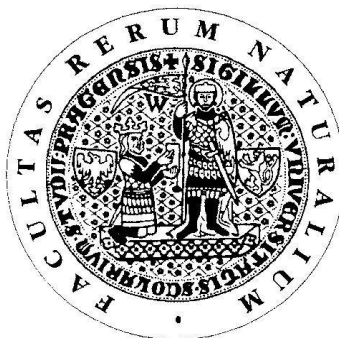


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Karolina Černá

ELEKTROMIGRAČNÍ CHOVÁNÍ KOMPLEXŮ POLYELEKTROLYTŮ
S IONTOVÝMI SURFAKTANTY A VESIKUL TVOŘENÝCH
BLOKOVÝMI KOPOLYMERY

Electromigration behaviour of polyelectrolyte-ionic surfactant
complexes and block copolymer vesicles

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Iva Zusková, CSc.

Konzultant: RNDr. Miroslav Štěpánek, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Jana Svobodová

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15. května 2012.

.....

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Ivě Zuskové, CSc. a Mgr. Janě Svobodové za odborné vedení, čas, trpělivost, cenné rady, pomoc při vypracovávání této diplomové práce a vytvoření velmi příjemné pracovní atmosféry.

Děk patří i ostatním členům skupiny elektromigračních separačních procesů.

Dále bych ráda poděkovala RNDr. Miroslavu Štěpánkovi, Ph.D. za poskytnutí vzorků, naměření a zpracování výsledků z dynamického rozptylu světla a RNDr. Miroslavu Šloufovi, Ph.D. za pořízení elektronových fotografií.

V neposlední řadě bych chtěla vyjádřit vděčnost mojí rodině, především Karlamatce za péči, podporu a vytvoření pohodových podmínek během studia a také mému příteli za jeho nesmírnou trpělivost.

Abstrakt

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je nejen široce využívaná analytická separační metoda, ale je také významnou technikou pro určování fyzikálně-chemických parametrů látek. Významné uplatnění nachází také v charakterizaci potenciálně zajímavých makromolekulárních látek. V této diplomové práci byla CZE použita ke studiu komplexů polyelektrolytů s opačně nabitými iontovými surfaktanty. U prvního studovaného komplexu, tvořeného poly(ethylen oxid)-*blok*-polymethakrylátem sodným a surfaktantem N-dodecylpyridinium chloridem, byly proměřeny elektroforetické pohyblivosti surfaktantu v závislosti na poměru koncentrace surfaktantu ve vzorku ku koncentraci polyelektrolytu přítomného v základním elektrolytu. Nedosáhli jsme ovšem tak výrazného poklesu pohyblivosti, jak bylo předpovězeno v literatuře na základě měření ζ -potenciálu, což je možné vysvětlit nízkou stabilitou komplexu v elektrickém poli. Druhý systém, který tvořil blokový kopolymer poly[3,5-bis(trimethylammoniummethyl)-4-hydroxystyren iodid]-*blok*-poly(ethylen oxid) se surfaktantem dodecylsulfátem sodným, nebylo možno pomocí klasických CZE experimentů charakterizovat. Důvodem byla pravděpodobně silná interakce vzniklého komplexu se stěnou kapiláry, kterou se nepodařilo omezit ani pokrytím kapiláry či použitím komerčně pokrytých kapilár.

V druhé části práce byla metoda kapilární zónové elektroforézy použita pro studium elektroforetického chování vesikul, tvořených blokovým kopolymerem polystyren-*blok*-polyakrylová kyselina, v závislosti na pH roztoku a v závislosti na iontové síle základního elektrolytu. Elektromigrační chování bylo interpretováno ve vztahu s hydrodynamickým poloměrem těchto částic proměřeným pomocí metody dynamického rozptylu světla a porovnáno s chováním kyseliny akrylové, která je základní stavební jednotkou polyelektrolytového „brushe“. Bylo ukázáno, že vesikuly se ve srovnání s kyselinou akrylovou chovají jako silnější kyseliny a při bazickém pH výrazně reagují na změnu iontové síly v důsledku vzniku iontové atmosféry a sorbce protiiontů do polyelektrolytového „brushe“. V rámci této práce bylo také sledováno elektromigrační chování vesikul v závislosti na čase od jejich přípravy. Bylo prokázáno, že pohyblivost vesikul není závislá na čase ani v roztocích o nízkém pH.

V posledním kroku byla využita kryogenní transmisní elektronová mikroskopie pro vizualizaci vesikul v roztoku.

Klíčová slova

kapilární zónová elektroforéza, komplex polyelektrolyt-surfaktant, vesikula, pH, iontová síla

Abstract

Capillary zone electrophoresis (CZE) is not only a widely used analytical separation method, but it is also an important technique for determining physico-chemical parameters of materials. Significant use is also in the characterization of potentially interesting macromolecular substances. In this master's thesis, CZE was applied to the study of polyelectrolyte–oppositely charged ionic surfactant complexes. For the first studied complex formed by poly(ethylene oxide)-*block*-poly(sodium methacrylate) and surfactant N-dodecylpyridinium chloride, the electrophoretic mobility of surfactant depending on the ratio of surfactant concentration in the sample to the concentration of polyelectrolyte present in the background electrolyte was measured. However, we did not get the significant decrease in mobility as was predicted in the literature based on measuring the ζ -potential. This can be explained by the low stability of the complex in an electric field. The second system, the polyelectrolyte–surfactant complex of cationic–neutral hydrophilic block copolymer poly[3,5-bis(trimethylammoniummethyl)-4-hydroxystyrene iodide]-*block*-poly(ethylene oxide) and surfactant sodium dodecyl sulfate, could not be characterized using conventional CZE experiments described. The reason was probably due to a strong interaction of newly formed complex with the wall of the capillary, which could not be mitigated by the use of coating nor by the use of commercially coated capillaries.

In the second part, the electrophoretic behavior of block copolymer vesicles as a function of pH and ionic strength of the background electrolyte was investigated using capillary zone electrophoresis. The vesicles were comprised of polystyrene-*block*-polyacrylic acid. Electromigration behavior was interpreted in relation to the hydrodynamic radius of these particles measured by dynamic light scattering and compared with the acrylic acid behavior, which is a fundamental building block of vesicle polyelectrolyte brush. It was shown that vesicles compared to acrylic acid act as stronger acids and in a basic solution significantly respond to changes of bulk electrolyte concentration as a result of ion atmosphere formation, and localization of counterions in the interior volume of the polyelectrolyte brush. Electromigration behavior of vesicles depending on the time elapsed from their preparation was also observed as a part of this work. It was shown that even in solutions of low pH the mobility of the vesicles is not dependent on time.

In the last step, the cryogenic transmission electron microscopy was used to image the vesicles in the bulk.

Key words

capillary zone electrophoresis, polyelectrolyte-surfactant complex, vesicle, pH, ionic strength

Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratk	9
1. Teoretická část	12
1.1 Teoretické základy kapilární zónové elektroforézy	12
1.2 Tlakem zprostředkovaná kapilární elektroforéza	17
1.3 Vliv pH a iontové síly na chování malých iontů	19
1.4 Komplexy blokových kopolymerů s iontovými surfaktanty	21
1.5 Vesikuly tvořené blokovými kopolymery	29
1.6 Vliv pH a iontové síly na chování polyelektrolytů	32
1.7 Další techniky pro studium blokových kopolymerů	34
2. Cíle diplomové práce	37
3. Experimentální část	38
3.1 Chemikálie	38
3.2 Instrumentace a programy	39
3.3 Volba a příprava pufrů a základních elektrolytů	40
3.4 Příprava vzorků	45
3.5 Další experimentální podmínky a postupy	46
3.6 Dynamický rozptyl světla	48
3.7 Cryo-TEM	48
4. Výsledky	50
4.1 Komplex PEO- <i>b</i> -PMANa + C ₁₂ PyrCl	50
4.2 Polyelektrolyt QNPHOS- <i>b</i> -PEO	56
4.3 Elektromigrační chování vesikul PS- <i>b</i> -PAA	57
5. Diskuse	75
6. Závěr	77
Citovaná literatura	78

Seznam použitých symbolů a zkratk

a	nejkratší vzdálenost středů protiiontů
a_{A^-}	aktivita aniontu kyseliny
a_{HA}	aktivita neutrálních molekul kyseliny
$a_{H_3O^+}$	aktivita oxoniových iontů
c	celková analytická koncentrace látky
c_{A^-}	koncentrace aniontu
c_{met}	koncentrace polyelektrolytu PEO- <i>b</i> -PMANa
c_{surf}	koncentrace surfaktantu
c_{HA}	koncentrace neutrálních molekul kyseliny
c_i	koncentrace <i>i</i> -té formy
D	difúzní koeficient
F	Faradayova konstanta
e	elementární náboj
E	intenzita elektrického pole
F_e	síla elektrického pole
F_f	třecí síla
$g(\tau, q)$	časová autokorelační funkce
I	iontová síla
$I(t, q)$	okamžitá časová hodnota intenzity rozptýleného záření
K_A	termodynamická disociační konstanta
K_A^{mix}	smíšená disociační konstanta
k_B	Boltzmannova konstanta
L_c	celková délka kapiláry
L_d	délka kapiláry k detektoru
l_K	dráhový rozdíl mezi zónou analytu a markeru
M_w	molekulová hmotnost
N_A	Avogadrova konstanta
p	aplikovaný tlak
r	poloměr
R	univerzální plynová konstanta
R_g	gyrační poloměr
R_H	hydrodynamický poloměr
T	termodynamická teplota

t_a	detekční čas analytu
t_K	detekční čas kationtu
t_{N1}	detekční čas neutrálního markeru N1
t_{N2}	detekční čas neutrálního markeru N2
t_{migr}	čas, po který je aplikováno napětí
t_p	čas odpovídající začátku aplikace tlaku ve finálním kroku
U	aplikované napětí
v	rychlost migrace částice
v_{EOF}	rychlost elektroosmotického toku
v_h	rychlost hydrodynamického toku
$v_{h, p}$	rychlost protlačování
z	nábojové číslo
z_i	nábojové číslo i -tého iontu
z_+	nábojové číslo kationtu
z_-	nábojové číslo aniontu
α_i	stupeň disociace
β	poměr koncentrací surfaktant/polyelektrolyt
γ_{A^-}	aktivitní koeficient aniontu kyseliny
ε	permitivita
η	viskozitní koeficient
μ	elektroforetická pohyblivost, aktuální pohyblivost
μ_{A^-}	aktuální pohyblivost aniontu
μ_{A^z}	aktuální pohyblivost aniontu
μ_{app}	pozorovaná pohyblivost
μ_{eff}	efektivní pohyblivost
μ_{EOF}	elektroosmotická pohyblivost
μ_i	aktuální pohyblivost i -té formy
μ_{K^+}	aktuální pohyblivost kationtu
μ_{lim}	limitní pohyblivost
μ_{lim, A^z}	limitní pohyblivost aniontu
μ_{lim, K^z}	limitní pohyblivost kationtu
A^-	anion kyseliny HA
HA	neutrální forma kyseliny

BGE	základní elektrolyt, background electrolyte
CE	kapilární elektroforéza, capillary electrophoresis
CMC	kritická micelární koncentrace
Cryo-TEM	kryogenní transmisní elektronová mikroskopie
CZE	kapilární zónová elektroforéza, capillary zone electrophoresis
C ₁₂ PyrCl	N-dodecylpyridinium chlorid
DAD	spektrofotometrický detektor s diodovým polem, diod array detector
DLS	dynamický rozptyl světla
DMSO	dimethylsulfoxid
EM	elektronová mikroskopie
EOF	elektroosmotický tok, electroosmotic flow
HCOOH	kyselina mravenčí
CHES	2-(cyklohexylamino)ethansulfonová kyselina
I.D.	vnitřní průměr kapiláry, inner diameter
LPA	lineární polyakrylamid
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MES	kyselina 2-(N-morpholino)ethansulfonová
MOPS	kyselina 3-(N-morpholino)propansulfonová
O.D.	vnější průměr kapiláry, outer diameter
PEO- <i>b</i> -PMANa	poly(ethylen oxid)- <i>blok</i> -polymethakrylát sodný
PE-S	komplex polyelektrolyt-surfaktant
PI	index polydispersity, polydispersity index
PreMCE	tlakem zprostředkovaná kapilární elektroforéza, pressure-mediated capillary electrophoresis
PS- <i>b</i> -PAA	polystyren- <i>blok</i> -polyakrylová kyselina
PVA	polyvinylalkohol
QNPHOS- <i>b</i> -PEO	poly[3,5-bis(trimethylammoniummethyl)-4-hydroxystyren iodid]- <i>blok</i> -poly(ethylen oxid)
SDS	dodecylsulfát sodný
TAPS	kyselina N-tri(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropansulfonová
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra

1. Teoretická část

1.1 Teoretické základy kapilární zónové elektroforézy [1–4]

Kapilární zónová elektroforéza se řadí mezi významné a široce využívané analytické separační metody umožňující analýzu a separaci organických i anorganických iontů ale i neutrálních látek, jejichž relativní molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí $3-10^6$ [5, 6]. Je založena na rozdílných rychlostech migrace nabitých částic v roztoku, který je vystaven působení elektrického pole. Vlastní separace se obvykle provádí v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem několika desítek mikrometrů. Nespornou výhodou kapilárních elektromigračních metod jsou velmi malé spotřeby vzorku a činidel potřebných pro separaci, velká účinnost separace a rychlost analýzy.

Kapilární zónová elektroforéza není pouze významnou analytickou metodou, ale využívá se i ke stanovení fyzikálně-chemických parametrů látek, jako disociačních konstant, limitních mobilit, komplexačních konstant, kritických micelárních koncentrací atd. [5].

Elektroforetická pohyblivost

Klíčovou veličinou všech elektromigračních metod charakterizující pohyb částice v elektrickém poli je tzv. elektroforetická pohyblivost (krátce pohyblivost či mobilita).

Je-li kulová částice o nábojovém čísle z umístěna do elektrického pole o intenzitě E , působí na ni hnací síla elektrického pole F_e zavedená jako

$$F_e = zeE, \quad (1)$$

kde e je elementární náboj. Intenzita elektrického pole E uvnitř separační kapiláry je dána podílem napětí U vloženého mezi elektrody a celkové délky kapiláry L_c

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

Současně je pohyb částice o poloměru r v prostředí o nenulovém viskozitním koeficientu η brzděn protichůdnou třecí silou F_f způsobenou srážkami s ostatními částicemi v kapalném prostředí, kterou popisuje Stokesův zákon

$$F_f = 6\pi\eta r v, \quad (3)$$

kde v je rychlost migrace dané částice. Velikosti těchto protichůdných sil se ovšem za krátký čas vyrovnají a částice se pohybuje rovnoměrnou rychlostí

$$v = \frac{ze}{6\pi\eta r} E. \quad (4)$$

Každý iont migruje v daném prostředí svou rychlostí, která je přímo úměrná intenzitě elektrického pole. Aby bylo možné rychlosti migrace konkrétních iontů porovnávat, byla zavedena veličina elektroforetická pohyblivost μ definovaná vztahem

$$\mu = \frac{v}{E} . \quad (5)$$

Elektroforetická pohyblivost tedy představuje rychlost migrace nabitě částice v roztoku vystaveném působení stejnosměrného elektrického pole o jednotkové intenzitě. Kombinací výrazů (4) a (5) plyne pro elektroforetickou pohyblivost iontu v ideálně zředěném roztoku následující vztah

$$\mu = \frac{ze}{6\pi\eta r} . \quad (6)$$

Dle tohoto vztahu má pohyblivost kationtů kladnou hodnotu a pohyblivost aniontů hodnotu zápornou. Tento vztah (6) byl odvozen za předpokladu ideálního chování roztoku. Za ideálních podmínek, tedy v nekonečně zředěném roztoku, se elektroforetická pohyblivost iontu označuje jako tzv. limitní pohyblivost μ_{lim} a hodnoty těchto pohyblivostí se tabelují při teplotě 25° C jako fyzikálně-chemické konstanty iontů. V reálném roztoku je ovšem nutné brát v úvahu vzájemné interakce iontů, elektroforetická pohyblivost tedy závisí na iontové síle roztoku.

Pohyblivost iontů při dané iontové síle prostředí a zvolené teplotě se nazývá aktuální pohyblivost označovaná symbolem μ .

Pro látky, které se v roztoku nacházejí ve více formách, mezi nimiž dochází k rychlému ustavování rovnováhy, se definuje efektivní pohyblivost μ_{eff} vztahem

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\sum_{i=1}^n c_i \mu_i}{c} , \quad (7)$$

ve kterém μ_i a c_i značí aktuální pohyblivost a koncentraci i -té formy dané látky o analytické koncentraci c . Pojem efektivní pohyblivost se formálně používá i pro ionty silných elektrolytů, u kterých má ale význam aktuální pohyblivosti.

V případě slabých elektrolytů je efektivní pohyblivost závislá na jejich stupni disociace α_i ,

$$\mu_{\text{eff}} = \sum_i \alpha_i \mu_i , \quad (8)$$

tedy na hodnotě pH základního elektrolytu (BGE). Mezi neutrální a nabitou formou analytu dochází vždy k ustavování rychlé dynamické rovnováhy, takže látka se pohybuje jako celek svou efektivní elektroforetickou pohyblivostí. Látka se pak pohybuje nejvyšší

pohyblivostí v roztoku o takovém pH, kdy je prakticky plně disociována. Mobilita plně disociované formy pak přímo odpovídá pohyblivosti příslušného iontu, μ_{A^-} nebo μ_{K^+} .

Elektroosmotický tok

Transportním jevem spojeným s elektroforetickou separací je elektroosmotický tok (electoosmotic flow, EOF) neboli elektroosmóza. Je-li křemenná kapilára naplněna vhodným elektrolytem, dochází na vnitřní stěně kapiláry k hydrolyze siloxanových skupin za vzniku silanolových, které při pH vyšším než 3 disociují a vnitřní stěna kapiláry se pokryje negativním nábojem ($\equiv\text{Si-O}^-$). Kationty přítomné v roztoku vytváří se stěnou kapiláry elektrickou dvojvrstvu. Vložení napětí několika desítek kilovoltů mezi elektrody se docílí pohybu solvatovaných kationtů směrem ke katodě. Tyto pohybující se solvatované ionty s sebou strhnou celý obsah kapiláry, čímž dojde ke vzniku elektroosmotického toku. Elektroosmóza unáší všechny složky přítomné v roztoku stejnou rychlostí směrem ke katodě, z tohoto důvodu nepřispívá k jejich vlastní separaci.

Směr elektroosmotického toku může být změněn dynamickým či statickým pokrytím (coatingem) vnitřní stěny kapiláry. [7–9] Dynamický coating se obvykle provádí propláchnutím kapiláry roztokem obsahující coatovací činidlo nebo přidáním tohoto činidla do BGE. Coatovacím činidlem může být polymer nebo látka o malé molekulové hmotnosti, např. polybren, dextransulfát nebo cetyltrimethylammonium bromid. K pokrytí vnitřní stěny kapiláry daným činidlem dochází na základě slabých molekulových interakcí, např. elektrostatických interakcí či vodíkových vazeb. Oproti tomu statický neboli permanentní coating je náročný na přípravu a často se provádí za extrémních podmínek. Tohoto typu pokrytí je docíleno buď derivatizací silanolových skupin a následným navázáním polymerního materiálu nebo přímým navázáním polymerní vrstvy na stěnu. Tento druh coatování se používá pro přípravu např. LPA, PVA nebo PVP kapilár.

Rychlost elektroosmotického toku v_{EOF} je přímo úměrná intenzitě elektrického pole E a konstantou úměrnosti je tzv. elektroosmotická pohyblivost (pohyblivost EOF) μ_{EOF}

$$v_{\text{EOF}} = \mu_{\text{EOF}} E . \quad (9)$$

Elektroosmotický tok směřující ke katodě se označuje jako kationický a přiřazuje se mu kladná hodnota pohyblivosti, analogicky elektroosmotický tok směřující k anodě se nazývá anionický a přiřazuje se mu pohyblivost záporná.

U nepokrytých kapilár disociace silanolových skupin silně závisí na pH, a proto i velikost a směr EOF je funkcí pH základního elektrolytu. Čím je pH roztoku uvnitř kapiláry vyšší, tím větší negativní náboj je rozprostřen na vnitřní stěně kapiláry a tím

rychlejší elektroosmotický tok lze pozorovat. Při pH nižším než 4 jednotky se elektroosmóza výrazně zpomaluje, případně může dojít k otočení jejího směru. Rychlost elektroosmózy lze kromě pH ovlivnit také iontovou silou. Se vzrůstající iontovou silou rychlost elektroosmózy klesá.

Nejpoužívanější metoda pro pozorování rychlosti/pohyblivosti elektroosmotického toku v kapiláře je založena na určení pohyblivosti tzv. markerů EOF. Pro tento účel se jako markery EOF nejčastěji volí elektroneutrální látky s vlastní nulovou elektroforetickou pohyblivostí, které kapilárou unáší pouze elektroosmotický tok. Mezi běžně používané markery patří dimethylsulfoxid, thiomčovina, mesithyloxid nebo nitromethan.

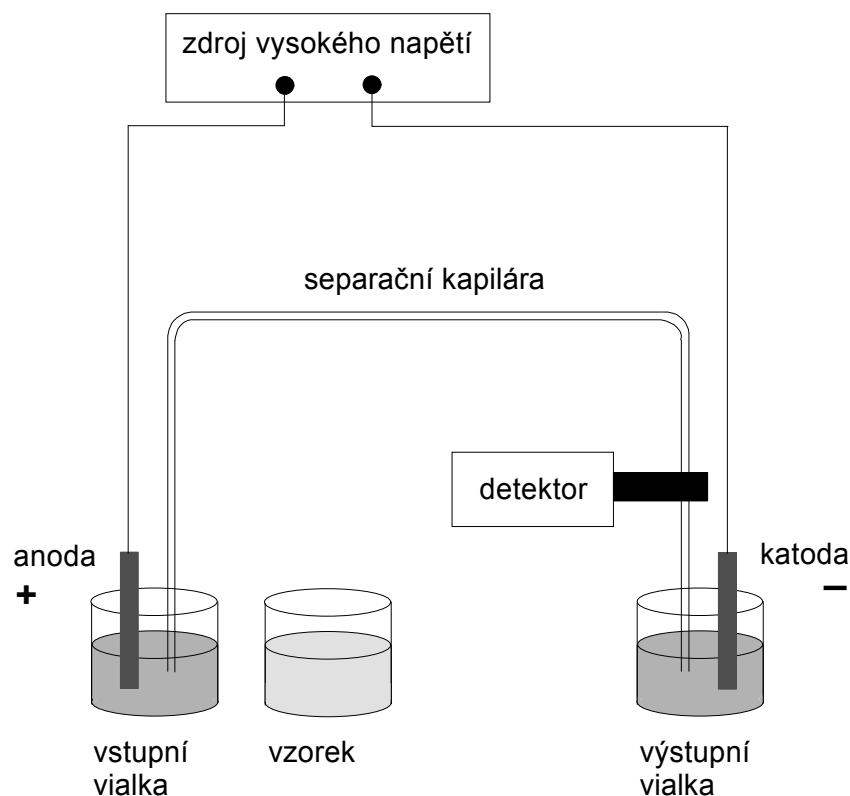
Částice nesoucí náboj jsou v kapiláře transportovány nejen elektroosmotickým tokem roztoku, ale navíc také svou vlastní migrací. Jejich tzv. pozorovaná (apparent) pohyblivost μ_{app} je dána součtem jejich efektivní pohyblivosti a pohyblivosti EOF

$$\mu_{app} = \mu_{EOF} + \mu_{eff} \cdot \quad (10)$$

Základní experimentální uspořádání a princip CZE

Základní experimentální uspořádání hlavních komponent přístroje pro kapilární zónovou elektroforézu schematicky znázorňuje Obr. 1. Separace se provádí v křemenné kapiláře pokryté vnější vrstvou polyimidu, který zamezuje přílišné křehkosti kapiláry a naopak jí dodává potřebnou pružnost. Vnitřní průměr kapiláry bývá obvykle v rozmezí 25–100 μm a délka se volí v rozsahu 30–100 cm.

Oba konce kapiláry jsou ponořeny do elektrodových nádobek (vialek) obsahujících vhodný separační elektrolyt, tzv. základní elektrolyt. Vložení napětí v řádu desítek kilovoltů ze zdroje stejnosměrného konstantního napětí na elektrody dojde k pohybu roztoku uvnitř kapiláry. Nezbytnou součástí aparatury je detektor umístěný poblíž výstupního konce kapiláry. Nejčastěji používaným detektorem v CZE bývá absorpční fotometrický detektor pracující v UV-VIS oblasti spektra. Další možnou variantou detekce látek je bezkontaktní vodivostní detekce [10], elektrochemická detekce, hmotnostní spektrometrie či laserem indukovaná fluorescenční detekce.



Obr. 1 Schéma přístroje pro kapilární zónovou elektroforézu (překresleno podle [1]).

Před vlastní analýzou je kapilára naplněna základním elektrolytem. Následně dojde k nadávkování vzorku obsahujícího směs analytů a markeru EOF v základním elektrolytu. Dávkování lze realizovat dvěma způsoby, a sice elektrokineticky nebo hydrodynamicky. Při elektrokinetickém dávkování je na elektrody vloženo dávkovací napětí a vlivem elektroosmózy a samotné elektroforetické migrace iontů dojde k transportu vzorku do kapiláry. Tímto způsobem dávkování dochází ke změně složení v nadávkované zóně oproti původnímu připravenému vzorku z důvodu rozdílné pohyblivosti analytů. Častěji využívaným způsobem je hydrodynamické dávkování, kdy je roztok vzorku do kapiláry natlačen vytvořením přetlaku na hladinu vzorku ve vialce.

Po nadávkování vzorku je vstupní konec kapiláry opět ponořen do vialky s BGE a na elektrody je vloženo stejnosměrného napětí. Během aplikace napětí se ionty v roztoku pohybují kombinací své vlastní rychlosti a rychlosti EOF a liší-li se nabitě látky dostatečně svojí elektroforetickou pohyblivostí, rozdělí se do samostatných zón, čímž dochází k jejich separaci. Neutrální látky unášejí pouze elektroosmotický tok a mohou být využity k určení rychlosti EOF (viz kapitola Elektroosmotický tok).

