

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Cílené strukturování křemenných povrchů – silný nástroj naznačující nové možnosti existujících separačních metod

**Pavel Karásek
Jihomoravský kraj**

Brno, 2021

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Cílené strukturování křemenných povrchů – silný nástroj naznačující nové možnosti existujících separačních metod

Targeted structuring of silica surfaces – a powerful tool indicating new possibilities of existing separation methods

Autoři: Pavel Karásek

Škola: tř. Kpt. Jaroše 1829/14, 658 70 Brno

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultant: RNDr. Iva Kubištová, Ph.D., doc. RNDr. Michal Roth CSc.
Brno, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné. Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 3.3.2021

Pavel Karásek

Poděkování

Touto cestou bych rád poděkoval docentu RNDr. Michalu Rothovi, CSc., a jeho spolupracovníkům za odbornou pomoc, vedení během mé středoškolské odborné práce, trpělivost a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Poděkování patří také vedení Ústavu analytické chemie, v.v.i., za možnost využití jejich laboratoří a originální, nákladné instrumentace.

V této práci bylo využito grantových prostředků Grantové agentury ČR projektu č. 19-00742S, a to především k zajištění potřebných chemikálií a materiálů.

Anotace

Speciální vlastnosti vody vystavené vysokým teplotám a tlakům (superkritická voda) byly využity k cílenému strukturování vnitřního povrchu jinak chemicky téměř inertních křemenných kapilár. Bylo provedeno přes 2000 experimentů s cílem definovat podmínky vhodné pro vznik různých typů povrchových struktur a pro řízení jejich velikosti. Vnitřní povrchy kapilár byly analyzovány elektronovou skenovací mikroskopií a zpracovávány vlastní databázovou aplikací.

Z databáze byly vybrány vzorky reprezentující jednotlivé typy struktur a byla připravena řada křemenných kapilár s konfigurací vhodnou pro elektromigrační analýzy. Na takto upravených kapilárách pak byla provedena charakterizační měření a nejvhodnější z nich pak byly využity k separacím některých tříd látek a biovzorků, které nelze na standardní kapiláře s hladkým povrchem analyzovat.

Klíčová slova

Superkritická voda, křemenná kapilára, struktura povrchu, elektroforéza, *Staphylococcus Aureus*, bakteriofág, Lactoglobulin

Annotation

Special properties of water exposed to high temperatures and pressures (supercritical water) were used for targeted structuring of the inner surface of silica capillaries that are otherwise chemically almost inert. Over 2000 experiments were carried out in order to define conditions suitable for formation of different types of surface and control of their size. The inner surfaces of capillaries were analyzed with scanning electron microscopy and processed by own database application.

A number of silica capillaries representing different types of structures were prepared with configuration appropriate for electromigration measurements. The properties of these capillaries were then tested and the most suitable of them were used for separations of some classes of substances and biosamples, which cannot be analyzed on standard capillaries with smooth surface.

Keywords

Supercritical water, fused silica capillary, surface structure, separation methods, *Staphylococcus Aureus*, bacteriophage, Lactoglobulin

Seznam použitých zkratek

AV ČR	Akademie věd České republiky
BSA	albumin
FSC	křemenné kapiláry
GC	plynová chromatografie
HCl	kyselina chlorovodíková
HF	kyselina fluorovodíková
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
LRM	rychlost posunu kapiláry
MALDI-TOF	hmotnostní spektrometrie s laserovou ionizací
MRSA	met icilin rezistentní <i>Staphylococcus Aureus</i>
MSSA	met icilin sensitivní <i>Staphylococcus Aureus</i>
o.d.	vnější průměr
P _{cr}	kritický tlak (221 bar)
PCR	polymerázová řetězová reakce
SCW	superkritická voda
PHWE	podkritická voda
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
i.d.	vnitřní průměr
SFC	superkritická fluidní chromatografie
SiO ₂	oxid křemičitý
T _{cr}	kritická teplota (374°C)
UIACH	Ústav analytické chemie
UV/VIS	ultrafialové/viditelné záření

Obsah

1	Úvod	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	
2.1	Skupenské stavy vody a fyzikálně-chemické vlastnosti jejího sub/superkritického stavu	10
2.2	Využití superkritické vody v průmyslu a armádě	12
2.3	Úpravy povrchu skla a křemene	13
2.4	Úpravy povrchu křemenných substrátů s využitím PHWE/SCW na UIACH Brno	15
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	
3.1	Komerční přístroje a zařízení	
3.1.1	Vysokotlaká pumpa s vakuovým degasérem	17
3.1.2	Elektronový skenovací mikroskop	17
3.2	Přístroje a zařízení vlastní konstrukce	14
3.2.1	Zařízení pro extrakci pevných vzorků a pro změnu vnitřního průměru kapiláry	18
3.2.2	Multifunkční zařízení pro programovatelný posuv kapiláry	19
3.2.3	Multipoziční polohovací zařízení s topnou jednotkou	20
3.3	Software	21
3.4	Použité chemikálie a materiály	23
3.5	Postup práce	
3.5.1	Leptání vnitřního povrchu křemenných kapilár	23
3.5.2	Příprava vzorků pro SEM a jejich fotografování	24
3.5.3	Plán experimentů	25
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	
4.1	Parametry ovlivňující výslednou strukturu	28
4.1.1	Závislost na hustotě řízené tlakem	28
4.1.2	Závislost na hustotě řízené teplotou	29
4.1.3	Závislost na průtoku superkritické vody	31
4.1.4	Závislost na rychlosti posunu kapiláry	32
4.2	Výběr různých morfologických struktur	34

5	VYUŽITÍ V PRAXI	
5.1	Separace bakterií druhu <i>Staphylococcus Aureus</i>	36
5.2	Replikace a separace bakteriofágů na <i>Staphylococcus Aureus</i> v kapiláře se strukturovaným povrchem	37
5.3	Rychlé stanovení plísní <i>Aspergillus</i> v bronchalveolárním výplachu	40
5.4	Stanovení alergenů lactoglobulin A a lactoglobulin B v mléce	43
6	ZÁVĚR	45
7	PŘÍLOHY	46
8	Seznam citované literatury	48

1 Úvod

Navzdory neustále vzrůstajícímu počtu vědeckých prací a dostupnosti stále sofistikovanějších přístrojů by se mohlo zdát, že vývoj analytické chemie lehce stagnuje v porovnání se svým bouřlivým rozvojem v posledních desetiletích. Zatímco “opravdu nové” principy a trendy jako chromatografie, hmotnostní spektrometrie, elektromigrační metody nebo spektroskopie byly ve své době objeovány a masivně zaváděny, současný výzkum se zdá být z tohoto úhlu pohledu méně temperamentní a je poháněn především ekonomickými a ekologickými faktory. Z těchto důvodů a s využitím všech současných poznatků je velikost analytických zařízení neustále zmenšována a metody zrychlovány a zlevňovány. Logickým vyústěním těchto požadavků je pak rozvoj technik prováděných v mikro a nano měřítku, což velmi často analýzy nejen zlevňuje, ale vede to i ke znatelně nižší zátěži životního prostředí. Právě důraz na ekologické aspekty nakonec vedl k nástupu nové oblasti chemie tzv. „Green chemistry“ [1], která se zaměřuje na vývoj nových metod, chemikálií a materiálů s potenciálem nahradit anebo alespoň snížit ekologickou stopu stávajících postupů.

K prvním úspěšným pokusům o náhradu toxických rozpouštědel určitě patří extrakce stlačeným oxidem uhličitým [2], modernější výzkum pak přinesl „iontové kapaliny“ [3,4]. Pokud bychom seřadili řadu rozpouštědel dle jejich toxicity, je jisté, že na prvním místě by se jako nejekologičtější rozpouštědlo umístila voda, která je také díky své dostupnosti a ceně široce využívána. Méně známým faktem ale zůstává, že voda může být uvedena při působení vysokých tlaků a teplot do dalších speciálních stavů, kde se zcela mění její fyzikálně-chemické vlastnosti. Tento efekt pak umožňuje její využití buď jako náhradu tradičních organických rozpouštědel anebo otvírá cestu ke zcela novým postupům. Na rozdíl od ostatních látek mohou být vlastnosti vody měněny v poměrně širokém rozmezí volbou teploty a tlaku; při teplotě vody mezi jejím bodem varu a kritickým bodem hovoříme o podkritické vodě [5,6], po překročení kritického bodu (373°C, 220 bar) pak o superkritické vodě [7-10].

Analytickou chemii lze zjednodušeně definovat jako obor zkoumající chemické složení vzorku nebo směsi a stanovující množství jejich jednotlivých složek. Pro správné stanovení musí být směsi nejdříve rozděleny na jednotlivé složky tzv. „separovány“. Tato operace se historicky prováděla různými způsoby [11], ale pokračující vývoj a miniaturizace vedly nakonec k masivnímu nasazení velmi tenkých křemenných kapilár [12], které postupně našly využití ve všech odvětvích chromatografie (GC, HPLC, SFC) a v elektromigračních metodách. Protože tyto kapiláry jsou vyráběny z křemenného substrátu tažením za vysokých teplot, tak jejich vnitřní i vnější povrch je dokonale hladký, a takto jsou i v praxi používány.

Vzrůstající požadavky na kvalitu analýz vedly nejdříve k pokusům upravit jejich povrch po chemické stránce, později byly prováděny i pokusy o hlubší, viditelné zdrsnění povrchu. K tomuto účelu byla testována řada často velmi agresivních toxických rozpouštědel [13-17], jejichž nevýhodou bylo také nežádoucí zanášení leptaného povrchu reakčními produkty, které dále znehodnocovaly následnou analýzu.

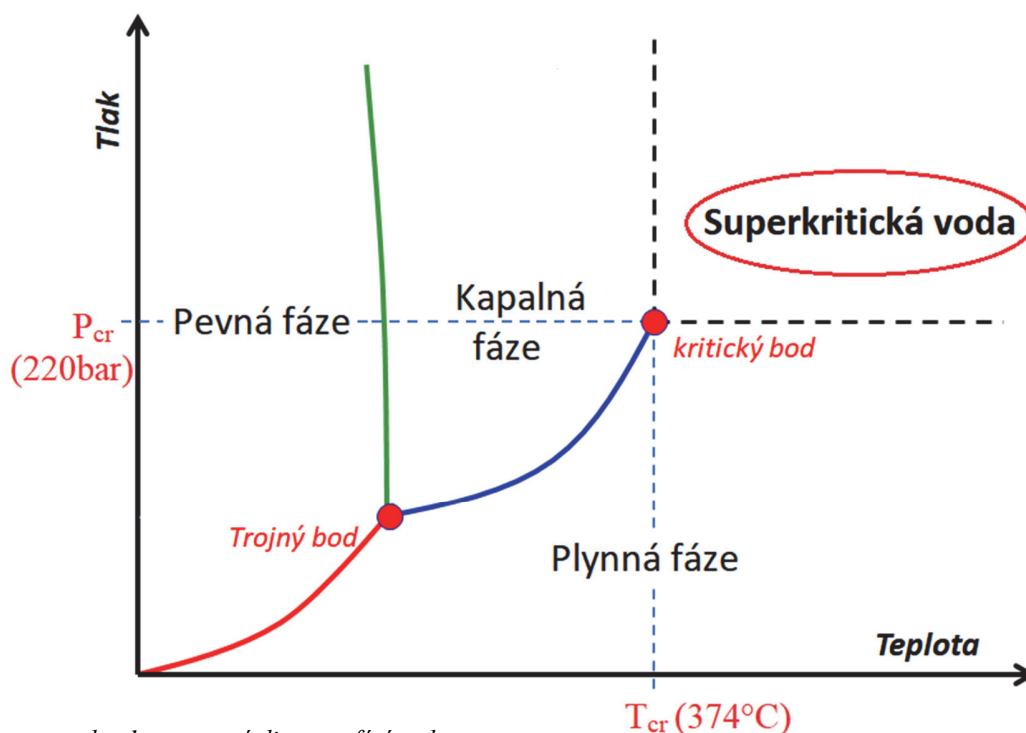
Využití specifických vlastností vody k leptání vnitřního povrchu těchto kapilár pak otevřelo cestu k ekologičtějšímu, cíleně řízenému a chemicky čistému procesu, který ve spojení s originálním řešením aparatury umožňuje tvorbu takových struktur a jejich kombinací, které nejsou ostatními metodami proveditelné.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Skupenské stavy vody a fyzikálně-chemické vlastnosti jejího sub/superkritického stavu

Za mimořádné vlastnosti vody, nepostradatelné pro všechny známý život na Zemi, vděčíme nejen její vlastní molekulové struktuře, ale také existenci zvláštních mezimolekulárních sil, tzv. vodíkových můstků. Kromě veřejnosti široce známých forem vody - ledu, kapaliny a plynu (obr. 1), tak existují i jiná její skupenství, která lze považovat za jakési kombinace těchto základních fází.

Rozdílné chování a vlastnosti jednotlivých skupenství H_2O jsou způsobeny kontinuálním přeskupováním anebo destrukcí právě zmíněných vodíkových můstků při působení termických a tlakových sil. Jako příklad můžeme použít přechod z pevné do kapalné fáze, kdy je při teplotě ledu $0^\circ C$ potřeba pro přeměnu v kapalnou vodu se stejnou teplotou systému dodat speciální energii

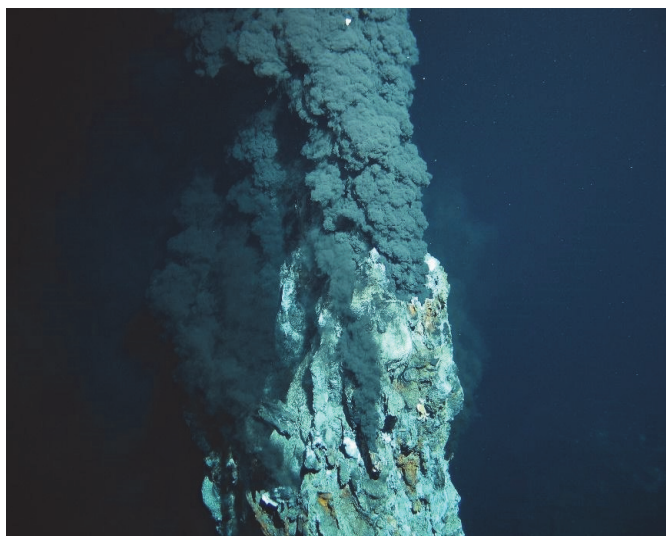


obr. 1 - stavový diagram fází vody

(tzv. skupenské teplo). Ve struktuře ledu jsou totiž molekuly uspořádané do geometricky stabilních náctistěnnů, jejichž tvar (díky malé vnitřní energii molekul H_2O) jsou schopné vodíkové můstky udržet. Jakékoliv dodané teplo o minimální velikosti skupenského tepla zvětšuje kmitání samotných molekul H_2O do takové míry, že síla vodíkových vazeb je nedostačující, struktura se deformuje a voda kapalná. Z uvedeného vyplývá, že při konstantním tlaku s rostoucí teplotou celková uspořádanost a stabilita molekulové struktury vody obecně klesá.

Méně známým skupenstvím vody je stav subkritický, který předchází stavu superkritickému (obr.1). Vzniká při přibližování se vysokým hodnotám teploty a tlaku kritického bodu vody ($374^{\circ}C$, 220bar), kde již jsou vodíkové můstky natolik slabé [18], že dokáží jednotlivé molekuly vody udržet pohromadě jen v maximálním počtu několika desítek molekul, tzv. "clustery". V této fázi začíná klesat polarita vody a dochází ke změně i dalších fyz.-chem. vlastností (hustota, iontový součin, permitivita apod.). To má za následek snižování rozpustnosti polárních látek a látek iontové povahy např. NaCl, sacharózy a naopak narůstá "náklonnost" vody k rozpouštění méně polárních látek.

V případě překročení kritického bodu již hovoříme o vodě superkritické. Zde již vodíkové vazby zanikají zcela, a díky izolaci jednotlivých molekul a další změně vlastností se voda chová jako nepolární rozpouštědlo a stává se tak vlastně svým vlastním protipólem. V tomto stavu se chová podobně jako hexan, rozpouští nepolární látky např. tuky, ale na rozdíl od něj dokáže také agresivně atakovat i takové odolné materiály jako je sklo nebo křemen [19-22]. A právě této specifické vlastnosti bylo využito v této práci pro modifikaci vnitřních povrchů křemenných kapilár.



obr. 2 - Black smokers

vysokých až 55 metrů. Tak se do oceánu dostávají další minerály a vzácné kovy, potřebné buď k životu samému anebo k udržení vhodné salinity či pH mořské vody.

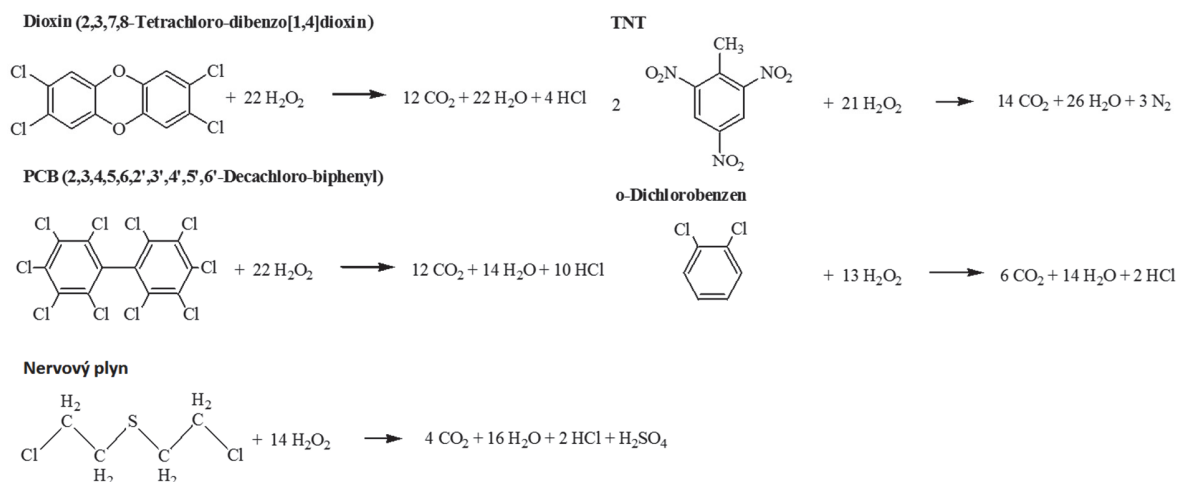
O tom, že superkritický stav vody není jen produktem vědeckých laboratoří, ale má svůj význam i v přírodním koloběhu svědčí jev nazvaný "black smokers" (obr. 2). Při tomto procesu je na dně oceánu pomocí vysokého hydrostatického tlaku vody a tepla pocházejícího z vulkanické činnosti dosaženo kritického bodu vody a vzniklá SCW je schopná rozpouštět i ty nejodolnější horniny zemské kůry. Při svém výstupu na povrch se poté ochlazuje a rozpuštěné minerály se usazují v nápadných kruhových komínkách

2.2 Využití superkritické vody v průmyslu a armádě

Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, vlastnosti superkritické vody a její role v transportu rozpuštěných kovů a různých minerálů z hlubin země do oceánů je geochemickým inženýrům známá již po desetiletí. Praktické využití superkritické vody je však relativně novým směrem a je zkoumáno jen v několika laboratořích na světě, komerční firemní nasazení této technologie je pak ještě vzácnější. Asi nejčastějším využitím SCW je spalování různých organických látek v SCW reaktoru za současné dodávky kyslíku. Extrémní podmínky totiž způsobí totální rozklad a oxidaci chemických látek na jejich základní prvky – uhlík, dusík, kyslík, vodík a jejich oxidy, v případě přítomnosti kyselinotvorných prvků pak vznikají příslušné kyseliny – HCl, HF, HNO₃ apod., což představuje, na rozdíl od běžných spalovacích procesů, jen minimální anebo žádnou zátěž pro životní prostředí.

