

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie



Testování optických vlastností Quantum-Dots nanočástic I.

Vedoucí diplomové práce: Doc. PhamDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Hradec Králové 2014

Edita Klusoňová

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové.....

.....

Edita Klusoňová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především vedoucí mé diplomové práce Doc. PhamDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a za pomoc při zpracování. Také bych chtěla poděkovat mé rodině za jejich podporu při studiu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Edita Klusoňová

Školitel: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Název diplomové práce: Testování optických vlastností Quantum-Dots nanočástic I.

Tato diplomová práce se zabývá testováním optických vlastností Quantum-Dots nanočástic (QDs), které byly ověřovány jako zesilovače chemiluminiscenčního (CL) signálu. K reakci byl použit luminol (5-aminoftalylhydrazid) v bazickém prostředí roztoku NaOH, který byl oxidován peroxidem vodíku za přítomnosti katalyzátoru hexakyanoželezitanu draselného. Experiment probíhal v systému sekvenční injekční analýzy (SIA) s využitím detekce ve spirální průtokové cele detektoru Schoeffel. Při reakci byly testovány různé koncentrační hladiny QD nanočástic, s orientací zejména na nízké koncentrace. Testovány byly roztoky QD nanočástic s různým emisním maximem a úpravou povrchu, které byly připravené na Oddělení bioanalytické instrumentace v Ústavu analytické chemie v Brně. Jednalo se o tyto modifikátory povrchu CdTe nanočástic: merkaptopropionová kyselina (MPA 520 nm, MPA 540 nm, MPA 636 nm), thioglykolová kyselina (TGA 620 nm), merkaptoethylamin (NH_2 590 nm) a částice CdTe/CdS obalené merkaptopropionovou kyselinou (MPA CdTe/CdS 640 nm). U každé nanočástice proběhlo srovnání s měřením bez QD a porovnání i v rámci opakovatelnosti měření. Dále bylo u každého typu provedeno tzv. stop-flow měření, které se uskutečnilo vždy u téhož roztoku, u kterého byla zjištěna největší intenzita chemiluminiscence. Vše bylo vyhodnoceno výškou signálu a plochou (nárůst a délka trvání CL signálu). Během experimentálního měření šesti typů analyzovaných QD nanočástic bylo zjištěno, že se největší nárůst intenzity chemiluminiscence vyskytl u QD NH_2 s emisním maximem 590 nm, a to o 42,28 %. K největšímu zesílení signálu za využití stop-flow měření došlo u QD NH_2 590 nm, a to o 91,02 %, avšak u této nanočástice byla zaznamenána i nejkratší signální odezva.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Edita Klusoňová

Supervisor: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Testing optical properties of Quantum-Dots nanoparticles I.

The diploma thesis deals with testing optical properties of Quantum-Dots nanoparticles (QDs), which have been verified as chemiluminescence (CL) signals enhancers. For the reaction luminol (5-aminophthalhydrazide) was used in alkaline medium, which was oxidized by hydrogen peroxide in the presence of catalyst potassium ferricyanide. The experiment was performed in the sequential injection analysis (SIA) system using detection in spiral flow cell Schoeffel. Different concentration levels of QDs nanoparticles were tested with main focus on low concentrations. QDs solutions with different emission maxima and surface modification were tested, which were prepared at the Department of bioanalytical instrumentation in the Institute of Analytical Chemistry in Brno. The following modifications of CdTe nanoparticles were used: mercaptopropionic acid (MPA 520 nm, MPA 540 nm, MPA 636 nm), thioglycolic acid (TGA 620 nm), mercaptoethylamine (NH₂ 590 nm) and CdTe/CdS particles coated with mercaptopropionic acid (MPA CdTe/CdS 640 nm). Every particle was compared with measuring without QDs as well as repeatability of measurements. Further stop-flow measuring was performed for every particle in solution in which the highest intensity of chemiluminescence had been found. Everything was evaluated by signal height and area (increase and length of CL signal). Data obtained during experimental measuring 6 kinds of QDs nanoparticles showed, that the highest increase of chemiluminescence was recorded using QD NH₂ with emission maximum at 520 nm, the procentual increase was of 42.28%. In case of peak area evaluation the best enhancing effect was found for QDs NH₂ with maximum emission occurs at 590 nm, the procentual enhancing was of 91.02 %, however, the shortest signal was recorded for this nanoparticle.

Obsah

1. Úvod	9
2. Cíl a popis zadání práce	10
3. Teoretická část	11
3.1. Sekvenční injekční analýza	11
3.2. Luminiscence	13
3.2.1. Chemiluminiscence	13
3.2.2. Chemiluminiscence luminolu	14
3.2.3. Použití luminolu	15
3.3. Nanočástice	16
3.3.1. Příprava nanočástic	16
3.3.2. Využití nanočástic	17
3.3.3. Farmaceutické využití nanočástic	17
3.4. Quantum-dots	18
3.4.1. Různé použití Quantum-Dots nanočástic	20
4. Experimentální část	23
4.1. Materiál	23
4.1.1. Použité chemikálie	23
4.1.2. Roztoky	23
4.1.3. Přístroje	24
4.2. Průběh měřicího cyklu	26
4.2.1. Stop-flow měření	27
4.3. Optimalizace chemiluminiscenční detekce	28
4.4. Vyhodnocení změřeného signálu	28
5. Výsledky měření a diskuze	29
5.1. NANOČÁSTICE TGA 620 nm	29
5.2. NANOČÁSTICE MPA 520 nm	33

5.3. NANOČÁSTICE MPA 540 nm	37
5.4. NANOČÁSTICE MPA 636 nm	41
5.5. NANOČÁSTICE MPA (CdTe/CdS) 640 nm.....	45
5.6. NANOČÁSTICE NH ₂ 590 nm	49
6. Shrnutí.....	53
7. Závěr	57
Seznam obrázků	58
Seznam tabulek	60
Seznam použité literatury a ostatních zdrojů.....	61

Seznam použitých zkratek

CL	chemiluminiscence
CRET	chemiluminiscenční přenos energie (Chemiluminiscence Resonance Energy Transfer)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
FIA	průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)
FRET	fluorescenční přenos energie (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
GSH	glutathion
HRP	křenová peroxidáza (horseradish peroxidase)
Ig G	imunoglobulin G
MPA	merkaptopropionová kyselina (mercaptopropionic acid)
PEG	polyethylenglykol
PL	fotoluminiscence
QDs	kvantové tečky (Quantum-Dots)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
ROS	reaktivní forma kyslíku (Reactive Oxygen Species)
RSD	relativní směrodatná odchylka (Relative Standard Deviation)
SD	směrodatná odchylka (Standard Deviation)
SIA	sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis)
TGA	thioglykolová kyselina (thioglycolic acid)

1. Úvod

Diplomová práce pojednává o testování optických vlastností Quantum-Dots nanočástic založeném na jejich využití jako zesilovačů chemiluminiscenčního signálu. Tyto vlastnosti byly testovány technikou sekvenční injekční analýzy, která umožňuje analýzu velkého počtu vzorků, a která slouží ke stanovení různých analytů v krátkém čase. Na rozdíl od jiných průtokových systémů využívá změnu přímého a zpětného toku pro efektivní mísení aspirovaných zón jednotlivých roztoků. Jako detektory sekvenční injekční analýzy se používají například spektrofotometry, fluorimetry nebo elektrochemické detektory, v tomto případě byl využit fotonásobič, který sloužil k detekci chemiluminiscenčního signálu.

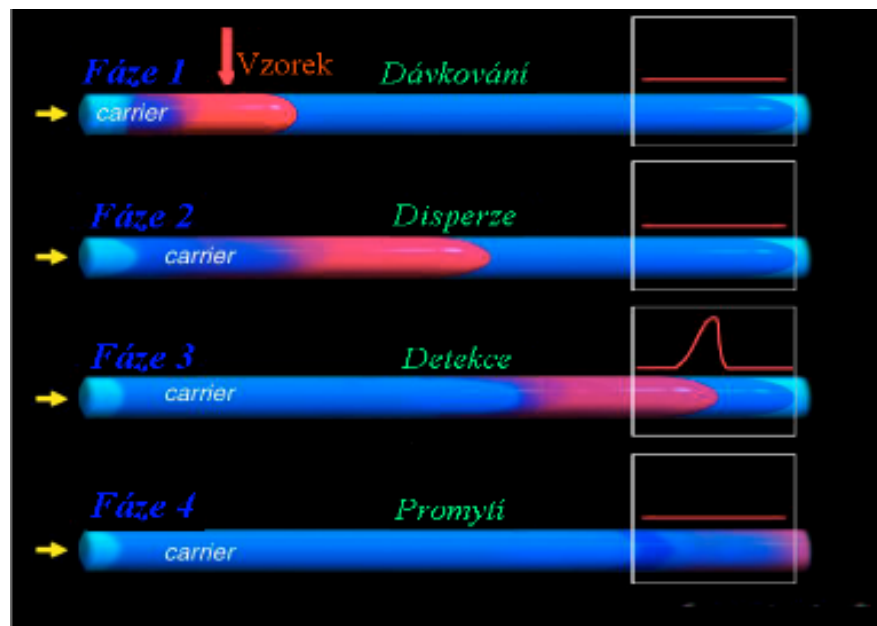
2. Cíl a popis zadání práce

Cílem práce je podrobné testování vlivu Quantum-Dots nanočástic s různým emisním maximem a úpravou povrchu částic na chemiluminiscenční reakci luminolu v bazickém prostředí za oxidace peroxidem vodíku a katalýzy hexakynoželezitanem. QDs nanočástice zde budou vystupovat jako zesilovače chemiluminiscenčního signálu. Naplánováno je testování širšího rozmezí ředění částic zaměřeného především na nízké koncentrace a porovnání jednotlivých částic s ohledem na emisní maxima a hlavně na úpravu jejich povrchu. Vše bude srovnáno s měřením bez QDs (slepý vzorek) a porovnáno i v rámci opakovatelnosti měření. Detekce chemiluminiscenčního signálu bude probíhat v průtokové cele detektoru Schoeffel a tento signál, znázorněný píkem, bude vyhodnocen výškou signálu (nárůst CL signálu) a plochou (délka trvání CL signálu). Dále je naplánováno testování chemiluminiscenčního signálu pomocí stop-flow měření. Tato detekce proběhne u každého typu nanočástice, u které bude naměřen nejvyšší CL signál.

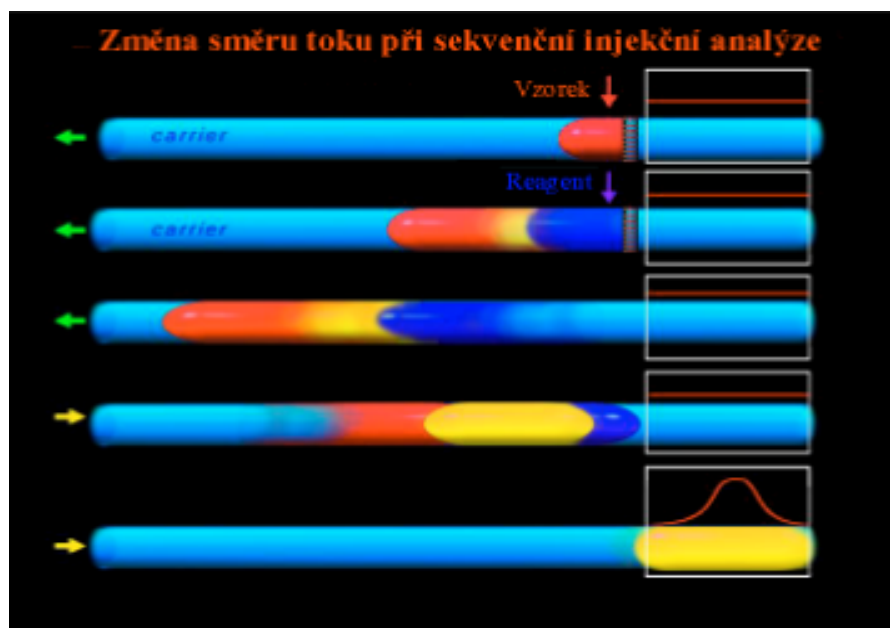
3. Teoretická část

3.1. Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (SIA) je technikou průtokové analýzy, která umožňuje snadnou automatizaci složitých postupů sériových analýz velkého počtu vzorků. SIA technika řeší některé nedostatky průtokové injekční analýzy (FIA). Významným rozdílem SIA techniky a FIA techniky je odlišnost v geometrii nosného toku, kdy FIA využívá přímý konstantní tok (Obr. č. 1), zatímco SIA využívá změnu přímého a zpětného toku (Obr. č. 2). Tím je dosaženo vyššího stupně konverze analytu na výsledný produkt¹.

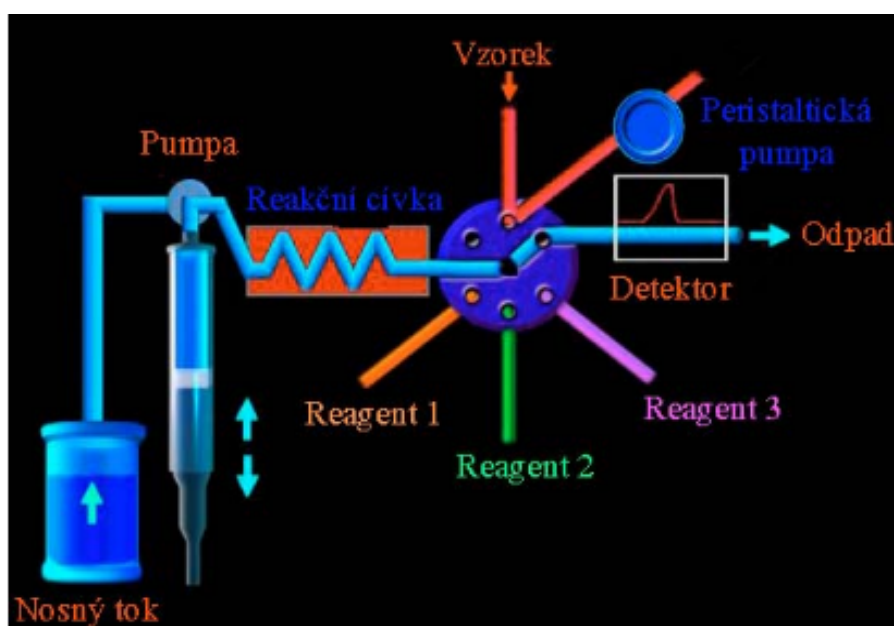


Obrázek č. 1: Princip průtokové injekční analýzy²



Obrázek č. 2: Princip sekvenční injekční analýzy ¹

Systém SIA pracuje v cyklu naprogramovaných pohybů čerpadla a přepínáním pozic selekčního ventilu. Součástí SIA systému musí být jednak detektor, obousměrná pístová pumpa, mísící cívka a vícecestný selekční ventil, ale i počítač s řídicí kartou a příslušným programovým vybavením, které řídí kroky měřicího cyklu a současně sbírá, uchovává a vyhodnocuje výstupní data ¹.



Obrázek č. 3: Schématické uspořádání sekvenční injekční analýzy ¹

U SIA techniky je možné provést změny dávkovaného objemu vzorku od jednotek až po stovky μl programováním doby otevření kanálu selekčního ventilu. Doba trvání jednoho měřicího cyklu se pohybuje okolo 30 s. Hlavní charakteristikou techniky SIA jsou oddělené měřicí cykly, kdy jsou nejprve zóny všech činidel a vzorku dávkovány postupně do jednobanálního systému s použitím vícecestného selekčního ventilu a pístového čerpadla. Pomocí čerpadla je pohyb toku dále obrácen a tím dojde k dokonalému promísení zón za vzniku reakčního produktu, který je poté detekován. Signál získaný detekcí má tvar píku. Jako detektory v SIA jsou používány spektrofotometry, fluorimetry, elektrochemické detektory atd. Výhodou SIA techniky je i její flexibilita, která je daná snadnou změnou parametrů měření pomocí klávesnice počítače bez změny konfigurace SIA systému ¹.

3.2. Luminiscence

Luminiscence je studené světélkování pevných látek a roztoků, řidčeji i plynů a par, vzniklé transformací jiné primární energie, většinou světelného záření o nižší vlnové délce (fotoluminiscence), ale také chemickými reakcemi (chemiluminiscence), tepelnou stimulací (méně přesné je označení termoluminiscence), mechanickým tlakem (triboluminiscence), elektrickým polem (elektroluminiscence) a některými dalšími způsoby. Pro analytické účely mají význam však jen první tři druhy luminiscence ³.

