

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium vlivu chinonů a Quantum Dots částic na průběh chemiluminiscenčních reakcí

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

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. Tato diplomová práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Práce byla vypracována v souladu se Studijním a zkušebním řádem Univerzity Karlovy v Praze a v souladu s Pravidly pro organizaci studia na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové.

Hradec Králové

.....

Martina Kořínková

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za odborné rady a čas, který mi věnovala při vzniku této práce. Mé poděkování patří také ostatním pracovníkům Katedry analytické chemie za vytvoření vhodných podmínek pro realizaci experimentální části diplomové práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Martina Kořínková

Školitel: PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium vlivu chinonů a Quantum Dots částic na průběh chemiluminiscenčních reakcí

Záměrem této diplomové práce bylo pozorovat a vyhodnotit vliv 9,10-fenantrenchinonu, dithiothreitolu a Quantum Dots (QD) částic na chemiluminiscenční (CL) systém, který obsahoval roztok peroxidu vodíku, luminolu a hexakynoželezitanu draselného. Všechny analýzy byly provedeny pomocí průtokové metody sekvenční injekční analýzy (SIA). Chemiluminiscenční záření luminolu bylo založeno na jeho oxidaci peroxidem vodíku za katalýzy $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6$. Existuje také ještě jiný CL systém, který se podařilo vyvinout japonským vědcům s využitím chinonu, luminolu a dithiothreitolu. Zájmem této práce bylo tedy reprodukovat výsledky, kterých dosáhli autoři japonské studie, avšak s použitím metody SIA nebyly shledány srovnatelné výsledky měření. Fenantrenchinon ovlivňoval CL signál ve smyslu zkrácení délky dosvitu a tím lze také vysvětlit rozdíly v hodnotách plochy pod píkem u jednotlivých měření. Roztok dithiothreitolu ovlivnil CL signál tak, že jen mírně zkracoval délku dosvitu. U roztoků s Quantum Dots částicemi bylo pozorováno, že čím méně je roztok QD částic naředěn, tím více klesá hodnota plochy pod píkem a tím více je zkracována délka dosvitu CL signálu. QD částice by se mohly uplatnit v průtokovém systému v souvislosti s dobrou opakovatelností výsledků měření. Vliv na výšku CL signálu bude v případě systému s luminolem nutno dále testovat z pohledu QD částic s nižšími emisními maximy, které budou lépe odpovídat emisi záření v uvedeném systému, která je nejintenzivnější při 425 nm.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Martina Kořínková

Supervisor: PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Study of quinone and Quantum Dots particles effects on chemiluminescence reaction

A purpose of this Diploma Thesis was to observe and interpret the influence of 9,10-phenanthrenequinone, dithiothreitol and Quantum Dots (QDs) on chemiluminescent (CL) system, which contained hydrogen peroxide, luminol and potassium ferricyanide. All analyses were performed by the flow method of sequential injection analysis (SIA). The chemiluminescent emission of luminol was based on its oxidation by hydrogen peroxide during the catalysis by $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6$. There is also different CL system, which has been developed by Japanese scientists, consisting quinone, luminol and dithiothreitol. The interest of this thesis was reproducing the results, which were reached by authors of the Japanese study, however with the use of SIA method the results of measurements were not comparable. The 9,10-phenanthrenequinone influenced the CL signal in the sense of shortening the emission length and thereby it is possible to evaluate the difference between the sizes of peak area in single measurements. The solution of dithiothreitol influenced the CL signal in terms of emission length slight shortening. QDs solutions effect was observed with following results: the less diluted QDs solution caused the largest decrease of the peak area and the more shortened emission length of the CL signal. The QDs could be applied in the flow system with good repeatability of the measured results. In case of the CL system with luminol the influence on peak height should be tested with respect to QDs with lower emission maxima, which will correspond to the emission at 425 nm.

SEZNAM ZKRATEK

AQ – antrachinon

ATP – adenosintrifosfát

CFU – kolonie tvořící jednotky (*Colony Forming Unit*)

CL – chemiluminiscenční

DEP – částice ve výfukových plynech naftových motorů (*Diesel Exhaust Particles*)

DLS – dynamický rozptyl světla (*Dynamic Light Scattering*)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DTT – dithiothreitol

ECD – detektor elektronového záchytu (*Electron Capture Detector*)

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

ESR – elektronová spinová rezonance (*Electron Spin Resonance*)

FCH – fenantrenchinon

FIA – průtoková injekční analýza (*Flow Injection Analysis*)

FL – fluorescenční

GC-MS – spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (*Gas Chromatography with Mass Spectrometry*)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*High Performance Liquid Chromatography*)

IgG – imunoglobulin G

IUPAC – Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LED – dioda emitující světlo (*Light-Emitting Diode*)

MK – menachinon

NQ – naftochinon

ODS – oktadecyl-silikagel

PC – počítač (*Personal Computer*)

PM_{2,5} – částice s aerodynamickým průměrem 2,5 μm (*Particulate Matter*)

PO-CL – peroxyoxalátová chemiluminiscenční detekce

PQ – plastochinon

PQQ – pyrrolchinolinchinon

PTFE – polytetrafluorethylen = teflon

QD – kvantové tečky (*Quantum Dots*)

ROS – reaktivní formy kyslíku (*Reactive Oxygen Species*)

RSD – relativní směrodatná odchylka (*Relative Standard Deviation*)

SEM – skenovací elektronový mikroskop (*Scanning Electron Microscope*)

SIA – sekvenční injekční analýza (*Sequential Injection Analysis*)

SRM 1649a – standardní referenční materiál (*Standard Reference Material*)

TEM – transmisní elektronový mikroskop (*Transmission Electron Microscope*)

UV – ultrafialový

OBSAH

Abstrakt	1
Abstract	2
Seznam zkratk	3
1. ÚVOD	7
Cíl a popis zadání práce	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1. Chemiluminiscence.....	11
2.1.1. Mechanismus a vznik chemiluminiscence	11
2.1.2. Chemiluminiscenční stanovení chinonů.....	13
2.1.2.1. Stanovení ubichinonu metodou CL ve farmaceutických přípravcích	16
2.1.2.2. Stanovení ubichinonu metodou CL v humánní plazmě	16
2.1.2.3. Stanovení fylochinonu, menachinonu-4 a menachinonu-7 metodou CL v humánní plazmě.....	17
2.1.3. Stanovení látek CL reakcí s využitím chinonů.....	17
2.1.3.1. Stanovení ATP metodou CL ve farmaceutických přípravcích, mléce a půdě.....	18
2.1.3.2. Stanovení DNA metodou CL v živočišných tkáních a rostlinném materiálu.....	18
2.1.3.3. Detekce životaschopných mikroorganismů metodou CL v bakteriálních kulturách.....	19
2.1.4. Stanovení chinonů jinou instrumentální metodou.....	19
2.1.4.1. Stanovení chinonů metodou GC-MS v ovzduší	20
2.2. Struktura a rozdělení nanočástic	21
2.2.1. Quantum Dots částice	21
2.2.2. Využití Quantum Dots částic	23
2.3. Sekvenční injekční analýza	23
2.3.1. Princip a základ SIA.....	23
2.3.2. Aplikace SIA ve farmacii a ostatních oborech.....	24
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1. Laboratorní přístroje.....	27
3.2. Použité chemikálie	27
3.3. Příprava roztoků.....	28
3.4. Systém sestavy SIA.....	30
3.4.1. Průtokový systém	30

3.4.2. Detekce a vyhodnocení signálu.....	31
3.4.3. Struktura měřicího cyklu.....	32
3.5. Studium chemiluminiscence chinonů	34
3.5.1. Popis základního systému s luminolem	34
3.5.2. Testování změny reakčních podmínek.....	35
3.6. Optimalizace parametrů chemiluminiscenční detekce metodou SIA (Sequential Injection Analysis)	36
3.6.1. Vliv koncentrace fenantrenchinonu na plochu a výšku signálu, na délku dosvitu a na opakovatelnost měření	36
3.6.2. Vliv koncentrace dithiothreitolu na plochu a výšku signálu, na délku dosvitu a opakovatelnost měření.....	36
3.7. Studium vlivu Quantum Dots částic	36
3.7.1. Vliv koncentrace Quantum Dots částic na plochu a výšku signálu, na délku dosvitu a opakovatelnost měření	37
4. VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUSE.....	38
4.1. Vliv koncentrace fenantrenchinonu na plochu a výšku signálu, na délku dosvitu a na opakovatelnost měření.....	39
4.2. Vliv koncentrace dithiothreitolu na plochu a výšku signálu, na délku dosvitu a opakovatelnost měření.....	43
4.3. Vliv koncentrace Quantum Dots částic na plochu a výšku signálu, na délku dosvitu a opakovatelnost měření.....	49
4.3.1. Quantum Dots částice s emisním maximem při 520 nm.....	49
4.3.2. Quantum Dots částice s emisním maximem při 575 nm.....	52
4.3.3. Quantum Dots částice s emisním maximem při 603 nm.....	56
4.3.4. Quantum Dots částice s emisním maximem při 636 nm.....	59
Souhrn.....	64
5. ZÁVĚR.....	65
6. SEZNAM LITERATURY	67

1. ÚVOD

Chemiluminiscence se liší od ostatních luminiscenčních jevů tím, že excitace fotonů je vyvolána chemickou reakcí [1]. Analytický systém založený na chemiluminiscenční (CL) luminolové reakci je vhodný pro stanovení mnoha sloučenin. Metoda je velmi citlivá (citlivější než například izotopové metody) a jednoduchá na provedení, proto našla své uplatnění v řadě laboratorních aplikací.

V této práci byl použit CL systém, který obsahoval peroxid vodíku (oxidační činidlo), luminol a hexakynoželezitan draselný, který zde vystupoval jako katalyzátor reakce. Pomocí průtokové metody SIA (sekvenční injekční analýza) byl studován vliv fenantrenchinonu, dithiothreitolu a Quantum Dots částic na uvedený CL systém. Metoda SIA je založená na kombinaci dávkování přesného objemu roztoku vzorku (studované látky) a reakčního činidla do toku nosného proudu. Kontrolovaná disperze a přesné dodržování konstantních experimentálních podmínek pak zaručují vysokou reprodukovatelnost výsledků.

Chinony jsou látky, které pomáhají udržovat základní biologické funkce v těle člověka, živočichů a rostlin, jsou také používány v průmyslových odvětvích, nacházejí se v herbicidech, bělicích látkách a kosmetice, ze zplodin výfukových motorů se dostávají do ovzduší. Struktury chinonů se také vyskytují v některých farmaceutických přípravcích a potravních doplňcích [13]. Nastává tak potřeba monitorování těchto látek v biologickém materiálu, v terapeutických preparátech a v životním prostředí, a tímto se také zabývají autoři odborných analytických studií.

Quantum Dots částice (kvantové tečky) jsou anorganické nanokrystaly z polovodičového materiálu, u kterých byly nalezeny významné optoelektronické vlastnosti, které se dají využít v biologických vědách a v řadě průmyslových technologií. V posledních letech se ve světě staly středem zájmu různých chemicko-technologických ústavů či univerzit a probíhá intenzivní studium jejich unikátních vlastností.

CÍL A POPIS ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem bylo zreprodukovat data obsažená v odborném japonském článku z roku 2008, která se týkala chemiluminiscenčního stanovení chinonů a optimalizovat koncentrace roztoků používaných činidel a studovaných látek. V teoretické části bylo úkolem obecně představit vlastnosti chinonů a Quantum Dots částic, a také charakterizovat chemiluminiscenční děj. V odborné literatuře bylo účelem vyhledat chemiluminiscenční reakce, kterými lze chinony stanovit nebo reakce založené na chemiluminiscenci, kterými se stanovují jiné látky, za pomoci chinonů. Úkolem bylo také představit průtokovou analytickou metodu SIA (sekvenční injekční analýza), popsat její základní komponenty, princip na jakém metoda pracuje a její uplatnění v praxi.

Zadáním diplomové práce bylo studovat vliv fenantrenchinonu, dithiothreitolu a Quantum Dots částic na chemiluminiscenční systém s peroxidem vodíku, luminolem a hexakynoželezitanem draselným pomocí systému SIA, který byl sestaven na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Chemiluminescence

Luminiscenční analýza je založena na měření luminiscenčního záření, které zkoumaný vzorek emituje. Luminiscencí rozumíme vlastní záření látky ve viditelné oblasti spektra nebo blízko ní, které zpravidla vzniká po nebo při ozáření této látky. Luminiscenční záření není tepelným zářením, má jinou vlnovou délku než záření primární a trvá i po přerušení primárního záření. Excitaci může vyvolat energie světelná (fotoluminiscence – fluorescence a fosforescence), tepelná (termoluminiscence), mechanická (mechanoluminiscence), biochemická (bioluminiscence) nebo může být excitace způsobena elektrickým polem (elektroluminiscence). Zdrojem excitace u chemiluminescence je energie pocházející z chemické reakce [2, 3]. Kvantový výtěžek luminiscence odpovídá podílu počtu vyzářených fotonů a excitovaných molekul (u přírodních systémů může dosahovat až 90%) [4].

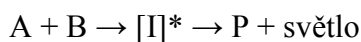
Chemiluminescence (CL) je definována jako proces, při kterém je produkováno elektromagnetické záření v UV, viditelné nebo blízké infračervené oblasti. Produkce elektromagnetického záření je následkem chemické reakce, při které se jeden z reakčních produktů dostane do excitovaného stavu (energeticky bohatší stav) a při přechodu na základní energetickou hladinu se přebytečná energie tohoto méně stabilního intermediátu uvolní ve formě fotonů. Za normálních okolností se uvolněná energie z exotermické reakce uvolňuje ve formě tepla, chemiluminescence tedy není běžným jevem [5].

Mezi faktory, které ovlivňují chemiluminescenci, patří chemická struktura CL prekurzoru, povaha a koncentrace ostatních substrátů podílejících se na CL reakci, výběr katalyzátoru, hydrofobicita rozpouštědla a složek roztoku, přítomnost kovových iontů, pH a iontová síla, a také teplota [6].

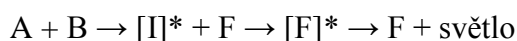
2.1.1. Mechanismus a vznik chemiluminescence

Chemiluminescence je emise elektromagnetického záření, které vzniká exotermickou chemickou reakcí, která může být provedena v pevném, kapalném nebo plynném systému. Podstata chemiluminescence byla v posledních letech obsáhle vysvětlena v řadě odborných studií. Existují dva hlavní druhy – přímá a nepřímá chemiluminescence. Při přímé chemiluminescenci spolu reagují dva reaktanty (A a B), obvykle to bývá substrát (chemiluminiscenční prekurzor) a oxidant. Vzniká při tom

meziprodukt (I) v excitovaném stavu, který se po přechodu do základního stavu změní v produkt (P) a emitují se fotony. Reakce s luminolem je příkladem pro tuto formu chemiluminiscence [7].



V případě nepřímé chemiluminiscence je energie excitované molekuly intermediátu přenesena na vhodný fluoreskující akceptor (F) a ten pak z excitovaného stavu přechází do základního energetického stavu a dochází k emisi fotonů [6]. Tato CL reakce je účinnější a jedná se například o peroxyoxalátovou reakci.

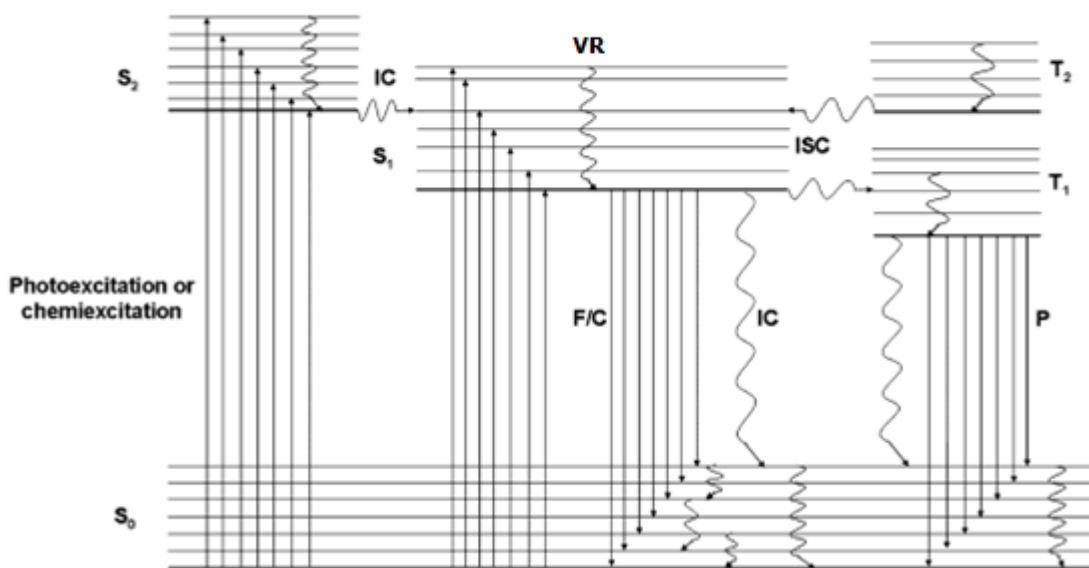


Jakmile je molekula konvertována do stavu excitovaného meziproduktu má několik možností, jak se vrátit do základního energetického stavu [7]. Teorie zářivých a nezářivých přechodů v molekule je vysvětlena pomocí Jablonského diagramu na obrázku č. 1.

Po absorpci fotonu excitovaná molekula velmi rychle předává získanou energii svému okolí a tzv. nezářivými přechody (vnitřní konverze a mezisystémový přechod) následovanými vibrační relaxací se dostává postupně do nižších excitovaných stavů. Pomalejší bývá většinou až nezářivý přechod ze základní vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S_1 do základního stavu S_0 . Teprve mezi těmito hladinami se vedle nezářivých přechodů může uplatnit přechod spojený s vyzářením (emisi) fotonu - fluorescence. Doba dosvitu fluorescence po přerušení excitace bývá řádově 10^{-6} až 10^{-9} s. Většinou až z hladiny S_1 se případně uplatní i nezářivý mezisystémový přechod do některého z tripletních stavů. Zářivý přechod ze základní vibrační hladiny nejnižšího tripletního stavu T_1 do základního stavu S_0 má dlouhou dobu dosvitu řádu 10^{-3} až 10^1 s a je označován jako fosforescence [8].

Aby byla emise z chemické reakce pozorovatelná, musí být splněny tři základní požadavky:

- 1) Chemiluminiscenční prekurzor by měl být schopen přijmout energii uvolněnou z reakce a přejít do excitovaného stavu – účinnost procesu by měla být dostatečně velká.
- 2) Reakce musí být exotermická – s výměnou volné energie v rozmezí 170–300 kJ/ mol.
- 3) Deaktivací procesy chemiluminiscenčního záření jako molekulární disociace, spontánní izomerizace, fyzikální zhášení, a také kompetitivní nezářivé přechody (intra- a intermolekulární přenos energie) by měli být udržovány na minimu [7].



Obr. č. 1: Schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy v molekule (Jablonského diagram): C – chemiluminiscence, F – fluorescence, P – fosforescence, VR – vibrační relaxace, IC – vnitřní konverze, ISC – mezisystémový přechod, S_0 – základní singletový stav, S_1, S_2 – excitované singletové stavy, T_1, T_2 – excitované tripletové stavy, \rightarrow zářivé (radiační) přechody (s účastí fotonu), \rightsquigarrow nezářivé (non-radiační) přechody (bez účasti fotonu), [7].

2.1.2. Chemiluminiscenční stanovení chinonů

Chinony jsou látky, které pomáhají udržovat základní biologické funkce v těle člověka, živočichů a rostlin. Patří mezi ně ubichinon (koenzym Q_{10}), který vykonává funkci nosiče elektronů v mitochondriích v elektronovém transportním řetězci, účastní se produkce energie v buňce a působí jako antioxidant. Koenzym Q_{10} je biologicky aktivní lipofilní látka, v těle vzniká z kyseliny mevalonové. Ubichinon je tvořen hlavně v játrech a dodáván buňkám, které ho potřebují. Relativně vysoká koncentrace ubichinonu je i v jiných tkáních, například v myokardu, ledvinách, pankreatu. Má antioxidační účinky, chrání cirkulující lipoproteiny proti oxidačnímu poškození. Jeho stanovení v lidské plazmě může být užitečné pro zjištění biologické dostupnosti ubichinonu a pro časnou diagnózu některých onemocnění. Plazmatická hladina koenzymu Q_{10} je významně nižší u pacientů s hypertyreoidismem, melanomem, cystickou fibrózou, fenylyketonurií a mevalonickou acidurií, než u zdravých lidí. Ubichinon je také předepisovaný pacientům s chorobami srdce (např. při kongestivním srdečním selhání). Pro rutinní kontrolu kvality ubichinonových přípravků je potřeba rychlé a spolehlivé analytické metody [9, 10, 13].

Dále sem patří naftochinonový derivát fylochinon (vitamin K₁), který je v organismu důležitý pro koagulaci krve a podílí se na procesu kostní mineralizace. Vitamin K se podílí na karboxylaci zbytků kyseliny glutamové u některých hemokoagulačních faktorů (F II, VII, IX, X). Je potřebný pro kostní kalcifikaci, neboť zmíněná karboxylace kyseliny glutamové je součástí vazby vápníku v kostech. V organismu se také podílí na oxidativní fosforylaci. Fylochinon (K₁) a menachinon (K₂) patří mezi přirozené vitaminy rozpustné v tucích. Fylochinon (vitamin K₁) je syntetizován rostlinami a přijímán potravou, jeho vstřebávání v tenkém střevě je závislé na resorpci tuků. Menachinon (vitamin K₂, MK-n) je tvořen různými druhy bakterií (*E. coli*) a aktinomycetami v tenkém a tlustém střevě. Fylochinon a menachinon jsou stabilní vůči teplu a redukčním agens, avšak jsou velmi citlivé na UV záření, oxidaci a jsou také rozkládány varem. Rozdíl mezi vitamínem K₁ a K₂ je hlavně v délce postranního řetězce, který určuje jeho dostupnost v biologických systémech a poločas aktivity. Stejně účinky mají i synteticky vyrobené vitaminy, které jsou rozpustné ve vodě, příkladem je menadion (vitamin K₃) obsažený v přípravku Kanavit [11, 12].

