

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Chemie



Amálie Dvořáková

CHARAKTERIZACE NANOKRYSTALŮ KURKUMINU
V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE

Characterization of curcumin nanocrystals
in capillary electrophoresis

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2024

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 je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 23. května 2024.

Amálie Dvořáková

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá charakterizací nanokrystalů kurkuminu pomocí kapilární elektroforézy s UV-VIS a laserem indukovanou fluorescenční (LIF) detekcí.

Kurkumin je přírodní polyfenolická látka s mnoha biologickými účinky. Nízká rozpustnost kurkuminu je jedním z hlavních faktorů jeho nízké biologické dostupnosti, kterou je ale možné zvýšit přípravou nanokrystalů kurkuminu.

V experimentální části byly zkoumány vlivy složení základního elektrolytu a vkládaného napětí na nanokrystalu kurkuminu. Základní elektrolyty byly připraveny z kyseliny fosforečné, nebo HEPES a jejich pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 pomocí NaOH, nebo TRIS, aby bylo otestováno, zda je tvar píku ovlivněn iontovou silou základního elektrolytu, a ne vlivem rostoucí koncentrace konkrétní složky BGE. Prvotní experimenty nezahrnovaly vkládání napětí, ale pouze tlak 50 mbar. Dále bylo vkládáno kladné i záporné napětí, přičemž byl použit 10mM fosfátový pufr, jehož pH bylo upraveno pomocí TRIS. Většina experimentů byla prováděna se vzorkem 100nm nanokrystalů kurkuminu.

Nanokrystalu kurkuminu poskytovaly abnormálně široký pík v UV-VIS i LIF detekci. Bylo zjištěno, že disperze zóny nanokrystalů nebyla způsobena difúzí a že k rozmývání zón dochází vlivem parabolického profilu toku při aplikaci tlaku. Dále bylo zjištěno, že se zvyšující se iontovou silou klesá výška píku, k čemuž dochází pravděpodobně kvůli agregaci nanokrystalů do větších celků, které se v experimentálním záznamu projevují jako extrémně úzké a vysoké píky. K tomuto jevu docházelo u všech testovaných pufrů zhruba při stejných hodnotách iontové síly. Následně byl experimentem, ve kterém probíhal posun zóny nanokrystalů vůči neutrálnímu markeru při různě dlouhé době vkládání kladného a záporného napětí, potvrzen záporný povrchový náboj nanokrystalů a jejich migrace směrem k anodě. Byl zkoumán i vliv velikosti nanokrystalů, přičemž bylo zjištěno, že s rostoucí velikostí částic dochází k většímu rozmývání zón vlivem parabolického profilu toku a také klesá intenzita signálu nanokrystalů.

Klíčová slova

Kurkumin, kapilární elektroforéza, UV-VIS detekce, LIF detekce, nanokrystalu kurkuminu

Abstract

This Bachelor thesis deals with the characterization of curcumin nanocrystals using capillary electrophoresis with UV-VIS and laser-induced fluorescence (LIF) detection.

Curcumin is a natural polyphenolic substance with many biological effects. Its low solubility is one of the main reasons for its low bioavailability, however, it can be increased by preparing curcumin nanocrystals.

In the experimental part, the effects of the composition of the background electrolyte (BGE) and the applied voltage on the curcumin nanocrystals were investigated. Background electrolytes were prepared using phosphoric acid, or HEPES and their pH was adjusted to 7.0 by NaOH, or TRIS, to test whether the shape of the peak is influenced by the ionic strength of BGE and not by the increasing concentration of a particular BGE component. Initial experiments did not involve voltage application, but only a pressure of 50 mbar. In following experiments both positive and negative voltages were applied, using a 10mM phosphate buffer, the pH of which was adjusted using TRIS. Most of the experiments were conducted using a 100nm curcumin nanocrystals sample.

Curcumin nanocrystals provided an abnormally wide peak in both UV-VIS and LIF detection. It was found that the dispersion of the nanocrystal zone was not caused by diffusion, and that the blurring of zones occurs due to parabolic flow profile when pressure is applied. Furthermore, peak height was found to decrease with increasing ionic strength, which is likely due to the aggregation of nanocrystals into larger units, which are shown as extremely narrow and high peaks in experimental record. This phenomenon occurred for all buffers tested at roughly the same ionic strength values. Subsequently, the negative surface charge of nanocrystals and their migration towards the anode were confirmed by an experiment in which the zone of nanocrystals moved towards the neutral marker at different times of positive and negative voltage application. The impact of nanocrystal size has also been studied, where increase in particle size resulted in greater blurring of zones due to parabolic flow profile, as well as decreasing signal intensity of nanocrystals.

Keywords

Curcumin, capillary electrophoresis, UV-VIS detection, LIF detection, curcumin nanocrystals

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost a odbornou pomoc při vypracování této bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Stanislavu Chvílovi ze skupiny prof. Františka Štěpánka z Ústavu chemického inženýrství VŠCHT za poskytnutí suspenzí nanokrystalů kurkuminu.

Práce vznikla za podpory programu CEEPUS (Central European Exchange Program for University Studies), síť RO-0010 – Teaching and Learning Bioanalysis.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	- 7 -
1 CÍL PRÁCE.....	- 9 -
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	- 10 -
2.1 KURKUMIN	- 10 -
2.1.1 Obecné informace.....	- 10 -
2.1.2 Struktura a vlastnosti kurkuminu.....	- 10 -
2.1.3 Nanokrystaly kurkuminu.....	- 12 -
2.1.3.1 Příprava nanokrystalů kurkuminu	- 13 -
2.1.3.2 Analýza a charakterizace nanokrystalů kurkuminu.....	- 14 -
2.2 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA	- 15 -
2.2.1 Elektroosmotický tok	- 15 -
2.2.2 Metody kapilární elektroforézy	- 15 -
2.2.3 Experimentální uspořádání.....	- 16 -
2.2.4 Nanočástice v kapilární elektroforéze	- 17 -
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 19 -
3.1 Použité chemikálie a instrumentace	- 19 -
3.1.1 Chemikálie	- 19 -
3.1.2 Instrumentace	- 19 -
3.2 Experimentální podmínky	- 20 -
3.3 Příprava suspenze nanokrystalů kurkuminu.....	- 21 -
3.4 Příprava vzorku a roztoků základních elektrolytů.....	- 22 -
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	- 23 -
4.1 Základní experiment.....	- 23 -
4.2 Příčina rozšiřování píku	- 24 -
4.2.1 Časová prodleva	- 24 -
4.2.2 Dráha v kapiláře	- 25 -
4.3 Vliv iontové síly	- 27 -
4.4 Vkládání kladného a záporného napětí	- 28 -
4.5 Posun vůči neutrálnímu markeru.....	- 29 -
4.6 Vliv velikosti nanokrystalů	- 30 -
5 ZÁVĚR.....	- 32 -
6 LITERATURA.....	- 33 -

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

BGE	základní elektrolyt (<i>background electrolyte</i>)
CE	kapilární elektroforéza (<i>capillary electrophoresis</i>)
CE-LIF	kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (<i>capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence</i>)
CE-UV/VIS	kapilární elektroforéza s detekcí v ultrafialové a viditelné oblasti záření (<i>capillary electrophoresis with UV/VIS detection</i>)
CEC	kapilární elektrochromatografie (<i>capillary electrochromatography</i>)
CGE	kapilární gelová elektroforéza (<i>capillary gel electrophoresis</i>)
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace (<i>capillary isoelectric focusing</i>)
CITP	kapilární izotachoforéza (<i>capillary isotachopheresis</i>)
CZE	kapilární zónová elektroforéza (<i>capillary zone electrophoresis</i>)
DLS	dynamický rozptyl světla (<i>dynamic light scattering</i>)
DMSO	dimethylsulfoxid (<i>dimethylsulfoxide</i>)
DPPC	dipalmitoylfosfatidylcholin (<i>dipalmitoylphosphatidylcholine</i>)
DPPG	dipalmitoylfosfatidylglycerol sodný (<i>sodium dipalmitoylphosphoglycerole</i>)
EOF	elektroosmotický tok (<i>electroosmotic flow</i>)
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanosulfonová kyselina (<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
HPH	vysokotlaková homogenizace (<i>high-pressure homogenization</i>)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie (<i>micellar electrokinetic chromatography</i>)
MEEKC	elektrokinetická chromatografie v mikroemulzi (<i>microemulsion electrokinetic chromatography</i>)
MPEG-2000-DMPE	sodná sůl N-(karbonyl-methoxypolyethylenglykol 2000)-1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolaminu (<i>N-(carbonyl-methoxypolyethylenglycol 2000)-1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanol-amine sodium salt</i>)
MS	hmotnostní spektrometrie (<i>mass spectrometry</i>)
NCs	nanokrystaly (<i>nanocrystals</i>)

SEM	skenovací elektronová mikroskopie (<i>scanning electron microscopy</i>)
SLS	statický rozptyl světla (<i>static light scattering</i>)
TEM	transmisní elektronová mikroskopie (<i>transmission electron microscopy</i>)
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminometan (<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>)
XRD	rentgenová difrakce (<i>X-ray diffraction</i>)

1 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo prozkoumat možnosti charakterizace nanokrystalů kurkuminu pomocí kapilární elektroforézy s detekcí v UV-VIS (ultrafialové a viditelné) oblasti a s laserem indukovanou fluorescenční detekcí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 KURKUMIN

2.1.1 Obecné informace

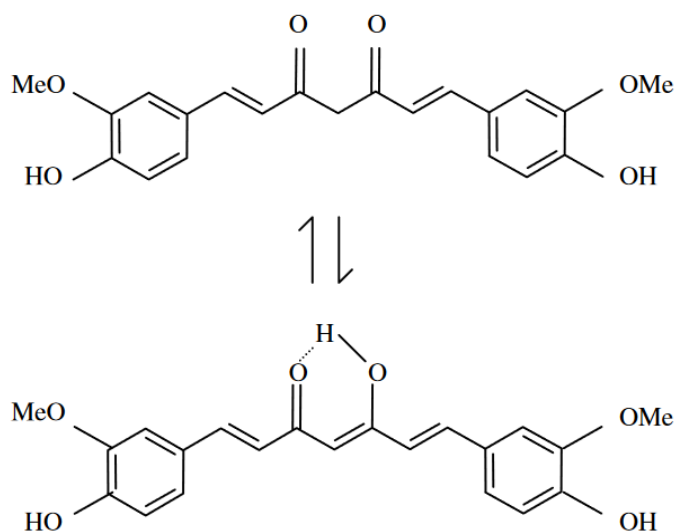
Kurkumin je přírodní látka, která se nachází v kořeni kurkumy (*Curcuma longa*; tumeric), rostliny původem z jižní Asie. Je to hlavní bioaktivní sloučenina kurkumy a odpovídá za většinu jejích biologických účinků [1]. Kurkumin propůjčuje kurkumě charakteristickou žlutou barvu a v praxi je využíván jako barvivo pod označením E100, které je součástí mnoha potravin a kořenících směsí [2]. Tato látka je součástí tradiční asijské kuchyně a byla dlouho používána pro své léčebné účinky v tradiční indické ajurvédské medicíně.