3.2.1. Chemiluminiscence

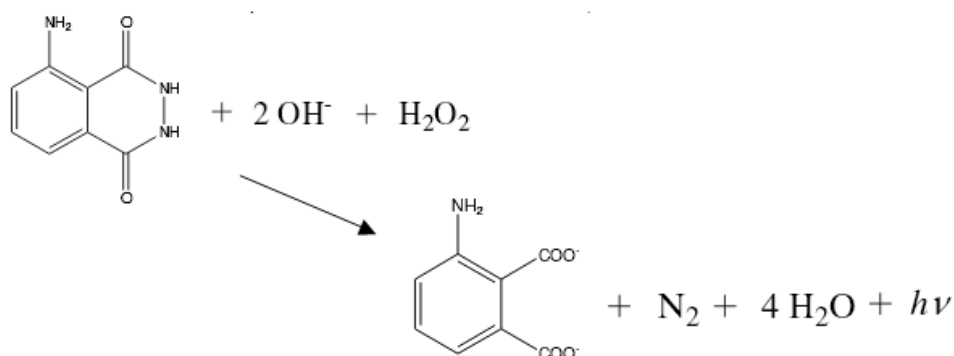
Chemiluminiscence je světélkování doprovázející chemické reakce některých látek. Chemiluminiscence, jinak též chemické světlo vzniká přímou přeměnou chemické energie na světelnou. Uvolněná chemická energie převádí atomy nebo molekuly do energeticky bohatšího, tzv. excitovaného stavu, které takto získanou energii uvolňuje ve formě světelných kvant (fotonů). Protože při chemiluminiscenci téměř vůbec nevzniká teplo, bývá světlo produkované některými chemickými reakcemi nazýváno také jako studené. Chemiluminiscenci lze pozorovat při tzv. silně exotermních reakcích některých látek. Při těchto reakcích se uvolňuje právě takové množství energie, které je potřeba ke vzniku viditelného světla. Fyzikové spočítali, že spektrum viditelného světla se nachází

v rozmezí vlnových délek přibližně od 400 do 700 nanometrů. Pro vznik viditelného světla je podle slavného Einsteinova vztahu potřeba energie (reakční enthalpie) 168 až do 294 kJ/mol⁴.

$$E = m \cdot c^2, \text{ resp. } E = h \cdot \nu$$

3.2.2. Chemiluminiscence luminolu

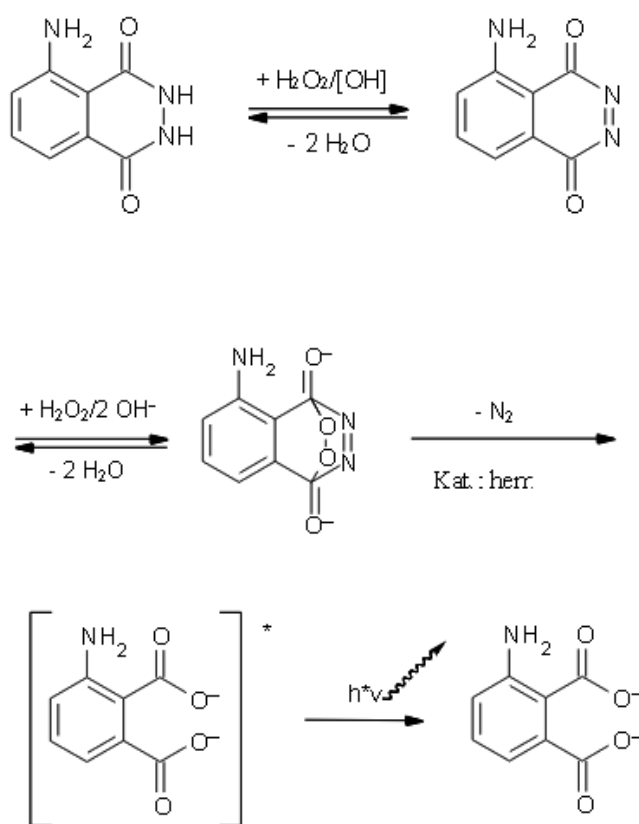
Luminol (5-aminoftalhydrazid) je odrazovým můstkem v oblasti výzkumu chemiluminiscence – byl objeven roku 1928 a od té doby se datují další objevy v této oblasti. Při oxidaci luminolu peroxidem vodíku v bazickém prostředí a za katalýzy dochází k chemiluminiscenci. Jednou z možností jak zajistit bazické prostředí je pomocí alkalického karbonátového pufru. Katalyzátorem reakce jsou zde ionty přechodného kovu (nejčastěji se používají ionty měďnaté nebo železité či železnaté, nejvhodnější pro tuto reakci jsou však ionty kobaltnaté, reakci ale katalyzují i různé přírodní látky – porfyriny, aj.). Reakci je možné provést i ve zjednodušeném provedení, kdy se bazické prostředí zajistí přidáním hydroxidu sodného nebo draselného. V tomto případě však nelze použít měďnaté ani železnaté ionty, protože by se srážely jejich nerozpustné hydroxidy. Proto se v téhle situaci s výhodou používá jako katalyzátor hexakynoželezitan draselný, případně hexakynoželezitan draselný. Nevýhodou zjednodušeného provedení je fakt, že hydroxidem vytvořené zásadité prostředí není tak stálé jako prostředí vytvořené pufrům, a proto je délka vyzařování chemiluminiscence v tomto případě poněkud kratší⁵.



Obrázek č. 4: Oxidace luminolu peroxidem vodíku v bazickém prostředí⁵

3.2.3. Použití luminolu

Luminol je například používán vyšetřovateli ve forenzních vědách k vyhledávání krvavých stop na místě činu. Luminol podléhá v zásaditém prostředí oxidaci peroxidem vodíku na diazachinon a postupně až na peroxodeanion. Z oxidačního produktu se za katalýzy hemovou skupinou odštěpuje molekula dusíku a vzniká excitovaný anion kyseliny aminoftalové. Vyzářením energie v podobě světla molekula opět dosahuje základního energetického stavu.



Obrázek č. 5: Reakce roztoku luminolu s krví (v přítomnosti peroxidu vodíku);
katalyzátor hem⁶

Využití luminolu je také při metodě Western blot (analytická technika používaná k detekci specifického proteinu ve směsi s dalšími proteiny), ve které slouží luminol jako substrát pro peroxidázu konjugovanou s použitou sekundární protilátkou. Dále se luminol používá např. k testům na přítomnost mědi, železa a kyanidu.

3.3. Nanočástice

Nanočástice je souhrnný pojem pro objekty různých tvarů a chemického složení (uhlík, kovy, oxidy kovů, polymery), jejichž jeden rozměr je menší než 100 nanometrů. Z hlediska původu rozlišujeme dvě základní kategorie: Nanomateriály, úmyslně vyráběné s cílem konkrétního využití v rozmanitých aplikacích souhrnně nazývaných nanotechnologie. A nanočástice, které vznikají jako nechtěný vedlejší produkt při různých spalovacích a dalších fyzikálních či chemických procesech. Některé nanočástice vznikají i jako důsledek přirozených přírodních procesů⁷.

3.3.1. Příprava nanočástic

Metody přípravy a chemické modifikace nanočástic jsou v současnosti intenzivně rozvíjeny a využívány. Již při přípravě vlastních nanočástic je třeba uvážit jejich další aplikaci. Nanočástice mohou být připraveny různými metodami a lze tak dosáhnout požadovaných tvarů a tím i požadovaných chemických a fyzikálních vlastností. Mezi nejrozšířenější typy patří nanočástice kovů (např. zlata, stříbra), nanočástice oxidů (křemičitého, titaničitého), sulfidů (kademnatého), selenidů (kademnatého) a polymerní nanočástice (kopolymery, dendrimery).

Chemická metoda přípravy nanočástic kovů je založena na nukleaci a růstu tuhé fáze. Tento proces je nejčastěji vyvolán chemickou redukcí solí kovů. Ke kontrole růstu nanočástic a k jejich ochraně před agregací je používáno velkého množství stabilizátorů. Kromě přípravy nanočástic kovů lze získat i nanočástice jejich oxidů, sulfidů a selenidů, jejichž využití ale není tak široké jako v případě samotných kovů. Syntéza je většinou prováděna ve vodných roztocích, ve kterých se jako redukční činidlo používá hydrazin nebo hydroxylamin.

Polymerní nanočástice se většinou získávají řízenou polymerací ve vodě působením peroxidu vodíku, tepla nebo ultrazvuku⁸.

3.3.2. Využití nanočástic

Nanočástice se od částic větších rozměrů liší především schopností snadno pronikat do lidského organismu, do řady tkání, včetně mozku, ale někdy i přes buněčnou membránu. Těchto unikátních vlastností lze úspěšně využívat v různých vědních oblastech, například v biomedicině či farmakologii, ale nese to s sebou i jistá rizika spojená s některými toxickými účinky, jako je oxidační poškození biologicky důležitých molekul (DNA, RNA, proteiny, lipidy).

Nanotechnologie přináší zcela nové možnosti v řadě průmyslových odvětví – od elektroniky přes chemický a textilní či automobilový průmysl až po potravinářství, biomedicínu a farmakologii. Jde o velmi perspektivní odvětví vesměs s malými materiálovými náklady a velkou přidanou hodnotou. Je to dané především tím, že jinak zcela běžné materiály mají ve formě nanočástic zcela nové unikátní vlastnosti. V potravinářském průmyslu se často využívají nanočástice oxidu titaničitého jako zvláčňovadla například v čokoládách či kečupech. K eliminaci bakteriemi způsobenými zápachy z prádla se v textilním průmyslu používají antimikrobiální částice nanostříbra. Ve stavebnictví se dostává pozornosti katalytickému působení nanočástic oxidu titaničitého jako přísady do omítek, které by měly rozkládat některé znečišťující látky v ovzduší ⁷.

3.3.3. Farmaceutické využití nanočástic

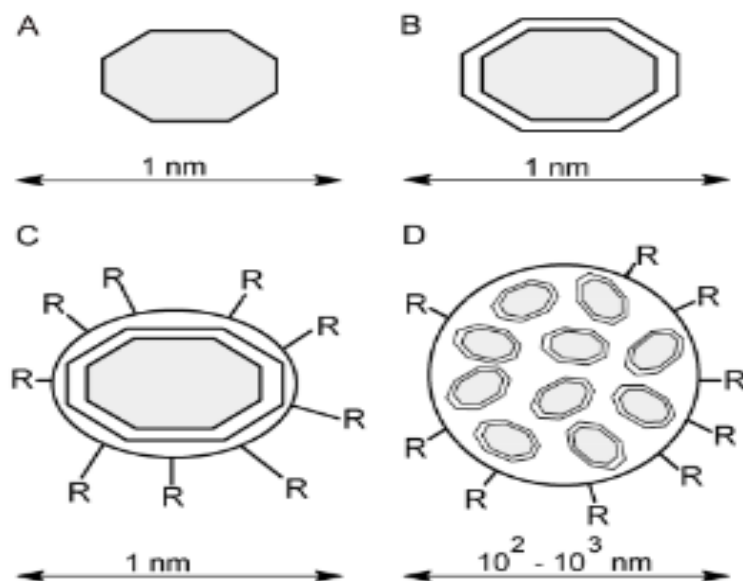
Podle stavby se nanočástice dělí na nanosféry a nanotobolky. Nanotobolky se vyznačují zřetelně odděleným jádrem a stěnou, zatímco nanosféry mají spíše maticovou strukturu s léčivem v ní dispergovaným nebo naadsorbovaným na povrch částice.

Pro přípravu nanočástic se používají různé postupy, které je možné dělit z několika hledisek, např. podle výsledného produktu, tj. zda vzniknou nanosféry nebo nanotobolky. Většina nanosfér (a také mikrosfér) vzniká polymerizací a polykondenzací, většina nanotobolek (a mikrotobolek) fyzikálně-chemickými procesy z předem připravených polymerů. Vzniklé částice mívají omezenou stabilitu a musí se zesíťovat nebo jinak upravit pro další zacházení. Výběr metody přípravy závisí na aplikaci a na vlastnostech léčiva, které má být do nanočástic zpracováno. Rozhodujícími kritérii při výběru metody přípravy a vhodných pomocných látek jsou biokompatibilita,

rozkladné produkty, profil požadovaného uvolňování léčiva a cesta podání léku. Formulace nanočástic tedy vyžaduje počáteční a velmi přesnou definici potřeby a účelu, jimž má sloužit. Pro přípravu nanočástic se používá řada pomocných látek, jejichž počet díky rychlému vývoji v této oblasti stále stoupá. Vzhledem k tomu, že se používají většinou k parenterální aplikaci, ať už se jedná o implantáty aplikované subkutánně nebo o částice určené pro podání intramuskulární a intravenózní, popř. do oka, nosu, nesmí to být látky toxické a musí být biodegradovatelné. Rozklad v organismu probíhá několika cestami, mezi něž lze zahrnout hydrolýzu nebo enzymatický rozklad. K základním a nejčastěji používaným materiálům patří alifatické polyestery (kyselina polymléčná – polylaktid, polyglykolová – polyglykolid, jejich kopolymery, poly-ε-kaprolakton), polyalkylkyanoakryláty, polyhydroxyalkanoáty, želatina a polysacharidy⁹.

3.4. Quantum-dots

Kvantové tečky (Quantum dots, QD) jsou nejčastěji polovodičové částice o rozměrech 2-10 nm. Struktura QD se zpravidla skládá z anorganického jádra (CdTe, CdSe, CdS, ZnS a mnohé další), a svrchní, nejčastěji organické vrstvy, tvořené merkaptopropionovou kyselinou (MPA), glutationem (GSH), polyethylenglykolem (PEG) a podobně. Takto upravené vykazují vynikající fluorescenční vlastnosti. V porovnání s klasickými organickými barvivy mají QD delší životnost, úzké emisní spektrum a široké absorpční spektrum¹¹.



Obrázek č. 6: Struktura kvantových teček: (A) QD tvořená jedním typem polovodiče např. CdTe. (B) QD tvořená dvěma typy polovodičů, např. QD s jádrem tvořeným CdTe, které je obalené vrstvou tvořenou CdS. (C) QD obalená vnějším obalem, který umožňuje solvataci ve vodném roztoku a nese reaktivní skupiny R nutné pro biokonjugaci. (D) Polymerní částice obsahující několik QD s povrchovými reaktivními skupinami R, toto uspořádání je základem pro fluorescenčně kódované mikročástice¹⁰.



