

U N I V E R Z I T A P A L A C K É H O V O L O M O U C I

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**Příprava modifikovaných nanokompozitů $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ pro účely
selektivní detekce vybraných látek pomocí povrchem zesílené
Ramanovy spektroskopie**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vypracovala: Nikola Masarová
Vedoucí práce: RNDr. Václav Ranc, Ph.D.

Studijní program: B 1407 Chemie
Studijní obor: Aplikovaná chemie
Forma studia: prezenční

Olomouc 2014

PROHLÁŠENÍ:

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

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

V Olomouci dne

.....
Nikola Masarová

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych poděkovala RNDr. Václavu Rancovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, za cenné rady a především čas, který mi v průběhu vypracovávání poskytl. Také bych chtěla poděkovat pracovníkům Katedry fyzikální chemie za pomoc při experimentální práci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu v průběhu celého studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Nikola Masarová
Název práce:	Příprava modifikovaných nanokompozitů $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ pro účely selektivní detekce vybraných látek pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Václav Ranc, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2014
Abstrakt:	Cílem bakalářské práce byla modifikace magnetického kompozitu pro selektivní detekci vybraných biologických látek. Byl využit kompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$, jehož povrch byl pokryt funkčními skupinami, na které byl imobilizován selektor anti-imunoglobulin G. Metodou povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie byly studovány jednotlivé modifikace a vlivy vybraných parametrů na výše zmíněnou imobilizaci proteinu. Dle měření bylo dokázáno, že vybrané parametry opravdu mají vliv na modifikaci kompozitu. Na základě těchto výsledků byly vybrány nejvhodnější parametry pro povrchovou úpravu kompozitu, který sloužil pro účely selektivní detekce imunoglobulinu G z lidské krve.
Klíčová slova:	nanočástice, magnetické částice, kompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$, modifikace, imobilizace, avidin, anti-imunoglobulin G, SERS
Počet stran:	46
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification:

Author: Nikola Masarová

Title: The preparation of modified Fe₃O₄@Ag nanocomposites for purposes of selective detection of selected compounds by Surface Enhanced Raman Spectroscopy

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Physical Chemistry

Supervisor: RNDr. Václav Ranc, Ph.D.

The year of presentation: 2014

Abstract: The aim of this bachelor thesis was a modification of magnetic composite for selective detection of selected biological compounds. It was used composite Fe₃O₄@Ag, whose surface was covered by functional groups on which was immobilized the selector anti-immunoglobulin G. Single modifications and influences of selected parameters, on mentioned immobilization of protein, were studied by SERS. By measurement it was proved that the selected parameters actually have an influence on modification of the composite. Based on these results the most suitable parameters were chosen for the surface modification of the composite, which was used for the selective detection of immunoglobulin G from the human blood.

Keywords: nanoparticles, magnetic particles, composite Fe₃O₄@Ag, modification, immobilization, avidin, anti-immunoglobulin G, SERS

Number of pages: 46

Language: Czech

ÚVOD.....	8
TEORETICKÁ ČÁST.....	9
1. Historie nanotechnologií.....	9
1.1. Aplikace nanočástic ve světle moderní doby	9
2. Disperzní soustavy.....	10
2.1. Charakterizace disperzních soustav.....	10
3. Koloidní systémy	11
3.1. Klasifikace koloidních soustav	11
3.2. Vlastnosti koloidních soustav	12
3.2.2.1. Optické vlastnosti	12
3.2.2. Kinetické vlastnosti.....	12
3.2.3. Reologické vlastnosti	13
3.3. Metody přípravy koloidních soustav	13
3.3.1. Dispergační metody	14
3.3.2. Kondenzační metody	14
3.4. Charakterizace koloidních částic	14
3.4.1. DLS	15
3.4.2. UV-VIS	16
3.4.3. Mikroskopické metody	16
4. Kompozity pro SERS.....	16
4.1. Metody přípravy kompozitů pro SERS	17
4.1.1. Příprava nanočástic	17
4.1.1.1. Chemické metody.....	17
4.1.1.2. Fyzikální metoda	18
4.1.2. Příprava magnetických částic	18
4.1.3. Příprava magnetických nanokompozitů.....	19
4.2. Charakterizace magnetických nanokompozitů.....	20
5. Modifikace magnetických nanokompozitů a jejich aplikace	23
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
6. Chemikálie a pracovní postupy.....	27
6.1. Chemikálie.....	27
6.2. Experimentální vybavení.....	27
6.3. Experimentální postupy	27
6.3.1. Příprava roztoků.....	27
6.3.2. Navázání linkerů (kyselina-amin).....	28
6.3.3. Imobilizace avidinu.....	28
6.3.4. Imobilizace anti-imunoglobulinu G	29
VÝSLEDKY A DISKUZE	30
7. Imobilizace anti-imunoglobulinu G.....	30
7.1. Vliv parametrů funkčních skupin	32

7.2. Vliv koncentrace EDC a NHS	34
7.3. Vliv koncentrace proteinu	35
7.4. Aplikace modifikovaného nanokompozitu.....	40
ZÁVĚR	41
SUMMARY	42
SEZNAM LITERATURY	43

ÚVOD

Nanomateriály mají v dnešní moderní době obrovský aplikační potenciál. Jejich využití má široké spektrum a zasahuje od energetického průmyslu přes chemický a farmaceutický průmysl až po průmysl textilní a kosmetiku. Díky snadné přípravě a unikátním vlastnostem jsou hojně využívány nanočástice ušlechtilých kovů (Ag, Au) a to především pro analytické aplikace, jako je například metoda povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS – Surface Enhanced Raman Spectroscopy).

Stále častěji jsou také předmětem zájmu magnetické materiály, které jsou převážně tvořeny nanočásticemi oxidů železa. Vzhledem k jejich magnetickým vlastnostem s nimi může být manipulováno pomocí vnějšího magnetického pole a díky této schopnosti jsou tyto látky velice atraktivní v oblasti biomedicíny pro cílenou léčbu.

Spojením magnetických látek a nanočástic ušlechtilých kovů (Ag, Au) vzniká magnetický nanokompozit, který může být využit pro selektivní detekci vybraných biologických látek pomocí metody povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. Nanočástice ušlechtilého kovu zesilují Ramanův signál v důsledku rezonance povrchových plazmonů a magnetické nanočástice slouží jako nosič pro imobilizované proteiny (selektory), prostřednictvím kterých jsme schopni vychytat biologické látky ze vzorku. Pro samotnou imobilizaci je velice důležitá povrchová úprava nanokompozitu. Nejprve musí být povrch vhodně pokryt funkčními skupinami a aby mohlo dojít k navázání proteinu, musí být tyto funkční skupiny aktivovány pomocí aktivačních činidel. Konečný výběr imobilizovaných látek závisí na aplikaci, pro kterou je daná metoda vyvíjena. V případě předložené bakalářské práce je modifikace nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ studována pro následnou aplikaci selektivní detekce imunoglobulinu G ze vzorku lidské krve.

V teoretické části se tato práce zabývá základními pojmy, jako jsou disperzní soustavy, koloidní systémy a jejich charakterizace. V druhé části teorie jsou popsány metody přípravy nanočástic, magnetických částic, modifikovaných nanokompozitů a jejich možných aplikací. Experimentální část je zaměřena na použité chemikálie, vybavení a postupy pro povrchovou modifikaci kompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$. Ve finální výsledkové části je pojednáváno o studiu vlivu vybraných parametrů na imobilizaci proteinů na základě měření metodou SERS.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Historie nanotechnologií

Pojem nanotechnologie se především zásluhou významného pokroku v této oblasti v posledních letech dostává stále více do povědomí veřejnosti nejen prostřednictvím odkazů v odborné literatuře, ale stále častěji i v masových médiích. První objevy a využití nanočástic, tedy částic nanometrických velikostí (10^{-9} m), jsou však datovány do období před naším letopočtem a pocházejí ze starověkého Egypta a Číny. Pokroky tehdejších civilizací vedly k objevu takzvaného „rozpuštěného zlata“, to bylo používáno nejen pro estetické účely, jako například při výrobě rubínového skla nebo barvení keramiky, ale i pro pokročilé účely v oborech medicíny. Zde se zlaté částice využívaly například v léčbě srdečních a sexuálních problémů, úplavice, epilepsie a nádorů nebo i pro diagnózu syfilis. Dalším z důležitých milníků na poli vývoje nanomateriálů byla dozajisté práce Faradaye, který v roce 1857 demonstroval přípravu koloidního zlata. Produkt získal redukci vodného roztoku tetrachlorozlatitanu. Termín koloid (z francouzského *colle*) byl zaveden Thomasem Grahamem v roce 1861. V následujících letech a desetiletích byly postupně získány koloidy i mnoha dalších kovů.¹

1.1. Aplikace nanočástic ve světle moderní doby

Současný trend v nanotechnologii je ovlivňován nejen vývojem a výzkumem v této oblasti, ale stále častěji i socioekonomickým tlakem na vývoj nových nanotechnologických produktů. Díky tomu se produkty obsahující nanočástice stále více dostávají do oblastí lidské činnosti. Nanočástice již tedy nejsou využívány jen pro specializované účely, jakými jsou například vývoj analytických systémů (separační metody na bázi nanočástic, využití nanočástic k přečištění a izolaci cílových látek)¹, katalýza (katalyzátory na bázi nanočástic železa), energetika (účinnější fotovoltaiické články)², ale například i v oděvním průmyslu (antibakteriální úprava textilu) a kosmetice.³

2. Disperzní soustavy

Disperzní soustava je tvořena disperzní fází, která je ve formě částic rovnoměrně rozptýlená ve spojitém disperzním prostředí. Pokud jsou v soustavě obsaženy dvě fáze, z nichž jedna tvoří disperzní fází a druhá disperzní prostředí, mluvíme o nestejnorodé (heterogenní) soustavě. Mezi částicemi disperzní fáze a disperzního prostředí potom existuje hranice, která se nazývá fázové rozhraní. Jestli je v soustavě obsažena pouze jedna fáze, která tvoří jak disperzní fází, tak i disperzní prostředí, pak je tato soustava stejnorodá (homogenní). V tomto případě je disperzní fáze v disperzním prostředí rozptýlena tak drobně, že zde neuvažujeme žádné fázové rozhraní.⁴

2.1. Charakterizace disperzních soustav

Disperzní soustavy můžeme charakterizovat podle velikosti disperzních částic nebo podle jejich tvaru.

Rozměr disperzních částic nám udává, jak jemně jsou částičky disperzní fáze rozptýleny v disperzním prostředí. Převrácená hodnota tohoto rozměru se nazývá stupeň disperzity. Soustava, jejíž disperzní částice mají všechny stejnou velikost, je uniformní (monodisperzní). V opačném případě hovoříme o neuniformní (polydisperzní) soustavě.⁵

Disperzní soustavy lze klasifikovat podle stupně disperzity dle následující tabulky.

	Velikost částic	Pozorování částic
Hrubé disperze	$10^{-6} \text{ m} < d < 10^{-5} \text{ m}$	viditelné okem nebo mikroskopem
Koloidní disperze	$10^{-6} \text{ m} < d < 10^{-9} \text{ m}$	viditelné ultramikroskopem nebo elektronovým mikroskopem
Analytické disperze	$d < 10^{-9} \text{ m}$	neviditelné i v elektronovém mikroskopu

Tabulka 1. Rozdělení disperzních soustav podle stupně disperzity.⁵

Podle tvaru částic rozdělujeme systémy na systémy s izometrickými a anizometrickými částicemi.

- 1) Systémy s izometrickými částicemi, tzv. globulárně disperzní systémy, mají částice ve všech třech prostorových směrech rozměrově přibližně stejné.
- 2) Systémy s anizometrickými částicemi mohou obsahovat částice protáhlé v jednom směru, ty se nazývají fibrilárně disperzní, nebo částice protáhlé ve dvou směrech a ty jsou označovány jako laminárně disperzní systémy.^{5,6}

3. Koloidní systémy

Rozměry částic koloidně disperzních soustav jsou velice malé, avšak plocha jejich fázového rozhraní je oproti množství rozptýleného fázového rozhraní velká. Nejen díky tomuto faktu mají koloidní systémy své specifické vlastnosti, díky nimž jsou významné.⁴

3.1. Klasifikace koloidních soustav

Koloidně disperzní systémy rozdělujeme do tří skupin.

- 1) Koloidní disperze (lyofobní) – obsahuje dvě fáze, které jsou oddělené fázovým rozhraním, můžeme tedy říct, že se jedná o heterogenní systém. Díky tomu, že nejsou stálé, se samovolně rozkládají a lze je připravit jak kondenzací z pravých roztoků, tak disperzací z makrofází.
- 2) Koloidní roztoky (lyofilní) – tento systém je homogenní, pouze jedna fáze tvoří jak disperzní podíl, tak i disperzní prostředí. Tyto roztoky jsou stálé a vznikají samovolným rozpouštěním.
- 3) Micelární koloidy (asociativní) – vznikají slučováním molekul povrchově aktivních látek.^{4,5}

Některé koloidní soustavy jsou schopny přecházet z kapalné fáze do pevné fáze, ty se potom nazývají gely. Na tvorbě se mohou podílet lyofobní i lyofilní koloidy. Více však ke tvorbě přispívají koloidy lyofilní.⁴

3.2. Vlastnosti koloidních soustav

2.3.2.1. Optické vlastnosti

Dopadá-li elektromagnetické záření na koloidní soustavu, dochází současně k absorpci a rozptylu dopadajícího světla. Tyto dva efekty jsou nejvíce charakteristické pro koloidní systémy, ale jsou výrazně závislé na velikosti částic.