Kurkumin má mnoho různých biologických účinků, včetně silných antioxidantních vlastností, které pomáhají chránit organismus před poškozením volnými radikály a oxidačním stresem. Také má významné protizánětlivé účinky, které mohou pomáhat snižovat zánět v těle a přispívat k ochraně proti různým chorobám. Kurkumin se také projevil jako potenciálně užitečný v prevenci a léčbě různých onemocnění, včetně kardiovaskulárních chorob, neurodegenerativních onemocnění (jako je Alzheimerova choroba) a některých typů rakoviny [3].

2.1.2 Struktura a vlastnosti kurkuminu

Kurkumin je polyfenolická, symetrická molekula známá také jako diferuloylmethan. Chemická struktura kurkuminu je znázorněna na Obrázku 1. Název kurkuminu podle IUPAC je (1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)hepta-1,6-dien-3,5-dion a jeho molekulová hmotnost činí 368,38 g/mol. Má tři funkční skupiny ve své struktuře: dva aromatické kruhy obsahující *o*-methoxyfenolické skupiny, spojené sedmiuhlíkovým řetězcem skládajícím se z α,β -nenasyceného β -diketonového zbytku.

Diketonová skupina vykazuje keto-enol tautomerii, která může existovat v různých typech konformerů v závislosti na prostředí [4]. Bis-keto forma převládá v kyselých a neutrálních vodných roztocích a v buněčných membránách. Při pH 3-7 je kurkumin donorem vodíku. Naopak nad pH 8 převládá enol forma a kurkumin je donorem elektronů [3]. V krystalické formě existuje v cis-enolové konfiguraci, kde je stabilizován rezonanční vodíkovou vazbou a jeho struktura se skládá ze tří substituovaných planárních skupin propojených dvěma dvojnými vazbami [4].

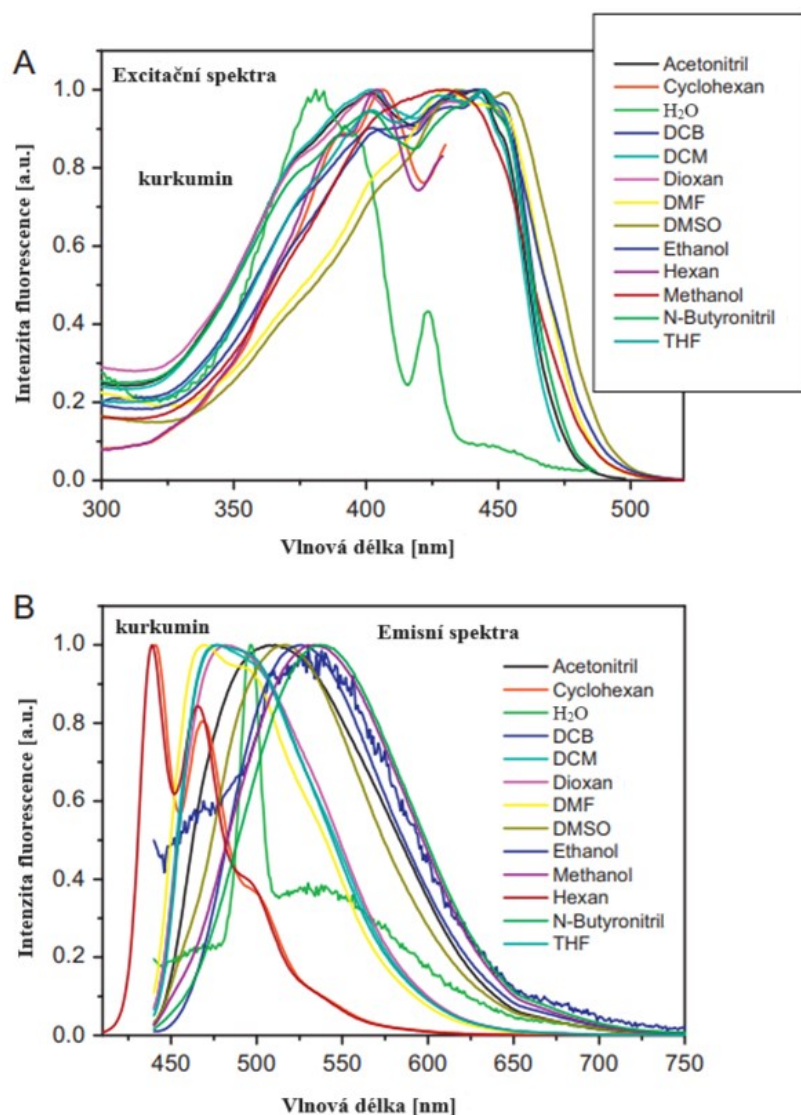


Obrázek 1 – Tautomerie kurkuminu za fyziologických podmínek – převzato z [3]

Kurkumin je prakticky nerozpustný ve vodě při kyselém nebo neutrálním pH, je však rozpustný v bazickém prostředí. Hodnoty pK_a pro disociaci tří kyselých protonů v kurkuminu byly stanoveny na 7,8; 8,5 a 9,0. V zásaditém prostředí, tedy když dochází k disociaci, se sloučenina rychle rozkládá hydrolýzou [5]. Degradačními produkty kurkuminu jsou například *trans*-6(4'-hydroxy-3'-methoxyfenyl)-2,4-dioxo-5-hexanal, ferulový aldehyd, ferulová kyselina, feruloylmethan a vanilin. Rozklad je významně omezen, když je kurkumin vázán na lipidy, liposomy, albuminy, cyklodextrin, cucurbituril, tenzidy, polymery a mnoho dalších makromolekulárních a mikroheterogenních systémů. Kurkumin se mnohem rychleji rozkládá při expozici slunečnímu světlu. Fotodegradace může být urychlena přítomností nanočástic TiO_2 [4].

Kurkumin je snadno rozpustný v polárních rozpouštědlech jako je například DMSO (dimethylsulfoxid), methanol, ethanol, acetonitril, chloroform, ethylacetát atd. Je málo rozpustný v uhlovodíkových rozpouštědlech jako je cyklohexan a hexan [4].

Kurkumin vykazuje solvatochromismus, což znamená, že se jeho fluorescence mění v závislosti na polaritě prostředí a vodíkových vazbách. Fluorescenční vlastnosti kurkuminu závisí také na pH rozpouštědla, obsahu solí a keto-enolové tautomerii. Díky těmto vlastnostem byl kurkumin dříve využíván ke studiu procesů v biologických systémech s cílem navrhnout nanonosiče léčivých látek a vyvinout biosenzory [6]. Na Obrázku 2 jsou znázorněna fluorescenční excitační a emisní spektra kurkuminu v rozpouštědlech s rozdílnou polaritou.



Obrázek 2 – Normalizované fluorescenční excitační (A) a emisní (B) spektrum kurkuminu v rozpouštědlech s rozdílnou polaritou – převzato z publikace [7] a upraveno

2.1.3 Nanokrystaly kurkuminu

I přes své slibné léčebné vlastnosti má kurkumin několik omezení, která brání jeho širokému klinickému využití. Perorální podání 10-12 mg kurkuminu vykazalo u lidí hladinu kurkuminu v krevním séru přibližně 50 ng/ml, což poukazuje na minimální dostupnost kurkuminu v krevním oběhu pro dosažení jeho léčebných účinků [8, 9].

Nízká biologická dostupnost kurkuminu je především způsobena třemi faktory: nízkou rozpustností ve vodě, špatnou absorpcí v trávicím traktu a rozsáhlou metabolickou přeměnou molekuly [10]. Rozpustnost kurkuminu ve vodném pufru o pH 5,0 je 11 ng/ml [5], což ukazuje, že je nemožné připravit vodný roztok kurkuminu pro intravenózní použití

[11]. Hlavním faktorem přispívajícím ke špatné absorpci kurkuminu je jeho lipofilní povaha. I když vysoce lipofilní povaha kurkuminu brání jeho rozpustnosti ve vodě, stále umožňuje kurkuminu překonat hematoencefalickou bariéru. Bylo prokázáno, že kurkumin je po perorálním podání detekovatelný v mozku a léčba kurkuminem u myši na modelu Alzheimerovy choroby vedla k významnému zlepšení kognitivních funkcí.

Častou metodou pro zvýšení vstřebatelnosti a biologické dostupnosti kurkuminu je jeho enkapsulace do liposomů. Liposomy jsou kulové dvouvrstvé vezikuly, které chrání hydrofobní sloučeniny (jako je kurkumin) a interagují s vodným prostředím pro zlepšení jejich rozpustnosti. Liposomální systém je ideální pro lipofilní charakteristiky kurkuminu, kde je kurkumin uvězněn v lipofilní membráně [10].

Biologickou dostupnost kurkuminu je možné zvýšit také přípravou nanokrystalů, které mají zvýšenou rozpustnost a stabilitu a mohou mít potenciál zlepšit terapeutické účinky této sloučeniny [3]. Kurkumin i nanokurkumin mají stejnou chemickou strukturu [12]. Nanokrystalické léky mají vyšší rozpustnost díky větší specifické povrchové ploše, která přichází do styku s rozpouštědlem. Vývoj úspěšné formulace nanokrystalů závisí na procesu stabilizace. Krystalizace kurkuminu je časově závislý proces, který trvá 90 minut ve směsi alkoholu a vody. Po 90 minutách začnou krystaly kurkuminu agregovat a tvořit precipitát. Tenzidy, včetně dodecylsulfátu sodného, cetyltrimethylamonium bromidu, Tweenu 80, Tritonu X-100 a polymerů typu Pluronic, mohou vytvářet micely a poskytnout potřebnou stabilizaci molekul kurkuminu, čímž lze předejít agregaci částic [8, 12].