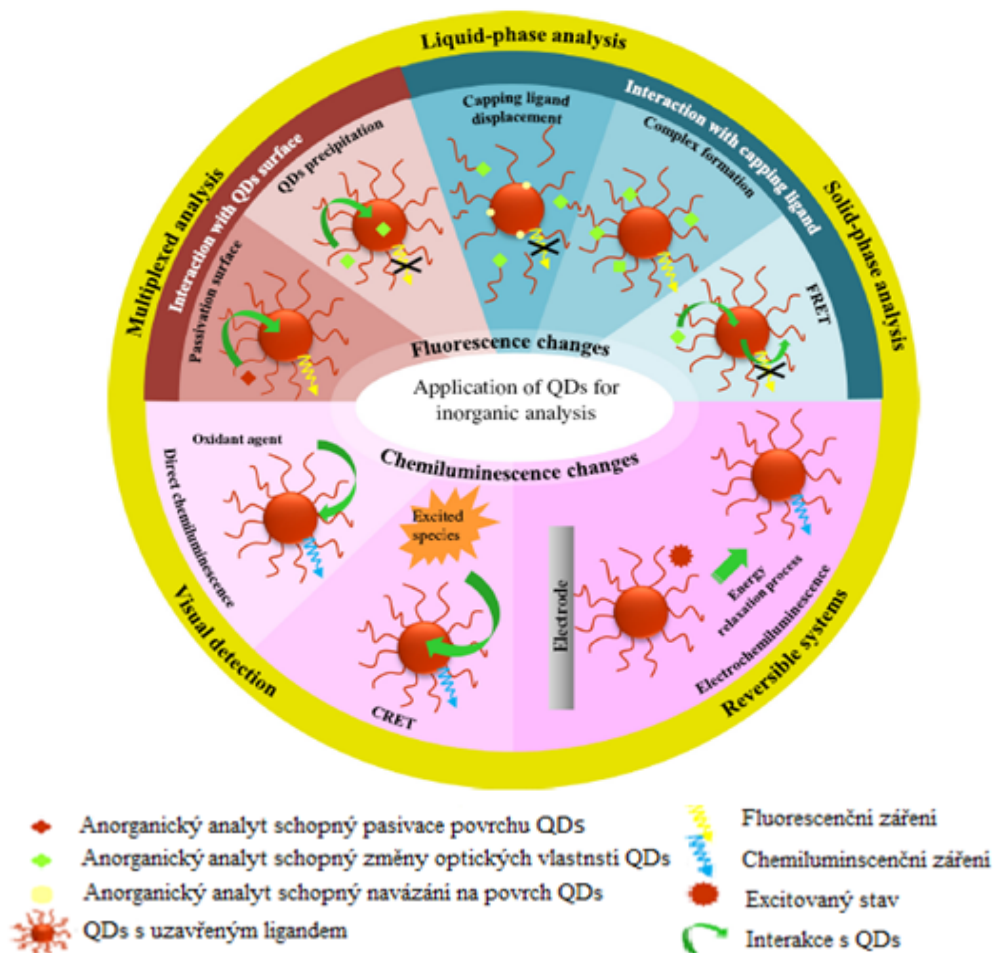
Obrázek č. 7: Luminiscence CdSe/ZnS Quantum-Dots roztoků¹³

3.4.1. Různé použití Quantum-Dots nanočástic

Tato kapitola je napsaná formou rešerše. Jednotlivé odstavce se věnují jednotlivým odborným článkům z časopisů nalezených ve vědecké databázi ScienceDirect.

Quantum-Dots nanočástice mají v poslední době obrovský význam na poli analytické chemie, a jsou hlavním předmětem zkoumání rychle se rozvíjející nanotechnologie ve světě moderních analytických technik.

Změna luminiscence působením QDs může být vnímána z analytického hlediska rozdílnými způsoby: zesílení či zeslabení fluorescence, fluorescenční přenos energie (FRET), přímá nebo nepřímá chemiluminiscence, která je zesílená nebo zeslabená, chemiluminiscenční přenos energie (CRET) a nebo elektrochemiluminiscence¹⁴.



Obrázek č. 8: Rozdílné procesy podílející se na mechanismu aplikací QD nanočástic v různých luminiscenčních metodách¹⁵

Předmětem jednotlivých článků jsou QDs nanočástice s vynikajícími optickými a elektronickými vlastnostmi, které by mohly potenciálně zlepšit chemiluminiscenční záření (zvýšit jeho intenzitu nebo prodloužit délku jeho trvání).

Například bylo prozkoumáno, že QDs nanočástice tvořená jedním polovodičem, a to CdTe, která je zároveň spojená s imunoglobulinem G (IgG), zesiluje CL reakci za použití vysoce citlivých průtokových injekčních systémů založených na nepřímém chemiluminiscenčním systému (luminol- H_2O_2). Pomocí fotoluminiscenčního (PL) a chemiluminiscenčního spektra bylo objeveno, že došlo k CL přenosu energie (CRET) mezi CdTe-IgG konjugátem a luminolem. V optimálním stavu se za rostoucí koncentrace IgG v konjugátu CdTe-IgG zvyšuje intenzita CL v systému luminol- H_2O_2 ¹⁶.

QDs CdTe by mohly také zvyšovat CL záření pocházející z redoxní reakce siřičitanů (SO_3^{2-}) s Ce^{IV} ionty v kyselém prostředí. Také bylo objeveno, že organické sloučeniny obsahující OH, NH_2 nebo SH skupiny, a některé elektron přenášející proteiny, jimiž jsou například cytochrom c, hemoglobin nebo myoglobin, které snadno interagují s QDs CdTe, inhibují CL signál v Ce^{IV} - SO_3^{3-} -QDs systému. Tento výsledek umožňuje aplikaci daných QDs nanočástic ke stanovení zkoumaných sloučenin a proteinů¹⁷.

Reakce mezi peroxidem vodíku, hydrogenuhličitanem a QDs nanočásticí CdSe/CdS vytváří silnou chemiluminiscenci. Přidáním stopového množství kyseliny L-askorbové do CL systému způsobí zeslabení chemiluminiscenčního záření. Při experimentálním výzkumu byly optimalizovány koncentrace jednotlivých reagentů a tato metoda je úspěšně aplikovatelná ke stanovení kyseliny L-askorbové v lidském séru¹⁸.

V různých studiích bylo objeveno, že HRP (křenová peroxidáza) účinně zesiluje chemiluminiscenční záření nanočástic CdTe v systému s peroxidem vodíku. Také bylo dokázáno, že HRP nezvyšuje pouze CL intenzitu, ale že také zlepšuje stabilitu QDs CdTe- H_2O_2 systému, která může znamenat důležitý krok v aplikaci v různých oborech zabývajících se chemiluminiscenčním zářením¹⁹.

V další práci bylo dokázáno, že QDs CdTe by mohly být úspěšně použity k posílení detekce současného stanovení dopaminu a adrenalinu pomocí kapilární elektroforézy a chemiluminiscence, k dosažení vyšší citlivosti. V tomto experimentu byly přidány QDs CdTe do pufru kapilární elektroforézy, aby katalyzovaly CL reakci

mezi luminolem a peroxidem vodíku a tím došlo ke zvýšení intenzity CL záření. Záporné píky, které se zde objevily, byly odrazem inhibičního účinku dopaminu a adrenalinu na CL záření. Tato metoda se používá ke stanovení množství hladin dopaminu a adrenalinu v lidské moči ²⁰.

QD nanočástice CdTe byly také používány jako generátory vysoce reaktivní formy kyslíku (ROS) pro kontrolu farmaceutických přípravků obsahujících adrenalin. Výzkum byl založen na sledování zeslabení chemiluminiscence způsobené adrenalinem. Adrenalin ovlivňoval negativně oxidaci luminolu, která byla produkována prostřednictvím ROS ²¹.

4. Experimentální část

4.1. Materiál

4.1.1. Použité chemikálie

Luminol 98%, Fluka BioChemka, Praha ČR

Peroxid vodíku 30% liquid, Sigma-Aldrich, Praha ČR

Hexakynoželezitan draselný 99%, Sigma-Aldrich, Praha, ČR

Hydroxid sodný, Penta Chrudim, ČR

Roztoky Quantum Dots nanočástic CdTe s rozdílnou úpravou povrchu a emisním maximem: merkaptopropionová kyselina (MPA 520 nm, MPA 540 nm, MPA 636 nm), thioglykolová kyselina (TGA 620 nm), merkptoethylamin (NH₂ 590 nm) a částice CdTe/CdS obalené merkaptopropionovou kyselinou (MPA CdTe/CdS 640 nm), připravené na Oddělení bioanalytické instrumentace, Ústavu analytické chemie, Akademie věd České Republiky, Brno

Destilovaná voda – připravená demineralizací systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)

4.1.2 Roztoky

Zásobní roztoky:

- roztok luminolu 10⁻³ M – 17,7 mg luminolu doplněno 0,1 M NaOH do 100 ml

- roztok hexakynoželezitanu draselného 10⁻³ M – 32,8 mg hexakynoželezitanu draselného doplněno vodou do 100 ml

- roztok peroxidu vodíku 10⁻¹ M – 560 µl 30% peroxidu vodíku doplněno vodou do 50 ml

Pracovní roztoky:

- peroxid vodíku 10⁻³ M – 1 ml peroxidu vodíku 10⁻¹ M doplněn vodou do 100 ml

Roztok peroxidu vodíku byl připravován čerstvě před každým měřením, neboť se za působení tepla a světla rozkládá.

- roztoky QDs TGA 620 nm, MPA 520 nm, MPA 540 nm, MPA 636 nm, MPA

CdTe/CdS 640 nm, NH₂ 590 nm, byly ředěny vodou v den měření do daných koncentračních hladin

Tabulka č. 1: Příprava pracovních roztoků QDs

Objem QDs [μ l]	Objem pracovního roztoku QDs [ml]	Molární koncentrace [mol/l]
250	1	$2,5 \cdot 10^{-5}$
100	1	$1 \cdot 10^{-5}$
50	1	$5 \cdot 10^{-6}$
250	10	$2,5 \cdot 10^{-6}$
100	10	$1 \cdot 10^{-6}$
50	10	$5 \cdot 10^{-7}$
25	10	$2,5 \cdot 10^{-7}$
10	10	$1 \cdot 10^{-7}$
50	100	$5 \cdot 10^{-8}$
25	100	$2,5 \cdot 10^{-8}$
10	100	$1 \cdot 10^{-8}$

4.1.3 Přístroje

Analytické váhy Sartorius 2004 MP, Německo

Počítač platformy PC AT (IBM kompatibilní) s konfigurací Pentium 75 MHz, 24 MB RAM se standardním vybavením Windows 98 CZ, nainstalovány speciální karty - PCIe 6251 karta pro zpracování dat (National Instruments Corporation, USA) a PCI 232:2 Netmos) – karta pro komunikační rozhraní SIA systému s počítačem

Ultrazvuková lázeň Sonorex RK 100, Bandelin Electronic, Německo

Průtokový fluorimetrický detektor pro chemiluminiscenční stanovení Spectra Physics FS 970 L.C. (Schoeffel Instrument Corporation, San Jose, CA, USA)

Pístové čerpadlo Cavro XL 3000 o objemu 2,5 ml

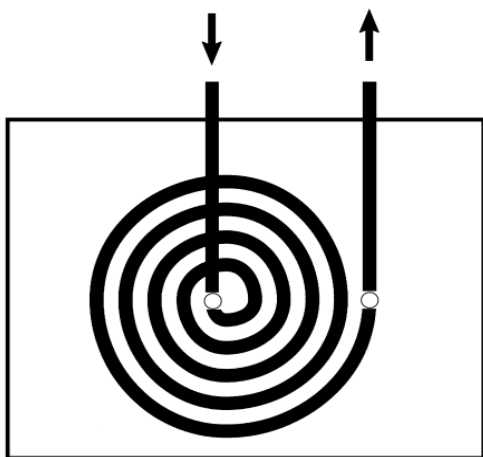
Deseticestný selekční ventil, VICI VALCO

Mísící cívka z teflonové hadičky o objemu 1,2 ml a vnitřním průměru 0,75 mm

Spojovací materiál – teflonové hadičky o vnitřním průměru 0,50 a 0,75 mm, Watrex
Praha, ČR

Součástí SIA (sekvenční injekční analýza) systému je detektor, obousměrná pístová pumpa, mísící cívka a 10ti cestný selekční ventil. Pomocí obousměrné pístové pumpy jsou nasávány činidla, vzorky a nosný proud. Deseti-cestný selekční ventil umožňuje volit pozice jednotlivých reagentů v jakémkoliv pořadí. Metoda SIA je založena na principu nasátí analytu a činidel pomocí obousměrné pístové pumpy, kde následně dochází buď k promísení v mísící cívce, nebo jsou nasáty s určitým odstupem tak, aby k promísení nedošlo a zreagovaly až v detekční cele. Roztok, který vznikne po reakci, je přes průtokovou celu detektoru odváděn do odpadu.

Fluorimetrický detektor byl pro chemiluminiscenci upraven následovně – byla vypnuta lampa fluorimetru, tedy nebylo použito primární záření a v místě sekundárního filtru byla instalována spirální průtoková cela. Spirální CL modul je tvořen průhlednou teflonovou stočenou hadičkou. Po celou dobu testování bylo nastaveno na fluorimetru Schoeffel napětí 200V.



Obrázek č. 9: Spirální chemiluminiscenční modul

4.2. Průběh měřicího cyklu

Cílem bylo podrobné testování vlivu QD nanočástic s různým emisním maximem a úpravou povrchu částic na chemiluminiscenční reakci luminolu s peroxidem vodíku a hexakynoželezitanem. Měřicí cyklus byl předem naprogramován tak, aby se dosáhlo dobré citlivosti a tím pádem co nejpřesnějších výsledků, přičemž zde musely být zohledněny objemy činidel a QD nanočástic, a také průtoková rychlost. Aspirace roztoků probíhala při konstantní průtokové rychlosti 100 $\mu\text{l/s}$, která byla zvolena tak, aby odezva detektoru byla opakovatelná a zároveň byl zajištěn rychlý transport činidel a vzorků do detektoru. Objem QD nanočástic a činidel byl 50 μl . Měření probíhalo po 3 cyklech za stejných reakčních podmínek. Měření probíhalo za neměnného rozsahu stupnice a to při 1,0 μA . V tabulce č. 2 je uvedena ukázka průběhu měřicího cyklu. Intenzita chemiluminiscence byla měřena za laboratorní teploty. Na konci měření se provádělo promytí SIA systému, ke kterému sloužila destilovaná voda.

Tabulka č. 2: Ukázka průběhu měřicího cyklu

syringe pump	initialize	0	
syringe pump	valve position IN		
syringe pump	set flow rate [$\mu\text{l/s}$]	100	
syringe pump	aspirate [μl]	1000	
syringe pump	valve position OUT		
syringe pump	set flow rate [$\mu\text{l/s}$]	100	
multi-port valve	set valve position	2	(peroxid vodíku)
syringe pump	aspirate [μl]	50	
multi-port valve	set valve position	3	(hexakynoželezitan)
syringe pump	aspirate [μl]	50	
multi-port valve	set valve position	4	(luminol)
syringe pump	aspirate [μl]	50	
multi-port valve	set valve position	5	(QDs)
syringe pump	aspirate [μl]	50	
multi-port valve	set valve position	8	
syringe pump	empty syringe		

4.2.1. Stop-flow měření

K testování intenzity chemiluminiscence bylo dále využito tzv. stop-flow měření, které spočívalo v zastavení aspirovaných zón v detekční cele po dobu 60 sekund a následném zaznamenání výšky a plochy píku detektorem. V tabulce č. 3 je ukázka měřícího programu.

Tabulka č. 3: Program stop-flow měření

syringe pump	valve position IN		
syringe pump	set flow rate [μl/s]	100	
syringe pump	aspirate [μl]	1500	
syringe pump	valve position OUT		
syringe pump	set flow rate [μl/s]	50	
multi-port valve	set valve position	2	(peroxid vodíku)
syringe pump	aspirate [μl]	50	
multi-port valve	set valve position	3	(hexakynoželezitan)
syringe pump	aspirate [μl]	50	
multi-port valve	set valve position	4	(luminol)
syringe pump	aspirate [μl]	50	
multi-port valve	set valve position	5	(QDs)
syringe pump	aspirate [μl]	50	
syringe pump	set flow rate [μl/s]	100	
multi-port valve	set valve position	8	
syringe pump	dispense [μl]	200	
timer	pause [s]	60	
syringe pump	empty syringe		

4.3. Optimalizace chemiluminiscenční detekce

Optimalizace chemiluminiscenční detekce probíhala s využitím sekvenční injekční analýzy. Cílem bylo zjistit, za kterých podmínek bude intenzita chemiluminiscence nejvyšší v závislosti na několika vybraných koncentračních hladinách roztoků nanočástic.