Ještě důležitější však je, že tímto způsobem lze bezpečně rozložit látky nebezpečné povahy, např. chemické zbraně. Ty totiž nelze zlikvidovat běžným způsobem, tak jako běžnou municí, vystřelením při cvičení anebo hromadným odpalem někde v poušti. Na obrázku 3 jsou znázorněny

Oxidační reakce v superkritické vodě



obr. 3 - rozklad bojových látek a polutantů superkritickou vodou

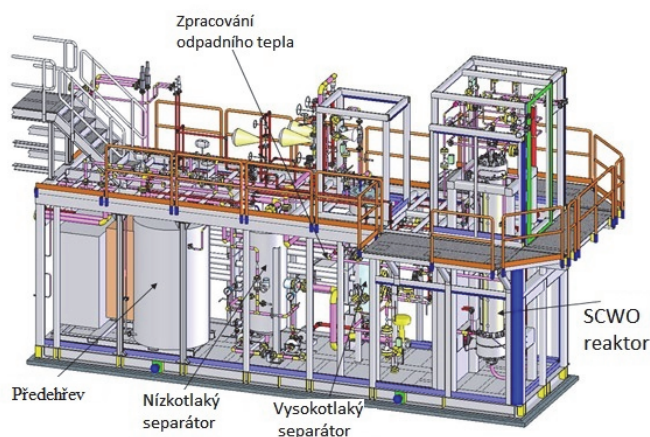
příklady reakcí probíhající právě při likvidaci tohoto druhu zbraní (nervový plyn, TNT) a rozklady látek vysoce nebezpečných životnímu prostředí a člověku (PCB, Dioxin, dichlorbenzen).

Superkritický reaktor spalující za pomoci kyslíku odpadní látky byl také nainstalován na amerických jaderných ponorkách, kde sloužil k likvidaci vznikajících odpadů s možností přímého vypouštění produktů do oceánu.

Na obrázku 4a je fotografie poloprovozní jednotky s reaktorem o objemu cca 100l určené k likvidaci chemických zbraní, na obrázku 4b pak ilustrace velkého zařízení instalovaného v nemocnici (Soul, Jižní Korea), které slouží k likvidaci vysoce infekčních materiálů. Kapacita tohoto zařízení dosahuje řádů tuny/rok.



obr. 4a likvidace chemických zbraní



obr. 4b likvidace infekčního odpadu

2.3 Úpravy povrchu skla a křemene

Povrchové úpravy skla lze principiálně provádět mechanickými nástroji anebo chemickou cestou. Mezi mechanické operace patří pískování skla, broušení a gravírování. Dále lze povrch skla upravit nanášením nových vrstev např. lakováním nebo UV tiskem. V případě použití chemické cesty lze použít ke zdrsňení povrchu skla za zvýšené teploty hydroxid sodný, ale reakce je poměrně pomalá a silně závislá na druhu použitého skla. Jedním z nejběžnějších způsobů pro cílené leptání skleněných a křemenných povrchů se stalo použití kyseliny fluorovodíkové. Využití této kyseliny je díky její vysoké agresivitě poměrně účinné, na druhou stranu se ovšem vyznačuje i vysokou toxicitou. Negativní stránkou je proto nejen vysoké nebezpečí při manipulaci s ní, ale i nepříjemný dopad na životní prostředí.

Chemicky lze tento proces zapsat:



Další variantou, jak dosáhnout vyleptání cíleného tvaru nebo struktury je použití roztoku známého pod pojmem leptací pufr (směs HF, NH₄F, HCl a H₂O), který je nejen účinnější než čistá HF, ale hlavně volbou poměru jednotlivých složek lze ovlivňovat jeho leptací sílu s ohledem na druh použitého skla. V menším měřítku bylo k leptání také využito etheru anebo hydroxidu

methyloamonného (TMAH). Z principu však všechny tyto metody ve výsledku kontaminují výsledný povrch reakčními zbytky a novými heteroatomy, což může způsobit zásadní problémy při zpracování nebo separaci vzorků biologického charakteru.

S nástupem mikro a nano zařízení do laboratoří i běžného života, jejichž výroba je z velké části založena na litografických procesech a následném leptání, začal na UIACH Brno pilotní výzkum směřující k využití specifických vlastností superkritické vody jako náhrady výše uvedených směsí. Výsledky ukázaly, že leptání takovou vodou je efektivnější (rychlost procesu), přesnější (ostré hrany útvarů), laditelné (teplota, tlak) a především nekontaminuje životní prostředí z důvodu přirozeného výskytu vody v přírodě. Za současných technických možností firem je ovšem využití superkritické vody prozatím omezené na specializované laboratoře (např. výroba mikročipů), a proto se zatím neuplatnilo v běžné komerční výrobě.

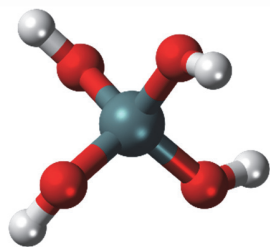
První databáze publikace o rozpouštění skla ve vodném prostředí pochází od Jasmunda z roku 1952, který zapsal rovnici rozpouštění následovně:

Brady 1953, Jasmund 1952 and 1958, Franck 1956, Mosebach 1957, Wood 1958, Kitahara 1960

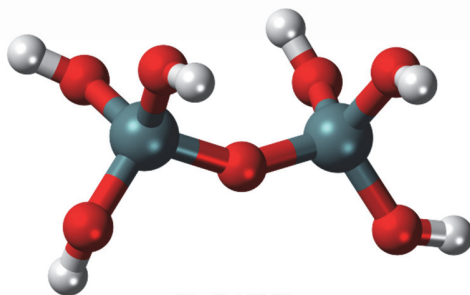


O deset let později pak Wendlandt and Glemser 1962 společně s Bradym 1963 tuto rovnici zrevidovali a zohlednili vliv tlaku a teploty (tedy hustoty) vody, ve které rozpouštění probíhá. Výsledným produktem je vždy kyselina křemičitá, avšak ve třech jejích různých konfiguracích:

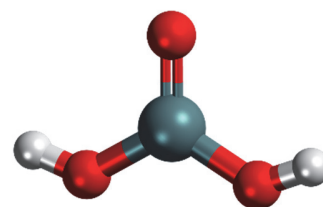
Wendlandt and Glemser, Brady 1963 and 1964



$\text{Si}(\text{OH})_4$
ortokřemičitá kys.



$\text{Si}_2\text{O}(\text{OH})_6$
parakřemičitá kys.



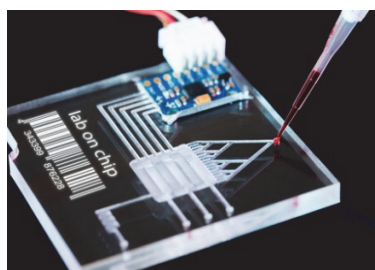
$\text{SiO}(\text{OH})_2$
metakřemičitá kys.

2.4 Úpravy povrchu křemenných substrátů s využitím PHWE/SCW na Ústavu analytické chemie

Schopnosti rozpouštět sklo, a dokonce různé formy křemene bylo tedy poprvé využito na UIACH Brno při leptání dnes tolik populárních „mikročipů“ [23], což jsou skleněné nebo křemenné destičky o velikosti desítek mm s vyleptanými dráhami, zabudovanými detektory a osazenými příslušnými vstupy a výstupy. Odborně jsou nazývány termínem „Lab on chip“ –



obr. 5a

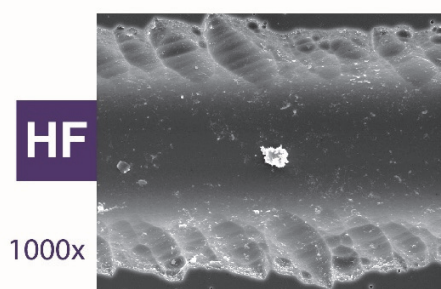


obr. 5b

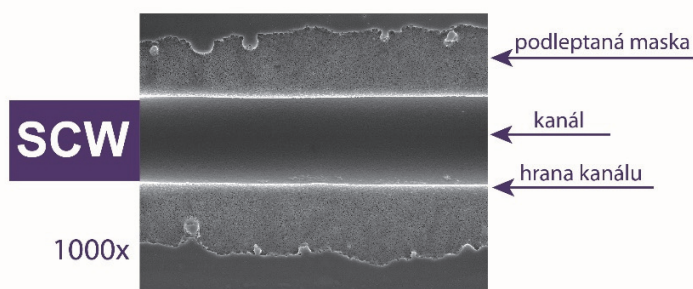
laboratoř na čipu a mohou představovat náhradu velkých laboratorních přístrojů. Obr. 5a ukazuje skleněný mikročip vyleptaný na UIACH Brno superkritickou vodou před finálním osazením, na obr. 5b je znázorněn příklad již hotového mikročipu.

zdroj: UIACH Brno a <https://www.news-medical.net/life-sciences/Benefits-of-a-Microfluidic-System.aspx>

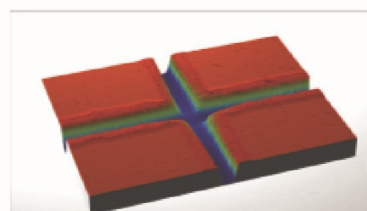
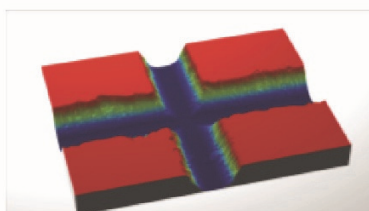
Průmyslově jsou tyto čipy vyráběny litografickým procesem s finálním leptáním pomocí směsi založené na kyselině fluorovodíkové a fluoridu amonném, tedy pomocí velmi agresivního a neekologického činidla. Proces leptání může trvat až hodiny a výsledkem jsou kanálky s nepřítisť ostrým okrajem (obr. 5c). Leptání také probíhá stejnou rychlostí ve všech směrech, takže nelze dosáhnout hlubokého kanálku, aniž bychom současně nezvětšovali jeho šířku. Nahrazení uvedené směsi superkritickou vodou pak umožnilo vyleptat čip během pouhých 5 min, okraje jsou téměř dokonale ostré (obr. 5d) a poměr šířky kanálku k jeho hloubce lze ovlivňovat vhodnou volbou teploty a tlaku.



obr. 5c



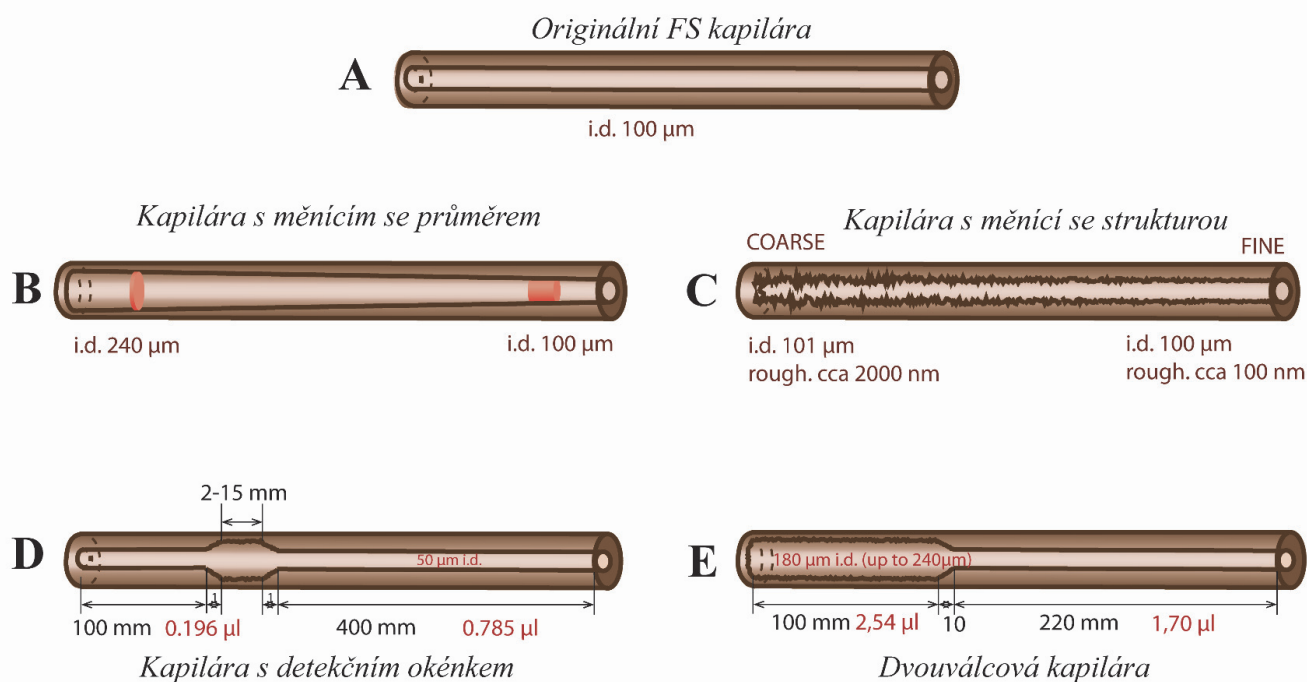
obr. 5d



Druhou aplikací realizovanou na UIACH na původní neinovované verzi aparatury (obr. 9) bylo postupné odleptávání materiálu vnitřní stěny křemenné kapiláry za účelem změny jejího vnitřního průměru. Z podstaty výrobního procesu těchto kapilár lze totiž získávat kapiláry pouze konstantního průměru (obr. 6A) a na trh jsou tak dodávány kapiláry pouze několika zaběhnutých průměrů.

Za účelem odleptávání a změny průměru byla použita křemenná kapilára ve statickém stavu (během leptání nedocházelo k jejímu pohybu), umístěná v termostatovaném bloku (obr. 9-3) a jejímž středem protékala SCW o hustotě definované teplotou a tlakem. V závislosti na podmínkách pak byla vyrobena kapilára s postupně se měnícím průměrem (obr. 6B) a nebo kapilára s postupně se měnící strukturou povrchu (obr. 6C).

Pokud nebyla kapilára vyhřívána celá, ale jen její část, pak bylo možno produkovat kapiláru s detekčním okénkem (obr. 6D) a nebo kapiláru s dvěma vnitřními průměry (obr. 6E). Výhoda silně zvětšeného průměru kapiláry byla uplatněna v elektromigračních analýzách k nástřiku velkého objemu vzorku, kapilára s detekčním okénkem pak umožňovala zvýšit citlivost UV-VIS detekce. Raritou je pak využití kapiláry s postupně se měnícím průměrem k izotachoforetickým separacím látek s velmi blízkým izoelektrickým bodem [24]. V lékařské praxi pak lze využít kapiláry s postupně se měnící strukturou povrchu (obr. 6B) na separaci antifungální látky Amphotericinu B od Albuminu [25].



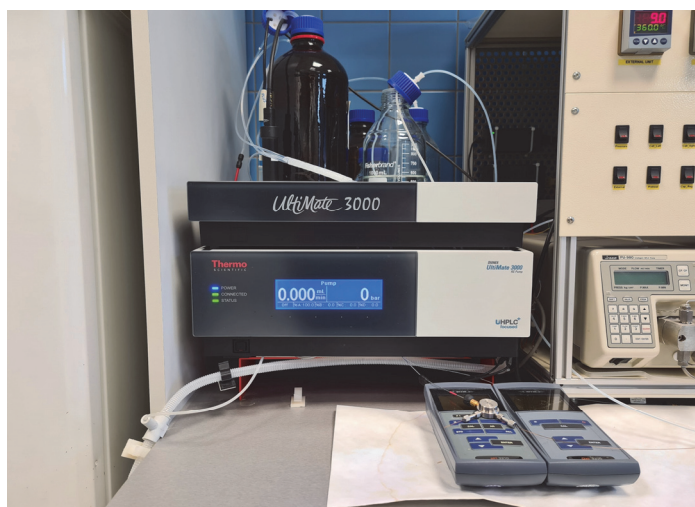
obr. 6 - kapiláry s upraveným profilem průměru pomocí SCW

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Komerční přístroje a zařízení

3.1.1 Vysokotlaká pumpa s vakuovým degasérem

Kromě vysoké teploty, zajištěné topnou jednotkou vlastní konstrukce, je pro vznik SCW nutné také dosažení dostatečného tlaku. K tomuto účelu byla použita vysokotlaká pumpa Dionex



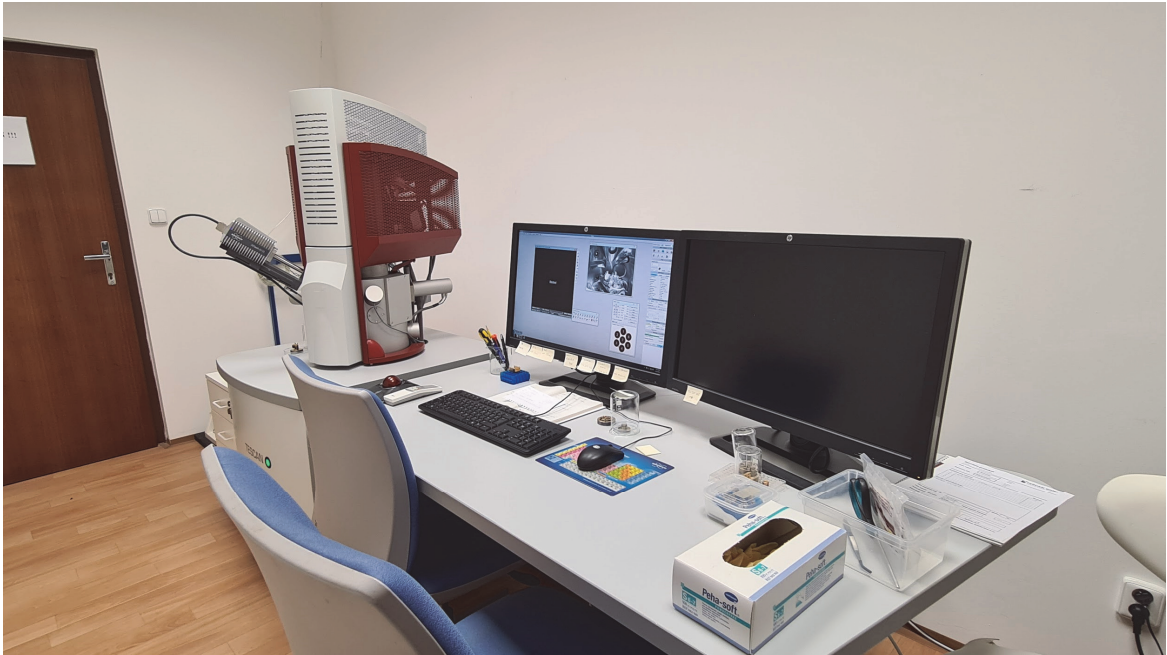
Ultimate 3000 (ThermoFisher Scientific) (obr. 7), umístěná na začátku celé aparatury. Jedná se o pumpu původně určenou k UHPLC a která je schopna operovat s tlaky do 1000 bar při průtocích od 1 μ l do 8 ml. Pumpa je také vybavena vestavěným vakuovým degasérem, který z vody před jejím vstupem do aparatury odstraní nežádoucí rozpuštěné plyny (zejména kyslík) a tím snížil korozivní agresivitu, kterou by generovaná SCW na kovové části aparatury působila.

obr. 7 - vysokotlaká UHPLC pumpa

3.1.2 Elektronový skenovací mikroskop

Jelikož se běžná optická mikroskopie používaná při měření změn průměru kapilár ukázala být pro zkoumání strukturálních změn povrchu kapiláry nedostatečná, bylo využito přístupu k elektronovému skenovacímu mikroskopu od firmy TESCAN, který se na Ústavu analytické chemie nachází (obr. 8).