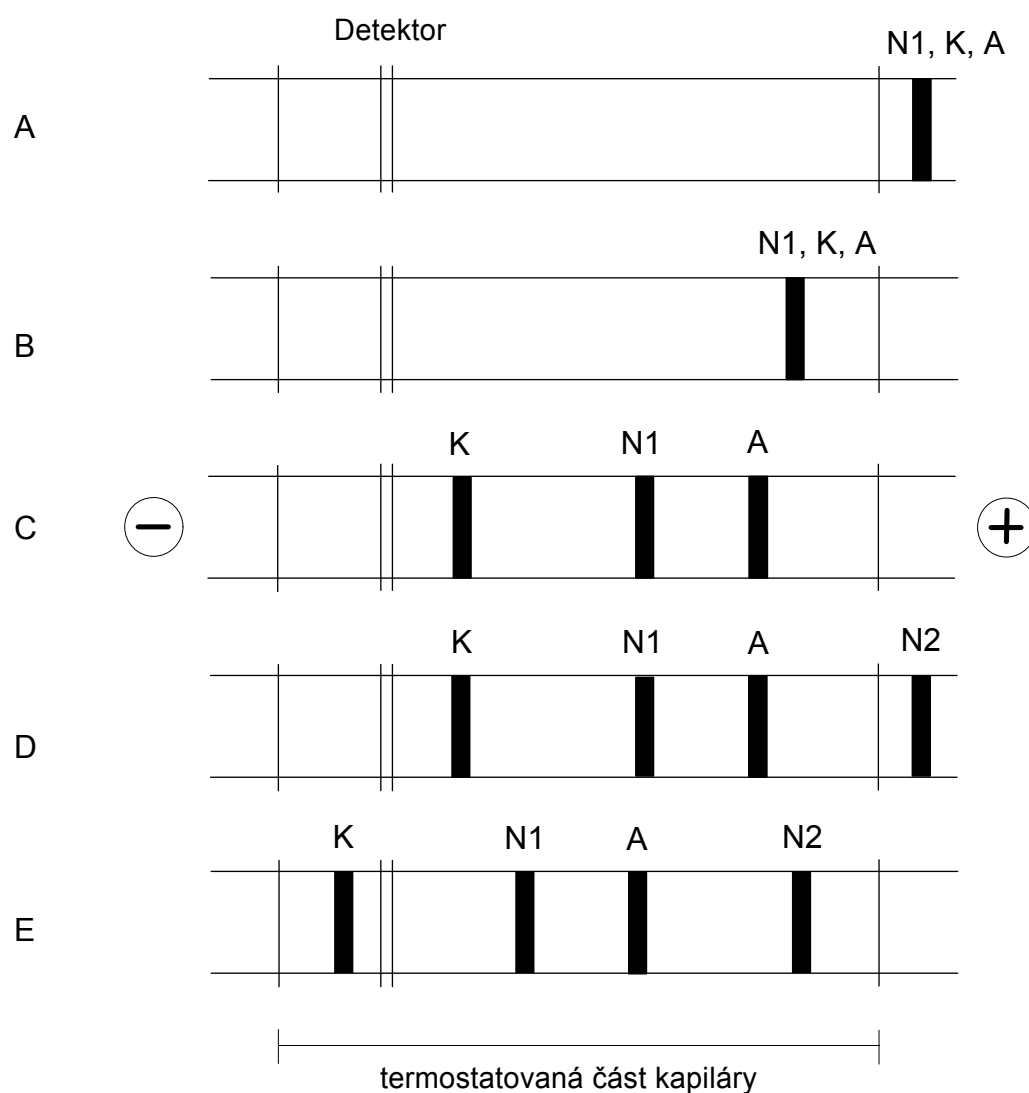
Velikost, polarita a doba aplikace napětí je volena tak, aby došlo k separaci sledovaných analytů před jejich průchodem přes detektor.

Na časovém záznamu detektoru, tzv. elektroferogramu, se při nenulové odezvě projeví zóny složek vzorku jako píky.

1.2 Tlakem zprostředkovaná kapilární elektroforéza

Tlakem zprostředkovaná kapilární elektroforéza (PreMCE) byla roku 1996 zavedena Williams a Vighem jako speciální elektroforetická metoda určená pro separaci analytů o malé pohyblivosti v systémech s nízkým EOF. [11, 12]

Metoda PreMCE umožňuje rychle a reprodukovatelně měřit velmi nízké mobility analytů i EOF, současně eliminuje základní problémy spojené s elektroforetickou separací, např. kolísání EOF během separace či vliv Joulova zahřívání, jelikož separace je možno provádět pouze v termostatované části kapiláry. Jednou z největších výhod této metody je možnost stanovení pohyblivosti kationtů a aniontů v jednom experimentu nezávisle na velikosti a směru EOF.



Obr. 2 Pořadí kroků PreMCE metody k určení elektroforetické pohyblivosti kationtu K a aniontu A (překresleno podle [11]). N1 a N2 značí elektroneutrální látky. Bližší popis je uveden v textu.

Schematické znázornění určení efektivní pohyblivosti kationtu a aniontu zobrazuje Obr. 2. V prvním kroku A se do kapiláry naplněné BGE nadávkuje vzorek, který obsahuje analyt a neutrální marker N1 rozpuštěný v BGE. V kroku B je zóna vzorku natlačena do termostatované části kapiláry konstantním tlakem p . Poté v kroku C je aplikováno separační napětí U po čas t_{migr} tak, aby ani analyt ani neutrální marker „nepřešly“ přes detektor nebo nevyputovaly vstupním koncem kapiláry. V tomto kroku dochází k separaci neutrálního markeru a sledovaného iontu. Neutrální marker se pohybuje směrem ke katodě (v případě kationického EOF), kation putuje směrem ke katodě a aniont k anodě kombinací své elektroforetické pohyblivosti a pohyblivosti elektroosmózy. Ihned po vypnutí napětí je v následujícím kroku D nadávkován další neutrální marker N2 rozpuštěný v BGE. Nakonec v kroku E je opět aplikován konstantní tlak p po dobu, než se na záznamu detektoru objeví pík markeru N2.

Popsaný způsob umožňuje stanovení efektivní pohyblivosti analytu. Metodu je možné rozšířit i pro stanovení rychlosti EOF, detailní popis uvádí publikace Williamse a Vigha [11].

Princip výpočtu efektivní pohyblivosti analytu je následující. Zóny v kroku E procházejí přes detektor rychlostí hydrodynamického toku v_h (neboli rychlostí protlačování). Tato rychlost se určí z času, za který marker N2 doputuje v konečném kroku E k detektoru

$$v_h = \frac{L_d}{t_{N2} - t_p}, \quad (11)$$

kde L_d odpovídá délce kapiláry k detektoru a t_{N2} je zaznamenaný čas druhého markeru při průchodu detektorem, t_p odpovídá času počátku aplikace tlaku p ve finálním kroku E.

Z této rychlosti a rozdílu detekčních časů markeru N1 (t_{N1}) a analytu a (t_a) pak lze vyjádřit dráhový rozdíl l_a , na který se od sebe vzdálí analyt a marker N1 během kroku C, kdy je aplikováno separační napětí,

$$l_a = (t_{N1} - t_a)v_h. \quad (12)$$

Tento dráhový rozdíl je dán součinem efektivní pohyblivosti analytu, doby aplikace napětí t_{migr} a intenzity elektrického pole. Pro efektivní elektroforetickou pohyblivost tedy platí následující vztah

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{l_a L_c}{U t_{\text{migr}}}. \quad (13)$$

Kombinací vztahů (11), (12) a (13) dostaneme finální výraz pro výpočet efektivní

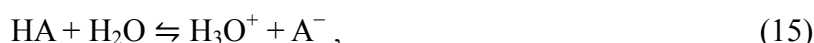
elektroforetické pohyblivosti pro analyt (nezávisle zda se jedná o anion a kation) pro metodu PreMCE

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{L_c L_d (t_{N1} - t_a)}{U t_{\text{migr}} (t_{N2} - t_p)} \quad (14)$$

1.3 Vliv pH a iontové síly na chování malých iontů

a) Efekt pH na chování malých iontů ve vodném roztoku [14]

Disociaci slabé jednosytné kyseliny ve vodném roztoku lze popsat stechiometrickou rovnicí



kde HA symbolizuje nedisociovanou formu a A^- anion této kyseliny. Termodynamická disociační konstanta K_A je pak definována výrazem

$$K_A = \frac{a_{\text{A}^-} a_{\text{H}_3\text{O}^+}}{a_{\text{HA}}} \quad (16)$$

ve kterém a_{A^-} značí aktivitu aniontu kyseliny, $a_{\text{H}_3\text{O}^+}$ je aktivita oxoniových iontů a a_{HA} aktivita nedisociované formy této kyseliny. Pokud stanovujeme hodnotu disociační konstanty pomocí elektroforetických experimentů, kde efektivní pohyblivost je přímo úměrná koncentraci aniontu viz vztah (7) a hodnota pH odpovídá výrazu $\text{pH} = -\log a_{\text{H}_3\text{O}^+}$, je vhodné zavést tzv. smíšenou disociační konstantu K_A^{mix}

$$K_A^{\text{mix}} = \frac{c_{\text{A}^-} a_{\text{H}_3\text{O}^+}}{c_{\text{HA}}} \quad (17)$$

Vztah mezi termodynamickou a smíšenou disociační konstantou je následující:

$$K_A = K_A^{\text{mix}} \gamma_{\text{A}^-} \quad (18)$$

kde γ_{A^-} je aktivitní koeficient aniontu kyseliny. Zároveň platí, že aktivitní koeficient neutrální formy kyseliny je jednotkový.

Efektivní pohyblivost dané kyseliny je podle vztahu (7) dána následující rovnicí

$$\mu_{\text{eff}} = \mu_{\text{A}^-} \frac{c_{\text{A}^-}}{c_{\text{HA}} + c_{\text{A}^-}} \quad (19)$$

kde c_{A^-} je koncentrace příslušného jednomocného aniontu a c_{HA} značí koncentraci nedisociované formy dané kyseliny, μ_{A^-} odpovídá aktuální pohyblivosti aniontu kyseliny.

Kombinací rovnic (17) a (19), dostaneme vztah pro závislost efektivní pohyblivosti na pH ve tvaru

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{A}^-}}{1 + 10^{\text{p}K_{\text{A}}^{\text{mix}} - \text{pH}}} \quad (20)$$

Vynesením experimentální závislosti elektroforetické pohyblivosti malých iontů na pH BGE se získá křivka ve tvaru sigmoidy, ze které proložením regresní funkcí (20) můžeme získat aktuální pohyblivost aniontu kyseliny μ_{A^-} a smíšenou disociační konstantu $\text{p}K_{\text{A}}^{\text{mix}}$ [13–16]. Obdobný vztah lze odvodit i pro slabé báze, či vícesytné elektrolyty.

b) Efekt iontové síly na chování malých iontů ve vodném roztoku

Závislost aktuální pohyblivosti binárního elektrolytu na iontové síle popisuje Onsagerův limitní zákon a Onsagerův rozšířený zákon. Zatímco Onsagerův limitní zákon je platný pouze pro nízké hodnoty iontových sil zhruba do 1 mM, což pro metodu CZE není reálné, rozšířený Onsagerův model v případě vyšších koncentrací iontů v BGE bere v úvahu konečnou velikost iontu, protože nelze zanedbat iontovou atmosféru obklopující centrální ion. [17]

Onsagerův limitní zákon

Onsagerův limitní zákon (také Debye–Hückel–Onsagerova teorie) byl odvozen na základě Debye–Hückelově teorie pro výpočet aktivitních koeficientů iontů. [17] Tento zákon popisuje vztah mezi aktuální a limitní pohyblivostí iontů a pro anion $\mu_{\text{A}^{z-}}$ má následující tvar

$$\mu_{\text{A}^{z-}} = \mu_{\text{lim}, \text{A}^{z-}} - \left(\mu_{\text{lim}, \text{A}^{z-}} |z_-| z_+ B_1 \frac{q}{1 + \sqrt{q}} + B_2 |z_-| \right) \sqrt{I}, \quad (21)$$

ve kterém $\mu_{\text{lim}, \text{A}^{z-}}$ je limitní pohyblivost daného aniontu, z_+ a z_- jsou nábojová čísla kationtu a aniontu a I je iontová síla. Pro konstanty B_1 a B_2 platí následující vztahy:

$$B_1 = \frac{\sqrt{2}F^3}{12\pi N_{\text{A}} (\varepsilon RT)^{\frac{3}{2}}}, \quad (22)$$

$$B_2 = \frac{\sqrt{2}F^2}{6\pi N_{\text{A}} \eta (\varepsilon RT)^{\frac{1}{2}}}, \quad (23)$$

kde F je Faradayova konstanta, N_{A} značí Avogadrovu konstantu, ε je permitivita a η viskozitní koeficient BGE. Symbol R odpovídá univerzální plynové konstantě a T je termodynamická teplota. Parametr q (z rovnice 21) lze získat z nábojových čísel z_+ a z_- a limitní pohyblivosti kationtu a aniontu, $\mu_{\text{lim}, \text{K}^{z+}}$ a $\mu_{\text{lim}, \text{A}^{z-}}$,

$$q = \frac{z_+ |z_-|}{z_+ + |z_-|} \frac{\mu_{\text{lim}, K^{z_+}} + \mu_{\text{lim}, A^{z_-}}}{|z_-| \mu_{\text{lim}, K^{z_+}} + z_+ \mu_{\text{lim}, A^{z_-}}} . \quad (24)$$

Iontová síla I je definovaná vztahem

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 , \quad (25)$$

ve kterém c_i a z_i je koncentrace a nábojové číslo i -tého iontu v roztoku.

Vztahy popisující Onsagerův zákon byly odvozeny za předpokladu, že změny pohyblivosti iontů způsobují dva efekty, a sice relaxační a elektroforetický [18]. Onsagerův zákon ovšem nebere v potaz komplexaci nebo asociaci iontů.

Rozšířený Onsagerův model [17]

Rozšířený Onsagerův model má následující tvar

$$\mu_{A^{z_-}} = \mu_{\text{lim}, A^{z_-}} - \left(\mu_{\text{lim}, A^{z_-}} |z_-| z_+ B_1 \frac{q}{1 + \sqrt{q}} + B_2 |z_-| \right) \frac{\sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}} , \quad (26)$$

kde B_1 , B_2 (zavedeno výše) a B jsou konstanty (pro vodné roztoky při teplotě 25 °C: $B_1 = 0,7853 \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$, $B_2 = 31,38 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$, $B = 3,291 \cdot 10^9 \text{ m}^{-1} \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$) a a představuje nejkratší vzdálenost, na jakou se mohou přiblížit středy aniontu a kationtu. Hodnota součinu Ba pro malé ionty přibližně odpovídá $1,5 \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$.

Platnost Onsagerova modelu ale není univerzální. Lze ho použít pouze pro silné binární elektrolyty. V CZE je ovšem analyt obvykle studován v BGE o více iontových formách. Z tohoto důvodu byly předchozí teorie v roce 1932 rozšířeny Onsagerem a Fuosssem i pro složitější systémy. Výsledný Onsager-Fuossův model je vhodný i pro vícevalentní ionty, je ovšem výrazně komplikovanější a nelze jej popsat jednoduchou rovnicí.

1.4 Komplexy blokových kopolymerů s iontovými surfaktanty

Blokové kopolymery [19–22]

Blokový kopolymer je typ polymeru, který se skládá ze dvou nebo více homopolymerních podjednotek, lineárně uspořádaných a navzájem spojených kovalentní vazbou [23]. Homopolymery rozlišujeme dle typu monomerní jednotky, kterou obsahují. Spojení homopolymerních podjednotek nebo jednoduše homopolymerů či bloků může vyžadovat mezičlánek, neopakující se podjednotku (an intermediate non-repeating subunit), označovanou jako spojující blok, tzv. junction block.

Blokové kopolymery jsou klasifikovány podle počtu bloků, které obsahují, nebo na základě jejich uspořádání. Struktura kopolymerů může být kontrolována syntetickými procedurami, a je tak možné připravit lineární diblokové (obsahující dva bloky), triblokové (obsahující tři bloky), multiblokové kopolymery nebo kopolymery uspořádané do hvězdice či rozvětvené kopolymery. Příklady blokového uspořádání ukazuje Schéma 1 [23] a Obr. 4. Meze se představivosti nekladou, a lze tak připravit např. i „exotický“ kopolymer mající tvar písmene H či „Ludolfova čísla“.

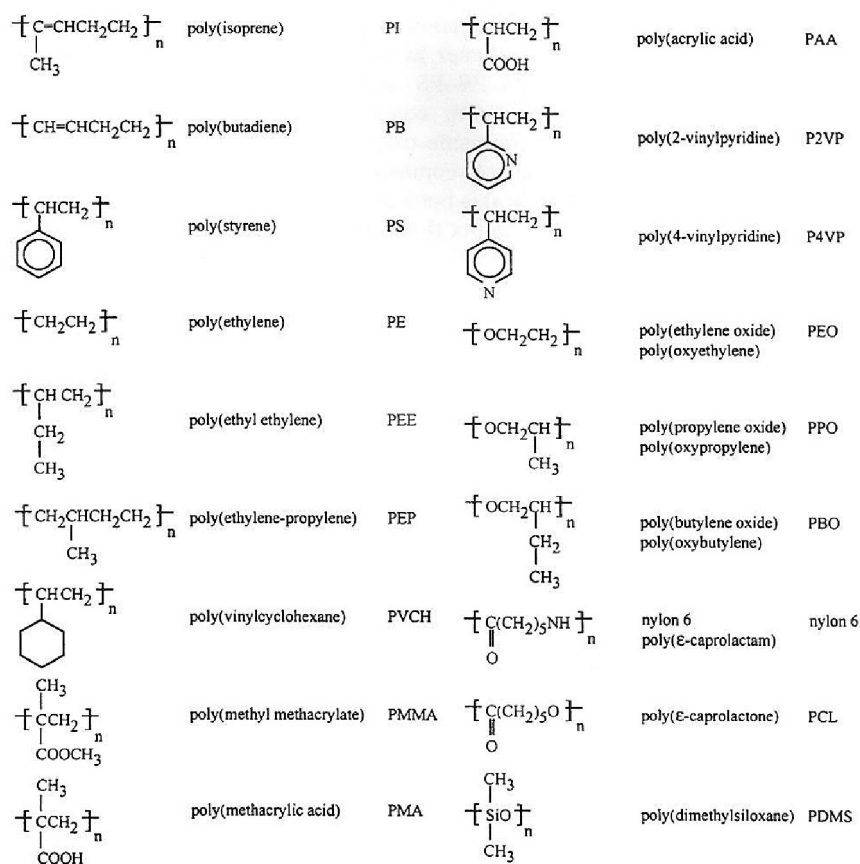
Schéma 1:

-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-
-A-A-A-A-A-B-B-B-B-B-A-A-A-A-A-
-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-
-A-B-B-B-A-B-A-B-A-A-

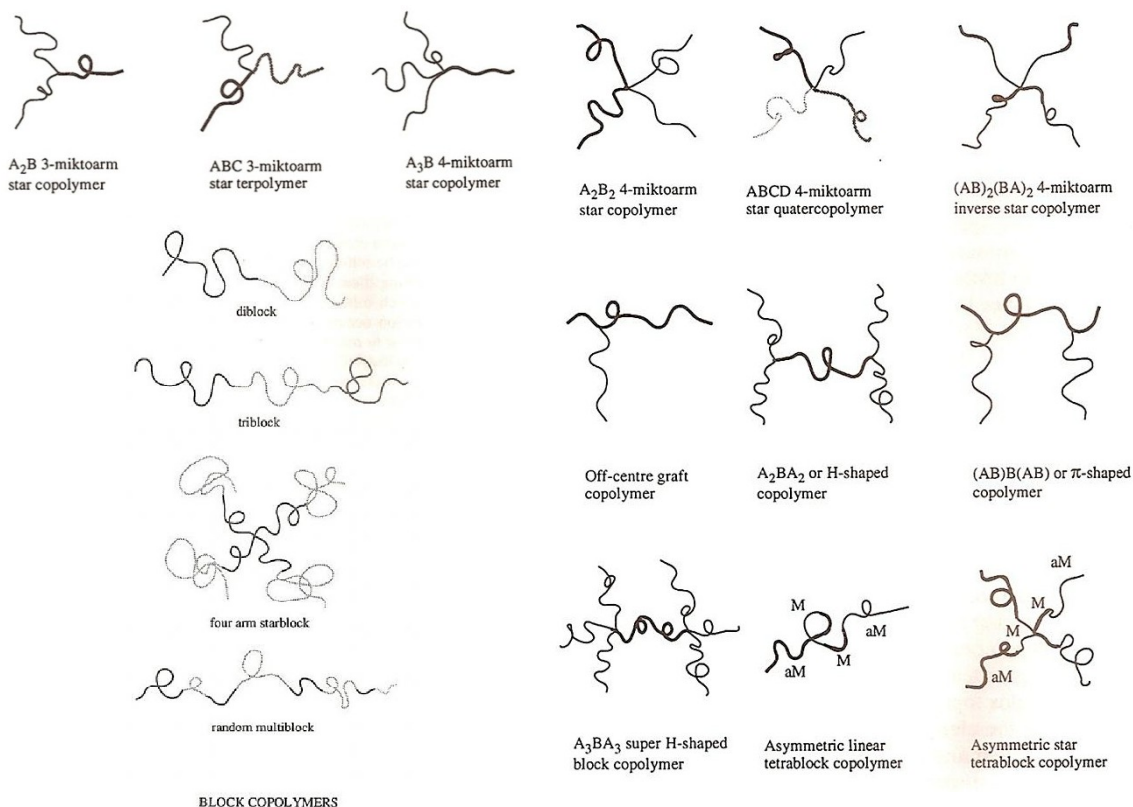
Blokové kopolymery studované v této diplomové práci se řadí do kategorie diblokových kopolymerů a jsou to:

polyethylen oxid-*blok*-polymethakrylová kyselina (PEO-*b*-PMANa),
poly[3,5-bis(trimethylammoniummethyl)-4-hydroxystyren iodid]-*blok*-poly(ethylen oxid) (QNPHOS-*b*-PEO),
polystyren-*blok*-polyakrylová kyselina (PS-*b*-PAA).

Další možné varianty vychází z kombinace nejčastěji používaných bloků, jejichž struktury uvádí Obr. 3.



Obr. 3 Chemické struktury bloků běžně používaných pro syntézu blokových kopolymerů. Převzato z [20].



Obr. 4 Architektura blokových kopolymerů. Převzato z [20].

Díky možnosti kombinovat různé druhy polymerních řetězců lze získat materiály s požadovanými přesně definovanými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Blokované kopolymery se tak hojně využívají v průmyslu, například jako materiály kombinující pevnost a pružnost, tzv. termoplastické elastomery, které se využívají k výrobě sněžných skútrů, v medicíně pak nacházejí využití jako katetry. Ve formě roztoků se kopolymery používají pro své povrchové vlastnosti například jako součást pěn, olejových příměsí, změkčovadel, zahušťovacích prostředků nebo také jako disperzní činidla. [20, 24]

Iontové surfaktanty [25–27]

Iontové surfaktanty neboli tenzidy či povrchově aktivní látky jsou substance, které se díky svým jedinečným vlastnostem hojně využívají ve farmacii, kosmetice, industriálních a environmentálních odvětvích [26]. Nachází uplatnění v každodenním životě, jsou součástí pracích prášků, motorových olejů nebo léků.

Mikroorganismy přirozeně syntetizují velkou řadu vysokomolekulárních a nízkomolekulárních biosurfaktantů. Do skupiny vysokomolekulárních biosurfaktantů se řadí amfifilní polysacharidy, proteiny, lipopolysacharidy, lipoproteiny nebo komplexy těchto látek. Mezi nízkomolekulární bioemulgátory patří glykolipidy.

Biosurfaktanty mají tři přirozené úlohy: 1. zvětšují povrch hydrofobních nerozpustných látek; 2. zvyšují biodostupnost hydrofobních látek navýšením jejich rozpustnosti; 3. regulují navázání mikroorganismů na povrchy rostlin, živočichů, složek půd atd. [26, 28].

Vedle přirozeně se vyskytujících surfaktantů se setkáváme i se surfaktanty synteticky připravenými. Nevýhodou synteticky připravených substancí oproti těm přírodním bývá jejich vyšší toxicita k přírodnímu prostředí, nebiodegradovatelnost a schopnost bioakumulace. Jejich pozitivní vlastnosti jsou ale podobné jako u biosurfaktantů [29].

Molekula surfaktantu se skládá z hydrofobní a hydrofilní domény. Nepolární část je nejčastěji tvořena jedním nebo dvěma uhlíkatými řetězci, které mají typicky několik ethylenových jednotek $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_n$, kde $n = 5-18$. Polární hlava se vyskytuje v mnoha modifikacích.

Surfaktanty dělíme do několika skupin podle jejich aktivního povrchového náboje na kationtové, aniontové a elektroneutrální. Kationtové surfaktanty se vyznačují pozitivním nábojem na povrchově aktivní části. Příkladem mohou být N-alkylpyridiniové halogenidy (N-dodecylpyridinium chlorid, N-dodecylpyridinium bromid) nebo tetraalkylamoniové soli. Aniontové surfaktanty nesou na své aktivní části záporný náboj. Nejvíce využívanými jsou alkybenzensulfonáty nebo alkylsulfonáty jako dodecylsulfát sodný (SDS) nebo sodium deoxycholát. Zwitterionty neboli obojetné ionty mají na své povrchově aktivní

části jak záporně nabitou tak kladně nabitou část – jejich náboj tedy závisí na pH okolního prostředí. Příkladem jsou fosfatidylcholin nebo Triton X-100.

Amfifilní charakter surfaktantů umožňuje, že ve vodných roztocích se jeho molekuly při dosažení kritické micelární koncentrace (CMC) samoorganizují do kulovitých útvarů tzv. micelárních agregátů, v nichž se hydrofobní části molekul (tzv. hydrofobní ocsy) uspořádají dovnitř a na povrchu vyčnívají hydrofilní hlavy. Tato schopnost samoorganizace (self-assembly) vychází primárně z hydrofobního efektu, ačkoli důležitou roli hrají také van der Waalovy síly, elektrostatické interakce (u nabitých surfaktantů) a vodíkové můstky. [25, 30] K určení hodnoty kritické micelární koncentrace surfaktantu se využívá mnoho metod, mezi něž patří i CZE [31, 32].

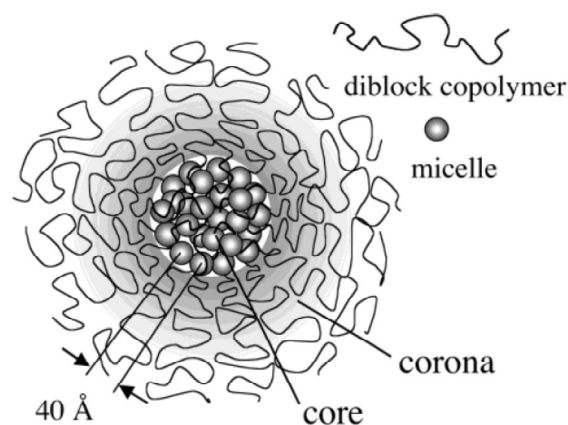
Surfaktanty našly také významné uplatnění v analytických separačních technikách. Na základě jejich výhodné interakce s širokou škálou látek byla vyvinuta důležitá elektroforetická metoda tzv. micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC), kdy jsou surfaktanty přidávány jako aditiva do základního elektrolytu. Tato metoda je určena především pro analýzu neutrálních molekul hydrofobní i hydrofilní povahy, a rozšiřuje tak využití CZE i pro separaci neutrálních látek. Metoda MEKC využívá solvatace neutrálních molekul v micelách. Separační mechanismus MEKC stojí na rozdílné distribuci neutrálních analytů mezi vodnou a micelární fází, jinak označované jako pseudostacionární fáze. [1]

Komplexy polyelektrolyt–surfaktant

V několika posledních dekádách se surfaktantům věnuje velká pozornost z hlediska tvorby komplexu polyelektrolyt-surfaktant (PE–S). Interakcemi mezi nabitým řetězcem polymeru (polyelektrolyt) a opačně nabitým surfaktantem se zabývá velké množství vědeckých týmů [33–39]. Nynější studie komplexů PE–S poukazují na jejich velký potenciál ve farmaceutickém průmyslu jako cílené nosiče léků (drug delivery systems) nebo při genové terapii (gene delivery). Využití nacházejí též v elektronice jako mikrosenzory či v kosmetice [40].

Komplex PE–S vzniká prostřednictvím elektrostatické interakce mezi nabitou hlavou surfaktantu a vedlejším řetězcem polyelektrolytu a hydrofobní interakce mezi alkylovým řetězcem surfaktantu a hydrofobní částí polyelektrolytu [35, 40]. K tvorbě komplexu dojde již při koncentraci významně nižší než je kritická micelární koncentrace surfaktantu [40]. V závislosti na poměru surfaktant/polyelektrolyt ve vodném roztoku, vytvořené komplexy mohou být stechiometrické nebo nestechiometrické. Nestechiometrické komplexy, obsahující buď nadbytek nabitého polyelektrolytu, nebo nadbytek surfaktantu, jsou

obvykle dobře rozpustné. Tento typ komplexu tvoří tzv. smíšené micely (mixed micelles) (Obr. 5), které obsahují shluk (cluster) hydrofobních řetězců surfaktantu na povrchu obklopeným polárními řetězci polyelektrolytu. Opakem jsou ekvimolární komplexy PE-S, které ve vodných roztocích typicky vykazují nerozpustnost nebo omezenou rozpustnost. Zájem o tyto ve vodě nerozpustné komplexy neustále stoupá, vzhledem k jejich rozpustnosti v organických rozpouštědlech a možnému dalšímu využití [40].