4.4. Vyhodnocení změřeného signálu

Měření intenzity chemiluminiscence bylo provedeno se třemi základními činidly vždy ve stejném pořadí. Nejdříve byl naaspirován peroxid vodíku, následně hexakynoželezitan draselný, poté luminol a nakonec roztok nanočástice. Roztok jednoho typu nanočástice byl měřen postupně z jedenácti předem naředěných koncentračních hladin, ($2,5 \cdot 10^{-5}$ M, $1 \cdot 10^{-5}$ M, $5 \cdot 10^{-6}$ M, $2,5 \cdot 10^{-6}$ M, $1 \cdot 10^{-6}$ M, $5 \cdot 10^{-7}$ M, $2,5 \cdot 10^{-7}$ M, $1 \cdot 10^{-7}$ M, $5 \cdot 10^{-8}$ M, $2,5 \cdot 10^{-8}$ M, $1 \cdot 10^{-8}$ M), ve třech po sobě jdoucích cyklech. K detekci bylo určeno 6 typů nanočástic s různým emisním maximem (TGA 620 nm, MPA 520 nm, MPA 540 nm, MPA 636 nm, MPA CdTe/CdS 640 nm, QD NH₂ 590 nm). Následně byla průměrná intenzita chemiluminiscence vypočtena z naměřených hodnot výšky píků a rozsahu stupnice. Rozsah stupnice byl po celé měření konstantní – 1,0 μ A. Intenzita chemiluminiscence je přímo úměrná výšce píku. Pokud je například výška píku 0,72, výpočet je následující:

$$(1 \times 1000 \times 0,72) / 2,5 = 288,00 \text{ nA}$$

5. Výsledky měření a diskuze

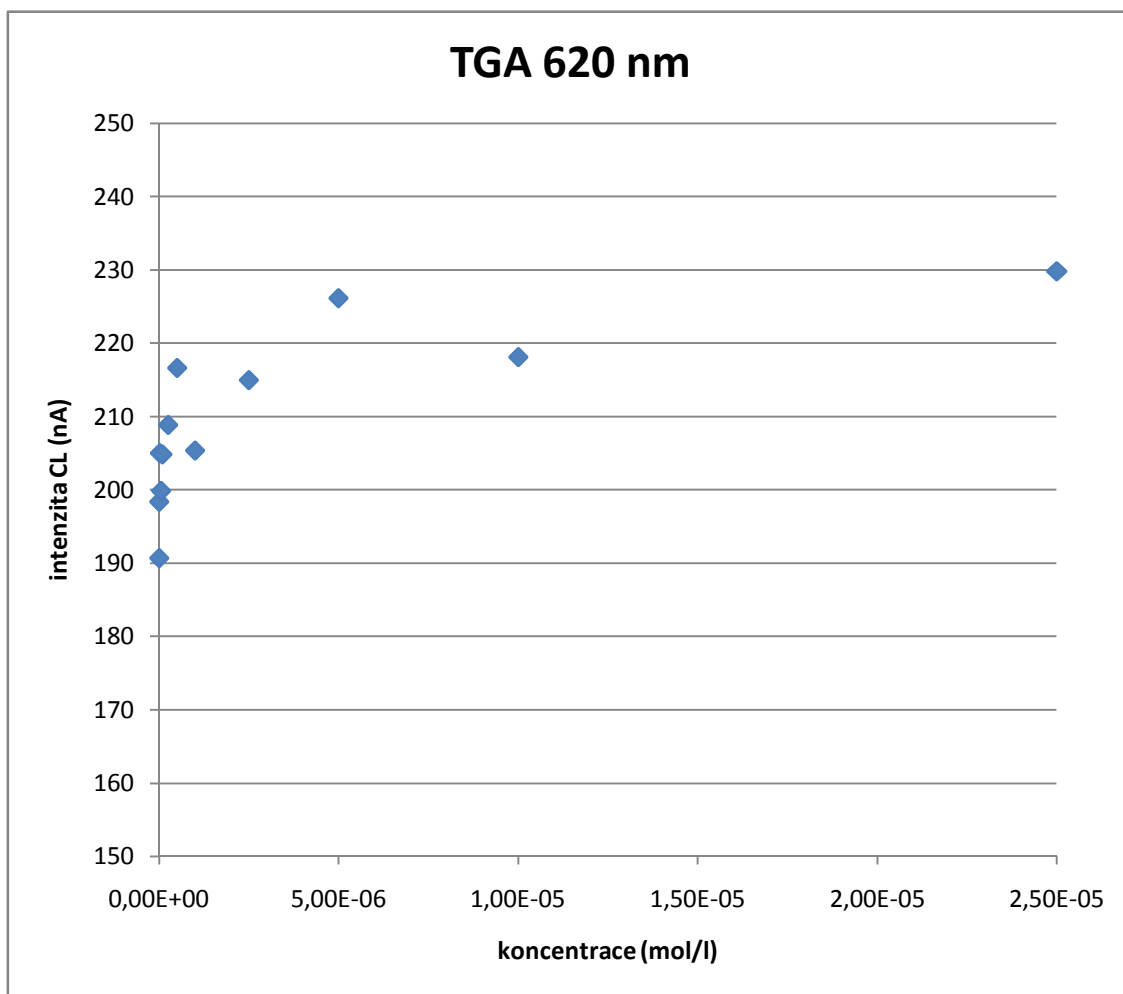
Testování optických vlastností Quantum-Dots nanočástic se uskutečnilo u šesti QDs s různým emisním maximem. Hodnoty intenzity CL byly vypočteny a zaznamenány do tabulek.

5.1. NANOČÁSTICE TGA 620 nm

Tabulka č. 4: Nanočástice TGA s emisním maximem 620 nm

TGA 620 nm							
c [mol/l]	výška píku			průměr	SD	RSD [%]	intenzita CL [nA]
0	0,48	0,47	0,48	0,48	0,0047	0,98	190,67
1.10^{-8}	0,49	0,49	0,50	0,49	0,0047	0,96	198,40
$2,5.10^{-8}$	0,51	0,51	0,52	0,51	0,0047	0,92	205,00
5.10^{-8}	0,49	0,50	0,51	0,50	0,0082	1,64	199,88
1.10^{-7}	0,50	0,51	0,52	0,51	0,0082	1,61	204,84
$2,5.10^{-7}$	0,51	0,53	0,53	0,52	0,0094	1,81	208,84
5.10^{-7}	0,53	0,55	0,54	0,54	0,0082	1,52	216,60
1.10^{-6}	0,50	0,52	0,53	0,52	0,0125	2,40	205,32
$2,5.10^{-6}$	0,53	0,54	0,54	0,54	0,0047	0,87	214,96
5.10^{-6}	0,56	0,56	0,57	0,56	0,0047	0,84	226,16
1.10^{-5}	0,55	0,55	0,54	0,55	0,0047	0,85	218,08
$2,5.10^{-5}$	0,57	0,58	0,58	0,58	0,0047	0,81	229,84

K porovnání naměřených hodnot intenzit chemiluminiscence dané nanočástice byla použita hodnota slepého signálu. U všech nanočástic bylo provedeno stejné srovnání vždy se slepým pokusem vztahujícím se k jednotlivým QDs.



Obrázek č. 10: Graf vyjadřující závislost intenzity chemiluminiscence na koncentračních hladinách nanočástic TGA 620 nm

Při testování TGA nanočástic s emisním maximem 620 nm byla zjištěna největší intenzita chemiluminiscence při koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ M. S touto koncentrací bylo dále provedeno tzv. stop-flow měření, při kterém byla zjištěna výška píku a plocha. Výsledné hodnoty byly vztaženy ke slepému pokusu.

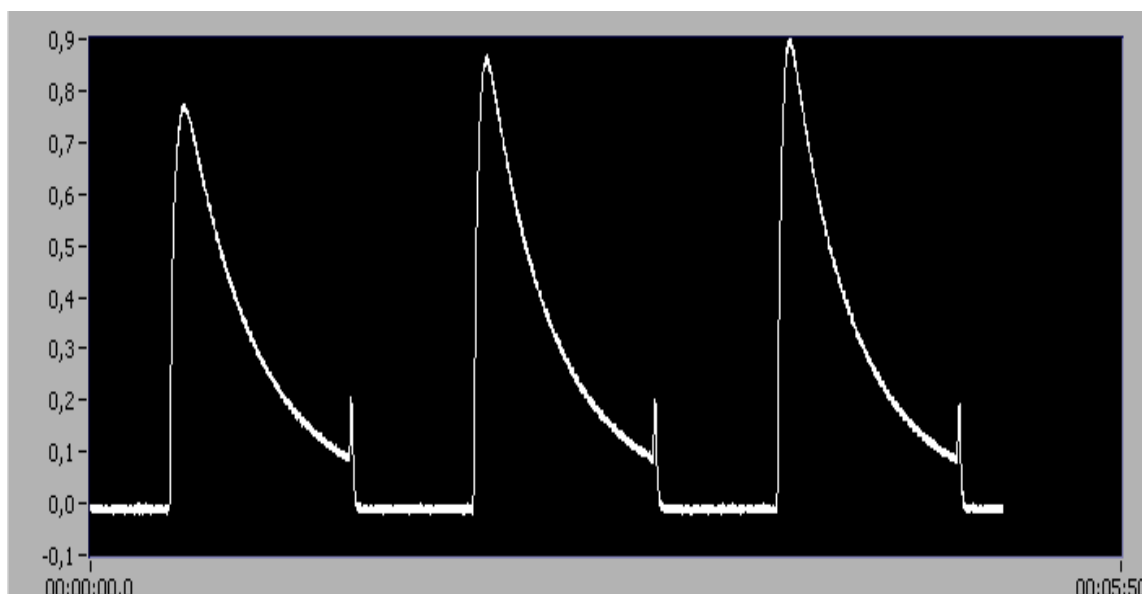
Tabulka č. 5: Vyhodnocení výšky píku a plochy QDs TGA 620 nm v koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ M

	výška píku	plocha píku
TGA 620 nm	0,77	21,11
	0,87	22,79
	0,89	22,93
průměr	0,84	22,28
směr.odchylka	0,05	0,83
RSD [%]	5,95	3,73
intenzita CL [nA]	336,00	–

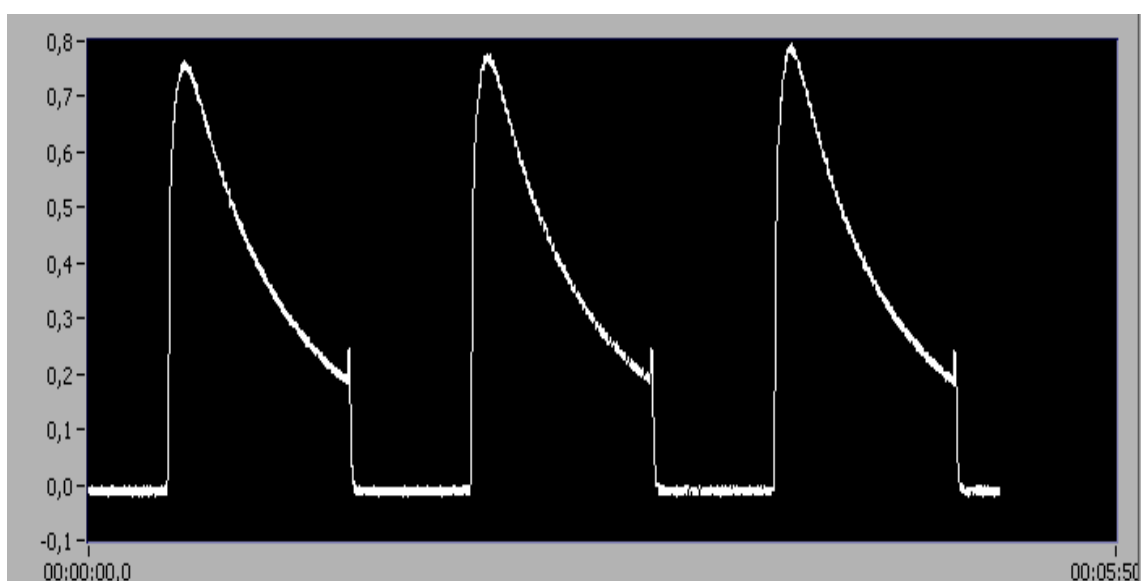
Tabulka č. 6: Vyhodnocení výšky píku a plochy slepého pokusu

	výška píku	plocha píku
slepý vzorek	0,76	27,31
	0,78	27,49
	0,80	27,73
průměr	0,78	27,51
směr.odchylka	0,02	0,17
RSD [%]	2,56	0,62
intenzita CL [nA]	312,00	–

Při porovnání výsledků ze stop-flow měření za použití nanočástic TGA 620 nm a slepého vzorku si lze povšimnout, že sice došlo ke zvýšení výšek píku a tím pádem ke zvýšení intenzity CL (v tomto případě o 7,69 %), ale plocha píku klesla. To znamená, že je signál při použití nanočástic kratší.



Obrázek č. 11: Reálný záznam ze stop-flow měření s použitím nanočástice



Obrázek č. 12: Reálný záznam ze stop-flow měření slepého vzorku

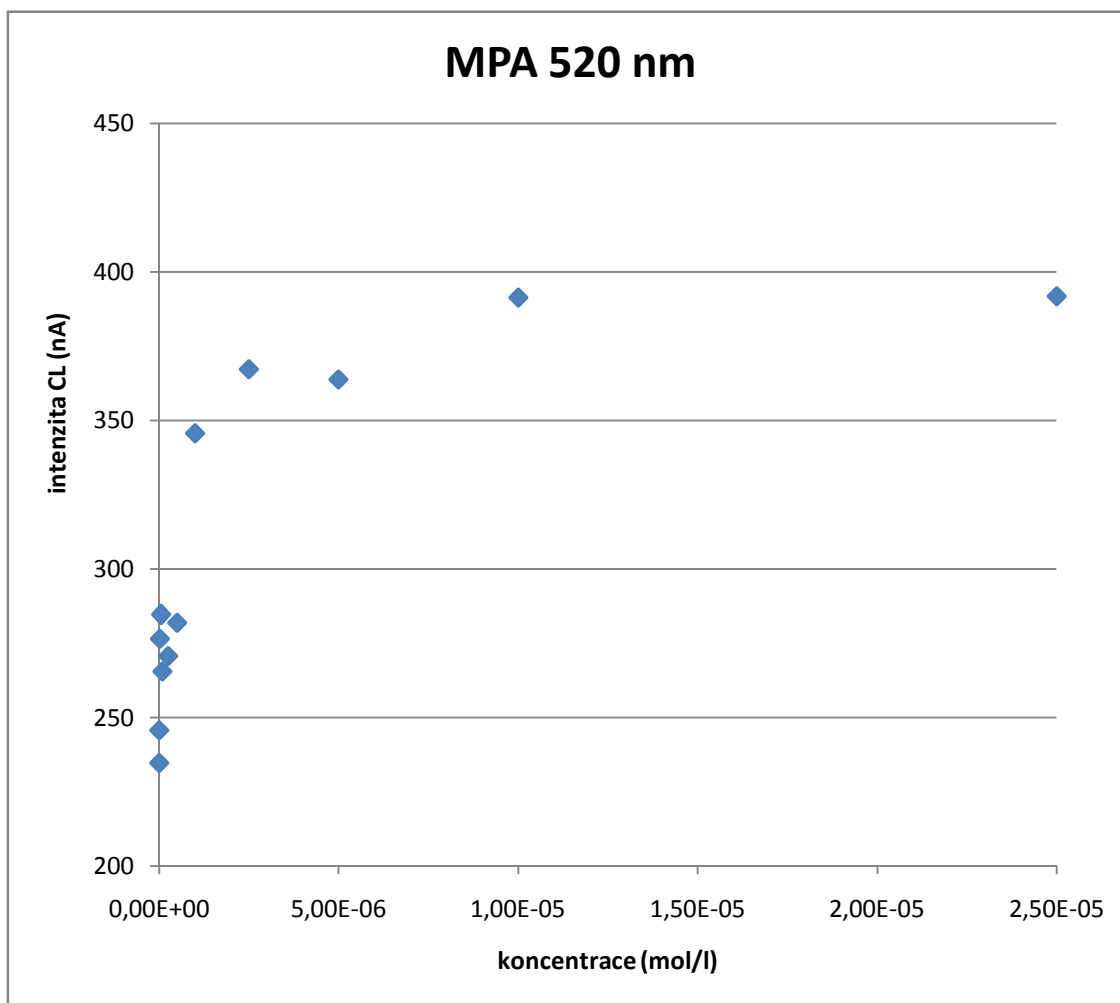
Závěr: Největší intenzita chemiluminiscence byla zjištěna při koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, a to 230,67 nA. V porovnání s hodnotou slepého pokusu, která vyšla 190,67 nA, byl vyhodnocen nárůst CL o 20,98 %. Naopak nejnižší signál chemiluminiscence byl naměřen při koncentraci $1 \cdot 10^{-8}$ M a to 197,33 nA, zde byl nárůst CL oproti slepému

pokusu o 3,49 %. S využitím stop-flow systému došlo sice ke zvýšení signálu (o 7,69 %), ale zároveň byl tento signál kratší (o 19,01 %)

5.2. NANOČÁSTICE MPA 520 nm

Tabulka č. 7: Nanočástice MPA s emisním maximem 520 nm

MPA 520 nm							
c [mol/l]	výška píku			průměr	SD	RSD [%]	intenzita CL [nA]
0	0,58	0,59	0,59	0,59	0,0047	0,80	234,80
$1 \cdot 10^{-8}$	0,61	0,62	0,61	0,61	0,0047	0,77	245,64
$2,5 \cdot 10^{-8}$	0,69	0,69	0,69	0,69	0,0000	0,00	276,48
$5 \cdot 10^{-8}$	0,70	0,71	0,72	0,71	0,0082	1,15	284,60
$1 \cdot 10^{-7}$	0,65	0,67	0,67	0,66	0,0094	1,42	265,57
$2,5 \cdot 10^{-7}$	0,70	0,68	0,68	0,69	0,0094	1,36	270,78
$5 \cdot 10^{-7}$	0,72	0,70	0,70	0,71	0,0094	1,32	281,92
$1 \cdot 10^{-6}$	0,86	0,86	0,87	0,86	0,0047	0,54	345,64
$2,5 \cdot 10^{-6}$	0,92	0,91	0,92	0,92	0,0047	0,51	367,28
$5 \cdot 10^{-6}$	0,90	0,89	0,92	0,90	0,0125	1,39	363,76
$1 \cdot 10^{-5}$	0,97	1,00	0,96	0,98	0,0170	1,73	391,44
$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,97	0,98	0,99	0,98	0,0082	0,84	391,84



Obrázek č. 13: Graf vyjadřující závislost intenzity chemiluminiscence na koncentračních hladinách nanočástic MPA 520 nm

Při testování MPA nanočástic s emisním maximem 520 nm byla zjištěna největší intenzita chemiluminiscence při koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ M. S touto koncentrací bylo dále provedeno tzv. stop-flow měření, při kterém byla zjištěna výška píku a plocha. Výsledné hodnoty byly vztaženy ke slepému pokusu.