Suspence nanokrystalů (nanosuspence) je systém obsahující pouze čisté krystaly léčiva a minimální množství tenzidů (surfaktantů) a/nebo polymerů pro stabilizaci, bez dalších nosičů nebo nosných částic [11]. Pomocí vhodné povrchové stabilizace je možné vytvořit koloidně stabilní nanosuspenci, která zvyšuje bioaktivitu běžné přírodní sloučeniny na úroveň srovnatelnou s klinicky schválenými cytostatiky [6]. Navíc nanosuspence může chránit zachycená léčiva před degradací, hydrolýzou a oxidací, může cílit na infekční místa, prodloužit dobu cirkulace v těle a snížit toxicitu a nežádoucí účinky způsobené některými tenzidy, organickými rozpouštědly nebo polymery [11].

2.1.3.1 Příprava nanokrystalů kurkuminu

Nejpoužívanější výrobní metody pro nanokrystaly kurkuminu jsou mletí v kuličkovém mlýně a vysokotlaká homogenizace (HPH; high-pressure homogenization) [13]. Nanokrystaly pro farmaceutické využití jsou obvykle připravovány metodami srážení

nebo mokrého mletí [6]. Poslední zmíněnou metodou byly připraveny nanokrystaly použité v této práci, proto bude následovat stručný popis jejího principu.

Mokré mletí je efektivní metodou pro vytváření nanočástic. Je založené na zmenšování velikosti částic dané látky suspendované ve vhodném disperzním rozpouštědle [14]. Pro mletí je přidáváno inertní, netoxické mlecí médium, jako je například pryskyřice, sklo nebo stabilizovaný oxid zirkoničitý. Často jsou přidávány i povrchově aktivní látky nebo disperzanty. Směs cirkuluje přes mlecí komoru, dokud nedosáhne požadované velikosti částic. Výsledkem je nanosuspenze dané látky či léčiva [15].

Pro zachování nanorozměrů finálního produktu a zabránění nechtěné rekrystalizace je zásadní přidání stabilizačních látek. Aplikace stabilizátorů ve formě tenzidů nebo polymerních povlaků je také nezbytná kvůli odolnosti v náročném prostředí lidského organismu. Stabilizace nanokrystalů je obvykle založena na elektrostatické repulzi nebo stericím bránění. Vhodný stabilizátor by neměl poskytovat pouze koloidní stabilitu nanokrystalů, ale měl by také ovlivnit rychlost rozpouštění léčivé látky. Jedna ze slibných strategií stabilizace nanokrystalů jsou fosfolipidy, které jsou známy svou skvělou biokompatibilitou [6].

2.1.3.2 Analýza a charakterizace nanokrystalů kurkuminu

Nanokrystaly kurkuminu mohou být charakterizovány různými analytickými technikami, jako je kapilární elektroforéza (CE), UV-VIS spektroskopie, fluorescenční spektroskopie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), hmotnostní spektrometrie (MS) [16], dynamický a statický rozptyl světla (DLS a SLS), skenovací elektronová mikroskopie (SEM), transmisní elektronová mikroskopie (TEM) a rentgenová difrakce (XRD) [6], které umožňují detailní zkoumání struktury, velikosti, distribuce a dalších vlastností nanokrystalů kurkuminu, což je důležité pro pochopení jejich biologické aktivity a účinků. V této práci byly zkoumány možnosti charakterizace nanokrystalů v CE.

2.2 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA

Kapilární elektroforéza (CE; capillary electrophoresis) je analytická metoda, která umožňuje separaci nabitých částic na základě jejich elektroforetické mobility (pohyblivosti) pomocí aplikovaného napětí v prostředí základního elektrolytu (background electrolyte; BGE) [17]. Elektroforetická mobilita závisí na náboji, velikosti dané částice a viskozitě roztoku [18]. Rychlost, kterou se částice pohybuje, je přímo úměrná intenzitě elektrického pole a náboji částice, nepřímo úměrná hydratovanému poloměru částice a viskozitě roztoku. Nenabitě částice nejsou ovlivněny elektrickým polem [17].

2.2.1 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF; electroosmotic flow) je způsoben aplikací vysokého napětí na kapiláru naplněnou elektrolytem. Křemenné kapiláry mají na svém povrchu siloxanové skupiny, které v přítomnosti vody hydrolyzují za vzniku silanolových skupin. Pokud má pufr protékající křemennou kapilárou pH vyšší než 3, silanolové skupiny disociují a vnitřní stěna kapiláry získá záporný náboj [17], kterým jsou přitahovány kationty, což vede k vytvoření elektrické dvojvrstvy. Kationty adsorbované na vnitřní stěnu kapiláry tvoří stacionární část, zatímco difúzní vrstva se může volně pohybovat podél kapiláry. Vzniklý elektrický potenciál mezi stacionární a difúzní vrstvou se nazývá zeta potenciál (elektrokinetický potenciál) [18]. V přítomnosti aplikovaného elektrického pole migruje difúzní vrstva směrem ke katodě, čímž vytváří EOF. Protože elektroforetická mobilita aniontů je často menší než mobilita EOF, negativní částice jsou také strhávány EOF směrem ke katodě a mohou projít detektorem, i když jejich vlastní mobilita směřuje k anodě. To neplatí u velmi rychlých anorganických aniontů, jejichž mobilita je srovnatelná nebo vyšší než mobilita EOF. Mobilita EOF je přímo úměrná velikosti zeta potenciálu a nepřímo úměrná viskozitě roztoku. Nejrychlejší EOF je s pufrem o pH zhruba 9, kdy jsou všechny silanolové skupiny ionizovány [17].

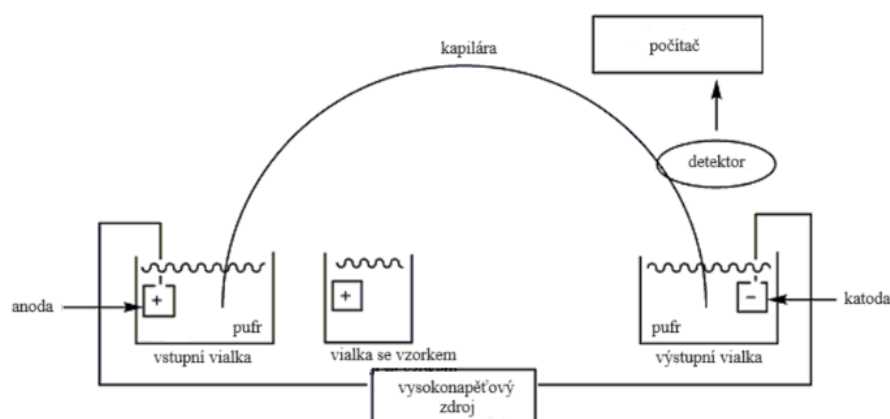
2.2.2 Metody kapilární elektroforézy

Různé varianty kapilární elektroforézy zahrnují kapilární zónovou elektroforézu (CZE), kapilární gelovou elektroforézu (CGE), micelární elektrokinetickou kapilární chromatografii (MEKC), elektrokinetickou chromatografii v mikroemulzi (MEEKC), kapilární elektrochromatografii (CEC), kapilární izoelektrickou fokusaci (CIEF) a kapilární izotachoforézu (CITP) [19].

Nejjednodušší elektroforetickou metodou je kapilární zónová elektroforéza (CZE; capillary zone electrophoresis), ve které separace probíhá výhradně na základě rozdílů v elektroforetických mobilitách. Optimalizace této metody zahrnuje především výběr složení základního elektrolytu, jehož pH ovlivňuje disociaci [18] a elektroosmotický tok (EOF) a pokud se jedná o slabé elektrolyty tak má výběr pH elektrolytu vliv i na mobilitu analytů. Kromě toho se optimalizuje iontová síla základního elektrolytu, rozměry kapiláry a aplikované napětí.

2.2.3 Experimentální uspořádání

Základní experimentální uspořádání pro kapilární elektroforézu je zobrazeno na Obrázku 3. Oba konce křemenné kapiláry jsou umístěny do elektrodových nádobek, které jsou naplněny základním elektrolytem, stejně jako samotná kapilára. Vnitřní průměr křemenné kapiláry se obvykle pohybuje mezi 25 až 100 μm [19] a délka kapiláry je většinou v rozsahu 30-80 cm [18].



Obrázek 3 – Schématické znázornění základního uspořádání kapilární elektroforézy – převzato z publikace [19]

Prostor kapilár může být termostatován pro zajištění reprodukovatelných výsledků. Udržení stálé teploty je důležité kvůli závislosti elektroforetické mobility analytů na viskozitě roztoku, která klesá s rostoucí teplotou kolony [17]. Kapilární formát separačního prostoru umožňuje efektivní odvod Jouleova tepla, což umožňuje použití vysokých intenzit elektrického pole, a tím i dosažení vysokých účinností a rychlostí separace. Miniaturizace separačního prostoru je také důležitým faktorem pro dosažení vysoké citlivosti [18].

Vzorek je nejčastěji dávkován pomocí natlakování vstupní nádoby. Po zavedení zóny vzorku do kapiláry je konec kapiláry obsahující vzorek ponořen zpět do elektrodové nádoby a k systému je připojeno stejnosměrné napětí (až 30 kV) [18]. Po aplikaci napětí

na elektrody vzniká elektrické pole, které iniciuje migraci vzorku od anody ke katodě skrze kapilární trubici. Před zavedením vzorku do kolony musí být kapilára propláchnuta požadovaným roztokem základního elektrolytu [17].

Blízko katodického konce kapiláry se může nacházet malé okénko, které umožňuje průchod UV-VIS světla skrze zóny analytů a měření absorbance [17]. Získaný záznam časového průběhu absorpce se nazývá elektroforeogram, který umožňuje získat kvalitativní a kvantitativní informace o složení analyzovaného vzorku [18].