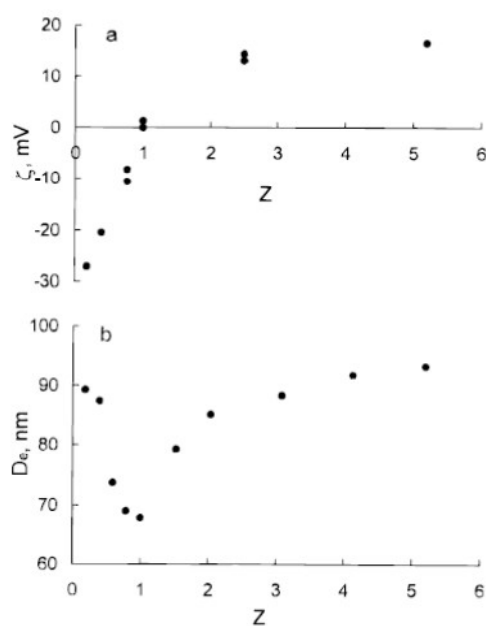


Obr. 5 Schematické znázornění komplexu PE-S tvořený asociací blokového kopolymeru z neutrální a nabitě části a opačně nabitým surfaktantem. Převzato z [37].

Stabilita a rozpustnost komplexu také výrazně závisí na složení polymeru a délce jednotlivých řetězců. Významný vliv má zvolené rozpouštědlo, jeho pH a iontová síla, teplota, poměr koncentrace surfaktantu ku koncentraci polymeru [39].

Bronich a kol. [33] studovali vliv poměru koncentrace surfaktantu a koncentrace polyelektrolytu, β (v publikaci značeno Z), na rozpustnost a stabilitu komplexu tvořeného poly(ethylen oxid)-*blok*-poly(methakrylátem) sodným (PEO-*b*-PMANa) a N-alkylpyridiniovými kationty. Autoři ukázali, že tento typ komplexu je rozpustný nezávisle na poměru β , což platí i pro poměr koncentrací, kdy je celkový náboj polyelektrolytu neutrální (tzv. stoichiometric complexes). Právě tato vlastnost je odlišuje od jiných systémů, jejichž nevýhodou tvoří omezená rozpustnost nebo nerozpustnost při nulovém náboji [40].

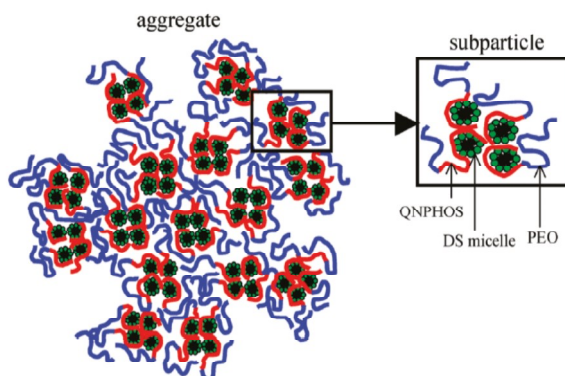
Současně se autoři zabývali změnou ζ -potenciálu a efektivního průměru v závislosti na poměru β (Obr. 6). Přídavek surfaktantu k roztoku polyelektrolytu vede k růstu hodnoty ζ -potenciálu směrem do kladných hodnot, což je způsobeno postupným poklesem náboje polyaniontových částí blokového kopolymeru. Velikost částic se zmenšuje až do hodnoty $\beta = 1$, kdy částice vykazují nejmenší průměr a celkový



Obr. 6 ζ -Potenciál a efektivní průměr D_e částic tvořených $C_{16}PyBr/PEO-b-PMANa$ v závislosti na různé hodnotě β . Převzato z [33].

náboj se rovná 0. Další zvyšování koncentrace surfaktantu vede k rostoucímu kladnému náboji částic a zároveň i ke zvětšení jejich velikosti.

V publikaci Štěpánka a kol. [35] se autoři věnují studiu komplexu tvořeného blokovým kopolymerem, který obsahuje kladně nabitý blok poly[3,5-bis(trimethylammoniummethyl)-4-hydroxystyren a neutrální blok z polyethylen oxidu (QNPHOS-*b*-PEO), s dodecylsulfátem sodným (SDS) (viz Obr. 7).



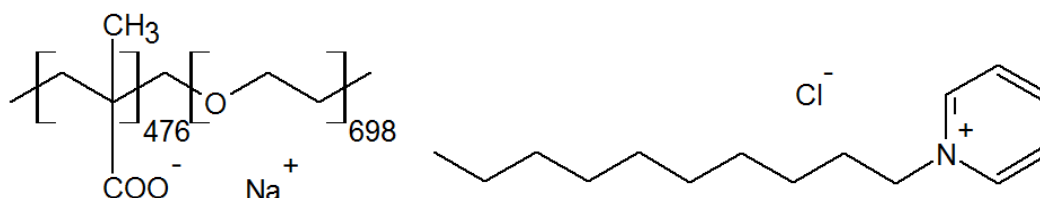
Obr. 7 Morfologie agregátů QNPHOS-*b*-PEO/SDS. Převzato z [35].

Metodami dynamického rozptylu světla a pomocí ζ -potenciometru byly charakterizovány vlastnosti PE-S komplexu v závislosti na poměru β , což je poměr koncentrací SDS/QNPHOS-*b*-PEO. Hydrodynamický poloměr částic bez přítomnosti SDS je 30 nm a jejich ζ -potenciál má hodnotu 86 mV. Přídavkem SDS na hodnotu $\beta = 0,2$ dochází k nárůstu hydrodynamického poloměru částic z 30 nm na 110 nm a ζ -potenciál v tomto rozmezí β klesá z 86 mV na 35 mV. S dalším přidavkem SDS je na křivce závislosti hydrodynamického poloměru i náboje na poměru β zřetelné plateau, a jejich hodnoty jsou téměř konstantní. U hodnot $\beta > 1$ je pozorován strmý nárůst velikosti částic důsledkem snížené rozpustnosti a dochází také k poklesu ζ -potenciálu. Při $\beta > 1,5$ komplex už není stabilní a dochází k tvorbě sraženin. Je zřejmé, že nulového náboje ($\beta > 2$) nebylo možné u tohoto komplexu dosáhnout.

Metoda CZE není pouze separační metodou, ale hojně se využívá i ke studiu mezimolekulových interakcí [41–44]. S využitím CZE můžeme sledovat změnu pohyblivosti komplexu PE-S v závislosti na změně poměru koncentrace surfaktantu a koncentrace polymeru β . Aktuální pohyblivosti komplexu se budou lišit díky změně jeho celkového náboje a velikosti, což umožňuje sledovat tvorbu komplexu.

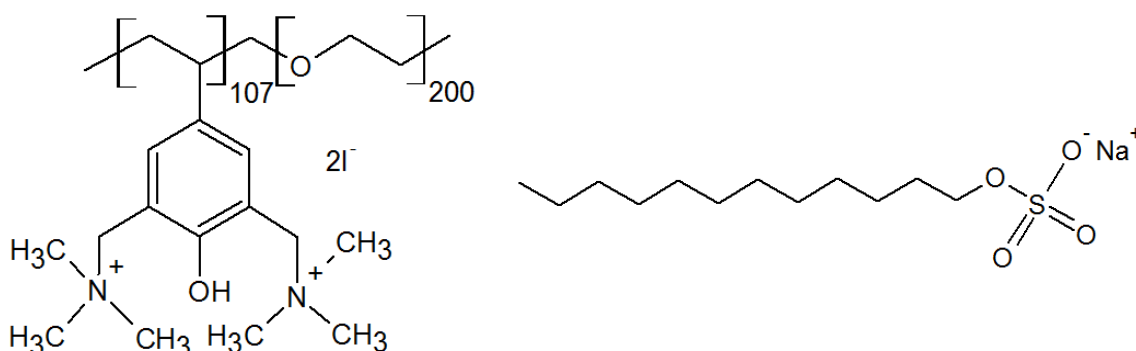
V této diplomové práci je s využitím kapilární zónové elektroforézy studován komplex PE-S tvořený blokovým kopolymerem poly(ethylen oxid)-*blok*-polymethakrylátem sodným (PEO-*b*-PMANa), k němuž jako opačně nabitý surfaktant byl vybrán N-dodecylpyridinium chlorid ($C_{12}PyrCl$) (Obr. 8). Jeden blok kopolymeru je tvořen

polymethakrylovou kyselinou, která je ve vysokém pH (při bazickém pH) záporně nabitá, a druhý blok sestává z neutrálního polyethylen oxidu. U tohoto komplexu PE–S se předpokládá, že jeho elektroforetická pohyblivost v závislosti na změně poměru β bude korelovat s již naměřenými vlastnostmi (ζ -potenciálu a efektivního průměru) podobného komplexu studovaného v publikaci [33].



Obr. 8 Struktura blokového kopolymeru PEO-*b*-PMANa a surfaktantu N-dodecylpyridinium chloridu.

Druhým studovaným systémem byl systém totožný jako v publikaci Štěpánka a kol. [35], a to kladně nabitý blokový kopolymer poly[3,5-bis(trimethylammoniummethyl)-4-hydroxystyren iodid]-*blok*-poly(ethylen oxid) (QNPHOS-*b*-PEO) a záporně nabitý surfaktant dodecylsulfát sodný (SDS). Blok polyelektrolytu se skládá z monomerních jednotek nesoucích dva kladné náboje na kvarterních dusících. Polyethylen oxid jako neutrální forma tvoří druhý blok (Obr. 9).



Obr. 9 Struktura blokového kopolymeru QNPHOS-*b*-PEO a surfaktantu SDS.

Chemické specifikace studovaných systémů PE–S jsou uvedeny v Tabulka 1.

Tabulka 1 Chemické charakteristiky studovaných komplexů PE–S.

	systém 1		systém 2	
	PE blok	neutrální blok	PE blok	neutrální blok
zkratka	PMANa	PEO	QNPHOS	PEO
$M_w/g\ mol^{-1}$	41000	30700	53900	8800
počet monomerů	476	698	107	200
PI		-		1,13
surfaktant		$C_{12}PyrCl$		SDS

U zmíněných komplexů již byla stanovena řada fyzikálně-chemických parametrů.

V závislosti na poměru β byla provedena měření hydrodynamického poloměru R_h resp. efektivního průměru D_e nebo ζ -potenciálu [33, 35], které mohou usnadnit interpretaci elektroforetických dat.

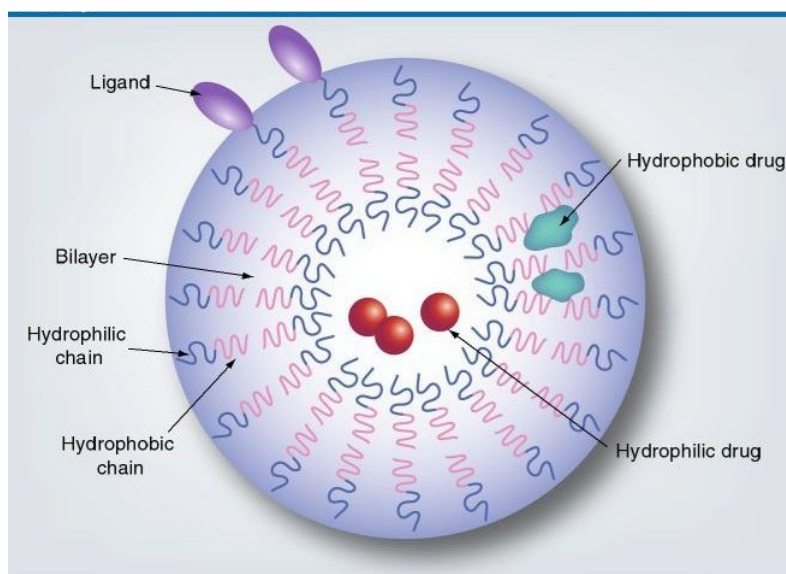
1.5 Vesikuly tvořené blokovými kopolymery

Vesikuly [45, 46]

Vesikuly jsou mikroskopické váčky schopné uzavřít do svého vnitřního prostoru požadovanou látku a transportovat ji na místo určení. V biologických organismech hrají nezastupitelnou roli v kompartmentaci buněk, transportní, sekreční nebo lysosomální činnosti.

Vnitřní prostor vesikuly je od okolního prostředí oddělen tenkou membránou. Membrány jsou obecně samoorganizovatelné struktury z amfifilních molekul (tedy s hydrofilně-hydrofobním charakterem), kterou v biologických organismech vytvářejí fosfolipidy. Membrána může být připravena také uměle, a to z blokových kopolymerů, které imitují amfifilitu lipidů a ve vodných roztocích jsou schopné se samoorganizovat do vesikulárních útvarů a zároveň určují povahu membrány.

Kontaktem amfifilních látek s vodným roztokem dojde k utvoření formace, kdy nepolární části se asociují k sobě a utvoří vrstvu, která je na obou stranách pokrytá polárními molekulami. Tím dojde v hydrofilním prostředí k utvoření vesikuly (Obr. 10). Vesikuly vzniklé z amfifilních blokových kopolymerů se označují jako polymersomy (z anglického polymersomes).



Obr. 10 Schematické znázornění vesikuly. Převzato z [47].

Polymerní vesikuly se podobají liposomům s tím rozdílem, že jsou tvořené synteticky připravenými blokovými kopolymery. Oproti liposomům vynikají větší velikostí, stabilitou

a zároveň nízkou imunogenicitou. V důsledku větší molekulové hmotnosti polymerů je také polymerní membrána výrazně tlustší, a umožní tak zapouzdřenou látku uchovat uvnitř vesikuly déle [46].

Schopnost vesikulárních útvarů zapouzdřit hydrofilní sloučeninu uvnitř kavity s vodným roztokem nebo akumulovat hydrofobní či mastné látky v membráně se využívá například v kosmetickém, farmaceutickém průmyslu jako cílené nosiče léků nebo v biomedicíně k vývoji tzv. nanoreaktorů či umělých organel, jinak nazývané jako reakční komůrky (chemical reaction chambers) [45, 46].

Vlastnosti některých vesikul zapouzdřit ve vnitřní dutině ve vodě rozpustnou látku, např. vitamin C mající omlazující efekt, a zároveň v hydrofobní části membrány navázat vitamin E působící léčivými účinky, se hojně využívá v kosmetice. [45] Dnešní výzkum se velmi zaměřuje na léčbu rakoviny. Uměle připravené liposomy tvořené polyethylenglykolem s lipidy a vpravené do krevního řečiště jsou z řečiště eliminovány velmi pomalu a vydrží cirkulovat dostatečně dlouho, aby v případě, že obsahují protirakovinné léčivo, našly cestu ke skrytému tumoru.

Velmi zajímavý výzkum se týká polymerních vesikul s bílkovinnými kanály zabudovanými do vesikulární membrány. [48] Kanály jsou schopné interagovat s viry, a zapříčinit tak přenos virové DNA dovnitř vesikuly. Takovéto vesikuly se označují jako nanokonteinery. V oblasti genové terapie tak tento model umožňuje zkoumat transport cizích genů do eukaryotických buněk.

Vesikuly tvořené PS-*b*-PAA

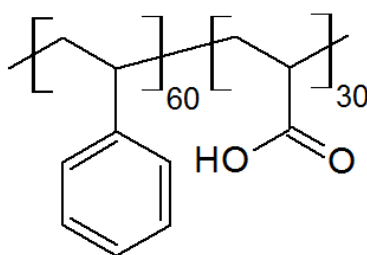
Zda se blokový kopolymer uspořádá do vesikuly záleží na více parametrech, konkrétně na celkové molekulové hmotnosti polymeru M_w , zastoupení jednotlivých bloků (frakce f), délce jednotlivých bloků [49, 50] a také na interakční energii mezi jednotlivými monomery v každém bloku [45]. Vliv má také příprava roztoku vesikul, např. použité rozpouštědlo [51, 52], typ a koncentrace iontů v roztoku [49]. Různých uspořádání blokového kopolymeru lze docílit i za zvýšené teploty a tlaku.

Polymersomy se dají připravit více způsoby, mezi něž patří přímé rozpuštění kopolymeru v selektivním rozpouštědle, nebo nepřímá metoda, kdy se v prvním kroku kopolymer rozpustí v organickém rozpouštědle vhodném pro oba bloky a následně se rozpouštědlo dialyzuje do vodného roztoku [53]. Složení roztoku (poměr organické a vodné fáze) při jejich přípravě významně ovlivňuje velikost částic [49].

Příprava vesikul PS-*b*-PAA probíhá nepřímým postupem [54]. Nejdřív se kopolymer rozpustí v organickém rozpouštědle, např. dioxanu, poté je tento roztok několikrát

dialyzován proti směsi dioxan/voda, ve kterém se postupně zvyšuje procentuální zastoupení vody. V posledním kroku nastává dialýza proti vodnému roztoku (borátový pufr), aby se kompletně odstranil dioxan z roztoku kopolymeru. Se vzrůstajícím procentem vody se hydrofobní blok kopolymeru stále více vyhýbá hydrataci a dochází k postupnému vzniku nejdříve kulovitých micel, přes tyčinkovité (cylindrické) tvary až po vznik vesikuly [45, 52].

V této diplomové práci byl k přípravě polymersomů použit blokový kopolymer, jehož jeden blok tvořilo 60 monomerních jednotek polystyrenu a druhá doména se skládala z 30 jednotek polyakrylové kyseliny [54]. Struktura blokového kopolymeru PS₆₀-*b*-PAA₃₀ je znázorněna na Obr. 11, chemická charakterizace tohoto polymeru je shrnuta v Tabulka 2.

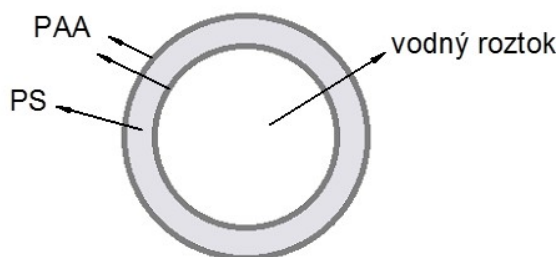


Obr. 11 Strukturní vzorec blokového kopolymeru PS₆₀-*b*-PAA₃₀.

Tabulka 2 Chemická charakterizace blokového kopolymeru PS₆₀-*b*-PAA₃₀.

zkratka	systém 3	
	PE blok	neutrální blok
$M_w/g\ mol^{-1}$	PAA	PS
$M_w/g\ mol^{-1}$	2160	6240
počet monomerů	30	60
PI		1,3

Vesikula tvořená PS-*b*-PAA je schematicky znázorněna na Obr. 12. Hydrofobní vrstva polystyrenu je z obou stran obklopena vrstvou polyakrylové kyseliny a uvnitř vesikuly se vyskytuje dutinka vyplněná roztokem pufru [54].



Obr. 12 Schematické znázornění vesikuly PS-*b*-PAA. Překresleno podle [54].

1.6 Vliv pH a iontové síly na chování polyelektrolytů

Zatímco chování malých iontů ve vodném roztoku v závislosti na pH a iontové síle je dobře popsáno teoreticky [17] (viz kapitola 1.3), u makromolekul je situace výrazně složitější. Ačkoliv již existuje několik teoretických modelů popisujících chování polyelektrolytů v závislosti na pH či iontové síle, ani jeden z nich nelze použít obecně i pro složitější systémy jako jsou například vesikuly. Proto je nutné jejich vlastnosti nadále studovat. Vhodnými kandidáty pro získání nových informací či ověření stávajících modelů jsou právě makromolekuly tvořené slabými pH-sensitivními a *I*-sensitivními polyelektrolyty vzhledem k jejich schopnostem dramaticky změnit konformaci jako odpověď na malou změnu okolních podmínek.

a) Chování PS-*b*-PAA v závislosti na pH

Elektroforetické chování velkých makromolekul, konkrétně PS-*b*-PAA vesikul v závislosti na pH BGE metodou CZE není dosud dostatečně popsáno. Jejich chování bylo intenzivně studováno v publikacích Eisenberga [45, 49–52, 55, 56] pomocí různých experimentálních technik, ovšem nebyla studována závislost na pH. Ke studiu byly využity například metody dynamického či statického rozptylu světla nebo mikroskopovací techniky [54]. V publikaci Currie a kol. [57] studovali chování rozvětveného polyakrylového brushe¹ v závislosti na pH a iontové síle metodou elipsometrie. Prokázali, že pH způsobuje konformační změnu polyelektrolytového brushe. Stupeň ionizace polyakrylových skupin se řídí hodnotou pH, kdy stejně jako u malých iontů s rostoucí hodnotou pH narůstá negativní náboj u akrylové kyseliny. Délka brushe se prodlužuje s nárůstem pH z hodnoty 3 na 5,8 při konstantní iontové síle, což způsobuje repulze negativních nábojů.

b) Polyelektrolytový brush vs. iontová síla

V případě makromolekul je třeba počítat s efekty, které u malých iontů nepozorujeme, konkrétně výrazná sorpce protiiontů z BGE na řetězce na povrchu vesikul s následným odstíněním nábojů na těchto řetězcích. [58, 59]

Efekt iontové síly na chování polyelektrolytů je studován vzhledem k obrovské možnosti manipulovat s povrchy polyelektrolytů na základě změny okolního prostředí, což může být výhodně využito v praxi.

Hlavní roli zde hrají elektrostatické interakce, ovšem nezanedbatelné jsou také hydrofobní interakce a vodíkové vazby. Všechny tyto interakce mají za následek, že kolem

¹ V této práci je používán anglický výraz „brush“, v české literatuře se překlad „kartáč“ nevyužívá.

polyelektrolytového brushe se utvoří iontová atmosféra, která do jisté míry odstiňuje jeho náboje. Důležitým rysem PE brushů je pak lokalizace protiiontů z roztoku ve vnitřní části řetězců.

Teoretický model zabývající se problematikou rozvrstvení řetězců polymerového brushe, povrchovým nábojem, délkou řetězce a distribucí iontů byl navržen v práci Misra a kol. [60] pro různé iontové síly roztoku. Autoři popisují, že brush se napíná s rostoucím nábojem v důsledku repulze mezi jednotlivými segmenty. S rostoucí koncentrací BGE se délka brushe naopak snižuje, což podle autorů není překvapivý výsledek, protože elektrostatická repulze mezi řetězci je stíněna mnohem efektivněji. Naopak v roztocích o nízkých iontových silách náboje na brushi nejsou dostatečně stíněny, což vede k natahování řetězců opět díky repulzi mezi řetězci.

V publikaci z roku 2000 [59] se tým kolem Borisova zabýval teorií (self-consistent-field theory (SCF)) popisující konformace slabých polyelektrolytových řetězců v roztoku. Teorie navazuje na článek Misra a kol. [60] a popisuje kontrakci brushe a jeho vnitřní strukturní přeuspořádání s rostoucí iontovou silou. V závislosti na hustotě řetězců a na hodnotě I rozlišují různé režimy chování brushe, a to (i) stínění meziřetězcových interakcí způsobené především protiionty, (ii) nestínění Coulombické repulze mezi nabitými monomery a (iii) odstínění způsobené co-ionty a protiionty soli přítomné v roztoku.

V pozdější publikaci stejný vědecký tým [58] kombinuje tuto teorii s Poisson-Boltzmanovým přístupem (analytical self-consistent field Poisson-Boltzman model) pro brushe tvořené slabými polyelektrolyty, kde se snaží analyzovat kombinaci efektů pH pufru a iontové síly na vnitřní strukturu brushe a na jeho vlastnosti pomocí matematického modelu a zároveň porovnávají několik matematických přístupů.

Tyto matematické modely ovšem nepopisují závislost aktuální pohyblivosti vesikul na iontové síle, ale pouze chování polyelektrolytových řetězců.

Článek Currie a kol. [57] studuje tloušťku polyelektrolytového brushe v závislosti na pH i iontové síle roztoku metodou elipsometrie. Z jejich práce vyplývá, že při konstantním pH 4 a 5,8 s rostoucí iontovou silou narůstá délka brushe z hodnot cca 17 nm na maximální hodnotu 40 nm. Tento trend pozorují v intervalu $I < 10^{-5} - 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, poté nastává zlom a s dalším nárůstem koncentrace iontů na 1 M v roztoku délka brushe strmě poklesne. Tento výsledek je ovšem v rozporu s teoretickými modely citovaných publikací, kde se uvádí, že s rostoucí iontovou silou klesá délka brushe.

Stávající práce tedy nepodávají jednoznačný popis chování povrchu vesikul v závislosti na iontové síle (dosavadní práce se zabývaly pouze polyelektrolytovým brushem), a tato tematika tudíž vyžaduje další studium.

1.7 Další techniky pro studium blokových kopolymerů

Dynamický rozptyl světla [20, 61, 62]

Dynamický rozptyl světla (Dynamic Light Scattering, Photon correlation spectroscopy nebo Quasi-elastic light scattering) (DLS) patří mezi základní experimentální techniky studia struktury a dynamiky polymerů v roztocích. Díky DLS lze získat informace jak o polymeru samotném tak i o jeho interakcích s použitým rozpouštědlem. Získanými údaji mohou být molekulová hmotnost polymeru, gyrační poloměr (R_g) popisující tvar polymerního klubka nebo difúzní koeficient, který lze použít k určení hydrodynamického poloměru (R_H) částice.

Při měření DLS vzorek tvořený malými částicemi je osvětlen zdrojem světla (např. laser), které se na částicích rozptýlí a rozptýlené světlo poté dopadá na detektor. Protože se částice v roztoku neustále pohybují Brownovým pohybem – náhodným pohybem – intenzita rozptýleného světla se s postupem času mění, fluktuuje. Rychlost s jakou se tyto časové fluktuace mění, charakterizuje normalizovaná *časová autokorelační funkce* intenzity rozptýleného záření definovaná vztahem

$$g(\tau, q) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(t, q) I(t + \tau, q) dt, \quad (27)$$

kde $I(t, q)$ je okamžitá časová hodnota intenzity rozptýleného záření, která náhodně osciluje kolem časové střední hodnoty $\langle I(q) \rangle$. Důvodem je skutečnost, že rozptyl světla je podmíněn hustotními, teplotními nebo koncentračními fluktuacemi. T je termodynamická teplota.

Hodnota funkce $g(\tau, q)$ v čase t popisuje míru korelace mezi velikostí fluktuací na počátku měření a poté v čase t . Rychlost fluktuace intenzity rozptýleného záření v čase se mění tím rychleji, čím rychleji funkce $g(\tau, q)$ s časem klesá.

Časová autokorelační funkce se získá z experimentálních dat. Proloží-li se tato funkce tzv. Laplaceovou transformací za použití programu CONTIN, zjistíme difúzní koeficient částic D .

Díky znalosti difúzního koeficientu částic lze pak snadno pomocí Stokesovy-Einsteinovy rovnice získat hydrodynamický poloměr R_H

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}, \quad (28)$$

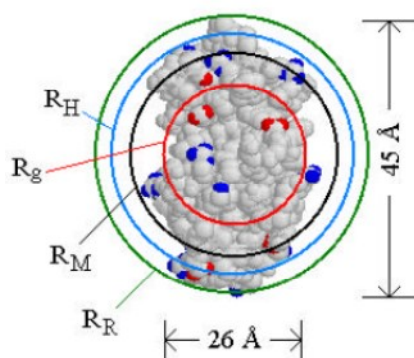
kde k_B je Boltzmannova konstanta, T je termodynamická teplota, η je viskozitní koeficient rozpouštědla.