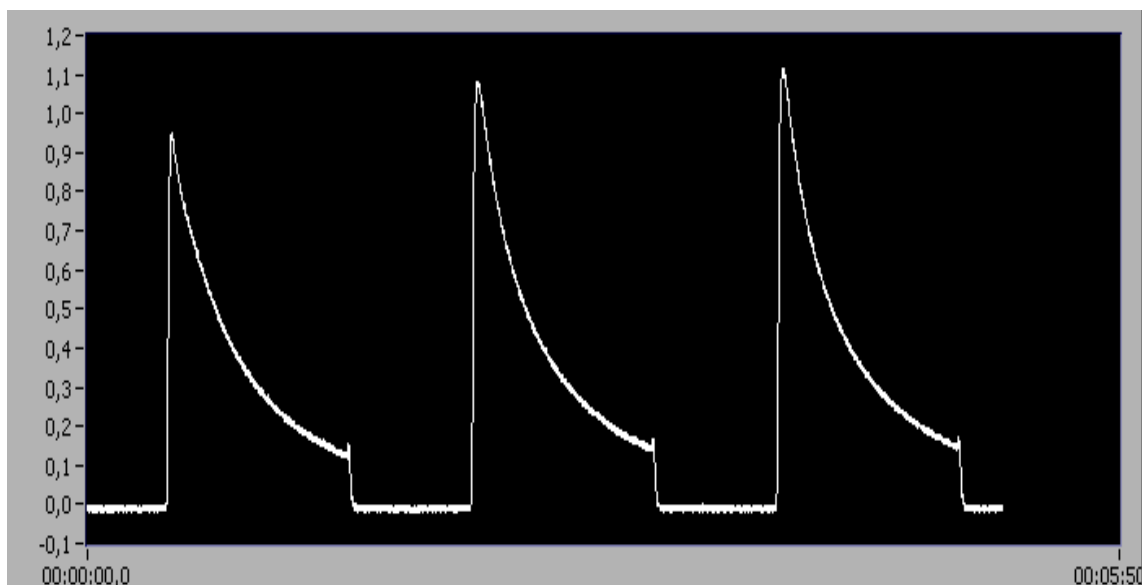
Tabulka č. 8: Vyhodnocení výšky píku a plochy QDs MPA 520 nm v koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ M

	výška píku	plocha píku
MPA 520 nm	0,94	23,65
	1,08	26,18
	1,10	26,65
průměr	1,04	25,49
směr.odchylka	0,02	1,32
RSD [%]	1,92	5,18
intenzita CL [nA]	417,05	–

Tabulka č. 9: Vyhodnocení výšky píku a plochy slepého pokusu

	výška píku	plocha píku
slepý vzorek	0,76	27,31
	0,78	27,49
	0,80	27,73
průměr	0,78	27,51
směr.odchylka	0,02	0,17
RSD [%]	2,56	0,62
intenzita CL [nA]	312,00	–

Při porovnání výsledků ze stop-flow měření za použití nanočástic MPA 520 nm a slepého vzorku si lze povšimnout, že sice došlo ke zvýšení výšek píku a tím pádem ke zvýšení intenzity CL (v tomto případě o 33,67 %), ale plocha píku klesla. To znamená, že signál při použití nanočástic je kratší.



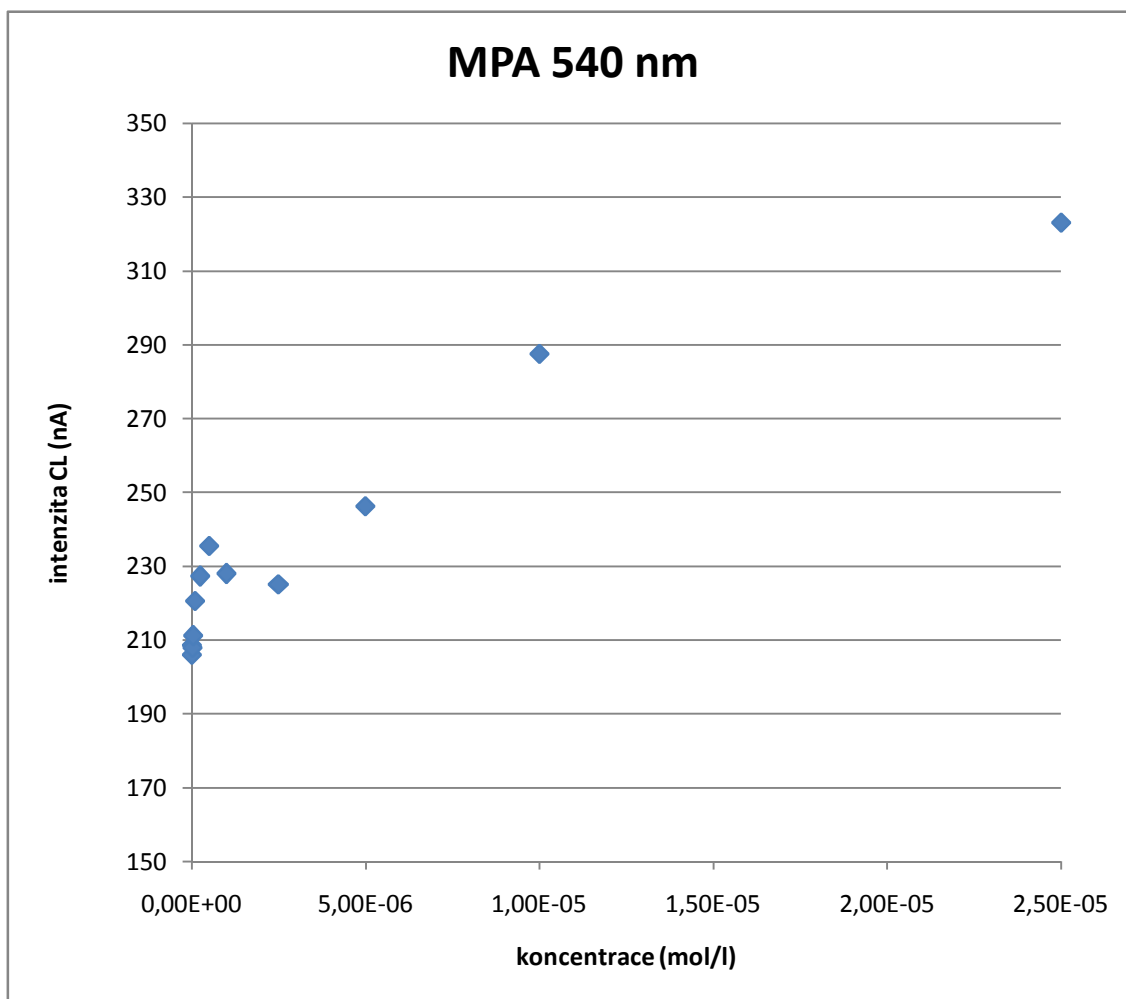
Obrázek č. 14: Reálný záznam ze stop-flow měření s použitím nanočástice

Závěr: Největší intenzita chemiluminiscence byla zjištěna při koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, a to 391,84 nA. V porovnání s hodnotou slepého pokusu, která vyšla 234,80 nA, byl vyhodnocen nárůst CL o 66,88 %. Naopak nejnižší signál chemiluminiscence byl naměřen při koncentraci $1 \cdot 10^{-8}$ M a to 245,64 nA, nárůst CL oproti slepému pokusu byl o 4,62 %. S využitím stop-flow systému došlo sice ke zvýšení signálu (o 33,67 %), ale zároveň byl tento signál kratší (o 7,34 %).

5.3. NANOČÁSTICE MPA 540 nm

Tabulka č. 10: Nanočástice MPA s emisním maximem 540 nm

MPA 540 nm							
c [mol/l]	výška píku			průměr	SD	RSD [%]	intenzita CL [nA]
0	0,50	0,52	0,52	0,51	0,0094	1,84	206,12
$1 \cdot 10^{-8}$	0,52	0,52	0,52	0,52	0,0000	0,00	208,71
$2,5 \cdot 10^{-8}$	0,50	0,52	0,54	0,52	0,0163	3,13	207,92
$5 \cdot 10^{-8}$	0,52	0,53	0,54	0,53	0,0082	1,55	211,16
$1 \cdot 10^{-7}$	0,54	0,55	0,56	0,55	0,0082	1,49	220,68
$2,5 \cdot 10^{-7}$	0,58	0,57	0,56	0,57	0,0082	1,44	227,30
$5 \cdot 10^{-7}$	0,59	0,59	0,59	0,59	0,0000	0,00	235,50
$1 \cdot 10^{-6}$	0,58	0,56	0,57	0,57	0,0082	1,44	228,00
$2,5 \cdot 10^{-6}$	0,58	0,56	0,55	0,56	0,0125	2,23	225,16
$5 \cdot 10^{-6}$	0,62	0,61	0,61	0,61	0,0047	0,77	246,32
$1 \cdot 10^{-5}$	0,68	0,73	0,73	0,71	0,0236	3,32	287,56
$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,83	0,81	0,79	0,81	0,0163	2,01	323,08



Obrázek č. 15: Graf vyjadřující závislost intenzity chemiluminiscence na koncentračních hladinách nanočástic MPA 540 nm

Při testování MPA nanočástic s emisním maximem 540 nm byla zjištěna největší intenzita chemiluminiscence při koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ M. S touto koncentrací bylo dále provedeno tzv. stop-flow měření, při kterém byla zjištěna výška píku a plocha. Výsledné hodnoty byly vztaženy ke slepému pokusu.

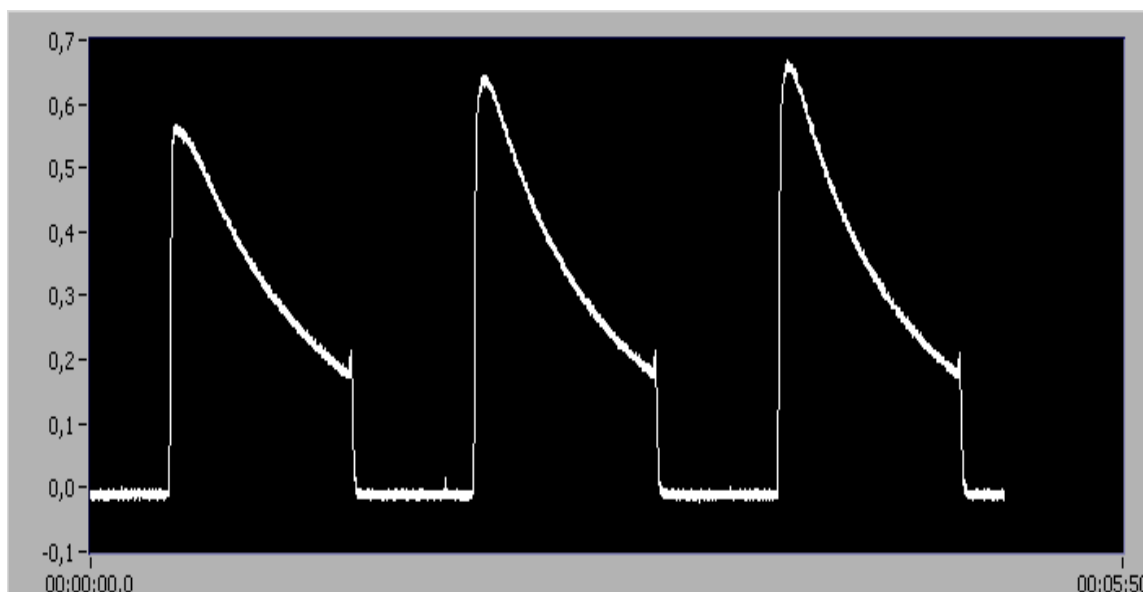
Tabulka č. 11: Vyhodnocení výšky píku a plochy QDs MPA 540 nm v koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$

	výška píku	plocha píku
MPA 540 nm	0,57	22,05
	0,65	23,63
	0,67	23,89
průměr	0,63	23,19
směr.odchylka	0,0432	0,8131
RSD [%]	6,86	3,51
intenzita CL [nA]	253,15	–

Tabulka č. 12: Vyhodnocení výšky píku a plochy slepého pokusu

	výška píku	plocha píku
slepý vzorek	0,76	27,31
	0,78	27,49
	0,80	27,73
průměr	0,78	27,51
směr.odchylka	0,02	0,17
RSD [%]	2,56	0,62
intenzita CL [nA]	312,00	–

Při porovnání výsledků ze stop-flow měření za použití nanočástic MPA 540 nm a slepého vzorku si lze povšimnout, že došlo jak ke snížení výšky píku, tak ke zmenšení plochy. To znamená, že signál získaný v kombinaci s nanočásticemi je menší i kratší.