K rozptylu světla dochází pouze za předpokladu, že velikost částic je menší než vlnová délka dopadajícího záření. Rozptýlené světlo se následně šíří všemi směry s různou intenzitou. Podle velikosti částic můžeme určit, pod jakým úhlem se bude rozptylovat nejvíce světla. Jestliže velikost částic přesáhne velikost vlnové délky dopadajícího elektromagnetického záření, nedochází k rozptylu, ale k odrazu světla. Ten se projeví jako pozorovatelný zákal.⁷

Při absorpci záření se dostávají elektrony do vyšších energetických stavů, vlivem pohlcení energetického kvanta. Tím se zvyšuje vnitřní energie systému, která se poté přemění na energii tepelnou. Absorpci popisuje rovnice Lambert-Beerův zákon:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

kde I je intenzita záření prošlého látkou, I_0 je intenzita dopadajícího záření na látku, ε je absorpční koeficient, c je koncentrace látky a d je tloušťka vrstvy, kterou prochází paprsek.⁴

3.2.2. Kinetické vlastnosti

Další ze základních charakteristických vlastností koloidních soustav je Brownův pohyb. V koloidních systémech vykonávají částice termický pohyb, který je chaotický v důsledku srážek mezi částicemi. Tento pohyb můžeme pozorovat v mikroskopu a ultramikroskopu. Stejně jako rozptyl a absorpce, je Brownův pohyb závislý na velikosti částic. Se zvětšujícím se rozměrem částic dochází k omezení nebo k úplnému zániku tepelného pohybu.

Projevem Brownova pohybu je jev zvaný difúze, při němž dochází k pohybu molekul z místa o vyšší koncentraci do místa o koncentraci nižší. Rychlost tohoto pohybu je závislá na poloměru částic. Čím větší poloměr, tím menší rychlost difúze.^{4,5}

K vyrovnávání koncentrací také dochází, pokud je disperzní systém oddělen semipermeabilní membránou od disperzního prostředí. Potom nastává jev zvaný osmóza, kdy dochází k průchodu disperzního prostředí (rozpouštědla) membránou do disperzního systému. Hnací silou tohoto jevu je osmotický tlak.⁶

Další významnou kinetickou vlastností koloidních soustav je sedimentace (usazování). K pohybu částic je zapotřebí gravitační nebo odstředivá síla, která je dodána například ultracentrifugou. Silové pole ultracentrifugy je řádově větší než zemská gravitace a tím lze efektivně urychlit ustálení sedimentační rovnováhy a také dosáhnout i sedimentace částic o menším efektivním poloměru.^{4,5}

3.2.3. Reologické vlastnosti

Reologie je věda, která se zabývá tokem a deformací hmoty vlivem vnějších mechanických sil. Dochází-li vlivem vnější síly k deformaci soustavy a po zániku této síly k následnému navrácení do původního stavu, mluvíme o elastickém chování. Chování, které je charakteristické pro tuhé látky. Jestliže vlivem vnější síly dochází k toku hmoty a po odstranění této síly k zastavení toku, nikoliv však obrácení, hovoříme potom o viskózním chování. To je charakteristické pro jednoduché tekutiny. Chování řady koloidních systémů se pohybuje mezi těmito dvěma extrémy a nazýváme jej viskoelastické.⁵

3.3. Metody přípravy koloidních soustav

U přípravy koloidů hrají důležitou roli vlastnosti vznikajícího systému, respektive vzájemné působení mezi disperzní fází a disperzním prostředím.

Pokud se jedná o přípravu lyofilních koloidů, jedná se o klasickou přípravu roztoku, tedy smíchání dvou složek, kterou lze urychlit zvýšením teploty. V případě lyofobních koloidů je příprava poněkud složitější. Jelikož je nutné vytvořit nové fázové rozhraní, musí být vydána dostatečná práce.⁸ Obecně k přípravě lyofobních koloidů používáme dispergační a kondenzační metody.⁴

3.3.1. Dispergační metody

Pro přípravu koloidních částic dispergační metodou lze využít mletí, rozmělnování pomocí ultrazvuku nebo elektrické rozprašování. Díky těmto mechanickým silám lze získat potřebnou práci pro vznik koloidních částic z hrubé disperze.

Jednou z nejnovějších dispergačních metod je například laserová ablace, kde je vznik koloidní soustavy založen na působení laserového paprsku na vybraný materiál.⁴

V případě emulzí a lyosolů je vhodnější provádět mechanické rozmělnování v kapalném prostředí, kvůli zmenšení přitažlivých sil mezi částicemi a snížení povrchového napětí.⁵

3.3.2. Kondenzační metody

Zatímco u dispergačních metod se jedná o přípravu koloidních systémů z hrubé disperze, u kondenzačních metod je to přesně naopak. Koloidní systémy tedy vznikají z analytické disperze.⁴

K tomu, aby se vzniklý koloidní systém vylučoval z roztoku, je zapotřebí, aby byl roztok přesycený. Přesycení lze dosáhnout změnou teploty nebo složení rozpouštědla. V tomto případě se jedná o fyzikálních postup. Další možností je chemická přeměna látky rozpustné na látku v daném prostředí nerozpustnou. Koloidní částice tak lze získat z mnoha typů reakcí (srážecích, redukčních, oxidačních...)⁵

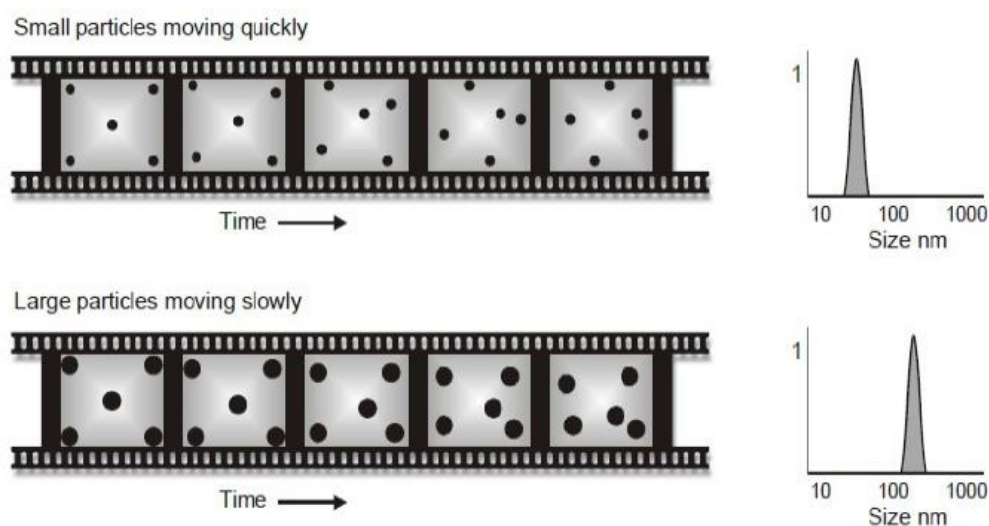
3.4. Charakterizace koloidních částic

Jak již bylo zmíněno, koloidní soustavy mají svoje specifické vlastnosti oproti ostatním soustavám. Tyto charakteristické vlastnosti, jako je například velikost a tvar částic, lze v praxi pozorovat například metodou dynamického rozptylu, UV-VIS spektroskopií nebo mikroskopickými metodami.⁹

3.4.1. DLS

Dynamického rozptylu světla, jakožto fyzikálního jevu (DLS – Dynamic Light Scattering), využívá metoda fotonové korelační spektroskopie (PCS – Photon Correlation Spectroscopy). Jedná se o nejčastěji využívanou metodu pro měření velikosti koloidních částic.¹⁰

Principem metody je měření časově závislého kolísání intenzity rozptýleného světla na částicích, které vykonávají Brownův pohyb.¹¹ Tím, že monochromatické světlo (laser) dopadá na částice, které konají pohyb, dochází ke změně vlnové délky dopadajícího světla a tato změna souvisí s velikostí částic. Pohyb částic v roztoku zobrazuje obrázek 1.¹⁰



Obrázek 1. Pohyb částic v roztoku, kdy malé částice se pohybují rychleji než velké částice.¹⁰

Pohyb, který částice vykonávají, také přímo úměrně ovlivňuje rychlost změny intenzity rozptýleného světla. Čím rychleji se částice pohybují, tím rychleji dochází ke změně intenzity.¹¹

Díky tomu, že metodou DLS měříme nanočástice v jejich roztocích, nedochází k vyschnutí kapky vzorku a případně k druhotnému shlukování částic, což je obrovskou výhodou této metody.¹²

3.4.2. UV-VIS

UV/Vis spektroskopie se využívá v nanomateriálové chemii především k prvotní charakterizaci připravených částic nebo jejich útvarů. Z tvaru a průběhu absorpčního spektra lze přibližně určit míru polydisperzity a velikost částic.

3.4.3. Mikroskopické metody

Mikroskopickou metodu, která zkoumá velikost částic a zároveň i jejich tvar, je transmisní elektronová mikroskopie (TEM – Transmission Electron Microscopy).¹² Základním fyzikálním principem je interakce elektronů se studovaným materiálem. U elektronů dopadajících na vzorek ve formě fólie dochází k pružným a nepružným interakcím uvnitř vzorku. Při pružném rozptylu dochází ke změně hybnosti v důsledku odklonění původní trajektorie vlivem interakce elektronů s elektrostatickým potenciálem jader atomů. U nepružného rozptylu dochází ke ztrátě energie v důsledku interakce elektronů s elektronovým obalem atomu.¹³

Dále pro určení velikosti částic můžeme využít skenovací elektronovou mikroskopii (SEM – Scanning Electron Microscopy).¹² Principem těchto mikroskopů je emise odražených elektronů, která se převádí v detektoru na optický signál.¹⁴ Další mikroskopické metody, jež můžeme využít ke zkoumání velikosti částic, jsou například: mikroskopie atomárních sil (AFM - Atomic Force Microscopy) nebo skenovací mikroskopie založená na tunelovacím jevu (STM - Scanning Tunneling Microscopy).¹²

4. Kompozity pro SERS

Kompozity jsou heterogenní látky tvořené ze dvou nebo více fází. Jednou z fází je matrice, která má pojivovou funkci a považujeme ji za spojitou část. Další fáze kompozitu jsou nespojité a ty nazýváme plniva. Tyto fáze mají většinou rozdílné chemické složení a odlišné mechanické a fyzikální vlastnosti. Změnou objemového poměru daných fází můžeme ovlivnit vlastnosti výsledného kompozitu.¹⁵ V případě nanokompozitů musí být jedna ze složek o velikosti jednotek až desítek nanometrů.¹⁶

4.1. Metody přípravy kompozitů pro SERS

4.1.1. Příprava nanočástic

Nanočástice, především ušlechtilých kovů (Ag, Au), se mimo jiné využívají jako efektivní nástroje k zesílení Ramanova rozptylu. Vlivem dopadajícího záření na povrch nanočástic kovů vzniká silné elektromagnetické pole, v důsledku rezonance povrchových plazmonů. Tím že je analyt adsorbovaný na nanomateriálu, tedy v dosahu vzniklého elektromagnetického pole, zvyšuje svůj indukovaný dipól a tím pádem i intenzitu emitovaného záření. Díky tomuto zesílení je možné využívat Ramanovu spektrometrii i pro analyty s velmi nízkou koncentrací. Důležitou podmínkou pro zmíněné zesílení je příprava vhodného nanomateriálu.¹⁷

Pro přípravu nanočástic se využívají vybrané chemické (kondenzační) a fyzikální (dispergační) metody.¹²

4.1.1.1. Chemické metody

Nejpoužívanější chemickou metodou přípravy nanočástic, konkrétně nanočástic ušlechtilých kovů (Ag, Au), je příprava redukcí solí těchto kovů. Redukcí primárně vznikají zárodky, které pak postupně dorůstají až do velikosti nanočástic. Stříbrné nanočástice se velmi často připravují chemickou redukcí dusičnanu stříbrného borohydridem. Tato příprava závisí na teplotě, která by neměla výrazně překročit hodnotu 4 °C, aby nedocházelo k hydrolýze borohydridu na boráty (při vyšších teplotách), dále také na pH a na rozpouštědle, ve kterém dochází k redukcí. Volbou výše zmíněných parametrů pak lze měnit charakteristiku částic (velikost, tvar).¹² Další možnou přípravou stříbrných nanočástic je redukce dusičnanu stříbrného citrátem sodným. V této metodě hraje následnou důležitou roli citrátový anion, který stabilizuje vznikající stříbrné nanočástice.¹⁸ Výsledné nanočástice jsou tedy stabilnější a mají menší distribuci velikosti částic než při redukcí borohydridem a proto se mohou jevit jako vhodnější pro využití v SERS.¹⁹

Zlaté nanočástice lze získat stejnými chemickými redukcemi, přičemž redukovaná sůl je velmi často ve formě tetrahydrátu tetrachlorozlatité kyseliny.¹²

Vlastnosti vznikajících nanočástic lze částečně ovlivnit změnou poměru solí a redukčního činidla.