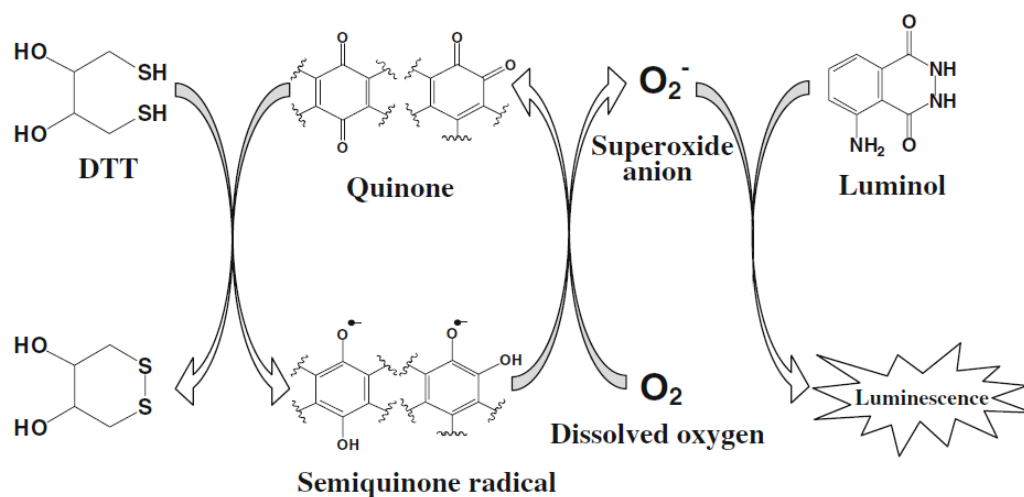
Další biologicky významnou látkou je pyrrolchinolinchinon (PQQ), redoxní kofaktor dehydrogenáz u bakterií. PQQ je v nanogramovém množství přítomen v savcích tkáních, mléce a rostlinách – jeho funkce zatím není dostatečně prostudována. Zřejmě má vliv na růst organismu a má též antioxidační účinky [13, 14, 15]. Velmi dobře je známá esenciální podstata plastochinonu (PQ), který je součástí thylakoidů a účastní se přenosu elektronů a protonů při fotosyntéze [16].

Také některé farmaceutické přípravky mají chinonovou strukturu, patří sem například antracyklinové deriváty doxorubicin a daunorubicin, které jsou využívány pro léčbu nádorových onemocnění [13].

Chinony jsou také používány v průmyslových odvětvích, nacházejí se v herbicidech, bělicích látkách a kosmetice. Kromě toho se chinony nacházejí v životním prostředí a v mnoha studiích bylo prokázáno, že mají škodlivé účinky na zdraví člověka. Chinony působí jako možné inhibitory některých biologických funkcí, ovlivňují takto aktivitu signální kaskády oxidu dusnatého (NO-syntázu) a sekreci progesteronu. Chinony jsou v biologických systémech schopné produkovat ROS, čímž v organismu způsobují oxidační stres – superoxidový aniont a hydroxylový radikál přispívají k poškození plic. Chinony jsou také obsaženy ve výfukových plynech naftových motorů (DEP – diesel exhaust particles), patří mezi ně například 9,10-fenantrenchinon, 1,2-naftochinon, 1,4-naftochinon a 9,10-antrachinon. Expozice DEP

může být příčinou zesílení odpovědi vůči alergenům a stává se tak rizikovým faktorem pro vznik astmatu [13, 17, 18].

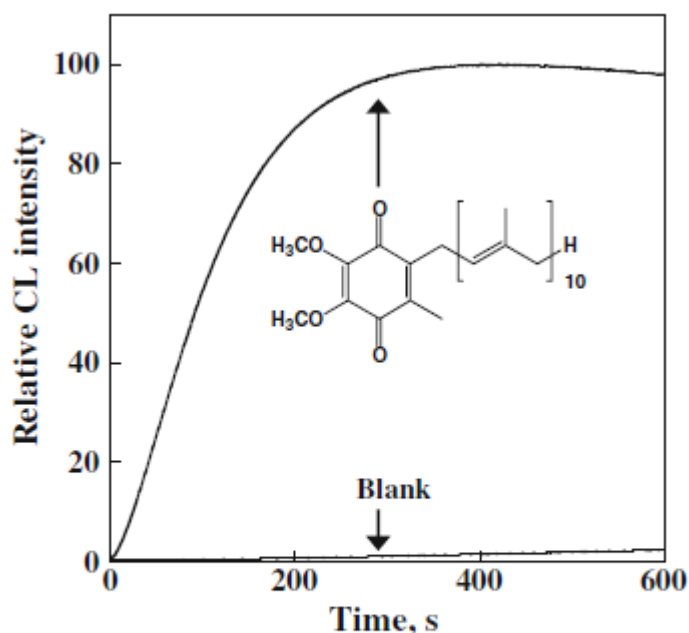
V odborné literatuře byla nalezena senzitivní a selektivní metoda pro stanovení chinonů. Metoda byla založena na vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) během redoxní reakce mezi chinonem a dithiothreitem jako redukčním činidlem [13]. Chinon je redukován redukčním činidlem DTT na semichinonový radikál, ten je za aerobních podmínek oxidován zpátky na chinon, rozpuštěný kyslík je přeměněn na superoxidový anion, se kterým reaguje luminol a dochází k silné luminiscenci. Chemiluminiscence byla intenzivní, dlouhotrvající a byla přímo úměrná koncentraci chinonu. Struktura chinonů se dala velmi dobře odlišit podle svých chemiluminiscenčních vlastností. Chemiluminiscence byla pozorována u 9,10-fenantrenchinonu, 1,2-naftochinonu, 1,4-naftochinonu a také u biologicky významných chinonů (ubichinon), avšak u 9,10-antrachinonu a 1,4-benzochinonu nikoliv [13].



Obr. č. 2: Schéma CL mechanismu chinonů, [13].

2.1.2.1. Stanovení ubichinonu metodou CL ve farmaceutických přípravcích

Byla vyvinuta jednoduchá a rychlá detekční metoda pro ubichinon v léčivých přípravcích [13], kterou byly analyzovány tablety farmaceutického přípravku japonské společnosti Eisai Pharmaceuticals chemiluminiscenční reakcí pomocí HPLC-CL. Jako luminofor byl použit luminol, roztok luminolu byl připraven rozpuštěním v roztoku



Obr. č. 3: Zobrazení profilu CL záření pro ubichinon – maximum CL intenzity bylo dosaženo po 300 s, koncentrace roztoku DTT, luminolu a NaOH byly 20 mM, 400 μ M a 160 mM, [13].

NaOH. Dále byl pro reakci použit roztok ubichinonu (obsažený v měřených vzorcích), který byl připraven rozpuštěním v ethanolu, rozpouštědlem pro DTT byl acetonitril. Dále byla vytvořena kalibrační křivka pro standardní roztok ubichinonu. Lineární vztah mezi koncentrací a CL intenzitou se nacházel v koncentračním rozsahu 0,3 – 0,6 μ M. Korelační koeficient byl roven hodnotě 0,997. Detekční limit pro ubichinon byl 0,05 μ M (9 ng/assay) s časem analýzy 30 s [13].

2.1.2.2. Stanovení ubichinonu metodou CL v humánní plazmě

Byla vyvinuta metoda HPLC s chemiluminiscenční detekcí (HPLC-CL) pro stanovení ubichinonu v plazmě [19]. Metoda je založena na reakci s luminolem a chemiluminiscenční detekci superoxidového aniontu, který vzniká během redoxní cyklické reakce mezi ubichinonem a DTT. Kalibrační křivka pro standardní roztok ubichinonu vykazovala linearitu v koncentračním rozsahu od 0,09 do 43,2 μ g/ml (0,45 – 216 ng on column) s korelačním koeficientem 0,999. Detekční limit (S/N=3) byl 26 ng/ml (130 pg on column). Detekce ubichinonu na chromatogramu proběhla zřetelně bez jakýchkoliv interferencí [19].

2.1.2.3. Stanovení fylochinonu, menachinonu-4 a menachinonu-7 metodou CL v humánní plazmě

Byla vyvinuta citlivá a selektivní metoda HPLC pro stanovení fylochinonu, menachinonu-4 a menachinonu-7 (formy vitamínu K₂) v humánní plazmě s využitím post-column peroxyoxalátové chemiluminiscenční detekce (PO-CL) s následným on-line UV ozářením [20]. Separace vitamínu K metodou HPLC byla provedena isokraticky na ODS koloně během 35 minut. Jako vnitřní standard byl použit 2-metyl-3-pentadecyl-1,4-naftochinon. Detekční limit byl 32, 38 a 85 fmol pro K₁, MK-4, MK-7. Senzitivita a citlivost metody je dostačující pro aplikaci v klinických a nutričních odvětvích [20].

2.1.3. Stanovení látek CL reakcí s využitím chinonů

V odborné literatuře byla nalezena metoda pro stanovení ATP s využitím fotochemické a chemiluminiscenční reakce v systému průtokové injekční analýzy (FIA). Adenosin-5'-trifosfát (ATP) je hlavním nosičem chemické energie všech živých organismů. ATP je využíván během svalové kontrakce, je také široce rozšířeným indikátorem žijících buněk. Obsah ATP je často využíván pro stanovení mikrobiální aktivity v půdě, v čerstvých rybách a také pro kontrolu kvality transfúzního přípravku před jeho podáním pacientovi [21].

Stejnými autory byla objevena metoda pro stanovení DNA, která opět využívá fotochemické a chemiluminiscenční reakce v průtokovém systému (FIA). Kvantifikace deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je důležitá pro mnoho biologických studií. Metoda byla také porovnána s frekventovaně používanými manuálními metodami pro stanovení DNA. Se svým limitem detekce se tato metoda může rovnat postupům, které využívají fluorescenční barvivo ethidiumbromid, Hoechst 33258 nebo metylénovou modř. Metoda byla použita pro stanovení DNA ve vzorcích z živočišné tkáně nebo rostlinných extraktů [22].

V zahraniční literatuře byla nalezena metoda, která využívá chemiluminiscenční reakci pro rychlé stanovení živých mikroorganismů bez lýzy buněk. Živé mikroorganismy mohou redukovat chinon za vzniku chinolu nebo semichinonových radikálů, které dávají vznik reaktivním formám kyslíku. Množství produkce ROS bylo stanoveno luminolovou CL reakcí a intenzita luminiscence byla přímo úměrná počtu

živých buněk. Citlivost chemiluminiscenční analýzy byla zvýšena použitím katalyzátorů (ionty kovů) nebo vhodných chinonů (menadion, koenzym Q₁). Tato analýza spočívala v 4 h kultivaci a centrifugaci (2 x 5 min), dalším krokem byla 10 min inkubace mikroorganismů s chinonem, dále následovalo přidání luminolu do směsi a v tento okamžik začalo počítání fotonů (photon counting), které trvalo 2 s. Densita živých bakterií a kvasinek byla stanovena přibližně na několik tisíc CFU/ ml. Analýza má velmi jednoduché provedení a mohla by být efektivně využívána pro stanovení životaschopných bakterií a kvasinek [23].

2.1.3.1. Stanovení ATP metodou CL ve farmaceutických přípravcích, mléce a půdě

Metoda je založena na reakci glukózy s ATP katalyzovanou enzymem hexokinázou a Mg²⁺ ionty. Glukóza, která není spotřebována ATP, je následně fotooxidována pomocí 9,10-antrachinon-2,6-disulfonátu jako senzibilizátoru. Peroxid vodíku produkovaný fotochemickou reakcí je monitorován chemiluminiscenční reakcí s luminolem, která je katalyzovaná hematinem. Je tu přímý vztah mezi poklesem chemiluminiscenční odpovědi a koncentrací ATP v roztoku s konstantní koncentrací glukózy [21]. V souladu s optimálními podmínkami, kalibrační křivka je lineární v rozsahu 0,20 – 50,50 mg/ l s rychlostí analýzy 25 vzorků za hodinu a RSD od 0,62 – 1,42 %. Limit detekce byl 0,07 mg/ l. Tato citlivá, jednoduchá a rychlá metoda byla použita pro stanovení ATP ve farmaceutickém přípravku Atepodin (Medix), dále v kravském a kozím mléce a pro důkaz mikrobiální aktivity v půdě [21].

2.1.3.2. Stanovení DNA metodou CL v živočišných tkáních a rostlinném materiálu

Metoda je založena na interakci mezi 9,10-antrachinon-2,6-disulfonátem (AQ) a DNA, následuje fotooxidace ethanolu senzibilizovaná AQ molekulami, které jsou interkalovány do DNA řetězce. Peroxid vodíku produkovaný fotochemickou reakcí může být monitorován CL reakcí s luminolem, která je katalyzována hematinem. Proces je velmi jednoduchý, rychlý a není finančně nákladný a byl uspokojivě využit pro stanovení DNA v živočišných tkáních [22]. Je zde lineární vztah mezi poklesem chemiluminiscence a DNA koncentrací při konstantní koncentraci antrachinonu. Za optimálních podmínek je koncentrační lineární rozsah 0,04 – 5,50 mg/ ml s rychlostí

analýzy 45 vzorků za hodinu. Hodnota RSD je 0,17 – 1,30 %. Detekční limit vypočítaný podle doporučení IUPAC je 17 ng/ ml. Metoda byla použita pro stanovení DNA, která byla extrahována z králičí tkáně, listů pomerančovníku a australského stromu nazývaného „flame tree“ [22].

2.1.3.3. Detekce životaschopných mikroorganismů metodou CL v bakteriálních kulturách

Vysoké citlivosti této metody bylo dosaženo pomocí Mo-EDTA (komplex molybdenu s ethylendiamintetraacetátem), menadionu nebo koenzymu Q₁. Naředěná bakteriální kultura (nebo kultura s kvasinkami) byla smíchána s roztokem chinonu, který obsahoval kovové soli (např. FeSO₄), EDTA, NaCl (pH 7,0), směs byla inkubována 10 min při 37 °C. Potom byl přidán roztok luminolu s kyselinou boritou (pH 9,5), chemiluminiscenční intenzita byla stanovena luminometrem za 2 s. Tato modifikovaná chemiluminiscenční analýza byla použita pro detekci několika referenčních kmenů bakterií a kvasinek. Detekční limit bakteriální analýzy byl v rozsahu od 2700 CFU/ ml pro *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) do 25 400 CFU/ ml pro *Enterobacter cloacae* (IFO13536). Detekční limit při analýze kvasinek se pohyboval v rozsahu od 300 CFU/ ml pro *Candida maltosa* (CHA1) do 9000 CFU/ ml pro *Yarrowia lipolytica* (CXAU1) [23].

2.1.4. Stanovení chinonů jinou instrumentální metodou

Zahraničními autory bylo popsáno několik technik pro stanovení chinonů zahrnující spektrofluorimetrii, elektronovou spinovou rezonanci (ESR), průtokovou injekční analýzu (FIA) s UV detekcí, hmotnostní spektrometrii tandemově spojenou s plynovou chromatografií (GC-MS), HPLC s ultrafialovou (UV), fluorescenční (FL), chemiluminiscenční (CL) a elektrochemickou (ECD) detekcí. Každá z těchto technik má z hlediska citlivosti, rychlosti a jednoduchosti metody svoje výhody a nevýhody [13].

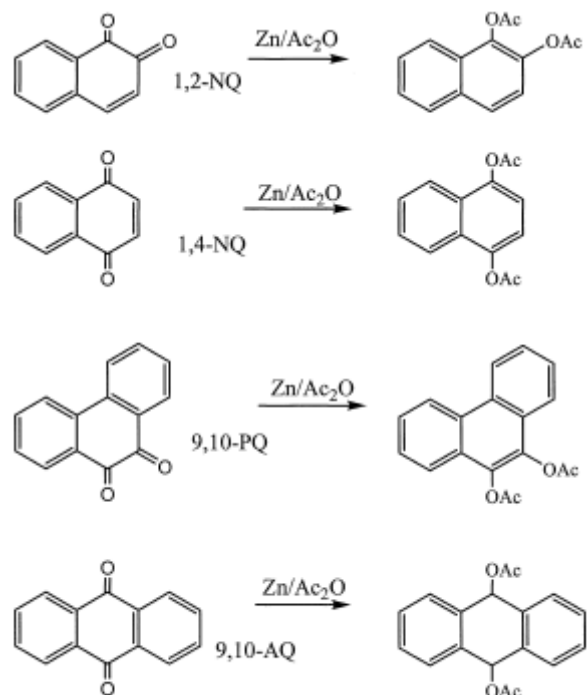
UV detekce je méně citlivá a selektivní než fluorescenční detekce, avšak chinony nevykazují žádnou fluorescenci, proto je u HPLC-FL metody požadována konverze chinonu na fluorescenční sloučeninu (pre-column derivatizační reakce). HPLC-CL metoda je také velmi citlivá a selektivní metoda, vyžaduje však fotoreaktor

pro fotochemickou reakci. HPLC-ECD je dostatečně citlivá metoda pro stanovení chinonů, ale postrádá jednoduchost a rychlost. Nevýhodou GC-MS metody je komplikovaná derivatizace chinonu na těkavou sloučeninu. ESR metoda vyžaduje speciální a finančně nákladný přístroj [13].

V odborné literatuře byla nalezena metoda, která byla použita k analýze vzorků ovzduší na několika místech v Jižní Kalifornii, ve standardním referenčním materiálu (SRM 1649a) a ve vzorcích ovzduší (PM_{2,5}), získaných na venkově a v městských částech Los Angeles [24]. Chinony jsou toxikologicky významné komponenty, které znečišťují vnější ovzduší. Byly nalezeny v částicích výfukových plynů a v kouři ze dřeva. Chinony a jejich redukční produkty, semichinony a hydrochinony, jsou toxikologicky významné pro jejich schopnost produkovat reaktivní formy kyslíku a tvořit kovalentní vazby s tkáňovými makromolekulami [24].

2.1.4.1. Stanovení chinonů metodou GC-MS v ovzduší

Byla představena metoda pro kvantifikaci 1,2-naftochinonu (1,2-NQ), 1,4-naftochinonu (1,4-NQ), 9,10-antrachinonu (9,10-AQ) a 9,10-fenantrenchinonu (9,10-PQ), které jsou přítomny ve výfukových plynech naftových motorů (DEP). Byla vyvinuta metoda GC-MS, založená na deuteriem značených vnitřních standardech a selektivně monitorovaných iontech. Po extrakci dichlormetanem byly cílové molekuly přeměněny na stabilní diacetylderiváty, a po smísení se zinkem a anhydridem kyseliny octové byly následně analyzovány technikou elektronové ionizace. Koncentrační lineární rozsah byl 7,9 – 40,4 µg/ g v DEP a 5 – 730 pg/m³ v PM_{2,5} vzorcích [24].



Obr. č. 4: Chinony a jejich derivatizace, [24].

2.2. Struktura a rozdělení nanočástic

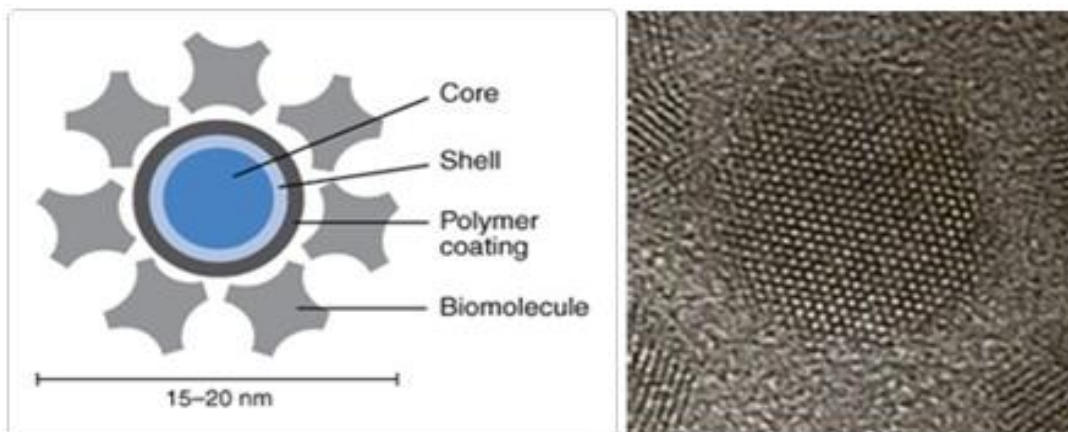
Nanočástice jsou struktury, které mají alespoň jeden rozměr v řádu jednotek až stovek nanometru. Lze je dělit podle chemického složení na kovové, polovodičové – kvantové tečky (Quantum Dots) a nekovové (uhlíkové nanotrubičky, nanopěny) [25].

V oblasti nanomateriálů se využívají nanočástice oxidů kovů (ZrO_2 , TiO_2 , SiO_2) především částice ve formě nanoprášků. Jedná se např. o nanoprášky ZrO_2 , TiO_2 , používané v kosmetických krémech, pleťových vodách a opalovacích krémech. Přítomnost nanočástic SiO_2 zabraňuje srážení vody na skle, speciální vlastnost takto upraveného skla se dá využít například pro skla automobilů [26].

Nanočástice ze skupiny ušlechtilých kovů (Cu, Ag, Au, Pt, Pd) a skupiny železa (Fe, Co, Ni) mají řadu potenciálních aplikací. V případě stříbra byla vyvinuta spolehlivá metoda přípravy nanočástic o velikosti 25 nm, testovaných jako účinné antibakteriální činidlo. U nanočástic železa byla dokonce vyvinuta metoda jejich poloprovozní výroby a povrchových stabilizací, a v současné době jsou tyto nanočástice testovány jako účinný prostředek dekontaminace podzemních vod, znečištěných halogenovanými uhlovodíky. Protilátky značené zlatými nanočásticemi mohou nalézt uplatnění v medicíně při léčbě nádoru ve fotodynamické terapii [25].

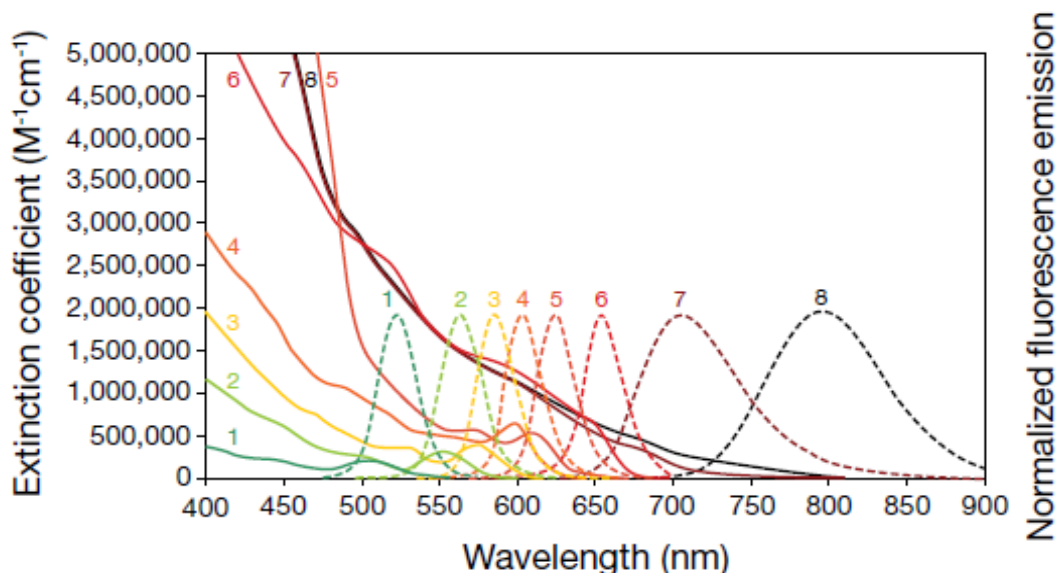
2.2.1. Quantum Dots částice

Kvantové tečky jsou velmi malé polovodiče, schopné v důsledku nižší energie ve srovnání s energií vodivostního pásu okolního polovodiče vázat elektrony. Mohou nabývat pouze diskretních hodnot energie, podobně jako je tomu u atomu. Každá tečka má omezenou kapacitu, určenou jejími rozměry. Elektrony uvnitř teček vykazují kvantové vlastnosti. Závislost změny vlnové délky emitovaného světla na velikosti nanočástic (nanokrystalů) lze dokázat tak, že vybudíme částice rozptýlené v roztoku ultrafialovým světlem, a čím je rozměr nanokrystalů menší, tím více se fluorescence posouvá do modré části spektra [25, 27]. QD částice jsou tvořeny polovodičovým jádrem vznikajícím kombinací prvků II. a VI. nebo III. a V. skupiny (například CdSe, CdTe), které může být stabilizováno obalem z anorganických solí (CdS a ZnS). Rozpustnost ve vodě je zajištěna nabitými organickými molekulami, které jsou kovalentně vázány na povrch kvantové tečky pomocí thiolových skupin. Tyto molekuly mohou sloužit pro navázání dalších funkčních ligandů nebo biomolekul.