Kromě nejběžnějšího UV-VIS absorpčního detektoru je možné použít i fluorescenční detektory, radiometrické detektory pro radioaktivní látky, detektory laserem indukované fluorescence, konduktometrické detektory, elektrochemické detektory a hmotnostní spektrometry [19].

2.2.4 Nanočástice v kapilární elektroforéze

Dvě nejčastěji používané techniky kapilární elektroforézy pro separaci nanomateriálů jsou MEKC a CZE. U obou technik jsou koncentrace a pH použitých pufrů klíčové pro dosažení vysoké kvality separace a tvaru píků [20]. Kapilární elektromigrační metody jsou především separační metody. Umožňují frakcionaci disperzí podle rozdílů ve velikosti částic nebo podle rozdílů v zeta potenciálu [21]. Jednou z výhod použití CE je možnost spojení této techniky s různými detektory. UV detektor je nejběžnější detektor používaný při charakterizaci nanomateriálů [20].

Mechanismus separace nanočástic není tak přímočarý jako u tradičních molekulárních a iontových látek v CE, vnitřní hydrodynamické a elektroforetické vlastnosti nanočástic, před a po modifikaci povrchu, se ukázaly být efektivním nástrojem pro charakterizaci nanostruktur [22]. Existují různé způsoby klasifikování nanočástic, které zohledňují jejich fyzikálně-chemické vlastnosti (chemické složení, velikost, tvar, vnitřní struktura, modifikace povrchu, agregace, magnetická susceptibilita nebo optické vlastnosti) [23].

Elektroforetická migrace nanočástic je složitější než migrace typického solutu [22]. V elektrolytickém roztoku je známo, že nabitá částice je obklopena "iontovou atmosférou", která je difuzní částí elektrické dvojvrstvy [23]. U nabitých koloidních částic lze předpokládat, že dominantními silami mezi částicemi jsou odpuzivé síly způsobené elektrostatickou interakcí a přitažlivé síly způsobené Londonovými a Van der Waalsovými interakcemi [21].

Je tedy třeba zohlednit elektrostatickou sílu působící na nabitou částici externím polem; Stokesovo tření způsobené viskozitou okolního média; elektroforetickou retardaci způsobenou elektrostatickou silou působící na iontový oblak s opačným nábojem externího pole (pohyb kapaliny obklopující částici opačným směrem než částice) a relaxační efekt způsobený deformací iontového oblaku [21–23].

Deformace iontového oblaku může být způsobena vyšší koncentrací elektrolytických iontů. Tato deformace způsobí snížení odpudivé energie a ovlivňuje rychlost koagulace (elektroforetické agregace částic). Proto systém při zvyšování iontové síly základního elektrolytu přechází ze stabilizovaného systému s pomalou koagulací na systém nestabilní, kdy je koagulace rychlá. Tento efekt lze očekávat i v závislosti na intenzitě elektrického pole [21]. Iontová síla základního elektrolytu je tedy důležitým parametrem při optimalizaci každé metody využívající kapilární elektroforézu ve volném roztoku pro velikostně selektivní separaci nanočástic. [21]

Stanovení elektroforetické mobility, která závisí na koncentraci částic, umožňuje získat informace o zeta potenciálu a/nebo o velikosti částic [21].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a instrumentace

3.1.1 Chemikálie

- thiomocovina 99% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- hydroxid sodný 1 mol/l (Agilent Technologies, Santa Clara CA USA)
- HEPES (C₈H₁₈N₂O₄S) p. a. (Carl Roth, Karlsruhe, Německo)
- TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) ≥99,8% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- kyselina *o*-fosforečná 85% p. a. (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- hydrogenfosforečnan sodný p. a. (Lachema, Brno, Česká republika)
- dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- nanokrystalů kurkuminu Q01 (100 nm), Q03 (40 nm) a Q05 (400 nm)

3.1.2 Instrumentace

- kapilární elektroforéza 7100 s UV-VIS detekcí (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) a s laserem indukovanou fluorescenční detekcí Zetalif LED 480 nm (Picometrics, Francie)
- křemenná kapilára o délce 50,0 cm s vnitřním průměrem 50 μm (Polymicro Technologies, Phoenix, USA), efektivní délka pro UV-VIS detektor 41,5 cm a pro LIF detektor 29 cm
- pH metr 3540 pH & Conductivity Meter (Jenway, Velká Británie)
- analytické váhy Precisa 262 SMA-FR (Precisa Gravimetrics AG, Švýcarsko)
- ultrazvuková lázeň Elma S15 (Elmasonic, Německo)

3.2 Experimentální podmínky

Na začátku každé série měření byla kapilára promývána nejprve 1M hydroxidem sodným po dobu 10 minut a poté deionizovanou vodou také po dobu 10 minut. V rámci metody bylo nastaveno promývání kapiláry mezi jednotlivými měřeními, které opět zahrnovalo promytí kapiláry 1M hydroxidem sodným po dobu 5 minut. Následně byly vstupní konce kapiláry spolu s elektrodou ponořeny do vialky s deionizovanou vodou kvůli opláchnutí případných zbytků hydroxidu sodného, aby se nedostal žádný do vialky se vzorkem, protože v takovém případě docházelo k rozpouštění nanokrystalů, rozkladu kurkuminu a hnědnutí vzorku. Dále byla kapilára promývána ještě 2 minuty vodou do odpadní vialky, poté 1 minutu základním elektrolytem do odpadní vialky a 1 minutu základním elektrolytem do vialky se základním elektrolytem.

Když navzdory uvedeným opatřením došlo ke kontaminaci vialky se vzorkem hydroxidem sodným, nebo bylo na přístroji prováděno předtím jiné měření, tak byly vymontovány elektrody a promyty v ultrazvukové lázni 5 minut v ethanolu a následně 5 minut v deionizované vodě a byla připravena nová vialka se vzorkem.

Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 5 sekund. Prvotní experimenty nezahrnovaly vkládání napětí na elektrody, ale pouze tlak o velikosti 50 mbar, který byl aplikován po nadávkování vzorku na vstupním konci kapiláry. Byly připraveny čtyři základní elektrolyty skládající se z kyseliny fosforečné, nebo HEPES a jejich pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 pomocí NaOH, nebo TRIS. Jako vzorek byla pro většinu měření používána suspenze nanokrystalů o velikosti 100 nm. Měření byla provedena vždy alespoň dvakrát. Pro měření s vkládáním napětí byl používán základní elektrolyt připravený ředěním 50mM kyseliny fosforečné, jejíž pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 pomocí TRIS, na koncentraci 10 mM. Kazeta s kapilárou byla termostatována na 25 °C.

Elektroforeogramy pro UV-VIS detekci byly zaznamenávány při vlnových délkách 200, 214 a 254 nm, ale pro vyhodnocování byla použita vlnová délka 200 nm. Pro detekci pomocí LIF byly elektroforeogramy zaznamenávány při excitační vlnové délce 480 nm. Přístroj Zetalif LED obsahoval filtr, který propouštěl emisní záření o vlnové délce přibližně nad 505 nm a výsledný signál byl tedy součtem signálů emisního záření s vlnovou délkou vyšší než 505 nm.

3.3 Příprava suspenze nanokrystalů kurkuminu

Nanokrystaly kurkuminu byly připraveny Ing. Stanislavem Chvílou ze skupiny prof. Františka Štěpánka z Ústavu chemického inženýrství VŠCHT a jejich rozměry, zeta potenciál a doba mletí byly zaznamenány do Tabulky 1.

Vodné suspenze nanokrystalů pokrytých lipidy byly připraveny metodou mokrého mletí následujícím způsobem: 60 mg kurkuminu; 30,2 mg dipalmitoylfosfatidylcholinu (DPPC); 3,6 mg dipalmitoylfosfatidylglycerolu sodného (DPPG) a 6,2 mg MPEG-2000-DMPE bylo umístěno do 25ml tmavé skleněné vialky s 5 g mlecích kuliček ZrO₂ o velikosti 0,4–0,5 mm a 1 ml vody. Mletí probíhalo za pokojové teploty při 600 ot./min za použití magnetického míchadla (8 × 20 mm) po dobu 24 hodin v případě vzorku kurkuminu s nejmenšími částicemi, 3 hodiny pro hrubě mletý kurkumin a 12 hodin pro středně mletý kurkumin. Poté byla suspenze zpracována přidáním 2 ml deionizované vody, mícháním po dobu 2 minut pro dosažení homogenizace a následným odebráním pipetou z mlecích kuliček, čímž byla získána zásobní nanosuspenze s hmotnostní koncentrací přibližně 20 mg/ml.

Tabulka 1 – rozměry nanokrystalů kurkuminu, jejich zeta potenciál a doba mletí – převzato od Ing. Stanislava Chvíly z VŠCHT a upraveno

	velké NCs	střední NCs	malé NCs
střední velikost ^a [nm]	187 ± 162	87 ± 36	37 ± 10
střední velikost ^b [nm]	410 ± 251	129 ± 67	61 ± 35
zeta potenciál [mV]	-42,6 ± 5,3	-39,8 ± 5,0	-38,9 ± 4,5
doba mletí	3	12	24

^a střední velikost částic vztažená k jejich celkovému počtu

^b střední velikost částic vztažená k objemu částic

3.4 Příprava vzorku a roztoků základních elektrolytů

Vzorek byl naředěn smísením 5 μl nanosuspenze kurkuminu (Q01; 100 nm), 10 μl thiomocoviny (vodný roztok, 1 mg/ml) a 85 μl deionizované vody. Dále bylo připraveno několik roztoků základních elektrolytů, jejichž složení a vypočítaná iontová síla pomocí programu PeakMaster [24] byly zaznamenány do Tabulky 2.

Sodno-fosfátový pufr (5mM NaH_2PO_4 + 5mM Na_2HPO_4) byl připraven smísením 100mM zásobních roztoků NaH_2PO_4 a Na_2HPO_4 v objemovém poměru 1:1 a doředěním deionizovanou vodou. 200mM HEPES byl připraven rozpuštěním potřebné navážky v deionizované vodě, po čemž bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 7,0 přidáním potřebného množství 1M roztoku hydroxidu sodného. Následně byl připraven druhý 200mM roztok HEPES a jeho pH bylo upraveno na 7,0 pomocí pevného TRIS. Dále byl připraven 50mM fosfátový pufr smísením potřebného množství 85% kyseliny fosforečné s deionizovanou vodou, pH tohoto roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,0 pomocí pevného TRIS. Všechny tyto roztoky byly následně ředěny deionizovanou vodou na požadovanou iontovou sílu.