4.1.1.2. Fyzikální metoda

Příkladem fyzikální metody přípravy nanočástic je laserová ablace. Pomocí této metody lze připravit čisté nanočástice stříbra o velikosti jednotek až desítek nanometrů. Tyto nanočástice lze též poměrně dobře uplatnit v povrchově zesílené Ramanově spektroskopii. Při laserové ablaci záleží na vlnové délce a intenzitě použitého laseru, délce ozařování a také na typu rozpouštědla. Tyto faktory značně ovlivňují velikost částic. Největší vliv na velikost vzniklých částic má vlnová délka a intenzita laseru.¹⁸

4.1.2. Příprava magnetických částic

Magnetické nanočástice jsou díky svým magnetickým vlastnostem využívány v biotechnologiích a analytických aplikacích. Pokud se na magnetické nanočástice působí vnějším magnetickým polem, lze s nimi snadno manipulovat. Této možnosti se dá využít například u některých chemických reakcí, kdy lze vzniklé částice separovat ze směsi pomocí magnetu. Oddělení složek je vhodné pro zlepšení detekce, protože směs obsahuje různé příměsi, které tuto detekci negativně ovlivňují.²⁰

Nejběžněji jsou připravovány magnetické částice ve formě oxidů železa a to především oxid železitý v krystalové modifikaci γ -Fe₂O₃ (tzv. maghemit) a oxid železnato-železitý (tzv. magnetit).

Nejjednodušší a zároveň i nejpoužívanější metodou přípravy magnetických částic je chemická koprecipitace solí železa. Protokol je založen na srážení železnatých a železitých solí v zásaditém prostředí podle rovnice:



Vzniklý Fe_3O_4 se může dále oxidovat na $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. K důležitým faktorům, kterými se dá upravit velikost a tvar vznikajících částic, patří iontová síla, pH, teplota a hlavně poměr železnatých a železitých solí.

Magnetické částice se dají také připravit tepelným rozkladem prekurzorů, které obsahují železo. Typy rozpouštědla pro tuto metodu se vybírají podle toho, jak jsou schopné změnit bod varu celého systému. Pokud se používají rozpouštědla s nízkým bodem varu, vznikají převážně magnetické nanočástice obsahující oxid železitý. V opačném případě dochází ke vzniku větších magnetických nanočástic obsahující oxid železnatý (tzv. wustit).

Magnetické vlastnosti vznikajících částic mohou být negativně ovlivněny jevem, jako je například shlukování, který způsobuje vysoká povrchová energie částic. Proto je velice důležité stabilizovat vzniklé částice hned po syntéze. Stabilizace lze docílit pokrytím povrchu částic vrstvou, která zabrání částicím v další agregaci. Díky této modifikaci nejenže nedojde ke shlukování, ale také se zvýší biokompatibilita částic.²¹

Za účelem zvýšení aplikovatelnosti SERS i v případech, kdy analyt je součástí velmi složité matrice (biologické, klinické, technologické vzorky) se využívá spojení magnetických vlastností výše popsaných částic s částicemi, které efektivně zesilují Ramanovský signál (Au, Ag). Výsledkem jsou magnetické nanokompozity, které mají zcela nové vlastnosti a jsou pro tyto aplikace výhodnější.²²

4.1.3. Příprava magnetických nanokompozitů

Spojením aktivních látek (tzn. látek s magnetickými, elektrickými nebo jinými zajímavými vlastnostmi) a nanočástic zejména ušlechtilých kovů, vznikají velice efektivní nanokompozitní materiály s širokou škálou využití (ukládání informací, magnetické chlazení, antiseptická vlákna apod.).²³ Bylo prokázáno, že magnetické kompozity vykazují mnohem větší magnetismus než samotné magnetické částice.²²

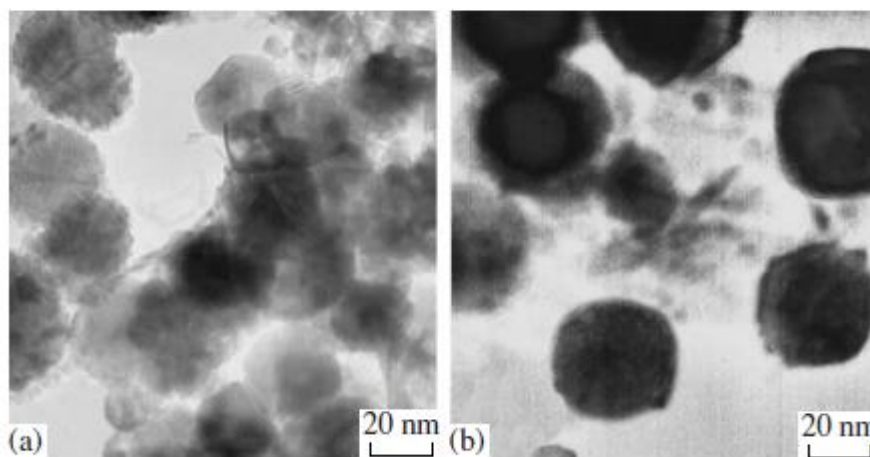
Často připravované jsou kompozity obsahující magnetit nebo maghemit a nanočástice stříbra nebo zlata.

Jedním z možných příkladů magnetického nanokompozitu je $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$. K jeho přípravě se využívají předem syntetizované magnetické nanočástice Fe_3O_4 a nanočástice stříbra, které se redukují přímo na jejich povrchu.¹² Jednou z možností je redukce stříbrné soli glukózou. Glukóza je v reakci důležitá pro růst částic Ag a množství dusičnanu stříbrného (AgNO_3) ovlivňuje výslednou tloušťku stříbrné vrstvy. Původně černé částice Fe_3O_4 se zbarví do hněda vlivem potažení stříbrnými částicemi.²⁴ Další redukcí, kterou můžeme použít pro přípravu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$, je redukce stříbrné soli chitosanem (biopolymer). Chitosan při zásaditém pH a zvýšené teplotě redukuje stříbrné ionty z roztoku. V konečném nanokompozitu funguje jako pojivo mezi stříbrnými nanočásticemi a magnetickým jádrem. Změnou koncentrace AgNO_3 v roztoku lze ovlivnit velikost stříbrných nanočástic (od 7 do 17 nm) na povrchu Fe_3O_4 .¹²

4.2. Charakterizace magnetických nanokompozitů

Chemické a fyzikální vlastnosti magnetických kompozitů lze charakterizovat různými metodami. Nejvíce využívané jsou metody mikroskopické, rentgenové nebo magnetizační.

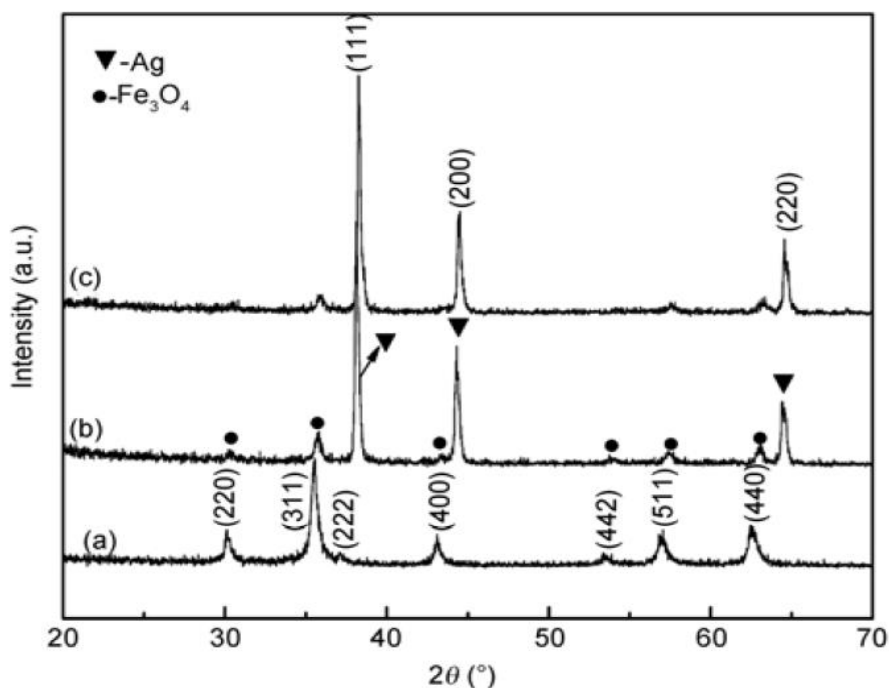
Mezi mikroskopické metody patří elektronová transmisní mikroskopie TEM. Princip elektronové transmisní mikroskopie je popsán v kapitole 3.4.3.



Obrázek 2. Transmisní elektronová mikroskopie Fe_3O_4 částic a kompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$.²²

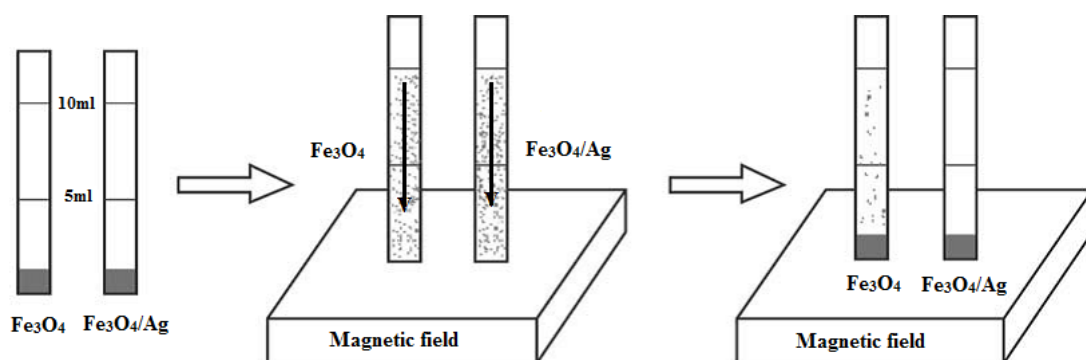
Na obrázku 2. je porovnání snímků částic Fe_3O_4 a kompozitních částic $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$. Je zřejmé, že magnetické částice i magnetický kompozit mají kulovitý tvar s rozdílem, že částice $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ jsou od sebe lépe odděleny. Z lepší separace lze vyvodit, že magnetický nanokompozit bude mít vyšší hustotu než částice Fe_3O_4 . Z hodnot mikroskopu lze také pozorovat, o kolik se změnila průměrná velikost částic. V tomto konkrétním případě byla změněna průměrná velikost z 30 nm na 40 nm. Je tedy jasné, že data z TEM jsou velice důležitá pro důkaz tvaru a velikosti zkoumaných částic.²²

Pro charakterizaci krystalové struktury nanokompozitů se využívá rentgenová difrakce (XRD – X-ray Diffraction). Princip této metody spočívá v průchodu monochromatického rentgenového záření vzorkem. Při dopadu záření na vzorek dochází k rozkmitání elektronů a ty se pak stávají zdrojem sekundárního rentgenového záření.²⁵ Princip metody lze ilustrovat například v záznamu výsledku zobrazeného na obrázku 3. Je patrné, že se zvyšujícím se poměrem Ag dochází ke zvýšení intenzity příslušného analytického signálu (označený trojúhelníkem). Z grafu můžeme dle difrakčních píků také určit, jakou krystalovou strukturu mají dané vzorky.²⁶



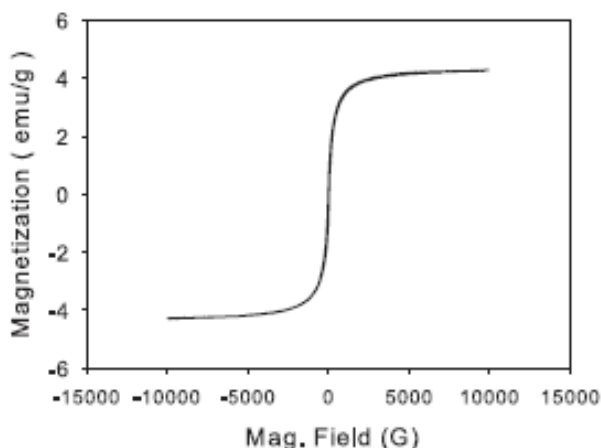
Obrázek 3. XRD vzory Fe_3O_4 (a), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ s poměrem Ag/Fe 1:10 (b) a 1:20 (c).²⁶

Magnetické vlastnosti kompozitů charakterizujeme magnetizačními metodami. Nejjednodušší z nich je separace pomocí vnějšího magnetického pole. Na obrázku 4. je znázorněn experiment, při kterém se porovnává magnetismus částic Fe_3O_4 a nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$. Z tohoto schématu je zřetelné, že magnetický nanokompozit má lepší magnetické schopnosti než magnetické částice Fe_3O_4 .