Obr. č. 5: Struktura QD nanočástice a nanokrystal CdSe zobrazený transmisním elektronovým mikroskopem (core – jádro, shell – obal, polymer coating – polymerní vrstva, biomolecule – biomelukula), [26, 28].

Kvantové tečky se využívají ve speciálních součástkách, které jsou schopny pracovat s jednotlivými elektrony či fotony a nacházejí uplatnění jako luminiscenční značky v analytické chemii, molekulární biologii a medicíně díky svým výborným optickým vlastnostem [25, 27]. QD nanokrystaly se vyznačují úzkými a symetrickými emisními spektry a širokými absorpčními (excitačními) spektry. Jejich výhodou je zejména jejich fotostabilita, relativně vysoký kvantový výtěžek a celkově dobrá chemická stabilita [27, 28].



Obr. č. 6: Emisní spektrum Quantum Dots částic různých velikostí (plná čára – excitace, přerušovaná čára – emise), 1-8 – velikost částic, osa x (wavelength – vlnová délka), osa y (extinction coefficient – molární absorpční koeficient, [28]).

2.2.2. Využití Quantum Dots částic

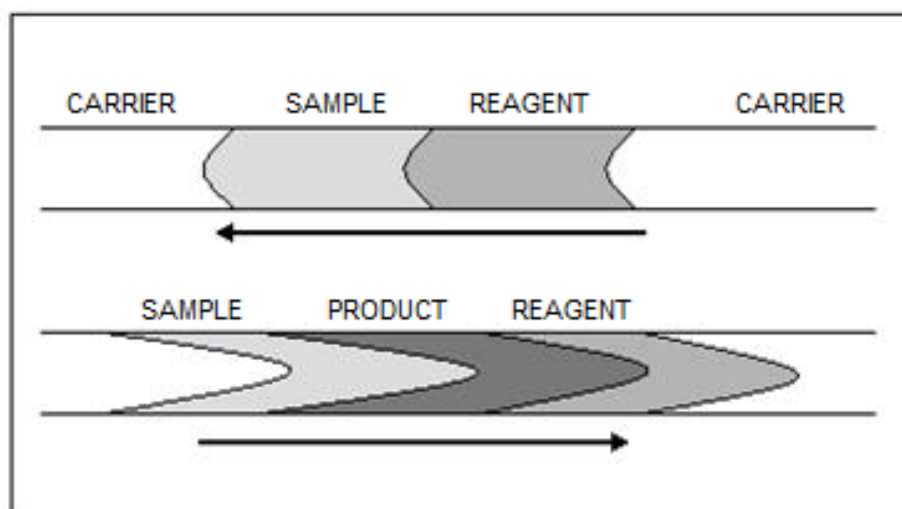
Kvantové tečky našly uplatnění zejména pro konstrukci optoelektronických součástek a přístrojů jako lasery a displeje, optické zesilovače, světlo emitující diody (LED) a detektory. V biologických vědách by QD částice mohly nalézt uplatnění v mikroskopii, v průtokové cytometrii, také by se daly aplikovat pro řízené uvolňování léčiv z lékových forem, fotodynamickou terapii, mapování tkání, detekci intracelulárních událostí v reálném čase (buněčné signální dráhy), sledování migrace buněk (kmenové buňky) a pro cílené zobrazování tumorů [29, 30].

2.3. Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (SIA) je průtoková analytická metoda, která byla vyvinuta během odstraňování nevýhod a nedokonalostí techniky průtokové injekční analýzy (FIA). U jejího vzniku stál kolektiv analytiků z University of Washington vedený J. Růžičkou a G. D. Marshalllem v roce 1990. Sekvenční injekční analýza umožňuje snadnou automatizaci složitých postupů sériových analýz velkého počtu vzorků. Tato relativně nová a velmi progresivně rozvíjející se metoda nabízí efektivní využití reagentů, snazší manipulaci s rizikovými látkami, minimalizaci odpadu, flexibilitu (danou snadnou změnou nastavených parametrů pomocí PC) a značnou robustnost [31, 32].

2.3.1. Princip a základ SIA

Sekvenční injekční analýza (SIA) je založena na koncepci kontrolované disperze mezi úzkými, vzájemně navazujícími zónami vzorků a reakčních činidel o přesně definovaných objemech v reakční cívce o malém vnitřním průměru. Tyto zóny s ostrým rozhraním jsou v prvním (plnicím) cyklu nasávány v přesně definované sekvenci přes 6- až 10-pozicový selekční ventil do kapiláry zvané zadržovací cívka pomocí mikropístové reverzní pumpy poháněné přesným krokovým motorem řízeným počítačem. Před vlastním měřením je do dutiny pístové pumpy nasáto nosné médium [33].



Obr. č. 7: Zóny vzorku (*sample*), činidla (*reagent*) a produktu (*product*) reakce v SIA systému před a po obrácení směru toku nosného proudu (*carrier*), [33].

Ve druhé měřicí fázi jsou pomocí nosného média zóny zavedeny přes selekční ventil do reakční cívky SIA aparatury, přičemž dojde ke kontrolované disperzi vlivem difúze, konvekce a míchání. Na rozhraní mezi zónami se ustaví přesně definovaný koncentrační gradient. Vytvořený reakční produkt je unášen nosnou kapalinou do detektoru, kde je zaznamenáván přechodový signál. Aparatura může být vedle reakční a zadržovací cívky doplněna o celou řadu dalších zařízení umožňujících provádění separačních procesů [33].

2.3.2. Aplikace SIA ve farmacii a ostatních oborech

Metoda SIA byla využita pro analýzu v zemědělství, potravinářství a pro monitorování životního prostředí. SIA se uplatnila při stanovení některých anorganických iontů (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cl^- , F^- , NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , SiO_3^{2-}) ve vodě povrchové, pitné, a odpadní za účelem kontroly její kvality. Také byla použita pro stanovení herbicidů a pro monitorování fermentačních procesů. Doporučený systém pro monitorování fermentačních procesů je miniaturní aparatura (MikroSIA). Poměrně často se v SIA uplatňují také imunoanalytické reakce, byly vyvinuty speciální typy detekčních cel, které umožňují imobilizaci protilátek nebo antigenů přímo v SIA systému. Příkladem může být tzv. jet-ring cela, která byla využita pro stanovení sodíku, lithia, chromu, IgG, glukózy a také při analýze buněk ledvinové tkáně [31, 34].

Možnost uplatnění SIA ve farmacii se vztahuje na kontrolu kvality a účinnosti léčiv, ale také na hodnocení déle trvajících stabilitních studií. Ve výrobní technologii

pomáhá tato metoda zjistit stejnoměrnost obsahu účinné látky v různých farmaceutických přípravcích a rychlost jejího uvolňování z dané lékové formy (monitorování disolučního procesu). Významná je také možnost využití SIA při studiu vazby léčiv či toxických látek na krevní bílkoviny [31].

Sekvenční injekční analýza je novou generací průtokové technologie, která by mohla pomoci zavést rutinní analýzu v chemické oceánografii, což je vědecké odvětví zabývající se chemickými procesy v mořské vodě. Pro svou nízkou spotřebu reagensů, minimalizaci odpadu a robustnost je metoda SIA ideální pro environmentální monitorování na odlehlých místech oceánu [34].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Laboratorní přístroje

Analytické váhy Sartorius 2004 MP, Německo

Ultrazvuková lázeň Sonorex RK 100, Bandelin electronic, Německo

SIA systém:

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

Pístové čerpadlo Cavro XL-3000 s objemem 2,5 ml

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

Deseticestný selekční ventil, VICI VALCO

Detektor Hamamatsu, model H5784-01, Hamamatsu Photonics K. K., Japonsko

Chemiluminiscenční cela navržená na Katedře analytické chemie FaF UK v HK a vyrobená v Mechanických dílnách FaF UK v HK

Spojovací materiál – hadičky z teflonu (PTFE) o vnitřním průměru 0,50 a 0,75 mm, Watrex Praha

3.2. Použité chemikálie

Dithiothreitol 99%, Sigma-Aldrich, Německo

9,10-Fenantrenchinon 99%, Sigma-Aldrich, Německo

Luminol 98%, Fluka BioChemika, Německo

Peroxid vodíku 30% liquid, Sigma-Aldrich, Německo

Hexakynoželezitan draselný 99%, Balex Pardubice Rosice n. Labem, ČR

Hydroxid sodný, min. 98%, Penta Chrudim, ČR

Ethanol 96%, denaturovaný methanolem, Lihovar Pardubice, ČR

Quantum Dots částice s emisními maximy 520 nm, 575 nm, 603 nm a 636 nm, roztoky připraveny na Oddělení bioanalytické instrumentace, Ústavu analytické chemie, Akademie věd České republiky

3.3. Příprava roztoků

Pro přípravu vodných roztoků byla použita vysoce čistá demineralizovaná voda připravená na Katedře analytické chemie FaF UK v HK systémem Millipore Milli-QRG. Roztoky Quantum Dots částic byly připraveny do plastových zkumavek (Eppendorf), pro přípravu všech ostatních roztoků byly použity odměrné baňky.

Vodný roztok peroxidu vodíku je nestálý, proto bylo nutné jej během měření několikrát připravovat znovu. Všechny roztoky (kromě roztoků s Quantum Dots částicemi a roztoku peroxidu vodíku) byly před měřením vloženy na 5 minut do ultrazvukové lázně.

Zásobní roztok hydroxidu sodného o koncentraci **160 mmol/l** připraven z navážky 0,7698 g rozpuštěním ve vodě a doplněním do 100 ml.

Pracovní roztok hydroxidu sodného o koncentraci **6 mmol/l** připraven naředěním 1 ml 160 mmol/l roztoku NaOH vodou a doplněním do 25 ml.

Zásobní roztok hexakvanoželezitanu draselného o koncentraci **20 mmol/l** připraven z navážky 0,6585 g rozpuštěním ve vodě a doplněním do 100 ml.

Zásobní roztok peroxidu vodíku o koncentraci **0,3 mol/l** připraven naředěním 3 ml 30 % roztoku H₂O₂ vodou a doplněním do 100 ml.

Pracovní roztok peroxidu vodíku o koncentraci **0,3 mmol/l** připraven naředěním 1 ml 0,3 mol/l roztoku H₂O₂ vodou a doplněním do 100 ml.

Zásobní roztok luminolu o koncentraci **15 mmol/l** připraven z navážky 0,0133 g rozpuštěním v 6 mmol/l roztoku NaOH a doplněním do 5 ml.

Pracovní roztok luminolu o koncentraci **150 μmol/l** připraven naředěním 1 ml 15 mmol/l roztoku luminolu 6 mmol/l roztokem NaOH a doplněním do 100 ml.

Zásobní roztok luminolu o koncentraci **10 mmol/l** připraven z navážky 0, 0177 g rozpuštěním v 6 mmol/l roztoku NaOH a doplněním do 10 ml.

Pracovní roztok luminolu o koncentraci **1 mmol/l** připraven naředěním 1 ml 10 mmol/l roztoku luminolu 6 mmol/l roztokem NaOH a doplněním do 10 ml.

Zásobní roztok fenantrenchinonu o koncentraci **1 mmol/l** připraven z navážky 0,0209 g rozpuštěním v 96% ethanolu a doplněním ethanollem do 100 ml.

Pracovní roztok fenantrenchinonu o koncentraci **100 μmol/l** připraven naředěním 1 ml 1 mmol/l roztoku fenantrenchinonu 96 % ethanollem a doplněním do 10 ml.

Pracovní roztok fenantrenchinonu o koncentraci **50 $\mu\text{mol/l}$** připraven naředěním 5 ml 100 $\mu\text{mol/l}$ roztoku fenantrenchinonu 96 % ethanolem a doplněním do 10 ml.

Pracovní roztok fenantrenchinonu o koncentraci **30 $\mu\text{mol/l}$** připraven naředěním 3 ml 100 $\mu\text{mol/l}$ roztoku fenantrenchinonu 96 % ethanolem a doplněním do 10 ml.

Pracovní roztok fenantrenchinonu o koncentraci **10 $\mu\text{mol/l}$** připraven naředěním 1 ml 100 $\mu\text{mol/l}$ roztoku fenantrenchinonu 96 % ethanolem a doplněním do 10 ml.

Pracovní roztok fenantrenchinonu o koncentraci **5 $\mu\text{mol/l}$** připraven naředěním 1 ml 50 $\mu\text{mol/l}$ roztoku fenantrenchinonu 96 % ethanolem a doplněním do 10 ml.

Pracovní roztok fenantrenchinonu o koncentraci **4 $\mu\text{mol/l}$** připraven naředěním 1 ml 100 $\mu\text{mol/l}$ roztoku fenantrenchinonu 96 % ethanolem a doplněním do 25 ml.

Pracovní roztok fenantrenchinonu o koncentraci **3 $\mu\text{mol/l}$** připraven naředěním 1 ml 30 $\mu\text{mol/l}$ roztoku fenantrenchinonu 96 % ethanolem a doplněním do 10 ml.

Pracovní roztok fenantrenchinonu o koncentraci **1,5 $\mu\text{mol/l}$** připraven naředěním 5 ml 3 $\mu\text{mol/l}$ roztoku fenantrenchinonu 96 % ethanolem a doplněním do 10 ml.

Pracovní roztok fenantrenchinonu o koncentraci **1 $\mu\text{mol/l}$** připraven naředěním 1 ml 10 $\mu\text{mol/l}$ roztoku fenantrenchinonu 96 % ethanolem a doplněním do 10 ml.

Zásobní roztok dithiothreitolu o koncentraci **25 mmol/l** připraven z navážky 0,3845 g rozpuštěním ve vodě a doplněním do 50 ml.

Pracovní roztok dithiothreitolu o koncentraci **5 mmol/l** připraven naředěním 1 ml 25 mmol/l roztoku DTT vodou a doplněním do 5 ml.

Pracovní roztok dithiothreitolu o koncentraci **0,5 mmol/l** připraven naředěním 1 ml 5 mmol/l roztoku DTT vodou a doplněním do 10 ml.

Pracovní roztok dithiothreitolu o koncentraci **50 $\mu\text{mol/l}$** připraven naředěním 1 ml 0,5 mmol/l roztoku DTT vodou a doplněním do 10 ml.

Pracovní roztok dithiothreitolu o koncentraci **5 $\mu\text{mol/l}$** připraven naředěním 1 ml 50 $\mu\text{mol/l}$ roztoku DTT vodou a doplněním do 10 ml.

Pracovní roztoky I Quantum Dots částic s emisními maximy při 520 nm, 575 nm, 603 nm a 636 nm byly připraveny naředěním **200 $\mu\text{l}/1 \text{ ml}$** vodou.

Pracovní roztoky II Quantum Dots částic s emisními maximy při 520 nm, 575 nm, 603 nm a 636 nm byly připraveny naředěním **200 $\mu\text{l}/10 \text{ ml}$** vodou.

Pracovní roztoky III Quantum Dots částic s emisními maximy při 520 nm, 575 nm, 603 nm a 636 nm byly připraveny naředěním **10 $\mu\text{l}/10 \text{ ml}$** vodou.

3.4. Systém sestavy SIA

Vstupní jednotkou SIA systému je čerpadlo (Cavro XL-3000 s objemem 2,5 ml). Dále je do sestavy zařazen vícecestný selekční ventil – nejčastěji 6, 8 a 10-cestné ventily firmy Vici Valco. Mezi čerpadlem a selekčním ventilem bývá reakční mísicí cívka. Poslední součástí sestavy je detektor, v tomto případě byl použit fotonásobič japonské firmy Hamamatsu Photoniscs. Celý analytický proces je řízený počítačem s příslušným softwarem.

Princip metody SIA systému a využití sekvenční injekční analýzy v praxi jsou podrobně popsány v teoretické části v kapitole 2.3.

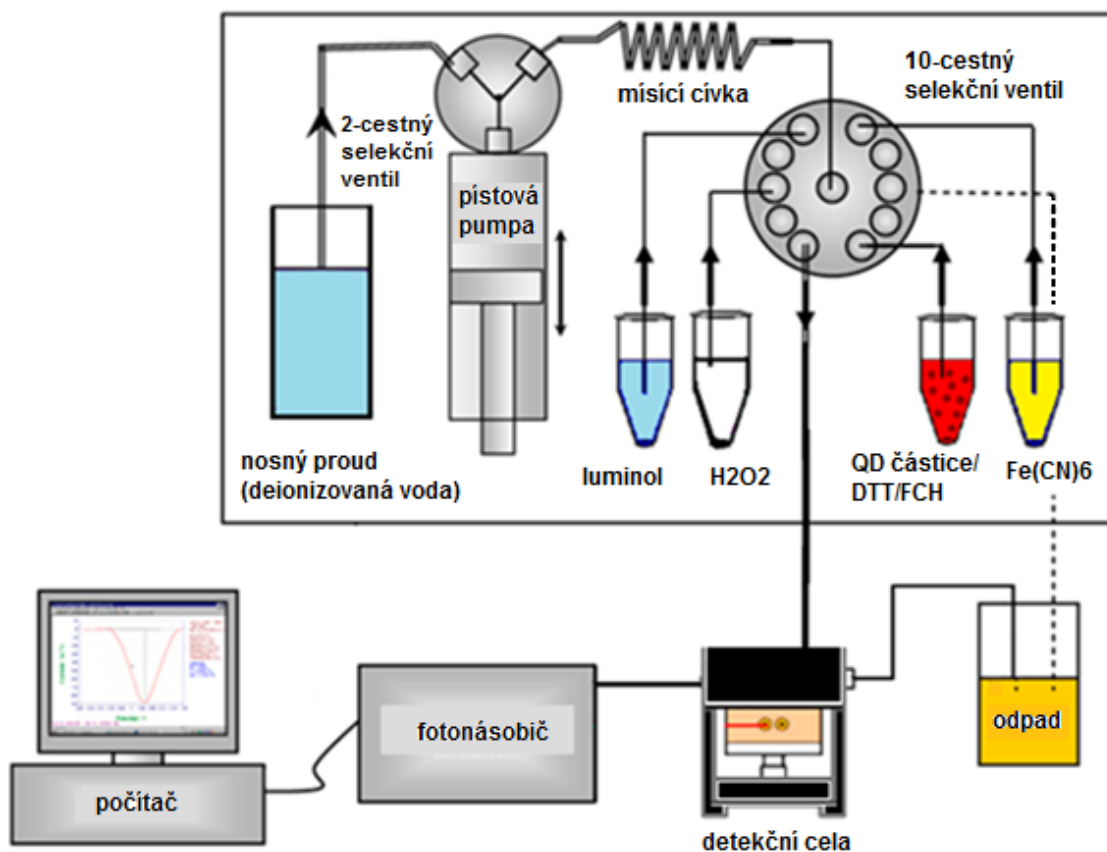
3.4.1. Průtokový systém

Do sestavy průtokového systému byl zapojen 10-cestný selekční ventil, který umožňoval aspiraci různých kombinací roztoků a činidel. Jednotlivé pozice na selekčním ventilu byly očíslovány od 1 – 10 (port č. 1 – fenantrenchinon, port č. 2 – dithiothreitol, port č. 3 – detekční cela IN (vstup), port č. 4 – nezapojen, port č. 5 – detekční cela OUT (výstup), port č. 6 – peroxid vodíku, port č. 7 – vzduch, port č. 8 – odpad, port č. 9 – luminol, port č. 10 – hexakynoželezitan draselný).

Jako čerpadlo byla použita pístová pumpa poháněná přesným krokovým elektromotorem [31]. Ventil pístové pumpy byl nejdříve naprogramován do polohy IN, tím bylo umožněno nasátí nosného proudu (demineralizované vody) do rezervoáru pístového čerpadla. Následně byl dvojcestný ventil přepnut do polohy OUT, čímž bylo propojeno čerpadlo s mísicí cívkou.

Do mísicí cívky pak byly postupně aspirovány roztoky činidel a studovaných látek přes dané porty selekčního ventilu. Aby se zbránilo nežádoucí reakci a iniciaci chemiluminiscenčního záření ještě před dopravením zón roztoků do detekční cely, byly jednotlivé roztoky v mísicí cívce odděleny vzduchovou bublinou [6].

Po obrácení pohybu pístu byly zóny roztoků převedeny do detekční cely, kde došlo k promísení studovaných látek a činidel a k průběhu chemiluminiscenční reakce. V tomto okamžiku byla do programu zařazena časová pauza (Timer) a detektor začal snímat chemiluminiscenční záření.



Obr. č. 8: Schéma SIA systému (obrázek byl převzat a upraven z časopisu *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* – Barry et al. 2008)

Nakonec byl průtokový systém promyt přebytkem demineralizované vody z pístové pumpy a celý cyklus se mohl opakovat. K propojení komponent průtokového systému byly použity teflonové hadičky (PTFE) o vnitřním průměru 0,50 a 0,75 mm. Před každým měřením bylo potřeba tyto hadičky naplnit příslušnými roztoky činidel a studovaných látek.

3.4.2. Detekce a vyhodnocení signálu

Chemiluminiscenční signál byl měřen detektorem Hamamatsu (H5784-01). Detektor je citlivý v rozmezí vlnových délek 300 – 850 nm. Mezi jeho výhody patří vysoká citlivost, nízké pracovní napětí, nízká spotřeba energie, široký dynamický rozsah měřené intenzity světla, rychlá časová odezva a jednoduchá obsluha. Při dopadu záření na fotosenzitivní snímač detektoru vzniká elektrický proud, který je veden do zesilovače a zde je transformován v napětí. Výsledná hodnota napětí je znázorněna na monitoru ve formě jednoduchého signálu – píku [6].

Aby fotokatoda správně snímala chemiluminiscenční záření, musí být umístěna ve tmavém obalu. Pro měření bylo tedy použito černé a zcela uzavřené nádoby, aby dovnitř nepronikalo světlo z okolí a neovlivňovalo měření chemiluminiscence.



(Hamamatsu Photonics. K. K.)

Vyhodnocení grafického záznamu bylo provedeno prostřednictvím programu FaFSIA 1.0 založeném na grafickém programovacím jazyce LabVIEW [35]. Zde v modulu *Peak Detection* byly odečteny píkem. Tyto hodnoty jsou závislé na intenzitě chemiluminiscence a tedy i na

koncentraci měřeného roztoku.