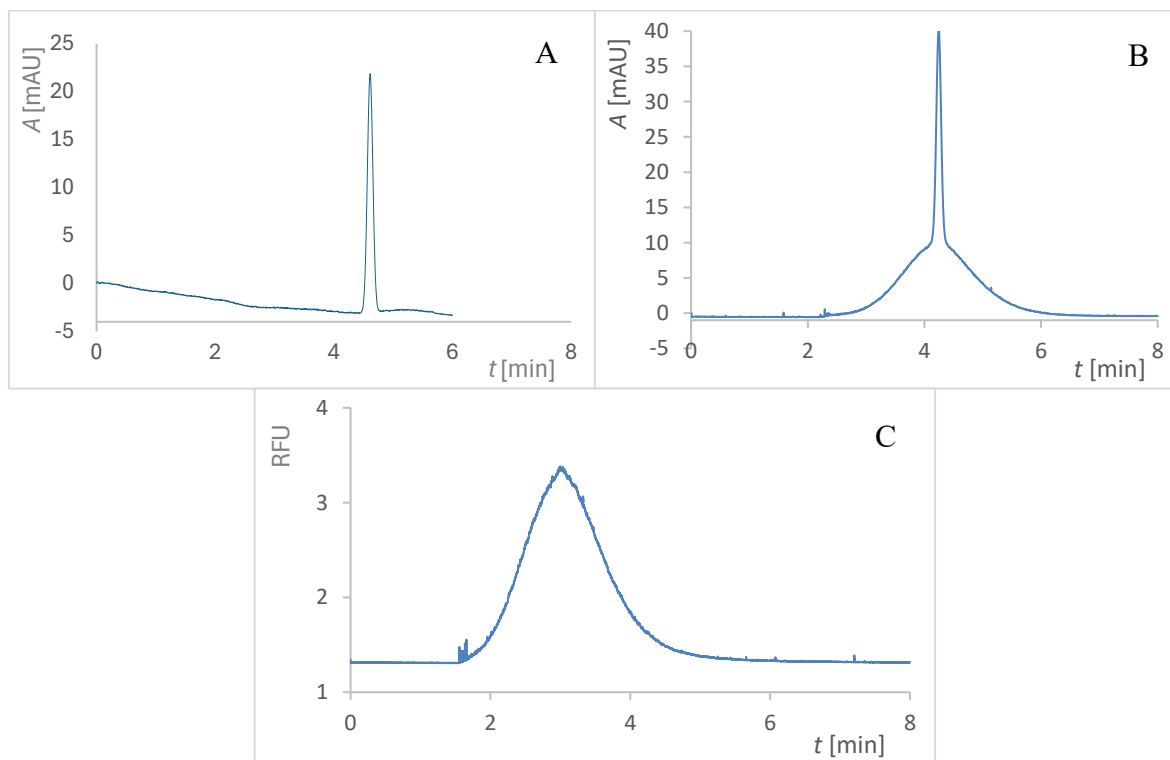
Tabulka 2 – Složení základních elektrolytů o pH 7 a jejich iontová síla

Pufující složka	c (mmol/l)	úprava na pH = 7,0	I (mmol/l)
HEPES	200	1M NaOH	56
HEPES	200	TRIS pevný	56
H_3PO_4	50	TRIS pevný	105
NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4	5 + 5	-	20

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Základní experiment

Při dávkování vzorku, který obsahuje nanokrystaly a thiomocovinu, do kapiláry naplněné fosfátovým pufrům o pH 7,0 a jeho průchodu detekčními okénky pouze za použití tlaku, poskytnou nanokrystaly v UV detektoru abnormálně široký pík (Obrázek 4B) v porovnání s thiomocovinou (Obrázek 4A). Nanokrystaly poskytují za těchto podmínek i velice široký pík ve fluorescenčním detektoru, což je vidět na Obrázku 4C. Zde se pík objevuje v kratším čase, protože dráha k detekčnímu okénku LIF je kratší než k okénku UV detektoru.



Obrázek 4 – Průchod vzorku detektory pouze za použití tlaku 50 mbar

A: pík thiomocoviny v UV detekci při vlnové délce 200 nm;

B: vzorek suspenze nanokrystalů s thiomocovinou v UV detekci při vlnové délce 200 nm;

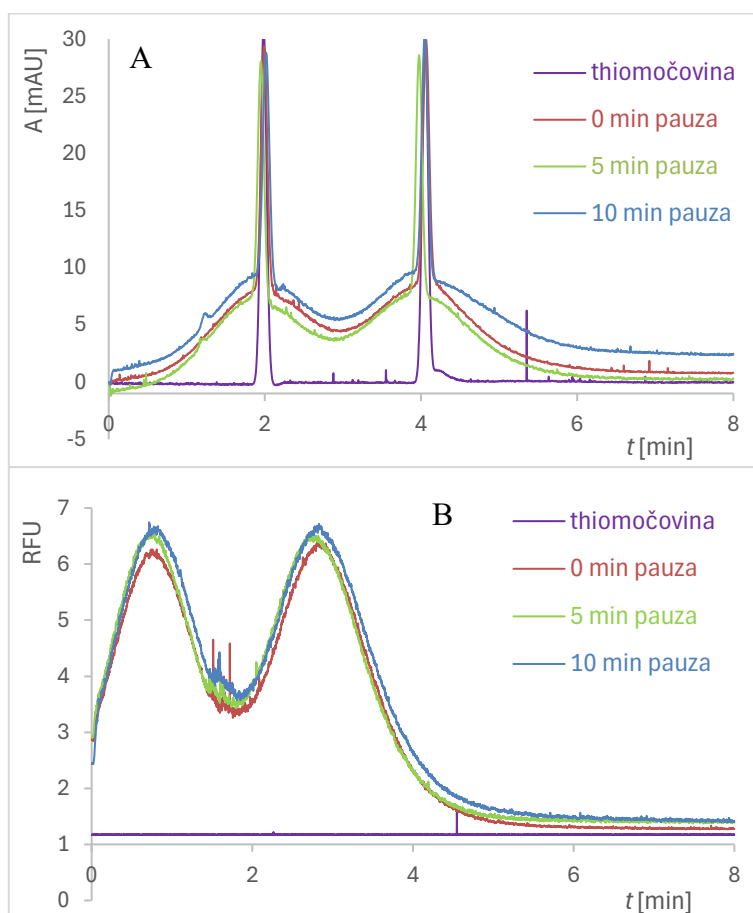
C: pík nanokrystalů v LIF detekci

4.2 Příčina rozšiřování píku

4.2.1 Časová prodleva

Jednou z hypotéz nabízejících možné vysvětlení abnormálně rozšířeného píku nanokrystalů byla zrychlená difúze způsobená elektrostatickou repulzí nanokrystalů, které mají dle hodnoty zeta-potenciálu (viz Tabulka 1) záporný povrchový náboj. Pro ověření této hypotézy byl proveden následující experiment.

Při tomto experimentu byla nadávkována jedna zóna vzorku (naředěná suspenze nanokrystalů s thiomocovinou) do kapiláry, poté byla udělána pauza a následně byla nadávkována druhá zóna vzorku a obě zóny byly tlakem rozpořhobovány, aby prošly detektorem. Z Obrázku 5 je zřejmé, že časová prodleva a prodloužený pobyt v kapiláře nemají vliv na rozšíření píků thiomocoviny a nanokrystalů. To znamená, že disperze zóny nanokrystalů není způsobena difúzí, a ani při stání v kapiláře se tato zóna významně nerozšiřuje.

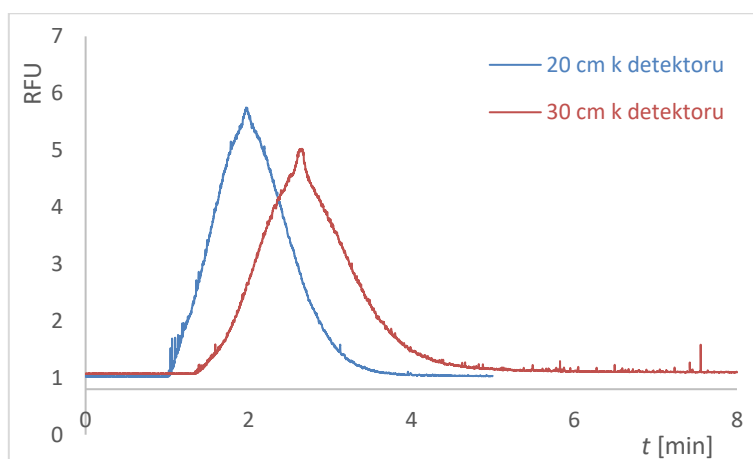


Obrázek 5 – Průchod dvou vzorků detektory pouze za použití tlaku 50 mbar s pauzou mezi dávkováním obou vzorků 0, 5 a 10 min, která vedla k prodlouženému pobytu prvního vzorku v kapiláře v UV detekci (A) a v LIF detektoru (B)

4.2.2 Dráha v kapiláře

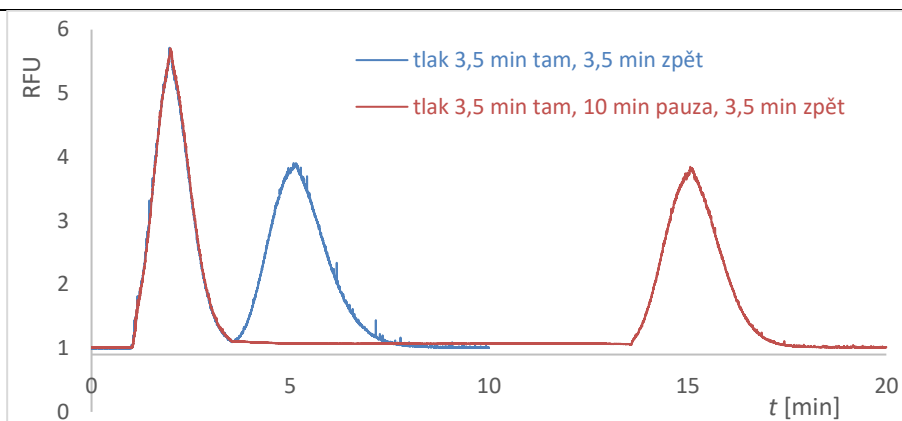
Další hypotézou bylo, že rozšíření zón nanokrystalů je způsobeno parabolickým rychlostním profilem tlakem poháněného toku v kapiláře, při kterém se částice uprostřed kapiláry pohybují rychleji než částice na jejím okraji. Čím jsou částice větší, tím pomaleji se pohybují napříč kapilárou a méně často přecházejí mezi oblastmi s rychlejším a pomalejším tokem. To způsobuje větší rozdíly v průměrné rychlosti pohybu jednotlivých částic, což vede k větší disperzi.