Obrázek 4. Magnetické chování Fe_3O_4 a $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ při experimentu.(převzato a upraveno)²²

Dále se magnetické vlastnosti měří VSM magnetometrií. Tato metoda je založena na měření magnetického momentu vzorku, který je rozkmitán kolmo k magnetickému poli, ve kterém je umístěn.²⁷ VSM magnetometrie pracuje na principu Faradayova zákona o indukci, který říká, že změna magnetického pole v čase generuje elektrické pole v uzavřeném elektrickém obvodu. Toto elektrické pole je měřitelné a poskytuje informaci o změně magnetického pole. Čím větší je indukovaný proud, tím větší je magnetizace.²⁸ Při měření magnetických vlastností Fe_3O_4 a $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ částic magnetometrem bylo opět dokázáno, že $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ částice vykazují větší magnetismus.²² Na obrázku 5. vidíme výslednou hysterezní křivku nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ měřeného při teplotě 300 K v aplikovaném magnetickém poli. Tato hysterezní křivka je typická pro superparamagnetické materiály. Tento výsledek tedy dokazuje, že nanokompozit vykazuje superparamagnetismus při teplotě 300 K.²⁹

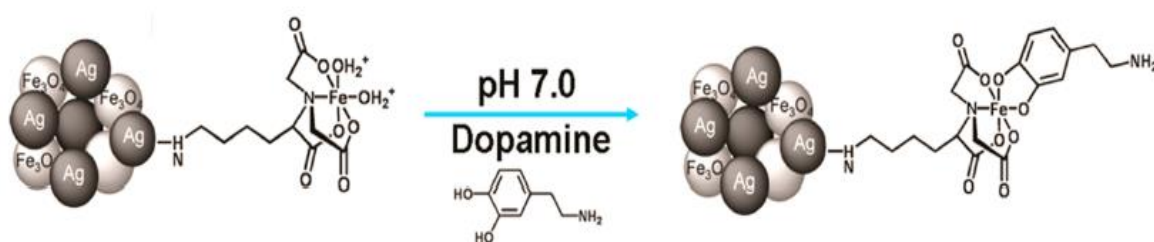


Obrázek 5. Hysterezní křivka Fe₃O₄@Ag nanočástic měřená při 300 K.²⁹

5. Modifikace magnetických nanokompozitů a jejich aplikace

Na základě výše zmíněného (kapitola 4.1.2.), magnetické kompozity se skládají z magnetických částic (nejčastěji magnetit a maghemit) a nanočástic ušlechtilých kovů (nejčastěji Ag a Au). Díky tomu, že mají kompozity magnetické vlastnosti, můžeme s nimi cíleně manipulovat a tak od nich separovat nežádoucí příměsi z roztoku pomocí vnějšího magnetického pole. Vzhledem k tomuto faktu mají magnetické kompozity pozitivní dopad na detekci, a proto jsou často využívány pro účely SERS. Detekce pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie za přítomnosti magnetických nanočástic má obrovskou výhodu, co se týče úpravy vzorků a času analýzy. Oproti ostatním běžným metodám, jako je například HPLC nebo MS, se nemusejí vzorky složitě upravovat, a tím je tedy SERS jednodušší a méně časově náročný. Další výhodou je možnost detekce samotné molekuly s poměrně vysokou mírou selektivity. Úpravou povrchu příslušných nanočástic může být selektivita této metody ještě zvýšena. Pro tuto povrchovou modifikaci jsou nejčastěji využívány protilátky nebo jiné selektory a takto modifikované nanokompozity mají využití v různých aplikacích, jejichž příklady budou uvedeny níže.³⁰

Modifikacemi se ve své práci zabývali Václav Ranc a kol.³⁰ Magnetický nanokompozit byl v tomto experimentu tvořen magnetitem spojeným se stříbrnými nanočásticemi O-karboxymethyl chitosanem, který byl užitečný pro zesílení citlivosti vzhledem k přítomnosti karboxylových skupin. Povrch nanokompozitu byl upraven potažením stříbrných nanočástic kyselinou železo-nitrilotrioctovou (Fe-NTA). Modifikovaný nanokompozit byl využit pro selektivní detekci dopaminu v umělém mozkomíšním moku a myším striatu. Magnetický kompozit sloužil pro separaci cílového analytu od nežádoucích látek v matrici a následná modifikace pomocí Fe-NTA umožnila specifickou detekci dopaminu metodou SERS.



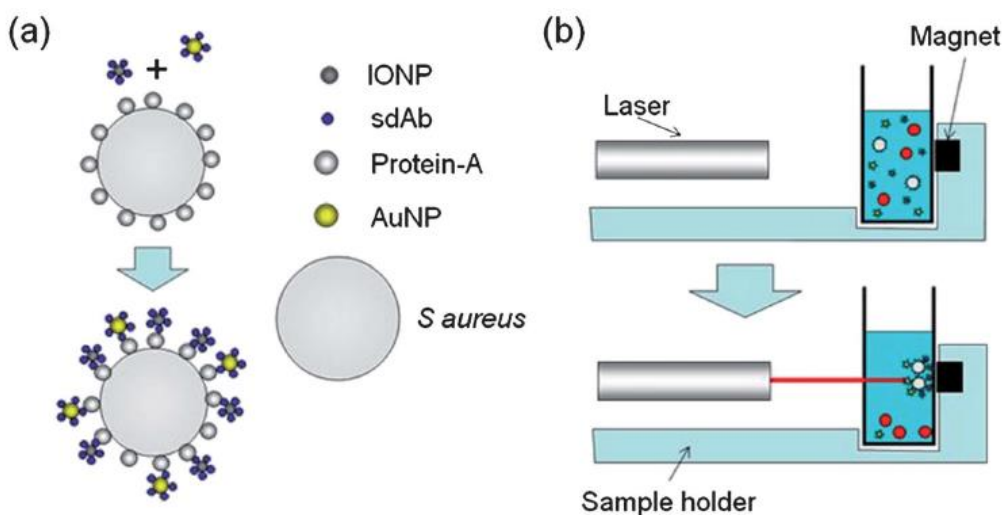
Obrázek 6. Schématické znázornění selektivního vázání dopaminu na modifikovaný nanokompozit m@cmCH@Ag@Fe-NTA.³⁰

Výhodami této metody jsou jednoduchá separace, selektivita a měření při velmi nízkých koncentracích. Oproti metodám, jako je ECD nebo MS, které byly dříve využívány ke stanovení hladiny dopaminu, není potřeba složitých úprav vzorků (odpaření rozpouštědla, zakoncentrování, apod.) a díky tomu je tato metoda rychlá. Další nespornou výhodou je univerzálnost, která spočívá především v možném nahrazení Fe-NTA jinou protilátkou pro stanovení jiných nízkomolekulárních cílů.

Modifikovanými nanokompozity se také zabývali Michael Y. Sha a kol.³¹ K experimentu bylo využito zlatých nanočástic, na nichž byly adsorbované protilátky anti-her2 (lidský epidermální růstový receptor) a celý tento systém byl potažen ochrannou a funkcionalizovanou vrstvou oxidu křemičitého. Dalším systémem, který byl zde využit, byly magnetické kuličky spojeny s protilátkou anti-EpCAM (anti-epiteliální buněčná adhézní molekula). Tyto dva kompozity byly použity pro rychlou a citlivou detekci cirkulujících nádorových buněk (CTC) přímo v lidské krvi.

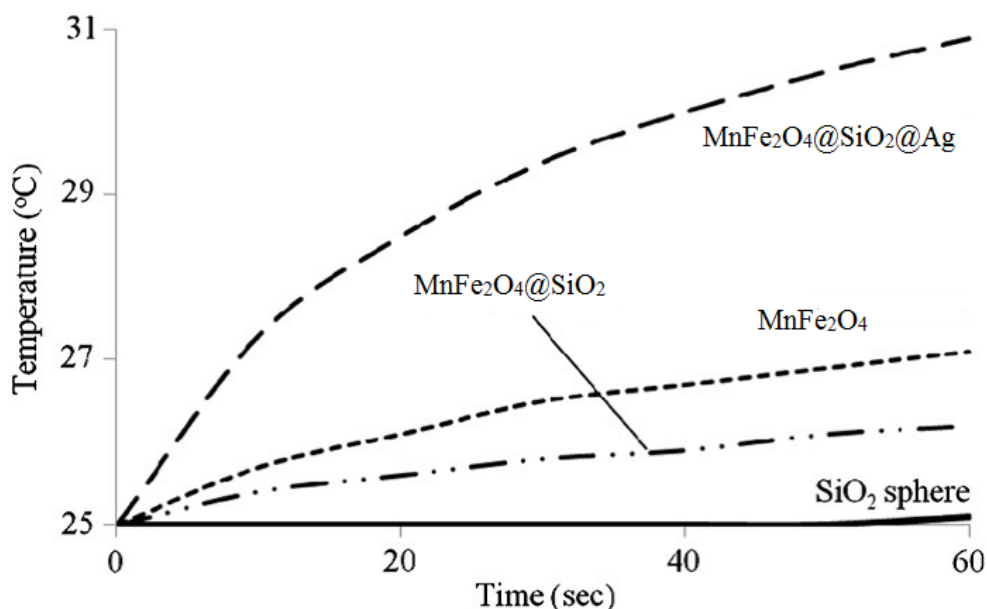
Magnetický systém umožňoval zachycení CTC tím, že se specificky navázal na nádorovou buňku pomocí protilátky anti-EpCAM. Rychlou a citlivou detekci zajistil systém obsahující zlaté nanočástice a protilátku anti-her2, neboť receptor her2 je obsažený na povrchu membrán nádorových buněk a díky protilátce anti-her2, navázané na nanočásticích zlata, je snadno rozpoznán. Kombinace těchto dvou kompozitů tedy umožnila rychlou a citlivou detekci CTC přímo v lidské krvi. Navíc byla tato metoda levná oproti běžným cytometrickým měřením.

Philip Drake a kol.³² vytvořili dva typy nanočástic, které měly sloužit pro detekci bakterie *Staphylococcus aureus*. Prvním typem byly nanočástice na bázi oxidu železa potažené oxidem křemičitým. Druhým typem byly zlaté nanočástice potažené kyselinou 4-merkaptobenzoovou. Oba typy nanočástic byly konjugovány s jednotlivými doménami protilátek (sdAb) specifickými pro *Staphylococcus aureus*, které se selektivně váží na protein A obsažený na povrchu bakterie. Zlaté nanočástice potažené kyselinou 4-merkaptobenzoovou sloužily k zesílení intenzity signálu SERS a dané protilátky na nich navázané pomocí EDC (pro aktivaci COOH) zajistily selektivitu. Nanočástice oxidu železa byly taktéž potaženy sdAb pomocí DMA a umožnily to, že bakterie byly zachycené na předem určeném místě vlivem magnetického pole, což vedlo k ulehčení detekce (obrázek 7.).



Obrázek 7. a) Schématické znázornění procesu označování. Po tomto procesu je buňka *S. aureus* magnetická a aktivní pro SERS. b) Ilustrace metody detekce.³²

Jr-Jie Lai a kol.³³ připravili magnetický vícejaderný nanokompozit $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ag}$. Magnetické nanočástice byly syntetizovány chemickou koprecipitací a jejich potažení vrstvou SiO_2 bylo dosaženo sol-gel metodou. Na vrstvě SiO_2 byly vypěstovány stříbrné nanočástice a výsledný vícejaderný kompozit byl připraven za přítomnosti glukózy, která sloužila jako redukční činidlo. Tento experiment demonstroval, že takovýto nanokompozit dokáže generovat teplo vlivem vnějšího střídavého magnetického pole, ze kterého čerpá energii a přeměňuje ji na zmíněné teplo. Tento fakt je velice slibný pro metodu zvanou hypertermie, která je založena na zahřívání nádorů, neboť vlivem zvýšené teploty dochází k poškození nemocné buňky, aniž by byla narušena zdravá tkáň. Navíc nanokompozit vykazuje pod infračerveným zářením silné foto-termální vlastnosti a na základě tohoto měření bylo zjištěno, že u vícejaderného nanokompozitu podstatně stoupá teplota s časem oproti samotným komponentům (obrázek 8.).



Obrázek 8. Teplotní křivky SiO_2 , MnFe_2O_4 , $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ a $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ag}$ v závislosti na čase měření infračerveným zářením (808 nm). (převzato a upraveno)³³

Měřením pomocí SERS bylo dokázáno, že $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ag}$ nanokompozit silně zesiluje Ramanův signál a že vykazuje vysokou citlivost k molekulám Rhodaminu 6G, které jsou využívány pro značení poškozených buněk.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6. Chemikálie a pracovní postupy

6.1. Chemikálie

Kyselina 6-aminohexanová (p.a., Sigma-Aldrich), butylamin (p.a., Sigma-Aldrich), kyselina 8-aminooktanová (p.a., Sigma-Aldrich), hexylamin (p.a., Sigma-Aldrich), N-hydroxysulfosuccimide sodium zkr. NHS (p.a., Sigma-Aldrich), 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide zkr. EDC (p.a., Sigma-Aldrich), avidin (p.a., Sigma-Aldrich), anti-imunoglobulin G zkr. anti-IgG (p.a., Sigma-Aldrich), Fe₃O₄@Ag (Připravené dle postupu popsaneho Markovou a kol.³⁴). Veškeré uvedené chemikálie byly dále použity bez dalšího čištění.