Hydrodynamický poloměr [63]

Hydrodynamický poloměr částice je velikost této částice v roztoku včetně solvatační vrstvy iontu.

Je-li rozpouštědlem voda, hydrodynamický poloměr zahrnuje všechny molekuly vody v solvatačním obalu. Ve výsledku tak je možné, že hydrodynamický poloměr malého iontu bude větší než pro velký iont, protože malý iont může být obklopen větší solvatační vrstvou.

Dalšími poloměry charakterizující makromolekuly mohou být gyrační R_g , rotační R_R nebo hmotnostní poloměr (mass radius) R_M (Obr. 13).



Obr. 13 Hydrodynamický (R_H), gyrační (R_g), rotační (R_R) a hmotnostní (R_M) radius lysozymu. Převzato z [63].

Cryo-TEM [20, 54, 64]

Elektronová mikroskopie (EM) společně s technikami rozptylu světla hraje důležitou roli při studiu morfologie nanočástic. Hlavní výhodou EM pramenů je možnost přímého zobrazení tvaru a velikosti jednotlivých částic. Na druhou stranu experimentální podmínky EM vyžadují vysoké vakuum, což znamená vysušení vzorku, čímž může dojít k deformaci, poškození nebo agregaci částic. V případě částic jako jsou micely nebo vesikuly tak může odpaření rozpouštědla způsobit významnou změnu jejich tvaru. Z tohoto důvodu byly vyvinuty šetrnější metody EM pro studium takovýchto částic tzv. *in situ* metody, např. kryogenní transmisní EM (Cryo-TEM), kryogenní scanovací EM (Cryo-SEM) nebo environmentální scanovací EM (ESEM) či wet-STEM pro pozorování objektů plně ponořených v roztoku [54].

Kryogenní techniky sledují vzorek při kryogenních teplotách obvykle při teplotě kapalného dusíku (-195.8 °C). Vlastnímu měření předchází mrazová fixace (cryo-fixation), která zaručuje stabilizaci biologických struktur obsahujících více než 70 % vody. Spočívá v rychlém a hlubokém zmrazení vzorku tak, aby obsažená voda nestačila zkrystalizovat a přeměnila se v amorfni led. Abychom získali amorfni led z čisté vody, je třeba ji ochladit pod -150 °C rychlostí 10^6 °C za sekundu. K mrazové fixaci se využívají

různá chladicí média. Nejčastěji používaným je kapalný dusík, kapalné hélium nebo také kapalný propan či etan.

Vzorek se pozoruje ve speciálním elektronovém mikroskopu vybaveném speciálním Cryo-TEM držákem vzorku, který je chlazen kapalným dusíkem a zároveň musí zaručovat minimální osvit vzorku, aby při jeho pozorování nedocházelo k ohřevu vzorku dopadajícími elektrony.

V Cryo-TEM mikroskopii je vzorek bombardován svazkem elektronů o energii řádově stovek keV, které se na atomech vzorku rozptýlí a výsledný obraz je důsledkem interakce vzorku s elektrony.

Výhodou Cryo-TEM mikroskopie je pozorování objektů v jejich přirozeném prostředí, v případě biologických materiálů nedochází k denaturaci bílkovin a lze studovat i časově závislé děje, protože buňky jsou zmrazeny během několika mikrosekund.

Nevýhodou Cryo-TEM je kromě nákladného technického vybavení také zdlouhavá, náročná příprava vzorku. Následně je třeba dodržet správné skladování vzorku v kapalném médiu, aby nedošlo k rekrystalizaci ledu a poškození materiálu [64].

Scanovací elektronová mikroskopie byla již v minulosti použita pro studium morfologie blokového kopolymeru $PS_{60}-b-PAA_{30}$ v publikaci Šloufa a kol. [54]. Autoři pro studium vesikul využili metodu wet-STEM (wet-scanning transmission EM), díky níž sledovali změnu morfologie vesikul ve vodném roztoku během kontrolovaného odpařování rozpouštědla.

2. Cíle diplomové práce

- Popsat elektroforetické chování komplexů polyelektrolytů s opačně nabitými iontovými surfaktanty, konkrétně komplexů tvořených polyelektrolytem poly(ethylen oxid)-*blok*-polymethakrylátem sodným a surfaktantem N-dodecylpyridinium chloridem. Druhý komplex tvořil polyelektrolyt poly[3,5-bis(trimethylammoniummethyl)-4-hydroxystyren iodid]-*blok*-poly(ethylen oxid) se surfaktantem dodecylsulfátem sodným.
- Objasnit elektroforetické chování vesikul PS-*b*-PAA v závislosti na pH a iontové síle základního elektrolytu a porovnat jejich chování s malými ionty (elektroforetické chování malých iontů v závislosti na pH a iontové síle je dobře popsáno teoreticky), konkrétně kyselinou akrylovou, která je základní stavební jednotkou vesikul PS-*b*-PAA.
- Charakterizovat vesikuly PS-*b*-PAA v závislosti na pH a iontové síle základního elektrolytu metodou dynamického rozptylu světla a diskutovat vztah mezi velikostí vesikul (hydrodynamický poloměr) a jejich elektroforetickou pohyblivostí.
- Sledovat závislost elektroforetické pohyblivosti vesikul na čase, tak určit čas nezbytný k stabilizaci vesikul zejména v roztocích o nízkém pH.
- Porovnat různé přístupy vyhodnocení experimentálních dat pomocí metody PreMCE, lišící se korekcí na fluktuace tlaku během experimentu, a určit chybu vzniklou vyhodnocením dat pomocí zjednodušeného přístupu.

3. Experimentální část

3.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly analytické stupně čistoty. Roztoky (základní elektrolyt a markery EOF) byly připraveny z deionizované vody (Rowapur 100 + Ultrapur, Watrex, Česká republika). K určení pohyblivosti EOF byl použit dimethylsulfoxid DMSO (99%) (Sigma-Aldrich, Německo), případně nitromethan (98,5%) (Sigma-Aldrich, Německo) pro systém PEO-*b*-PMANa. Křemenná kapilára a kapilára μ SIL-FC byly kondicionovány pomocí 0,1 M NaOH (Agilent Technologies, Německo). Methanol (Riedel-de Haën, Německo) a 10 mM kyselina fosforečná (Lachema, Česká republika) byly použity k proplachu CEP kapiláry. Ke kalibraci pH metru se využily IUPAC pufrů (Radiometr, Dánsko) o hodnotách pH $1,679 \pm 0,010$, $4,005 \pm 0,010$, $7,000 \pm 0,010$ a $10,012 \pm 0,010$.

Studium komplexů polyelektrolyt–surfaktant

▪ PEO-*b*-PMANa + C₁₂PyrCl

K přípravě základního elektrolytu sloužil dekahydrát tetraboritanu disodného (borax) Na₂B₄O₇·10H₂O (Lachema, Česká republika). Studovaným analytem byl blokový kopolymer ve formě sodné soli poly(ethylen oxid)-*blok*-polymethakrylát (PEO-*b*-PMANa) (Polymer Source, Inc., Kanada). Surfaktant N-dodecylpyridinium chlorid (98%) byl zakoupen od Sigma-Aldrich (Německo).

▪ QNPPOS-*b*-PEO

K přípravě základních elektrolytů byly použity kyselina octová CH₃COOH (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika), monohydrát hydroxidu litného LiOH·H₂O (Sigma-Aldrich, Německo), glycin C₂H₅NO₂ (Merck KGaA, Německo) a kyselina chloroctová CH₂ClCOOH (Sigma-Aldrich, Německo).

Analyt poly[3,5-bis(trimethylammoniummethyl)-4-hydroxystyren iodid]-*blok*-poly(ethylen oxid) ve formě prášku cihlové barvy dodala laboratoř Dr. Mountrichase z Theoretical and Physical Chemistry Institute, Atény, Řecko. Jeho příprava anionickou polymerizací byla provedena podle postupu detailně popsáno v publikaci [65].

Elektromigrační chování vesikul PS-*b*-PAA

Základní elektrolyty pro všechny tři iontové síly byly připraveny ze slabých kyselin: kyseliny mravenčí HCOOH, kyseliny octové CH₃COOH (obojí od Lach-Ner, s.r.o., Česká republika), kyseliny 2-(N-morpholino)ethansulfonové MES, kyseliny 3-(N-morpholino)propansulfonové MOPS, kyseliny N-tri(hydroxymethyl)methyl-3-

aminopropansulfonové TAPS, kyseliny 2-(cyklohexylamino)ethansulfonové CHES, kyseliny maleinové $C_4H_4O_4$ a monohydrátu hydroxidu litného $LiOH \cdot 10H_2O$ (Sigma-Aldrich, Německo). Analyt ve formě roztoku vesikul PS-*b*-PAA byl připraven v laboratoři RNDr. Miroslava Štěpánka Ph.D. (Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Praha). Příprava vesikul PS-*b*-PAA proběhla podle protokolu uvedeného v následující publikaci [54].

3.2 Instrumentace a programy

Elektroforetické experimenty byly prováděny pomocí přístroje pro kapilární elektroforézu Agilent 3D CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo), jehož součástí je vestavěný fotometrický UV-VIS detektor s diodovým polem (DAD). Součástí aparatury je počítač s nainstalovaným programem Agilent ChemStation, díky němuž je aparatura řízena, jsou sbírána a vyhodnocována data.

pH pufrů bylo měřeno digitálním pH-metrem PHM 220 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Radiometr, Dánsko).

Programy OriginPro 8.0 (Origin Lab, USA) a Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA) byly využity ke grafickému zpracování experimentálně získaných dat.

Studium komplexů polyelektrolyt–surfaktant

▪ PEO-*b*-PMANa + C_{12} PyrCl

Elektroferogramy byly zaznamenávány pomocí UV detektoru při vlnové délce 214 nm (pro DMSO i surfaktant). Současně byl k detekci použit i bezkontaktní vodivostní detektor naší konstrukce [10], pomocí kterého byl detekován pík kyseliny methakrylové.

Elektroforetické experimenty byly v první fázi provedeny v komerčně dostupných coatovaných kapilárách, u kterých byl avizovaný „nulový“ elektroosmotický tok i při použití borátového pufru. První kapilára (μ SIL-FC, 0,075 μ m film, Agilent Technologies, USA) měla vnitřní průměrem 50 μ m, celková délka byla 59 cm a délka kapiláry k UV detektoru činila 50,6 cm. Jako druhá komerčně coatovaná kapilára byla použita kapilára CEP s I.D. 75 μ m dodaná společností Agilent Technologies (USA), o celkové délce 81,7 cm a délce k detektoru 73 cm. Měření byla prováděna i v nepokryté křemenné kapiláře (I.D. 50 μ m, O.D. 375 μ m, Polymicro, U.K.) o celkové délce 80 cm. Délka kapiláry k UV detektoru měřila 71,5 cm.

Teplota v termostatované části aparatury byla nastavena na hodnotu 25 °C, v některých experimentech pak na hodnotu 15 °C. Viz kapitola Výsledky 4.2.

▪ QNPPOS-*b*-PEO

K detekci píku polyelektrolytu byl použit UV-VIS detektor při vlnové délce 214 nm. Pro detekci surfaktantu sloužil bezkontaktní vodivostní detektor naší konstrukce [10].

V první sadě experimentů byla použita křemenná kapilára ($L_c = 60$ cm, $L_d = 51,5$ cm, I.D. 50 μm , O.D. 375 μm), s trojvrstevným coatingem ve formě polybren-dextran-sulfát-polybren (PB-DS-PB). Stěna kapiláry byla pokryta dle postupu uvedeného v publikaci Katayama a kol. [66]. Následná měření probíhala v holé křemenné kapiláře o přesně stejných parametrech jako měla první coatovaná kapilára.

Poslední sada měření byla provedena v komerčně dostupných coatovaných kapilárách: v kapiláře LPA pokryté lineárním polyakrylamidem, a v kapiláře PVA, jejíž povrch je modifikován polyvinylalkoholem. Tyto kapiláry mají být inertní a dodavatelé avizují nulový elektroosmotický tok.

Parametry kapiláry LPA jsou $L_c = 60$ cm, $L_d = 51,5$ cm, I.D. 50 μm , O.D. 375 μm a PVA kapiláry $L_c = 33,2$ cm, $L_d = 24,7$ cm, I.D. 50 μm , O.D. 375 μm .

Všechny experimenty probíhaly při teplotě 25 °C v termostatované části aparatury pomocí metody PreMCE.

Elektromigrační chování vesikul PS-*b*-PAA

UV detekce byla prováděna při vlnové délce 214 nm.

Experimenty probíhaly v holé křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 50 μm a vnějším průměrem 375 μm (Polymicro, U.K.), celková délka kapiláry činila 50 cm a délka kapiláry k UV detektoru byla 41,5 cm.

Experimenty běžely při teplotě 25 °C v termostatované části aparatury pomocí metody PreMCE.

3.3 Volba a příprava pufrů a základních elektrolytů

Studium komplexů polyelektrolyt–surfaktant

▪ PEO-*b*-PMANa + C₁₂PyrCl

Jako základní elektrolyt byl zvolen borátový pufr o koncentraci 50 mM. Stejný pufr byl použit v předchozí práci Bronicha a kol. [33], na jejichž výsledky tato diplomová práce částečně navazuje. pH pufru bylo teoreticky spočítáno pomocí programu PeakMaster 5.3 [67] $\text{pH}_{\text{teor}} = 9,04$ a poté bylo experimentálně změřeno $\text{pH}_{\text{exp}} = 9,22$. Roztok borátového pufru byl před použitím přefiltrován pomocí membránového filtru Sartorius (Minisart, Německo) o velikosti pórů 0,45 μm .

V první sérii měření byl polyelektrolyt o koncentraci 6,6 mmol dm⁻³ dávkován jako vzorek, surfaktant o koncentraci 1,32 mmol dm⁻³ byl součástí BGE, což odpovídalo

poměru $\beta = 1 : 0,2$.

V druhé fázi, kdy bylo aplikováno napětí 20 kV, byl polyelektrolyt součástí BGE a surfaktant dávkován společně s markerem ve vzorku. Koncentrace surfaktantu v těchto experimentech odpovídala 1 mmol dm^{-3} . Koncentrace polyelektrolytu v BGE a poměry β uvádí Tabulka 9 v kapitole 4.1.

Další měření za sníženého napětí 5 kV probíhala ve stejném uspořádání jako při 20 kV, pouze koncentrace surfaktantu ve vzorku byla 2 mmol dm^{-3} a k tomu zvolená koncentrace polyelektrolytu se řídila podle Tabulka 10 v kapitole 4.1.

Následující experimenty, kdy se komplex PE-S vyskytoval ve vzorku společně s markerem, byly proměřeny v čistém borátovém pufru.

▪ QNPPOS-*b*-PEO

Acetátový pufr o $\text{pH}_{\text{exp}} 4,68$ složený ze 40 mM kyseliny octové ($\text{p}K_{\text{A}} = 4,70$) a 20 mM hydroxidu litného byl použit v prvních experimentech s kapilárou coatovanou PB-DS-PB, následně v holé křemenné kapiláře a také v kapilárách LPA a PVA. Složení a $\text{pH}_{\text{teor}} 4,7$ bylo spočítáno pomocí programu PeakMaster 5.3.

Za účelem snížení elektroosmotického toku byla měření provedena i v glycinovém pufru o $\text{pH}_{\text{exp}} 2,53$ a složení 40 mM glycin ($\text{p}K_{\text{A}} = 2,32$, $\text{p}K_{\text{B}} = 9,78$) a 60 mM kyselina chloroctová ($\text{p}K_{\text{A}} = 2,87$). Měření v tomto pufru byla prováděna v holé křemenné kapiláře, v LPA a PVA kapilárách. $\text{pH}_{\text{teor}} 2,52$ a složení pufru bylo opět spočítáno pomocí PeakMasteru 5.3.

Elektromigrační chování vesikul PS-*b*-PAA

Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti vesikul PS-*b*-PAA na pH byla proměřena ve třech sériích roztoků lišících se iontovou silou. Pro měření závislosti μ_{eff} vs. pH byly vybrány pufrы s hodnotami pH v rozmezí 3,5–10,0 a s přibližně ekvidistantním krokem pH v oblasti 3,5–8,2 ($\Delta\text{pH} \sim 0,5$), dále byly použity pufrы s hodnotami pH 9,0 a 10,0. Pro dané rozmezí hodnot pH byly zvoleny pufrы tvořené slabými kyselinami (kyselina mravenčí, $\text{p}K_{\text{A}} = 3,75$; kyselina octová, $\text{p}K_{\text{A}} = 4,70$; MES, $\text{p}K_{\text{A}} = 6,10$; MOPS, $\text{p}K_{\text{A}} = 7,20$; TAPS, $\text{p}K_{\text{A}} = 8,50$; CHES, $\text{p}K_{\text{A}} = 9,55$) a hydroxidem litným. Složení roztoků elektrolytů bylo vypočítáno pomocí programu PeakMaster 5.3 tak, aby série roztoků měly hodnotu iontové síly $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a $80 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Tabulka 3, Tabulka 4, Tabulka 5 a Tabulka 6 udávají přesné složení těchto roztoků, stejně jako vypočtené hodnoty pH a iontové síly a experimentální hodnoty pH.

Pro iontovou sílu 20 mmol dm^{-3} byly připraveny také roztoky o $\text{pH}_{\text{exp}} 3,30$, 2,61 a 2,95. V těchto pufrech ovšem došlo k tvorbě okem viditelných agregátů, pro

elektroforetické měření tedy nebyly použity.

Tabulka 3 Programem PeakMaster určené teoretické pH (pH_{teor}), iontová síla základních elektrolytů 20 mmol dm^{-3} (I_{BGE}) a složení základních elektrolytů. pH_{exp} odpovídá experimentálně změřenému pH základních elektrolytů.

pH_{teor}	$\frac{I}{\text{mmol dm}^{-3}}$	složení BGE	pH_{exp}
3,70	20,03	40 mM HCOOH + 19,80 mM LiOH	3,68
4,21	20,07	82 mM CH ₃ COOH + 20 mM LiOH	4,22
4,70	20,31	40 mM CH ₃ COOH + 20 mM LiOH	4,68
5,22	20,01	26 mM CH ₃ COOH + 20 mM LiOH	5,29
5,61	20,00	74 mM MES + 20 mM LiOH	5,70
6,11	20,00	37 mM MES + 20 mM LiOH	6,18
6,64	20,00	25 mM MES + 20 mM LiOH	6,69
7,10	20,00	42 mM MOPS + 20 mM LiOH	7,12
7,60	20,00	27 mM MOPS + 20 mM LiOH	7,58
8,44	20,00	40 mM TAPS + 20 mM LiOH	8,47
9,04	20,00	25 mM TAPS + 20 mM LiOH	9,07
10,08	20,00	25 mM CHES + 20 mM LiOH	10,00

Tabulka 4 Programem PeakMaster určené teoretické pH (pH_{teor}), iontová síla základních elektrolytů 50 mmol dm^{-3} (I_{BGE}) a složení základních elektrolytů. pH_{exp} odpovídá experimentálně změřenému pH základních elektrolytů.

pH_{teor}	$\frac{I}{\text{mmol dm}^{-3}}$	složení BGE	pH_{exp}
3,68	50,25	100 mM HCOOH + 50 mM LiOH	3,64
4,20	50,08	199 mM CH ₃ COOH + 50 mM LiOH	4,17
4,70	50,02	97 mM CH ₃ COOH + 50 mM LiOH	4,67
5,20	50,01	65 mM CH ₃ COOH + 50 mM LiOH	5,17
5,60	50,00	180 mM MES + 50 mM LiOH	5,69
6,10	50,00	91 mM MES + 50 mM LiOH	6,18
6,60	50,00	63 mM MES + 50 mM LiOH	6,69
7,10	50,00	102 mM MOPS + 50 mM LiOH	7,11
7,60	50,00	66,5 mM MOPS + 50 mM LiOH	7,60
8,42	50,00	100 mM TAPS + 50 mM LiOH	8,44
9,02	50,00	62,5 mM TAPS + 50 mM LiOH	9,06
10,07	50,00	62,5 mM CHES + 50 mM LiOH	9,97

V pufrch v oblasti pH 5,60–6,70, jejichž základní složkou je MES, byl pozorován relativně velký rozptyl hodnot pohyblivostí. Relativní směrodatná odchylka se pohybovala kolem 6 %. Bylo tedy rozhodnuto proměřit závislost μ_{eff} vs. pH při střední iontové síle 50 mM ještě s jiným typem pufru, abychom vyloučili případnou interakci složek pufru s vesikulami. K těmto srovnávacím měřením byl použit pufr tvořený kyselinou maleinovou ($\text{p}K_{\text{A1}} = 1,92$ a $\text{p}K_{\text{A2}} = 6,23$) a hydroxidem litným. Složení udává Tabulka 5.

Tabulka 5 Programem PeakMaster určené teoretické pH (pH_{teor}), iontová síla základních elektrolytů 50 mmol dm^{-3} (I_{BGE}) a složení základních elektrolytů. pH_{exp} odpovídá experimentálně změřenému pH základních elektrolytů.

pH_{teor}	$\frac{I}{\text{mmol dm}^{-3}}$	složení BGE	pH_{exp}
5,69	50,01	29,8 mM $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ + 39,9 mM LiOH	5,71
6,18	50,00	22,5 mM $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ + 36,25 mM LiOH	6,21
6,68	50,01	18,75 mM $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ + 34,38 mM LiOH	6,70

Tabulka 6 Programem PeakMaster určené teoretické pH (pH_{teor}), iontová síla základních elektrolytů 80 mmol dm^{-3} (I_{BGE}) a složení základních elektrolytů. pH_{exp} odpovídá experimentálně změřenému pH základních elektrolytů.

pH_{teor}	$\frac{I}{\text{mmol dm}^{-3}}$	složení BGE	pH_{exp}
3,56	80,04	180 mM HCOOH + 79,7 mM LiOH	3,51
4,10	80,00	370 mM CH_3COOH + 79,9 mM LiOH	4,05
4,22	80,00	300 mM CH_3COOH + 80 mM LiOH	4,17
4,61	80,03	170 mM CH_3COOH + 80 mM LiOH	4,55
5,10	80,01	109 mM CH_3COOH + 80 mM LiOH	5,10
5,51	80,00	330 mM MES + 80 mM LiOH	5,60
6,00	80,00	160 mM MES + 80 mM LiOH	6,09
6,51	80,00	105 mM MES + 80 mM LiOH	6,59
7,00	80,00	180 mM MOPS + 80 mM LiOH	6,99
7,51	80,00	112 mM MOPS + 80 mM LiOH	7,52
8,41	80,00	160 mM TAPS + 80 mM LiOH	8,43
9,01	80,00	100 mM TAPS + 80 mM LiOH	9,02
10,06	80,00	100 mM CHES + 80 mM LiOH	10,00

V další fázi byla studována závislost mobilit vesikul na iontové síle roztoku. Za účelem těchto měření byl vybrán pufr o pH_{exp} 8,43, kdy je polyakrylová kyselina téměř plně disociována. Efektivní elektroforetické pohyblivosti byly měřeny v rozmezí iontových sil $2\text{--}80 \text{ mmol dm}^{-3}$. Pufry o nižších iontových silách byly připraveny pouhým naředěním pufru o iontové síle 80 mmol dm^{-3} . Složení a teoretické pH bylo opět spočítáno pomocí programu PeakMaster 5.3. Iontovou sílu a složení těchto roztoků udává Tabulka 7.

Tabulka 7 Složení základních elektrolytů připravených naředěním 80 mmol dm⁻³ roztoku o pH_{exp} 8,43 (pH_{teor} 8,41) a variabilní iontové síle určené programem PeakMaster.

pH _{teor}	I mmol dm ⁻³	složení BGE	
		c_{TAPS} mmol dm ⁻³	c_{LiOH} mmol dm ⁻³
8,48	2,00	4,00	2,00
8,47	5,00	10,00	5,00
8,46	8,00	16,00	8,00
8,46	10,00	20,00	10,00
8,45	15,00	30,00	15,00
8,44	20,00	40,00	20,00
8,43	30,00	60,00	30,00
8,43	40,00	80,00	40,00
8,42	50,00	100,00	50,00
8,42	60,00	120,00	60,00
8,41	80,00	160,00	80,00

Obdobná série měření byla provedena v acetátovém pufru o pH_{exp} 4,17, kdy je polyakrylová kyselina málo disociována, ale ještě nedochází ke vzniku viditelných agregátů, které by znemožňovaly elektroforetická měření. Tato série roztoků byla opět připravena pouhým naředěním roztoku s nejvyšší iontovou silou. Složení roztoků a teoretické pH bylo zjištěno pomocí programu PeakMaster 5.3 (Tabulka 8).

Tabulka 8 Složení základních elektrolytů připravených naředěním 80 mmol dm⁻³ roztoku o pH_{exp} 4,17 (pH_{teor} 4,22) a variabilní iontové síle určené programem PeakMaster.

pH _{teor}	I mmol dm ⁻³	složení BGE	
		$c_{\text{CH}_3\text{COOH}}$ mmol dm ⁻³	c_{LiOH} mmol dm ⁻³
4,31	2,00	7,50	2,00
4,29	5,00	18,75	5,00
4,28	8,00	30,00	8,00
4,28	10,00	37,50	10,00
4,27	15,00	56,25	15,00
4,26	20,00	75,00	20,00
4,25	30,00	112,50	30,00
4,24	40,00	150,00	40,00
4,24	50,00	187,50	50,00
4,23	60,00	225,00	60,00
4,22	80,00	300,00	80,00

3.4 Příprava vzorků

Studium komplexů polyelektrolyt–surfaktant

▪ PEO-*b*-PMANa + C₁₂PyrCl

Navážka polyelektrolytu byla rozpuštěna přímo v 10 ml borátového pufru tak, že koncentrace kyseliny methakrylové v zásobním roztoku činila 20 mmol dm⁻³. Vzniklý zásobní roztok byl sonifikován po dobu 10 minut. Podobně byl připraven zásobní roztok DMSO/nitromethanu o koncentraci 2% obj., a to smísením příslušného objemu DMSO (99%), respektive nitromethanu (98,5%) a borátového pufru. Zásobní roztok surfaktantu byl připraven také rozpuštěním příslušné navážky v 10 ml borátového pufru, aby jeho výsledná koncentrace byla 30 mmol dm⁻³. Koncentrace markeru DMSO nebo nitromethanu ve vzorku byla 0,07%.

V první sérii měření, kdy se surfaktant nacházel v BGE a polyelektrolyt byl dávkován ve vzorku, se vzorek připravil vždy smísením zásobního roztoku polyelektrolytu a zásobního roztoku nitromethanu a doplněny základním elektrolytem do 600 μl. Výsledná koncentrace analytu ve vialce se vzorkem činila 6,6 mmol dm⁻³.

V druhé fázi při napětí 20 kV byl polyelektrolyt součástí BGE a surfaktant společně s markerem EOF ve vzorku. Pro tato experimentální měření byl vzorek vždy připraven smísením surfaktantu s puftrem, aby jeho koncentrace činila 1 mmol dm⁻³.

Další měření za sníženého napětí 5 kV proběhla jako v předchozím uspořádání, pouze koncentrace surfaktantu ve vzorku byla 2 mmol dm⁻³.

Následující experimenty, kdy se polyelektrolyt a surfaktant vyskytovaly ve vzorku společně s markerem EOF, proběhly pouze v určitých poměrech β . Vždy byla ale koncentrace polyelektrolytu ve vzorku 6 mmol dm⁻³ a k tomu odpovídající koncentrace surfaktant tak, že $\beta = 1 : 0,2; 1 : 0,4; 1 : 0,8$ a $1 : 1$.