Tato hypotéza byla otestována experimenty, při kterých zóna nanokrystalů proházela k detektoru po různě dlouhé dráze. Porovnáním výsledků s různě dlouhou kapilárou (20 cm vs. 30 cm od vstupu k detektoru) lze pozorovat (viz Obrázek 6), že čím delší je dráha, kterou vzorek urazí, tím více je zóna rozmytá.



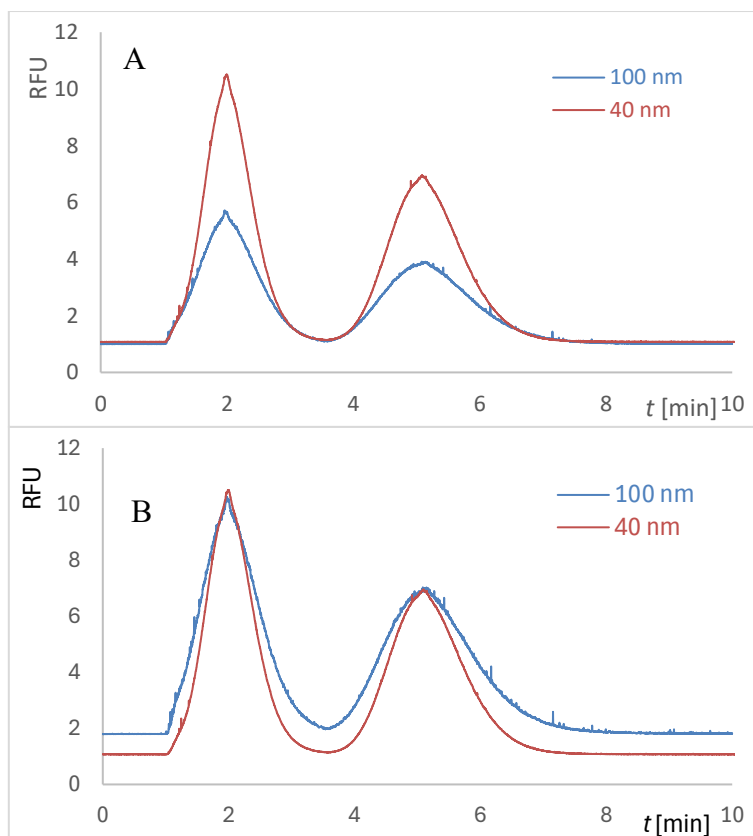
Obrázek 6 – Píky nanokrystalů kurkuminu po průchodu LIF detektorem vlivem tlaku 50 mbar při různé délce kapiláry

Pokud zóna nanokrystalů prochází detektorem jedním směrem, a poté se obrátí směr tlaku a zóna prochází detektorem zpět, druhý pík při zpětném průchodu je výrazně více rozmytý (viz Obrázek 7). Pokud je před zpětným tlakem zóna ponechána 10 minut stát v kapiláře, pík zůstane naprosto stejný.



Obrázek 7 – Prodloužení vzdálenosti, kterou zóna nanokrystalů urazí v kapiláře obrácením směru toku po prvním průchodu zóny detektorem s a bez pauzy před obrácením toku

S rostoucí velikostí částic se zóny nanokrystalů více rozmývají, což je patrné z experimentů s obrácením směru toku po 3,5 minutě (viz Obrázek 8).

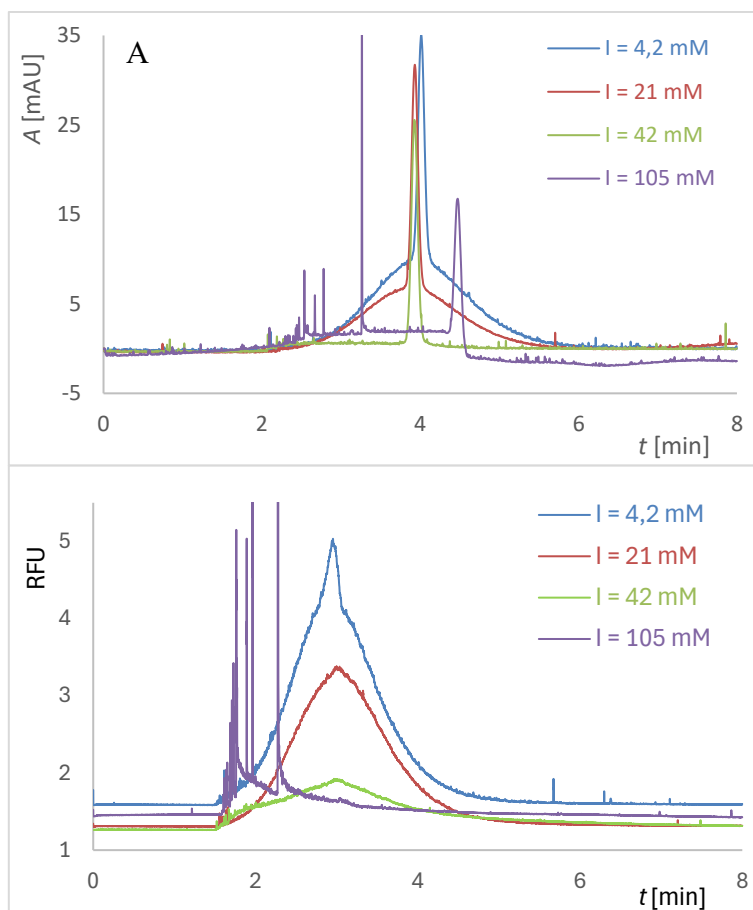


Obrázek 8 – Obrácení směru toku pro nanokrystalů s různou velikostí ukázáno ve shodném měřítku (A) a s normalizovanou odezvou detektoru (B)

Výsledky těchto experimentů potvrzují hypotézu, že k rozmývání zón nanokrystalů dochází vlivem parabolického profilu toku a nikoli difúzí nanokrystalů.

4.3 Vliv iontové síly

Při zvyšování koncentrace pufru, kterým je naplněna kapilára, se široký pík nanokrystalů postupně zmenšuje až mizí. Pravděpodobně dochází vlivem rostoucí iontové síly k odstínění vzájemné elektrostatické repulze nanokrystalů a vzniku větších agregátů, které se projevují jako velmi úzké píky v čase blízkém začátku širokého píku nanokrystalů (viz Obrázek 9).

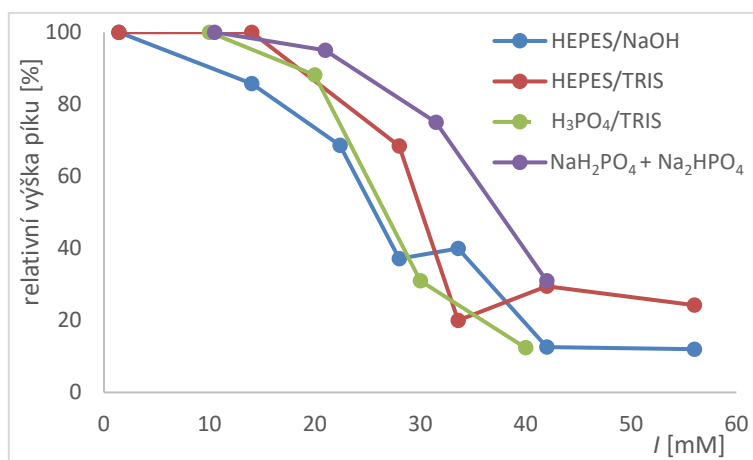


Obrázek 9 – 100nm nanokrystalý kurkuminu po průchodu detektory vlivem tlaku 50 mbar v 10mM H₃PO₄/TRIS o pH 7,0 při zvyšující se iontové síle v UV detekci při vlnové délce 200 nm (A) a v LIF detekci (B)

Pro otestování hypotézy, že k vymizení píku dochází vlivem iontové síly roztoku a nikoli vlivem rostoucí koncentrace nějaké specifické složky roztoku, byl stejný experiment proveden s pufrý obsahujícími fosfát, HEPES, sodný kation a TRIS v různých kombinacích. Ve všech případech bylo pozorováno zmizení širokého píku při přibližně stejné iontové síle, přestože koncentrace pufrů byla různá (kvůli odlišnému pK_a a počtu nábojů složek). Suspenze nanokrystalů je stabilizována vzájemným odpuzováním jejich povrchových nábojů, které jsou od určité iontové síly odstíněny, a dojde tak k samovolné

agregací částic do větších celků, které se poté projeví velmi úzkými píky tam, kde při ostatních experimentech začíná široký pík nanokrystalů.

Na Obrázku 10, kde je vynesena závislost výšky píku nanokrystalů na iontové síle, je vidět, že v rozmezí iontové síly 30–40 mM dochází k výraznějšímu zmenšování píků nanokrystalů. Absolutní odezvy detektoru se v jednotlivých pufrech lišily, proto jsou v Obrázku 10 vyneseny výšky píku vztažené k jejich počáteční hodnotě při nejnižší iontové síle. Na elektroforeogramech jako jsou na Obrázku 9 je pak možné pozorovat, že při iontové síle 40 mM a vyšší, kdy dochází ke zmizení píku nanokrystalů, se objevuje velmi ostrý a úzký pík v relativně krátkém čase.