6.2. Experimentální vybavení

Částice byly charakterizovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) na přístroji JEM 2010 (Jeol, Japonsko) s napětím 160 kV a rozlišením 1,9 Å. K měření Ramanových spekter byl využit přístroj DXR Raman (Thermo Scientific, U.S.A.), kde vzorky byly měřeny při vlnové délce laseru 532 nm a výkonu laseru 2mW. Každé spektrum bylo složeno s 32 mikroskenů a expoziční čas byl 1 s. Pro získání absorpčních spekter byl využit FT-IR spektrometr Nicolet iS5 (Thermo Scientific, U.S.A.). I v tomto případě bylo každé spektrum složeno s 32 mikroskenů.

6.3. Experimentální postupy

6.3.1. Příprava roztoků

Zásobní roztoky byly připraveny přesným navážením nebo odměřením dané látky, která byla kvantitativně převedena do 25 ml baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku. Výsledná koncentrace roztoků byla $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Roztoky kyselin byly připraveny navážením 0,328 g kyseliny 6-aminohexanové a 0,398 g kyseliny 8-aminooktanové, které byly následně rozpuštěny v destilované vodě. Pro přípravu roztoků aminů bylo odměřeno 240 μl butylaminu a 330 μl hexylaminu a toto množství bylo následně doplněno destilovanou vodou do 25 ml odměrné baňky. K přípravě roztoků EDC a NHS bylo naváženo 0,743 g EDC a 0,543 g NHS. Roztoky avidinu a anti-IgG o koncentraci 1 mg/ml byly připraveny navážením 1 mg avidinu a 1 mg anti-IgG, které byly následně rozpuštěny v 1 ml destilované vody.

6.3.2. Navázání linkerů (kyselina-amin)

Nejprve byly připraveny dvě dvojice kyselina-amin o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Roztok kyseliny 6-aminohexanové byl smíchán s roztokem butylaminu (dvojice A) do eppendorfký o objemu 1 ml a stejně tak byla smíchána kyselina 8-aminooktanová s roztokem hexylaminu (dvojice B). U uvedených dvojic byly studovány poměry: 1:1, 2:1, 1:2 a 1:3 a délka jejich uhlíkatého řetězce. Na základě měření Ramanovy spektroskopie bylo dokázáno, že dvojice B v poměru 1:3 je nejvýhodnější pro další postupy.

6.3.3. Imobilizace avidinu

Aby mohlo dojít k imobilizaci proteinu na magnetický nanokompozit, byla nutná aktivace karboxylových kyselin, které bylo dosaženo přidavkem aktivačních činidel EDC a NHS. K 90 μl kompozitu s 10 μl dvojice B v poměru 1:3 bylo přidáváno 10 μl roztoku EDC a NHS, který byl připraven v poměru 1:1 o koncentracích: $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $7,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Po aktivaci (cca 20 minut) byly směsi promyty a následně k nim bylo přidáno 10 μl avidinu. Dle vyhodnocení sledovaných koncentrací EDC a NHS pomocí zesílené Ramanovy spektroskopie byla jako nejvhodnější určena koncentrace $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, která byla využita pro následující kroky.

Ke kompozitu o objemu 90 μl s 10 μl dvojice B v poměru 1:3 a s přidavkem aktivačních činidel o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl přidán avidin o objemu 5 μl , 10 μl , 15 μl a 20 μl . Sledované koncentrace avidinu byly v rozmezí od $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Jako nejlepší koncentrace proteinu byla stanovena koncentrace $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a ta byla využita při finálním kroku imobilizace anti-IgG.

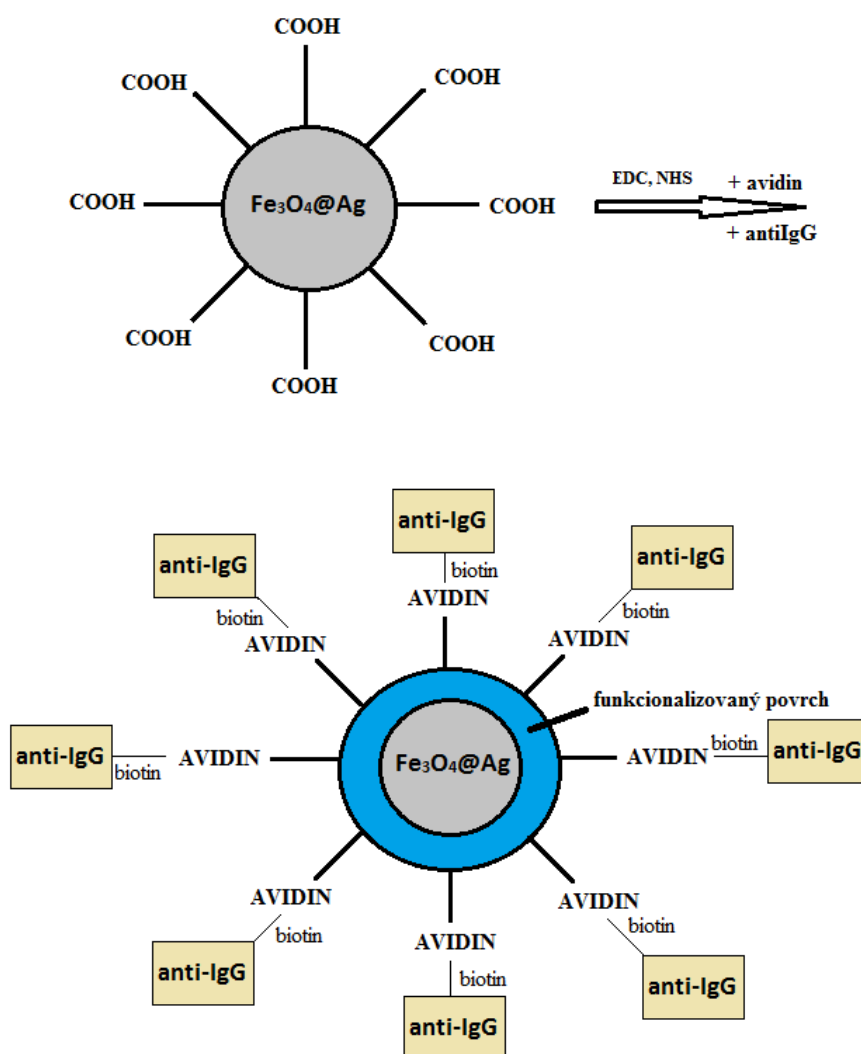
6.3.4. Imobilizace anti-imunoglobulinu G

K imobilizaci anti-IgG bylo smícháno 10 μ l roztoku dvojice B v poměru 1:3 s 90 μ l kompozitu. Po přidavku 10 μ l EDC a NHS o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla celá směs promyta destilovanou vodou. V konečné fázi bylo přidáno 10 μ l avidinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a 10 μ l anti-IgG o stejné koncentraci.

VÝSLEDKY A DISKUZE

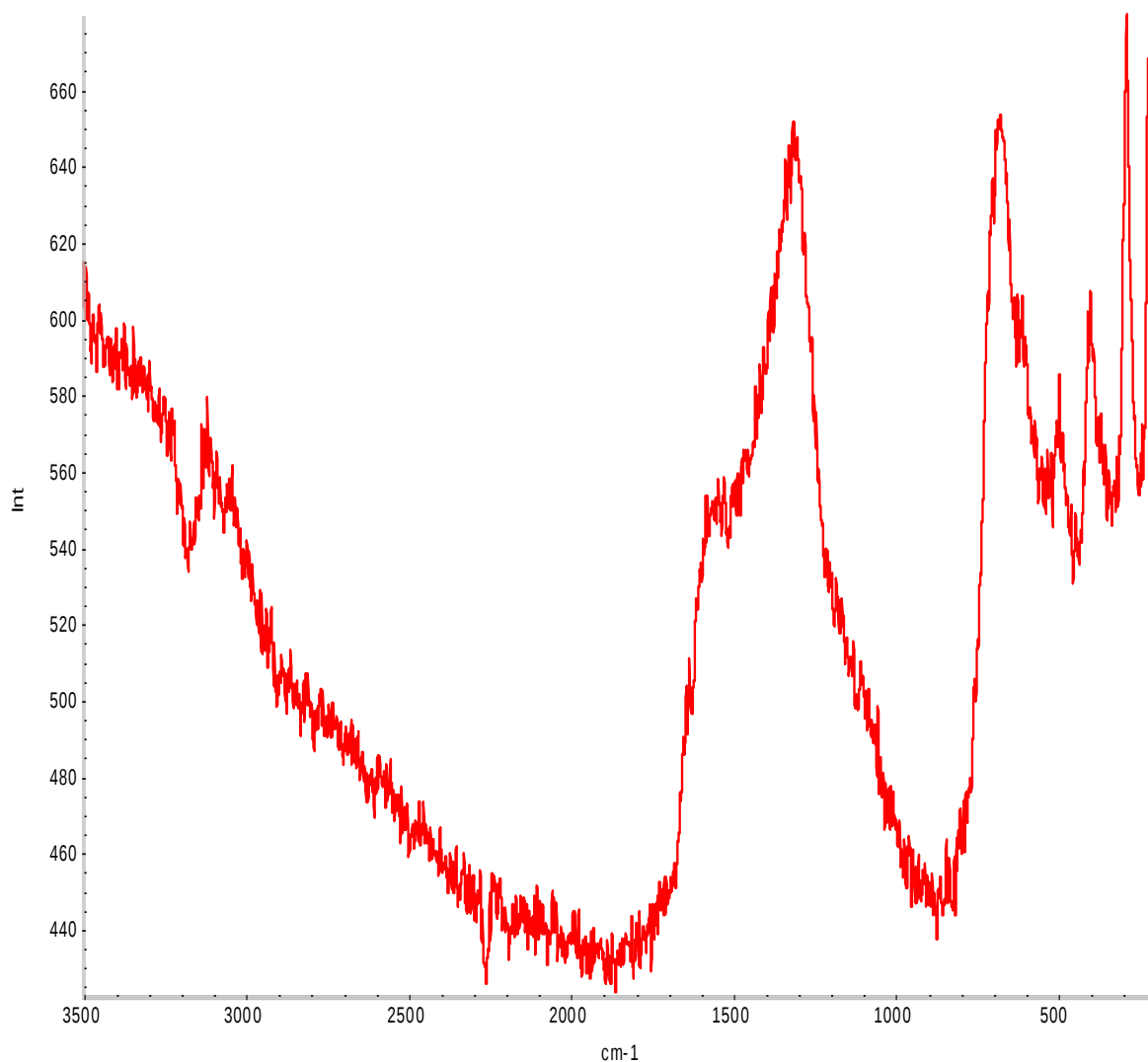
7. Imobilizace anti-imunoglobulinu G

Cílem této práce je studium vlivu vybraných parametrů na imobilizaci selektoru anti-IgG na magnetický nanokompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$. Byl studován vliv poměrů směsi kyselina-amin a délka uhlíkatého řetězce, vliv koncentrace aktivačních činidel EDC a NHS a vliv koncentrace proteinu avidin. Takto modifikovaný nanokompozit byl dále využit pro selektivní detekci imunoglobulinu G (IgG) ze vzorku.



Obrázek 9. Modifikace nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$.

V první řadě byl Ramanovým spektroskopem proměřen samotný nanokompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ a jeho spektrum je uvedeno na obrázku 10.

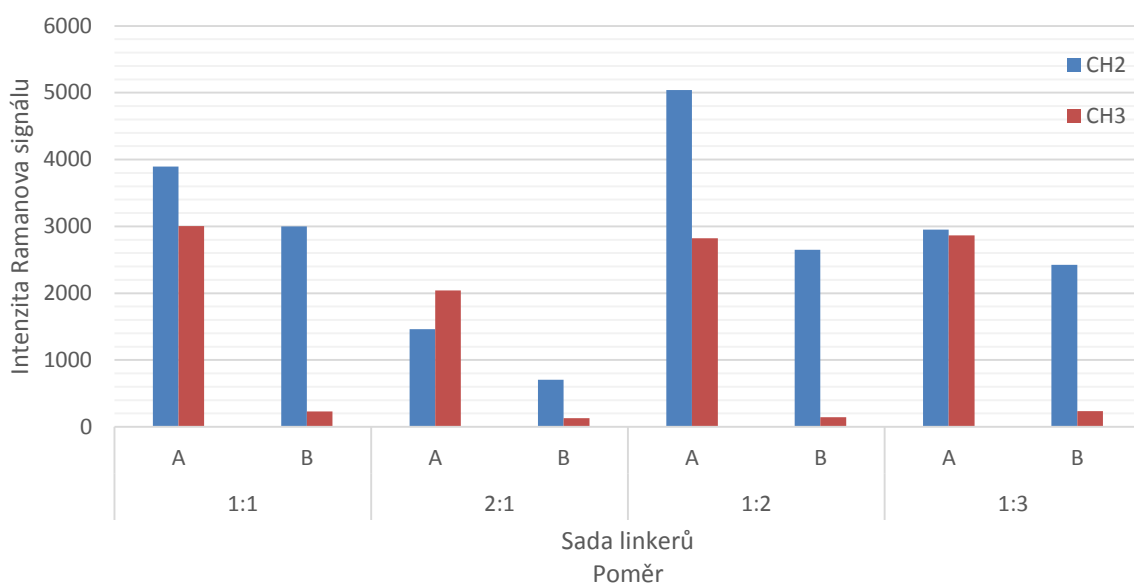


Obrázek 10. Spektrum čistého nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$.