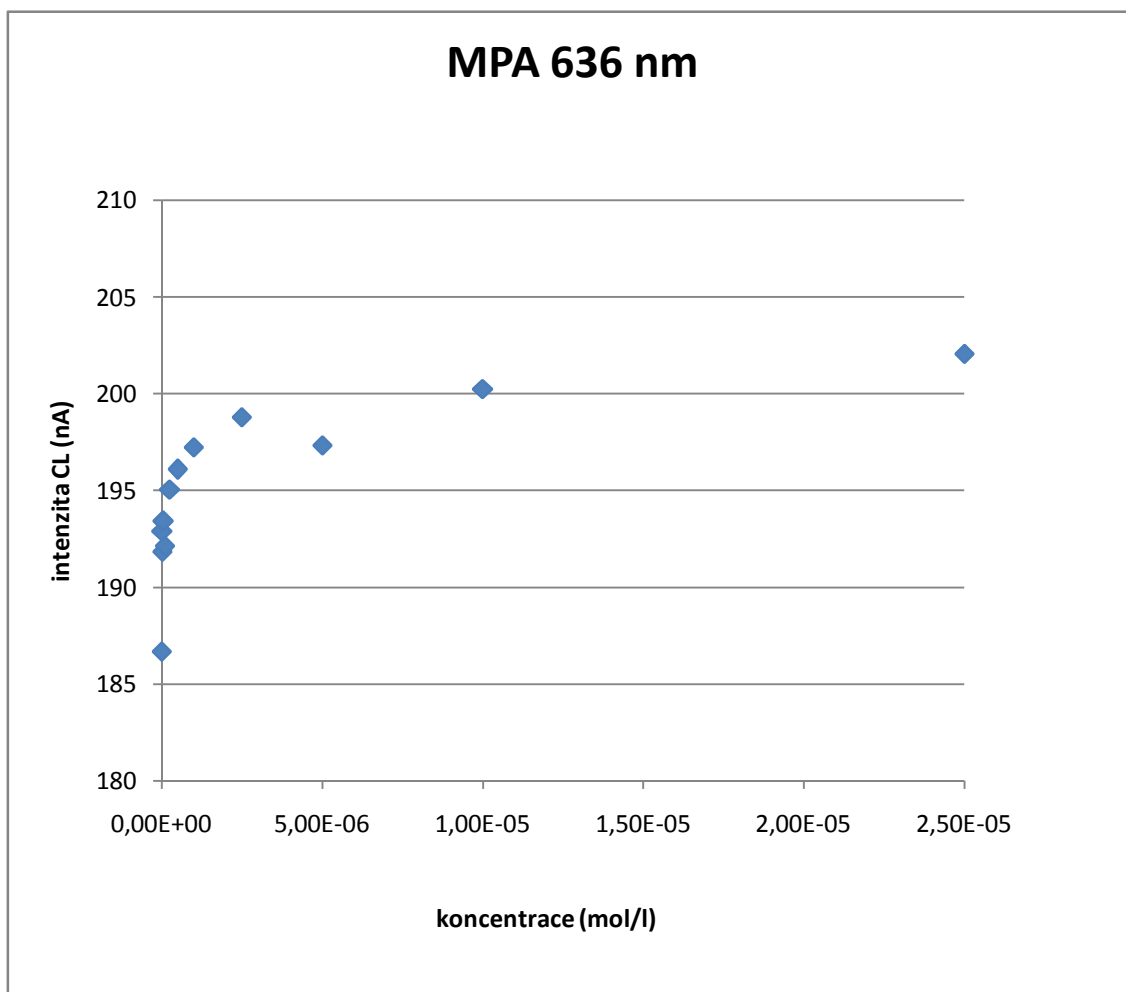
Obrázek č. 16: Reálný záznam ze stop-flow měření s použitím nanočástice

Závěr: Největší intenzita chemiluminiscence byla zjištěna při koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, a to 323,08 nA. V porovnání s hodnotou slepého pokusu, která vyšla 206,12 nA, byl vyhodnocen nárůst CL o 56,74 %. Naopak nejnižší signál chemiluminiscence byl naměřen při koncentraci $2,5 \cdot 10^{-8}$ M a to 207,92 nA, nárůst CL oproti slepému pokusu byl o 0,87 %. S využitím stop-flow systému došlo ke snížení signálu (o 18,86 %) a zároveň byl tento signál kratší (o 15,70 %).

5.4. NANOČÁSTICE MPA 636 nm

Tabulka č. 13: Nanočástice MPA s emisním maximem 636 nm

MPA 636 nm							
c [mol/l]	výška píku			průměr	SD	RSD [%]	intenzita CL [nA]
0	0,46	0,47	0,47	0,47	0,0047	1,00	186,79
$1 \cdot 10^{-8}$	0,47	0,49	0,48	0,48	0,0082	1,71	192,92
$2,5 \cdot 10^{-8}$	0,47	0,48	0,48	0,48	0,0047	0,98	191,85
$5 \cdot 10^{-8}$	0,48	0,49	0,49	0,49	0,0047	0,96	193,42
$1 \cdot 10^{-7}$	0,47	0,49	0,49	0,48	0,0094	1,96	192,15
$2,5 \cdot 10^{-7}$	0,48	0,49	0,49	0,49	0,0047	0,96	195,06
$5 \cdot 10^{-7}$	0,48	0,49	0,50	0,49	0,0082	1,67	196,10
$1 \cdot 10^{-6}$	0,49	0,50	0,49	0,49	0,0047	0,96	197,24
$2,5 \cdot 10^{-6}$	0,48	0,50	0,51	0,50	0,0125	2,50	198,80
$5 \cdot 10^{-6}$	0,47	0,50	0,51	0,49	0,0170	3,47	197,35
$1 \cdot 10^{-5}$	0,49	0,50	0,51	0,50	0,0082	1,64	200,24
$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,49	0,51	0,51	0,50	0,0094	1,88	202,07



Obrázek č. 17: Graf vyjadřující závislost intenzity chemiluminiscence na koncentračních hladinách nanočástic MPA 636 nm

Při testování MPA nanočástic s emisním maximem 636 nm byla zjištěna největší intenzita chemiluminiscence při koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ M. S touto koncentrací bylo dále provedeno tzv. stop-flow měření, při kterém byla zjištěna výška píku a plocha. Výsledné hodnoty byly vztaženy ke slepému pokusu.

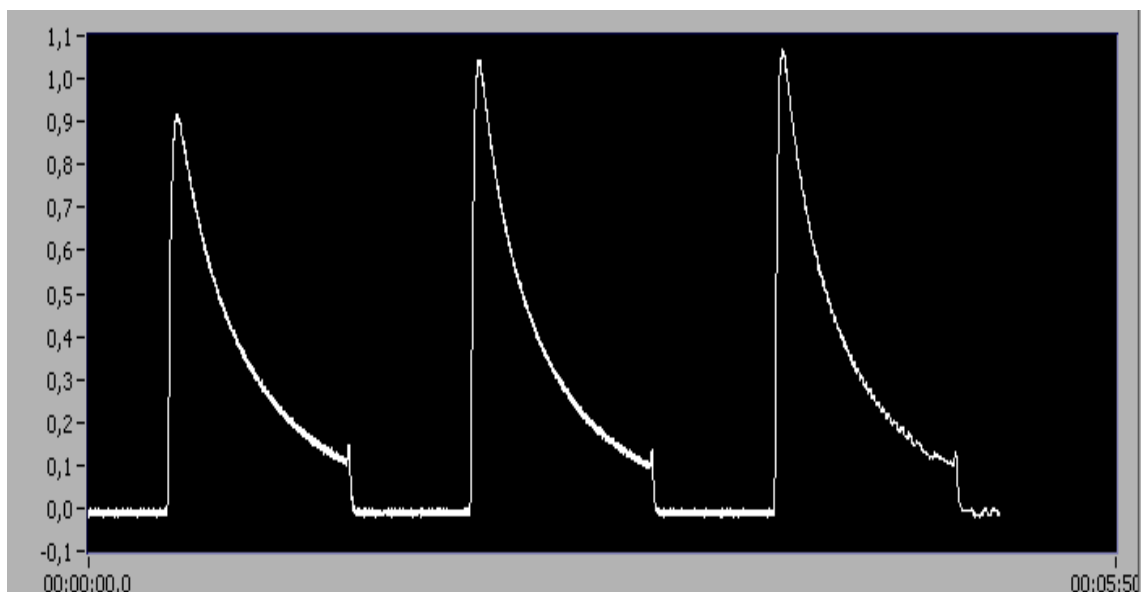
Tabulka č. 14: Vyhodnocení výšky píku a plochy QDs MPA 636 nm v koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ M

	výška píku	plocha píku
MPA 636 nm	0,92	23,61
	1,04	24,22
	1,07	24,35
průměr	1,01	24,06
směr.odchylka	0,0648	0,3226
RSD [%]	6,42	1,34
intenzita CL [nA]	403,77	–

Tabulka č. 15: Vyhodnocení výšky píku a plochy slepého pokusu

	výška píku	plocha píku
slepý vzorek	0,76	27,31
	0,78	27,49
	0,80	27,73
průměr	0,78	27,51
směr.odchylka	0,02	0,17
RSD [%]	2,56	0,62
intenzita CL [nA]	312,00	–

Při porovnání výsledků ze stop-flow měření za použití nanočástic MPA 636 nm a slepého vzorku si lze povšimnout, že sice došlo ke zvýšení výšek píku a tím pádem ke zvýšení intenzity Cl (v tomto případě o 29,41 %), ale plocha píku klesla. To znamená, že signál při použití nanočástic je kratší.



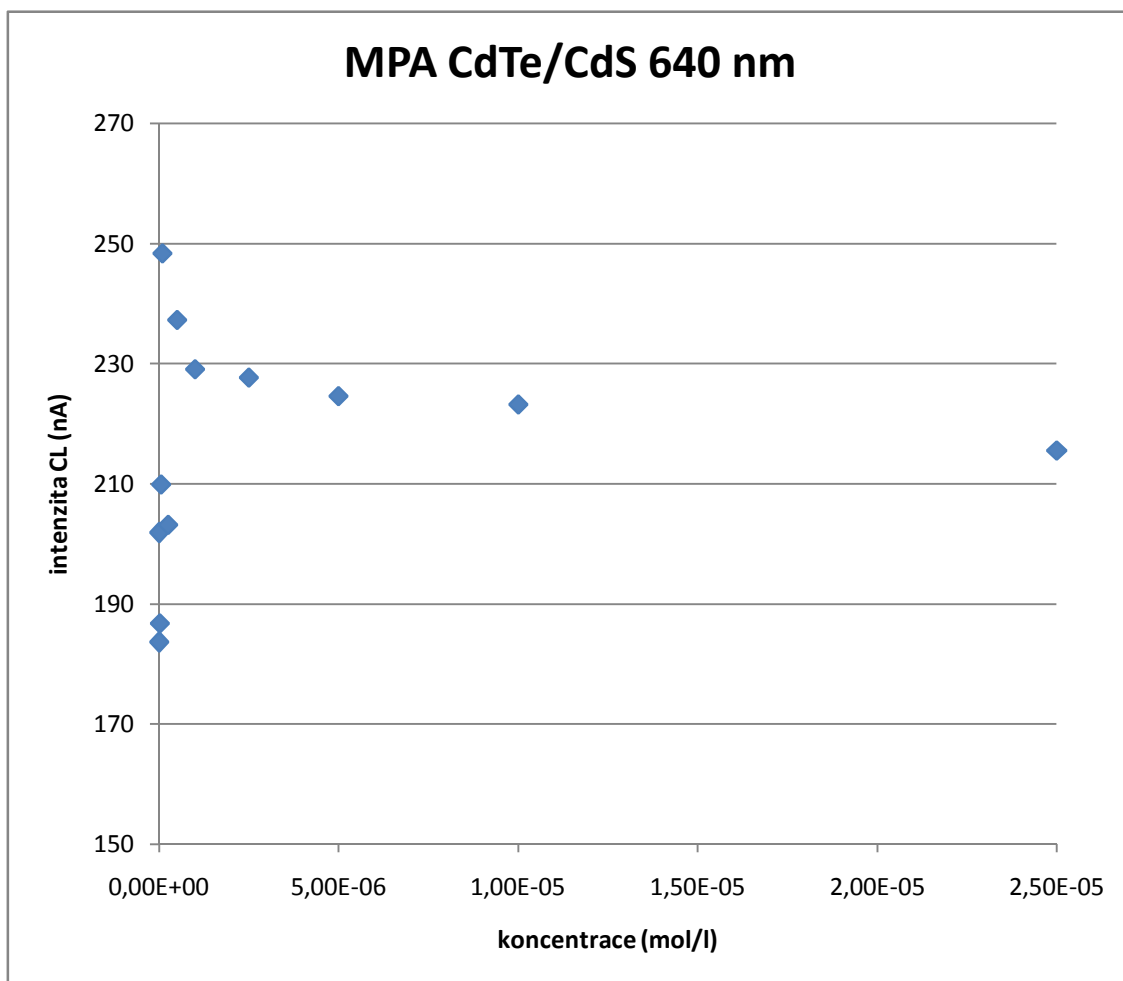
Obrázek č. 18: Reálný záznam ze stop-flow měření s použitím nanočástice

Závěr: Největší intenzita chemiluminiscence byla zjištěna při koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, a to 202,07 nA. V porovnání s hodnotou slepého pokusu, která vyšla 186,79 nA, byl vyhodnocen nárůst CL o 8,18 %. Naopak nejnižší signál chemiluminiscence byl naměřen při koncentraci $2,5 \cdot 10^{-8}$ M a to 191,85 nA, nárůst CL oproti slepému pokusu byl o 2,71 %. S využitím stop-flow systému došlo sice ke zvýšení signálu (o 29,41 %), ale zároveň byl tento signál kratší (o 12,54 %).

5.5. NANOČÁSTICE MPA (CdTe/CdS) 640 nm

Tabulka č. 16: Nanočástice MPA (CdTe/CdS) s emisním maximem 640 nm

MPA (CdTe/CdS) 640 nm							
c [mol/l]	výška píku			průměr	SD	RSD [%]	intenzita CL [nA]
0	0,45	0,46	0,46	0,46	0,0047	1,02	183,61
$1 \cdot 10^{-8}$	0,50	0,51	0,50	0,50	0,0047	0,94	201,84
$2,5 \cdot 10^{-8}$	0,47	0,46	0,48	0,47	0,0082	1,74	186,74
$5 \cdot 10^{-8}$	0,52	0,53	0,53	0,53	0,0047	0,89	209,88
$1 \cdot 10^{-7}$	0,61	0,63	0,62	0,62	0,0082	1,32	248,36
$2,5 \cdot 10^{-7}$	0,51	0,51	0,51	0,51	0,0000	0,00	203,16
$5 \cdot 10^{-7}$	0,60	0,59	0,59	0,59	0,0047	0,80	237,28
$1 \cdot 10^{-6}$	0,56	0,57	0,58	0,57	0,0082	1,44	229,05
$2,5 \cdot 10^{-6}$	0,56	0,57	0,57	0,57	0,0047	0,82	227,72
$5 \cdot 10^{-6}$	0,55	0,56	0,57	0,56	0,0082	1,46	224,56
$1 \cdot 10^{-5}$	0,55	0,56	0,56	0,56	0,0047	0,84	223,22
$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,53	0,54	0,54	0,54	0,0047	0,87	215,52



Obrázek č. 19: Graf vyjadřující závislost intenzity chemiluminiscence na koncentračních hladinách nanočástic MPA (CdTe/CdS) 640 nm

Při testování MPA (CdTe/CdS) nanočástic s emisním maximem 640 nm byla zjištěna největší intenzita chemiluminiscence při koncentraci $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$. S touto koncentrací bylo dále provedeno tzv. stop-flow měření, při kterém byla zjištěna výška píku a plocha. Výsledné hodnoty byly vztaženy ke slepému pokusu.

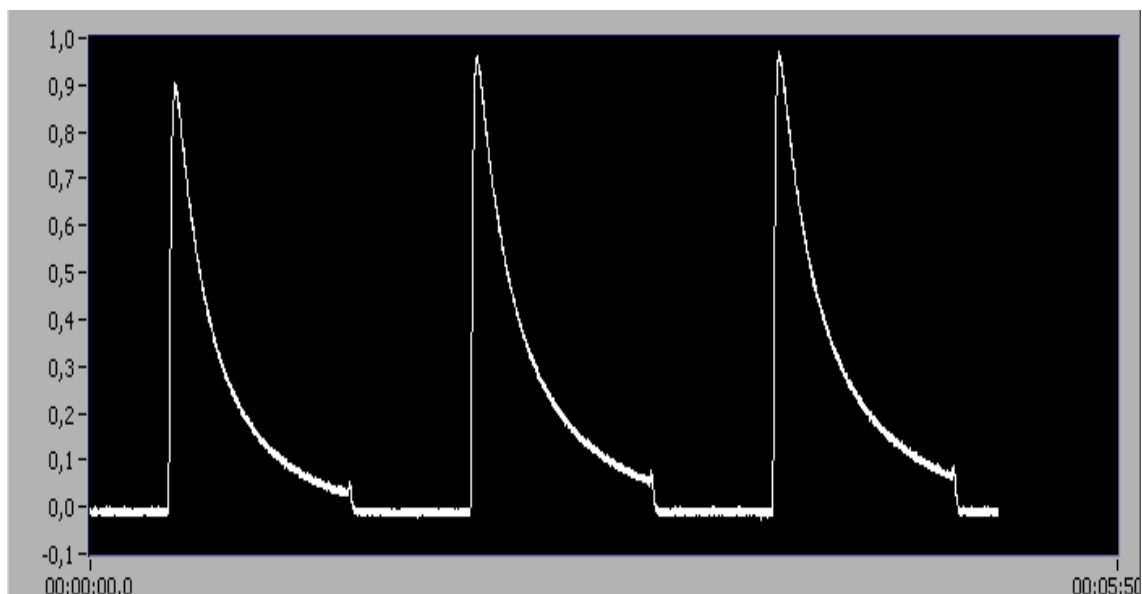
Tabulka č. 17: Vyhodnocení výšky píku a plochy QDs MPA (CdTe/CdS) 640 nm v koncentraci 5.10^{-7} M

	výška píku	plocha píku
MPA (CdTe/CdS) 640 nm	0,87	15,77
	0,97	18,80
	0,97	19,92
průměr	0,94	18,16
směr.odchylka	0,0471	1,7530
RSD [%]	5,01	9,65
intenzita CL [nA]	374,74	–

Tabulka č. 18: Vyhodnocení výšky píku a plochy slepého pokusu

	výška píku	plocha píku
slepý vzorek	0,76	27,31
	0,78	27,49
	0,80	27,73
průměr	0,78	27,51
směr.odchylka	0,02	0,17
RSD [%]	2,56	0,62
intenzita CL [nA]	312,00	–

Při porovnání výsledků ze stop-flow měření za použití nanočástic MPA (CdTe/CdS) 640 nm a slepého vzorku si lze povšimnout, že sice došlo ke zvýšení výšek píku a tím pádem ke zvýšení intenzity CI (v tomto případě o 20,11 %), ale plocha píku klesla. To znamená, že signál při použití nanočástic je kratší.