Délka dosvitu je doba, která uplyne od ukončení budícího impulsu do vyhasnutí chemiluminiscence. Dosvit je patrný z hodnot plochy píku (hodnocených za určitý časový úsek) – čím jsou nižší, tím signál klesá rychleji. Dobu dosvitu je možné dokumentovat pomocí záznamů měření, podle tvaru píku lze také odhadnout, o kolik procent signál klesl za určitou dobu měření.

Posouzení opakovatelnosti výsledků měření bylo provedeno podle vzorců:

$$s = \sqrt{\frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad s_r [\%] = \frac{100 \cdot s}{\bar{x}}$$

kde s je směrodatná odchylka, N je počet měření, $x_i - \bar{x}$ je absolutní odchylka jednotlivých výsledků od aritmetického průměru, s_r je relativní směrodatná odchylka vyjádřená v procentech [6].

Při hodnocení výsledků měření byly využity hodnoty velikosti výšky píku a velikosti plochy pod píkem.

3.4.3. Struktura měřícího cyklu

Základní strukturou měřícího cyklu byla aspirace nosného proudu do pístové pumpy, aspirace činidel, aspirace studovaných látek, transport aspirovaných zón oddělených bublinkami vzduchu do detekční cely, promísení zón činidel a studované látky, a vlastní měření chemiluminiscenčního signálu po dobu 1 minuty, měřící cyklus byl ukončen odstraněním všech roztoků z detekční cely a jejím promytím.

Výchozí hodnoty některých parametrů (objem aspirovaného roztoku, rychlost pohybu pístové pumpy) a základní struktura měřicího cyklu byly převzaty z Diplomové práce Hany Tomanové z roku 2005. Pro experimentální část mé práce bylo použito celkem 6 programů. Na ukázkou byl vybrán měřicí program, který byl vytvořen pro měření s různými koncentracemi roztoku fenantrenchinonu. Byl vytvořen také program promývací, protože po skončení měření bylo vždy nutné SIA systém promýt vodou. Byly provedeny celkem 3 cykly měření pro jedny reakční podmínky.

syringe pump	initialize	0	
syringe pump	valve position IN		vlastní měření
syringe pump	set flow rate [$\mu\text{l/s}$]	50	
syringe pump	aspirate[μl]	150	{nosný proud}
Detector	on		
syringe pump	valve position OUT		
syringe pump	set flow rate [$\mu\text{l/s}$]	30	
multi-port valve	set valve position	7	{vzduch}
syringe pump	aspirate[μl]	10	
multi-port valve	set valve position	1	{chinon}
syringe pump	aspirate[μl]	10	
multi-port valve	set valve position	7	{vzduch}
syringe pump	aspirate[μl]	10	
multi-port valve	set valve position	6	{peroxid}
syringe pump	aspirate[μl]	40	
multi - port valve	set valve position	7	{vzduch}
syringe pump	aspirate[μl]	10	
Detector	on		
multi-port valve	set valve position	9	{luminol}
syringe pump	aspirate[μl]	30	
multi-port valve	set valve position	7	{vzduch}
syringe pump	aspirate[μl]	10	
multi-port valve	set valve position	10	{hexakynoželezitan}
syringe pump	aspirate[μl]	10	
multi-port valve	set valve position	7	{vzduch}
syringe pump	aspirate[μl]	10	
syringe pump	set flow rate [$\mu\text{l/s}$]	50	
multi-port valve	set valve position	3	{cela IN}
syringe pump	empty syringe		
Timer	pause [s]	60	
multi-port valve	set valve position	5	{cela OUT}
syringe pump	aspirate[μl]	300	
multi-port valve	set valve position	8	{odpad}
syringe pump	set flow rate [$\mu\text{l/s}$]	60	
syringe pump	empty syringe		

syringe pump	valve position IN		promytí detekční cely
syringe pump	aspirate[μ l]	500	{nosný proud}
syringe pump	valve position OUT		
multi - port valve	set valve position	3	{cela IN}
syringe pump	dispense [μ l]	250	
multi-port valve	set valve position	5	{cela OUT}
syringe pump	aspirate[μ l]	300	
multi-port valve	set valve position	8	{odpad}
syringe pump	empty syringe		

3.5. Studium chemiluminiscence chinonů

Japonští vědci Kishikawa a kol. se zabývali chemiluminiscenční metodou pro stanovení chinonů, která byla založena na vzniku reaktivních forem kyslíku během redoxního cyklu chinonu. Dále studovali stanovení ubichinonu ve farmaceutických přípravcích chemiluminiscenční metodou. K měření využívali systém HPLC-CL. K vytvoření CL reakce použili tyto chemikálie: 9,10-fenantrenchinon, luminol a dithiothreitol. Smícháním fenantrenchinonu a luminolu dosáhli po přidání DTT velmi silné a dlouhotrvající chemiluminiscence, jejíž intenzita byla úměrná koncentraci fenantrenchinonu [13].

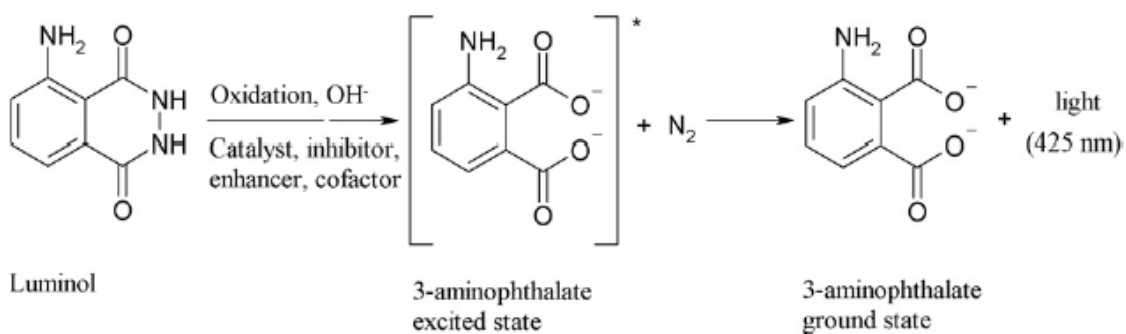
Aby bylo možné tuto metodu vyzkoušet na systému SIA, pracovalo se pouze s vodnými a ethanolickými roztoky, což se shodovalo se studií. Výjimkou byl DTT, který měl být původně rozpuštěn v acetonitrilu. Protože se výrazná chemiluminiscence dlouho neobjevovala, celý experiment byl proveden s DTT rozpuštěným v acetonitrilu. Výsledek byl opět negativní. Chování systému s fenantrenchinonem, luminolem a DTT bylo vysvětleno možným výskytem rušivých iontů v používané demineralizované vodě. Proto byl použit již odzkoušený systém s peroxidem vodíku, luminolem a hexakvanoželezitanem draselným, a také byl studován vliv fenantrenchinonu a DTT na tento základní systém.

3.5.1. Popis základního systému s luminolem

Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalazindion/5-aminoftalylhydrazid) je už dlouhou dobu frekventovaně používán jako chemiluminiscenční činidlo. Chemiluminiscenční záření luminolu je založeno na jeho oxidaci peroxidem vodíku za katalýzy $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6$ nebo pomocí jiných katalyzátorů (Cu^{II} , Co^{II} , Fe^{II}). Předpokládaným

zářičem je 3-aminofthalátový anion v excitovaném stavu, jehož emisní maximum se nachází při 425 nm [5].

Základní systém s luminolem, který byl používán k měření, obsahoval roztok peroxidu vodíku o koncentraci 0,3 mmol/l, roztok luminolu o koncentraci 1 mmol/l a roztok hexakvanoželezitanu draselného o koncentraci 20 mmol/l.



Obr. č. 10: Schéma CL reakce luminolu, [5].

3.5.2. Testování změny reakčních podmínek

Byl pozorován vliv různých koncentrací luminolu v základním systému, do kterého byly postupně přidávány roztoky fenantrenchinonu o koncentracích 1 $\mu\text{mol/l}$, 1,5 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$, 4 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$ a 10 $\mu\text{mol/l}$. Obdobně bylo postupováno s roztoky DTT o koncentracích 5 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 0,5 mmol/l, 5 mmol/l, 25 mmol/l. Podle japonského článku byl připraven roztok luminolu o koncentraci 150 $\mu\text{mol/l}$, a dále roztok luminolu o koncentraci 1 mmol/l.

Byly studovány různé kombinace koncentrací roztoků luminolu s různými koncentracemi roztoků fenantrenchinonu a DTT. Koncentrace roztoku peroxidu vodíku a hexakvanoželezitanu draselného v základním systému se neměnily. Měření bylo prováděno při pracovním napětí 420 a 500 mV.

3.6. Optimalizace parametrů chemiluminiscenční detekce metodou SIA (Sequential Injection Analysis)

Pro měření v SIA systému byla optimalizována koncentrace roztoků luminolu, fenantrenchinonu a DTT. Výchozí hodnoty aspirovaných objemů roztoků činidel, rychlosti pohybu pístové pumpy a jednotlivé kroky v měřicím cyklu byly převzaty z Diplomové práce Hany Tomanové (2005) [6].

3.6.1. Vliv koncentrace fenantrenchinonu na plochu a výšku signálu, na délku dosvitu a na opakovatelnost měření

Bylo testováno, jestli budou mít různé koncentrace fenantrenchinonu vliv na základní systém, který obsahoval 0,3 mmol/l roztok peroxidu vodíku, 1 mmol/l roztok luminolu a 20 mmol/l roztok hexakynoželezitanu draselného. Test byl zaměřen na velikost plochy pod píkem, na jeho výšku, na délku dosvitu a opakovatelnost. Měření bylo provedeno s roztoky fenantrenchinonu o koncentracích 1 $\mu\text{mol/l}$, 1,5 $\mu\text{mol/l}$, 3 $\mu\text{mol/l}$, 4 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$ a 10 $\mu\text{mol/l}$.

3.6.2. Vliv koncentrace dithiothreitolu na plochu a výšku signálu, na délku dosvitu a opakovatelnost měření

Pro měření byly použity roztoky dithiothreitolu o koncentracích 5 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 0,5 mmol/l, 5 mmol/l, 25 mmol/l. Koncentrace roztoků činidel v základním systému s luminolem a ostatní parametry v naprogramovaném měřicím cyklu zůstaly konstantní. Test byl také zaměřen na délku snímání CL signálu a hodnocení opakovatelnosti měření.

3.7. Studium vlivu Quantum Dots částic

Quantum Dots částice mají jedinečné optické vlastnosti využitelné pro různé bioanalytické aplikace. V posledních letech se ve světě staly středem zájmu různých chemicko-technologických ústavů a univerzit. Mohou být použity například v optické fluorescenční mikroskopii pro studium buněk, jako zesilovače intenzity

luminiscenčního záření, v dekontaminačních technologiích nebo pro medicínské a farmaceutické účely [30].

Velikost QD částic může ovlivňovat jejich optické vlastnosti a je také klíčovým parametrem, který určuje spektrální pozici a čistotu fotoluminiscence. Velikost QD částic je obecně počítána s použitím konvenčních technik jako SEM (skenovací elektronový mikroskop), TEM (transmisní elektronový mikroskop) a DLS (dynamický rozptyl světla) [36].



Obr. č. 11: Roztoky *Quantum Dots* o různé velikosti – velikost QD částic a jejich emisní maximum roste od modré k červené, [30].

Test vlivu QD částic byl proveden s roztoky, které byly připraveny na Oddělení bioanalytické instrumentace - Ústav analytické chemie, AV ČR. Byl zkoumán vliv QD částic o různých emisních maximech a různého naředění roztoku QD částic na chemiluminiscenční signál v základním systému, který obsahoval roztoky peroxidu vodíku, luminolu a hexakvanoželezitanu draselného.

3.7.1. Vliv koncentrace Quantum Dots částic na plochu a výšku signálu, na délku dosvitu a opakovatelnost měření

K dispozici byly Quantum Dots částice s emisními maximy 520 nm, 575 nm, 603 nm a 636 nm. Měření bylo provedeno s pracovními roztoky I, které byly připraveny naředěním 200 μ l/ 1 ml vodou, dále s pracovními roztoky II, které byly připraveny naředěním 200 μ l/ 10 ml vodou a s pracovními roztoky III, které byly připraveny naředěním 10 μ l/ 10 ml vodou. Bylo pozorováno, jak se částice budou chovat v prostředí základního systému, který obsahoval 0,3 mM roztok peroxidu vodíku, 1 mM roztok luminolu a 20 mM roztok hexakvanoželezitanu draselného. Byl také testován vliv QD částic na hodnotu výšky píku, na velikost plochy pod píkem, na délku dosvitu a na opakovatelnost měření.

4. VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUSE

4.1. Vliv koncentrace fenantrenchinonu na plochu a výšku signálu, na délku dosvitu a na opakovatelnost měření

Pro měření byly použity tyto roztoky: 0,3 mM peroxid vodíku, 1 mM luminol v 6 mM hydroxidu sodném, 20 mM hexakynoželezitan draselný a fenantrenchinon rozpuštěný v 96 % ethanolu. Byl testován vliv různých koncentrací roztoků fenantrenchinonu na chemiluminiscenční signál základního systému obsahujícího roztok peroxidu vodíku, luminolu a hexakynoželezitanu draselného. Bylo aspirováno 40 μ l peroxidu vodíku, 30 μ l luminolu, 10 μ l hexakynoželezitanu draselného a 10 μ l fenantrenchinonu. Pracovní napětí detektoru bylo nastaveno na 500 mV. CL signál byl hodnocen po dobu jedné minuty, po uplynutí této doby byl obsah detekční cely odstraněn do odpadu – což odpovídá poklesu CL signálu na základní hladinu.

Tab. č. 1: Vliv fenantrenchinonu o koncentraci 1 μ M

	1	2	3	$\bar{\phi}$	s	s_r [%]
výška píku	3,12	3,03	3,07	3,07	0,05	1,47
plocha pod píkem	78,47	84,94	90,12	84,51	5,84	6,91

Tab. č. 2: Vliv fenantrenchinonu o koncentraci 1,5 μ M

	1	2	3	$\bar{\phi}$	s	s_r [%]
výška píku	3,03	2,93	2,88	2,95	0,08	2,59
plocha pod píkem	75,94	85,96	88,18	83,36	6,52	7,82

Tab. č. 3: Vliv fenantrenchinonu o koncentraci 3 μ M

	1	2	3	$\bar{\phi}$	s	s_r [%]
výška píku	3,19	3,12	2,99	3,10	0,10	3,27
plocha pod píkem	92,81	78,73	86,35	85,96	7,05	8,20

Tab. č. 4: Vliv fenantrenchinonu o koncentraci 4 μ M

	1	2	3	$\bar{\phi}$	s	s_r [%]
výška píku	2,75	2,57	2,80	2,71	0,12	4,47
plocha pod píkem	87,81	71,11	82,97	80,63	8,59	10,66

Tab. č. 5: Vliv fenantrenchinonu o koncentraci 5 μ M

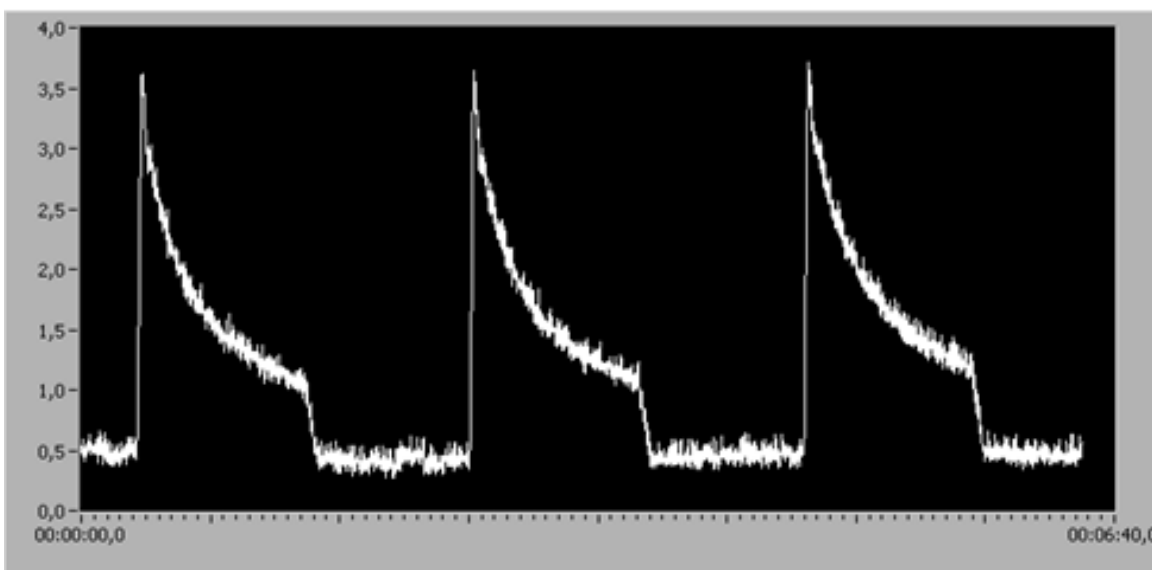
	1	2	3	$\bar{\phi}$	s	s_r [%]
výška píku	2,80	3,07	2,95	2,94	0,14	4,60
plocha pod píkem	82,84	92,70	80,85	85,46	6,35	7,42

Tab. č. 6: Vliv fenantrenchinonu o koncentraci 10 μM

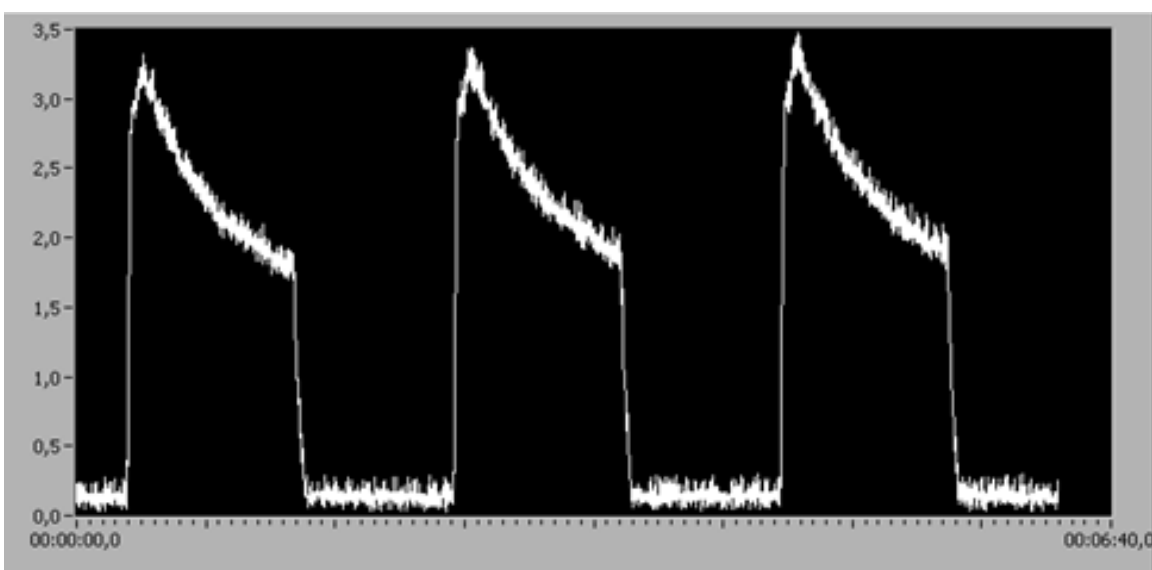
	1	2	3	$\bar{\phi}$	s	s_r [%]
výška píku	2,69	2,87	2,96	2,84	0,14	4,84
plocha pod píkem	71,60	86,88	93,87	84,12	11,39	13,54

Tab. č. 7: Chemiluminiscence v základním systému (0,3 mM peroxid vodíku, 1mM luminol, 20 mM hexakynoželezitan)

	1	2	3	$\bar{\phi}$	s	s_r [%]
výška píku	3,04	3,23	3,31	3,19	0,14	4,34
plocha pod píkem	144,21	149,72	152,20	148,71	4,09	2,75



Obr. č. 12: Ukázka záznamu měření s fenantrenchinonem (1 μM fenantrenchinon a základní systém), pracovní napětí 500mV

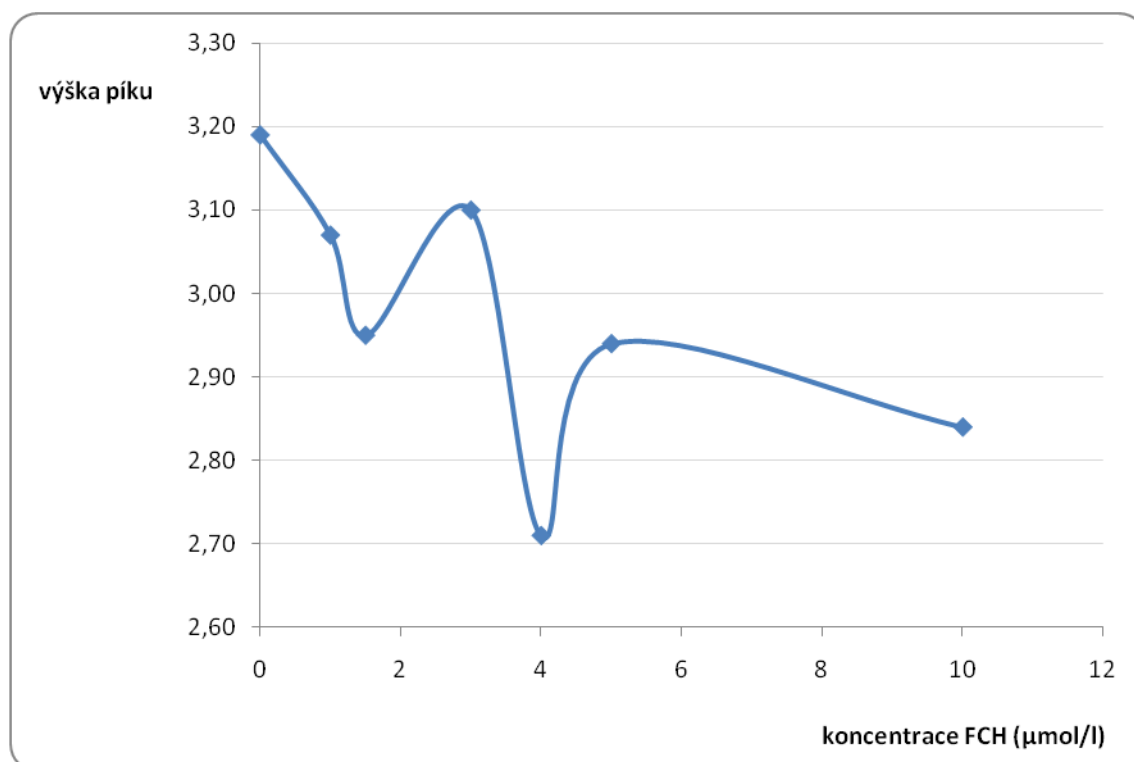


Obr. č. 13: Ukázka záznamu měření – základní systém (0,3 mM peroxid vodíku, 1 mM luminol, 20 mM hexakynoželezitan draselný), pracovní napětí 500 mV