Spektrum čistého nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ vykazuje pásy v oblasti 250 – 350 cm^{-1} . Tyto pásy odpovídají navázanému stříbru, respektive interakci mezi stříbrnými nanočásticemi a použitým polymerem (karboxymetylchitosan), díky kterému je toto stříbro navázáno na magnetickém jádře.

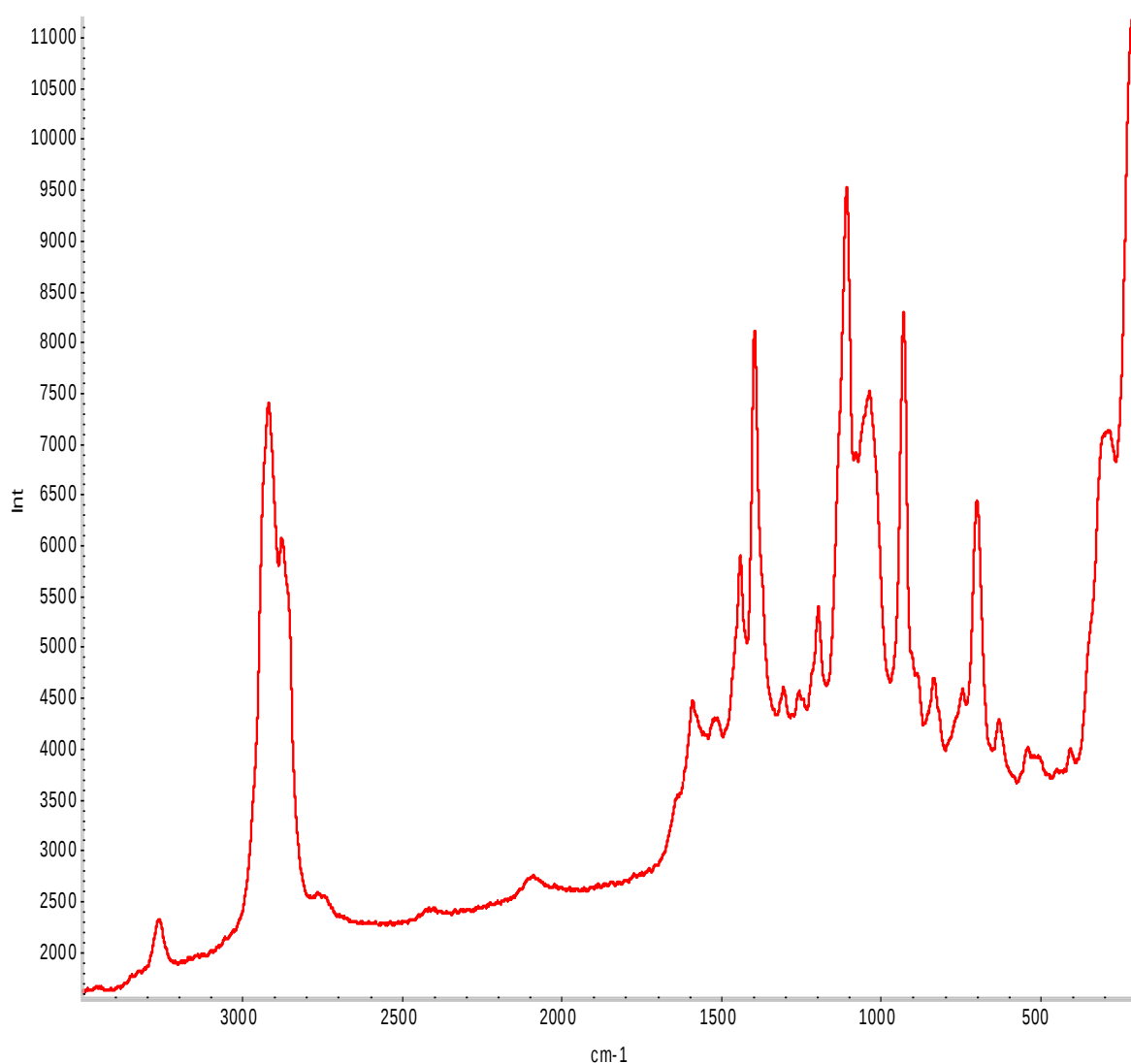
7.1. Vliv parametrů funkčních skupin

Byl sledován vliv poměrů $\text{CH}_2:\text{CH}_3$ skupin ve směsi kyselina-amin a také délka uhlíkatého řetězce, která se v našem případě lišila o dva uhlíky (4 – 6 a 6 – 8), aby nedošlo ke sterické zábraně. Řetězec s osmi uhlíky dosahoval dále od kovu a tak se na stříbrné nanočástice mohlo efektivněji navázat větší množství proteinu (avidin), než tomu bylo u šesti-uhlíkatého řetězce, který byl blíže ke kovu.



Obrázek 11. Závislost intenzity Ramanova signálu na složení směsi linkerů.

Dvojice A značí směs butylaminu a kyseliny 6-aminohexanové (4 a 6ti uhlíkaté řetízky). Dvojice B je směsí hexylaminu a kyseliny 8-aminooktanové (6 a 8mi uhlíkaté řetízky). Z obrázku 11. je patrné, že skutečný podíl, který byl navázán a podíl, který byl přidáván v průběhu reakce, je rozdílný. To může být způsobeno rozdílnou schopností řetízku navázat se na nanokompozit. Proto byla výhodnější směs stanovena z praxe, přičemž bylo nejlepšího rozložení těchto skupin pro největší navázání anti-IgG dosaženo za použití směsi B v poměru 1:3.



Obrázek 12. Spektrum nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ po navázání linkerů (aminokyselin a aminů).

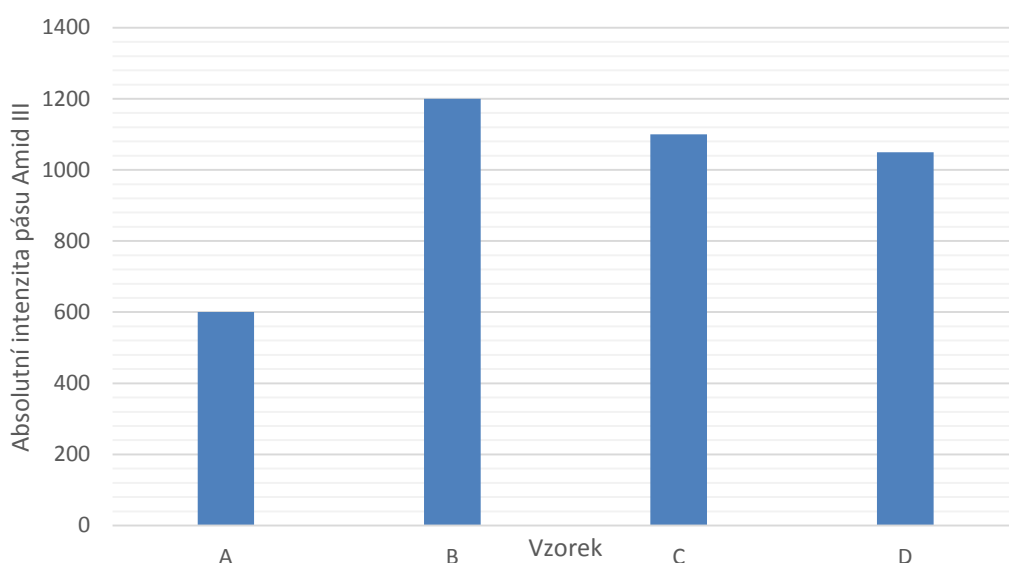
Na nanokompozit byla navázána směs kyseliny 8-aminooktanové s hexylaminem v poměru 1:3 a o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Po navázání těchto linkerů na nanokompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ jsou v Ramanově spektru zřetelné pásy okolo 3000 cm^{-1} . Tyto pásy charakterizují navázaný uhlíkatý řetízek z pohledu CH_2 a CH_3 skupin.

7.2. Vliv koncentrace EDC a NHS

Pro aktivaci navázaných karboxylových skupin byl použit roztok aktivačních činidel EDC a NHS, u něhož byl sledován vliv změny koncentrace. Činidla EDC a NHS jsou využita pro kovalentní vazbu mezi karboxylovou skupinou a aminoskupinou, kterou ve své struktuře obsahuje avidin. Na změně koncentrace aktivačních činidel závisí navázání proteinu na karboxylové skupiny. Měřením bylo dokázáno, že u koncentrace $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ nedošlo k navázání proteinu vůbec, zatímco u koncentrace $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl již protein navázán a tato koncentrace byla tedy určena jako nejvýhodnější pro aktivaci funkčních karboxylových skupin. Další zvyšování koncentrace nevedlo k žádným změnám.

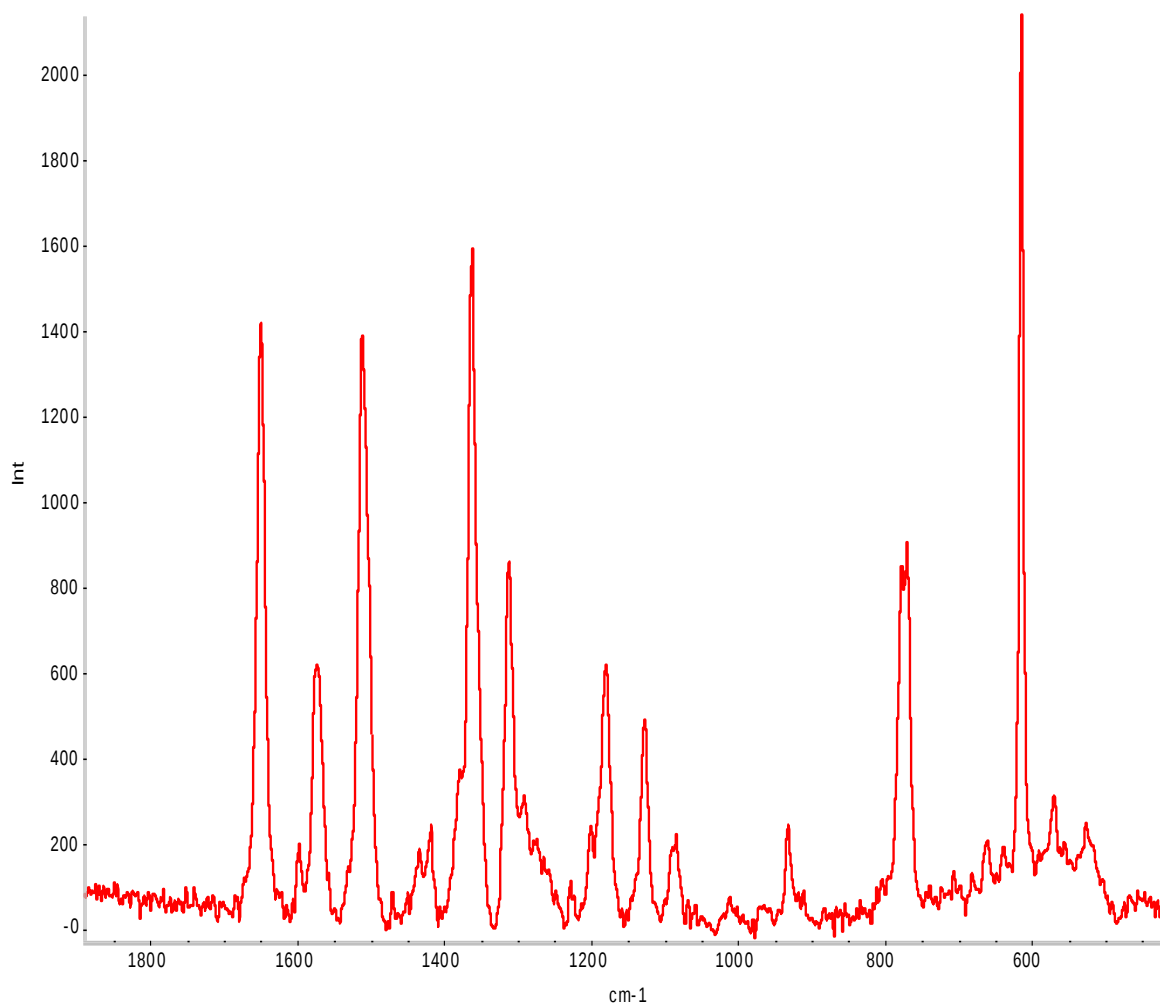
7.3. Vliv koncentrace proteinu

Posledním parametrem, který byl studován, byla koncentrace přidávaného proteinu avidin. Koncentrace byly sledovány v rozmezí od $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Se změnou koncentrací proteinu docházelo ke změnám intenzity Ramanova signálu spektrálního pásu Amid III, který charakterizuje část struktury imobilizovaného proteinu. Dle měření byla nejvyšší intenzita výše zmíněného pásu proteinu při koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (viz obrázek 13.).