Jedná se o model Mira3 s maximálním zvětšením 100000x. Tato vysoce pokročilá, ale i nákladná technika využívá usměrněného elektronového paprsku, který je “nastřelován” na vodivý povrch vzorku a odražené elektrony jsou pak zachycovány vybraným detektorem. Pro tuto práci byla použita kombinace dvou detektorů, a sice SE a InBeam, snímání probíhalo převážně v poměru 75/25. Snímky byly zaznamenány při zvětšeních 5000x, 10000x, 25000x a 50000x.



obr. 8 - elektronový skenovací mikroskop TESCAN/MIRA 3 s vysokým rozlišením

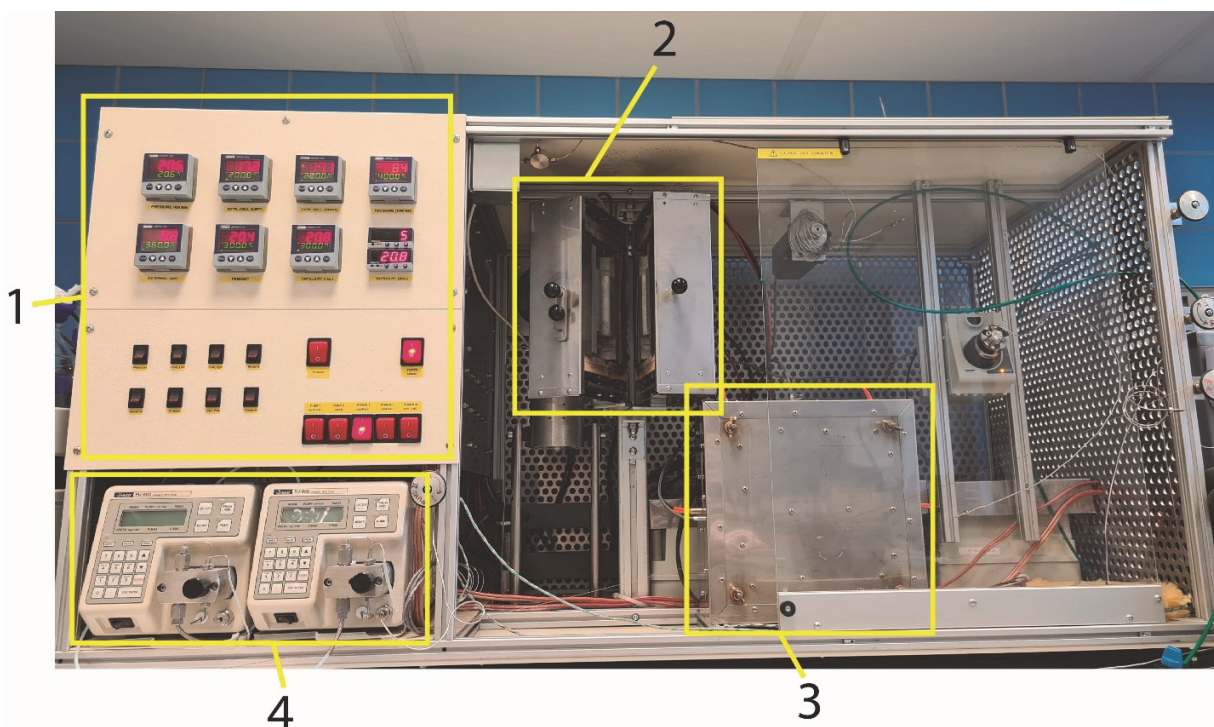
3.2 Přístroje a zařízení vlastní konstrukce

3.2.1 Zařízení pro extrakci pevných vzorků a pro změnu vnitřního průměru kapiláry

První verze aparatury umožňující práci se SCW sestavené na Ústavu analytické chemie AVČR se skládala ze tří hlavních částí. První z nich je elektronický modul (obr. 9_1), který ovládá celý systém a zobrazuje informace o teplotách a tlacích v jednotlivých částech zařízení. Další částí je vertikální extrakční cela (obr. 9_2), která slouží ke statickým typům extrakcí, např. k výrobě křemenných mikročipů jejich leptáním (kap.2.4). Protože většina dílů extrakční cely přichází do kontaktu se SCW, musí být kvůli její vysoké agresivitě vyrobeny ze speciální oceli bez obsahu železa, zde byla použita slitina Inconel 625 (Mo, Ni, Cr). Poslední, neméně důležitou částí je frézovaný, vyhřívaný duralový blok (obr. 9_3), který se používá k úpravě vnitřních průměrů kapilár (kap.2.4). Výstupy z obou částí ústí do ochlazovacího zařízení, které po extrakci umožňuje vypuštění zkondenzované vody z aparatury.

K provedení našich experimentů byl z tohoto systému použit pouze elektronický ovládací panel, a to k nastavení teploty externí topné jednotky a k monitorování tlaku. Původní aparatura byla vybavena dvěma vysokotlakými pumpami Jasco 980 (obr. 9_4) s maximálním pracovním tlakem

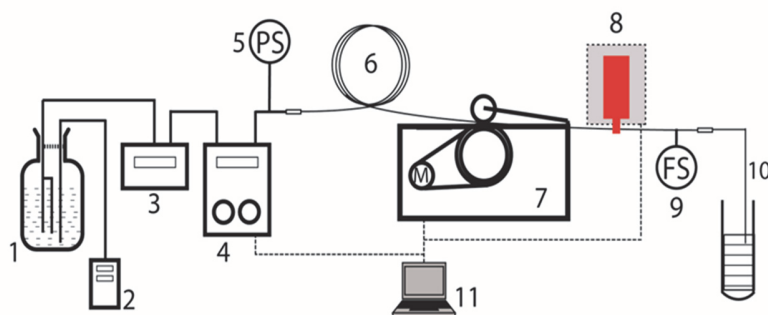
400 bar. Tyto byly nahrazeny vhodnější vysokotlakou pumpou Dionex Ultimate 3000 s vestavěným degasérem.



obr. 9 - první verze aparatury pro práci se superkritickou vodou

3.2.2 Multifunkční zařízení pro programovatelný posuv kapiláry

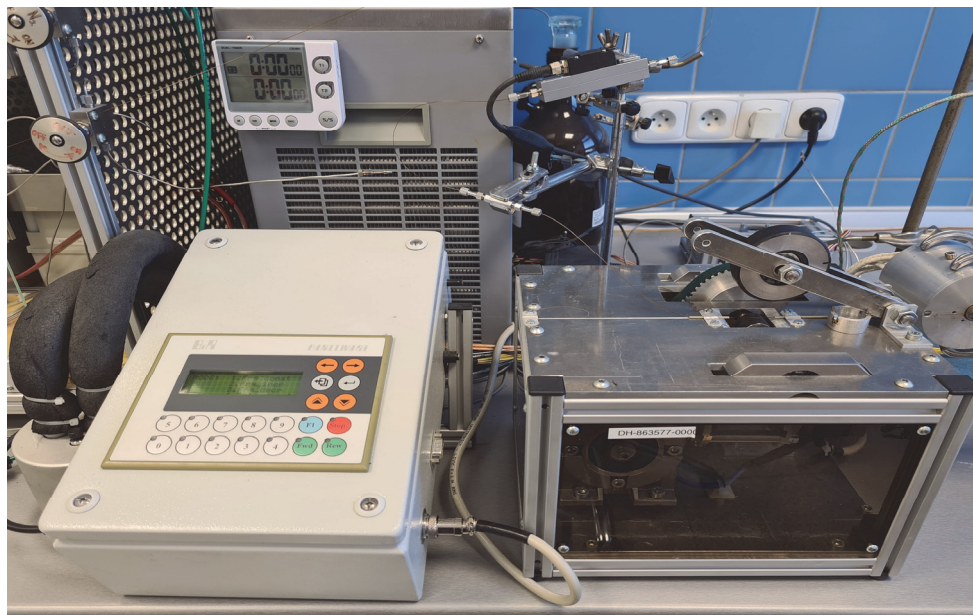
Jak vyplynulo z předchozích kapitol, aparatura ve stávající konfiguraci neumožňuje leptání konstantních průměrů kapilár nebo povrchů se stálou, neměící se strukturou. Z tohoto důvodu bylo vyvinuto zcela nové zařízení, které zásadním způsobem rozšiřuje možnosti využití specifických vlastností superkritické vody k modifikaci vnitřního povrchu kapilár (obr.10_6).



obr. 10 - schéma nového řešení s posuvem kapiláry

v kapiláře, jen na malém úseku definovaném velikostí topné jednotky (obr.10_8). Touto zónou je pak kapilára kontinuálně posouvána. Zařízení se skládá ze dvou částí. První část tvoří krokový motor připojený přes převodové ústrojí na dvě pogumovaná kolečka (obr.10_7). Díky vysoké třecí síle gumi se vložená kapilára, standardně pokrytá kluzkou polyimidovou vrstvou,

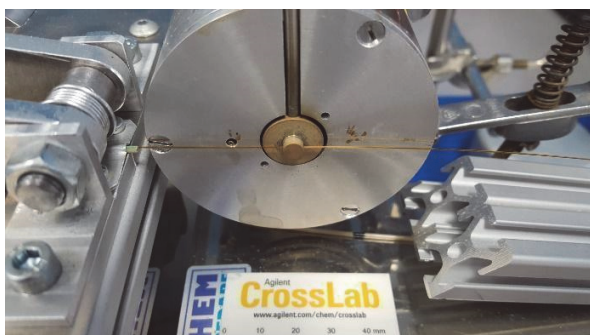
jednoduše posouvá topnou jednotkou. Druhou částí je programovatelná elektronická jednotka (obr.11), která ovládá výkon a směr otáčení motoru. Software umožňuje využít čtyř přednastavených a jednoho libovolně programovatelného módu posunu, pro naše účely pak byl použit mód posunu konstantní rychlostí. Naše měření byla prováděna při čtyřech rychlostech a to 4, 8, 16 a 32 mm/min.



obr. 11 - technická realizace posuvu kapiláry

3.2.3 Multipoziční polohovací zařízení s topnou jednotkou

Posledním zařízením vlastní konstrukce je multipoziční polohovací zařízení s již dříve zmíněnou topnou jednotkou (obr 12a). Vzhledem k vysokým teplotám (až 500°C) bylo potřeba vlastní jádro dostatečně tepelně odizolovat. To bylo provedeno pomocí duralového pláště a vzduchové mezery, spojení pláště a vyhřívaného jádra bylo minimalizováno pomocí tří hrotů. Vyhřívané jádro topné jednotky je vyrobeno z mosazného válce (ø45 mm) s dutým středem, do kterého se dále vkládají inserty podle požadované délky topné zóny (obr. 12b). Celý systém je řízen



obr. 12a - topná jednotka



obr12b – inserty s různou délkou topné zóny

mikroprocesorovým regulátorem s přesností 0.1°C . I když to není na první pohled patrné, neméně důležitým prvkem sestavy je speciální pojezdová konstrukce (obr.13). Velikost otvoru v topné zóně, kterým je posouvána kapilára, je totiž vyrobena co nejtěsněji (mezera mezi stěnou kapiláry a insertu je $20\mu\text{m}$) a je mimořádně důležité zachovat přesný a rovný průchod kapiláry. Díky vysokým tlakům, teplotám a křehkosti samotné kapiláry hrozí při porušení souososti její prasknutí. Vyrobena konstrukce umožňuje pomocí mikrometrických šroubů přesné nastavení ve všech třech osách včetně nastavení horizontálního úhlu a tím poskytuje dostatečné možnosti jemného finálního nastavení pojezdové dráhy.



obr. 13 – pojezdová vodící dráha jemně nastavitelná ve všech osách

3.3 Software

Obecným výstupem většiny vědeckých článků v analytické chemii je soubor dat prezentující kvantitativní (množství, obsah, koncentrace) nebo kvalitativní (jaké chemické složení) údaje. Protože jde o číselné hodnoty, tak je lze přehledně zpracovávat matematicky, statisticky nebo graficky a následně je přímo porovnávat. Specifikum této práce je, že jedním z nejdůležitějších výstupů je výsledný snímek vytvořené struktury, na který nelze tyto postupy aplikovat. Již před začátkem celé experimentální části bylo z přibližného počtu experimentů zřejmé, že vznikne velké množství fotografií, ve kterých se nelze bez vhodného systému orientovat. Z toho důvodu byla vyvinuta vlastní aplikace v databázovém programu Access, do které byla ke každému experimentu vložena všechna dostupná experimentální data a odpovídající snímek.

Aplikace obsahovala kromě souboru dat (obr. 14a) a vstupního formuláře (obr.14b) také dotazový formulář, díky kterému bylo možné snímky třídit dle hodnot zadaného parametru nebo jejich kombinací a několik typů sestav tiskových výstupů (obr.14c). Díky tomu bylo možné snímky jednoduše řadit vedle sebe podle konkrétních požadavků a v takto vytvořených sestavách hledat závislosti na experimentálních parametrech.

ID	Experiment	Temp	Pressure	Density	SEM	LRM	H2O flow	Director	Project	Datum	FS id	File	Task
8	n1	300	340	0,7564	50000	32,0000	2000	FF	Surface mapping	21.04.2020	100	SOC_n1_300C_340bar_2000ml_400Hz_50kx_02.tif	No
12	n3	300	340	0,7564	50000	8,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n3_300C_340bar_2000ml_100Hz_50kx_03.tif	No
16	n4	300	340	0,7564	50000	4,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n4_300C_340bar_2000ml_50Hz_50kx_03.tif	No
20	n5	320	340	0,7209	50000	32,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n5_320C_340bar_2000ml_400Hz_50kx_03.tif	No
24	n6	320	340	0,7209	50000	16,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n6_320C_340bar_2000ml_200Hz_50kx_03.tif	No
28	n7	320	340	0,7209	50000	8,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n7_320C_340bar_2000ml_100Hz_50kx_02.tif	No
32	n8	320	340	0,7209	50000	4,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n8_320C_340bar_2000ml_50Hz_50kx_02.tif	No
36	n9	340	340	0,6798	50000	32,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n9_340C_340bar_2000ml_400Hz_50kx_03.tif	No
40	n10	340	340	0,6798	50000	16,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n10_340C_340bar_2000ml_200Hz_50kx_02.tif	No
44	n11	340	340	0,6798	50000	8,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n11_340C_340bar_2000ml_100Hz_50kx_02.tif	No
48	n12	340	340	0,6798	50000	4,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n12_340C_340bar_2000ml_50Hz_50kx_02.tif	No
52	n13	360	340	0,6298	50000	32,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n13_360C_340bar_2000ml_400Hz_50kx_03.tif	No
56	n14	360	340	0,6298	50000	16,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n14_360C_340bar_2000ml_200Hz_50kx_03.tif	No
60	n15	360	340	0,6298	50000	8,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n15_360C_340bar_2000ml_100Hz_50kx_02.tif	No
64	n16	360	340	0,6298	50000	4,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n16_360C_340bar_2000ml_50Hz_50kx_03.tif	No
68	n17	370	340	0,5997	50000	32,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n17_370C_340bar_2000ml_400Hz_50kx_02.tif	No
72	n18	370	340	0,5997	50000	16,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n18_370C_340bar_2000ml_200Hz_50kx_03.tif	No
76	n19	370	340	0,5997	50000	8,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n19_370C_340bar_2000ml_100Hz_50kx_03.tif	No
80	n20	370	340	0,5997	50000	4,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n20_370C_340bar_2000ml_50Hz_50kx_03.tif	No
84	n21	380	340	0,5640	50000	32,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n21_380C_340bar_2000ml_400Hz_50kx_02.tif	No
85	n21	380	340	0,5640	50000	32,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n21_380C_340bar_2000ml_400Hz_50kx_02.tif	No
89	n22	380	340	0,5640	50000	16,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n22_380C_340bar_2000ml_200Hz_50kx_02.tif	No
93	n23	380	340	0,5640	50000	8,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n23_380C_340bar_2000ml_100Hz_50kx_02.tif	No
97	n24	380	340	0,5640	50000	4,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n24_380C_340bar_2000ml_50Hz_50kx_02.tif	No
101	n25	400	340	0,5640	50000	32,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n25_400C_340bar_2000ml_400Hz_50kx_02.tif	No
105	n26	400	340	0,5640	50000	16,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n26_400C_340bar_2000ml_200Hz_50kx_02.tif	No
109	n27	400	340	0,5640	50000	8,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n27_400C_340bar_2000ml_100Hz_50kx_03.tif	No
113	n28	400	340	0,4609	50000	4,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n28_400C_340bar_2000ml_50Hz_50kx_03.tif	No
117	n29	420	340	0,4609	50000	32,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n29_420C_340bar_2000ml_400Hz_50kx_03.tif	No
121	n30	420	340	0,4609	50000	16,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n30_420C_340bar_2000ml_200Hz_50kx_02.tif	No
125	n31	420	340	0,4609	50000	8,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n31_420C_340bar_2000ml_100Hz_50kx_02.tif	No
129	n32	420	340	0,4609	50000	4,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n32_420C_340bar_2000ml_50Hz_50kx_03.tif	No
133	n33	440	340	0,2984	50000	32,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n33_440C_340bar_2000ml_400Hz_50kx_03.tif	No
137	n34	440	340	0,2984	50000	16,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n34_440C_340bar_2000ml_200Hz_50kx_02.tif	No
141	n35	440	340	0,2984	50000	8,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n35_440C_340bar_2000ml_100Hz_50kx_02.tif	No
145	n36	440	340	0,2984	50000	4,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n36_440C_340bar_2000ml_50Hz_50kx_02.tif	No
149	n37	460	340	0,2115	50000	32,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n37_460C_340bar_2000ml_400Hz_50kx_02.tif	No
153	n38	460	340	0,2115	50000	16,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n38_460C_340bar_2000ml_200Hz_50kx_02.tif	No
157	n39	460	340	0,2115	50000	8,0000	2000	FF	Surface mapping	22.04.2020	100	SOC_n39_460C_340bar_2000ml_100Hz_50kx_02.tif	No

obr. 14a – ukázka části vloženého souboru dat

obr. 14b – ukázka vstupního formuláře

obr. 14c – ukázka tiskového výstupu dle parametrů dotazu

3.4 Použité materiály a chemikálie

Všechny experimenty byly prováděny na křemenných kapilárách (i.d. 100 μm ; o.d. 365 μm) zakoupených od firmy Agilent Technologies, Phoenix, USA. Po extrakci byly kapiláry profukovány dusíkem (purity 3.0.) dodaným společností Linde Gas a.s., Praha, ČR (purity 3.0) po dobu 2 min k odstranění zbytků reakčních produktů a vody. K přípravě vzorků na elektronovou mikroskopii byl použit naprašovací terčík z čistého zlata a speciální samolepící vodivá páska od společnosti Tescan Brno, ČR.