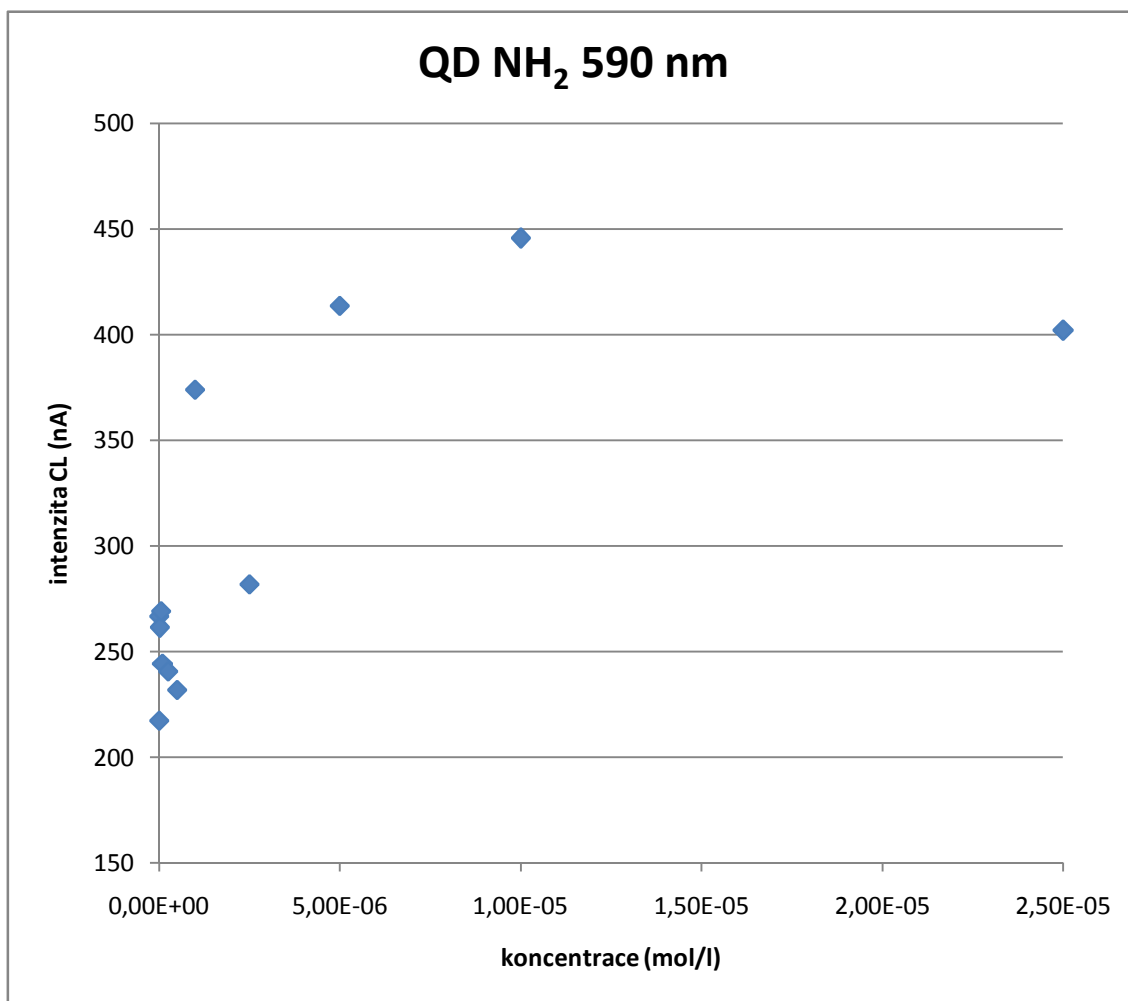
Obrázek č. 20: Reálný záznam ze stop-flow měření s použitím nanočástice

Závěr: Největší intenzita chemiluminiscence byla zjištěna při koncentraci $5 \cdot 10^{-7}$ M, a to 237,28 nA. V porovnání s hodnotou slepého pokusu, která vyšla 183,61 nA, byl vyhodnocen nárůst CL o 29,23 %. Naopak nejnižší signál chemiluminiscence byl naměřen při koncentraci $2,5 \cdot 10^{-8}$ M a to 186,74 nA, nárůst CL oproti slepému pokusu byl o 1,70 %. S využitím stop-flow systému došlo sice ke zvýšení signálu (o 20,11 %), ale zároveň byl tento signál kratší (o 33,99 %).

5.6. NANOČÁSTICE NH₂ 590 nm

Tabulka č. 19: Nanočástice NH₂ s emisním maximem 590 nm

NH ₂ 590 nm							
c [mol/l]	výška píku			průměr	SD	RSD [%]	intenzita CL [nA]
0	0,53	0,54	0,55	0,54	0,0082	1,52	217,36
1.10 ⁻⁸	0,66	0,67	0,67	0,67	0,0047	0,70	266,68
2,5.10 ⁻⁸	0,65	0,66	0,66	0,66	0,0047	0,71	261,44
5.10 ⁻⁸	0,57	0,61	0,62	0,60	0,0216	3,60	239,18
1.10 ⁻⁷	0,58	0,62	0,63	0,61	0,0216	3,54	244,40
2,5.10 ⁻⁷	0,57	0,61	0,63	0,60	0,0249	4,15	240,80
5.10 ⁻⁷	0,57	0,58	0,59	0,58	0,0082	1,41	232,00
1.10 ⁻⁶	0,92	0,93	0,95	0,93	0,0125	1,34	373,99
2,5.10 ⁻⁶	0,70	0,71	0,71	0,71	0,0047	0,66	282,05
5.10 ⁻⁶	1,01	1,03	1,06	1,03	0,0205	1,99	413,61
1.10 ⁻⁵	1,05	1,13	1,16	1,11	0,0464	4,18	445,63
2,5.10 ⁻⁵	0,93	1,03	1,06	1,01	0,0556	5,50	402,09



Obrázek č. 21: Graf vyjadřující závislost intenzity chemiluminiscence na koncentračních hladinách nanočástic NH₂ 590 nm

Při testování nanočástic NH₂ s emisním maximem 590 nm byla zjištěna největší intenzita chemiluminiscence při koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ M. S touto koncentrací bylo dále provedeno tzv. stop-flow měření, při kterém byla zjištěna výška píku a plocha. Výsledné hodnoty byly vztaženy ke slepému pokusu.

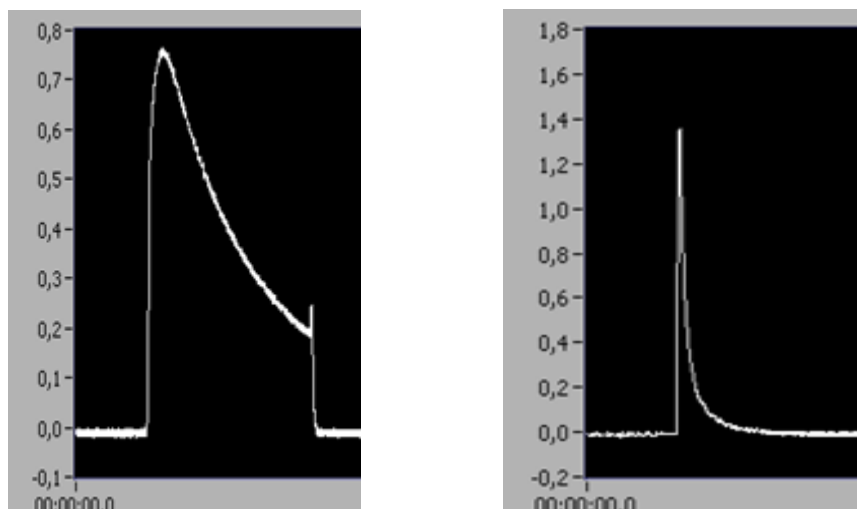
Tabulka č. 20: Vyhodnocení výšky píku a plochy QDs NH₂ 590 nm v koncentraci 1.10⁻⁵ M

	výška píku	plocha píku
QD NH₂ 590 nm	1,35	4,58
	1,44	7,02
	1,68	8,42
průměr	1,49	6,67
směr.odchylka	0,1393	1,5867
RSD [%]	9,35	23,79
intenzita CL [nA]	595,97	–

Tabulka č. 21: Vyhodnocení výšky píku a plochy slepého pokusu

	výška píku	plocha píku
slepý vzorek	0,76	27,31
	0,78	27,49
	0,80	27,73
průměr	0,78	27,51
směr.odchylka	0,02	0,17
RSD [%]	2,56	0,62
intenzita CL [nA]	312,00	–

Při porovnání výsledků ze stop-flow měření za použití nanočástic NH₂ 590 nm a slepého vzorku si lze povšimnout, že došlo k výraznému zvýšení výšek píku a tím pádem ke zvýšení intenzity CL (v tomto případě o 91,02 %), ale plocha píku razantně klesla. To znamená, že signál při použití nanočástic je o dost kratší.



Obrázek č. 22: Porovnání profilu píků nanočástice QD NH₂ (vpravo) se slepým pokusem (vlevo)

Závěr: Největší intenzita chemiluminiscence byla zjištěna při koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ M, a to 445,63 nA. V porovnání s hodnotou slepého pokusu, která vyšla 217,36 nA, byl vyhodnocen nárůst CL o 105,02 %. Naopak nejnižší signál chemiluminiscence byl naměřen při koncentraci $5 \cdot 10^{-7}$ M a to 232,00 nA, nárůst CL oproti slepému pokusu byl o 6,74 %. S využitím stop-flow systému došlo k výraznému zvýšení signálu (o 91,02 %), ale zároveň byl tento signál o dost kratší (o 75,75 %).

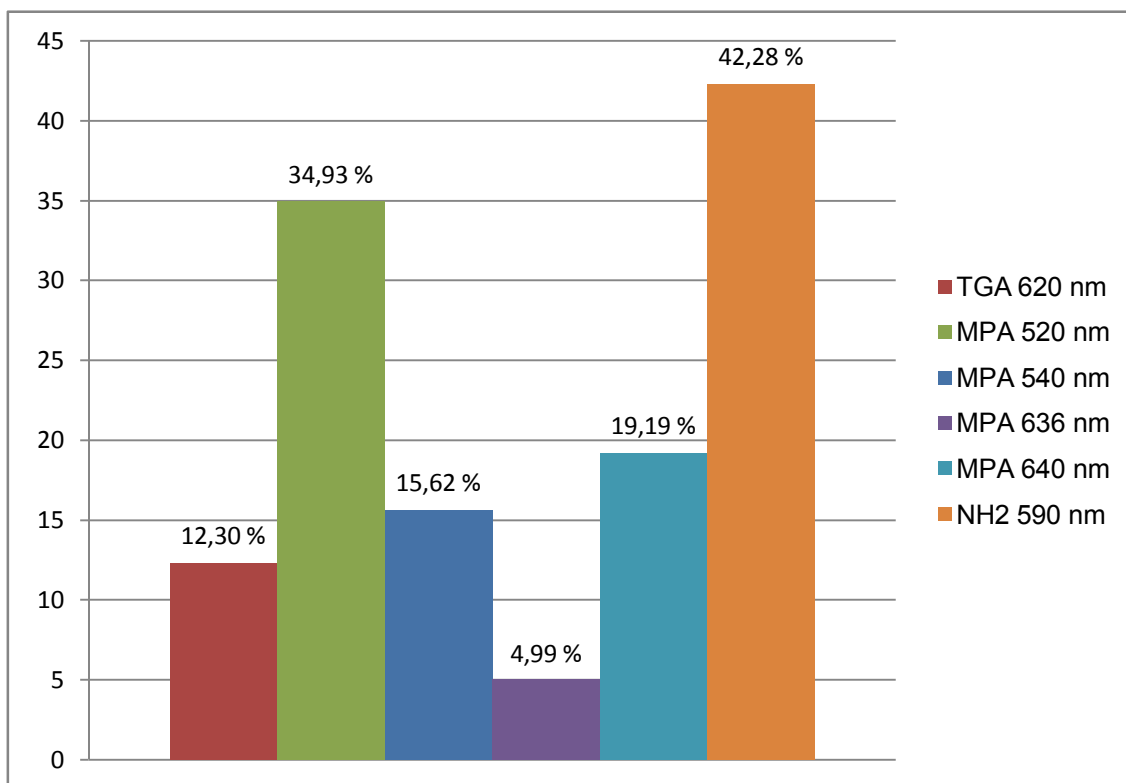
6. Shrnutí

Intenzita CL byla vypočtena z naměřených výšek píků vycházejících z měření s předem připravenými jednotlivými koncentračními hladinami. U každého typu nanočástice bylo provedeno tzv. stop-flow měření, které se uskutečnilo vždy u téhož roztoku, u kterého byla detekována největší intenzita chemiluminiscence.

Tabulka č. 22: Souhrn výsledků

Nanočástice	průměr CL [nA]	průměr RSD [%]	průměr CL Sl.vz [nA]	průměrný % nárůst/pokles
TGA 620 nm	214,12	1,29	190,67	+ 12,30
MPA 520 nm	316,81	1,00	234,80	+ 34,93
MPA 540 nm	238,31	1,58	206,12	+ 15,62
MPA 636 nm	196,11	1,70	186,79	+ 4,99
MPA 640 nm	218,85	1,01	183,61	+ 19,19
NH ₂ 590 nm	309,26	2,53	217,36	+ 42,28

Největší nárůst intenzity CL, vztažené ke slepému pokusu, je u nanočástice NH₂ 590 nm, a to o 42,28 %. Ale v tabulce č. x., kde jsou zaznamenány hodnoty intenzit CL připravených vzorků s různými koncentracemi, je vidět, že výsledky jsou značně rozdílné. Nejmenší relativní směrodatnou odchylku a zároveň výrazný nárůst signálu má nanočástice MPA s emisním maximem 520 nm a to o 34,93 %. U všech typů nanočástic byla zjištěna velice dobrá opakovatelnost měření.

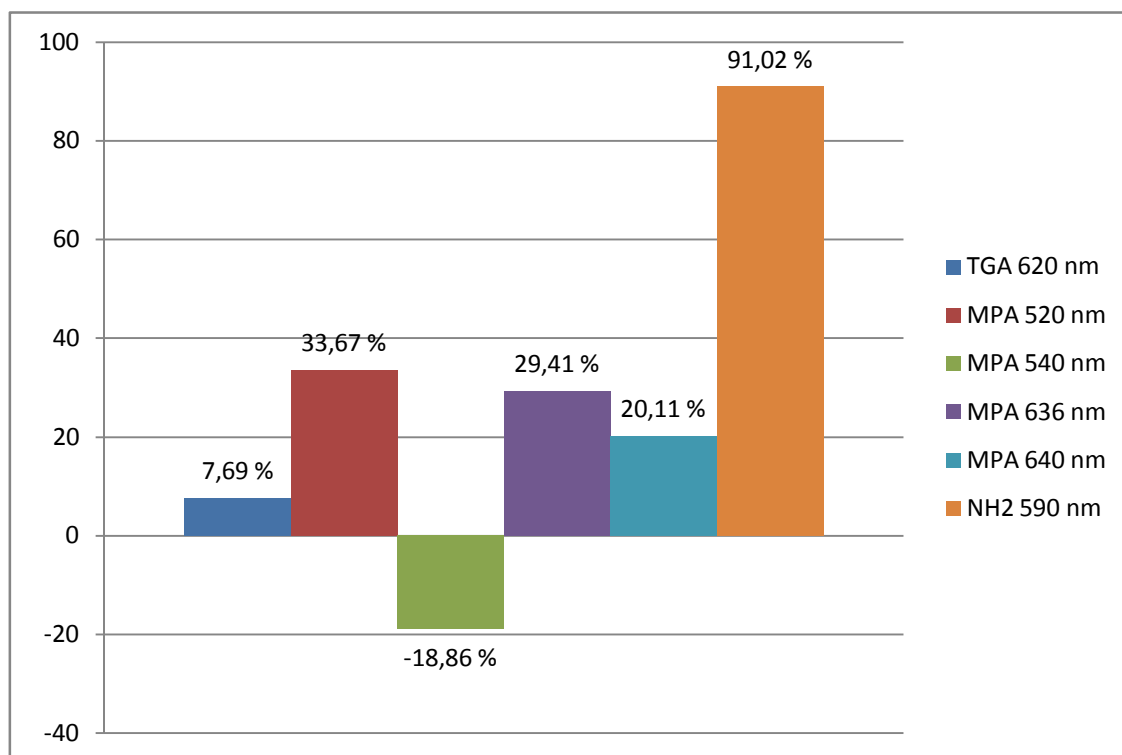


Obrázek č. 23: Celkový procentuální nárůst/pokles intenzit CL různých typů QD nanočástic.