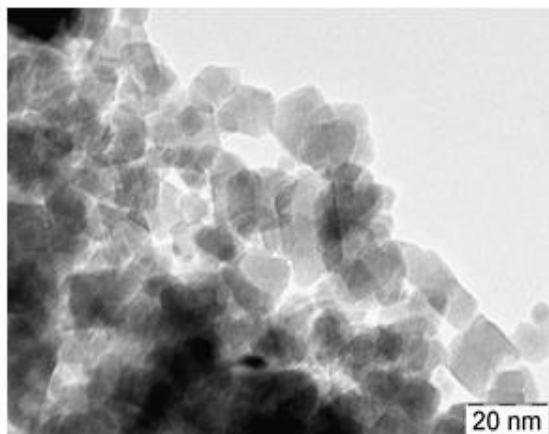
Obrázek 13. Závislost intenzity spektrálního pásu Amid III (slouží jako proteinová značka) na zvolené koncentraci avidinu při syntéze.

Výše uvedený graf je výsledkem přidání $10 \mu\text{l}$ avidinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ke kompozitu s již navázanými linkery. Ty jsou vhodně rozloženy na nanokompozitu a všechny karboxylové skupiny jsou aktivovány činidly EDC a NHS. Cílem bylo zjistit nejvýhodnější koncentrací proteinu pro jeho nejlepší možné navázání. Z grafu je patrné, že při první koncentraci (A) je velice malý signál a tím pádem docházelo k navázání malého množství proteinu avidin a nemohlo tak dojít k úplnému pokrytí volných skupin. Druhá koncentrace (B) s nejvyšší absolutní intenzitou vedla k celkové saturaci stericky přístupného aktivovaného povrchu, a proto byla označena jako nejvhodnější. Dalším zvýšením koncentrace (C, D) nebyla zvýšena intenzita daných pásů, tedy zvyšování koncentrace nevedlo k dalším změnám.

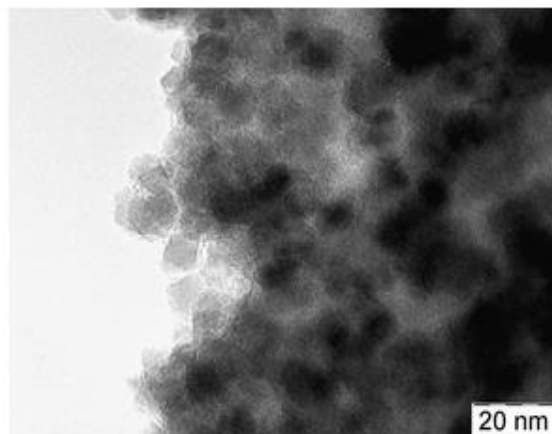


Obrázek 14. Spektrum nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ po navázání avidinu.

Na obrázku 14. je zobrazeno spektrum nanokompozitu po navázání proteinu avidin. Ze spektra jsou patrné pásy, které lze interpretovat jako části proteinové struktury, tedy: Amid I, II a III ($1350 - 1650 \text{ cm}^{-1}$). Dané pásy charakterizují imobilizovaný protein avidin z hlediska jeho složení i struktury a jsou pro něj tedy z určitého ohledu určující.



Před navázáním proteinu

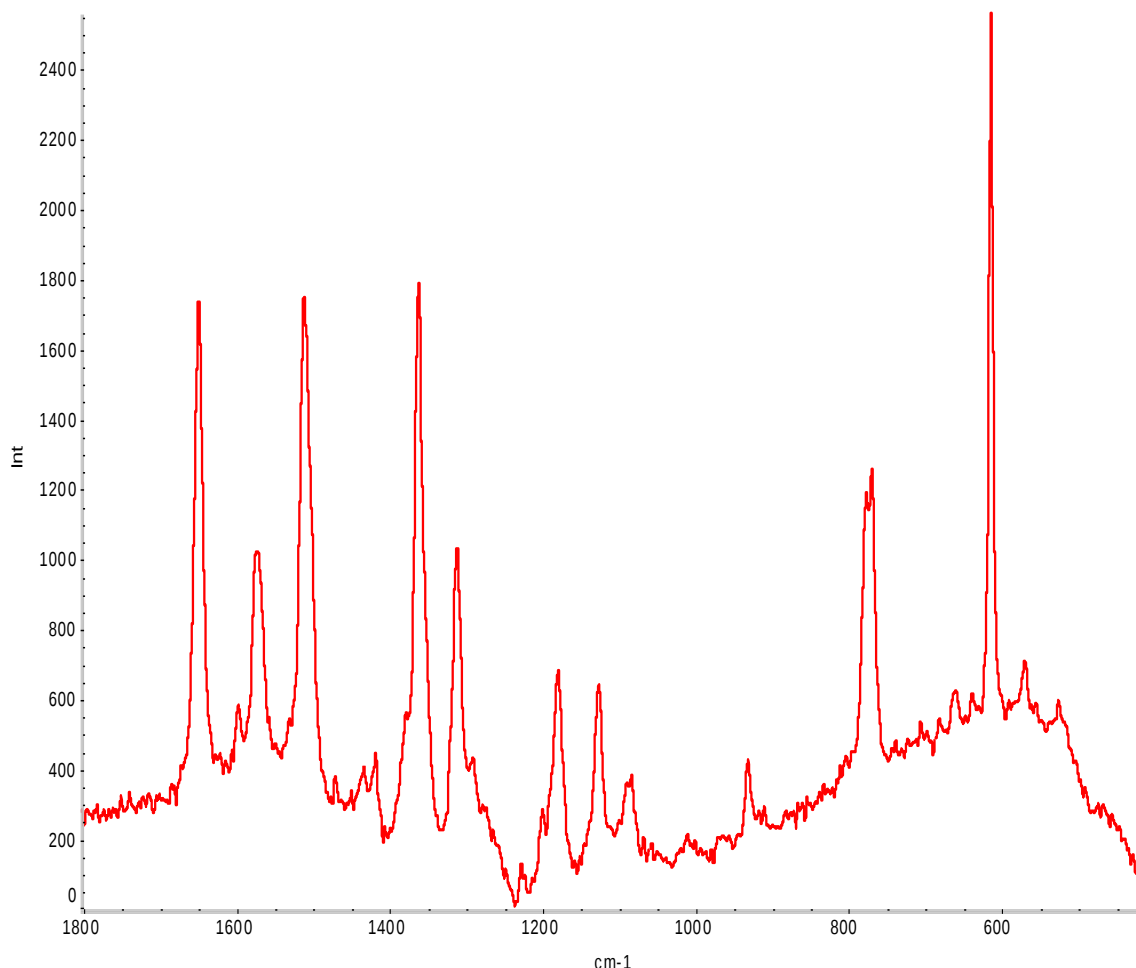


Po navázání proteinu

Obrázek 15. Porovnání nanokompozitu před a po navázání proteinu anti-IgG.

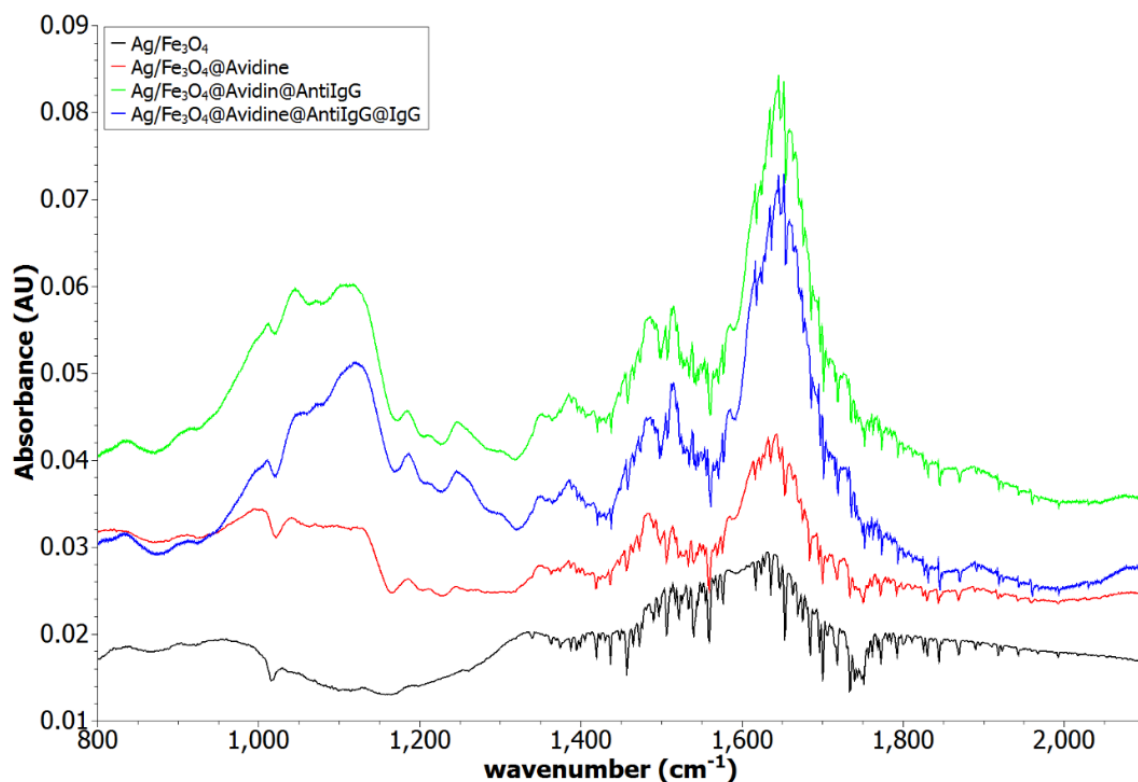
Částice, na kterých byl imobilizován protein anti-IgG, byly charakterizovány metodou transmisní elektronové mikroskopie. Ze snímku je patrné, že došlo ke změně povrchu částic. Tato změna může souviset právě s danou imobilizací proteinu anti-IgG na povrch těchto částic.

Nejvýhodnější koncentrace avidinu, která byla $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, bylo využito při posledním kroku imobilizace anti-IgG přes biotin na magnetický nanokompozit. Biotin je součástí struktury anti-IgG a vytváří s avidinem komplex avidin-biotin. Tvorba tohoto komplexu je velice snadná, neboť avidin má vůči biotinu přirozeně vysokou afinitu. Díky vytvoření tohoto komplexu je možné na avidin navázat další protein, tedy anti-IgG.



Obrázek 16. Spektrum nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ po navázání avidinu a imobilizaci anti-IgG přes biotin.

Na nanokompozit s navázaným avidinem byl přes biotin imobilizován anti-IgG, jakožto selektor pro IgG. Ze spektra je zřetelné, že došlo ke změně relativních intenzit pásů Amidu I, II a III zejména vůči ostatním pásům ve spektru, které neznají navázání proteinu. Takovýmto pásem je například pás kolem 600 cm^{-1} , který pravděpodobně charakterizuje vazbu kov – NH_2 skupina. Rozdílný podíl pásů Amid I, II a III (v porovnání s obrázkem 14.) značí navázání jiného proteinu.

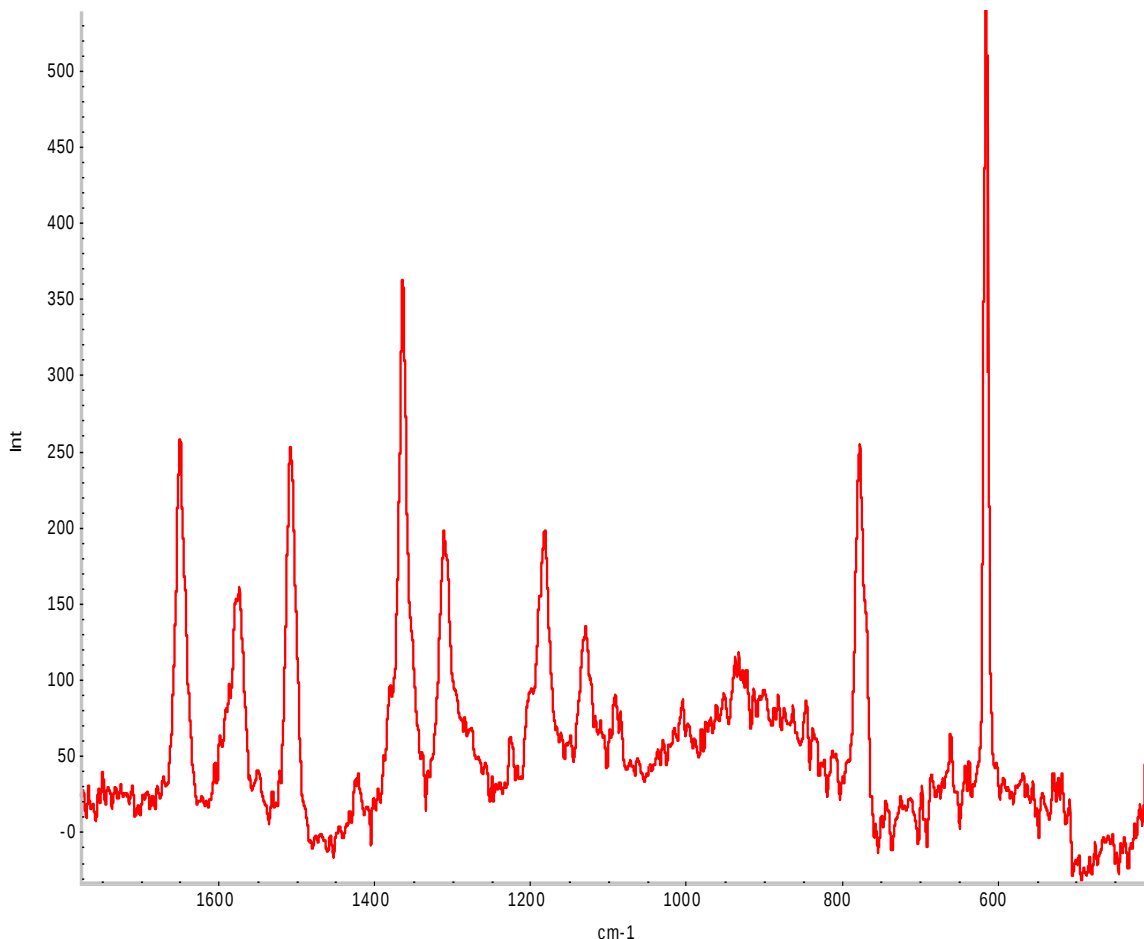


Obrázek 17. IR spektra samotného kompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ a spektra jeho postupné modifikace.