Několikrát redestilovaná voda dále upravená procesem reverzní osmózy Ultra clear UV (SG Wasseraufbereitung and Regenerierstation GmbH, Barsbüttel, Německo) byla před použitím probublána héliem (Linde Gas a.s., Praha, ČR, purity 4. 8.) za účelem vytěsnění rozpuštěného oxidu uhličitého a kyslíku. Pro čištění vnějších povrchů a duralového bloku na vzorky se kvůli nutnosti zachování vysoké čistoty vnitřních prostor elektronového mikroskopu používal Aceton p.a. (Riedel-deHaen, Seelze, SRN).

3.5 Postup práce

3.5.1 Leptání vnitřního povrchu křemenných kapilár

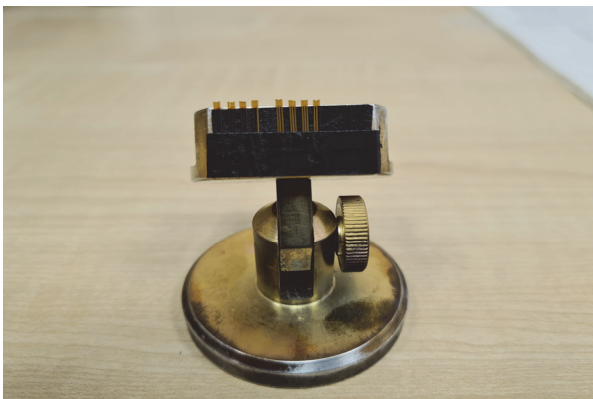
Příprava kapiláry a leptání jejího vnitřního povrchu vyžadovalo provedení několika rutinních kroků. Prvním z nich bylo zapnutí vysokotlaké pumpy vybavené vakuovým degasérem a nastavení potřebné teploty topné jednotky (obr. 12a) na ovládacím panelu systému. Na řídicím počítači (obr. 10_11) jsem spustil program Chromeleon, sloužící k ovládní vysokotlaké pumpy a dále program Sensirion, který zaznamenával informace o přesném průtoku vody z čidla zabudovaném v systému (obr. 10_5). Dalším krokem bylo zapojení leptané křemenné kapiláry o příslušné délce (60 cm) pomocí speciálních vysokotlakých konektorů do systému. Protože extrakce probíhaly za velmi vysokých tlaků, musela být na konec systému připojena kapilára o výrazně menším vnitřním průměru (i.d. 10 μm), tzv. "restriktor" (obr. 10_10), jehož délkou byl ovlivňován průtok SCW systémem. Posledním krokem před zahájením leptání bylo nastavení parametrů programovatelného zařízení, které posunovalo kapiláru topnou jednotkou.

K zvýšení efektivity měření byly experimenty rozděleny do sérií, které měly vždy jeden proměnný parametr. Nejjednodušší byla isobarická měření, kde díky konstantnímu tlaku zůstal nainstalován stále stejný restriktor a nastavována byla pouze požadovaná teplota. Složitějšími již byla izotermická měření (konstantní teplota), kde pro každý nastavený tlak musel být vybrán vhodný restriktor tak, aby byla udržena požadovaná hodnota průtoku. Ve většině experimentů byl průtok nastaven na 2000 nl/min. Pro každou kombinaci tlaku, teploty a průtoku byla také vždy v průběhu leptání 4x změněna rychlost posunu kapiláry (4, 8, 16, 32 mm/min). Z výše uvedeného také vyplývá, že pro různé nastavení tlaků a průtoků bylo potřeba vždy provést výpočet správné délky restriktoru z důvodu vzájemné závislosti těchto dvou parametrů.

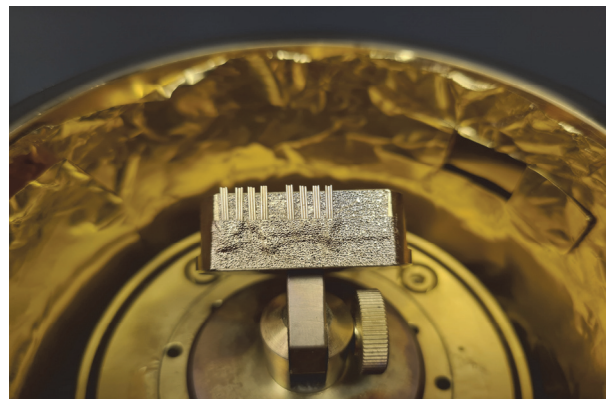
3.5.2 Příprava vzorků pro SEM a jejich fotografování

Použití SEM se ukázalo jako nejvhodnější a nejsnazší metoda k získání informace o struktuře povrchu. Každá leptaná kapilára obsahovala 4 úseky odpovídající čtyřem rychlostem posunu kapiláry. Pro zkoumání vlivu jednotlivých parametrů na vnitřní povrch kapiláry byl každý takový úsek rozřezán keramickým nožem na dílky o délce cca 5-10 mm (obr. 15d). K ověření reprodukovatelnosti a vyloučení případných odchylek byly z každého experimentu nachystány vždy tři vzorky. Celkově tak z jedné kapiláry vzniklo 12 vzorků, které byly následně kolmo přilepeny na duralový blok pomocí speciální oboustranné vodivé lepicí pásky (obr. 15a). Protože SEM, na rozdíl od optického mikroskopu, vyžaduje elektricky vodivé povrchy vzorků, musel být celý duralový blok včetně kapilár pozlacen. K tomuto účelu byl použit přístroj Bal-tec / SCD 500 Sputter Coater, který na vzorky pomocí plazmového výboje v prostředí vakua nanese tenkou vrstvu (12-20 nm) zlata (obr. 15b).

Následně byly pozlacené vzorky vloženy na manipulační stolek a zavedeny pod tubus elektronového mikroskopu TESCAN Mira3 (napětí 10 kV, prac. vzdálenost WD 5 mm, Beam intenzity 10 pA) (obr. 15c).



obr. 15a



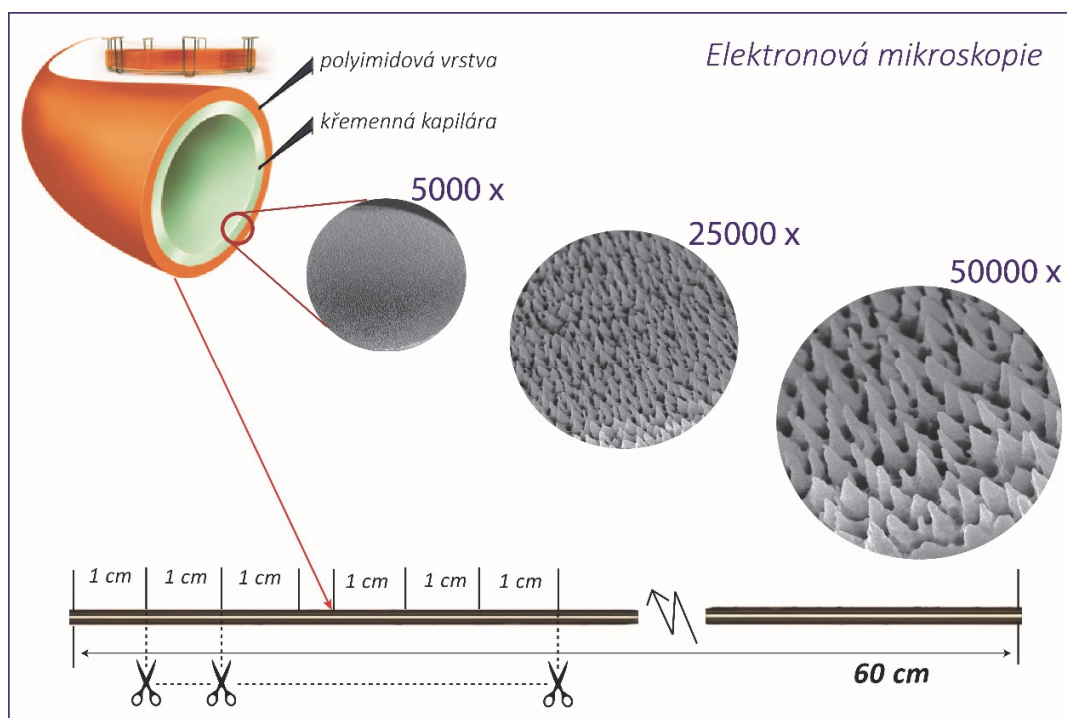
obr. 15b



obr. 15c

U tohoto kroku jsem pouze asistoval, jelikož manipulace s tímto drahým přístrojem vyžaduje praxi a certifikované zaškolení. Z celkového počtu 520-ti experimentů vzniklo 1560 pozlacených

vzorků. Všechny vzorky byly vyfotografovány ve čtyřech zvětšeních (5000x, 10000x, 25000x, 50000x) (obr. 16). Celkově tak vzniklo 6240 snímků a třetina z nich (2080) byla s patričnými údaji uložena do vlastní aplikace v databázovém programu Access.



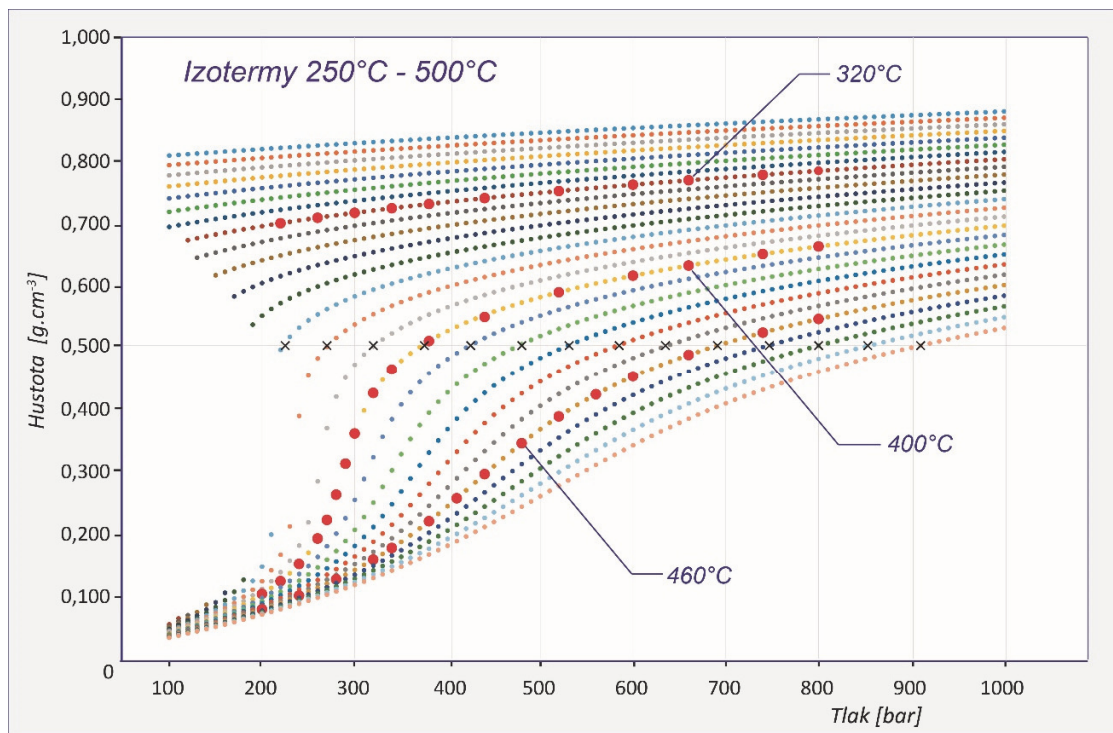
obr. 16 ilustrace řezání kapiláry a místo pořízení snímků

3.5.3 Plán experimentů

Aparatura sestavená na UAICH (obr. 10) umožňuje při extrakci měnit následující parametry: teplotu, tlak, rychlost posunu kapiláry, rychlost průtoku vody, směr průtoku vody, směr a typ posunu kapiláry. Pro tuto práci jsme se rozhodli sledovat změnu vnitřní struktury povrchu kapiláry v závislosti na tlaku a teplotě podrobněji, na průtoku vody a rychlosti posunu kapiláry v omezeném rozsahu, a parametry jako směr průtoku vody, směr pohybu kapiláry a typ posunu kapiláry byly ponechány konstantní. K vytvoření plánu měření se vycházelo z rozsahu teplot (250-500 °C) a tlaků (100-1000 bar), kterých bylo možné v našich podmínkách dosáhnout. Ideálním by bylo zmapování povrchů při všech kombinacích, čímž bychom získali přehled o všech typech dosažitelných struktur. I když uvážíme, že bychom prováděli změny těchto parametrů o 10 °C, resp. 10 bar, potřebovali bychom provést celkem 2250 experimentů. Při změně hodnot dalších parametrů, jako například rychlost posunu kapiláry, průtok vody atd. dochází k znásobení tohoto čísla na desetitisíce až statisíce experimentů.

Jednou z důležitých fyzikálně-chemických veličin definující superkritickou tekutinu je její hustota (určená teplotou a tlakem). Je známo, že rozpustnost látek, v našem případě křemene, je často závislá právě na hustotě rozpouštědla.

Z tohoto důvodu jsme pro plánování experimentů sestrojili graf závislosti hustoty vody na tlaku pro dané teploty, kde každá jedna křivka představuje jednu teplotu. Rozhodli jsme se provést celkem tři izotermická (obr. 17) a pět izobarických měření (obr. 18). První izotermické měření (320°C) mapuje oblast nízkých teplot a vysokých hustot vody, druhé (400°C) se pak pohybuje těsně nad super-kritickou teplotou a představuje přechod od nízkých do vyšších hustot (prostřední křivka) a poslední, 460°C, mapuje oblast nižších hustot vody. Při konstantním průtoku vody 2000 nl/min a celkem čtyř rychlostí posunu kapiláry představovala tato série celkem 172 experimentů (příloha tab.1).

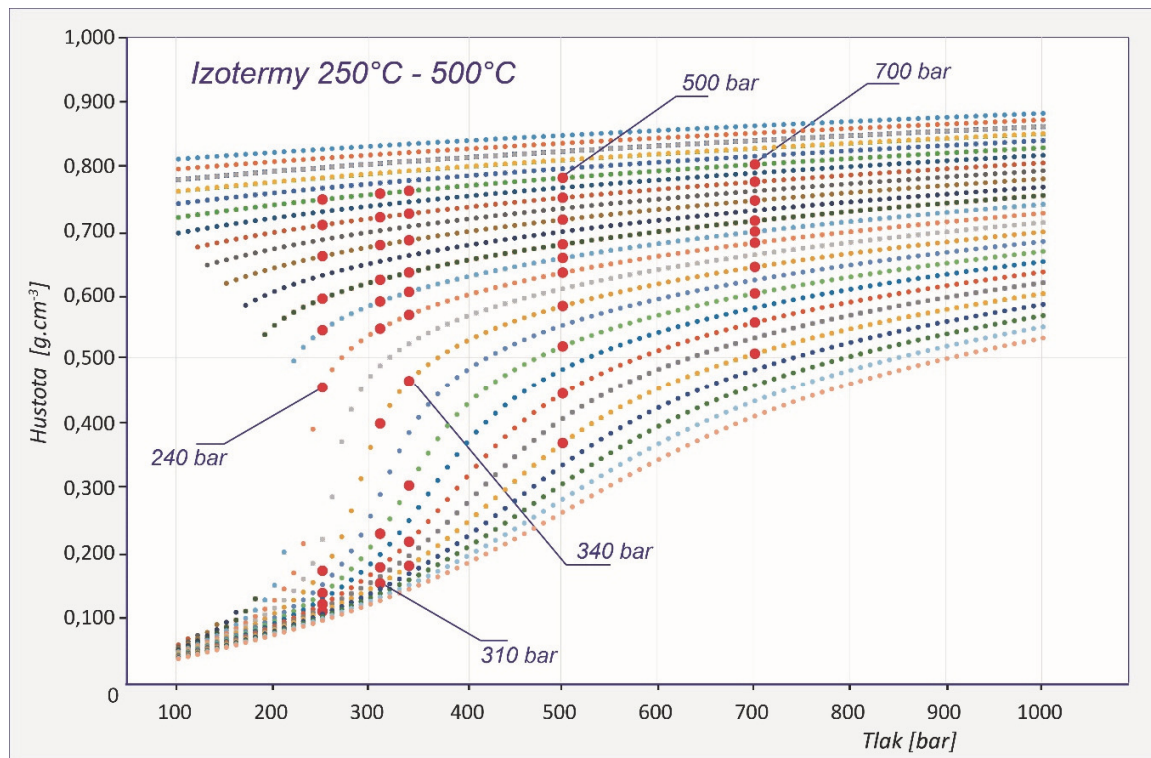


obr. 17 – červené body zobrazují provedené experimenty

Druhá série byla věnována izobarickým měřením (obr. 18). Volba izobar (240, 310, 340, 500, 700 barů) byla provedena tak aby docházelo při experimentech k významným změnám hustoty. Stejně jako v předchozím případě byl každý experiment proveden při čtyřech rychlostech posunu kapiláry, což znamenalo celkem 200 experimentů (příloha tab.1).

Kromě hustoty vody představuje průtok vody systémem druhý nejdůležitější parametr. Protože z kapacitních důvodů nelze všechny předchozí experimenty opakovat s různými průtoky, tak se z výsledků předchozí části měření vybraly takové kombinace tlaků a teplot, které vytvořily zajímavé struktury, a ty pak byly změřeny s pěti jinými průtoky (3000, 4000, 6000, 8000 a 10000 nl/min), celkem 80 experimentů (příloha tab.2). Tato série měření odhalila, že s rostoucím průtokem má struktura povrchu tendenci řádnout a slábnout. Z tohoto důvodu se naplánovala poslední série experimentů s polovičním průtokem 1000 nl/min.

Na základě předchozích výsledných povrchů byla pro tuto sérii vybrána konstantní teplota 400°C se sedmnácti různými hodnotami tlaků (příloha tab.3). Celkově tedy bylo ze všech sérií získáno 520 vzorků, které byly dále analyzovány elektronovou skenovací mikroskopií.