Metoda PreMCE vyžaduje dvojí dávkování. Druhý vzorek obsahoval pouze roztok markeru EOF připravený ze zásobního roztoku DMSO (2%) nebo zásobního roztoku nitromethanu (2%) a doplněný základním elektrolytem, tak aby koncentrace markeru opět byla 0,07%.

▪ QNPPOS-*b*-PEO

Polyelektrolyt byl rozpuštěn přímo v pufru tak, aby koncentrace analytu byla 15 mmol dm⁻³. Pro elektroforetické experimenty byl vzorek připraven smísením zásobního roztoku polyelektrolytu s markerem DMSO a puftrem tak, že výsledná koncentrace QNPPOS-*b*-PEO byla 1,5 mmol dm⁻³ nebo 3 mmol dm⁻³. Příprava zásobního roztoku DMSO o koncentraci 2% obj. se nelišila od postupu v případě polymethakrylové kyseliny.

Koncentrace DMSO ve vzorku činila opět 0,07%. Koncentrace druhého markeru, který vyžaduje metoda PreMCE, byla také stejná jako v případě PEO-*b*-PMANa + C₁₂PyrCl.

Elektromigrační chování vesikul PS-*b*-PAA

Mléčný roztok vesikul PS-*b*-PAA o koncentraci 4 mg ml⁻¹ byl poskytnut laboratoří RNDr. Miroslava Štěpánka, Ph.D. (Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Praha). Zásobní roztok vesikul v 50 mM borátovém pufru se pro přípravu vzorku vždy naředil příslušným pufrem. Míra ředění se odvíjela od hodnoty pH pufru. Vzhledem k nižší detekovatelnosti vesikul v kyselém pH, byl v oblasti pH 3,6–4,6 použit 4x, případně 10x zředěný roztok vesikul. Ve zbylých roztocích byl použit 20x naředěný zásobní roztok vesikul. Do vialky byl poté k naředěnému roztoku už jen dopipetován zásobní roztok DMSO (2%) tak, že koncentrace markeru činila 0,07%. K použití metody PreMCE byl druhý vzorek s markerem DMSO připraven obdobně jako u měření PEO-*b*-PMANa.

3.5 Další experimentální podmínky a postupy

Studium komplexů polyelektrolyt–surfaktant

▪ PEO-*b*-PMANa + C₁₂PyrCl

Separáční napětí bylo nastaveno na hodnotu 15 kV pro měření v komerčně coatovaných kapilárách a pro měření v křemenné kapiláře bylo napětí nastaveno na hodnotu 20 kV, případně 5 kV pro ověření stability komplexu ve stejnosměrném elektrickém poli. Procházející proud se pohyboval kolem hodnoty 39 μA u kapiláry μSIL-FC při napětí 15 kV; 61–62 μA u kapiláry CEP a napětí 15 kV; v křemenné kapiláře 35–40 μA při napětí 20 kV a 9–11 μA při 5 kV.

Metoda PreMCE byla využita u kapilár s komerčním coatingem z důvodu avizovaného „nulového“ elektroosmotického toku.

Doba t_{migr} v metodě PreMCE, po kterou bylo aplikováno napětí, byla nastavena na 5 min. Tlak p použitý k natlačení první dávkované zóny do termostatované části kapiláry a k protlačení druhé dávkované zóny přes detektor byl nastaven na 40 mbar. K nadávkování vzorku se použilo hydrodynamické dávkování 10 mbar × 12 s. Jednotlivá měření byla opakována nejméně třikrát.

V křemenné kapiláře za použití borátového pufru je EOF tak vysoký, že její použití metody PreMCE není potřeba. Proto byly v křemenné nepokryté kapiláře provedeny klasické elektroforetické experimenty.

Před prvním měřením byla nová křemenná kapilára proplachována třikrát 3 minuty

vodou, 5 minut 0,1 M NaOH, následně třikrát 5 minut vodou a 10 minut separačním pufrem.

μ SIL-FC kapilára byla před prvním měřením proplachována třikrát 3 minuty vodou, 2 minuty 0,1 M NaOH, poté čtyřikrát 3 minuty vodou a 10 minut separačním pufrem.

CEP kapilára byla kondicionována 4 minuty methanolem, čtyřikrát 3 minuty vodou, 4 minuty 10 mM kyselinou fosforečnou, následně čtyřikrát 3 minuty vodou a 10 minut separačním pufrem před prvním použitím.

U všech kapilár bylo pro stabilizaci elektroosmotického toku vloženo napětí 15 kV po dobu 30 minut. Mezi jednotlivými experimenty byla kapilára proplachována 2 minuty aktuálním pufrem. Jednotlivá měření byla opakována nejméně třikrát.

▪ QNPPOS-*b*-PEO

Všechny experimenty se uskutečnily při napětí 15 kV. V BGE o pH 4,68 a pH 2,53 byl procházející proud 6,8–7,2 μ A, respektive 12,5–14 μ A.

Z důvodu použití komerčně coatovaných kapilár, v nichž má být elektroosmotický tok „nulový“, byla všechna měření realizována metodou PreMCE. V této metodě se separační napětí aplikovalo po dobu t_{migr} , která se lišila v závislosti na volbě kapiláry:

- křemenná kapilára s coatingem PB-DS-PB (pH 4,68) 2 min nebo 3 min
- křemenná kapilár holá (pH 2,53) 3 min nebo 5 min
- LPA kapilára (pH 2,53) 3 min nebo 5 min
- LPA kapilára (pH 4,68) 3 min
- PVA kapilára (pH 4,68) 2 min.

Před prvním měřením byla nová křemenná kapilára proplachována třikrát 3 minuty vodou, 5 minut 0,1 M NaOH, následně třikrát 5 minut vodou a 10 minut separačním pufrem. LPA a PVA nebylo nutno kondicionovat před prvním použitím žádnými chemikáliemi, byly propláchnuty pouze několik minut vodou a následně separačním pufrem. Mezi jednotlivými experimenty bylo prováděno proplachování 2 minuty aktuálním pufrem.

K ustálení elektroosmózy bylo vloženo napětí 15 kV po dobu 15 minut u křemenné kapiláry. K protlačení obsahu kapiláry přes detektor se vždy použil tlak 40 mbar. Hydrodynamické nadávkování vzorku bylo u všech experimentů nastaveno na 20 mbar \times 12 sekund. Jednotlivá měření byla opakována minimálně dvakrát.

Elektromigrační chování vesikul PS-*b*-PAA

Experimenty probíhaly při napětí 15 kV. V tomto módu byla u vstupního konce kapiláry (inlet) nastavena kladná polarita (+). Procházející proud se pohyboval mezi hodnotami 7–10 μ A pro $I = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$; 15–20 μ A pro $I = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$; 24–30 μ A

pro $I = 80 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Doba t_{migr} , po kterou bylo aplikováno separační napětí v metodě PreMCE, se lišila dle pH a iontové síly BGE. Napětí bylo aplikováno po dobu 2,5 min nebo 3,5 min z důvodu měnící se pohyblivosti EOF. S prodlouženou dobou $t_{\text{migr}} = 3,5$ minuty byla také prodloužena doba natlačování vzorku do termostatované části kapiláry z 2 minut na 7 minut.

Tlak p nutný pro natlačení první dávkované zóny do termostatované části kapiláry a k protlačení druhé zóny přes detektor byl nastaven na hodnotu 40 mbar obdobně jako u předchozích systémů PE-S. Ve všech experimentech se použilo hydrodynamické dávkování $20 \text{ mbar} \times 12 \text{ s}$. Jednotlivá měření byla opakována nejméně čtyřikrát.

Proplach nové křemenné kapiláry byl před prvním použitím realizován třikrát 3 minuty vodou, 5 minut 0,1 M NaOH, následně třikrát 5 minut vodou, 10 minut separačním pufrem. Pro ustálení elektroosmotického toku bylo vloženo napětí 15 kV po dobu 30 minut. Mezi jednotlivými experimenty bylo prováděno proplachování 2 minuty aktuálním pufrem.

3.6 Dynamický rozptyl světla

Hydrodynamický poloměr vesikul PS-*b*-PAA byl měřen pomocí přístroje pro dynamický rozptyl světla ALV (Langen, Německo) obsahující 22 mW He-Ne laser s vlnovou délkou 632,8 nm. Další součástí přístroje je ALV CGS/8F goniometr, ALV High QE APD detektor a ALV 5000/EPP multi bit, multi tau autokorelátor. Experimenty byly provedeny při teplotě 25 °C. K měření byly použity stejné roztoky vesikul jako vzorky v elektroforetických experimentech, vzorky byly pouze naředěny aktuálním pufrem na koncentraci kopolymeru $0,04 \text{ mg ml}^{-1}$. Veškeré experimenty DLS provedl RNDr. Miroslav Štěpánek Ph.D. na katedře Fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Karlovy v Praze.

3.7 Cryo-TEM

Cryo-TEM měření byla provedena pomocí elektronového mikroskopu Tecnai G2 Sphera 20 (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) vybaveného speciálním cryo-držákem (Gatan 626, Pleasanton, CA, USA).

3 μl roztoku vesikul v borátovém pufru (pH 9,22) byly nanášeny na mřížku pokrytou uhlíkovým filmem (C-flat 2/2-2C, Electron Microscopy Sciences). Většina vzorku byla poté během 1 s odsáta a mřížka se vzorkem bez prodloužení ponořena do kapalného etanu o teplotě -183 °C . Takto připravený zmrzlý vzorek byl pozorován při napětí 120 kV. Citlivého rozlišení se docílilo díky CCD čipu (Gatan UltraScan 1000) s možností zvětšení

5000x až 14500x.

Elektronové fotografie vesikul PS-*b*-PAA byly pořízeny RNDr. Miroslavem Šloufem Ph.D., Institut Makromolekulární chemie Akademie věd ČR, Heyrovského 2, Praha, ČR.

4. Výsledky

4.1 Komplex PEO-*b*-PMANa + C₁₂PyrCl

V této části práce byla studována interakce polyelektrolytu polyethylen oxid-*blok*-polymethakrylové kyseliny se surfaktantem N-dodecylpyridinium chloridem. Na základě změny poměru koncentrace surfaktantu ku koncentraci kopolymeru byla elektroforeticky sledována tvorba jejich komplexu. Pro první sadu měření byly použity komerčně dostupné coatované kapiláry, a to kapilára μ SIL-FC a kapilára CEP, (viz kapitola 3.2). U těchto kapilár výrobci deklarují neutrální povrch kapiláry i při použití borátového pufru, který je nevhodný pro běžně dostupné neutrální PVA kapiláry z důvodu borátové komplexace. Důvodem použití neutrálních kapilár bylo omezení potenciální interakce mezi stěnou kapiláry a kopolymerem či surfaktantem. Bohužel i tak pravděpodobně docházelo k interakci kapiláry s některou složkou systému, což vedlo k modifikaci vnitřního povrchu kapiláry. To mělo za důsledek horší reprodukovatelnost záznamů, až postupné ucpání kapiláry. Tyto kapiláry tedy nejsou vhodné ke studiu takového systému. Získané výsledky nemohly být korektně vyhodnoceny, a nejsou tedy v této diplomové práci diskutovány.

V druhé sadě experimentů byla použita holá křemenná kapilára. Měření v této kapiláře byla provedena pomocí metody afinitní kapilární elektroforézy, kdy byl surfaktant přítomen v základním elektrolytu (BGE) a polyelektrolyt byl dávkován jako analyt. Tyto záznamy bohužel nebylo možné vyhodnotit pro jejich nečitelnost a nereprodukovatelnost pravděpodobně z důvodu interakce kladně nabitého surfaktantu se záporně nabitou stěnou křemenné kapiláry.

Na základě předchozích experimentů se zvolil opačný postup, kdy součástí BGE byl polyelektrolyt a surfaktant se dávkoval jako vzorek. V tomto módu se měření uskutečnila při napětí 20 kV a teplotě 25 °C.

Ze získaných elektroferogramů byly pomocí integrační funkce programu ChemStation odečteny detekční časy analytu t_a , resp. surfaktantu N-dodecylpyridinium chloridu, a neutrálního markeru t_{EOF} , DMSO.

Efektivní elektroforetické pohyblivosti analytu byly spočteny podle následujícího vztahu

$$\mu_{\text{eff}} = \left(\frac{1}{t_a} - \frac{1}{t_{\text{EOF}}} \right) \frac{L_c L_d}{U} \quad (29)$$

Výsledné hodnoty efektivní elektroforetické pohyblivosti v závislosti na poměru koncentrace polyelektrolytu (c_{met}) přítomné v BGE ku koncentraci surfaktantu (c_{surf}) nacházejícího se ve vzorku shrnuje Tabulka 9. Z uvedených hodnot vyplývá,

že pohyblivost surfaktantu se významně nemění v závislosti na změně koncentrace polyelektrolytu v základním elektrolytu a nevykazuje jasný trend.

Tabulka 9 Přehled koncentrací polyelektrolytu PEO-*b*-PMANa v BGE ku koncentraci surfaktantu C₁₂PyrCl ve vzorku, konkrétní koncentrace těchto látek, c_{surf} a c_{met} , a výsledná efektivní pohyblivost μ_{eff} surfaktantu a relativní směrodatná odchylka s_r . Měřeno při teplotě 25 °C a napětí 20 kV v borátovém pufru o pH 9,22.

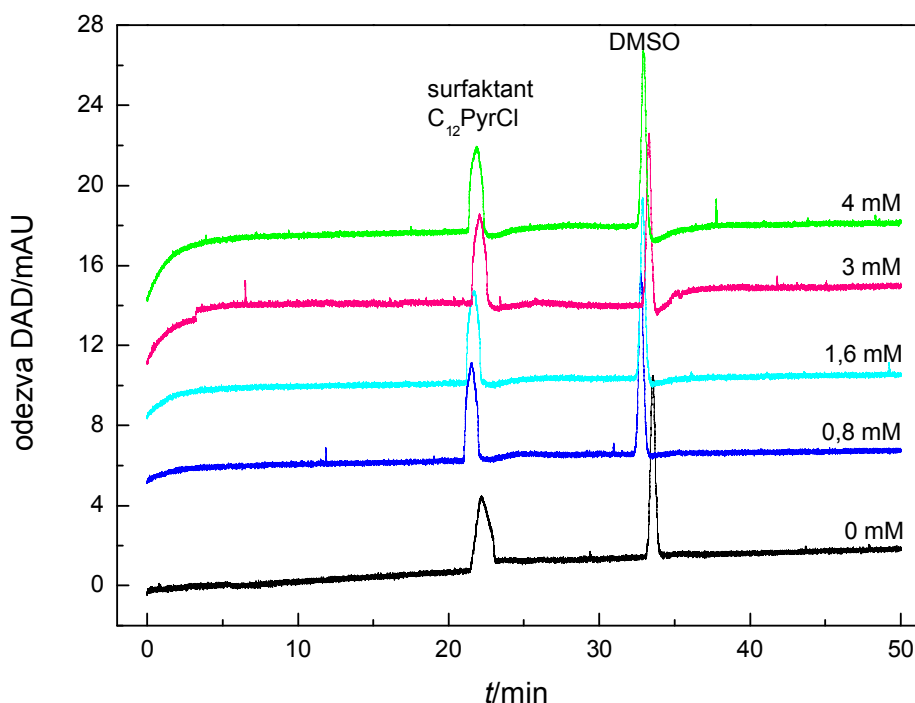
β surfaktant : polyelektrolyt	c_{surf} mmol dm ⁻³	c_{met} mmol dm ⁻³	μ_{eff} 10 ⁻⁹ m ² V ⁻¹ s ⁻¹	s_r %
1 : 0	1	0	18,84	0,93
1 : 0,2	1	0,2	18,68	0,44
1 : 0,4	1	0,4	18,67	0,75
1 : 0,5	1	0,5	18,40	1,89
1 : 0,6	1	0,6	18,45	0,86
1 : 0,8	1	0,8	18,66	0,34
1 : 1	1	1	18,69	0,43
1 : 5	1	5	18,25	1,03
1 : 10	1	10	18,26	0,70

Téměř neměnná pohyblivost surfaktantu může mít několik příčin. Za prvé, komplex PE–S není dostatečně stabilní a při aplikaci stejnosměrného napětí 20 kV se rozpadne na jednotlivé ionty. Za druhé, za těchto podmínek se komplex vůbec neuvěří. A za třetí, rovnováha mezi komplexovanou a nekomplexovanou formou je velmi pomalá, aby mohla být studována pomocí CZE. Aby se potvrdila nebo vyloučila první příčina, že se komplex rozpadá působením silného elektrického pole, následující měření probíhala za sníženého napětí 5 kV a při stejné teplotě 25 °C. Tomuto napětí odpovídá delší doba separace a tedy i výrazněji rozmyté píky analytu. Aby bylo možné surfaktant při tomto napětí detekovat, jeho koncentrace ve vzorku byla navýšena na 2 mmol dm⁻³.

Poměr koncentrace surfaktantu ku koncentraci polyelektrolytu byl zachován přibližně stejný jako při měřeních při vyšším napětí. Koncentrace surfaktantu a polyelektrolytu jsou uvedeny v Tabulka 10, stejně jako výsledné efektivní mobility. Příklady elektroferogramů při různých poměrech β jsou uvedeny na Obr. 14.

Tabulka 10 Přehled naměřených efektivních pohyblivostí surfaktantu μ_{eff} se směrodatnými odchylkami s_r v závislosti na poměru β , tedy koncentraci surfaktantu (c_{surf}) ve vzorku ku koncentraci polyelektrolytu (c_{met}) v BGE. Měřeno při teplotě 25 °C a napětí 5 kV v borátovém pufru o pH 9,22.

β surfaktant : polyelektrolyt	c_{surf} mmol dm ⁻³	c_{met} mmol dm ⁻³	μ_{eff} 10 ⁻⁹ m ² V ⁻¹ s ⁻¹	s_r %
1 : 0	2	0	15,80	0,95
1 : 0,2	2	0,4	16,48	0,08
1 : 0,4	2	0,8	16,41	0,09
1 : 0,6	2	1,2	16,07	1,13
1 : 0,8	2	1,6	16,23	0,28
1 : 1	2	2	16,02	0,03
1 : 1,5	2	3	15,83	1,29
1 : 2	2	4	15,77	0,23

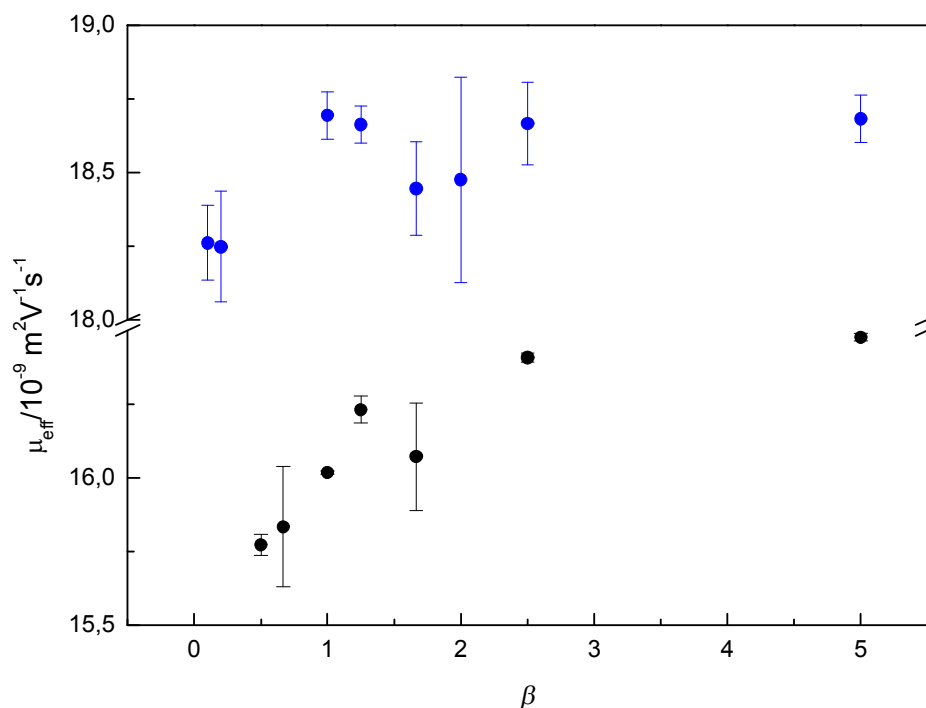


Obr. 14 Výběr elektroferogramů pořízených DAD detektorem při vlnové délce 214 nm, v borátovém pufru o pH 9,22, $U = 5$ kV. Vzorek obsahoval surfaktant o koncentraci 2 mmol dm⁻³ a marker DMSO. V základním elektrolytu se vyskytoval polyelektrolyt o různých koncentracích uvedených v Tabulce 10. Koncentrace uvedené u křivek udávají koncentrace polyelektrolytu v BGE. Bližší popis v textu.

Srovnáním efektivních pohyblivostí pro napětí 5 kV a 20 kV (Obr. 15) z Tabulka 9 a Tabulka 10 je zjevné, že hodnoty efektivních pohyblivostí surfaktantu měřených při napětí 20 kV jsou výrazně vyšší než hodnoty zjištěné při napětí 5 kV. Tento rozdíl je možné vysvětlit změnou teploty BGE spojenou se vznikem Joulova tepla, jelikož míra Joulova zahřívání výrazně roste s výkonem v kapiláře. Při napětí 5 kV byl výkon 0,04–0,06 W a při napětí 20 kV 0,7–0,8 W. Lze tedy očekávat výraznější vliv Joulova tepla v systému o

vyšším napětí, a tedy i vyšší teplotu BGE.²

Je známo, že pohyblivost analyzovaných látek se změní o zhruba 2 % při změně teploty o 1 °C [17]. V našem případě se pohyblivost mění o cca 14 %, což odpovídá změně teploty o 7 °C. Při daném rozdílu výkonů není tato hodnota nereálná, jak diskutují Evenhuis a kol. [68].



Obr. 15 Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti surfaktantu N-dodecylpyridinium chloridu na změně koncentrace polyelektrolytu poly(ethylen oxid)-blok-polymethakrylátu sodného v základním elektrolytu. Měřeno při napětí 5 kV (symboly •) a 20 kV (symboly •) a teplotě 25 °C v borátovém pufru o pH 9,22.

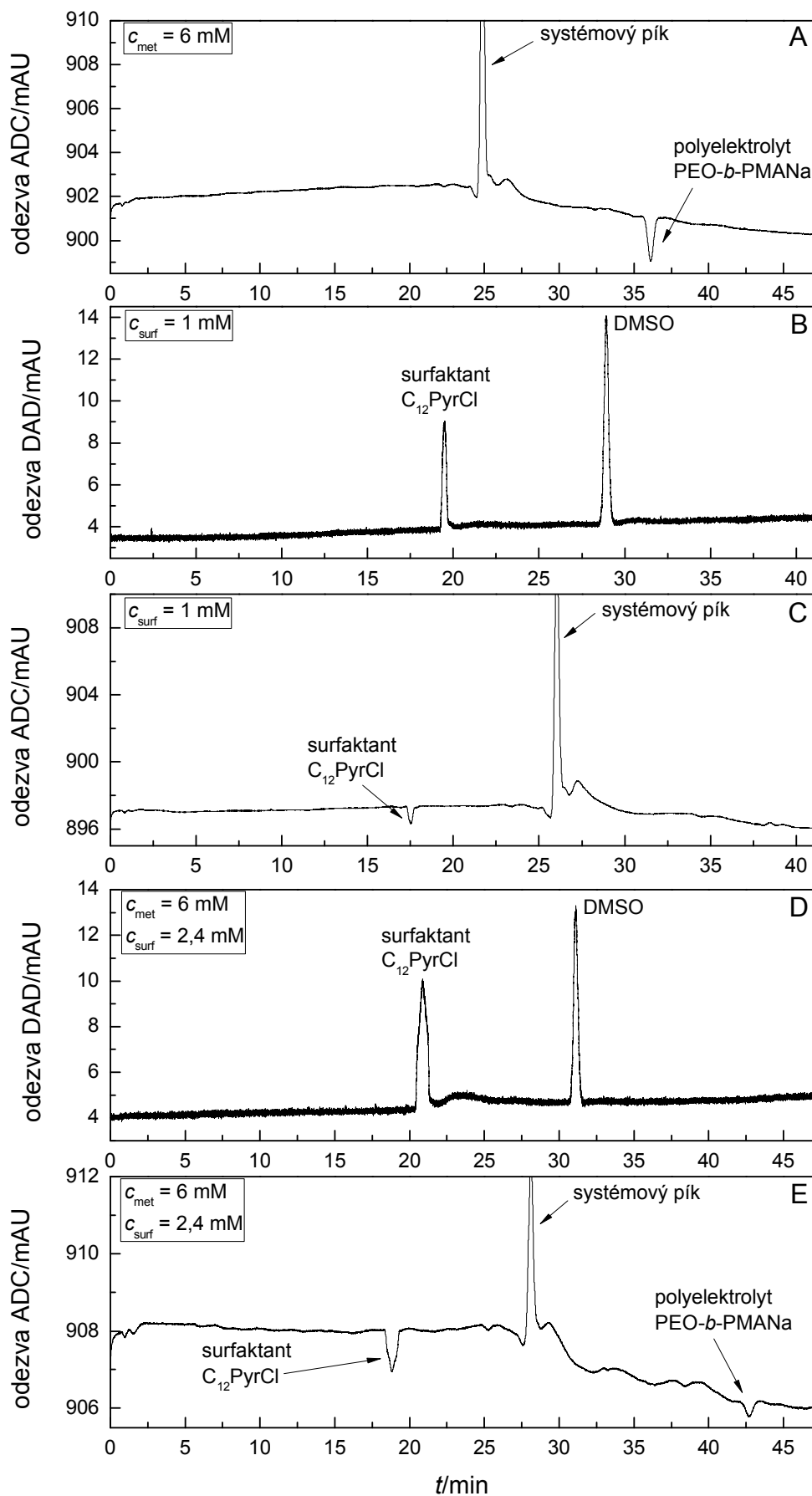
Výsledné efektivní elektroforetické pohyblivosti při napětí 20 kV se mění jen velmi málo s poměrem β a nevykazují zjevný trend viz Obr. 15. Při napětí 5 kV lze pozorovat pozvolný vzrůst pohyblivosti až do poměru koncentrací $\beta = 2,5$, při vyšších poměrech se pohyblivost dále nemění. Tvar křivky při napětí 5 kV koreluje s křivkou závislosti ζ -potenciálu vs. β , jak je patrné z Obr. 6 [33]. Je tedy pravděpodobné, že se částečně potlačil rozpad komplexu v důsledku aplikace sníženého stejnosměrného napětí. Změna pohyblivosti je ovšem stále významně nižší, než by se očekávalo dle předchozích měření dynamického rozptylu a ζ -potenciálu vs. β , jelikož při poměru $\beta = 1$ autoři naměřili ζ -potenciál 0 a při nižších poměrech β dokonce záporný ζ -potenciál. Pohyblivost komplexu je v našich měřeních pouze kladná nezávisle na poměru β .

Je tedy možné, že sledovaný komplex je velmi nestabilní i při nízkém napětí. Další

² Ačkoliv je kapilára umístěna v kazetě, která je po celou dobu měření intenzivně termostatována, konce kapiláry se nacházejí mimo termostatovanou oblast. Chlazení tedy není obvykle dostatečně účinné a teplota BGE se může při vyšších výkonech výrazně měnit.

měření byla proto navržena tak, aby bylo možné detekovat současně kopolymer, surfaktant nebo komplex PE-S, a tak prokázat stabilitu předpokládaného komplexu. Roztok kopolymeru se surfaktantem o různém poměru koncentrací látek se dávkoval jako analyt a jako základní elektrolyt byl použit čistý borátový pufr. Experimenty probíhaly při napětí 5 kV a teplota v termostatované části kapiláry byla nastavena na 25 °C.