Jednotlivá spektra byla postupně měřena v průběhu povrchové modifikace nanokompozitu pomocí FT-IR spektrometru. Nejprve byl měřen samotný nanokompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$, jako druhý modifikovaný nanokompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{Avidin}$, dále byl proměřen modifikovaný nanokompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{Avidin}@\text{AntiIgG}$ a jako poslední byl změřen modifikovaný nanokompozit s navázaným IgG, tedy $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}@\text{Avidin}@\text{AntiIgG}@\text{IgG}$. Ze spekter je jasně viditelný nárůst spektrálních pásů (zvýšení absorbance), který odpovídá vazbám v proteinu.

7.4. Aplikace modifikovaného nanokompozitu

Na původní nanokompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ byl imobilizován anti-IgG, jakožto selektor pro aplikaci selektivní detekce imunoglobulinu G z modelového vzorku. Takto modifikovaný nanokompozit byl proměřen pomocí zesílené Ramanovy spektroskopie a výsledné spektrum je uvedeno na obrázku 18.



Graf 18. Spektrum nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ po navázání avidinu, imobilizaci anti-IgG přes biotin a následné navázání IgG ze vzorku ($c = 100 \text{ ng/ml}$).

Na magnetický nanokompozit s navázaným avidinem byl přes biotin imobilizován selektor anti-IgG, který umožnil selektivní detekci IgG ze vzorku. Spektrum tohoto modifikovaného nanokompozitu po vychytání IgG z daného vzorku bylo změřeno pomocí zesílené Ramanovy spektroskopie a je zobrazeno na výše uvedeném obrázku 18. IgG zde bylo v koncentraci 100 ng/ml . Ve spektru lze pozorovat markantnější rozdíl poměrů pásů Amid I, II a III (oproti obrázku 16.), což v daném případě značí navázání IgG.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce byla povrchová modifikace magnetického kompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$, který byl následně využit pro selektivní detekci imunoglobulinu G z modelového vzorku. Během modifikace byly studovány vybrané parametry metodou SERS, které mohly mít vliv na úpravu povrchu daného kompozitu.

K experimentu byl využit kompozit $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$, obsahující částice Fe_3O_4 , které tvořily magnetické jádro a sloužily jako nosič a nanočástice stříbra, jejichž funkcí bylo zesílení Ramanova signálu. Pro funkcionalizaci povrchu kompozitu byla využita směs linkerů kyselina 6-aminohexanová - butylamin a kyselina 8-aminooktanová - hexylamin, u nichž byl studován vliv poměrů směsi a také délka uhlíkatého řetízku. K aktivaci navázaných karboxylových skupin byly využity aktivační činidla EDC a NHS, u kterých byla sledována koncentrace. Na takto aktivované karboxylové skupiny byl navázán protein avidin, u něhož byl taktéž zkoumán vliv jeho koncentrace. Konečnou fází celé modifikace byla imobilizace anti-immunoglobulin G na avidin přes biotin, jež byl součástí struktury anti-IgG.

Jednotlivé modifikace byly měřeny pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. Na základě výsledků těchto měření bylo dokázáno, že studované parametry mají obrovský vliv na povrchovou modifikaci kompozitu. Například, pokud by směs linkerů byla přidána v nevhodném poměru se špatnou délkou uhlíkatého řetízku, došlo by k nevyhovujícímu rozložení těchto linkerů na povrchu kompozitu, a tím pádem by povrch nebyl plně funkcionalizován a vhodně připraven pro imobilizaci. Koncentrace aktivačních činidel měla vliv na počet aktivovaných skupin, takže pokud by byla využita nevhodná koncentrace, nedošlo by k aktivaci všech volných karboxylových skupin. Co se týče koncentrace proteinu, ta taktéž hrála důležitou roli a to zejména proto, že na této koncentraci záviselo pokrytí celého kompozitu. Při změnách této koncentrace docházelo k navázání různého počtu proteinu na aktivované karboxylové skupiny.

Experimentálně byly stanoveny vhodné parametry pro modifikaci povrchu nanokompozitu $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$, který byl takto modifikovaný využit pro selektivní vycytávání IgG.

SUMMARY

The aim of this bachelor thesis was the surface modification of magnetic composite $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$, which was used for purposes of selective detection of immunoglobulin G from the model sample. Selected parameters, which could affect the surface modification of the composite, were studied by SERS.

It was used the composite $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$, composed of two components. The first was Fe_3O_4 particles, which formed a magnetic core and served as a magnetic carrier. The second component were silver nanoparticles, whose function was enhancing of Raman signal. To functionalization of the surface was used a mixture of linkers 6-aminohexanoic acid - butylamine and 8- aminooctanoic acid – hexylamine. By these linkers was studied the influence of their ratio and the length of the carbon chain. For activation of the binded carboxyl group were used activating agents EDC and NHS, for which was monitored their concentration. On this activated carboxyl group was bound protein avidin, for which was also studied the influence of its concentration. The last steps of modification was the immobilization of anti-immunoglobulin G to avidin through a biotin, which was the part of the structure of anti-IgG .

Each modification were measured by surface enhanced Raman spectroscopy. Based on results of these measurements was proved, that studied parameters have a huge influence on surface modification of the composite. For example, if a mixture of linkers were added in an inappropriate ratio and with the wrong lenght of carbon chain, there would be unsuitable distribution of these linkers at the surface of the composite, and thus the surface would not fully functionalized and therefore it would not suitably prepared for immobilization. Concentration of activating agents had an effect on the number of activated groups, so if was used unsuitable concentration, it would not activated each free carboxyl groups. The concentration of the protein also play an important role, especially because on this concentration dependent coverage of the entire composite. During the changing the concentration there was a variable number of binding protein to the activated carboxyl groups.

The appropriate parameters for the surface modification of composite $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ were determined experimentally. The modified composite was used for the selective uptake of IgG.

SEZNAM LITERATURY

- [1] ŘEZANKA, P., ZÁRUBA, K. a KRÁL, V. *Potenciál modifikovaných nanočástic v analytické chemii*. Praha: Chemické listy. 2007, 101: 881-885.
- [2] PRUCEK, R. *Příprava a aplikace nanočástic vybraných kovů či jejich oxidů v spektroskopických, katalytických a environmentálních aplikacích*. Olomouc, 2013. Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci.
- [3] *Aplikace nanotechnologie*. [online]. [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: <<http://csnmt.fme.vutbr.cz/OKO/2-6/pruv08.pdf>>.
- [4] KVÍTEK, L. a PANÁČEK, A. *Základy koloidní chemie*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. 70 s. Skripta. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [5] BARTOVSKÁ, L. a ŠIŠKOVÁ, M. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 6. vyd., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. 262 s. ISBN 978-80-7080-745-3.
- [6] POUCHLÝ, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 3. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. 205 s. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [7] VOJUCKIJ, S. S. *Kurs koloidní chemie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1984. 396 s.
- [8] KVÍTEK, L. *Metody studia koloidních soustav*. Prozatímní učební text. Katedra fyzikální chemie PřF UP Olomouc, 2006.
- [9] KVÍTEK, L., et al. *Nanočástice stříbra – příprava, vlastnosti a aplikace*. Sborník Nanocon. 2009. ISBN 978-80-87294-12-3.
- [10] ARZENŠEK, D. *Dynamic light scattering and application to proteins in solutions*. Ljubljana, 2010. Seminar - 4th Year. University of Ljubljana.
- [11] KVÍTEK, L., NOVOTNÝ, R. a PIKAL, P. *Stanovení velikostní distribuce částic anorganických disperzí metodou dynamického rozptylu světla*. Praha: Chemické listy. 1998, 92: 431-433.
- [12] MACHALOVÁ ŠIŠKOVÁ, K. *Funkční modifikace povrchů nanočástic*. Olomouc, 2010. Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci.

- [13] KARLÍK, M. *Transmisní elektronová mikroskopie: pohled do nitra materiálů*. Čs. čas. fyz., 2005, 55: 457-464.
- [14] DOLNÍČEK, Z. *Laboratorní metody výzkumu*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2005. 62 s. Skripta.
- [15] DULEBA, B. and GRESKOVIC, F. *Simulation of Loading the Polymer/Carbon Fiber Composites and Prediction of Safety Factors*. International Journal of Engineering and Innovative Technology. 2013, 2.8: 134-140. ISSN 2277-3754
- [16] TARTAJ, P., et al. *The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*. Journal of Physics D: Applied Physics. 2003, 36.13: R182-R197.
- [17] PŘIKRYL, J., et al. *Využití nanočástic ve fluorescenční mikroskopii a ramanově spektrometrii*. Sborník Nanocon. 2009, 95-101. ISBN 978-80-87294-12-3.
- [18] KVÍTEK, L. *Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra*. Olomouc, 2008. Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci.
- [19] MUNRO, C. H., et al. *Characterization of the Surface of a Citrate-Reduced Colloid Optimized for Use as a Substrate for Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering*. American Chemical Society. 1995, 11.10: 3712–3720. ISSN 0743-7463.
- [20] WU, W., HE, Q. and JIANG, CH. *Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies*. Nanoscale Research Letters. 2008, 3.11: 397-415. ISSN 1556-276X.
- [21] LAURENT, S., et al. *Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications*. Chemical Reviews. 2008, 108.6: 2064-2110.
- [22] LIU, C. H., et al. *Preparation and characterization of Fe₃O₄ /Ag composite magnetic nanoparticles*. Inorganic Materials. 2008, 44.3: 291-295. ISSN 1608-3172.
- [23] *Nanokompozity*. [online]. [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: <<http://www.kompozity.info/index.php?pr=15&uid=9999&id=0>>.

- [24] TANG, D., YUAN, R. and CHAI, Y. *Magnetic Core-Shell Fe₃O₄@Ag Nanoparticles Coated Carbon Paste Interface for Studies of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Immunoassay*. Journal of Physical Chemistry B. 2006, 110.24: 11640-1646. ISSN 1520-6106.
- [25] BLECHTA, V. *Příprava a charakterizace nanočástic elementárního železa pomocí vysokoteplotní RTG práškové difrakce*. Olomouc, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci.
- [26] PAN, L., TANG, J. and CHEN, Y. *Synthesis of Fe₃O₄, Fe₂O₃, Ag/Fe₃O₄ and Ag/Fe₂O₃ nanoparticles and their electrocatalytic properties*. Science China Chemistry. 2013, 56.3: 362-369. ISSN 1869-1870.
- [27] FONER, S. *Versatile and Sensitive Vibrating-Sample Magnetometer*. Review of Scientific Instruments. 1959, 30.7: 548-557.
- [28] *Vibrating Sample Magnetometer* [online]. [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: <https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CC0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fgato-docs.its.txstate.edu%2Fcos-department-of-physics%2Fmanuals%2FVSM%2Fvsm.pdf&ei=yXE5U8_3BoS2hAeFuoCoDg&usg=AFQjCNGNCKvRc2p5ufEbLZNhxOwkFqNshA&sig2=lumbO_gUBwSswkRIKgW8XA>.
- [29] GONG, P., et al. *Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@Ag nanoparticles*. Nanotechnology. 2007, 18.28: 285604. ISSN 0957-484.
- [30] RANC, V., et al. *Magnetically Assisted Surface-Enhanced Raman Scattering Selective Determination of Dopamine in an Artificial Cerebrospinal Fluid and a Mouse Striatum Using Fe₃O₄/Ag Nanocomposite*. Analytical Chemistry. 2014, 86.6: 2939–2946.
- [31] SHA, M. Y., et al. *Surface-Enhanced Raman Scattering Tags for Rapid and Homogeneous Detection of Circulating Tumor Cells in the Presence of Human Whole Blood*. Journal of the American Chemical Society. [online]. 2008, 130.51: 17214–17215. ISSN 0002-7863.

- [32] DRAKE, P., et al. *Raman based detection of Staphylococcus aureus utilizing single domain antibody coated nanoparticle labels and magnetic trapping*. Analytical Methods. 2013, 5.16: 4152-4158.
- [33] LAI, J. J., et al. *Multifunctional magnetic plasmonic nanoparticles for applications of magnetic/photo-thermal hyperthermia and surface enhanced Raman spectroscopy*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 2013, 331: 204-207. ISSN 0304-8853.
- [34] Markova, Z., et al. *Air Stable Magnetic Bimetallic Fe-Ag Nanoparticles for Advanced Antimicrobial Treatment and Phosphorus Removal*. Environ Sci Technol. 2013, 47.10: 5285-5293.