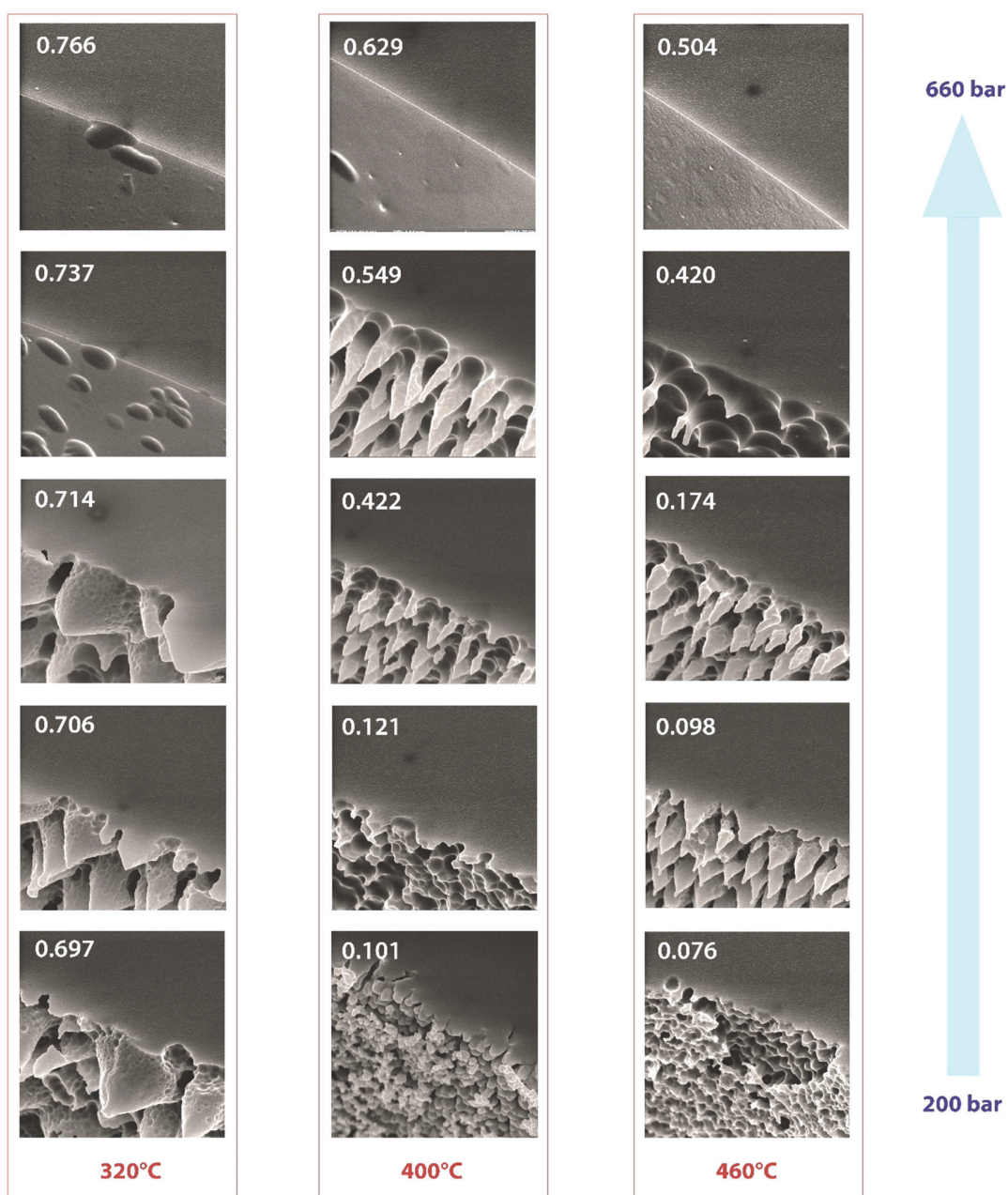
obr. 18 – červené body zobrazují provedené experimenty

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Parametry ovlivňující výslednou strukturu

4.1.1 Závislost na hustotě řízené tlakem

Znázornění vlivu tlaku na tvar struktury vnitřního povrchu kapilár lze vidět na obr. 18. V prvním sloupci jsou struktury získané při leptání pod kritickou teplotou vody (320°C) a při tlacích od 200

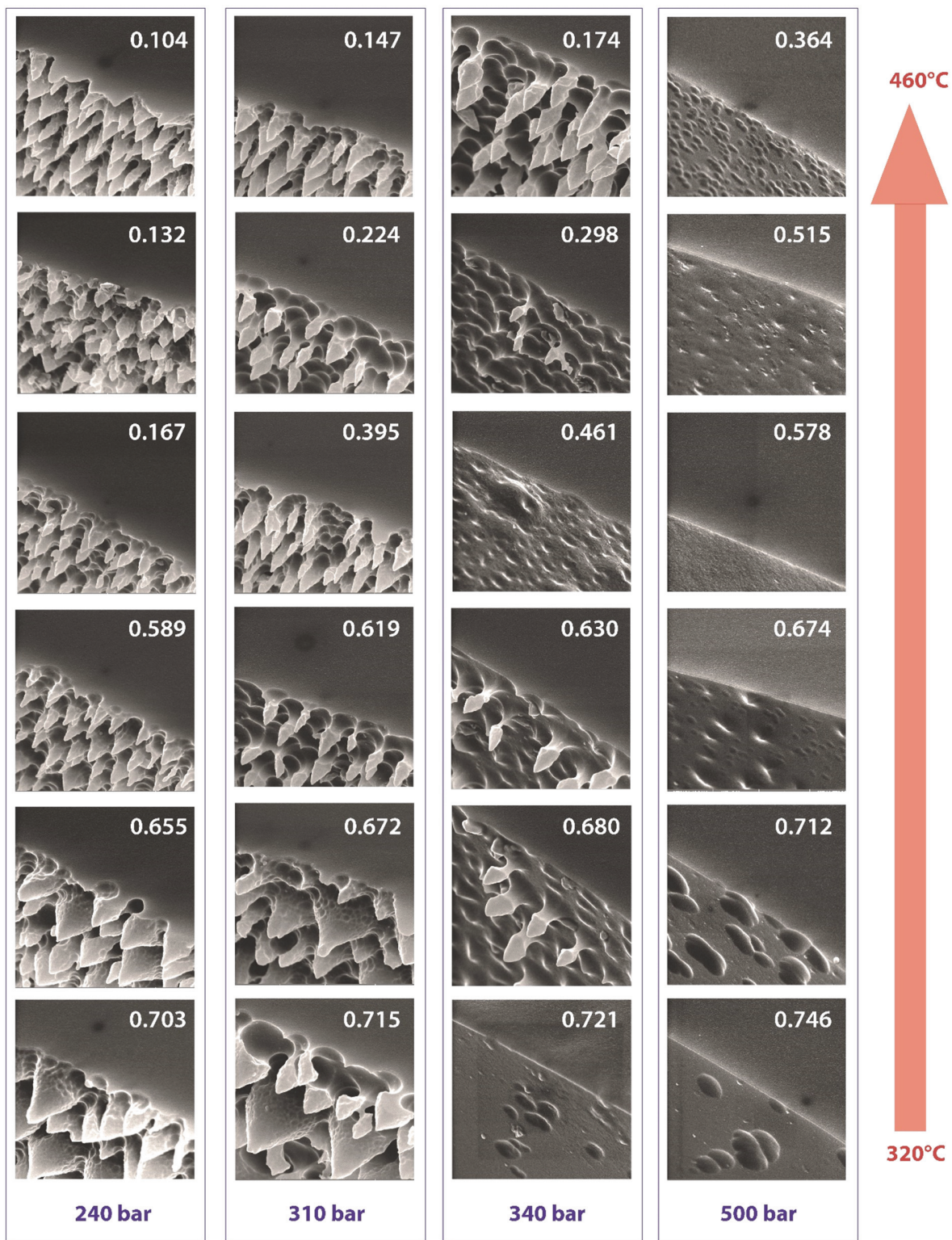


obr. 18 – izotermická měření – hustota řízená tlakem

do 660 bar. V tomto rozsahu má voda relativně vysokou hustotu ($0.697-0,766 \text{ g.cm}^{-3}$) a vytváří spíše nižší kuželovité útvary se širokou základnou. Pokud hustota přesáhne hodnotu 0.720 g.cm^{-3} tvorba těchto útvarů mizí, ale rozpouštění povrchu pokračuje, což dokazoval zvětšený vnitřní průměr kapiláry. Prostřední sloupec (400°C) mapuje chování systému v oblasti, kde i malá změna tlaku iniciuje velkou změnu hustoty $0.101-0.629 \text{ g.cm}^{-3}$ (obr. 16-prostřední křivka). Výsledkem jsou různé typy struktur od jemného „kuličkovitého“ povrchu přes vyleptané „dolíčky“ až po vysoké úzké trny „kartáčového“ charakteru. V posledním sloupci při 460°C a 200 barech lze pozorovat hloubkové podleptávání povrchu, které je pravděpodobně způsobeno extrémně nízkou hustotou vody (0.076 g.cm^{-3}) umožňující její velmi snadné pronikání do mikropórů povrchu. Zvyšující tlak pak podobně jako v předchozím případě produkuje „trny“ jejichž základna se postupně ztenčuje a při 460 bar (0.420 g.cm^{-3}) je natolik tenká, že jsou zbytky trnů proudící vodou ulamovány a ze systému odnášeny.

4.1.2 Závislost na hustotě řízené teplotou

Obrázek 19 představuje teplotní závislost struktury ($320^\circ\text{C}-460^\circ\text{C}$) prezentovanou na čtyřech úrovních tlaku 240, 310, 340 a 500 bar. Při 500 bar a více nedocházelo ke tvorbě žádných struktur, voda o vysoké hustotě odleptávala povrch kapiláry víceméně plošně. Vliv rostoucí teploty na typ a velikost vyleptané struktury byl tím větší, čím nižší tlaková hladina byla použita, nejvýraznějších změn povrchu bylo dosaženo při 240 bar. Mohlo by se zdát, že když tlak a teplota definují hustotu, tak dvě popsané závislosti 4.1.1 a 4.1.2 lze shrnout do jedné: závislosti na hustotě. Takto to ovšem nelze zjednodušit, protože stejné hustoty vody lze dosáhnout při různých kombinacích tlaků a teplot, např. na obr.17 je křížkem pro hustotu vody 0.500 g.cm^{-3} znázorněno celkem 14 takových kombinací. Je zřejmé, že experimenty s konstantní hustotou, tzv. izochorická měření, by byla velmi zajímavá a přinesla by další poznatky o procesu leptání, ale vzhledem k rozsahu a náročnosti měření nejsou již experimenty tohoto druhu možné v rámci této práce.



obr. 19 – izobarická měření – hustota řízená teplotou

4.1.3 Závislost na průtoku superkritické vody

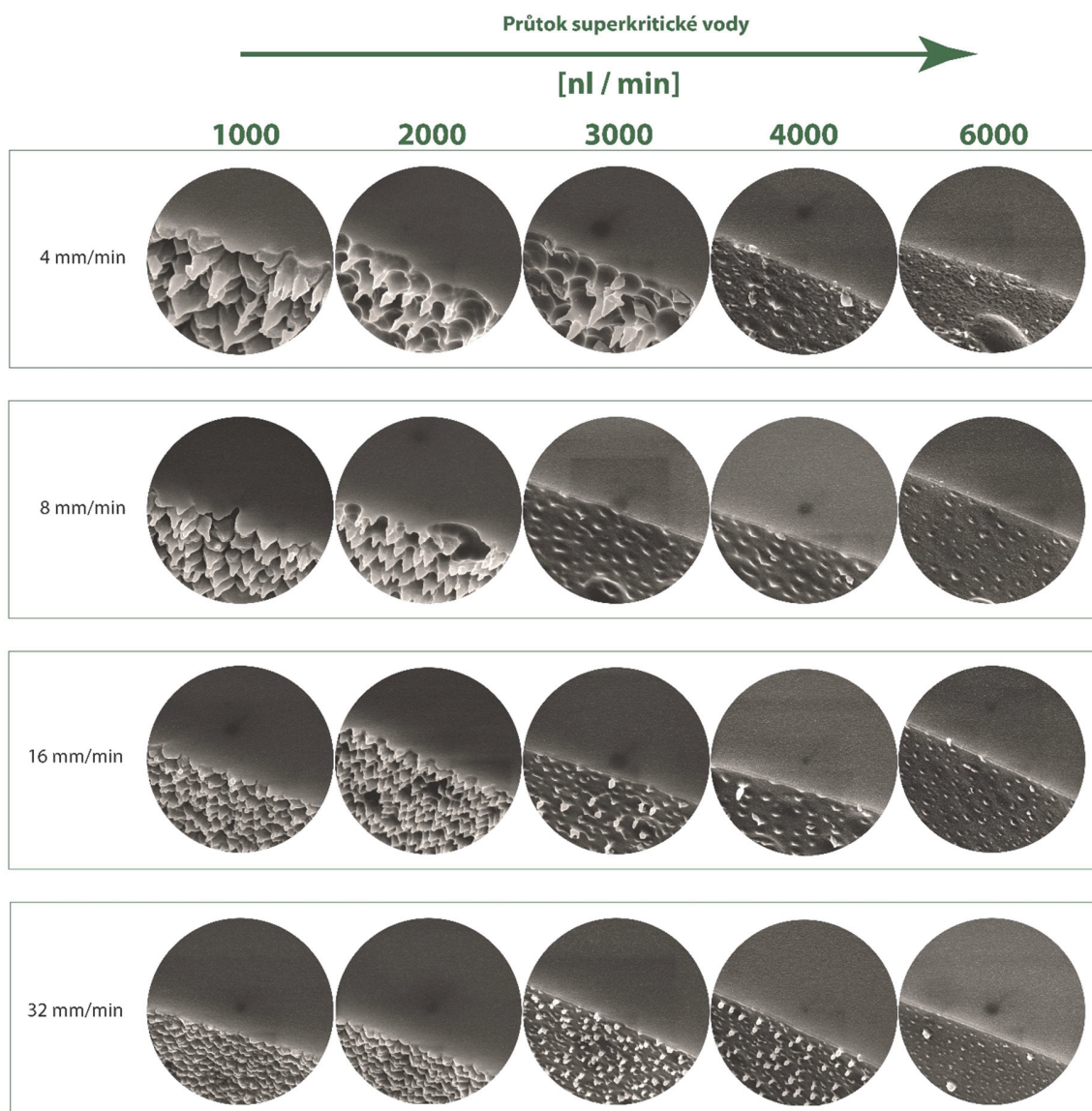
Jak vyplývá z výše uvedeného, cílem první a druhé části našeho plánu experimentů bylo prozkoumat závislost struktury vzniklých povrchů na změnách teploty a tlaku. Jedná se totiž o parametry, které zásadním způsobem ovlivňují fyzikálně chemické vlastnosti superkritické vody a předpokládali jsme tedy jejich největší vliv. Celou proceduru leptání kapilár však nelze zjednodušit pouze na tyto dva “přímé” parametry. Na celý proces leptání je potřeba nahlížet jako na komplex několika dějů, které probíhají buď současně, anebo jeden po druhém. Z tohoto důvodu je tedy nutné uvážit také vliv dalších, vlastnosti vody přímo neovlivňujících parametrů např. rychlosti posuvu kapiláry (kap. 4.1.4) a rychlosti toku vody systémem.

Rychlost průtoku vody hraje zásadní roli při tvorbě leptaného povrchu, a to zejména kvůli jeho vlivu na dynamiku celého procesu, který se odehrává v topné jednotce. Pro bližší představu je třeba zmínit, že studená voda, vstupující do topné jednotky se musí nejprve ohřát na požadovanou teplotu, poté projít přeměnou do superkritického stavu, a především před finálním ochlazením a výstupem z jednotky rozpustit část křemenného povrchu kapiláry. Pro hlavní sadu experimentů byl zvolen průtok vody 2000 nl/min, který se z předběžných testovacích měření ukázal být nejvhodnějším.

Rychlost průtoku, tedy konkrétně množství vody, které projde topným zařízením za jednotku času, tedy přímo ovlivňuje množství rozpuštěného SiO_2 , a tím i vzhled výsledné struktury. Například při průtoku vody 1000 nl/min trvá celý tento proces 4.71s, kdežto v případě průtoku vody 10000 nl/min je to jen 0.417s. Zjednodušeně by se tedy mohlo zdát, že v druhém případě projde systémem více vody a rozpustí se více SiO_2 , ale tak tomu není, protože jednak se voda nestačí dostatečně prohřát a jednak nemá dostatek času k interakci s povrchem. A právě rozhodnutí, kam až lze posouvat průtok vody bylo cílem těchto měření, a tak kromě průtoku 2000nl/min byla vybraná měření ještě zopakována s průtoky vody v rozmezí 1000–10000 nl/min.

Výsledky těchto měření jsou zobrazeny na obrázku 20. Je patrné, že voda při průtoku 1000 nl/min (viz. 4 mm/min) měla dostatek času na řádné prohřátí a rozpuštění povrchu, čímž vytvořila vysoký a hustě strukturovaný reliéf. U průtoků 2000 a 3000 nl/min stále docházelo ke strukturování, ovšem se sníženou hloubkou a četností výběžků. Při vyšších průtocích 4000 a 6000 nl/min už byl povrch atakován jen velmi málo, avšak i takové povrchy mají praktické uplatnění např. pro chemické kotvení separačních fází či úpravu elektroosmotického toku. Nejvyšší průtoky (8000-10000 nl/min-nezobrazeno) pak byly natolik rychlé, že se buď nevytvořila samotná SCW nebo nebyl dostatek kontaktního času na rozpouštění SiO_2 a výsledný efekt na finální povrch byl nulový.

Skutečnost, zda je tento trend obecně platný anebo je ovlivněn také rychlostí posuvu kapiláry, byla otestována měřením při čtyřech různých rychlostech lineárního posuvu kapiláry (obr.20), která se vždy pohybovala opačným směrem, než byl tok vody. Při vyhodnocování pořízených snímků se ukázalo, že byl v případě všech měřených průtoků trend vlivu rychlosti toku vody zachován, a tím lze tedy konstatovat, že se tyto dva parametry vzájemně neovlivňují.