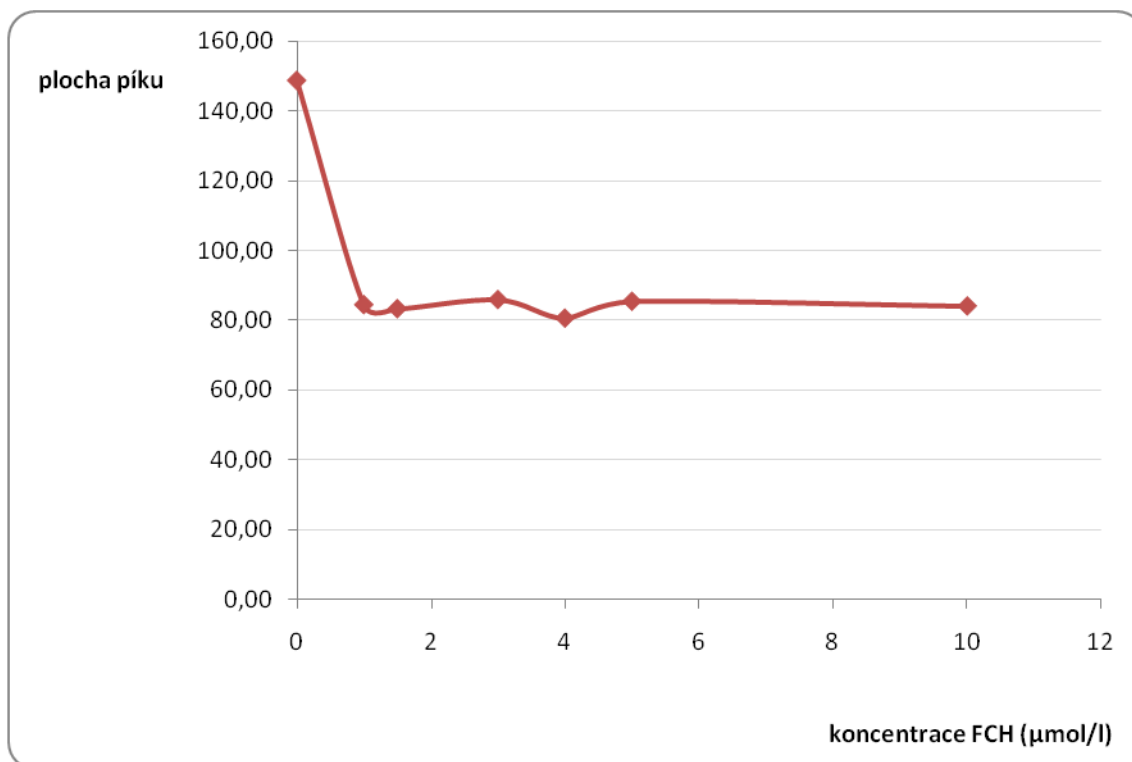
Tab. č. 8: Vyhodnocení vlivu koncentrace fenantrenchinonu na plochu a výšku signálu – souhrnná tabulka

c (μM)	výška píku (Ø)	s	s _r [%]	plocha (Ø)	s	s _r [%]
1	3,07	0,05	1,47	84,51	5,84	6,91
1,5	2,95	0,08	2,59	83,36	6,52	7,82
3	3,10	0,10	3,27	85,96	7,05	8,02
4	2,71	0,12	4,47	80,63	8,59	10,66
5	2,94	0,14	4,60	85,46	6,35	7,42
10	2,84	0,14	4,84	84,12	11,31	13,54
zs	3,19	0,14	4,34	148,71	4,09	2,75

*(c – koncentrace, Ø – průměrná hodnota plochy a výšky píku, s – směrodatná odchylka, s_r – relativní směrodatná odchylka, zs – základní systém bez FCH)



Obr. č. 14: Závislost výšky CL signálu na koncentraci fenantrenchinonu v základním systému [peroxid, luminol, hexakynoželezitan]



Obr. č. 15: Závislost plochy CL signálu (hodnocené po dobu 60 s) na koncentraci fenantrenchinonu v základním systému [peroxid, luminol, hexakvanoželezitan]

Z hodnot v tabulce č. 8 vyplývá, že mezi koncentrací fenantrenchinonu a plochou pod píkem nelze vysledovat žádnou závislost, ale u koncentrací 1 μM a 3 μM lze vyzorovat, že průměrná hodnota výšky píku se přibližovala průměrným hodnotám výšky píku základního systému, který obsahoval peroxid vodíku, luminol a hexakvanoželezitan draselný.

Hodnota relativní směrodatné odchylky při hodnocení výšky píku byla u všech měření menší než 5 %. Při hodnocení plochy píku se hodnoty RSD pohybovaly od 2,75 do 13,54 % – hodnoty vyšší než 5 % se přitom vyskytovaly u měření s fenantrenchinonem, který CL signál ovlivňuje ve smyslu zkrácení délky dosvitu a tím také lze vysvětlit rozdíly v hodnotách plochy pod píkem u jednotlivých měření.

4.2. Vliv koncentrace dithiothreitolu na plochu a výšku signálu, na délku dosvitu a opakovatelnost měření

Pro měření byly použity roztoky o těchto koncentracích: 0,3 mM peroxid vodíku, 1 mM luminol v 6 mM hydroxidu sodném, 20 mM hexakynoželezitan draselný a dithiothreitol rozpuštěný ve vodě. Byl testován vliv různých koncentrací roztoků DTT na chemiluminiscenční signál základního systému obsahujícího peroxid vodíku, luminol a hexakynoželezitan draselný. Pracovní napětí detektoru bylo nastaveno na 420 mV – při vlastním měření došlo ke změně nastavení pracovního napětí vlivem vyššího CL signálu nově připraveného 0,3 mM peroxidu vodíku.

CL signál byl hodnocen po dobu jedné minuty (Tab. č. 9 – 14), po uplynutí této doby byl obsah detekční cely odstraněn do odpadu – což odpovídá poklesu CL signálu na základní hladinu. Také bylo vyzkoušeno prodloužení časové pauzy v měřicím cyklu na 3 minuty a na záznamu bylo pozorováno, jak se změnilly parametry CL signálu (zde bylo ještě použito napětí 500 mV).

Tab. č. 9: Vliv dithiothreitolu o koncentraci 5 μ M

	1	2	3	$\bar{\phi}$	s	s_r [%]
výška píku	3,86	4,03	4,08	3,99	0,09	2,36
plocha pod píkem	64,55	66,09	67,08	65,91	1,04	1,58

Tab. č. 10: Vliv dithiothreitolu o koncentraci 50 μ M

	1	2	3	$\bar{\phi}$	s	s_r [%]
výška píku	3,45	3,41	3,68	3,51	0,12	3,39
plocha pod píkem	59,14	61,27	60,66	60,36	0,90	1,48

Tab. č. 11: Vliv dithiothreitolu o koncentraci 0,5 mM

	1	2	3	$\bar{\phi}$	s	s_r [%]
výška píku	3,38	3,62	3,55	3,52	0,10	2,87
plocha pod píkem	57,43	59,43	59,56	58,81	0,97	1,66

Tab. č. 12: Vliv dithiothreitolu o koncentraci 5 mM

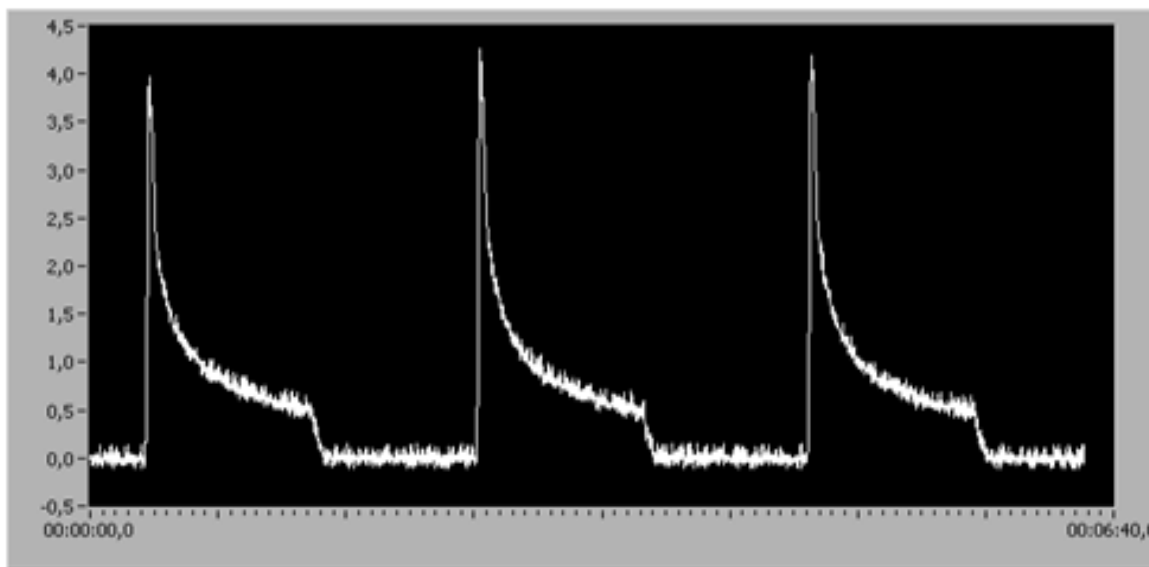
	1	2	3	$\bar{\phi}$	s	s_r [%]
výška píku	3,5	3,69	3,49	3,56	0,09	2,58
plocha pod píkem	61,74	61,94	61,74	61,81	0,09	0,15

Tab. č. 13: Vliv dithiothreitolu o koncentraci 25 mM

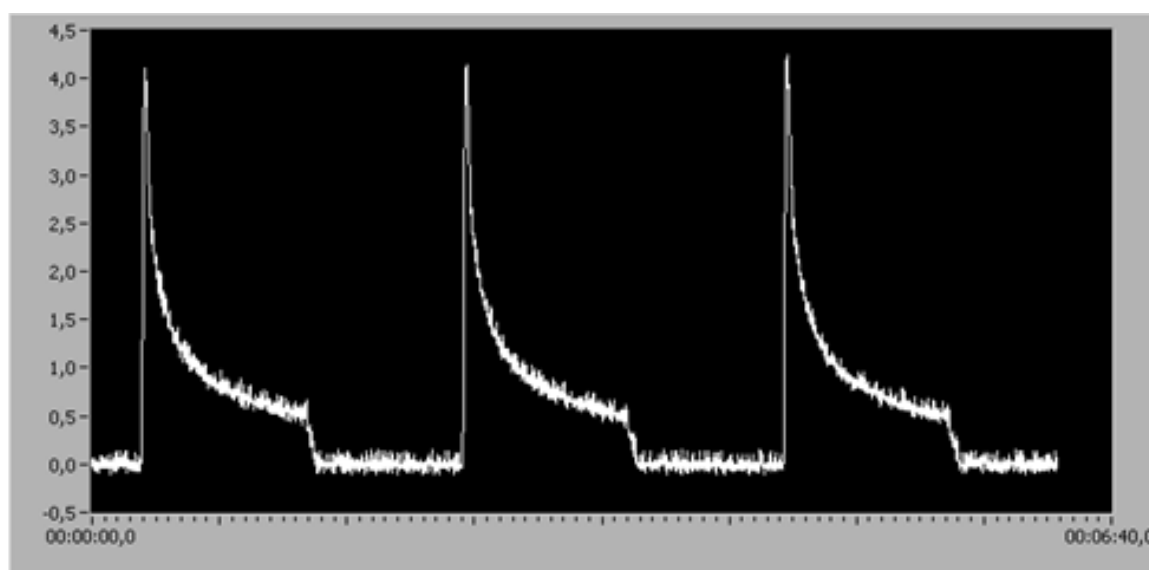
	1	2	3	$\bar{\phi}$	s	s_r [%]
výška píku	3,48	3,62	3,46	3,52	0,07	2,02
plocha pod píkem	59,31	61,28	60,11	60,23	0,81	1,34

Tab. č. 14: Chemiluminiscence v základním systému (0,3 mM peroxid vodíku, 1mM luminol, 20 mM hexakynoželezitan)

	1	2	3	$\bar{\phi}$	s	s_r [%]
výška píku	4,1	3,95	4,26	4,10	0,13	3,08
plocha pod píkem	67,87	68,58	68,8	68,42	0,40	0,58



Obr. č. 16: Ukázka záznamu měření s dithithreitolem (5 μ M dithiothreitol a základní systém), pracovní napětí 420 mV

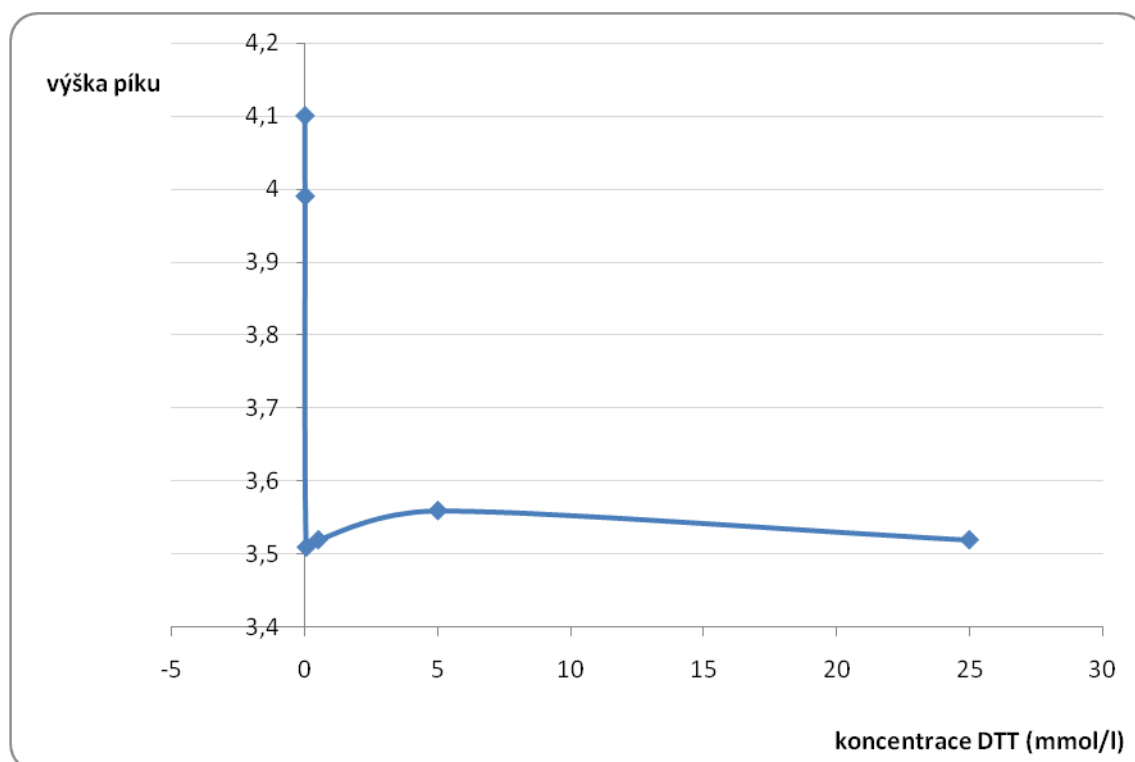


Obr. č. 17: Ukázka záznamu měření – základní systém (0,3 mM peroxid vodíku, 1 mM luminol, 20 mM hexakynoželezitan draselný), pracovní napětí 420 mV

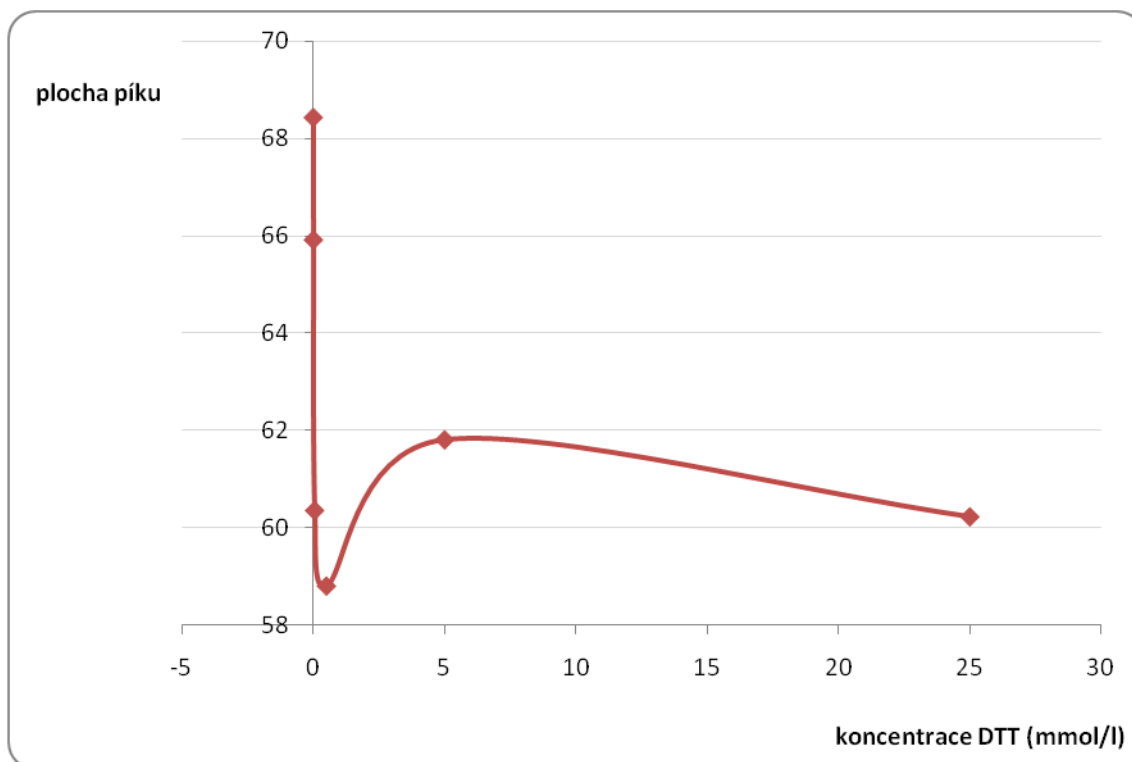
Tab. č. 15: Vyhodnocení vlivu koncentrace dithiothreitolu na plochu a výšku signálu – souhrnná tabulka

c (mM)	výška píku ($\bar{\varnothing}$)	s	s _r [%]	plocha ($\bar{\varnothing}$)	s	s _r [%]
0,005	3,99	0,09	2,36	65,91	1,04	1,58
0,050	3,51	0,12	3,39	60,36	0,90	1,48
0,5	3,52	0,10	2,87	58,81	0,97	1,66
5	3,56	0,09	2,58	61,81	0,09	0,15
25	3,52	0,07	2,02	60,23	0,81	1,34
zs	4,10	0,13	3,08	68,42	0,40	0,58

* (c – koncentrace, $\bar{\varnothing}$ – průměrná hodnota plochy a výšky píku, s – směrodatná odchylka, s_r – relativní směrodatná odchylka, zs – základní systém bez dithiothreitolu)



Obr. č. 18: Závislost výšky CL signálu na koncentraci dithiothreitolu v základním systému [peroxid, luminol, hexakvanoželezitan]



Obr. č. 19: Závislost plochy CL signálu (hodnocené po dobu 60 s) na koncentraci dithiothreitolu v základním systému [peroxid, luminol, hexakynoželezitan]

Během testování vlivu koncentrace DTT na základní systém s luminolem bylo vyzkoušeno prodloužení časové pauzy (Timer) v měřicím cyklu z 60 s na 180 s. Bylo pozorováno, jak tato změna ovlivní CL signál (hodnotu plochy pod píkem) a relativní směrodatnou odchylku.

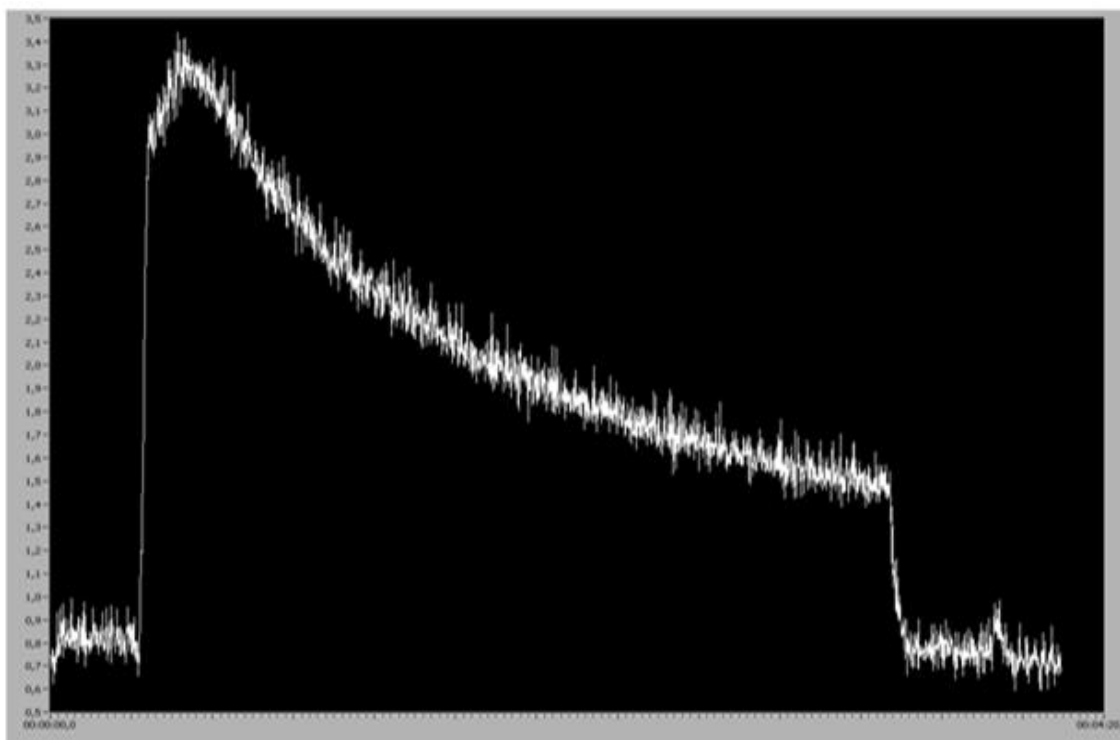
Měření bylo provedeno za těchto podmínek: 0,3 mM peroxid vodíku, 150 μ M luminol, 20 mM hexakynoželezitan draselný a 50 μ M DTT. Napětí bylo nastaveno na 500 mV.