Na získaných elektroferogramech bylo ovšem možné detekovat jak pík kopolymeru, tak surfaktantu. Příklad těchto elektroforegramů znázorňuje Obr. 16. Surfaktant bylo možné detekovat na UV i vodivostní detekci (Obr. 16, C, D), kopolymer pouze na vodivostní detekci (Obr. 16 A). Měření bylo opakováno i při teplotě 15 °C s totožnými výsledky. Je tedy velmi pravděpodobné, že komplex není v elektroforetickém systému stabilní a rozpadá se na jednotlivé složky. Kapilární zónová elektroforéza proto není vhodná pro studium komplexace tohoto druhu kopolymeru a surfaktantu.



Obr. 16 Elektroforegramy měřeny při napětí 5 kV, teplotě 25 °C v borátovém pufru o pH 9,22. Záznam A – vodivostní detekce polyelektrolytu o $c = 6 \text{ mM}$, záznam B – UV detekce surfaktantu o $c = 1 \text{ mM}$, záznam C – vodivostní detekce surfaktantu o $c = 1 \text{ mM}$, záznam D – UV detekce vzorku obsahující polyelektrolyt i surfaktant, $c_{\text{met}} = 6 \text{ mM}$, $c_{\text{surf}} = 2,4 \text{ mM}$, záznam E – vodivostní detekce vzorku obsahující jak polyelektrolyt, tak surfaktant, $c_{\text{met}} = 6 \text{ mM}$, $c_{\text{surf}} = 2,4 \text{ mM}$.

4.2 Polyelektrolyt QNPHOS-*b*-PEO

V této části práce měla být studována interakce polyelektrolytu poly[3,5-bis(trimethylammoniummethyl)-4-hydroxystyren iodid]-*blok*-poly(ethylen oxid) se surfaktantem dodecylsulfátem sodným. Tvorba komplexu měla být sledována na základě změny poměru koncentrace kopolymeru a surfaktantu stejně jako v předchozí kapitole týkající se komplexu PEO-*b*-PMANa s SDS.

Metoda PreMCE byla využita z důvodu pomalého elektroosmotického toku v použitých pufrch o pH 4,68 a 2,53.

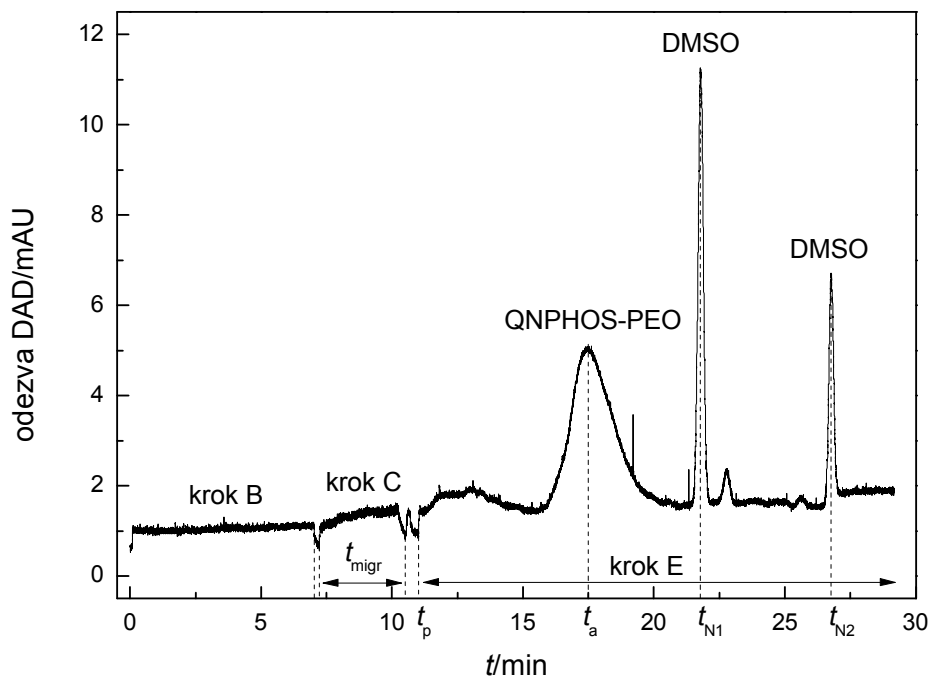
V prvním kroku byla měření prováděna v acetátovém pufru o pH 4,68 v křemenné kapiláře coatované trojvrstevným coatingem polybren-dextranulfát-polybren (viz kapitola 3.1), jejíž kladně nabitý povrch by neměl interagovat s polyelektrolytem obsahujícím kvartérní dusíky. Ačkoliv byl polyelektrolyt bez problému detekován v čistém pufru, po přidavku surfaktantu bohužel nebylo možné pík polyelektrolytu identifikovat ani na UV ani na vodivostní detekci. Příčinou pravděpodobně bude interakce komplexu PE-S se stěnou kapiláry. Tato tematika je nad rámec této diplomové práce.

Z toho důvodu byly pro ostatní experimenty zvoleny komerčně dostupné coatované LPA a PVA kapiláry, jejichž vnitřní povrch by měl být inertní a měl by vykazovat nulovou pohyblivost EOF. Bohužel u těchto kapilár docházelo k radikálnímu zrychlení EOF v průběhu experimentů. U PVA kapiláry pravděpodobně dochází k tvorbě vodíkových můstků mezi polyethylenoxidem, který je součástí blokového kopolymeru, a polyvinylalkoholem na povrchu kapiláry. Z experimentálních výsledků vyplývá, že tedy dochází k průběžnému coatování povrchu kapiláry vzniklým komplexem, což se projevilo rostoucí pohyblivostí EOF a prodloužením doby nutné k protlačení vzorku kapilárou, zjevně se tedy snižuje i průměr kapiláry. Získané elektroferogramy nebylo možné vyhodnotit, jelikož jsme díky horší reprodukovatelnosti experimentů nebyli schopni identifikovat pík komplexu. Obdobné chování jsme pozorovali u LPA kapiláry, která je coatována lineárním modifikovaným polyakrylamidem. Proto byla použita holá křemenná kapilára za současného snížení pH BGE na hodnotu 2,53, čímž došlo k redukci záporného náboje na stěně křemenné kapiláry. Tímto způsobem jsme chtěli omezit možnou interakci kvartérních dusíků polyelektrolytu s negativní stěnou kapiláry.

Vzorový UV záznam získaný při pH 2,53 a iontové síle 20 mmol dm^{-3} , kdy jako BGE byl použit pouze pufr a dávkován byl polyelektrolyt rozpuštěný v pufru, je znázorněn na Obr. 17. Na tomto elektroferogramu jsou znázorněny jednotlivé kroky metody PreMCE (jak je popsána v kapitole 1.2) a časové údaje nezbytné pro výpočet efektivní pohyblivosti analytu. Efektivní pohyblivost polyelektrolytu byla vypočtena dle vztahu (14), výsledná

iontová pohyblivost při těchto podmínkách byla $30,89 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ($s_r = 6,43 \%$).

Bohužel po přidání SDS do základního elektrolytu jsme nebyli schopni identifikovat pík komplexu, a proto tedy nemohla být tvorba komplexu v tomto systému studována. Toto chování prozatím nebylo vysvětleno.



Obr. 17 Elektroferogram pořízený DAD detektorem při vlnové délce 214 nm, v pufru o pH 2,53, $I = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$, $U = 15 \text{ kV}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Vzorek obsahoval polyelektrolyt QNPHOS-*b*-PEO o koncentraci $1,5 \text{ mg ml}^{-1}$ a marker DMSO.

4.3 Elektromigrační chování vesikul PS-*b*-PAA

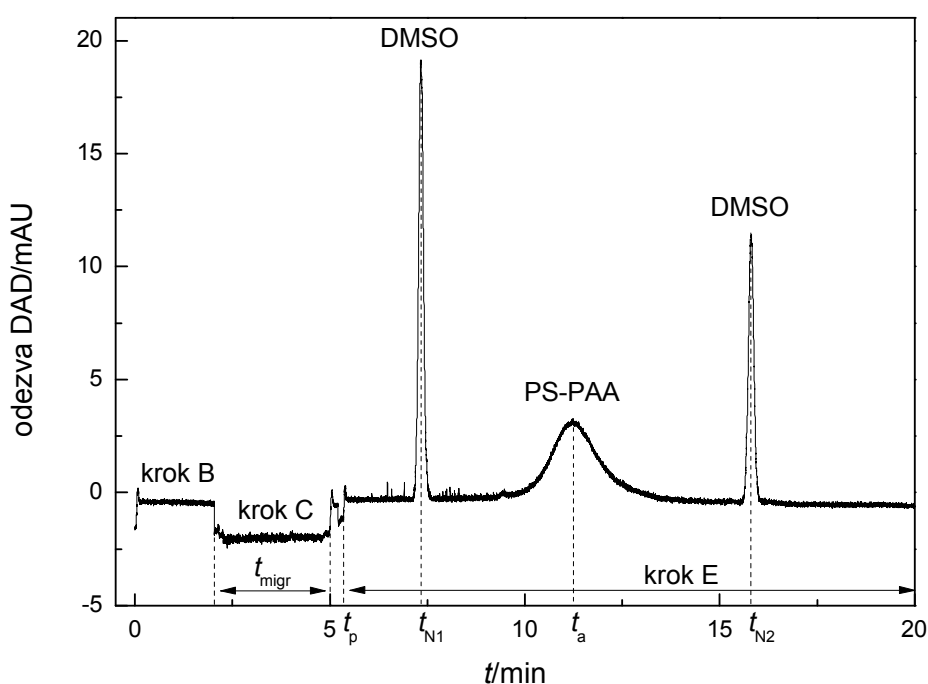
V této části práce bylo charakterizováno elektromigrační chování vesikul v závislosti na pH a iontové síle základního elektrolytu. Taé bylo sledováno chování vesikul v závislosti na čase. Všechna měření se uskutečnila pomocí metody PreMCE. Klasické měření není vhodné z důvodu nízké pohyblivosti EOF v základním elektrolytu o nízkém pH. Elektroforetická separace současně probíhala pouze v termostatované části kapiláry, čímž se omezil vliv Joulova zahřívání na pohyblivost vesikul.

Nejprve byla provedena řada experimentů za účelem optimalizace podmínek metody PreMCE. S měnícím se pH se měnila doba aplikace separačního napětí t_{migr} a doba natlačování vzorku do kapiláry. Detailní podmínky metody PreMCE pro jednotlivé experimenty jsou uvedeny v kapitole 3.5.

Obr. 18 ukazuje příklad elektroferogramu získaného při pH 6,69 a iontové síle 20 mmol dm^{-3} pomocí UV detekce se schematicky vyznačenými kroky metody PreMCE. Vyznačeny jsou kroky B, C a E a také časové údaje nezbytné pro výpočet efektivní pohyblivosti analytu. Během kroku B došlo k natlačení první dávkované zóny vzorku do

termostatované části kapiláry tlakem p , v kroku C bylo aplikováno napětí U po dobu t_{migr} . Závěrečné vytlačení obsahu kapiláry přes detektor tlakem p odpovídá kroku E.

Ze všech získaných elektroferogramů se pomocí integrační funkce programu ChemStation odečetly detekční časy analytu t_a a neutrálních markerů t_{N1} a t_{N2} . Doba t_{migr} , po kterou bylo aplikováno separační napětí, figurovala jako vstupní hodnota metody PreMCE. Čas t_p odpovídající začátku aplikace tlaku ve finálním kroku E se odečítal v příslušném inflexním bodě tlakového záznamu v kroku E každého elektroferogramu. Vstupní hodnota aplikace tlaku p neodpovídá reálné době začátku aplikace tlaku, protože mezi počáteční hodnotou 0 mbar a požadovaným tlakem 40 mbar je cca 5 sekundové zpoždění. Efektivní elektroforetické pohyblivosti vesikul byly spočteny podle vztahu (14).



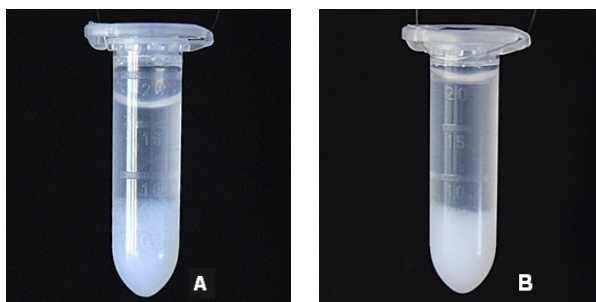
Obr. 18 Elektroferogram pořízený DAD detektorem při vlnové délce 214 nm, v pufru o pH 6,69, $I = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$, $U = 15 \text{ kV}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Vzorek obsahoval vesikuly PS-*b*-PAA o koncentraci $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ a marker DMSO.

Efektivní pohyblivosti vesikul PS-*b*-PAA byly změřeny v závislosti na hodnotě pH základního elektrolytu ve třech sériích roztoků o konstantní iontové síle 20 mmol dm^{-3} , 50 mmol dm^{-3} a 80 mmol dm^{-3} v intervalu pH 3,5–10. V druhé fázi byly experimenty realizovány v závislosti na iontové síle základního elektrolytu 2–80 mmol dm^{-3} v roztocích s konstantní hodnotou pH (pH 8,43 a pH 4,17).

Závislost efektivní pohyblivosti vesikul PS-*b*-PAA na pH pufru o konstantní iontové síle

Vliv pH na chování vesikul PS-*b*-PAA lze částečně pozorovat pouhým okem. Zatímco v roztocích o bazickém pH nepozorujeme změnu zbarvení roztoku a roztok zůstává čirý,

v kyselém pH < 3,3 začíná být roztok mléčně bílý a kolem pH 3 dochází ke vzniku okem viditelných agregátů, které sedimentují na dně použité nádoby (viz Obr. 19 pro pH 2,95 a pH 2,65). Při pH 10 se dá naopak předpokládat plná disociace akrylových skupin na povrchu vesikul. Z tohoto důvodu byly efektivní pohyblivosti a hydrodynamický poloměr vesikul proměřeny v rozmezí pH 3,5 až 10. Hydrodynamický poloměr vesikul technikou DLS ve všech roztocích v dané sérii o konstantní iontové síle změřil RNDr. Miroslav Štěpánek Ph.D. (laboratoř Asociujících polymerů na katedře Fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty).



Obr. 19 Eppendorfy s agregáty vesikul PS-*b*-PAA v roztocích o pH 2,95 (A) a v pH 2,65 (B) a iontové síle 20 mmol dm⁻³.

Výsledné průměrné hodnoty hydrodynamického poloměru R_H včetně relativní směrodatné odchylky a průměrné absolutní hodnoty vypočtených efektivních pohyblivostí vesikul u_{eff} společně se směrodatnými odchylkami v roztocích o iontové síle 20, 50 a 80 mmol dm⁻³ jsou shrnuty v Tabulce 11, 12, resp. 13.³

Tabulka 11 Přehled naměřených hodnot R_H a u_{eff} vesikul PS-*b*-PAA včetně směrodatných odchylek v závislosti na pH o konstantní iontové síle roztoků 20 mmol dm⁻³.

pH _{exp}	$\frac{R_H}{\text{nm}}$	$\frac{S_r}{\%}$	$\frac{u_{\text{eff}}}{10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}}$	$\frac{S_r}{\%}$
3,68	94,66	2,98	20,73	3,36
4,22	76,38	2,35	26,52	2,08
4,68	75,16	2,06	30,80	3,37
5,29	75,24	1,91	31,71	1,58
5,70	76,46	1,16	32,74	2,81
6,18	76,64	3,25	34,13	5,65
6,69	77,56	2,08	31,37	6,19
7,12	76,66	2,40	31,18	3,79
7,58	78,22	2,42	29,64	2,92
8,47	87,14	2,99	30,12	0,87
9,07	77,90	0,96	29,68	0,40
10,00	76,94	2,68	30,09	0,31

³ Pro přehlednost je efektivní pohyblivost vesikul PS-*b*-PAA udávána v absolutní hodnotě značené u_{eff} .

Tabulka 12 Přehled naměřených hodnot R_H a u_{eff} vesikul PS-*b*-PAA včetně směrodatných odchylek v závislosti na pH o konstantní iontové síle roztoků 50 mmol dm⁻³.

pH _{exp}	$\frac{R_H}{\text{nm}}$	$\frac{s_r}{\%}$	$\frac{u_{\text{eff}}}{10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}}$	$\frac{s_r}{\%}$
3,64	158,58	2,75	19,59	1,68
4,17	87,34	1,67	25,28	1,12
4,67	75,14	0,71	30,81	0,82
5,17	76,94	2,72	32,41	4,01
5,69	83,50	1,13	32,15	5,28
6,18	82,76	1,73	32,61	4,71
6,69	79,32	1,93	29,96	2,87
7,11	78,78	2,57	28,83	1,11
7,60	78,98	2,04	28,37	0,72
8,44	83,26	2,50	28,11	1,84
9,06	80,15	3,75	27,73	0,17
9,97	81,74	1,69	27,94	0,41

Tabulka 13 Přehled naměřených hodnot R_H a u_{eff} vesikul PS-*b*-PAA včetně směrodatných odchylek v závislosti na pH o konstantní iontové síle roztoků 80 mmol dm⁻³.

pH _{exp}	$\frac{R_H}{\text{nm}}$	$\frac{s_r}{\%}$	$\frac{u_{\text{eff}}}{10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}}$	$\frac{s_r}{\%}$
3,51	697,76	4,51	-	-
4,05	112,72	0,88	21,51	1,12
4,17	-	-	22,55	1,03
4,55	77,63	2,49	29,72	2,02
5,10	75,40	1,55	33,12	0,72
5,60	79,10	3,19	29,59	4,21
6,09	80,18	1,17	32,21	4,00
6,59	77,36	1,91	29,41	3,46
6,99	80,17	3,52	29,27	2,06
7,52	79,25	2,80	27,49	0,18
8,43	87,14	2,61	26,79	0,25
9,02	82,18	3,98	26,82	1,29
10,00	80,64	2,27	26,53	0,43

Průměrné hodnoty efektivních pohyblivostí vesikul PS-*b*-PAA stejně tak hydrodynamický poloměr v závislosti na změřené hodnotě pH pufru byly vyneseny do grafu, viz Obr. 20 a Obr. 21.

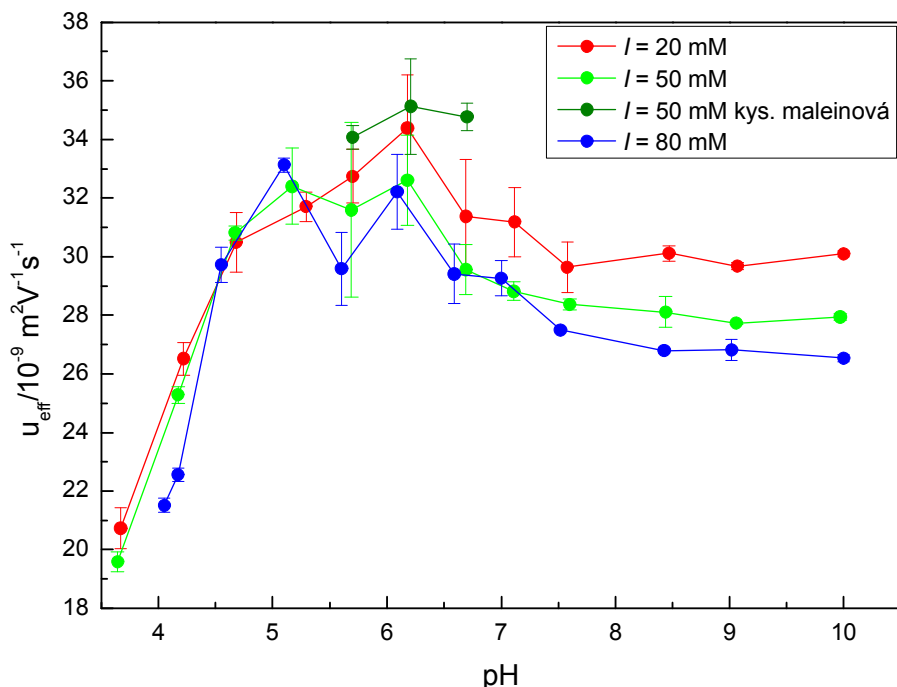
Ze závislosti pohyblivosti vesikul na pH (Obr. 20) je zřejmé, že jejich pohyblivost se při pH vyšším než 7,5 a konstantní iontové síle téměř nemění.

Podobné chování vesikul (v intervalu pH 10–7,5) ukazuje i průběh křivky závislosti hydrodynamického poloměru na pH (Obr. 21). Velikost hydrodynamického poloměru se tedy při pH vyšším než 7,5 také nemění. Nepatrně vyšší velikost částic v pH kolem 8,5 je

pravděpodobně způsobena pouze prachovými částicemi či jinými nečistotami v roztoku.

V intervalu pH 7,5–10 lze předpokládat, že polyelektrolytový brush na povrchu vesikuly je prakticky plně disociovaný a jednotlivé polyelektrolytové řetězce plně natažené (viz kapitola 1.6). Konstantní hydrodynamický poloměr tak plně koreluje s jejich neměnnou pohyblivostí a konstantním povrchovým nábojem.

Záporný náboj polyakrylové kyseliny ovšem elektrostaticky přitahuje Li^+ ionty přítomné v základním elektrolytu. Související sorpce Li^+ iontů na polyelektrolytový brush stoupá se zvyšující se iontovou silou a má za následek odstínění záporného náboje od okolního roztoku a pokles elektroforetické pohyblivosti v pořadí I 20 < 50 < 80 mmol dm^{-3} . Vliv iontové síly na migraci vesikul se potvrdila a je detailně popsána v kapitole Závislost efektivní pohyblivosti vesikul PS-*b*-PAA na iontové síle I .



Obr. 20 Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti vesikul u_{eff} PS-*b*-PAA na pH pro všechny série roztoků, včetně tří maleinových pufrů. Symboly • odpovídají naměřeným elektroforetickým pohyblivostem vesikul PS-*b*-PAA při dané iontové síle (viz legenda).

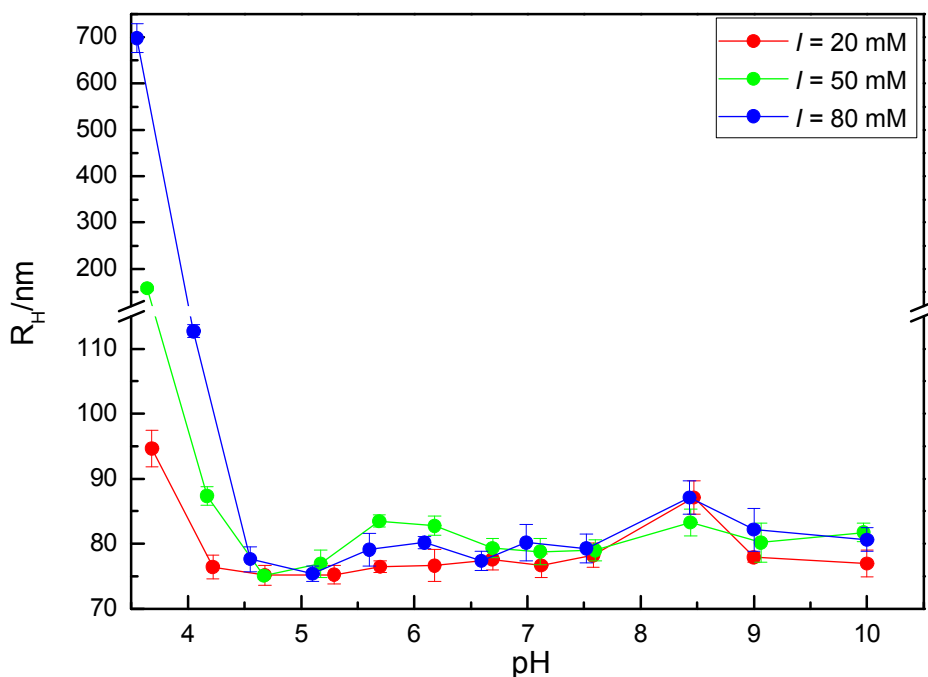
S dalším snížením pH nastává pozvolný, ale viditelný růst pohyblivosti (Obr. 20). Ve střední oblasti pH 5,6–6,7 dochází k zajímavému jevu. Během experimentálních měření byla vyzorována horší reprodukovatelnost experimentálních dat, což je evidentní i na vyšší hodnotě relativní směrodatné odchylky pohyblivosti v porovnání s roztoky o jiném pH (Tabulka 11, 12, 13), jejíž hodnota je až 6 %. Toto může být vysvětleno nestabilitou PAA koróny vesikul, která obsahuje jak nabitě polyakrylové kusy, tak nedisociované části v této oblasti pH. Z tohoto důvodu se chování vesikuly může mezi jednotlivými experimenty měnit. Aby se vyloučila nestabilita systému spojená s případnou interakcí

vesikuly se slabou kyselinou přítomnou v pufru (MES), totožná měření byla provedena i v pufrech o stejném pH, v nichž jako pufrující složka byla použita kyselina maleinová. Experimentální hodnoty pohyblivosti změřené v maleinovém pufru s ekvivalentní hodnotou pH k třem vybraným MES pufrům vykazují stejné chování, a potvrzují tak nestabilitu vesikul v této oblasti pH.

Při pH nižším než 4,8 nastává strmý pokles pohyblivosti vlivem dvou efektů. Za prvé z důvodu klesajícího náboje polyakrylové kyseliny a za druhé díky rostoucí hydrofobicitě vesikul. Kolem pH 4,6 se pohyblivost vesikul výrazně zpomaluje, ale jejich velikost se zatím nemění. Usuzujeme tedy pouze na pokles povrchového náboje vesikul.

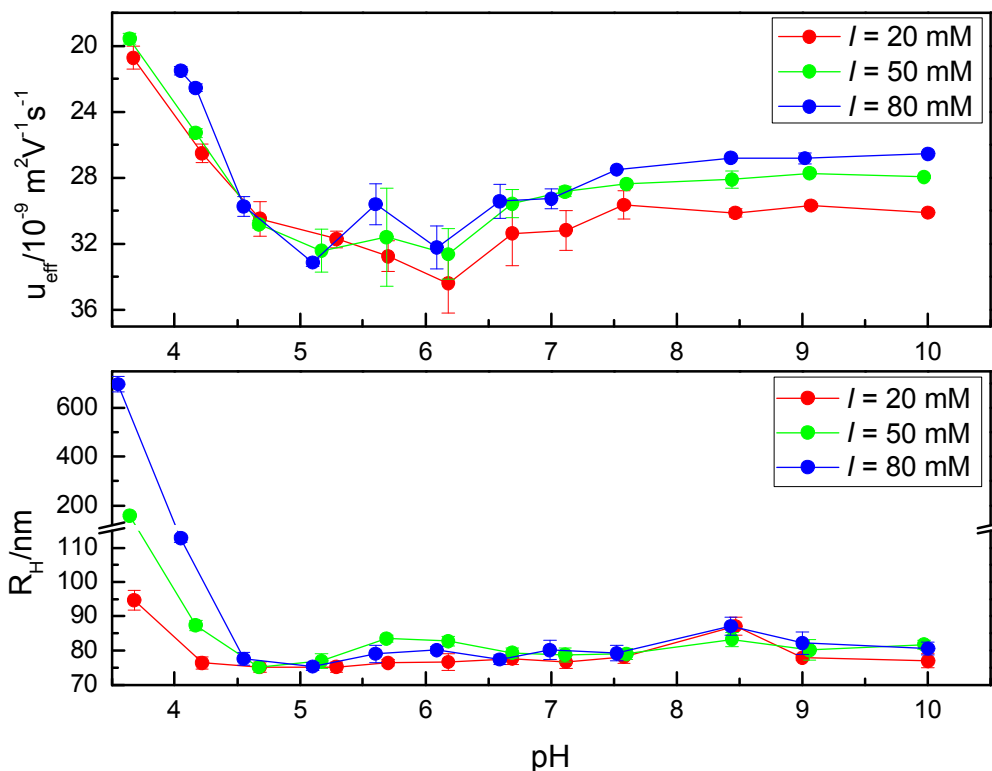
S dalším snížením pH pufru klesá povrchový náboj a stoupá hydrofobita vesikul, a v důsledku dochází k nárůstu velikosti částic z důvodu asociace vesikul v agregáty, jak potvrzuje Obr. 21. Z důvodu zvyšování R_H a poklesu povrchového náboje pak větší částice migrují výrazně pomaleji.