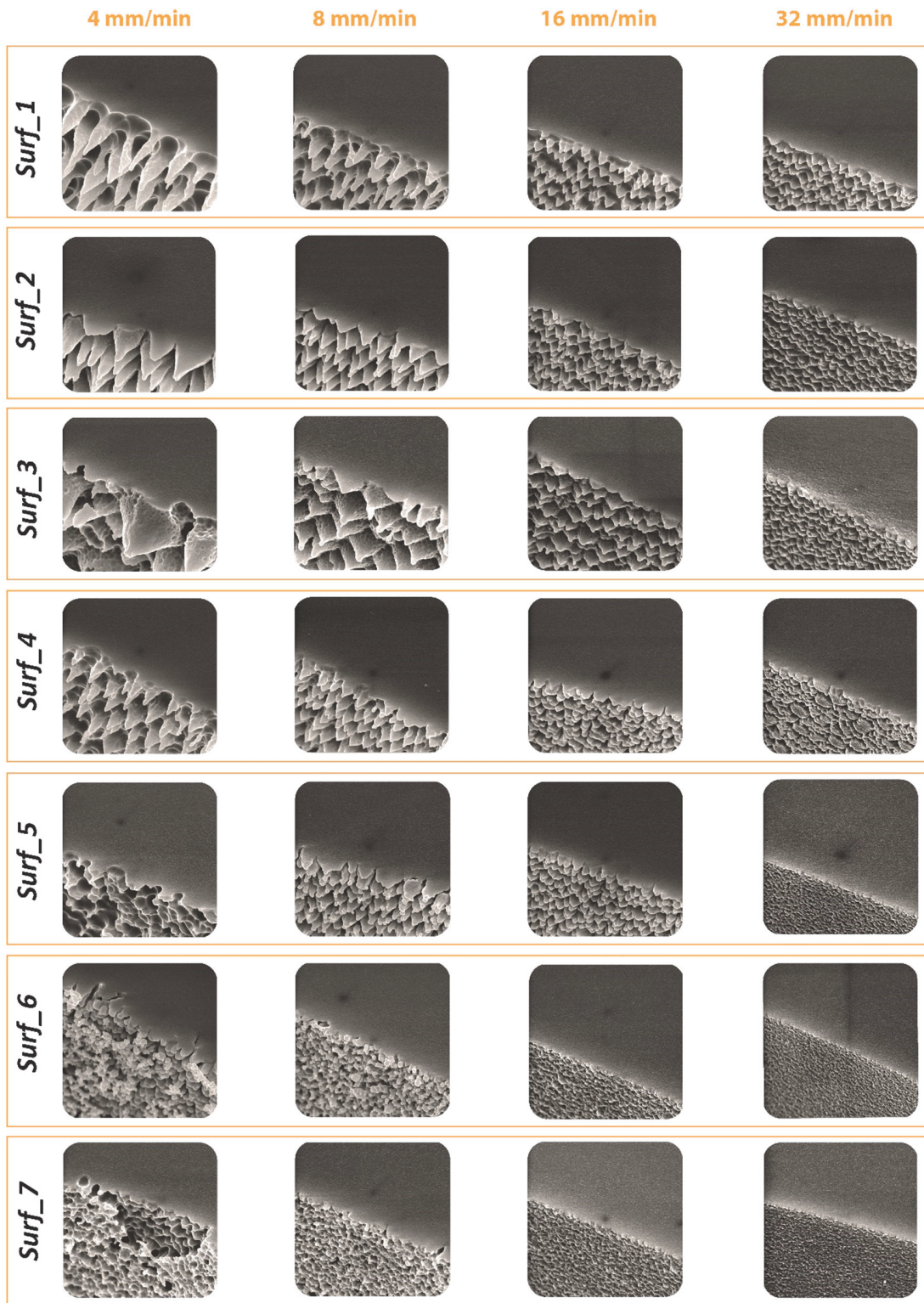


obr. 20 – vliv rychlosti toku superkritické vody

4.1.4 Závislost na rychlosti posuvu kapiláry

Jedním z parametrů, jehož důležitost při ovlivňování povrchu výsledné struktury byla předpokládána již při stavbě aparatury a plánování experimentů, byla lineární rychlost posuvu kapiláry topnou jednotkou. Maximální dosažitelná rychlost posuvu je 83 mm/min a lze ji volit s velmi jemným krokem 0.08 mm/min. Protože tento parametr lze velmi jednoduše změnit bez přerušení samotného měření, byly vždy u každé měřené kombinace teploty, tlaku a průtoku SCW provedeny čtyři experimenty s různými rychlostmi posuvu. Rychlost posuvu v podstatě představuje čas, po který je vnitřní stěna kapiláry v kontaktu s topným zařízením, a tedy také čas, po který může

být povrch tekoucí vodou leptán. Předběžné experimenty naznačovaly poměrně silné narušování vnitřního povrchu již u rychlosti 4 mm/min, která byla zvolena jako výchozí, u pomalejšího



obr. 21 – vliv rychlosti posunu křemenné kapiláry

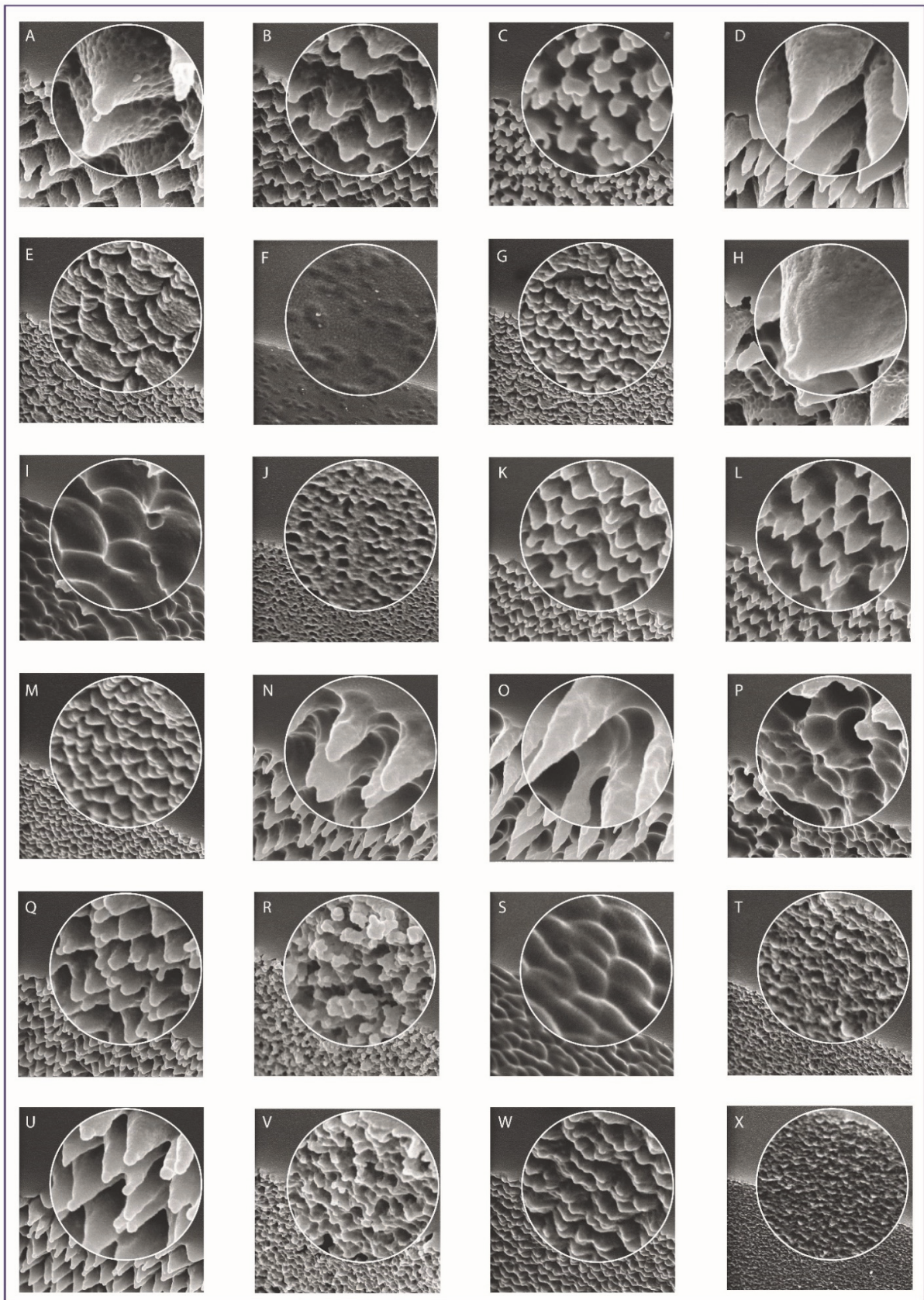
posunu by pak hrozilo u některých experimentů proleptání stěny a prasknutí kapiláry. Abychom mohli sledovat výraznější změny na povrchu, byla vždy každá následující rychlost dvojnásobkem rychlosti předcházející, měřeno tedy bylo při 4, 8, 16 a 32 mm/min, což odpovídá době leptání 150, 75, 37.5 a 18.8 s. Vyhodnocení ukázalo poměrně vzácnou shodu vlivu tohoto parametru u všech sérií snímků, a protože je prakticky nemožné prezentovat všechny, jsou zobrazeny jen vybraní zástupci různě vyhlížejících struktur (Surf_1–Surf_7). Z obrázku 21 je patrné, že s rostoucí rychlostí posunu dochází u všech struktur k postupnému snižování výšky povrchu. V případě, že se jedná o kuželovitou strukturu se širokou základnou, pak při nejvyšších rychlostech dojde buď k otupění špiček (Surf_2, Surf_3) nebo ke vzniku jen samotné základny (Surf_4, 32 mm/min). U struktur s vyleptanými “dolíčky” pak dochází ke zmenšení jejich průměru a ke snížení četnosti výskytu. Obecně však lze učinit závěr, že zvyšující se rychlost posunu snižuje hloubku struktury a prakticky nikdy nemění její charakter. Z praktického hlediska se tak jednoznačně jedná o parametr, při jehož volbě můžeme vzhled výsledné struktury předvídat již před experimentem, a to s vysokou přesností.

4.2 Výběr různých morfologických struktur

Studium vlivu jednotlivých parametrů na hloubku a typ struktury bylo prvním, a poměrně důležitým cílem této práce. Bylo ale také zjištěno, že faktorů ovlivňujících výsledný povrch je více a že procesy probíhající v topném tělese jsou relativně složité a jejich průběh nelze jednoznačně definovat. I přes velké množství experimentů byla proměřena jen menší část experimentálně dostupných kombinací teplot a tlaků (obr. 17). Pokud zohledníme ještě změny rychlosti toku vody a posuvu kapiláry, tak se dokonce jedná o „velmi malou zmapovanou“ oblast možných kombinací. Proto i po vyhodnocení značného množství dat nelze vytvořit nějaký matematický nebo experimentální model umožňující dopředu předpovědět výsledný tvar nebo hloubku struktury. Jistou představu o chování systému jsme však získali a např. dopad změny dynamických parametrů (tok, posuv) dokážeme již velmi slušně odhadnout.

Za nejhodnotnější výstup, vzhledem k dalšímu praktickému využití lze kromě takto originálně upravených kapilár považovat také vznik a postupné plnění databáze. Ta kromě přehledného prohlížení snímků uchovává veškerá experimentální data nezbytná k reprodukovatelné úpravě vnitřního povrchu kapilár.

Pokud se tedy zaměříme na samotné vlastnosti těchto povrchů a budeme hledat jejich uplatnění v analytické praxi, pak hlavním kritériem výběru z databáze by měla být různorodost povrchu. Na obr. 22 je znázorněn set snímků, jejichž výběr byl proveden z databáze právě na základě tohoto kritéria a kde nebyl zohledněn žádný z dříve popisovaných parametrů. Některé z těchto kapilár byly pak použity pro praktická měření, kde dosahovaly jedinečných výsledků (viz. kap. 5), větší část z nich bude podrobena bližšímu výzkumu v průběhu roku 2021.



obr. 22 – vybrané typy struktur

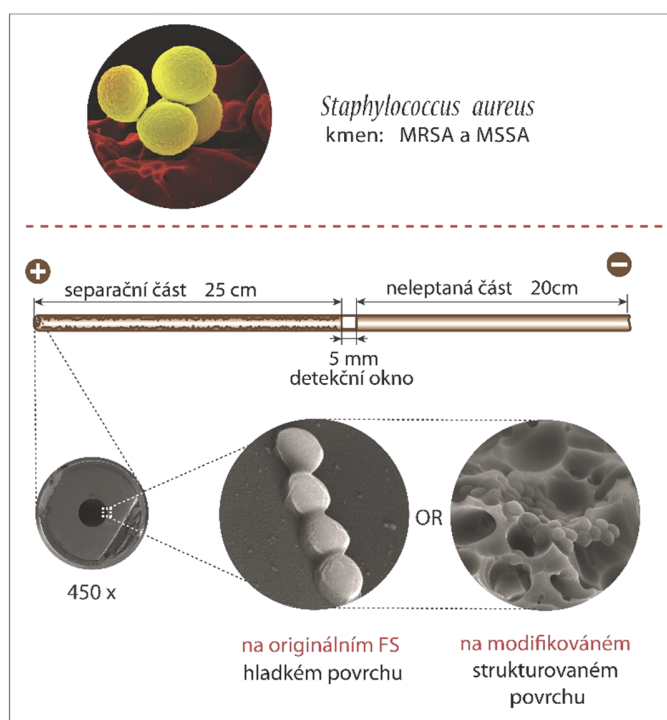
5 VYUŽITÍ V PRAXI

Praktické uplatnění kapilár vyrobených pomocí leptání superkritickou vodou je součástí běžícího výzkumu na UIACH Brno již několik let. V této práci bylo vyrobeno velké množství různých druhů kapilár, které byly průběžně dodávány na specializované oddělení k elektroforetickým analýzám. Protože má práce byla náročná svým experimentálním rozsahem a nakládání s viry a bakteriemi vyžaduje speciálně proškolené pracovníky, byly následující analýzy prováděny Dr. Marií Horkou, které bych chtěl tímto vyjádřit také své poděkování. I když provádění takových odborných analýz je již zcela nad rámec mých možností, průběžně jsem se s dosaženými výsledky seznamoval a zpracoval stručný přehled aplikací demonstrujících „užitečnost“ takto vyrobených kapilár.

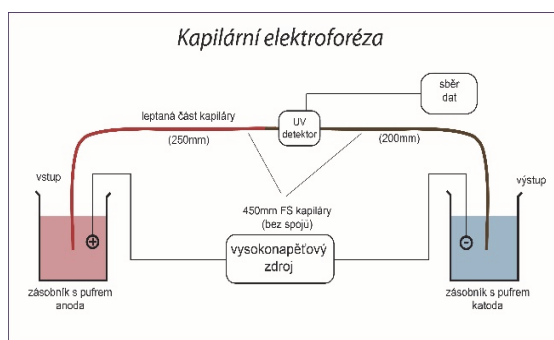
5.1 Separace bakterií druhu *Staphylococcus aureus*

Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA, zlatý stafylokok) je převládající bakteriální patogen zodpovědný za nemocniční a komunitní infekce lidí a zvířat po celém světě. Tyto infekce jsou spojeny s vysokou nemocností a úmrtností ve srovnání s infekcemi způsobenými

na methicilin citlivou variantou *S. aureus* (MSSA). Pro identifikaci a prevenci těchto infekcí je důležité mít spolehlivou metodu, která v krátkém čase rozliší kmeny rezistentní (MRSA) a citlivé na methicilin (MSSA). Současné metody zahrnující polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a jiné molekulární testy jsou obvykle pracné, drahé a časově náročné. Jednou

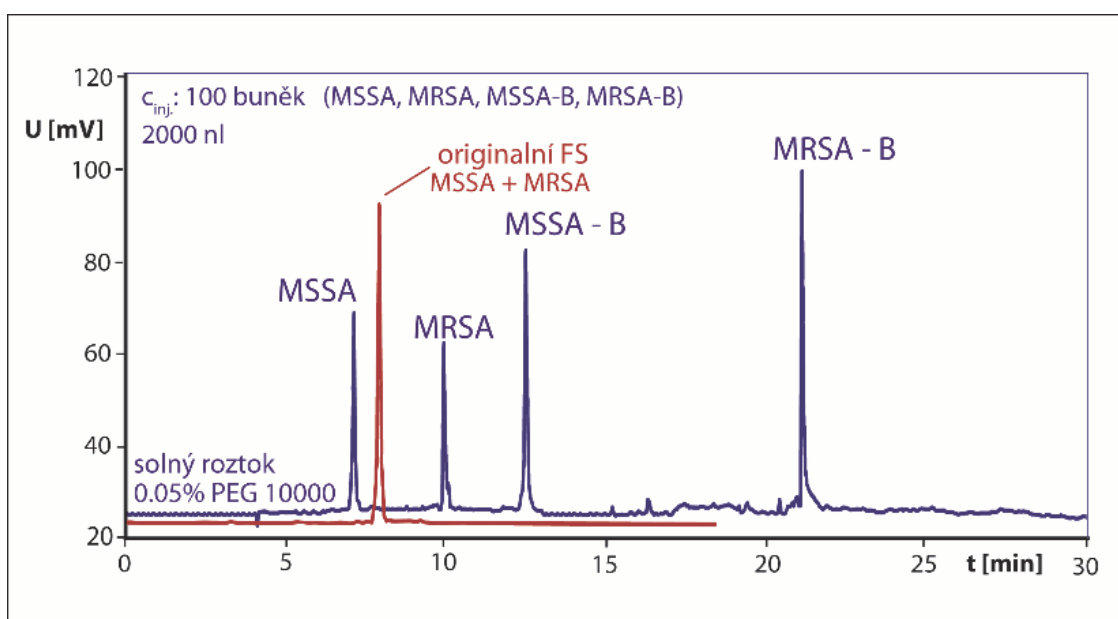


obr. 23 – *S.aureus* na površích kapilár



obr. 24 schéma kapilární elektroforézy

z možností je i využití kapilární elektroforézy (obr.24), která je v klinické praxi běžně zavedenou technikou. Ta je sice schopna odseparovat *S. aureus* od jiných patogenů, nedokáže však již rozdělit jeho jednotlivé kmeny od sebe (obr.25, červená křivka). Zavedením strukturovaného povrchu do části kapiláry (obr. 23) se průběh elektroforetické analýzy změnil natolik, že jsme byli schopni oddělit od sebe nejenom kmeny MRSA a MSSA, ale byli jsme navíc i schopni určit, zda se jedná o kmeny kultivované v laboratoři na misce („v agaru“) anebo zda jde o bakterie namnožené přímo v lidské krvi (MSSA-B a MRSA-B, modrá křivka) a to v čase nepřesahujícím 30 min.



obr. 25 – separace *S.aureus* na originální a leptané kapiláře

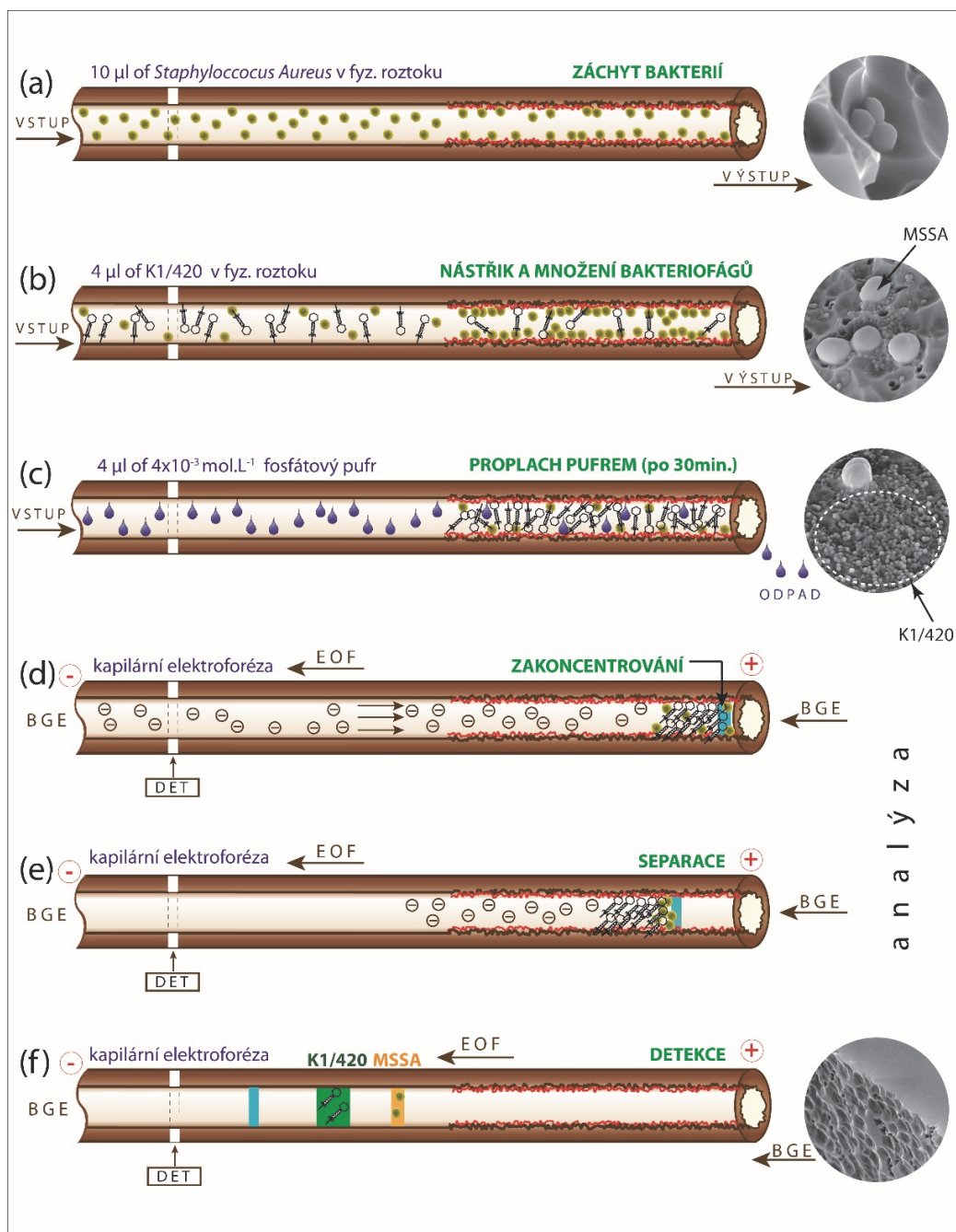
5.2 Replikace a separace bakteriofágů na *Staphylococcus aureus* v kapiláře se strukturovaným povrchem

Bakteriofágy tvoří nejrozšířenější zástupce živočišné říše. Jsou nesmírně důležití v regulaci životního cyklu bakterií. V podstatě každá bakterie na světě má svého „fága“, který je schopen do bakterie proniknout, namnožit se v ní a usmrtit ji, přičemž ostatní bakterie a vyšší organismy nenapadá. Počátky serióznějšího výzkumu bakteriofágů spadají do oblasti Gruzie, do roku 1920, kdy tehdejší vědci dokázali jejich pomocí léčit některé vážné infekce jako cholera, tyfus, diabetická noha, zánět močových cest apod. Velice slibný výzkum byl však zastaven nejen světovými válkami, ale především objevem prvních antibiotik. Ta dostala ve vývoji absolutní přednost a na „fágy“ se zapomnělo. Teprve po válce byl v polské Wroclawi výzkum obnoven a po nadějných výsledcích byla teprve nedávno v roce 1995 otevřena klinika, kde jsou experimentálně léčeni pacienti, pro které již nemá medicína alternativu. Pomocí této terapie dokázali vyléčit přes

80 % pacientů. Nejdůležitějším úkonem je přesné stanovení typu patogenu a použití „správného fága“, po zničení infekce jsou bakteriofágy z těla vyloučeny, a to bez jakýchkoliv vedlejších následků.