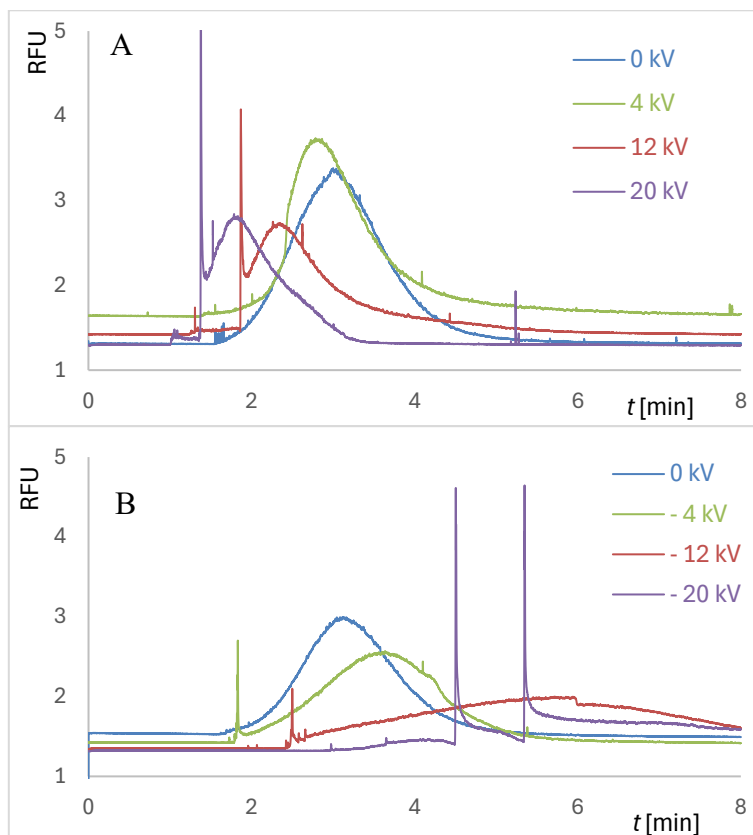
Obrázek 10 – Závislost výšky píku nanokrystalů na iontové síle; měřeno s vzorkem 100nm nanokrystalů kurkuminu

Pro další experimenty, které zahrnovaly vkládání napětí, byl kvůli nejlepší symetrii píku vybrán 10mM fosfátový pufr, jehož pH bylo upravováno pomocí TRIS.

4.4 Vkládání kladného a záporného napětí

Předchozí pokusy byly prováděny bez vložení napětí. Aby se do experimentu zapojila i elektroforetická migrace nanokrystalů, bylo v průběhu experimentu kromě tlaku 50 mbar vkládáno na elektrody kladné napětí postupně od 0 kV až po 20 kV. Z Obrázku 12A lze pozorovat, že se pík nanokrystalů postupně zmenšuje a posouvá směrem k detektoru. Dle záporného zeta-potenciálu by nanokrystalové částice měly migrovat jako anionty k anodě a při kladné polaritě napětí tedy směrem od detektoru. Posun ke kratším časům je dán působením elektroosmotického toku, který pohání roztok v kapiláře směrem k detektoru, a je dle výsledků experimentu rychlejší než vlastní migrace nanokrystalů k anodě. Následně bylo vkládáno záporné napětí na elektrody, od 0 kV po -20 kV. Zde

docházelo k posunu píku nanokrystalů viz Obrázek 12B. Tento posun je opět způsoben hlavně působením elektroosmotického toku, který při záporné polaritě napětí směřuje od detektoru.



Obrázek 12 – Vkládání kladného (A) a záporného (B) napětí při měření s 100nm nanokrystalu kurkuminu, po celou dobu měření aplikován tlak 50 mbar

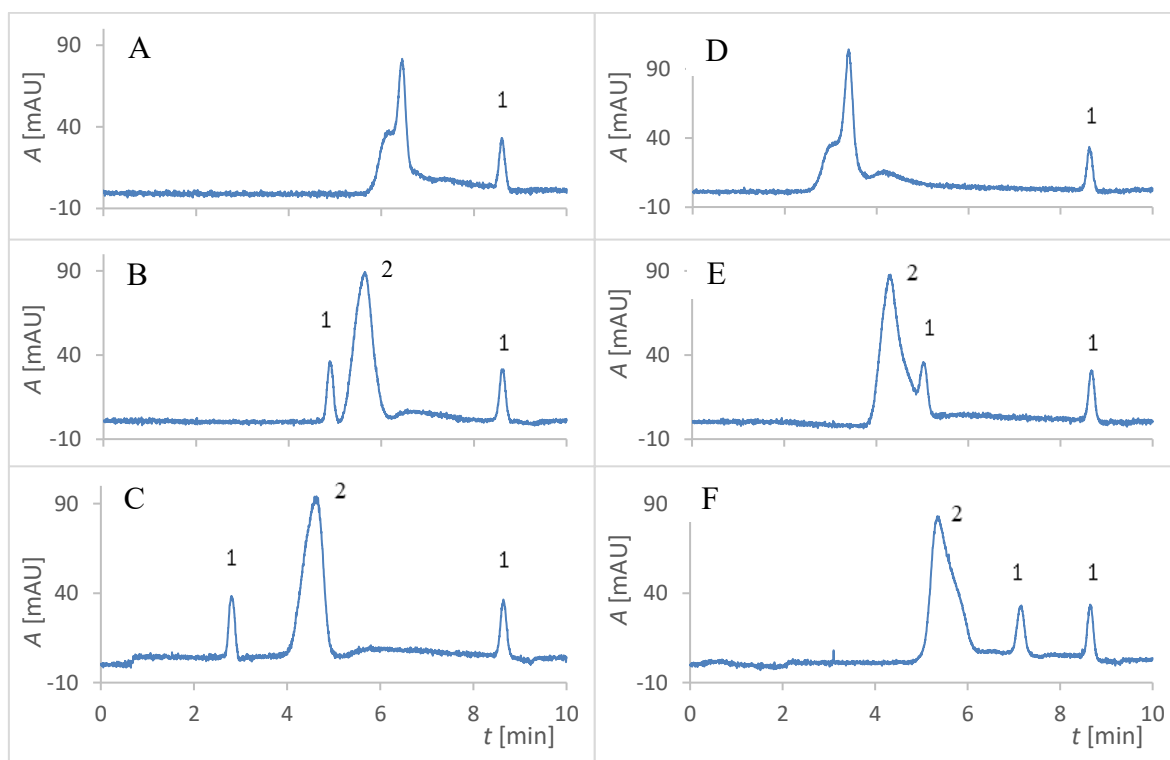
Při tomto pozorování převládá vliv elektroosmotického toku, který překryje případnou vlastní migraci nanokrystalů, proto z tohoto experimentu nebylo možné přímo vyvozovat závěry o elektroforetické migraci.

4.5 Posun vůči neutrálnímu markeru

Pro potvrzení záporného povrchového náboje nanokrystalů a jejich migrace v elektroforetickém systému směrem k anodě byl proveden experiment, při kterém byla zóna obsahující nanokrystalu a thiomocovinu jako neutrální marker nejprve nadávkována do kapiláry a posunuta v kapiláře tlakem 50 mbar po dobu 2 minut, následně bylo vloženo napětí +30 kV nebo -30 kV po různě dlouhou dobu. Poté byla do kapiláry nadávkována zóna thiomocoviny bez nanokrystalů. Nakonec byly všechny zóny v kapiláře mobilizovány tlakem 50 mbar tak, aby postupně prošly detektorem. Posun vůči neutrálnímu markeru při

různě dlouhé době vkládání kladného a záporného napětí ukazuje, že nanokrystaly kurkuminu migrují v elektrickém poli ve fosfátovém pufru o pH 7,0 jako anionty.

Při vložení kladného napětí se první pík markeru posouvá ke kratším časům vlivem elektroosmotického toku a pík nanokrystalů za ním čím dál více zaostává vlivem migrace nanokrystalů proti směru EOF (viz Obrázek 13A–C). Při vložení záporného napětí se naopak čas prvního markeru prodlužuje, protože je posouván EOF směrem od detektoru (viz Obrázek 13D–F). Nanokrystaly jsou sice také unášeny EOF od detektoru, ale oproti neutrálnímu markeru migrují proti směru EOF, takže jejich časy jsou kratší než časy prvního markeru.

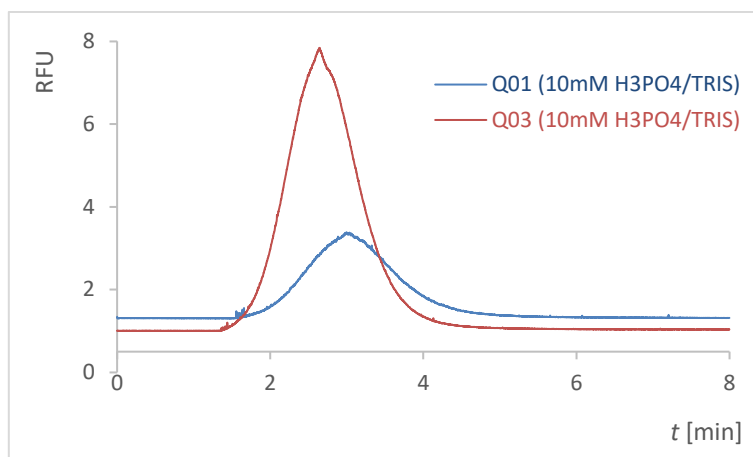


Obrázek 13 – Posun píku nanokrystalů (2) vůči neutrálnímu markeru (1) při různě dlouhé době vkládání kladného a záporného napětí: (A) 30 kV, 0 s, (B) 30 kV, 20 s, (C) 30 kV, 40 s, (D) -30 kV, 0 s, (E) -30 kV, 20 s, (F) -30 kV, 40 s

4.6 Vliv velikosti nanokrystalů

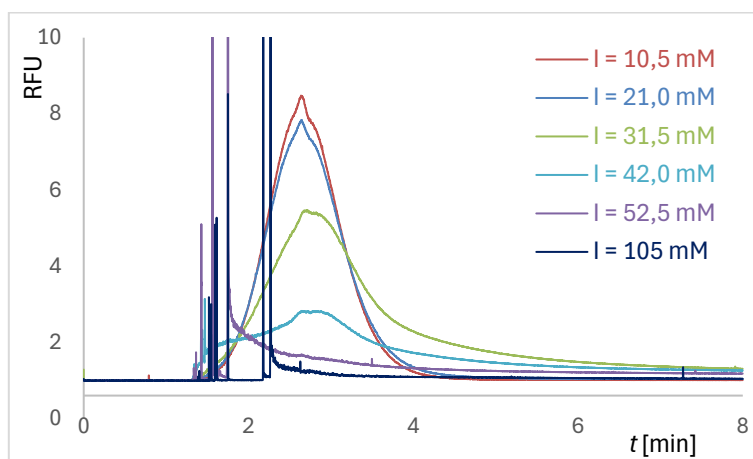
Všechny předchozí experimenty byly prováděny se vzorkem 100nm nanokrystalů kurkuminu. Pro další měření byly použity nanokrystaly o velikosti 40 a 400 nm pro zjištění vlivu velikosti nanokrystalů. Bohužel výsledky měření se 400nm nanokrystaly nebyly reprodukovatelné, protože v opakovaných měřeních si dané píky neodpovídaly.