Tab. č. 16: Prodloužení doby měření signálu u 50 μ M DTT na 3 min

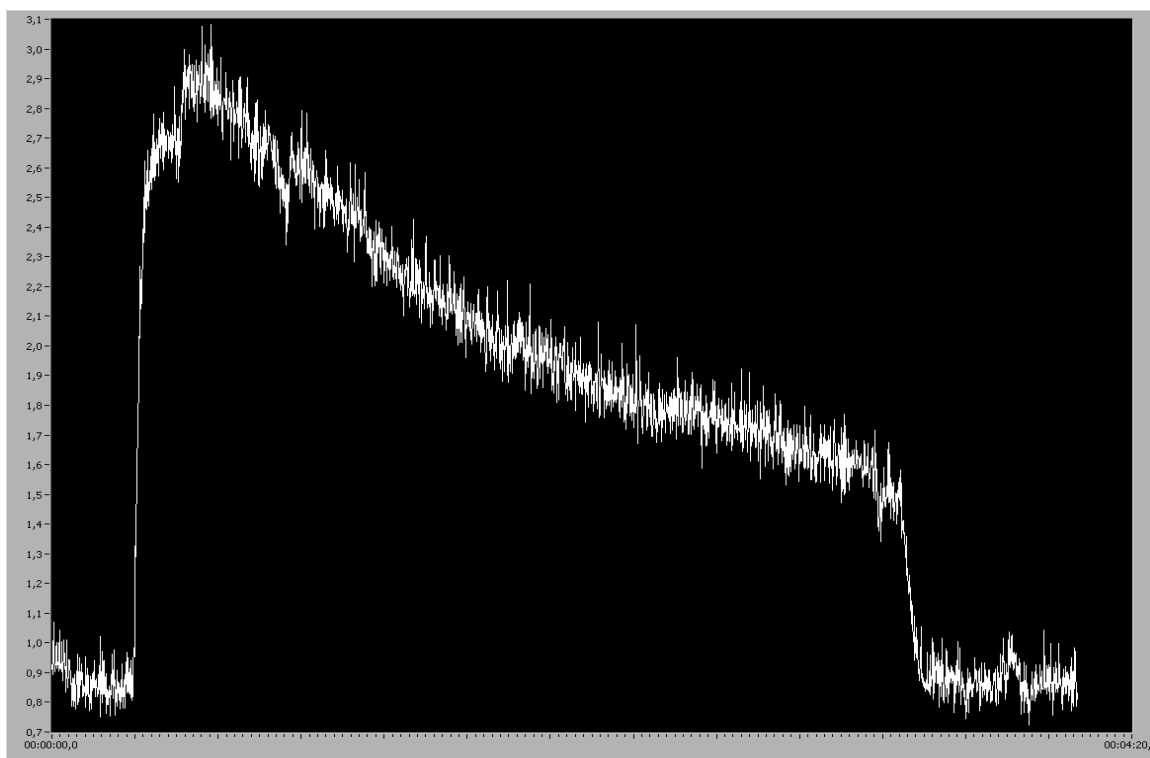
	1	2	3	$\bar{\phi}$	s	s_r [%]
výška píku	2,44	2,02	2,12	2,19	0,22	10,00
plocha pod píkem	239,93	228,32	226,16	231,47	7,41	3,20

Tab. č. 17: Chemiluminiscence v základním systému (0,3 mM peroxid vodíku, 150 μ M luminol, 20 mM hexakynoželezitan) – doba měření signálu 3 minuty

	1	2	3	$\bar{\phi}$	s	s_r [%]
výška píku	2,08	2,12	2,09	2,10	0,02	0,99
plocha pod píkem	229,93	234,00	232,01	231,98	2,04	0,88



Obr. č. 20: Ukázka záznamu měření s dithithreitolem s časovou pauzou 3 minuty (50 μ M DTT a základní systém), pracovní napětí 500 mV



Obr. č. 21: Ukázka záznamu měření – základní systém (0,3 mmol/l peroxid vodíku, 1 mmol/l luminol, 20 mmol/l hexakvanoželezitan draselný), pracovní napětí 500 mV

Z hodnot v tabulce č. 15 lze vysledovat, že parametrům základního systému s luminolem se nejvíce blíží měření s roztoky DTT o koncentracích 5 μ M a 5 mM. Velikost RSD při hodnocení výšky píku byla u všech měření menší než 4 %. Při hodnocení plochy píku se hodnoty RSD pohybovaly do 2 %. Měření s dithiothreitem ovlivnilo CL signál tak, že jen mírně zkracovalo délku dosvitu. Z hodnot v souhrnné tabulce je vidět, že průměrné hodnoty ploch pod píkem jednotlivých měření s roztoky DTT se významně neliší od průměrné hodnoty plochy pod píkem naměřené u základního systému s luminolem.

Z hodnot v tabulkách č. 15, 16 a 17 je podle hodnot relativních směrodatných odchylek vidět, že při časové pauze 180 s došlo u měření s roztokem DTT ke zvýšení velikosti RSD proti měření s nastavenou pauzou na 60 s. Naopak u měření se základním systémem (bez DTT) byly hodnoty RSD při časové pauze 180 s nižší. Při prodloužení délky časové pauzy na 3 minuty roztok DTT významně nezkracoval délku dosvitu, což je vidět podle podobných hodnot ploch pod píkem.

4.3. Vliv koncentrace Quantum Dots částic na plochu a výšku signálu, na délku dosvitu a opakovatelnost měření

Pro měření byly použity tyto roztoky: 0,3 mM peroxid vodíku, 1 mM luminol v 6 mM hydroxidu sodném, 20 mM hexakynoželezitan draselný a vodné roztoky Quantum Dots částic. Byl testován vliv různého naředění roztoků QD částic vodou na chemiluminiscenční signál základního systému obsahujícího peroxid vodíku, luminol a hexakynoželezitan draselný. Pracovní napětí detektoru bylo nastaveno na 420 mV. CL signál byl hodnocen po dobu jedné minuty, po uplynutí této doby byl obsah detekční cely odstraněn do odpadu – což odpovídá poklesu chemiluminiscenčního signálu na základní hladinu.

4.3.1. Quantum Dots částice s emisním maximem při 520 nm

Měření bylo provedeno s pracovními roztoky Quantum Dots částic, které byly připraveny naředěním vodou postupem I-III. Emisní maximum QD částic bylo 520 nm. Výsledky měření byly porovnány s naměřenými hodnotami u základního systému s luminolem, který neobsahoval QD částice.

Tab. č. 18: Vliv Quantum Dots částic připravených naředěním postupem I

	1	2	3	\emptyset	s	s _r [%]
výška píku	3,79	3,78	3,66	3,74	0,06	1,58
plocha pod píkem	29,16	27,96	28,59	28,57	0,49	1,72

Tab. č. 19: Vliv Quantum Dots částic připravených naředěním postupem II

	1	2	3	\emptyset	s	s _r [%]
výška píku	4,14	4,11	4,04	4,10	0,04	1,02
plocha pod píkem	57,02	56,46	56,07	56,52	0,39	0,69

Tab.č. 20: Vliv Quantum Dots částic připravených naředěním postupem III

	1	2	3	\emptyset	s	s _r [%]
výška píku	4,02	4,13	4,06	4,07	0,05	1,12
plocha pod píkem	65,56	65,54	64,76	65,29	0,37	0,57

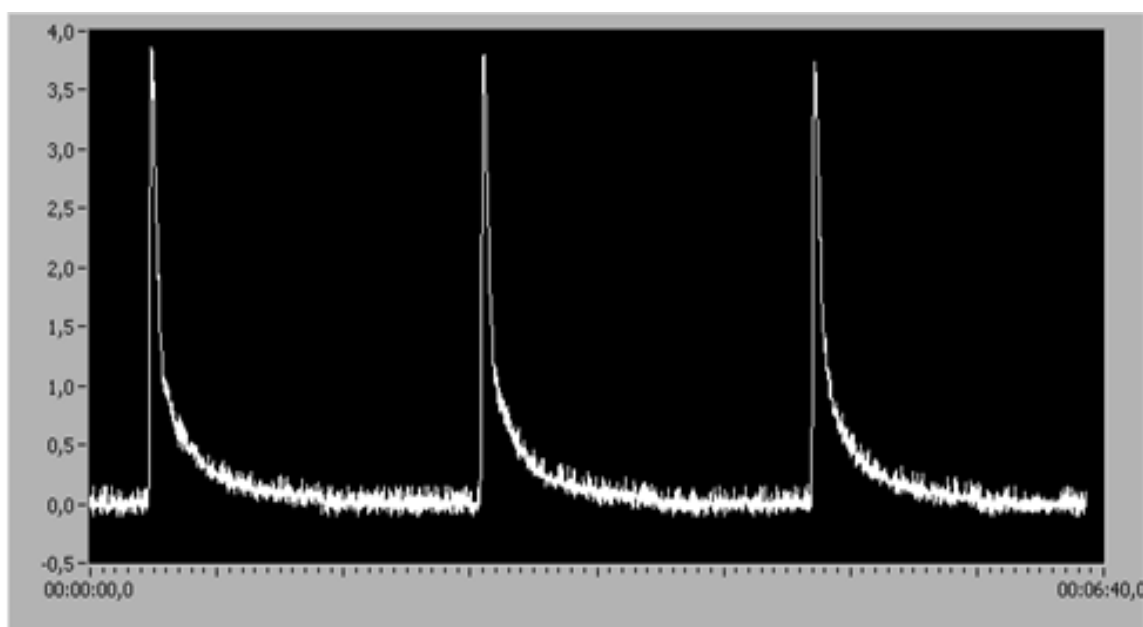
Tab. č. 21: Chemiluminiscence v základním systému (0,3 mM peroxid vodíku, 1mM luminol, 20 mM hexakynoželezitan)

	1	2	3	$\bar{\phi}$	s	s_r [%]
výška píku	4,1	3,95	4,26	4,10	0,13	3,08
plocha pod píkem	67,87	68,58	68,8	68,42	0,40	0,58

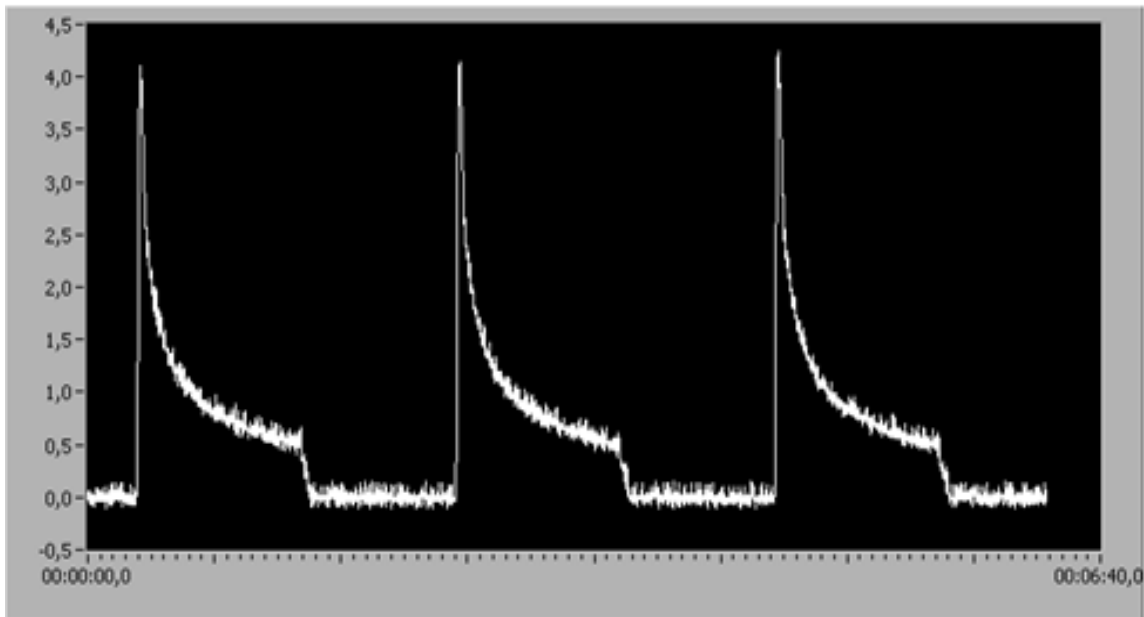
Tab. č. 22: Vyhodnocení vlivu naředěných Quantum Dots částic s emisním maximem 520 nm na plochu a výšku signálu – souhrnná tabulka

ředění	výška píku ($\bar{\phi}$)	s	s_r [%]	plocha ($\bar{\phi}$)	s	s_r [%]	n/p [%]
I	3,74	0,06	1,58	28,57	0,49	1,72	- 58,10
II	4,10	0,04	1,02	56,52	0,39	0,69	- 17,39
III	4,07	0,05	1,12	65,29	0,37	0,57	- 4,57
zs	4,10	0,13	3,08	68,42	0,40	0,58	-

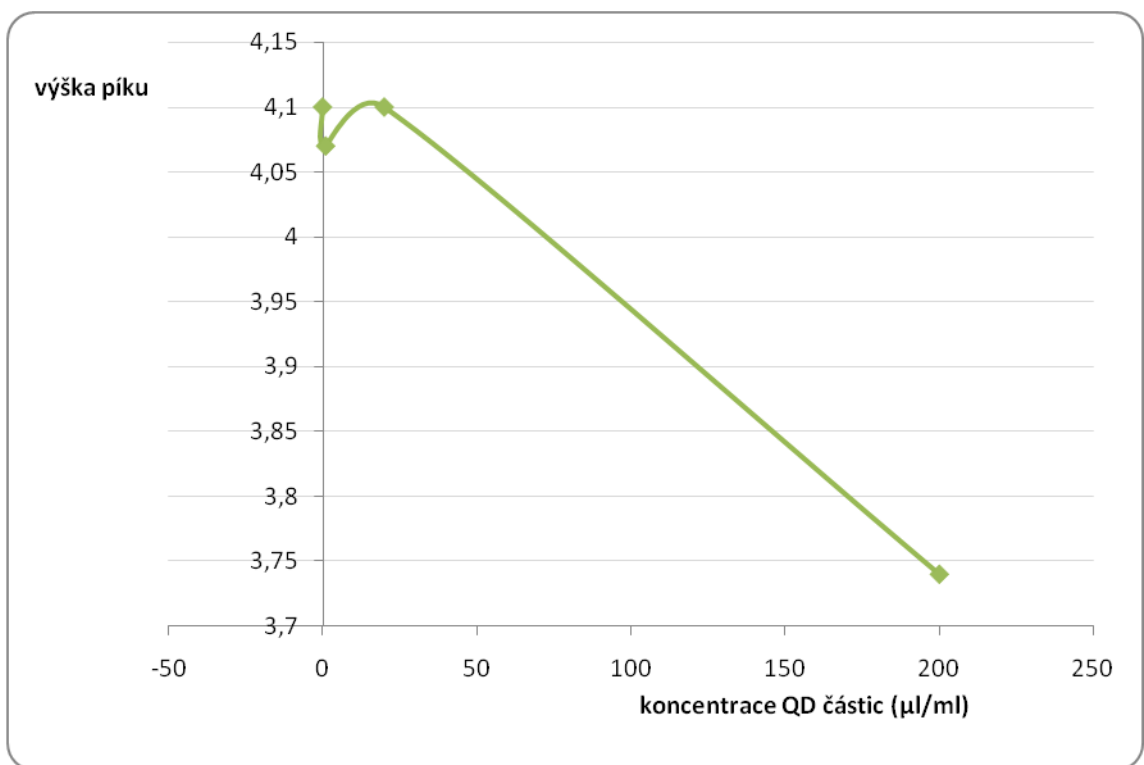
*(c – koncentrace, $\bar{\phi}$ – průměrná hodnota plochy a výšky píku, s – směrodatná odchylka, s_r – relativní směrodatná odchylka, n/p – nárůst resp. pokles plochy pod píkem proti základnímu systému, zs – základní systém bez QD částic)



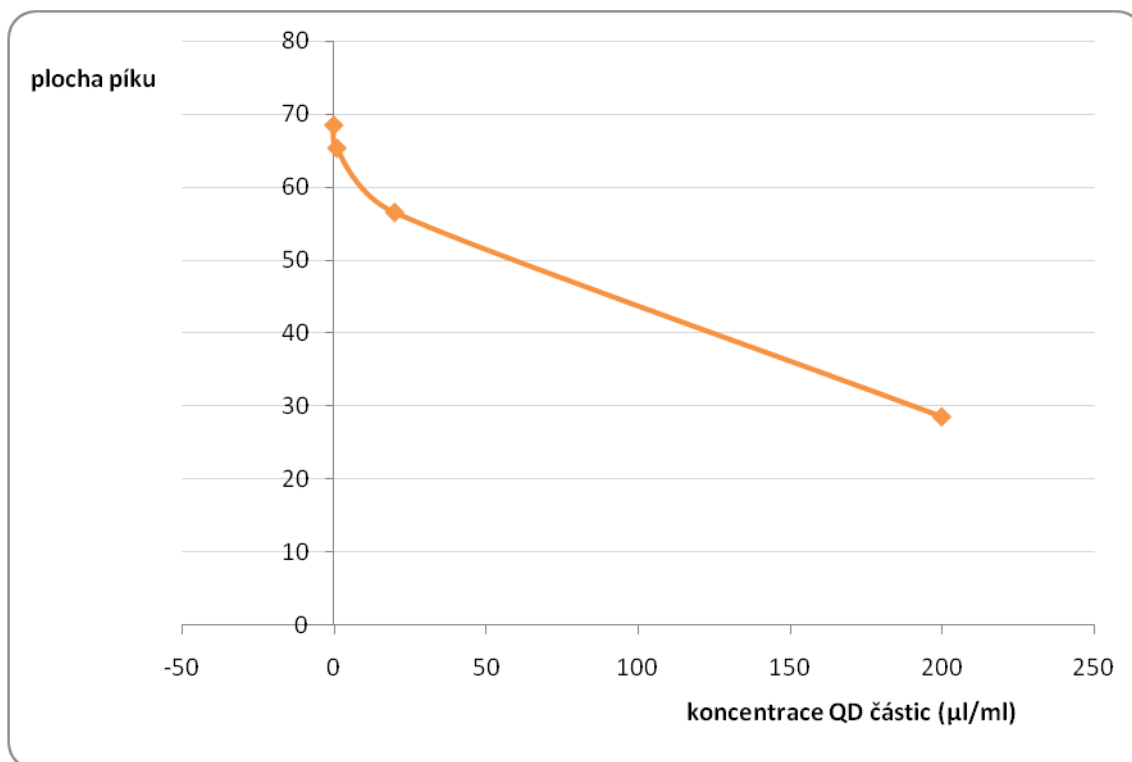
Obr. č. 22: Ukázka záznamu měření s Quantum Dots částicemi s emisním maximem 520 nm (QD částice naředěné postupem I a základní systém), pracovní napětí 420 mV



Obr. č. 23: Ukázka záznamu měření – základní systém (0,3 mM peroxid vodíku, 1 mM luminol, 20 mM hexakyanoželezitan draselný), pracovní napětí 420 mV



Obr. č. 24: Závislost výšky CL signálu na ředění Quantum Dots částic s emisním maximem 520 nm v základním systému s luminolem



Obr. č. 25: Závislost plochy CL signálu (hodnocené po dobu 60 s) na ředění Quantum Dots částic s emisním maximem 520 nm v základním systému s luminolem

Hodnoty v tabulce č. 22 znázorňují, že parametrům základního systému, který obsahoval roztoky peroxidu vodíku, luminolu a hexakynoželezitanu draselného, se nejvíce blíží měření s roztokem QD částic, který byl připraven naředěním postupem III. Velikost RSD při hodnocení výšky píku byla u všech měření menší než 4 %. Při hodnocení plochy píku se hodnoty RSD pohybovaly od 0,57 do 1,72 %. Z hodnot ploch pod píkem je zřetelné, že koncentrovanější roztoky QD částic ovlivnily CL signál tak, že značně zkracovaly délku dosvitu.

4.3.2. Quantum Dots částice s emisním maximem při 575 nm

Měření bylo provedeno s pracovními roztoky Quantum Dots částic, které byly připraveny naředěním vodou postupem I-III. Emisní maximum QD částic bylo 575 nm. Výsledky měření byly porovnány s naměřenými hodnotami u základního systému s luminolem, který neobsahoval QD částice.