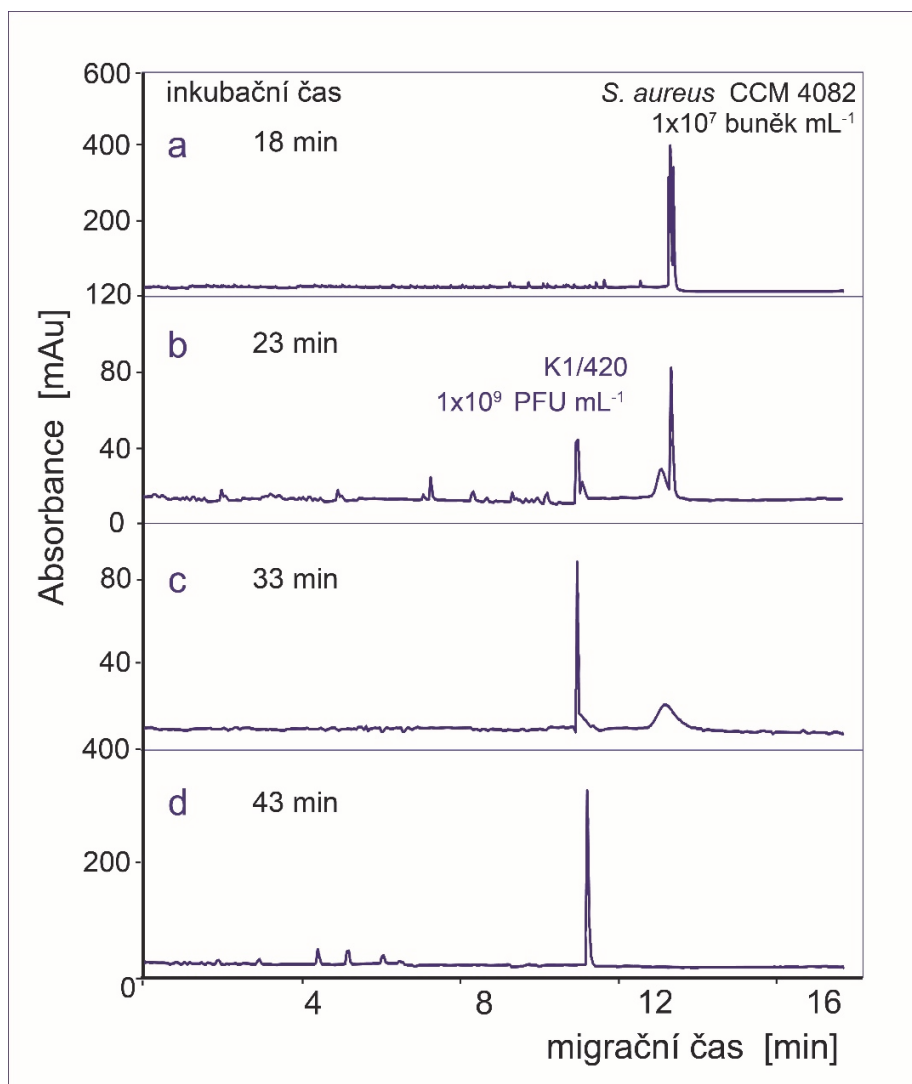
Neustálé nadužívání antibiotik, jejich preventivní nasazení v živočišné výrobě a neustálé zvyšování jejich koncentrace v potravě, řekách a životním prostředí tvoří ideální prostředí, ve kterém mají možnost stávající bakterie rozvíjet svoji odolnost. Nejnovější odhady hovoří o tom, že kolem roku 2050 již zemře více lidí na infekce než na rakovinu. Proto se pozornost vědců opět obrací k bakteriofágové terapii.

V předchozí kapitole bylo ukázáno, jak strukturovaný povrch kapiláry dokáže selektivně zachytávat a separovat bakterie. A právě této vlastnosti lze také využít při studiu mechanismu a rychlosti interakce bakterie-bakteriofág. Na kapiláru s příslušným povrchem (obr. 26) je nejdříve nainjektován roztok s bakterií *S.aureus* (a), které se zde postupně zachytí. Na takto fixované bakterie je následně nanesen roztok s malou koncentrací bakteriofágů (b). Pokud se jedná o „správný typ“ tak dojde k množení těchto fágů na hostitelských bakteriích, a to za jejich současného úbytku. Následuje proplach kapiláry fosfátovým pufrům, který zakoncentruje namnožené fágy v leptané části kapiláry (c) a aplikací vysokého napětí pak dojde ke zpětnému pohybu a elektroforetické separaci jednotlivých složek směrem k detekčnímu oknu (d, e). Po úplném rozdělení složek a jejich detekci (f), lze potom samostatně stanovit množství vzniklých fágů a zaniklých bakterií [26].



obr. 26 – namnožení a stanovení množství nově vzniklých bakteriofágů K1/420

Pokud elektroforetickou separaci budeme spouštět v námi definovaných časech, lze tímto způsobem také zkoumat dynamiku celého procesu, tj. určit za jakou dobu vznikne jaké množství fágů a kolik zanikne bakterií. To nám mimo jiné dává také možnost spočítat kolik fágů je schopno vzniknout replikací na jedné bakterii. Příklad takového měření je na obr. 27, kde po 18 minutách působení ještě nedošlo k měřitelným replikacím, po 43 minutách pak byly všechny bakterie zničeny a na záznamu je vidět pouze segment namnožených bakteriofágů K1/420.

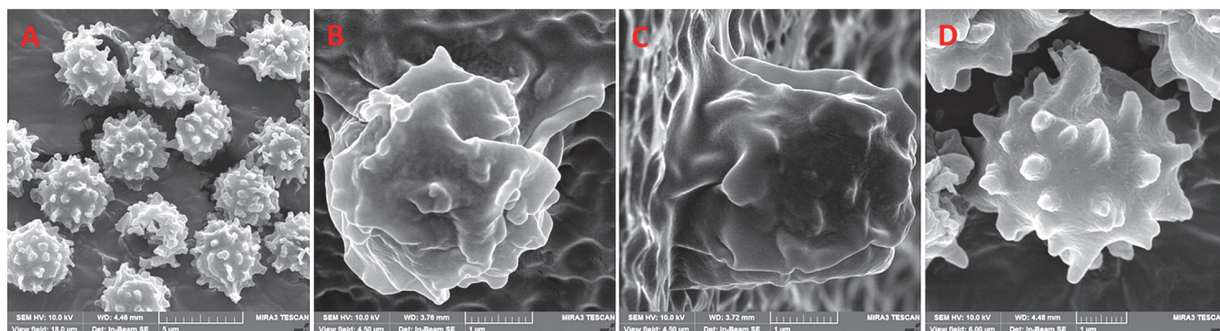


obr. 27 – buněčná smrt *S. aureus* pomocí fágů K1/420 v závislosti na čase

5.3. Rychlé stanovení plísní *Aspergillus* v bronchoalveolárním výplachu

Aspergillus jsou nejběžnější a nejrozšířenější houby způsobující širokou škálu infekcí u lidí, včetně život ohrožujících infekcí u imunokompromitovaných pacientů. *Aspergillus spp.* vylučují do okolí vzdušné konidie (obr.28), které lidé vdechují a patogen se může rozšířit z plic i do jiných orgánů. Imunita hostitele a stav jeho plic jsou klíčové faktory rozhodující o následcích takové expozice. Existuje více než 250 popsanych druhů, z nichž přibližně 40 je původcem lidských infekcí. Nejčastější příčinou infekce je *Aspergillus fumigatus*, následují *A. flavus* a *A. niger*. Protože v případě pozdě zahájené léčby mohou být infekce způsobené *Aspergillus spp.* spojeny s vysokou úmrtností, tak včasná a spolehlivá identifikace tohoto agens je zásadní pro úspěch léčebné terapie.

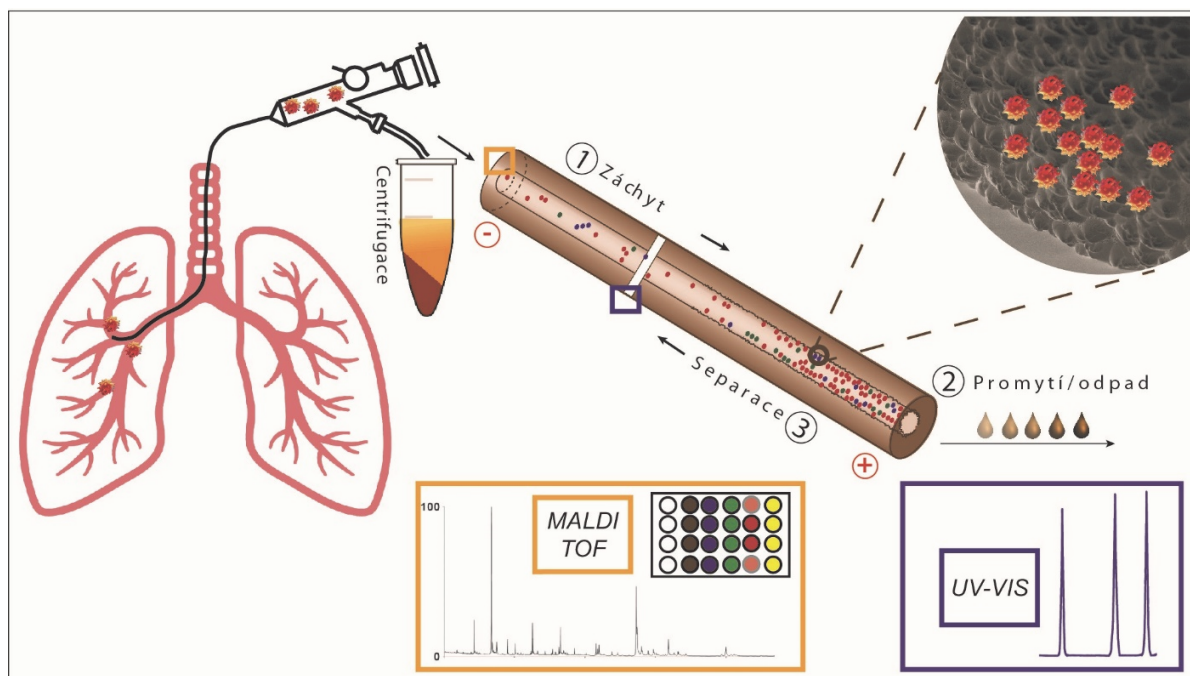
Diagnostika infekcí *Aspergillus*, zejména na počátku onemocnění, je stále docela náročná. Spoléhá se na kombinace radiologických údajů, mikrobiologické nástroje, sérologické detekce protilátek nebo antigeny (β -D-glukan, galaktomannan), PCR analýzy a histopatologické vyšetření.



obr. 28 – konidie zachycené na povrchu kapiláry

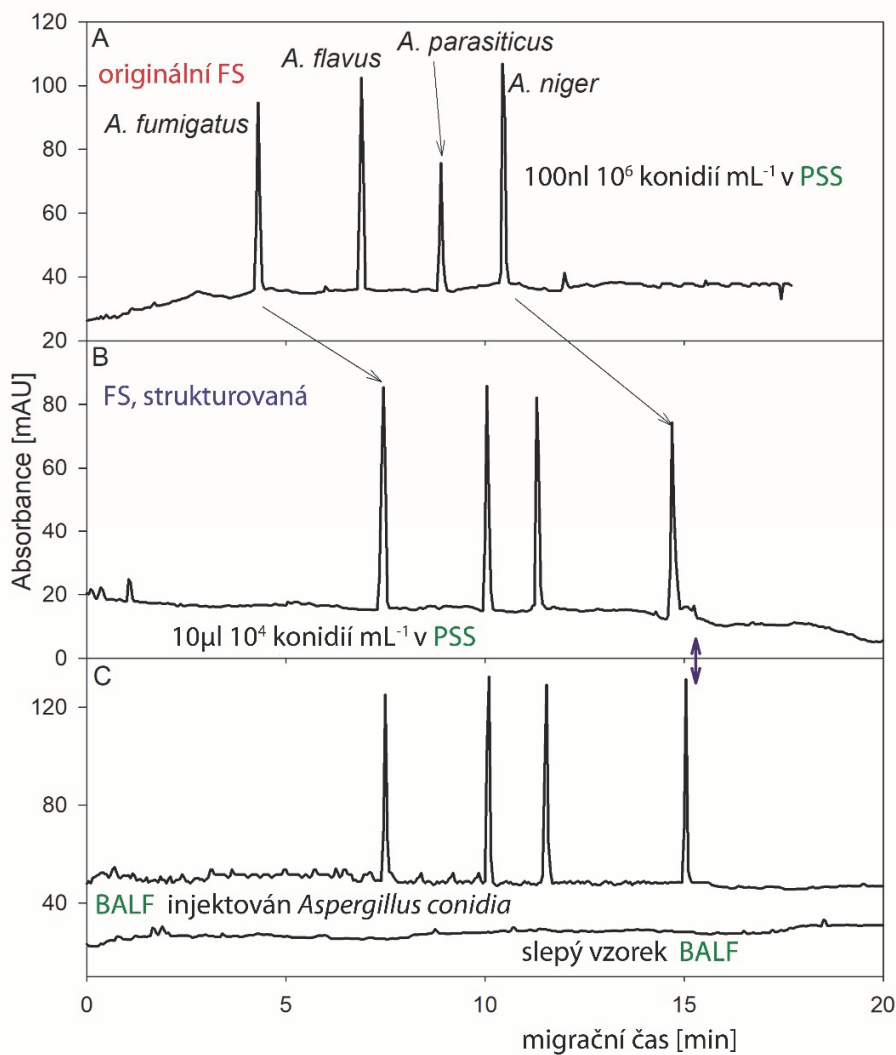
Kultivační metody jsou časově náročné a mají nízký výtěžek, testy založené na protilátkách trpí nízkou citlivostí a biopsie může být pro vysoce nemocné pacienty příliš riskantní.

Novou alternativou, odstraňující většinu těchto nevýhod je spojení leptaných kapilár a micelární kapilární elektrochromatografie. Účelem tohoto řešení není v tomto případě samotná separace látek, ale jejich zakoncentrování a tím řádové zvýšení citlivosti stanovení, navíc prováděné v jednom on-line kroku, tedy beze ztrát. Na obr. 29 je schéma odběru vzorku z plic pacienta, po odstředění následuje nástřik na kapiláru se strukturovaným povrchem (29_1) a proplach při kterém dojde jednak k zachycení cílových analytů a jednak k odstranění části biologické tekutiny (29_2).



obr. 29 – odběr a analýza *Aspergillus* spp. na kapiláře s upraveným povrchem

Po provedení elektrochromatografické separace (29_3) lze z migračního času určit, který patogen vzorek obsahoval (obr. 30) a protože se jedná o nedestruktivní UV-VIS detekci, tak lze zakoncentrovaný analyt na výstupu z kapiláry odchytil a dále podrobit analýze na MALDI-TOF. Tato technika pak pomocí nanosekundového laseru vytvoří spektrum, („otisk prstu“) charakteristické pro každou bakterii, plíseň atd. a tím definitivně potvrdí druh patogenu.



obr. 30 – elektroforeogram plísní *Aspergillus* na původní a leptané kapiláře

Na obrázku A je demonstrována separace čtyř různých druhů *Aspergillus*, která byla prováděna na originální, neleptané kapiláře. Bylo nastříknuto 100 nl roztoku o koncentraci 10⁶ konidií/ml. Použití strukturované kapiláry (B) umožnilo nastříknout větší množství roztoku, ale 100x méně koncentrovaného čímž byla významně zvýšena citlivost stanovení, a to při zachování stále výborných separačních schopností. Na obrázku C je pak již příklad analýzy prováděné novou metodou na skutečném vzorku odebraném pacientovi [27].