Vliv iontové síly na agregaci vesikul v této oblasti pH je patrný z výsledků dynamického rozptylu světla, který jasně ukazuje, že s rostoucí koncentrací iontů v základním elektrolytu se enormně navyšuje poloměr vzniklých agregátů. To plně souhlasí s klesajícím nábojem vesikul v důsledku odstínění jejich náboje a s jejich rostoucí hydrofobicitou. V roztocích o $\text{pH } 3,6 \pm 0,1$ a $I \text{ } 80 \text{ mmol dm}^{-3}$ již jsou vesikuly natolik agregovány, že není možno elektroforeticky stanovit jejich pohyblivost.



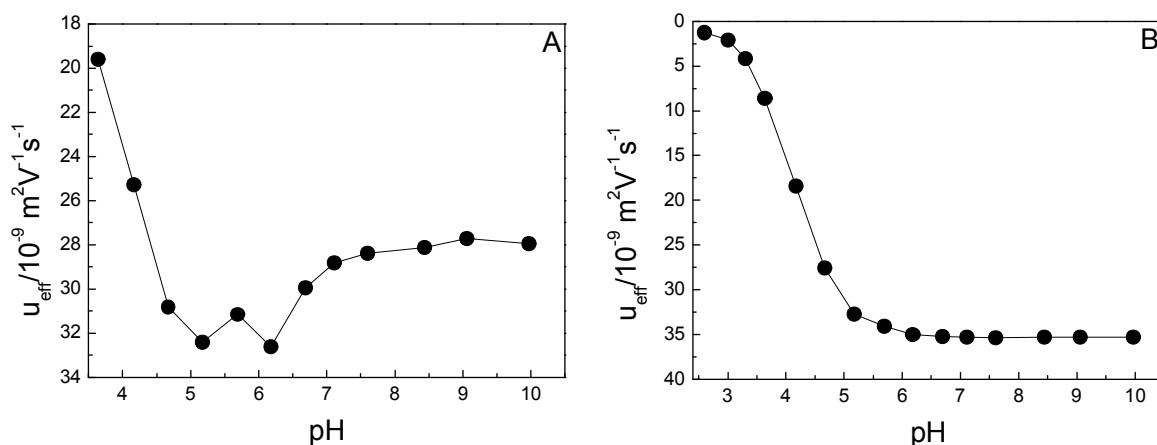
Obr. 21 Závislost hydrodynamického poloměru R_H vesikul PS-b-PAA na pH v sérii pufrů o iontové síle 20 mmol dm^{-3} (symboly ●), 50 mmol dm^{-3} (symboly ●) a 80 mmol dm^{-3} (symboly ●).

Pro přehlednost a srovnání jsou křivky R_H vs. pH a u_{eff} vs. pH společně uvedeny na Obr. 22, ze kterého vyplývá souvislost mezi migrací a velikostí studovaných vesikul PS-*b*-PAA.



Obr. 22 Korelace závislosti hydrodynamického poloměru na pH a závislosti efektivní pohyblivosti na pH vesikul PS-*b*-PAA.

Zajímavé srovnání, uvedené na Obr. 23, nabízí závislost efektivní pohyblivosti vesikul na pH se závislostí u_{eff} vs. pH pro malou molekulu kyseliny akrylové, která je monomerním polyelektrolytovým brushe. Pro tento účel byla vybrána střední hodnota I 50 mM. Efektivní pohyblivost kyseliny akrylové v závislosti na pH byla spočtena programem PeakMaster 5.3 pro rozmezí pH 2,6–10 a iontovou silou 50 mmol dm⁻³. Křivka kyseliny akrylové vykazuje sigmoidní tvar typický pro malé molekuly. Proložení sigmoidy rovnicí (20) lze v případě experimentálních měření určit konstantu pK_A této látky, která odpovídá hodnotě 4,26. U vesikul nelze proměřit tuto závislost do dostatečně nízkých hodnot pH, protože při pH nižším než 4 významně roste poloměr vesikul z důvodu jejich agregace. Nelze tak dostatečně přesně srovnat křivky u_{eff} vs. pH vesikul s křivkou u_{eff} vs. pH kyseliny akrylové, a tak určit pK_A kyseliny akrylové v polyelektrolytovém brushi. Lze ale odhadnout, že pK_A vesikul je lehce nižší či srovnatelné s pK_A související kyseliny akrylové, z čehož je zřejmé, že kyselina akrylová v polyelektrolytovém brushi je pravděpodobně silnější kyselinou.



Obr. 23 Přehled závislosti vesikul PS-*b*-PAA na pH (Graf A) pro sérii roztoků o $I = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$. Graf B platí pro kyselinu akrylovou, jejíž hodnoty efektivní pohyblivosti byly vypočteny programem PeakMaster 5.3 s ekvivalentními hodnotami pH jako u vesikul a $I = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Závislost efektivní pohyblivosti vesikul PS-*b*-PAA na iontové síle I

Chování velkých molekul jako jsou vesikuly se výrazně odlišuje od chování malých iontů, u kterých není pozorována sorpce protiiontů ani u nich nedochází k agregaci. Závislost efektivní pohyblivosti a hydrodynamického poloměru vesikul PS-*b*-PAA na iontové síle znázorňují křivky na Obr. 24 a Obr. 25. Tato závislost byla měřena při pH 8,43, kdy je polyelektrolytový brush již plně disociovaný a polyakrylové řetězce jsou plně natažené. Naopak pH 4,17 bylo vybráno jako druhý extrém, kdy část aniontových skupin již není disociována a zároveň agregace částic není natolik výrazná, abychom měření mohli provést v celém rozsahu iontových sil.

Hodnoty experimentálně zjištěných pohyblivostí vesikul společně s hydrodynamickými poloměry molekul (naměřené RNDr. Miroslav Štěpánkem Ph.D.) při pH 8,43 shrnuje Tabulka 14 a při pH 4,17 Tabulka 15.

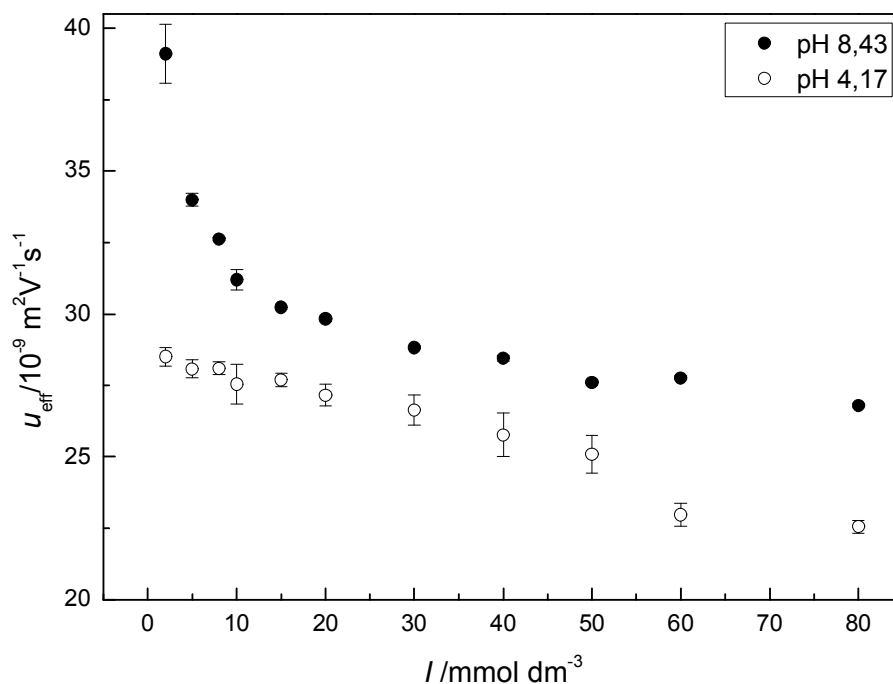
Tabulka 14 Přehled naměřených hodnot R_H a u_{eff} vesikul PS-*b*-PAA v závislosti na iontové síle roztoků o $pH_{\text{exp}} 8,43$.

I mmol dm^{-3}	R_H nm	S_r %	u_{eff} $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$	S_r %
2,00	78,48	2,79	39,11	2,61
5,00	79,56	1,40	34,00	0,70
8,00	80,26	2,32	32,63	0,20
10,00	78,66	2,66	31,20	1,14
15,00	78,62	2,17	30,22	0,17
20,00	78,88	3,67	29,83	0,30
30,00	81,48	0,97	28,82	0,18
40,00	79,75	2,11	28,45	0,36
50,00	81,15	0,24	27,60	0,37
60,00	81,47	0,92	27,76	0,26
80,00	87,14	2,61	26,79	0,25

Tabulka 15 Přehled naměřených hodnot R_h a u_{eff} vesikul PS-*b*-PAA v závislosti na iontové síle roztoků o pH_{exp} 4,17.

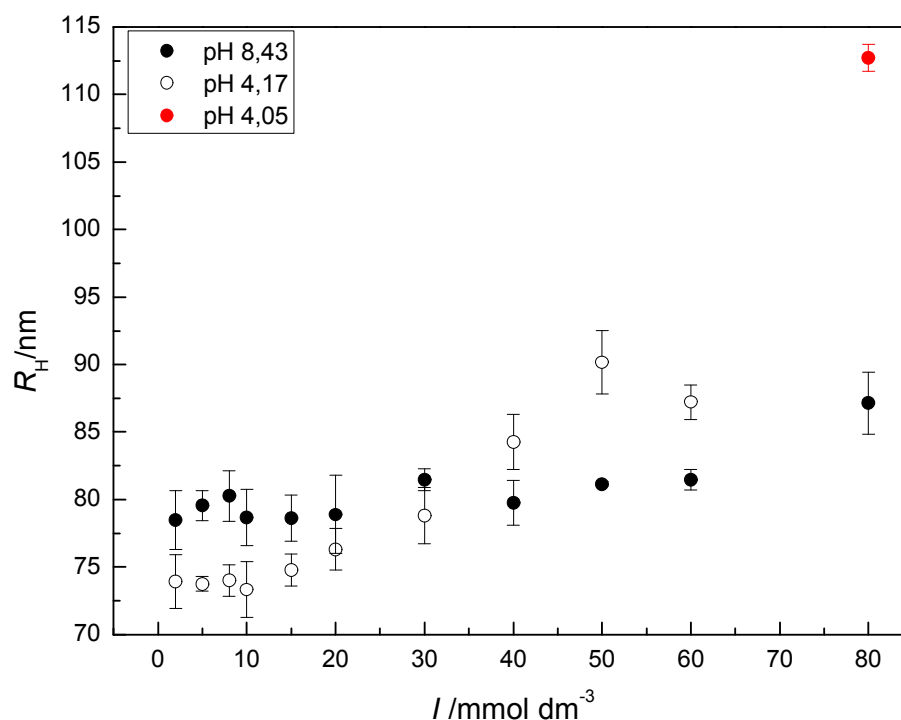
I mmol dm ⁻³	R_h nm	$\frac{S_r}{S_0}$ %	$\frac{u_{\text{eff}}}{10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}}$	$\frac{S_r}{S_0}$ %
2,00	73,92	2,69	28,51	1,12
5,00	73,76	0,73	28,08	1,11
8,00	74,00	1,57	28,10	0,82
10,00	73,34	2,82	27,54	2,52
15,00	74,78	1,60	27,70	0,82
20,00	76,30	2,01	27,15	1,39
30,00	78,82	2,67	26,64	1,99
40,00	84,26	2,39	25,78	2,95
50,00	90,17	2,61	25,11	2,63
60,00	87,22	1,46	22,98	1,71
80,00	-	-	22,55	1,03

Při pH 8,43, kdy je polyelektrolytový brush téměř plně disociovaný, se zvyšující se iontovou silou dochází ke strmému poklesu pohyblivosti zejména v oblasti iontových sil 2–15 mmol dm⁻³ a následuje mírnější pokles pohyblivosti v intervalu iontových sil 20–80 mmol dm⁻³. Snížení efektivní pohyblivosti se vzrůstající iontovou silou způsobují zejména tři efekty, jak již bylo diskutováno v literatuře (viz kapitola 1.6). Za první efekt zodpovídá iontová atmosféra vytvořená kolem vesikul, která houstne se zvyšující se iontovou silou, a tak odstiňuje náboje polyakrylové kyseliny. Za druhý efekt jsou odpovědné protiionty Li⁺ přítomné v základním elektrolytu. Ty se díky elektrostatické přitažlivosti sorbují na záporně nabitou polyakrylovou kyselinu, čímž dochází ke snížení celkového náboje vesikuly. Třetím efektem je měnící se hydrodynamický poloměr, který přímo souvisí s předchozími dvěma efekty. Ten se ovšem při pH 8,43 výrazně nepodílí na poklesu pohyblivosti, jelikož hydrodynamický poloměr při pH 8,43 v oblasti $I <2;60>$ mmol dm⁻³ roste jen velmi málo s iontovou silou viz Obr. 24.



Obr. 24 Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti u_{eff} vesikul PS-*b*-PAA na iontové síle základního elektrolytu. Symboly • odpovídají experimentální závislosti u_{eff} vs. I pro pH 8,43. Symboly ○ odpovídají závislosti u_{eff} vs. iontová síla pro pH 4,17.

V roztocích o nižším pH 4,17 s rostoucí iontovou silou základního elektrolytu od 2 mmol dm⁻³ až po hodnotu 80 mmol dm⁻³ nastává méně strmý pokles pohyblivosti než u bazického pH. V tomto pH je již povrchová hustota náboje vesikuly nízká, proto se s rostoucí iontovou silou náboj mění méně výrazně než při plné disociaci polyelektrolytu jako je tomu při pH 8,43. Současně ale pozorujeme výraznější nárůst velikosti útvarů s rostoucí iontovou silou spojených s agregací vesikul, který vede k poklesu jejich pohyblivosti. Z důvodu chybějícího bodu R_H při pH 4,17 a iontové síle 80 mmol dm⁻³ je na Obr. 25 pro názornost vložena hodnota R_H pro pH 4,05 a iontovou sílu 80 mmol dm⁻³ (označeno červeným bodem).



Obr. 25 Závislost hydrodynamického poloměru R_H vesikul PS-*b*-PAA na iontové síle základního elektrolytu pro sérii roztoků o pH 8,43 (symboly •) a sérii o pH 4,17 (symboly ○). Symbol • odpovídá pH 4,05 a iontové síle 80 mmol dm^{-3} a je uveden pro teoretické prodloužení křivky o pH 4,17.

Chování vesikul bylo opět srovnáno s chováním kyseliny akrylové, která je základní stavební jednotkou příslušného polyelektrolytu. Teoretické efektivní mobility kyseliny akrylové byly vypočteny pomocí programu PeakMaster 5.3 za stejných experimentálních podmínek jako byly použity během měření.

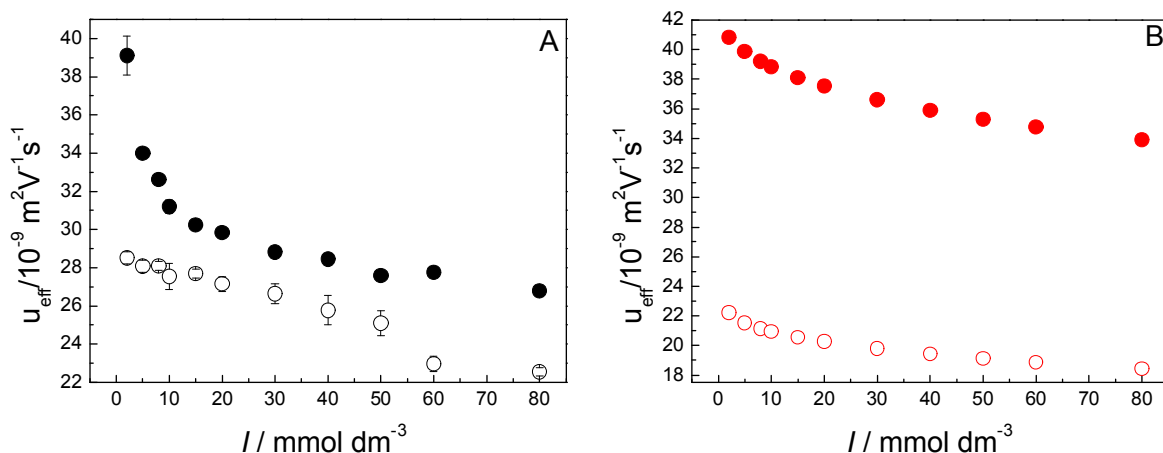
Grafy na Obr. 26 a Obr. 27 srovnávají efektivní pohyblivost vesikul a akrylové kyseliny v bazickém pH 8,43, resp. v kyselém pH 4,17.

Při pH 8,43 má vesikula vždy nižší pohyblivost než samotná kyselina akrylová, ač při nízké iontové síle (2 mmol dm^{-3}) jsou hodnoty pohyblivostí blízké (Obr. 27, Graf A). Při pH 8,43 tedy musí být nižší efektivní náboj vesikul než u samotné kyseliny akrylové. Současně se výrazně liší i tvar této závislosti. Vesikuly jednoznačně vykazují strmější pokles pohyblivostí v oblasti nízkých iontových sil než kyselina akrylová. Tento rozdíl lze vysvětlit vlivem iontové atmosféry v okolí vesikuly. Kationty lithia mají tendenci zalézat hlouběji do polyelektrolytového brushe vesikul a zde elektrostaticky interagovat s přítomnými záporně nabitými kusy polyakrylové kyseliny. Tím dochází jak ke snižování záporného náboje, tak k postupnému odstínění zbylých negativních nábojů nacházejících se hlouběji ve vrstvě brushe. Proto tedy koncentrace protiiontů výrazně ovlivňuje pohyblivost v oblasti nízkých iontových sil.

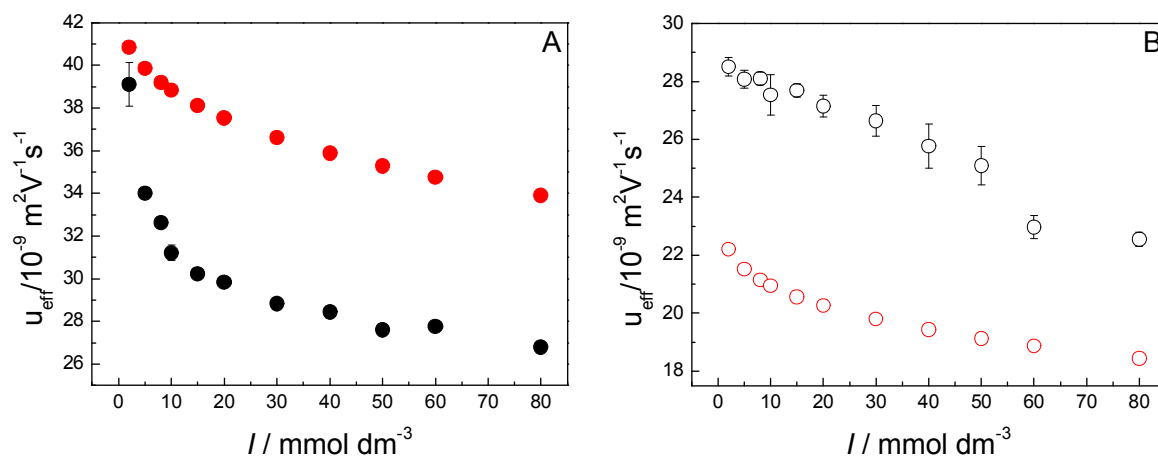
V kyselém pH 4,17 je nečekaně pohyblivost vesikul vyšší v porovnání s kyselinou akrylovou (Obr. 31, Graf B), což je přesně naopak oproti bazickému pH. Efektivní náboj

v případě obou částic je již nízký, ale jak již bylo řečeno v kapitole 4.3, vesikuly jsou pravděpodobně silnější kyselinou než samotná kyselina akrylová. Tvar obou závislostí pro kyselinu akrylovou a vesikul je podobný, ale je třeba brát v úvahu, že tvar závislosti pro vesikuly je ovlivněn současně i rostoucím hydrodynamickým poloměrem, a tedy klasické modely pro ně nemohou být použity. Zároveň nepozorujeme stejně strmý pokles jako u pH 8,43 z důvodu menší sorpce protiiontů na povrchu polyelektrolytu, jelikož sorpce je funkcí povrchového napětí, které je v tomto případě výrazně nižší.

Abychom námi diskutované závěry ověřili, budou pomocí ζ -seizure naměřeny i ζ -potenciály vesikul.



Obr. 26 Srovnání efektivních pohyblivostí vesikul (Graf A) a akrylové kyseliny (Graf B) v závislosti na iontové síle. Symboly \bullet , \bullet odpovídají pH 8,43 a symboly \circ , \circ pH 4,17. Měřeno při teplotě 25 °C.



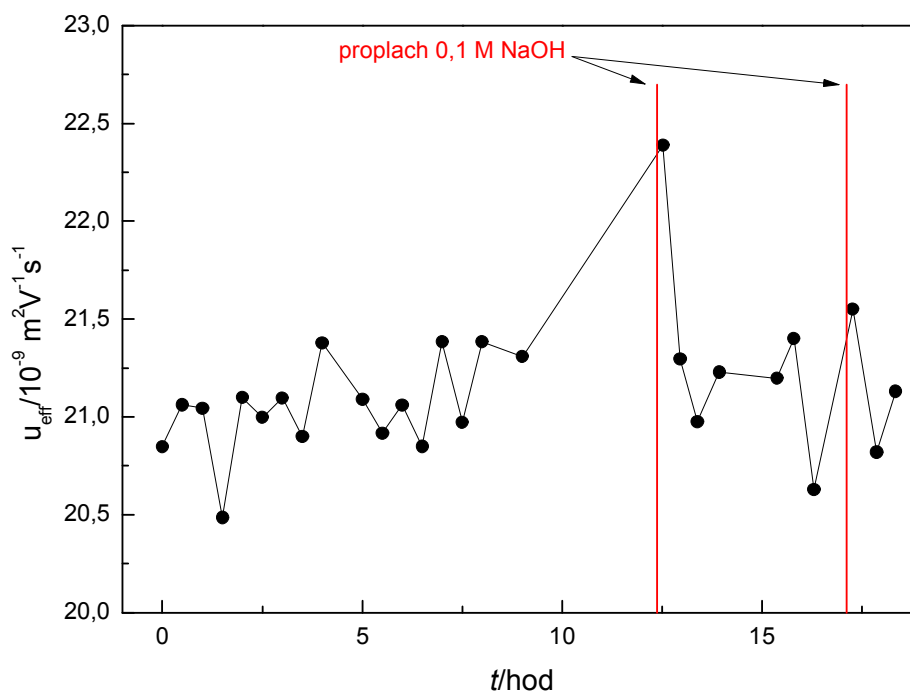
Obr. 27 Srovnání efektivních pohyblivostí vesikul (symboly \bullet , \circ) a akrylové kyseliny (symboly \bullet , \circ) v závislosti na iontové síle při pH 8,43 (Graf A) a pH 4,17 (Graf B). Měřeno při teplotě 25 °C.

Závislost efektivní pohyblivosti vesikul PS-*b*-PAA na čase

Cílem těchto měření bylo zjistit, zda dochází ke změnám chování vesikul s časem a zda se tvar a náboj vesikul v pufrch o různém pH ustavuje po delší časový úsek. U dvou vybraných roztoků o iontové síle 20 mmol dm^{-3} , pH 3,68 a 6,69, byl připraven čerstvý roztok vesikul PS-*b*-PAA, jejichž elektroforetická pohyblivost byla měřena každých 30 minut po dobu minimálně 20 hodin.

Podmínky pH 3,68 a iontová síla 20 mmol dm^{-3} byly vybrány z důvodu, že zde dochází k největším změnám v uspořádání brushe oproti vesikulám připraveným v borátovém pufru (pH 9,20), a navíc agregace je nejnižší ve srovnání s vyššími koncentracemi iontů v BGE. Naopak pH 6,69 bylo zvoleno, jelikož v již zmíněné oblasti pH 5,6–6,7 pozorujeme nečekaně největší chybu měření. Časová závislost efektivní pohyblivosti tedy může vést k vysvětlení tohoto jevu.

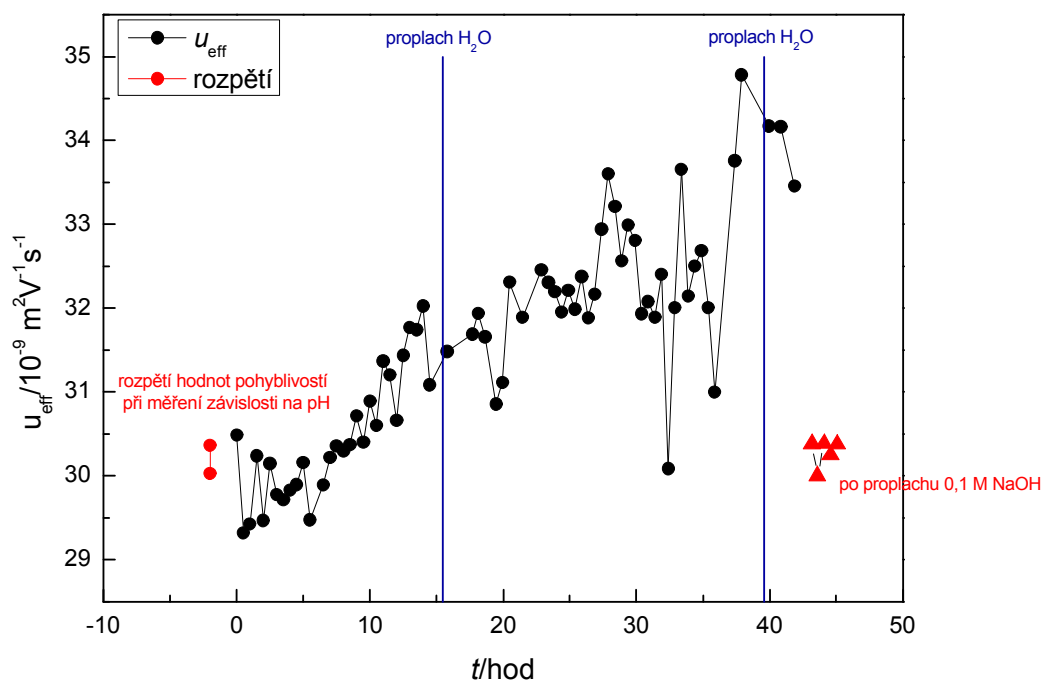
Při pH 3,68, byla proměřena časová závislost elektroforetické pohyblivosti v průběhu necelých 20 hodin. Zhruba 1 hodinu po přípravě roztoku vesikul v daném pH bylo zahájeno měření a každý následující experiment probíhal v 30 minutových intervalech. Proplach kapiláry 0,1 M hydroxidem sodným, vodou a separačním pufrům byl realizován pro obnovu povrchu kapiláry ovlivněného případnou adsorpcí vesikul na stěnu. Tyto proplachy ale nikterak neovlivnily pohyblivost vesikul. Vývoj pohyblivosti vesikul na čase je znázorněn na Obr. 28. Z průběhu necelých 20 hodin záznamů je evidentní, že v rámci statistické chyby se pohyblivost vesikul s časem nemění. Vesikuly se tedy stabilizují během první hodiny po jejich přípravě.