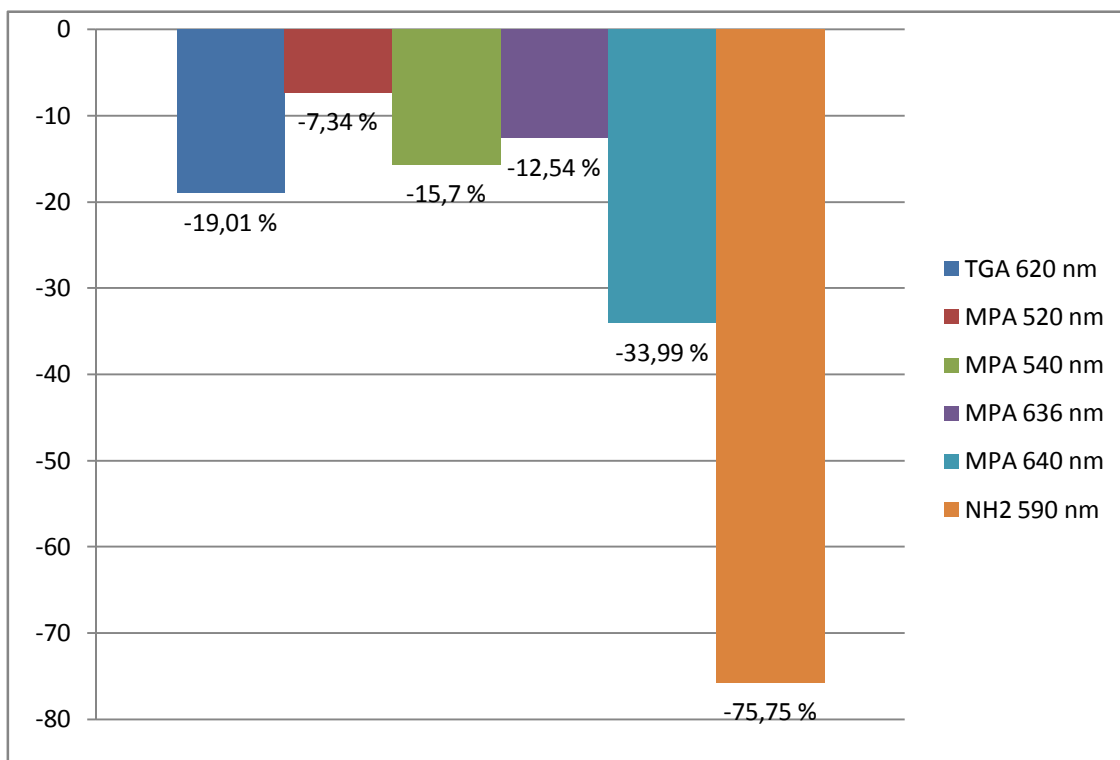
Tabulka č. 23: Souhrn výsledků ze stop – flow měření

Nanočástice	c [mol/l]	CL [nA]	plocha píku	RSD [%] CL	RSD [%] plochy píku	% nárůst/pokles s intenzitou CL	% nárůst/pokles s plochy píku
TGA 620 nm	$2,5 \cdot 10^{-5}$	336,00	22,28	5,95	3,73	+ 7,69	- 19,01
MPA 520 nm	$2,5 \cdot 10^{-5}$	417,05	25,49	1,92	5,18	+ 33,67	- 7,34
MPA 540 nm	$2,5 \cdot 10^{-5}$	253,15	23,19	6,86	3,51	- 18,86	- 15,70
MPA 636 nm	$2,5 \cdot 10^{-5}$	403,77	24,06	6,42	1,34	+ 29,41	- 12,54
MPA 640 nm	$5 \cdot 10^{-7}$	374,74	18,16	5,01	9,65	+ 20,11	- 33,99
NH₂ 590 nm	$1 \cdot 10^{-5}$	595,97	6,67	9,35	23,79	+ 91,02	- 75,75

U žádného vzorku obsahujícího nanočástice nedošlo k nárůstu plochy píku, to znamená, že ve všech případech byl signál kratší než u slepého pokusu. Největší pokles plochy píku byl pozorován u QDs s emisním maximem 590 nm, a to o 75,75 %. Na druhou stranu byl u této nanočástice naměřen největší nárůst intenzity CL, a to o 91,02 %. U nanočástice MPA 540 nm došlo naopak k největšímu poklesu intenzity CL, a to o 18,86 %. Nejlepší opakovatelnost měření co se týče plochy píku, byla zaznamenána u nanočástice MPA 636 nm (1,34 %). Naopak značné rozdíly se vyskytovaly u nanočástice NH₂ 590 nm (23,79 %).



Obrázek č. 24: Procentuální nárůst/pokles intenzity CL různých typů QD nanočástic při použití stop-flow systému



Obrázek č. 25: Procentuální nárůst/pokles plochy píku různých typů QD nanočástic při použití stop-flow systému

7. Závěr

Cílem práce bylo podrobné testování QD nanočástic s různým emisním maximem a povrchovou úpravou jako zesilovačů chemiluminiscenčního signálu. V tomto experimentálním měření bylo použito většího počtu koncentračních hladin, se zaměřením na nízké koncentrace, a srovnání s hodnotou bez QDs (slepý pokus). K vlastnímu testování byla využita metoda SIA s detekcí ve spirální průtokové cele detektoru Schoeffel.

Ze 6-ti analyzovaných QD nanočástic byl největší nárůst intenzity chemiluminiscence u QD NH₂ s emisním maximem 590 nm, a to o 42,28 %. U nanočástice MPA s emisním maximem 540 nm došlo k poklesu intenzity CL v rámci stop-flow měření, a to o 18,86 %. K největšímu zesílení signálu za využití stop-flow systému došlo u QD NH₂ 590 nm, a to o 91,02 %, avšak u této nanočástice byla zaznamenána i nejkratší signální odezva.

Díky dobré opakovatelnosti výsledků z měření bez použití stop-flow systému, a také kvůli potvrzení kratšího signálu ze stop-flow detekce se dá využití QD nanočástice doporučit pro praktické účely ke zvýšení chemiluminiscenčního signálu v systému s luminolem. Nicméně zvýšení nedosahuje takové úrovně, aby se v praxi významně zvýšila citlivost stanovení využívajících uvedený chemiluminiscenční systém.

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Princip průtokové injekční analýzy

Obrázek č. 2: Princip sekvenční injekční analýzy

Obrázek č. 3: Schématické uspořádání sekvenční injekční analýzy

Obrázek č. 4: Oxidace luminolu peroxidem vodíku v bazickém prostředí

Obrázek č. 5: Reakce roztoku luminolu s krví (v přítomnosti peroxidu vodíku);
katalyzátor hem

Obrázek č. 6: Struktura kvantových teček

Obrázek č. 7: Luminiscence CdSe/ZnS Quantum-Dots roztoků

Obrázek č. 8: Rozdílné procesy podílející se na mechanismu aplikací QD nanočástic v
různých luminiscenčních metodách ¹⁵

Obrázek č. 9: Spirální chemiluminiscenční modul

Obrázek č. 10: Graf vyjadřující závislost intenzity chemiluminiscence na
koncentračních hladinách nanočástic TGA 620 nm

Obrázek č. 11: Reálný záznam ze stop-flow měření s použitím nanočástice

Obrázek č. 12: Reálný záznam ze stop-flow měření slepého vzorku

Obrázek č. 13: Graf vyjadřující závislost intenzity chemiluminiscence na
koncentračních hladinách nanočástic MPA 520 nm

Obrázek č. 14: Reálný záznam ze stop-flow měření s použitím nanočástice

Obrázek č. 15: Graf vyjadřující závislost intenzity chemiluminiscence na
koncentračních hladinách nanočástic MPA 540 nm

Obrázek č. 16: Reálný záznam ze stop-flow měření s použitím nanočástice

Obrázek č. 17: Graf vyjadřující závislost intenzity chemiluminiscence na
koncentračních hladinách nanočástic MPA 636 nm

Obrázek č. 18: Reálný záznam ze stop-flow měření s použitím nanočástice

Obrázek č. 19: Graf vyjadřující závislost intenzity chemiluminiscence na
koncentračních hladinách nanočástic MPA (CdTe/CdS) 640 nm

Obrázek č. 20: Reálný záznam ze stop-flow měření s použitím nanočástice

Obrázek č. 21: Graf vyjadřující závislost intenzity chemiluminiscence na
koncentračních hladinách nanočástic NH₂ 590 nm

Obrázek č. 22: Porovnání profilu píků nanočástice QD NH₂ (vpravo) se slepým
pokusem (vlevo)

Obrázek č. 23: Celkový procentuální nárůst/pokles intenzit CL různých typů QD nanočástic

Obrázek č. 24: Procentuální nárůst/pokles intenzity CL různých typů QD nanočástic při použití stop-flow systému

Obrázek č. 25: Procentuální nárůst/pokles plochy píku různých typů QD nanočástic při použití stop-flow systému

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Příprava pracovních roztoků QDs

Tabulka č. 2: Ukázka průběhu měřicího cyklu

Tabulka č. 3: Program stop-flow měření

Tabulka č. 4: Nanočástice TGA s emisním maximem 620 nm

Tabulka č. 5: Vyhodnocení výšky píku a plochy QDs TGA 620 nm v koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ M

Tabulka č. 6: Vyhodnocení výšky píku a plochy slepého pokusu

Tabulka č. 7: Nanočástice MPA s emisním maximem 520 nm

Tabulka č. 8: Vyhodnocení výšky píku a plochy QDs MPA 520 nm v koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ M

Tabulka č. 9: Vyhodnocení výšky píku a plochy slepého pokusu

Tabulka č. 10: Nanočástice MPA s emisním maximem 540 nm

Tabulka č. 11: Vyhodnocení výšky píku a plochy QDs MPA 540 nm v koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ M

Tabulka č. 12: Vyhodnocení výšky píku a plochy slepého pokusu

Tabulka č. 13: Nanočástice MPA s emisním maximem 636 nm

Tabulka č. 14: Vyhodnocení výšky píku a plochy QDs MPA 636 nm v koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5}$ M

Tabulka č. 15: Vyhodnocení výšky píku a plochy slepého pokusu

Tabulka č. 16: Nanočástice MPA (CdTe/CdS) s emisním maximem 640 nm

Tabulka č. 17: Vyhodnocení výšky píku a plochy QDs MPA (CdTe/CdS) 640 nm v koncentraci $5 \cdot 10^{-7}$ M

Tabulka č. 18: Vyhodnocení výšky píku a plochy slepého pokusu

Tabulka č. 19: Nanočástice NH₂ s emisním maximem 590 nm

Tabulka č. 20: Vyhodnocení výšky píku a plochy QDs NH₂ 590 nm v koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ M

Tabulka č. 21: Vyhodnocení výšky píku a plochy slepého pokusu

Tabulka č. 22: Souhrn výsledků

Tabulka č. 23: Souhrn výsledků ze stop-flow měření

Seznam použité literatury a ostatních zdrojů

[1] Paseková H., Polášek M., Solich P.: Sekvenční injekční analýza, Chemické listy 93, 354-359 (1999)

[2] Průtoková injekční analýza se spektrofotometrickou detekcí [online]. [cit. 2014-2-5] Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/fia.pdf>

[3] Patrovský V., Luminiscenční analýza, Rozhledy mat. fyz. 61, 1982/3, 341-347

[4] Co je chemiluminiscence [online]. [cit. 2014-2-8] Dostupné z: <http://projekt-cl.ujep.cz/teoriecl.html#cojecl>

[5] Chemiluminiscence luminolu [online]. [cit. 2014-2-8] Dostupné z: http://chemiluminiscence.xf.cz/chemiluminiscence_II_final.pdf

[6] Forezní chemie [online]. [cit. 2014-2-8] Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~kudch/main/JPD3/foreznichemie.pdf>

[7] Nanočástice: Technologický zázrak, nebo hrozba pro lidské zdraví? [online]. [cit. 2014-2-11] Dostupné z: <http://www.ceskapozice.cz/domov/ekologie/nanocastice-technologicky-zazrak-nebo-hrozba-pro-lidske-zdravi?page=0>

[8] Řezanka P., Záruba K., Král V.: Potenciál modifikovaných nanočástic v analytické chemii. Chemické listy 101, 881-885 (2007)

[9] Remedia: Nanočástice pro léčivé formy [online] [cit. 2014-2-11] Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-formy/Nanocastice-pro-lekove-formy/6-H-ix.magarticle.aspx>

[10] Hlaváček A., Skládal P.: Kvantové tečky: příprava, konjugace a využití v bioanalytické chemii a biologii. Chemické listy 105, 611-615 (2011)

- [11] Drbohlavová J., Adam V., Křížek R., Hubálek J.: Quantum Dots- Characterization, Preparation and Usage in Biological System. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(2), 656-673 (2009)
- [12] Junling D., Song L. X., Zhan J. H.: One-Pot Synthesis of Highly Luminescent CdTe Quantum Dots by Microwave Irradiation Reduction and Their Hg²⁺-Sensitive Properties. *Nano Research*, 2(1), 61-68 (2009)
- [13] Obrázek luminiscence QDs [online] [cit. 2014-3-2] Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/quantum-dots.html>
- [14] Frigerio Ch., Riberio D. S. M., Rodrigues S. S. M., Abreu V. L. R. G., Barbarosa J. A. C., Prior J. A. V., Marques K. L., Santos J. L. M.: Application of quantum dots as analytical tools in automated chemical analysis. *Analytica Chimica Acta* 735, 9-22 (2012)
- [15] Costas-Mora I., Romero V., Lavilla I., Carlos B.: An overview of recent advances in the application of quantum dots as luminescent probes to inorganic-trace analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 57, 64-72 (2014)
- [16] Kanwal S., Traore Z., Zhao Ch., Su X.: Enhancement effect of CdTe quantum dots-IgG bioconjugates on chemiluminescence of luminol-H₂O₂ system. *Journal of Luminescence* 130, 1901-1906 (2010)
- [17] Sun Ch., Liu B., Li J.: Sensitized chemiluminescence of CdTe quantum-dots on Ce (IV)-sulfite and its analytical applications. *Talanta* 75, 447-454 (2008)
- [18] Chen L., Li R., Lin L., Guo G., Lin J-M.: Determination of l-ascorbic acid in human serum by chemiluminescence based on hydrogen peroxide-sodium hydrogen carbonate-CdSe/CdS quantum dots system. *Talanta* 81, 1688-1696 (2010)
- [19] Zhang J., Li B.: Enhanced chemiluminescence of CdTe quantum dots-H₂O₂ by horseradish peroxidase-mimicking DNAzyme. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 125, 228–233 (2014)

[20] Zhao Y., Zhao S., Huang J., Ye F.: Quantum dot-enhanced chemiluminescence detection for simultaneous determination of dopamine and epinephrine by capillary electrophoresis. *Talanta* 85, 2650– 2654 (2011)

[21] Ribeiro D. S. M., Frigerio Ch., Santos J. L. M., Prior J. A. V.: Photoactivation by visible light of CdTe quantum dots for inline generation of reactive oxygen species in an automated multipumping flow system. *Analytica Chimica Acta* 735, 69– 75 (2012)