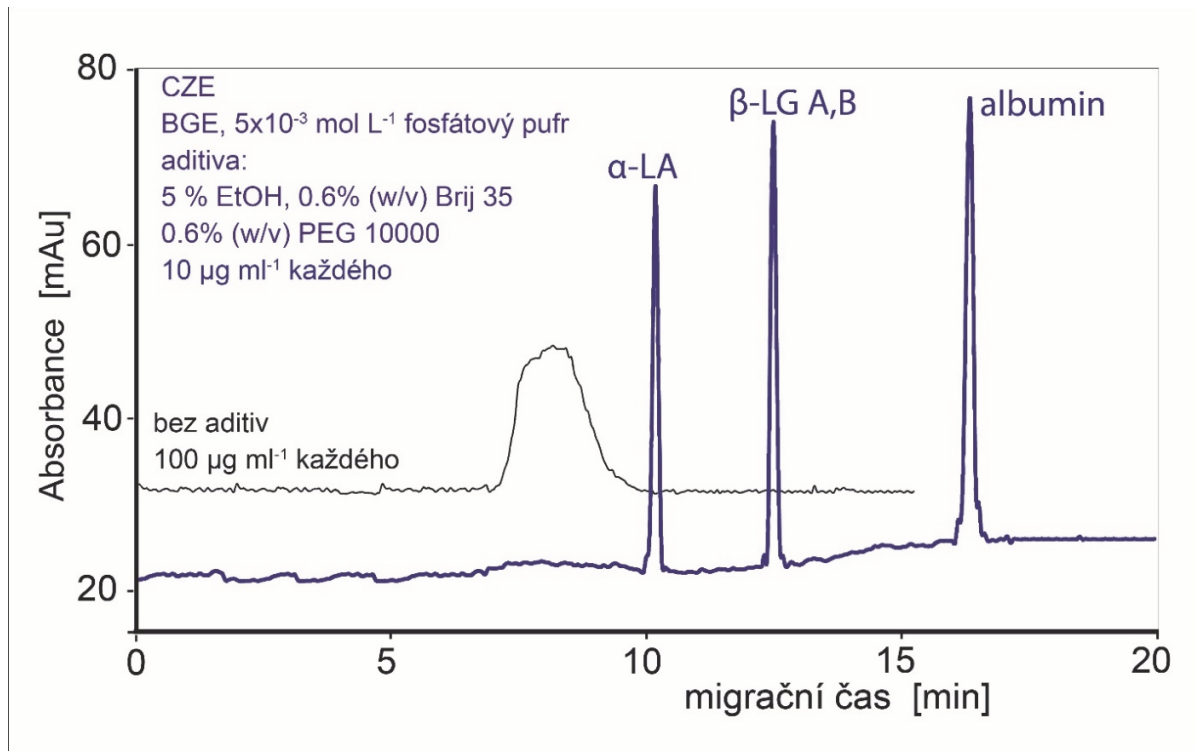
5.4 Stanovení alergenů lactoglobulin A a lactoglobulin B v mléce

Stanovení obsahu proteinů v kravském mléce je důležité nejen z hlediska kontroly jeho kvality, ale také z hlediska lékařského. Mezi nejčastěji studované proteiny nalezené v mléce patří sérový albumin (BSA), α -laktalbumin (α -LA) a β -laktoglobulin (β -LG). BSA jako hlavní protein krevního séra, má mnoho funkcí, včetně udržování osmotického tlaku a pH krve. Kromě toho je důležitý jako látka schopná vázat rozmanité spektrum molekul. Díky těmto mimořádným vazebným schopnostem má BSA širokou škálu klinických, farmaceutických a biochemických aplikací. Méně známým je fakt, že BSA byl také identifikován jako alergen.

α -LA je druhý nejhojnější syrovátkový protein, který má kromě nutričního významu také klíčovou roli v syntéze laktózy.

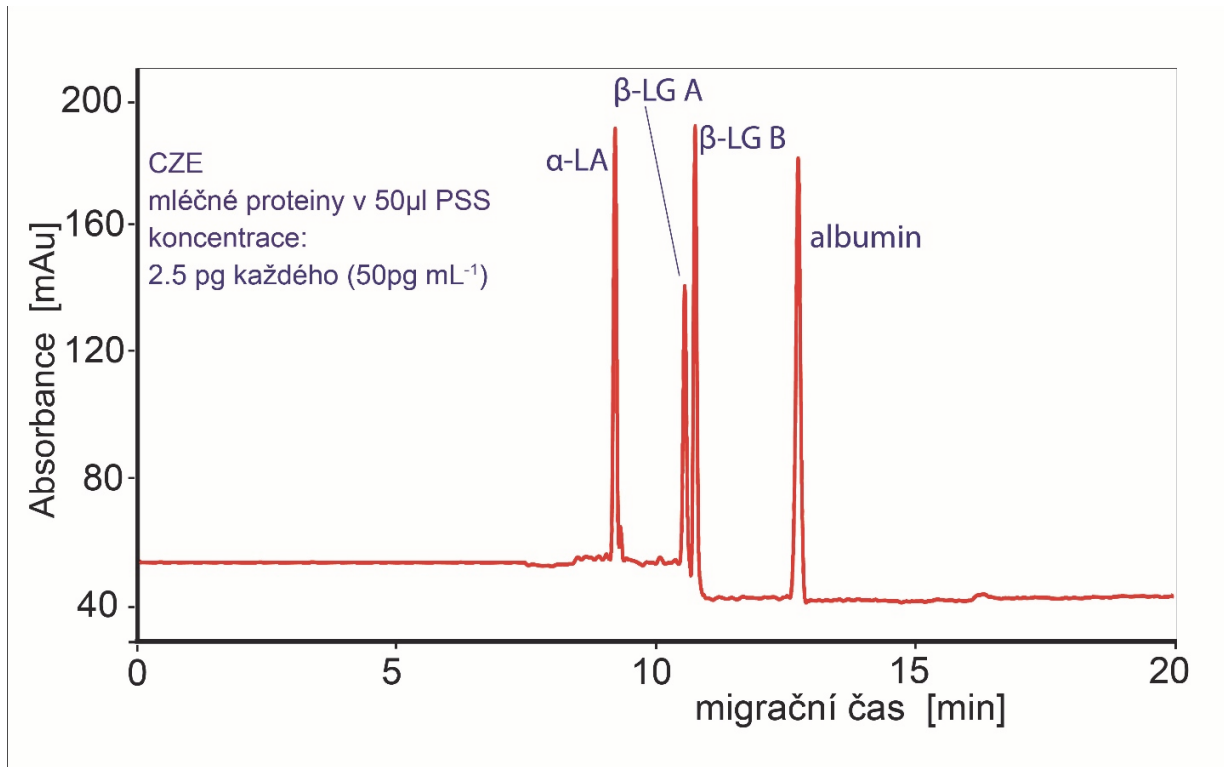
β -LG jsou bílkoviny také obsažené v syrovátce, jejichž biologická funkce je stále nejasná. Bylo popsáno několik genetických variant tohoto proteinu, přičemž varianty A a B jsou nejhojnější. β -LG jsou hlavními alergeny v kravském mléce.

K detekci potravinových alergenů bylo vyvinuto mnoho metod. Stejně jako v předchozích případech však tyto metody vyžadují nákladnou a složitou instrumentaci anebo jsou pracné a časově náročné. Při použití kapilární elektroforézy se standardní hladkou kapilárou bez jakýchkoliv úprav není možné tyto analyty rozdělit a jsou eluovány jako jeden peak (obr. 31-černá). Po úpravě povrchových vlastností kapiláry použitím směsi různých aditiv a optimalizací celého procesu lze docílit částečné separace, nikoliv však rozdělení β -LG-A a β -LG-B (modrá).



obr. 31 – dělení alergenů kravského mléka na neupravené kapiláře

Obrázek 32 pak znázorňuje výsledek, kterého je možné dosáhnout při použití kapiláry s povrchem naleptaným superkritickou vodou, což umožní nejen identifikaci β -LG-A a β -LG-B v mléce, ale i stanovení obsahu každého proteinu zvlášť.



obr. 32 – dělení alergenů kravského mléka na strukturované kapiláře

6 ZÁVĚR

Aplikace a využití superkritické vody v analytické chemii je stále poměrně neznámou a novou technikou. V této práci byl využit potenciál superkritické vody k přípravě křemenných kapilár s rozdílnými strukturami vnitřního povrchu.

Na začátku této studie byly definovány a poté postupně realizovány čtyři hlavní cíle: v praktické části se jednalo o vlastní leptání povrchů kapilár, kde bylo provedeno velké množství experimentů s cílem „zmapovat“ co nejširší oblast dosažitelných teplot a tlaků. Byla také provedena celá řada doprovodných experimentů, kde byly systematicky měněny ostatní parametry procesu, jako např. rychlost toku vody a rychlost posuvu kapiláry, a to tak, abychom mohli posoudit jejich vliv na typ a hloubku vznikající struktury. V druhé, taktéž experimentální části, byly z vyleptaných kapilár připraveny jednotlivé vzorky, které byly nalepeny na nosič, pozlaceny a podrobeny analýze pod elektronovým mikroskopem. Snímky vyleptaných struktur byly pořízeny při zvětšeních 5000x – 50000x. Třetím cílem bylo vytvoření databázové aplikace, do které lze všechny naměřené experimenty uložit včetně obrazové informace a také dotazového nástroje, který umožnil vyhledávat, třídit a porovnávat výsledky jednotlivých experimentů.

Posledním cílem bylo vybrat z naměřených dat takové experimentální podmínky, které umožní výrobu co největšího množství kapilár lišících se výslednou strukturou a její hloubkou. Bylo vybráno celkem 24 různých morfologických struktur; pro tyto struktury pak byly vyrobeny kapiláry s leptanou částí o délce 250 mm a celkovou délkou 500 mm. Na neleptané části kapiláry bylo vyrobeno detekční okénko a kapiláry byly použity pro elektromigrační měření.

Praktická měření jednoznačně prokázala, že strukturování povrchu umožňuje separovat analyty, které nelze separovat na komerčních kapilárách např. lze oddělit stafylokokové kmeny MRSA a MSSA, a navíc je lze ještě dělit na základě původu (agar, lidská krev). Kromě separačních schopností se strukturovaný povrch ukázal být vhodným také pro záchyt bakterií, které potom mohou být infikovány bakteriofágy a lze tak zkoumat jejich vzájemné interakce. Za up-to-date aplikaci lze také považovat stanovení jednotlivých plísní rodu *Aspergillus* ve vzorku přímo odebíraném z plic pacienta. Poslední ukázkou nových možností je stanovení alergenů v mléce.

Závěrem je třeba konstatovat, že i když lze povrch kapiláry do jisté míry narušit hydroxidem sodným nebo směsí založenou na fluorovodíku, vždy půjde jen o jeden typ morfologické struktury, která bude navíc kontaminována cizími heteroatomy, což může být zejména v případě citlivých biologických analýz překážkou. Výhodou použití superkritické vody je zejména čistota výsledného produktu, možnost vytvářet na jedné kapiláře segmenty s rozdílnými strukturami, plná kontrola procesu a obrovské množství kombinací parametrů, umožňujících tvorbu ještě dalších, v této práci neprezentovaných struktur.

7 PŘÍLOHY

Plán experimentů - závislost na hustotě řízené teplotou/tlakem							
Izoterm y (172 experimentů)				Izobary (200 experimentů)			
Průtok=2000 nl za min / FSC=100 pm / Zoom: 5000x, 10000x, 25000x, 50000x							
T [°C]	P [bar]	ρ [g/cm ³]	LRM [mm/min]	P [bar]	T [°C]	ρ [g/cm ³]	LRM [mm/min]
320	800	0,781	4;8;16;32	240	300	0,743	4;8;16;32
	740	0,775	4;8;16;32		320	0,703	4;8;16;32
	660	0,766	4;8;16;32		340	0,655	4;8;16;32
	600	0,759	4;8;16;32		360	0,589	4;8;16;32
	520	0,749	4;8;16;32		370	0,540	4;8;16;32
	440	0,737	4;8;16;32		380	0,451	4;8;16;32
	380	0,728	4;8;16;32		400	0,167	4;8;16;32
	340	0,721	4;8;16;32		420	0,132	4;8;16;32
	300	0,714	4;8;16;32		440	0,115	4;8;16;32
	260	0,706	4;8;16;32		460	0,104	4;8;16;32
	220	0,697	4;8;16;32				
400	800	0,660	4;8;16;32	310	300	0,752	4;8;16;32
	740	0,647	4;8;16;32		320	0,715	4;8;16;32
	660	0,629	4;8;16;32		340	0,672	4;8;16;32
	600	0,612	4;8;16;32		360	0,619	4;8;16;32
	520	0,586	4;8;16;32		370	0,585	4;8;16;32
	440	0,549	4;8;16;32		380	0,543	4;8;16;32
	380	0,507	4;8;16;32		400	0,395	4;8;16;32
	340	0,461	4;8;16;32	420	0,224	4;8;16;32	
	320	0,422	4;8;16;32	440	0,172	4;8;16;32	
	300	0,357	4;8;16;32	460	0,147	4;8;16;32	
	290	0,309	4;8;16;32	340	300	0,756	4;8;16;32
	280	0,259	4;8;16;32		320	0,721	4;8;16;32
	270	0,219	4;8;16;32		340	0,680	4;8;16;32
	260	0,189	4;8;16;32		360	0,630	4;8;16;32
	240	0,149	4;8;16;32		370	0,600	4;8;16;32
	220	0,121	4;8;16;32		380	0,564	4;8;16;32
	200	0,101	4;8;16;32		400	0,461	4;8;16;32
460	800	0,543	4;8;16;32	420	0,298	4;8;16;32	
	740	0,521	4;8;16;32	440	0,212	4;8;16;32	
	660	0,504	4;8;16;32	460	0,174	4;8;16;32	
	600	0,450	4;8;16;32	500	300	0,777	4;8;16;32
	560	0,420	4;8;16;32		320	0,746	4;8;16;32
	520	0,385	4;8;16;32		340	0,712	4;8;16;32
	480	0,342	4;8;16;32		360	0,674	4;8;16;32
	440	0,292	4;8;16;32		370	0,653	4;8;16;32
	410	0,256	4;8;16;32		380	0,630	4;8;16;32
	380	0,217	4;8;16;32		400	0,578	4;8;16;32
	340	0,174	4;8;16;32	420	0,515	4;8;16;32	
	320	0,156	4;8;16;32	440	0,441	4;8;16;32	
	280	0,124	4;8;16;32	460	0,364	4;8;16;32	
	240	0,098	4;8;16;32	700	300	0,780	4;8;16;32
200	0,076	4;8;16;32	320		0,770	4;8;16;32	
			340		0,741	4;8;16;32	
			360		0,710	4;8;16;32	
			370		0,693	4;8;16;32	
			380		0,676	4;8;16;32	
			400		0,638	4;8;16;32	
			420	0,597	4;8;16;32		
			440	0,552	4;8;16;32		
			460	0,504	4;8;16;32		

Tab.1

Plán experimentů - závislost na průtoku SCW (80 experimentů)									
FCS=100 pm / Zoom: 5000x, 10000x, 25000x, 50000x									
T [°C]	P [bar]	Průtok [nl/min]	ρ [g/cm ³]	LRM [mm/min]	T [°C]	P [bar]	Průtok [nl/min]	ρ [g/cm ³]	LRM [mm/min]
320	310	3000	0,715	4;8;16;32	400	340	3000	0,461	4;8;16;32
		4000	0,715	4;8;16;32			4000	0,461	4;8;16;32
		6000	0,715	4;8;16;32			6000	0,461	4;8;16;32
		8000	0,715	4;8;16;32			8000	0,461	4;8;16;32
		10000	0,715	4;8;16;32			10000	0,461	4;8;16;32
320	340	3000	0,721	4;8;16;32	460	560	3000	0,420	4;8;16;32
		4000	0,721	4;8;16;32			4000	0,420	4;8;16;32
		6000	0,721	4;8;16;32			6000	0,420	4;8;16;32
		8000	0,721	4;8;16;32			8000	0,420	4;8;16;32
		10000	0,721	4;8;16;32			10000	0,420	4;8;16;32

Tab.2

Průtok 1000 nl/min (68 exp.)		
T=400 °C / Průtok=1000 nl za minutu		
FSC=100 pm		
Zoom: 5000x, 10000x, 25000x, 50000x		
P [bar]	ρ [g/cm ³]	LRM [mm/min]
800	0,660	4;8;16;32
740	0,647	4;8;16;32
660	0,629	4;8;16;32
600	0,612	4;8;16;32
520	0,586	4;8;16;32
440	0,549	4;8;16;32
380	0,507	4;8;16;32
340	0,461	4;8;16;32
320	0,422	4;8;16;32
300	0,357	4;8;16;32
290	0,309	4;8;16;32
280	0,259	4;8;16;32
270	0,219	4;8;16;32
260	0,189	4;8;16;32
240	0,149	4;8;16;32
220	0,121	4;8;16;32
200	0,101	4;8;16;32

Tab.3

8 Seznam citované literatury

- [1] Anastas, P.; Farris, C. (Eds.): *Benign by Design: Alternative Synthetic Design for Pollution Prevention*; American Chemical Society: Washington (DC), 1994.
- [2] Jessop, P.; Leitner, W. *Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids*; Wiley-VCH: Weinheim, 1999.
- [3] Welton, T. *Chem. Rev.* 1999, 99, 2071–2083.
- [4] Earle, M.; Seddon, K. *Pure Appl. Chem.* 2000, 72, 1391–1398.
- [5] Lu, J.; Brown, J. S.; Boughner, E. C.; Liotta, C. L.; Eckert, C. A. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2002, 41, 2835–2841.
- [6] Eckert, C. A.; Liotta, C. L.; Bush, D.; Brown, J. S.; Hallett, J. P. *J. Phys. Chem. B* 2004, 108, 18108–18118.
- [7] Shaw, R. W.; Brill, T. B.; Clifford, A. A.; Eckert, C. A.; Franck, E. U. *Chem. Eng. News* 1991, 69, 26–39.
- [8] Weingärtner, H.; Franck, E. U. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 2672–2692.
- [9] Brunner, E.; Thies, M. C.; Schneider, G. M. *J. Supercrit. Fluids* 2006, 39, 160–173.
- [10] Kruse, A.; Dinjus, E. *J. Supercrit. Fluids* 2007, 39, 362–380.
- [11] Lochmuller Ch. *J. Chrom. Sci.* 1987, 25, 583–591.
- [12] Dandeneau, R. D.; Zerenner, E. H. *J. High Resolut. Chrom.* 1979, 2, 351–356.
- [13] Pesek, J. J.; Matyska, M. T. *J. Chromatogr. A* 1996, 736, 255–264.
- [14] Gelfi, C.; Curcio, M.; Righetti, P. G.; Sebastiano, R.; Citterio, A.; Ahmadzadeh, H.; Dovichi, N. J. *Electrophoresis* 1998, 19, 1677–1682.
- [15] Dhanesar, S. C.; Coddens, M. E.; Poole, C. F. *J. Chromatogr. Sci.* 1985, 23, 320–324.

- [16] Woldegiorgis, A.; Jansson, K.; Curcio, M.; Roeraade, J. *Electrophoresis* 2004, 25, 3660–3668.
- [17] Woldegiorgis, A.; Jansson, K.; Roeraade, J. *J. Mater. Sci.* 2005, 40, 583–589.
- [18] Zychová M.; Růžičková M.; Macák J.; Janda V.; *Chem. Listy* 2013, 107, 126-135
- [19] Fournier, R. O.; Rowe, J. J. *Am. Mineral.* 1977, 62, 1052–1056.
- [20] Fournier, R. O.; Marshall, W. L. *Geochim. Cosmochim. Acta* 1983, 47, 587–596.
- [21] Anderson, G. M.; Burnham, C. W. *Am. J. Sci.* 1965, 263, 494–511.
- [22] Newton, R. C.; Manning, C. E. *Am. Mineral.* 2009, 94, 1287–1290.
- [23] Karásek, P.; Grym, J.; Roth, M.; Planeta, J.; Foret, F. *Lab Chip* 2015, 15, 311–318.
- [24] Šlais, K.; Horká, M.; Karásek, P.; Planeta, J.; Roth, M. *Anal. Chem.* 2013, 85, 4296–4300.
- [25] Horka, M.; Slais, K.; Karasek, P.; et al. *J. Sep. Sci.* 2016, 39, 3827-3834.
- [26] Horka, M.; Karasek, P.; Roth, M.; et al. *Talanta*, 2021, 224, 121800.
- [27] Salplachta, J.; Horka, M.; Karasek, P.; et al. *Analytical Chemistry*, 2020, 92, 7588-75 .