Při srovnání 40nm a 100nm nanokrystalů je vidět, že se chovají velice podobně. Jak již bylo zmíněno v odstavci 4.2.2, zóny nanokrystalů se s rostoucí velikostí částic více rozmývají. S rostoucí velikostí klesá intenzita signálu, což je vidět na Obrázku 14. Vyšší intenzita u menších velikostí nanokrystalů by mohla být způsobena tím, že při konstantní hmotnostní koncentraci kurkuminu roste koncentrace částic nanokrystalů.



Obrázek 14 – Porovnání intenzity píku vzorku Q01 (100 nm) a Q03 (40 nm) nanokrystalů v 10mM fosfátovém pufru o pH 7, při tlaku 50 mbar

Z Obrázku 15 je zřejmé, že i menší nanokrystal kurkuminu jsou ovlivněny zvyšující se iontovou silou a že k vymizení širokého píku nanokrystalů dochází rovněž při iontové síle kolem 30 mM.



Obrázek 15 – 40nm nanokrystal kurkuminu po průchodu LIF detektorem vlivem tlaku 50 mbar v 10mM H₃PO₄/TRIS o pH 7,0 při zvyšující se iontové síle

5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byly zkoumány nanokrystaly kurkuminu pomocí kapilární elektroforezy s UV-VIS a laserem indukovanou fluorescenční detekcí. Elektroforeogramy pro UV-VIS detekci byly zaznamenávány při vlnových délkách 200, 214 a 254 nm, ale pro vyhodnocování byla použita vlnová délka 200 nm. Pro detekci pomocí LIF byly elektroforeogramy zaznamenávány při excitační vlnové délce 480 nm.

Nanokrystaly kurkuminu poskytovaly abnormálně široký pík v UV-VIS i LIF detekci. Bylo zjištěno, že časová prodleva a prodloužený pobyt nanokrystalů v kapiláře nemají vliv na rozšíření píku. Disperze zóny nanokrystalů tedy nebyla způsobena difúzí. Experiment s různě dlouhou kapilárou, kde bylo možné pozorovat větší rozmytí zóny při delší dráze, kterou vzorek urazil a další experiment s obrácením směru tlaku potvrdily hypotézu, že k rozmývání zón dochází vlivem parabolického profilu toku.

Dále bylo zjištěno, že se zvyšující se iontovou silou klesá výška píku. Vlivem rostoucí iontové síly docházelo k odstínění vzájemné elektrostatické repulze nanokrystalů a agregaci částic, která se projevila velmi úzkými píky v čase blízkém začátku širokého píku nanokrystalů. K postupnému mizení píku docházelo v rozmezí iontové síly 30–40 mM a při iontové síle vyšší než 40 mM docházelo k již zmíněné agregaci částic. Ke stejným jevům docházelo ve všech pufrách obsahujících anionty HEPES a fosfát a kationty sodný a TRIS v různých kombinacích.

Následně bylo na elektrody vkládáno kladné napětí, což způsobilo posun zón nanokrystalů ke kratším časům působením elektroosmotického toku. Při vkládání záporného napětí docházelo k posunu zón nanokrystalů od detektoru. Z tohoto experimentu ale nebylo možné přímo vyvozovat závěry o elektroforetické migraci nanokrystalů. Poté byl experimentem, ve kterém probíhal posun zóny nanokrystalů vůči neutrálnímu markeru při různě dlouhé době vkládání kladného a záporného napětí, potvrzen záporný povrchový náboj nanokrystalů.

Byl zkoumán i vliv velikosti nanokrystalů, přičemž bylo zjištěno, že s rostoucí velikostí částic dochází k většímu rozmývání zón a také klesá intenzita signálu nanokrystalů.

6 LITERATURA

- [1] Zong, R., H. Ruan, W. Zhu, P. Zhang, Z. Feng, C. Liu, S. Fan, H. Liang a J. Li. Curcumin nanocrystals with tunable surface zeta potential: Preparation, characterization and antibacterial study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2022, **76**, 103771. ISSN 1773-2247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2022.103771
- [2] *Seznam éček | CEFF* [online]. [vid. 2024-04-19]. Dostupné z: <https://www.ceff.info/cz/additives/detail/1?seo=e-100>
- [3] Sharma, R. A., A. J. Gescher a W. P. Steward. Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer* [online]. 2005, **41**(13), Cancer Chemoprevention – An Update on a Novel and Exciting Field of Oncology, 1955–1968. ISSN 0959-8049. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejca.2005.05.009
- [4] Priyadarsini, K. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules* [online]. 2014, **19**(12), 20091–20112. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules191220091
- [5] Tønnesen, H. H., M. Másson a T. Loftsson. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2002, **244**(1), 127–135. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(02)00323-X
- [6] Lizoňová, D., F. Hládek, S. Chvíla, A. Baláž, Š. Staňková a F. Štěpánek. Surface stabilization determines macrophage uptake, cytotoxicity, and bioactivity of curcumin nanocrystals. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2022, **626**, 122133. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2022.122133
- [7] Patra, D. a C. Barakat. Synchronous fluorescence spectroscopic study of solvatochromic curcumin dye. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2011, **79**(5), 1034–1041. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2011.04.016
- [8] Yallapu, M. M., M. Jaggi a S. C. Chauhan. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discovery Today* [online]. 2012, **17**(1–2), 71–80. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2011.09.009

- [9] Lao, C. D, M. T. Ruffin, D. Normolle, D. D. Heath, S. I. Murray, J. M. Bailey, M. E. Boggs, J. Crowell, C. L. Rock a D. E. Brenner. Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2006, **6**, 10. ISSN 1472-6882. Dostupné z: doi:10.1186/1472-6882-6-10
- [10] Toden, S. a A. Goel. The Holy Grail of Curcumin and its Efficacy in Various Diseases: Is Bioavailability Truly a Big Concern?, *Journal of restorative medicine* [online]. 2017, **6**(1), 27–36. ISSN 2165-7971. Dostupné z: doi:10.14200/jrm.2017.6.0101
- [11] Gao, Y., Z. Li, M. Sun, H. Li, C. Guo, J. Cui, A. Li, F. Cao, Y. Xi, H. Lou a G. Zhai. Preparation, characterization, pharmacokinetics, and tissue distribution of curcumin nanosuspension with TPGS as stabilizer. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 2010, **36**(10), 1225–1234. ISSN 0363-9045. Dostupné z: doi:10.3109/03639041003695139
- [12] Carvalho, D. M., K. P. Takeuchi, R. M. Geraldine, C. J. de Moura a M. C. L. Torres. Production, solubility and antioxidant activity of curcumin nanosuspension. *Food Science and Technology* [online]. 2015, **35**, 115–119. ISSN 0101-2061, 1678-457X. Dostupné z: doi:10.1590/1678-457X.6515
- [13] Rachmawati, H., L. A. Shaal, R. H. Müller a C. M. Keck. Development of Curcumin Nanocrystal: Physical Aspects. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2013, **102**(1), 204–214. ISSN 0022-3549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.23335
- [14] Dhivya, S. a A. N. Rajalakshmi. A Review on the preparation methods of Curcumin Nanoparticles. *PharmaTrutor*. 2018, **6**(9), 6–10. ISSN 2347-7881.
- [15] Loh, Z. H., A. K. Samanta a P. W. Sia Heng. Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2015, **10**(4), 255–274. ISSN 1818-0876. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajps.2014.12.006
- [16] Alves, C. R., R. Perosa Fernandes, B. Fonseca-Santos, F. Damiani Victorelli a M. Chorilli. A Critical Review of the Properties and Analytical Methods for the Determination of Curcumin in Biological and Pharmaceutical Matrices. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2019, **49**(2), 138–149. ISSN 1040-8347. Dostupné z: doi:10.1080/10408347.2018.1489216

-
- [17] Capillary Electrophoresis. *Chemistry LibreTexts* [online]. 2013 [vid. 2024-03-13]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumentation_and_Analysis/Capillary_Electrophoresis](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumentation_and_Analysis/Capillary_Electrophoresis)
- [18] Kašička, V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy* 91 (1997) 320-329.
- [19] Shah, M., N. Patel, N. Tripathi a V. K. Vyas. Capillary electrophoresis methods for impurity profiling of drugs: A review of the past decade. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2022, **12**(1), 15–28. ISSN 2095-1779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2021.06.009
- [20] Chetwynd, A., E. Guggenheim, S. M. Briffa, J. Thorn, I. Lynch a E. Valsami-Jones. Current Application of Capillary Electrophoresis in Nanomaterial Characterisation and Its Potential to Characterise the Protein and Small Molecule Corona. *Nanomaterials* [online]. 2018, **8**, 99. Dostupné z: doi:10.3390/nano8020099
- [21] Pyell, U. Characterization of nanoparticles by capillary electromigration separation techniques. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2010, **31**(5), 814–831. ISSN 1522-2683. Dostupné z: doi:10.1002/elps.200900555
- [22] Oszwałdowski, S., K. Zawistowska-Gibuła a K. P. Roberts. Capillary electrophoretic separation of nanoparticles: Analytical and bioanalytical chemistry. *Analytical and bioanalytical chemistry* [online]. 2011, **399**(8), 2831–2842. ISSN 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-011-4650-y
- [23] Surugau, N. a P. L. Urban. Electrophoretic methods for separation of nanoparticles. *Journal of Separation Science* [online]. 2009, **32**(11), 1889–1906. ISSN 1615-9314. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200900071
- [24] Zusková, I.; Gaš, B.; Ušelová-Včeláková, K.: Peakmaster 5.3 [počítačový program, dostupný z <https://web.natur.cuni.cz/gas/>]