Obr. 28 Časová závislost elektroforetické pohyblivosti vesikul PS-*b*-PAA v pufru o pH 3,68 a $I = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Časová závislost efektivní pohyblivosti vesikul v pH 6,69 (znázorněno na Obr. 29) byla proměřena v časovém intervalu 45 hodin s tím, že první experiment započal do 30 minut od přípravy vzorku vesikul v tomto pH. Každý další experiment následoval po cca 30 minutách.

V pH 6,69 evidentně pohyblivost vesikul roste s časem. Kapilára byla propláchnuta destilovanou vodou před experimentem v 15,8 hodině a pak v 39,9 hodině (na Obr. 29 vyznačeno modrou linií), což neovlivnilo vzrůstající hodnotu pohyblivosti. Naopak prokazatelný efekt na pohyblivost vesikul lze vidět při proplachu 0,1 M NaOH (vyznačeno červenými trojúhelníky), kterým byla kapilára propláchnuta před posledními pěti experimenty. Po tomto proplachu soustavně se zvyšující efektivní pohyblivost výrazně poklesla na její původní hodnotu. Toto chování vesikul se doposud nepodařilo vysvětlit a pravděpodobně souvisí s horší stabilitou vesikul v této oblasti pH.



Obr. 29 Časová závislost elektroforetické pohyblivosti vesikul PS-*b*-PAA v pufru o pH 6,69 a $I = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Korekce tlaku

Elektroforetická aparatura není schopna udržet nastavenou konstantní hodnotu tlaku po celou dobu experimentu, a dochází tak k jeho mírnému kolísání. Toto kolísání může ovlivnit detekční čas analyzovaných látek a tím výslednou elektroforetickou pohyblivost. Jak výrazný vliv na výslednou hodnotu efektivní pohyblivosti má kolísání tlaku, bylo ověřeno porovnáním výsledků vypočteného podle vztahu (14) a výsledků efektivní pohyblivosti zjištěných z následujících přesnějších vztahů.

Rychlost protlačování (neboli rychlost hydrodynamického toku) v_h v posledním kroku E metody PreMCE lze definovat vztahem zahrnujícím v čitateli časový interval mezi druhým markerem a počátkem aplikace tlaku p , jak ukazuje vztah (11)

$$v_h = \frac{L_d}{t_{N2} - t_p} \quad (11)$$

Tento vztah byl použit k odvození zjednodušeného výrazu (14) pro výpočet efektivní pohyblivosti získané pomocí metody PreMCE (viz kapitola 1.2).

Výsledek efektivní pohyblivosti korigovaný na kolísání tlaku byl vypočten z rozdílu plochy pod křivkou mezi úseky $t_{N2} - t_p$ a $t_{N1} - t_a$ vyznačených na Obr. 30. Místo samotných časů potřebných k výpočtu rychlosti protlačování v_h , p , lze použít hodnotu určitého integrálu časového záznamu průběhu tlaku (30).

$$v_{h,p} = \frac{L_d}{\int_{t_p}^{t_{N2}} p dt} . \quad (30)$$

Součin rychlosti $v_{h,p}$ a plochy pod křivkou v úseku t_{N1} a t_a udává vzdálenost l_m

$$l_m = v_{h,p} \int_{t_{N1}}^{t_a} p dt . \quad (31)$$

Efektivní pohyblivost je možné počítat podle následujícího výrazu

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{l_m L_c}{U t_{\text{migr}}} . \quad (32)$$

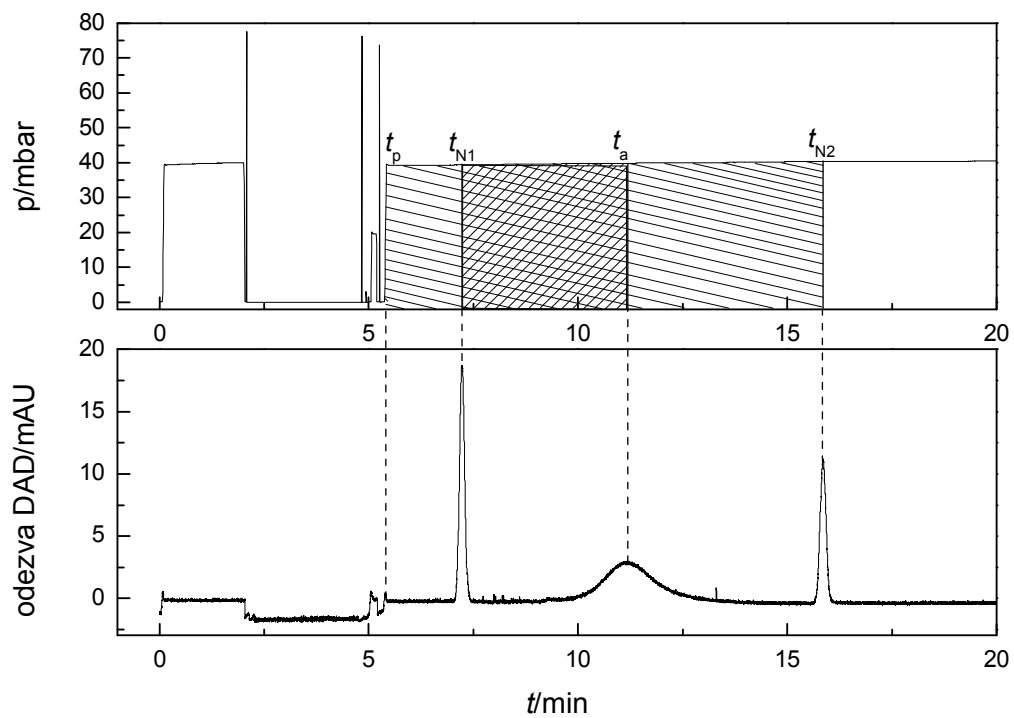
Kombinací vztahů (30), (31) a (32) dostaneme pro výpočet efektivní pohyblivosti následující vztah

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{L_c L_d \int_{t_{N1}}^{t_a} p dt}{U t_{\text{migr}} \int_{t_p}^{t_{N2}} p dt} . \quad (33)$$

V tomto vztahu jsou samotné časy analytu a markerů nahrazeny integrály časového záznamu tlaku, díky nimž lze považovat výpočet efektivní pohyblivosti za přesnější, protože zohledňuje fluktuace tlaku během experimentu.

K tomuto výpočtu bylo vybráno 8 experimentů napříč měřeními časové závislosti efektivní pohyblivosti při pH 6,69 o iontové síle 20 mmol dm^{-3} a poté 6 experimentů vybraných náhodně při různém pH a iontové síle.

Porovnáním mobilit vypočtených pomocí přesného vztahu (33) a mobility vypočtené podle vztahu (14) se ověřil malý rozdíl těchto dvou postupů. Rozdíl mezi odlišnými způsoby vyhodnocení se pohyboval vždy do 0,5 %. Jelikož zpracování experimentálních dat pomocí vztahu (33) je výrazně časově náročnější a chyba způsobená použitím vztahu (14) zanedbatelná, byl vztah (14) použit k vyhodnocení všech experimentů.



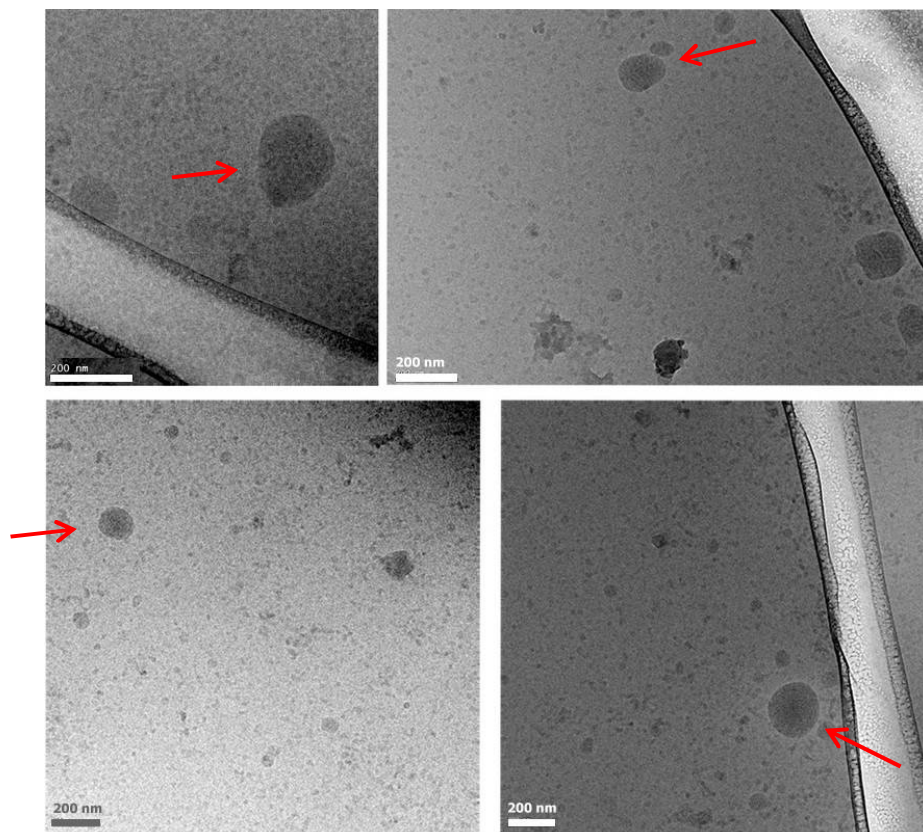
Obr. 30 Záznam průběhu tlaku aplikovaného na kapiláru s vyznačenými úseky $t_{N2}-t_p$ a $t_{N1}-t_a$ pro výpočet korigované pohyblivosti.

Cryo-TEM

Cryo-TEM mikrografy (Obr. 31) vesikul v 50 mmol dm^{-3} borátovém pufru naměřil RNDr. Miroslav Šlouf Ph.D., Institut Makromolekulární chemie Akademie věd ČR, Heyrovského 2, Praha, ČR.

Vesikuly jsou na fotografiích označené červenou šipkou, jejich průměrná velikost se pohybuje na 200 nm.

Z fotografií je patrná nesourodost ve velikosti útvarů. Je to způsobeno tím, že při přípravě vesikul nelze zcela přesně nastavit spojení ploché lamely vždy ve stejně velikou vesikulu. Zjevná polydisperzita vesikul také dobře souhlasí s větší šířkou píku vesikul na elektroferogramech. Šířka píku vesikul u baseliny byla obvykle cca 3 min (viz Obr. 18), takto široké píky obvykle pozorujeme právě u polydisperzních makromolekul.



Obr. 31 Cryo-TEM mikrografy vesikul $\text{PS}_{60}\text{-}b\text{-PAA}_{30}$ v borátovém pufru o pH 9,22.

5. Diskuse

- Interakce polyelektrolytů s opačně nabitými iontovými surfaktanty byla studována pro dva systémy lišící se volbou polyelektrolytu a surfaktantu. Efektivní pohyblivost prvního komplexu tvořeného anionickým polyelektrolytem poly(ethylen oxid)-*blok*-poly(methakrylátem) sodným a kationickým surfaktantem obsahujícím N-dodecylpyridiniové kationy byla studována v závislosti na poměru koncentrací těchto dvou komponent. Experimenty byly prováděny pomocí metody ACE, kdy surfaktant byl dávkován jako vzorek a polyelektrolyt byl součástí základního elektrolytu, při několika experimentálních uspořádáních: v různých kapilárách, při různých napětích a teplotách atd. Ve srovnání s údaji uvedenými v literatuře, získané závislosti ukazují mnohem nižší změnu mobility komplexu s měnícím se poměrem surfaktantu a polyelektrolytu. Současně jsme byli schopni identifikovat píky polyelektrolytu a surfaktantu v rámci jednoho experimentu, kdy byl roztok surfaktantu a polyelektrolytu dávkován jako vzorek do čistého pufru, z čehož usuzujeme na nízkou stabilitu komplexu během elektroforetických experimentů. CZE tedy není vhodnou metodou pro studium tohoto komplexu.

V případě druhého systému tvořeného polyelektrolytem poly[3,5-bis(trimethylammoniummethyl)-4-hydroxystyren iodid]-*blok*-poly(ethylen oxid) a dodecylsulfátem sodným se podařilo stanovit pouze efektivní pohyblivost polyelektrolytu samotného. Komplex polyelektrolytu se surfaktantem nebylo možno detekovat, pravděpodobně z důvodu interakce komplexu se stěnou kapiláry.

- Elektroforetické chování vesikul PS-*b*-PAA bylo studováno v závislosti na pH základního elektrolytu v intervalu pH 3,5–10 ve třech sériích roztoků tak, že každá série měla konstantní iontovou sílu ($20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a $80 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$). V pufrách o pH vyšším než 7,5 se pohyblivost vesikul již neměnila, ve střední oblasti pH 5,6–6,7 pohyblivosti rostly a zároveň měly velký rozptyl s relativní směrodatnou odchylkou až 6 %, s dalším snížením pH dochází k výraznému poklesu pohyblivosti.

Efektivní pohyblivosti těchto vesikul byly proměřeny také v závislosti na iontové síle základního elektrolytu v intervalu I 2–80 mmol dm⁻³ ve dvou sériích pH, a to 4,17 a 8,43. Tato pH byly zvolena, jelikož při pH 4,17 je polyakrylová kyselina v brushi vesikuly již částečně nedisociována, ale současně vesikuly neagregují natolik, abychom je nebyli schopni v elektroforetických experimentech detekovat. Naopak v pH 8,43 je polyelektrolytový brush plně disociován a natažen. Tyto závislosti ukazují, že pohyblivost výrazně klesá s iontovou silou při pH 8,43 v oblasti nízkých iontových sil. To je pravděpodobně způsobeno sorpcí protiiontů do polyelektrolytového brushe a odstíněním

jeho náboje. Sorpce protiiontů je funkcí povrchového náboje micely a je tedy výrazně nižší v kyselém pH, proto tedy pravděpodobně takto výrazný pokles nepozorujeme při pH 4,17.

Hydrodynamický poloměr vesikul proměřený metodou dynamického rozptylu světla ve stejných sériích roztoků, jako byly měřeny elektroforetické experimenty, přispěl k vysvětlení elektroforetického chování vesikul v závislosti na pH a iontové síle. Jeho hodnoty dobře korelují s vývojem elektroforetických pohyblivostí v jednotlivých experimentech.

Srovnání chování vesikul, jejichž stavební jednotkou je akrylová kyselina, s elektroforetickým chováním této kyseliny ukázalo, že pK_A polyakrylové kyseliny na vesikule je pravděpodobně lehce nižší hodnoty než u kyseliny akrylové. V závislosti na iontové síle poté hraje významnou roli sorpce protiiontů z BGE na polyelektrolytový brush vesikuly, a ovlivňuje tak výslednou efektivní pohyblivost

- Elektroforetická pohyblivost byla také měřena v závislosti na časové prodlevě mezi jejich přípravou a samotným experimentem ve dvou vybraných roztocích o pH 3,68 a 6,69 a iontové síle 20 mmol dm^{-3} . V nižším pH nebyla zaznamenána výrazná změna pohyblivosti s časem. Oproti tomu v pH 6,69 lze pozorovat postupný vzrůst hodnoty efektivní pohyblivosti s narůstajícím časem od přípravy, ovšem po proplachu kapiláry hydroxidem sodným se pohyblivosti redukovaly na původní hodnoty. Toto chování plně koreluje s velkou směrodatnou odchylkou měření v tomto pH, které bylo zaznamenáno během měření pH závislosti, a tedy pravděpodobně s nestabilitou vesikul při tomto pH.

- V práci byly také porovnány způsoby vyhodnocení experimentálních dat, a to 1. výpočtu zahrnujícího integrace tlako-časového záznamu, tedy přesnějšího přístupu při vyhodnocení PreMCE experimentů a 2. zjednodušeného postupu, který zanedbává fluktuace tlaku a pracuje pouze s detekčními časy jednotlivých píků. Porovnáním výsledků vypočtených těmito způsoby bylo ukázáno, že fluktuace tlaku během měření výrazně neovlivňují konečné hodnoty pohyblivosti. Odlišnost výsledků se pohybovala do 0,5 %, je tedy možné použít zjednodušený a výrazně kratší postup výpočtu aniž bychom výrazně zvýšili chybu stanovení.

6. Závěr

V rámci této diplomové práce bylo studováno chování komplexů polyelektrolyt-surfaktant a polymerních vesikul. Prvním studovaným systémem byl komplex tvořený anionickým polyelektrolytem poly(ethylen oxid)-*blok*-poly(methakrylátem) sodným a kationickým surfaktantem obsahujícím N-dodecylpyridiniové kationty. Stanovená změna pohyblivost komplexu byla výrazně nižší než ta popsána v literatuře. Následné experimenty předpovídají, že komplex není v elektroforetických experimentech stabilní, a tudíž nemůže být studován pomocí CZE. U druhého komplexu z polyelektrolytu poly[3,5-bis(trimethylammoniummethyl)-4-hydroxystyren iodid]-*blok*-poly(ethylen oxidu) s dodecylsulfátem sodným jsme museli překonávat problémy s interakcí složek systému se stěnou kapiláry, z toho důvodu nebylo možno komplex detekovat a byla stanovena pouze pohyblivost čistého polyelektrolytu poly[3,5-bis(trimethylammoniummethyl)-4-hydroxystyren iodid]-*blok*-poly(ethylen oxidu).

Pohyblivost vesikul byla studována v závislosti na pH, iontové síle základního elektrolytu a na čase. Pohyblivost vesikul se výrazně mění s pH. Při pH vyšším než 7 je pohyblivost vesikul konstantní, jelikož polyelektrolytový brush je plně disociován, kolem pH 5 pozorujeme výrazný pokles pohyblivosti v důsledku klesajícího náboje vesikul a jejich agregace, tedy jejich vzrůstající velikosti. Poukazujeme také na nestabilitu vesikul v intervalu pH 5–6, v tomto rozmezí pH mají pohyblivosti podstatně vyšší směrodatnou odchylku (6 %) v porovnání s pohyblivostmi v jiných oblastech pH.

Závislost na iontové síle vykazuje strmý pokles při bazickém pH, který je pravděpodobně způsoben vznikající iontovou atmosférou a sorpcí protiontů lithia do polyelektrolytového brushe, a tak odstíněním náboje brushe. Tento strmý pokles nepozorujeme v kyselém pH, jelikož sorpce protiiontů do brushe závisí na povrchovém náboji vesikul, který je při v kyselém pH výrazně nižší. Získané výsledky byly srovnány s chováním malých molekul, abychom poukázali na odlišnosti jednotlivých systémů.

Pohyblivost vesikul při pH 3,68 se nemění s časem, vesikuly se tedy v tomto pH stabilizují velmi rychle a následně se jejich tvar ani velikost nemění. Při pH 6,69 pohyblivost s časem roste, ale proplach kapiláry hydroxidem sodný toto chování výrazně mění. Tyto výsledky korelují s předchozím předpokladem, že vesikuly jsou v této oblasti pH nestabilní.

CZE je tedy vhodnou metodou ke studiu chování vesikul. Výsledky CZE velmi dobře korelují s měřeními dynamického rozptylu světla. Abychom byly schopni všechny popsané jevy spolehlivě vysvětlit, budou závěry ověřeny ještě pomocí měření ζ -potenciálu.

Citovaná literatura

1. Štulík, K. a kolektiv: *Analytické separační metody*. Praha, Karolinum 2005.
2. Opekar, F. a kolektiv: *Základní analytická chemie*. Praha, Karolinum 2005.
3. Kašička, V.: *Chem. listy* **91**, 320 (1997).
4. Copper, C.L.: *J. Chem. Educ.* **75**, 343 (1998).
5. Mosher, R.A.; Saville, D.A.; Thormann, W.: *The Dynamics of Electrophoresis*. Weinheim, New York, VCH 1992.
6. Pacáková, V.; Coufal, P.; Štulík, K.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **24**, 1883 (2003).
7. Silva, M.: *Electrophoresis* **28**, 174 (2007).
8. Horvath, J.; Dolník, V.: *Electrophoresis* **22**, 644 (2001).
9. Melanson, J.E.; Baryla, N.E.; Lusy, C.A.: *Trends Anal. Chem.* **20**, 365 (2001).
10. Gaš, B.; Zuska, J.; Coufal, P.; van de Goor, T.: *Electrophoresis* **23**, 3520 (2002).
11. Williams, B.; Vigh, G.: *Anal. Chem.* **68**, 1174 (1996).
12. Williams, B.; Vigh, G.: *Anal. Chem.* **69**, 4445 (1997).
13. Zusková, I.; Novotná, A.; Včeláková, K.; Gaš, B.: *J. Chromatogr. B* **841**, 129 (2006).
14. Včeláková, K.; Zusková, I.; Kenndler, E.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **25**, 309 (2004).
15. Gluck, S.J.; Cleveland, J.A.: *J. Chromatogr.* **680**, 43 (1994).
16. Cleveland, J.A.; Benko, M.H.; Gluck, S.J.; Walbroehl, Y.M.: *J. Chromatogr. A* **652**, 301 (1993).
17. Koval, D.; Kašička, V.; Zusková, I.: *Electrophoresis* **26**, 3221 (2005).
18. Zusková, I.: *Přednášky z Fyzikální chemie II*, str. 26.
19. *Chem. listy* **84**, 843–861 (1990) Dostpné z URL: <<http://www.chemicke-listy.cz/download/chl84-843/chl84-843.htm>> [cit. 29.4.2012].
20. Hamley, I.W.: *The Physics of block copolymers*. Oxford, Oxford University Press 1998.
21. Jenkins, A.D.; Kratochvíl, P.; Stepto, R.F.T.; Suter, U.W.: *Pure Appl. Chem.* **68**, 2287 (1996).
22. Munk, P.; Aminabhavi, T.M.: *Introduction to Macromolecular Science*. 2. vydání New York, Wiley-Interscience 2002.
23. Vollmert, B.: *Polymer Chemistry*. New York, Springer-Verlag-NY 1973.
24. Bates, F.S.; Fredrickson, G.H.: *Phys. Today* **52**, 32 (1999).
25. Stephenson, B.; Kenneth, B.; Blankschtein, D.: *Langmuir* **22**, 1500 (2006).
26. Rosenberg, E.; Ron, E.Z.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 154 (1999).

27. Desai, J.D.; Banat, I.M.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 47 (1997).
28. Makkar, R.S.; Rockne, K.J.: *Environ. Toxicol. Chem.* **22**, 2280 (2003).
29. Banat, I.M.; Makkar, R.S.; Cameotra, S.S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 495 (2000).
30. Dutkiewicz, E.; Jakubowska, A.: *Colloid Polym. Sci.* **280**, 1009 (2002).
31. Mrestani, Y.; Marestani, Z.; Neubert, R.H.H.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **26**, 883 (2001).
32. Mrestani, Y.; Claussen, S.; Neubert, R.H.H.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30** 869 (2002).
33. Bronich, T.K.; Kabanov, A.V.; Kabanov, V.A.; Eisenberg, A.; Yu, K.: *Macromolecules* **30**, 3519 (1997).
34. Jacquies, J.-C.; Gorelov, A.V.; McLoughlin, D.M.; Dawson, K.A.: *J. Chromatogr. A* **817**, 263 (1998).
35. Štěpánek, M.; Matějček, P.; Procházka, K.; Filippov, S.K.; Angelov, B.; Šlouf, M.; Mountrichas, G.; Pispas, S.: *Langmuir* **27**, 5275 (2011).
36. Avranas, A.; Tasopoulos, V.: *J. Colloid Interface Sci.* **221**, 223 (2000).
37. Berret, J.-F.; Hervé, P.; Aguerre-Chariol, O.; Oberdisse, J.: *J. Phys. Chem. B* **107**, 8111 (2003).
38. Kabanov, A.V.; Kabanov, V.A.: *Adv. Drug Delivery Rev.* **30**, 49 (1998).
39. Holappa, S.; Anderson, T.; Kantonen, L.; Plattner, P.; Tenhu, H.: *Polymer* **44**, 7907 (2003).
40. Macknight, W.J.; Ponomarenko, E.A.; Tirrel, D.A.: *Acc. Chem. Res.* **31**, 781 (1998).
41. Busch, M.H.A.; Carels, L.B.; Boelens, H.F.M.; Kraak, J.C.; Poppe H.: *J. Chromatogr. A* **777**, 311 (1997).
42. Rundlett, K.L.; Armstrong, D.W.: *Electrophoresis* **22**, 1419 (2001).
43. Tanaka, Y.; Terabe, S.: *J. Chromatogr.* **768**, 81 (2002).
44. Jiang, Ch.; Armstrong, D.W.: *Electrophoresis* **31**, 17 (2010).
45. Discher, D.E.; Eisenberg, A.: *Science* **297**, 967 (2002).
46. Tanner, P.; Baumann, P.; Enea, R.; Onaca, O.; Palivan, C.; Meier, W.: *Acc. Chem. Res.* **44**, 1039 (2011).
47. Polymer Vesicle. Dostupné z URL: <http://www.medscape.com/viewarticle/734055_6> [cit. 20.2.2012].
48. Graff, A.; Sauer, M.; Van Gelder, P.; Meier, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 5064 (2002).
49. Choucair, A.; Lavigueur, C.; Eisenberg, A.: *Langmuir* **20**, 3894 (2004).
50. Zhang, L.; Eisenberg, A.: *Science* **268**, 1728 (1995).
51. Luo, L.; Eisenberg, A.: *Langmuir* **17**, 6804 (2001).

52. Shen, H.; Eisenberg, A.: *J. Phys. Chem. B* **103**, 9473 (1999).
53. Discher, B.M.; Won, Y.-Y.; Ege, D.S.; Lee, J.C.-M.; Bates, F.S.; Discher, D.E.; Hammer, D.A.: *Science* **284**, 1143 (1999).
54. Šlouf, M.; Lapčíková, M.; Štěpánek, M.: *Eur. Polym. J.* **47**, 1273 (2011).
55. Shen, H.; Zhang, L.; Eisenberg, A.: *J. Phys. Chem. B* **101**, 4697 (1997).
56. Azzam, T.; Eisenberg, A.: *Langmuir* **26**, 10513 (2010).
57. Currie, E.P.K.; Sieval, A.B.; Fleer, G.J.; Cohen Stuart, M.A.: *Langmuir* **16**, 8324 (2000).
58. Zhulina, E.B.; Borisov, O.V.: *Langmuir* **27**, 10615 (2011).
59. Zhulina, E.B.; Klein Wolterink, J.; Borisov, O.V.: *Macromolecules* **33**, 4945 (2000).
60. Misra, S.; Varanasi, S.; Varanasi, P.P.: *Macromolecules* **22**, 4173 (1989).
61. Dynamický rozptyl světla. Dostupné z URL: <<http://www.xray.cz/ns/dls.htm>> [cit. 1.5.2012].
62. Štěpánek, M.: *Návody k praktickým úlohám – Experimentální metody fyzikální a makromolekulární chemie*.
63. Hydrodynamický poloměr. Dostupné z URL: <<http://www.silver-colloids.com/Papers/hydrodynamic-radius.pdf>> [cit. 1.5.2012].
64. Karlík, M.: *Úvod do transmisní elektronové mikroskopie*, Praha, ČVUT 2011.
65. Mountrichas, G.; Pispas, S.: *J. Polym. Sci. Part A* **45**, 5790 (2007).
66. Katayama, H.; Ishihama, Y.; Asakawa, N.: *Anal. Chem.* **70**, 5272 (1998).
67. PeakMaster 5.3. Dostupné z URL: <<http://www.natur.cuni.cz/~gas>> [cit. 10.3.2012].
68. Evenhuis, C.J.; Hruška, V.; Guijt, R.; Macka, M.; Gaš, B.; Marriott, P.J.; Haddad, P.R.: *Electrophoresis* **28**, 3759 (2007).