Tab. č. 23: Vliv Quantum Dots částic připravených naředěním postupem I

	1	2	3	\emptyset	s	s_r [%]
výška píku	3,35	3,23	3,41	3,33	0,07	2,25
plocha píku	33,7	32,86	32,72	33,09	0,43	1,31

Tab. č. 24: Vliv Quantum Dots částic připravených naředěním postupem II

	1	2	3	\emptyset	s	s_r [%]
výška píku	3,94	3,9	3,89	3,91	0,02	0,55
plocha píku	52,63	52,82	53,07	52,84	0,18	0,34

Tab. č. 25: Vliv Quantum Dots částic připravených naředěním postupem III

	1	2	3	\emptyset	s	s_r [%]
výška píku	3,97	3,89	3,93	3,93	0,03	0,83
plocha píku	72,09	72,81	71,68	72,19	0,47	0,65

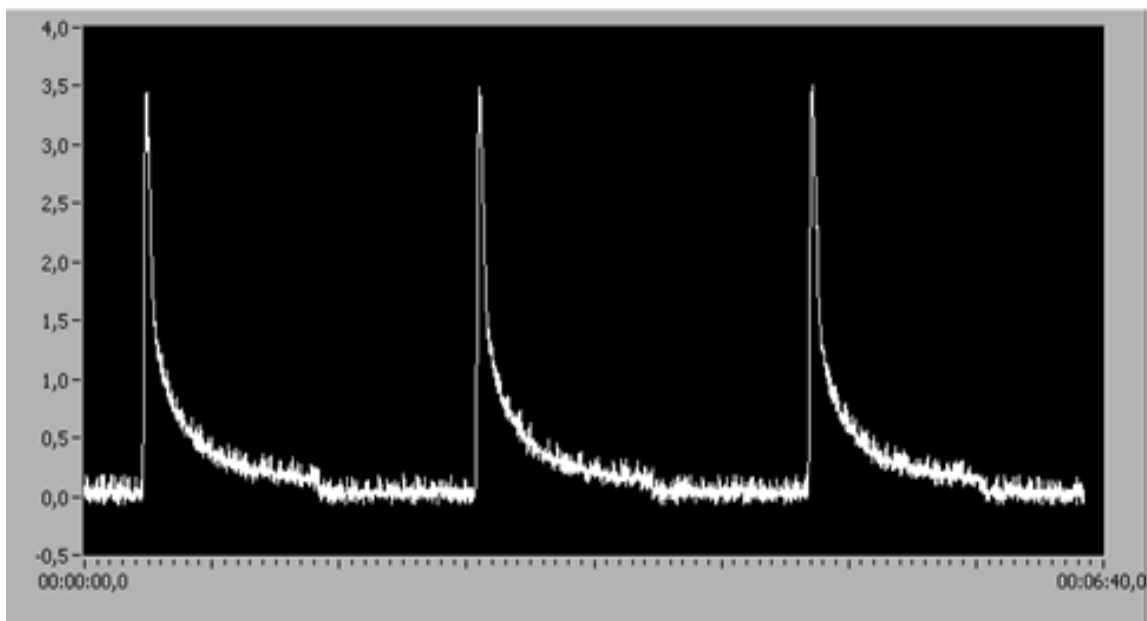
Tab. č. 26: Chemiluminiscence v základním systému (0,3 mM peroxid vodíku, 1mM luminol, 20 mM hexakvanoželezitan)

	1	2	3	\emptyset	s	s_r [%]
výška píku	4,1	3,95	4,26	4,10	0,13	3,08
plocha píku	67,87	68,58	68,8	68,42	0,40	0,58

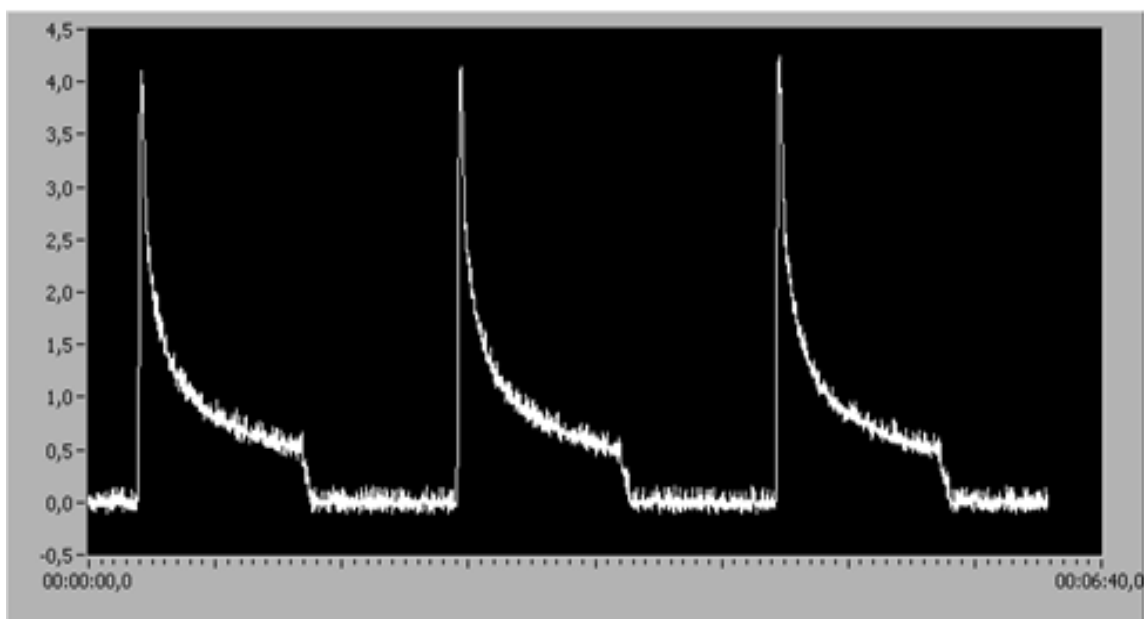
Tab. č. 27: Vyhodnocení vlivu naředěných Quantum Dots částic s emisním maximem 575 nm na plochu a výšku signálu – souhrnná tabulka

ředění	výška píku (\emptyset)	s	s_r [%]	plocha (\emptyset)	s	s_r [%]	n/p [%]
I	3,33	0,07	2,25	33,09	0,07	1,31	- 51,63
II	3,91	0,02	0,55	52,84	0,02	0,34	- 22,77
III	3,93	0,03	0,83	72,19	0,47	0,65	+ 5,51
zs	4,10	0,13	3,08	68,42	0,40	0,58	-

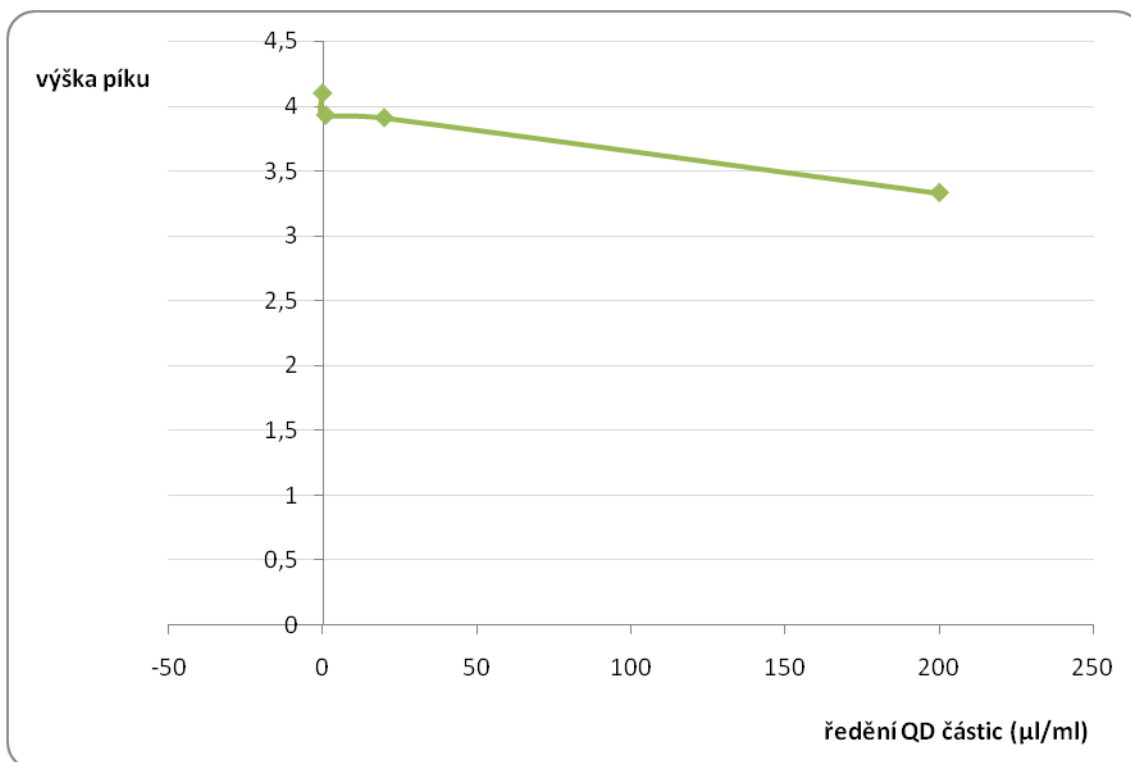
*(c – koncentrace, \emptyset – průměrná hodnota plochy a výšky píku, s – směrodatná odchylka, s_r – relativní směrodatná odchylka, n/p – nárůst resp. pokles plochy pod píkem proti základnímu systému, zs – základní systém bez QD částic)



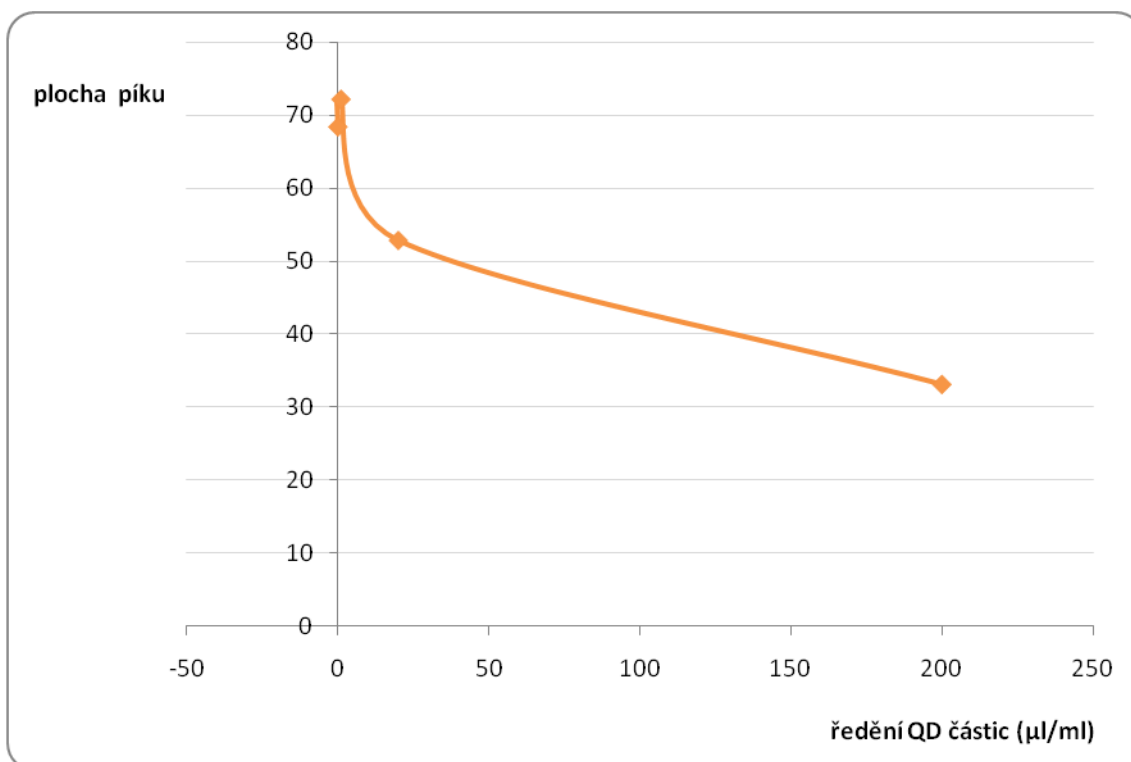
Obr. č. 26: Ukázka záznamu měření s *Quantum Dots* částicemi s emisním maximem 575 nm (QD částice nařaděné postupem III a základní systém), pracovní napětí 420 mV



Obr. č. 27: Ukázka záznamu měření – základní systém (0,3 mM peroxid vodíku, 1 mM luminol, 20 mM hexakynoželezitan draselný), pracovní napětí 420 mV



Obr. č. 28: Závislost výšky CL signálu na ředění Quantum Dots částic s emisním maximem 575 nm v základním systému s luminolem



Obr. č. 29: Závislost plochy CL signálu (hodnocené po dobu 60 s) na ředění Quantum Dots částic s emisním maximem 575 nm v základním systému s luminolem

Z hodnot v tabulce č. 27 je zřejmé, že parametrům základního systému s luminolem, se také nejvíce blíží měření s roztokem QD částic, který byl připraven naředěním postupem III – průměrná hodnota plochy píku dokonce mírně přesáhla průměrnou hodnotu plochy píku naměřenou u základního systému. Při hodnocení výšky píku byla velikost RSD u všech měření menší než 4 %. Při hodnocení plochy píku se hodnoty RSD pohybovaly od 0,34 do 1,31 %. Čím méně je roztok QD částic naředěn, tím více klesá hodnota plochy pod píkem. CL signál je tedy opět ovlivněn ve smyslu zkrácení doby dosvitu.

4.3.3. Quantum Dots částice s emisním maximem při 603 nm

Měření bylo provedeno s pracovními roztoky Quantum Dots částic, které byly připraveny naředěním vodou postupem I-III. Emisní maximum QD částic bylo 603 nm. Výsledky měření byly porovnány s naměřenými hodnotami u základního systému s luminolem, který neobsahoval QD částice.

Tab. č. 28: Vliv Quantum Dots částic připravených naředěním postupem I

	1	2	3	∅	s	s _r [%]
výška píku	1,98	1,88	1,89	1,92	0,04	2,35
plocha píku	17,93	17,38	16,9	17,40	0,42	2,42

Tab. č. 29: Vliv Quantum Dots částic připravených naředěním postupem II

	1	2	3	∅	s	s _r [%]
výška píku	2,34	2,41	2,41	2,39	0,03	1,38
plocha píku	41,06	40,95	40,55	40,85	0,22	0,54

Tab.č. 30: Vliv Quantum Dots částic připravených naředěním postupem III

	1	2	3	∅	s	s _r [%]
výška píku	2,51	2,47	2,49	2,49	0,02	0,66
plocha píku	47,5	45,02	45,06	45,86	1,16	2,53

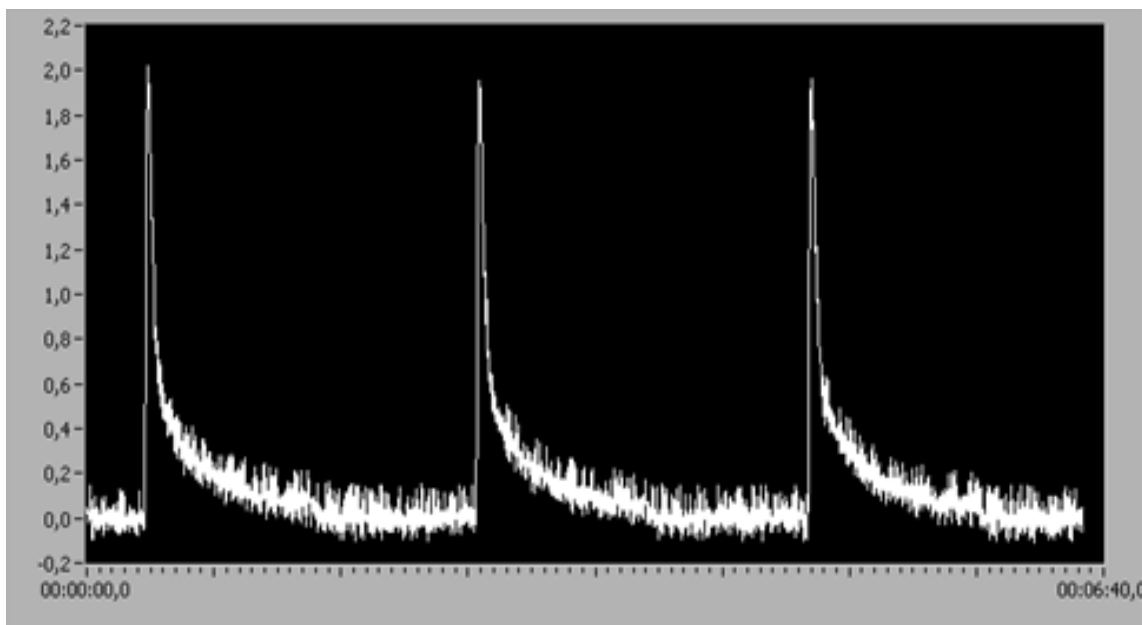
Tab. č. 31: Chemiluminiscence v základním systému (0,3 mM peroxid vodíku, 1mM luminol, 20 mM hexakynoželezitan)

	1	2	3	\emptyset	s	s_r [%]
výška píku	2,73	2,7	2,8	2,74	0,04	1,53
plocha píku	51,4	49,67	49,53	50,20	0,85	1,69

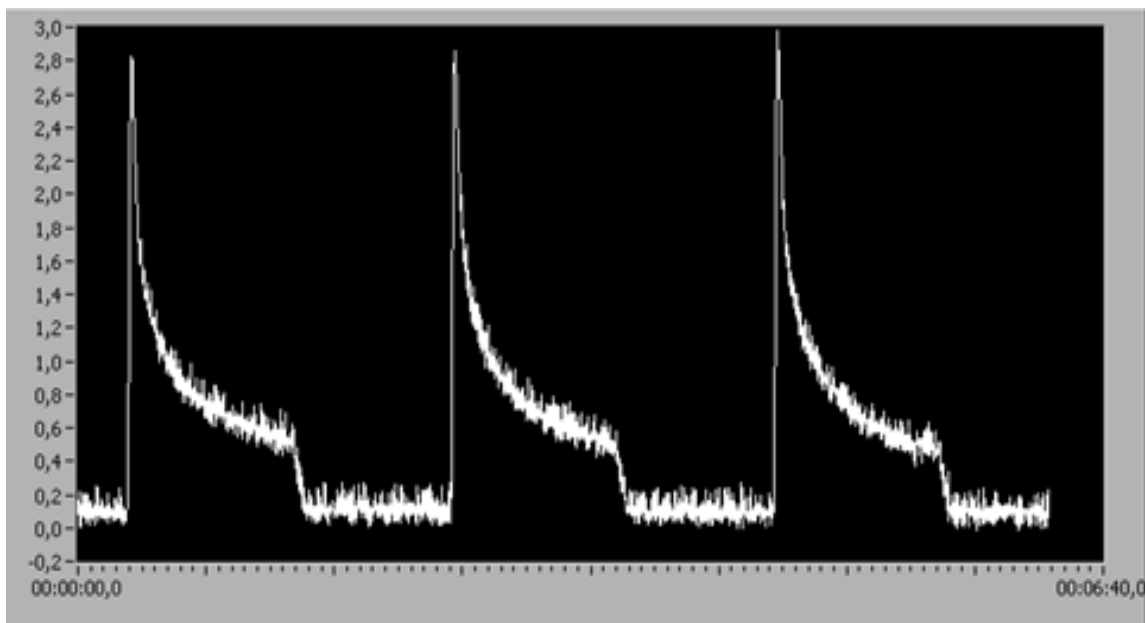
Tab. č. 32: Vyhodnocení vlivu naředěných Quantum Dots částic s emisním maximem 603 nm na plochu a výšku signálu – souhrnná tabulka

ředění	výška píku (\emptyset)	s	s_r [%]	plocha (\emptyset)	s	s_r [%]	n/p [%]
I	1,92	0,04	2,35	17,40	0,42	2,42	- 65,33
II	2,39	0,03	1,38	40,85	0,22	0,54	- 18,62
III	2,49	0,02	0,66	45,86	1,16	2,53	- 8,65
zs	2,74	0,04	1,53	50,20	0,85	1,69	-

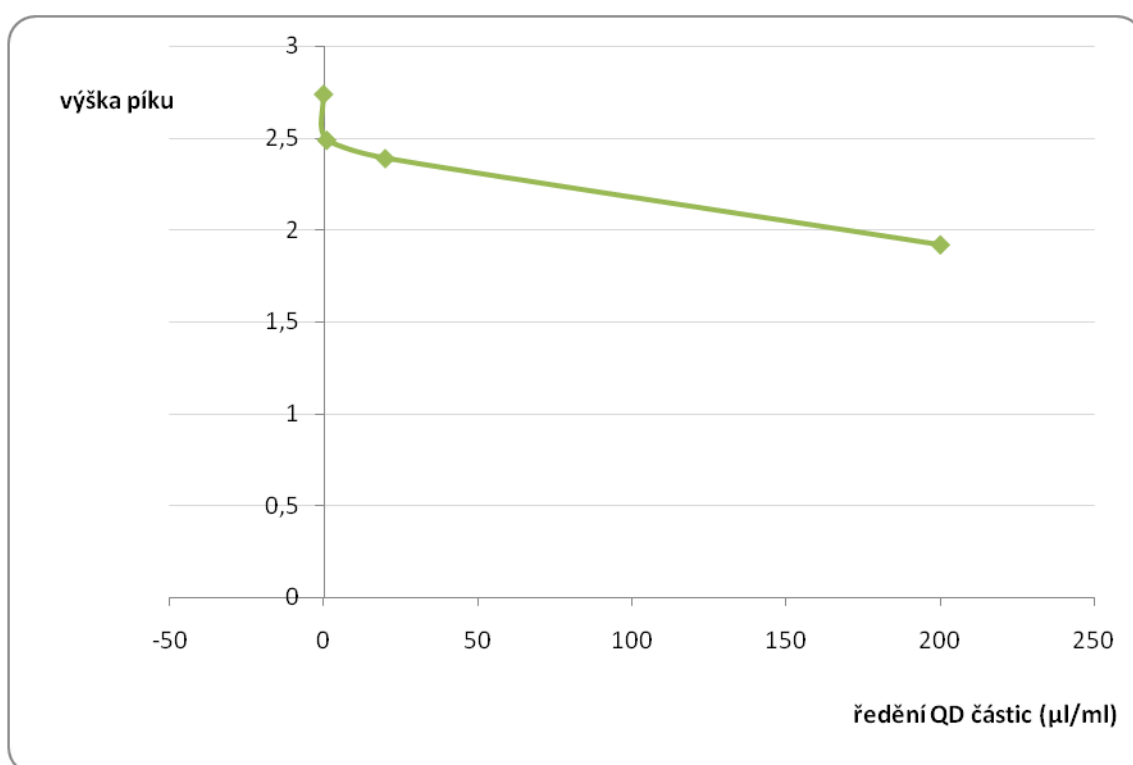
*(c – koncentrace, \emptyset – průměrná hodnota plochy a výšky píku, s – směrodatná odchylka, s_r – relativní směrodatná odchylka, n/p – nárůst resp. pokles plochy pod píkem proti základnímu systému, zs – základní systém bez QD částic)



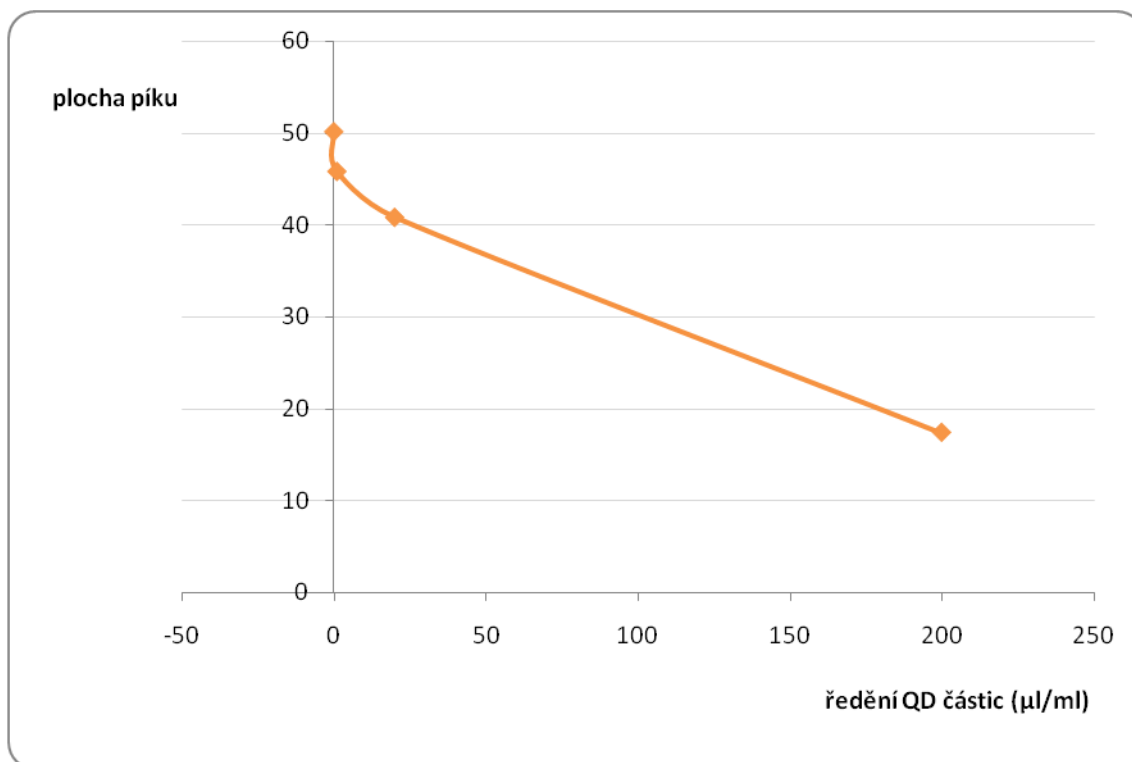
Obr. č. 30: Ukázka záznamu měření s Quantum Dots částicemi s emisním maximem 603 nm (QD částice naředěné postupem I a základní systém), pracovní napětí 420 mV



Obr. č. 31: Ukázka záznamu měření – základní systém (0,3 mM peroxid vodíku, 1 mM luminol, 20 mM hexakynoželezitan draselný), pracovní napětí 420 mV



Obr. č. 32: Závislost výšky CL signálu na ředění Quantum Dots částic s emisním maximem 603 nm v základním systému s luminolem



Obr. č. 33: Závislost plochy CL signálu (hodnocené po dobu 60 s) na ředění Quantum Dots částic s emisním maximem 603 nm v základním systému s luminolem

Z hodnot v tabulce č. 32 je zřejmé, že parametrům základního systému obsahujícího roztoky peroxidu vodíku, luminolu a hexakynoželezitanu draselného, se opět nejvíce blíží měření s roztokem QD částic, který byl připraven naředěním postupem III. Při hodnocení výšky píku byla velikost RSD u všech měření menší než 3 %. Při hodnocení plochy píku se hodnoty RSD pohybovaly od 0,54 do 2,53 %. Čím méně je roztok QD částic naředěn, tím více klesá hodnota plochy pod píkem. CL signál je tedy ovlivněn ve smyslu zkrácení doby dosvitu. Nejvíce naředěný roztok QD částic zkracoval délku dosvitu jen mírně, avšak nejméně naředěný roztok QD částic (roztok I) délku dosvitu zkracoval značně.

4.3.4. Quantum Dots částice s emisním maximem při 636 nm

Měření bylo provedeno s pracovními roztoky Quantum Dots částic, které byly připraveny naředěním vodou postupem I-III. Emisní maximum QD částic bylo 636 nm. Výsledky měření byly porovnány s naměřenými hodnotami u základního systému s luminolem, který neobsahoval QD částice.

Tab. č. 33: Vliv Quantum Dots částic připravených naředěním postupem I

	1	2	3	\emptyset	s	s_r [%]
výška píku	1,86	1,93	1,9	1,90	0,03	1,51
plocha píku	17,61	17,55	17,65	17,60	0,04	0,23

Tab. č. 34: Vliv Quantum Dots částic připravených naředěním postupem II

	1	2	3	\emptyset	s	s_r [%]
výška píku	2,42	2,48	2,5	2,47	0,03	1,38
plocha píku	42,66	42,44	42,73	42,61	0,12	0,29

Tab. č. 35: Vliv Quantum Dots částic připravených naředěním postupem III

	1	2	3	\emptyset	s	s_r [%]
výška píku	2,64	2,57	2,52	2,58	0,05	1,91
plocha píku	49,22	47,78	48,5	48,50	0,59	1,21

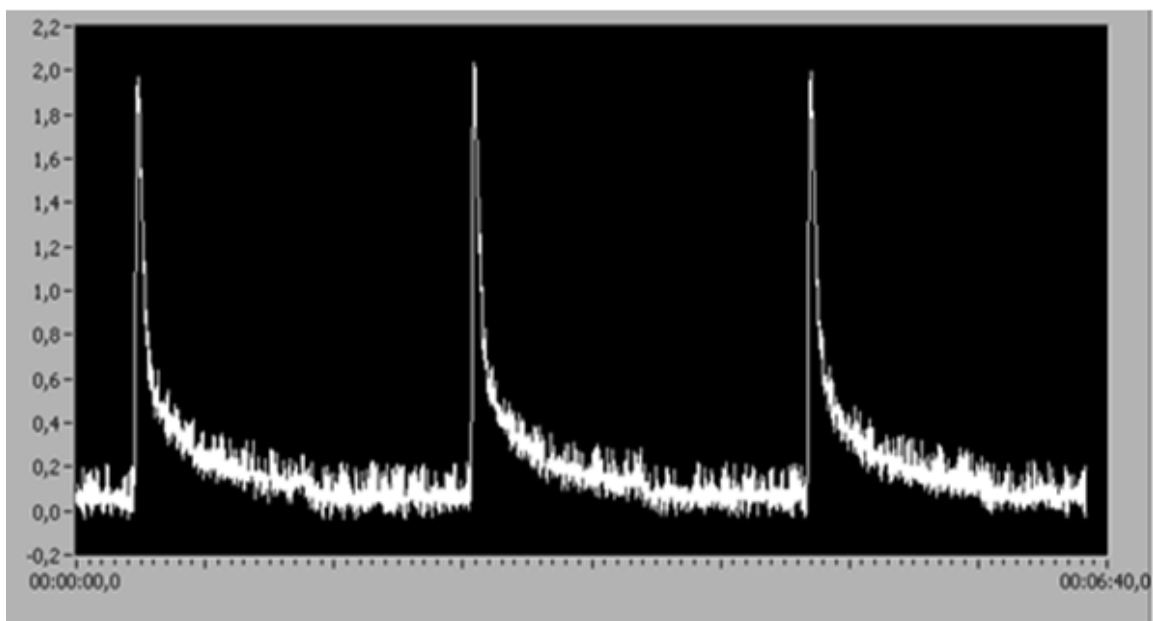
Tab. č. 36: Chemiluminiscence v základním systému (0,3 mM peroxid vodíku, 1mM luminol, 20 mM hexakynoželezitan)

	1	2	3	\emptyset	s	s_r [%]
výška píku	2,73	2,7	2,8	2,74	0,04	1,53
plocha píku	51,4	49,67	49,53	50,20	0,85	1,69

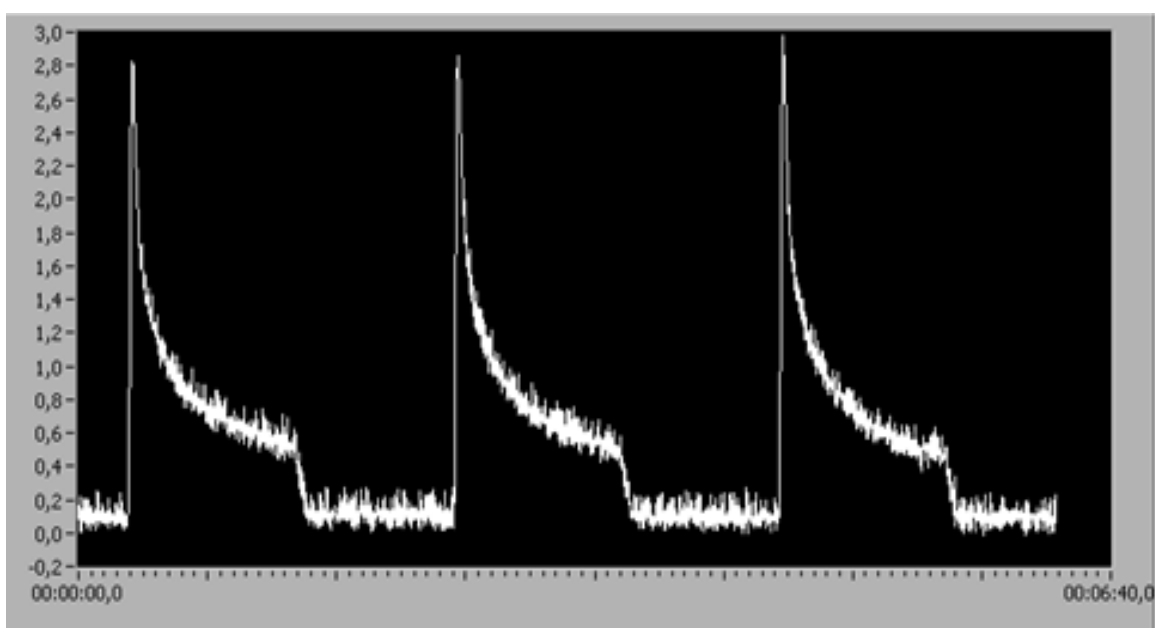
Tab. č. 37: Vyhodnocení vlivu naředěných Quantum Dots částic s emisní maximem 636 nm na plochu a výšku signálu – souhrnná tabulka

ředění	výška píku (\emptyset)	s	s_r [%]	plocha (\emptyset)	s	s_r [%]	n/p [%]
I	1,90	0,03	1,51	17,60	0,04	0,23	- 64,94
II	2,47	0,03	1,38	42,61	0,12	0,29	- 15,12
III	2,58	0,05	1,91	48,50	0,59	1,21	- 3,39
zs	2,74	0,04	1,53	50,20	0,85	1,69	-

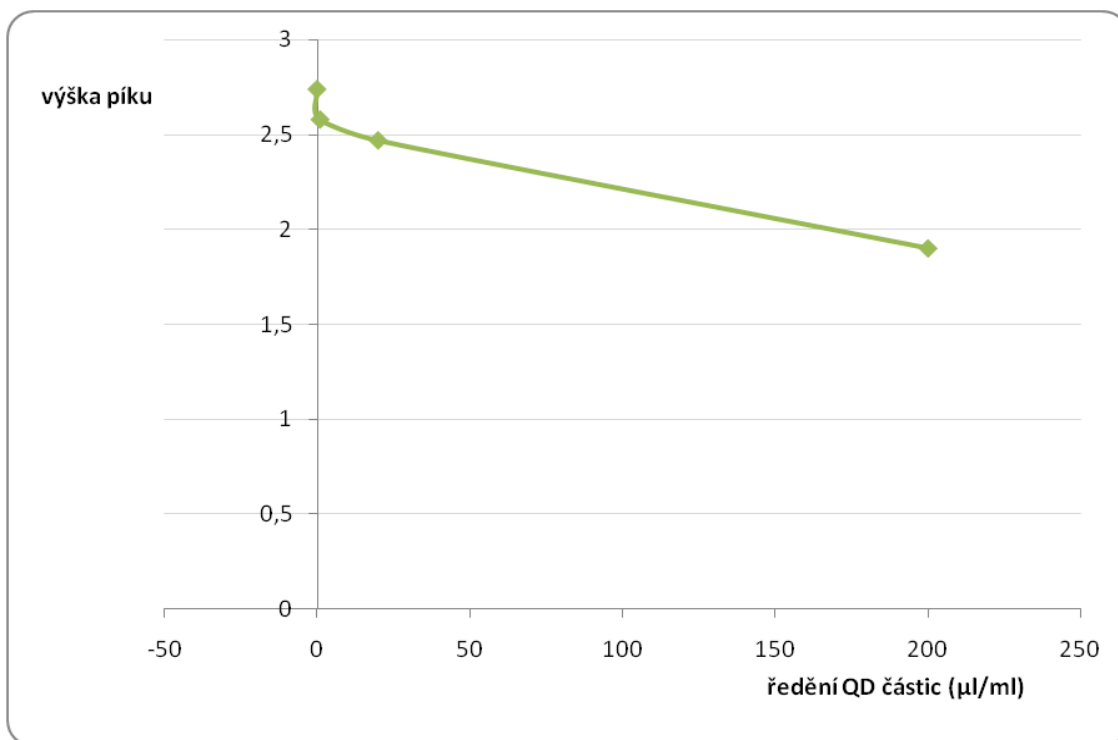
*(c – koncentrace, \emptyset – průměrná hodnota plochy a výšky píku, s – směrodatná odchylka, s_r – relativní směrodatná odchylka, n/p – nárůst resp. pokles plochy pod píkem oproti základnímu systému, zs – základní systém bez QD částic)



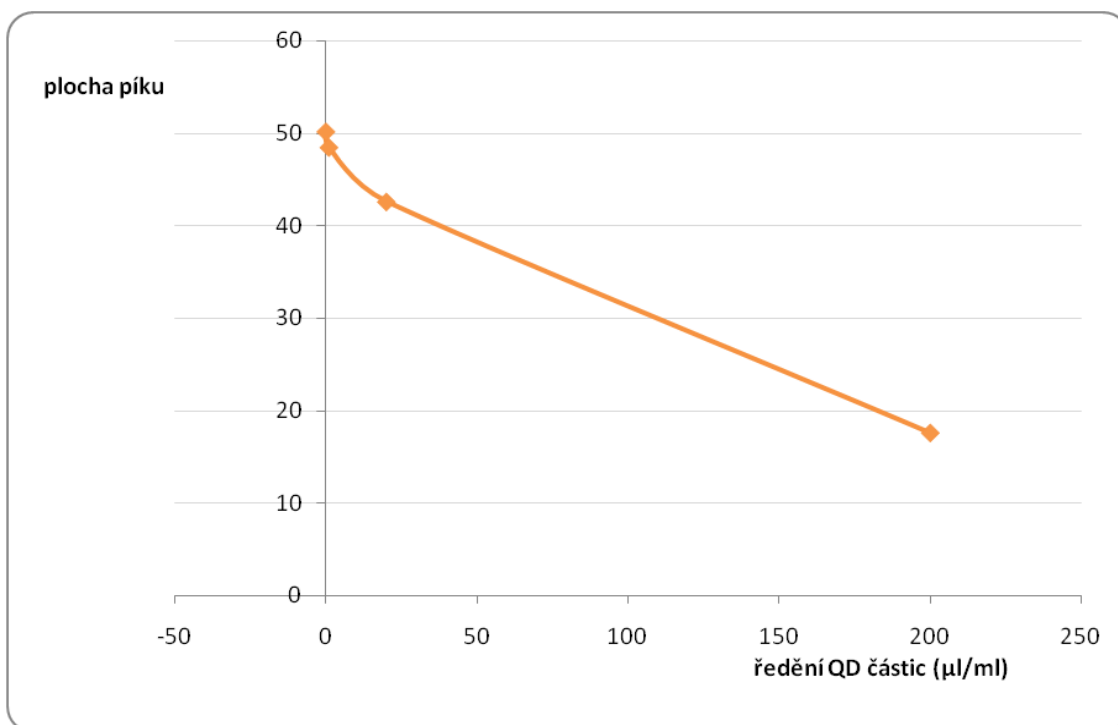
Obr. č. 34: Ukázka záznamu měření s *Quantum Dots* částicemi s emisním maximem 636 nm (QD částice nařaděné postupem I a základní systém), pracovní napětí 420 mV



Obr. č. 35: Ukázka záznamu měření – základní systém (0,3 mM peroxid vodíku, 1 mM luminol, 20 mM hexakynoželezitan draselný), pracovní napětí 420 mV



Obr. č. 36: Závislost výšky CL signálu na ředění Quantum Dots částic s emisním maximem 636 nm v základním systému s luminolem



Obr. č. 37: Závislost plochy CL signálu (hodnocené po dobu 60 s) na ředění Quantum Dots částic s emisním maximem 636 nm v základním systému s luminolem

Hodnoty v tabulce č. 37 ukazují, že parametrům základního systému s luminolem se nejvíce blíží měření s roztokem QD částic, který byl připraven naředěním postupem III. Velikost RSD při hodnocení výšky píku byla u všech měření

menší než 2 %. Při hodnocení plochy píku se hodnoty RSD pohybovaly od 0,23 do 1,69 %. Podobně jako u předchozích měření bylo z hodnot ploch pod píkem zřetelné, že méně naředěné roztoky QD částic ovlivňovaly CL signál tak, že značně zkracovaly délku dosvitu.

Tab. č. 38: Procentuální nárůst/ pokles plochy pod píkem při měření s QD částicemi (520, 575, 603 a 636 nm) připravenými naředěním postupem I-III proti základnímu systému – souhrnná tabulka

	ředění	emisní maximum QD částic [nm]			
		520	575	603	636
nárůst/ pokles plochy pod píkem [%]	I	- 58,10	- 51,63	- 65,33	- 64,94
	II	- 17,39	- 22,77	- 18,62	- 15,12
	III	- 4,57	+ 5, 51	- 8,65	- 3,39

U všech používaných QD částic byly získány obdobné výsledky. Ze souhrnné tabulky č. 38 vyplývá, že největší pokles plochy pod píkem byl zaznamenán u QD částic, které byly naředěny postupem I a dosahoval hodnot od 51,63 do 65,33 % v porovnání se základním systémem. U QD částic naředěných postupem II byl tento pokles nižší a jeho hodnoty se pohybovaly od 17,39 do 22,77 %. Nejmenší hodnoty poklesu plochy pod píkem byly nalezeny u QD částic naředěných postupem III a tento pokles činil 3,39 % až 8,65 % proti základnímu systému. V případě částic s emisním maximem 575 nm bylo zaznamenáno nepatrné zvýšení CL signálu o 5,51 % ve srovnání se základním systémem.

Z pohledu různých emisních maxim QD částic lze z vypočítaných procentuálních poklesů usoudit, že hodnoty poklesů zůstaly téměř stejné a jejich vliv na vlnovou délku CL signálu luminolu v základním systému je podobný. CL signál byl proti základnímu systému mírně zesílen jen v jednom případě, a to u QD částic s emisním maximem 575 nm.

Aspirace Quantum Dots v průtokovém systému probíhá velmi dobře a nebylo pozorováno ani usazování těchto částic v SIA systému. QD částice by se mohly uplatnit v průtokovém systému v souvislosti s dobrou opakovatelností výsledků měření. Vliv na výšku CL signálu bude v případě systému s luminolem nutno dále testovat z pohledu QD částic s nižšími emisními maximy, které budou lépe odpovídat emisi záření v uvedeném systému, která je nejintenzivnější při 425 nm.

SOUHRN

V této diplomové práci byl nejprve studován CL systém podle japonského odborného článku (Kishikawa a kol. 2008, [13]). Japonští vědci s použitím HPLC metody navrhli nový CL systém, který obsahoval chinon, luminol, dithiothreitol a vytvořili tím senzitivní a selektivní CL stanovení pro některé látky s chinonovou strukturou. Úkolem této práce bylo reprodukovat výsledky měření uvedené japonské studie a pozorovat tento systém v podmínkách průtokového systému SIA za použití speciální detekční cely.

Byl testován CL systém, který obsahoval 1 μM roztok 9,10-fenantrenchinonu, 1mM roztok luminolu a 50 μM DTT, avšak nebyly shledány srovnatelné výsledky měření s japonskou studií. Chování tohoto CL systému bylo objasněno možným výskytem rušivých iontů v používané demineralizované vodě, dalším vysvětlením by mohlo být použití vody jako rozpouštědla pro přípravu DTT, ačkoliv původní roztok DTT (podle japonské studie) byl připraven pomocí organického rozpouštědla - acetonitrilu. V průtokovém systému by dlouhodobé používání tohoto rozpouštědla mohlo naleptat součásti aparatury SIA, zejména detekční cely, a naměřený signál by byl zkreslený.

Experimentální část byla dále zaměřena na studium vlivu fenantrenchinonu, dithiothreitolu a Quantum Dots částic na již odzkoušený CL systém, který obsahoval 0,3 mM roztok peroxidu vodíku, 1 mM roztok luminolu, 20 mM roztok hexakvanoželezitanu draselného, pro měření byla využita SIA metoda. Byl sledován vliv uvedených látek na výšku a plochu CL signálu, na délku dosvitu a na opakovatelnost měření. Testováním se zjistilo, že roztoky těchto studovaných látek měly spíše negativní vliv na používaný CL systém ve smyslu zmenšení velikosti plochy pod píkem a zkrácení doby dosvitu.

Naproti tomu při prodloužení délky sledování CL signálu na 180 s roztok DTT významně nezkracoval délku dosvitu, ale zároveň docházelo ke zhoršení opakovatelnosti (ve srovnání s měřením po dobu 60 s). Vliv na výšku CL signálu bude v případě systému s luminolem nutno dále testovat z pohledu QD částic s nižšími emisními maximy, které budou lépe odpovídat emisi záření v uvedeném systému, která je nejintenzivnější při 425 nm.

5. ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byly obecně charakterizovány vlastnosti chinonů a Quantum Dots částic, dále byl přiblížen princip a aplikace průtokové metody SIA. Potřebné informace pro teoretickou část byly získány z české, převážně však ze zahraniční odborné literatury, k vyhledávání článků z vědeckých časopisů byla použita databáze ScienceDirect a SpringerLink.

Tato diplomová práce se zabývala odborným článkem, kde autoři Kishikawa a kol. představili nový CL systém, který obsahoval chinon, luminol a dithiothreitol. Tento systém byl odzkoušen v podmínkách SIA systému, výsledky měření se však s touto studií neshodovali. Experimentální část se dále pomocí průtokové metody SIA věnovala studiu chemiluminiscenčních reakcí v CL systému, který obsahoval peroxid vodíku, luminol a hexakynoželezitan draselný, a také studiem vlivu fenantrenchinonu, dithiothreitolu a QD částic na uvedený chemiluminiscenční systém. Roztoky studovaných látek fenantrenchinonu a DTT neměly výrazný pozitivní vliv na používaný CL systém. Roztoky QD částic by se mohly uplatnit v průtokovém systému v souvislosti s dobrou opakovatelností výsledků měření.

6. SEZNAM LITERATURY

- [1] ZIMA T.: Laboratorní diagnostika, Galén Karolinum, Praha 2007
- [2] KUPKOVÁ Z., BENEŠ L.: Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého, Chem. Listy 98 (2004) 116-122
- [3] http://fch.upol.cz/skripta/zfcm_pred/3_luminiscence.pdf (únor 2011)
- [4] SKLÁDAL P., Biosenzory, Masarykova univerzita v Brně, Brno 2002
- [5] MERVARTOVÁ K, POLÁŠEK M., CALATAYUD M. J.: Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals, J. of Pharm. Biomed. Anal. 45 (2007) 367-381
- [6] TOMANOVÁ H.: Diplomová práce – Chemiluminiscenční detekce antioxidantů metodou sekvenční injekční analýzy (SIA), Farmaceutická fakulta v Hradci Králové UK v Praze, Hradec Králové 2005
- [7] BARNI F., SIMON W., LEWIS B., BERTI A., MISKELLY M. G., LAGO A. G.: Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection, Talanta 72 (2007) 896-913
- [8] <http://www.vscht.cz/anl/lach2/FLUORO.pdf> (březen 2011)
- [9] OTRUBA P., KAŇOVSKÝ P.: Periferní neuropatie jako nežádoucí účinek statinů, Klin. Farmakol. Farm. 20 (2006) 41-42
- [10] TEKIN D. E., ERKOC S.: Structural and electronic features of the ubiquinone and ubiquinol molecules: molecular dynamics and quantum chemical treatments, Molecular Simulation 36 (2010) 763-771
- [11] FOJTÍK P., URBAN O., FALT P., NOVOSAD P.: Výživa a sekundární osteoporóza, Centrum péče o zažívací trakt - Vítkovická nemocnice, a. s. Ostrava, Mediekos a. s. - Osteologické centrum Zlín, Interní Med. 11 (2009) 561-568
- [12] <http://www.osteoporosis-vitamins.com/vitamin-K2.html> (březen 2011)
- [13] KISHIKAWA N., OHKUBO N., OHYAMA K., NAKASHIMA K., KURODA N.: Chemiluminescence assay for quinones based on generation of reactive oxygen species through the redox cycle of quinone, Anal. Bioanal. Chem. 393 (2008) 1337-1343
- [14] STEINBERG F., STITES E. T., ANDERSON P., STORMS D., CHAN I., GHBALI S., RUCKER R.: Pyrroloquinoline Quinone Improves Growth and Reproductive Performance in Mice Fed Chemically Defined Diets, Exp. Biol. Med. 228 (2003) 160-166

- [15] CHOI O., KIM J., KIM G-J., JEONG Y., MOON S. J., PARK S. CH., HWANG I.: Pyrroloquinoline Quinone Is a Plant Growth Promotion Factor Produced by *Pseudomonas fluorescens* B16, *Plant. Physiol.* 146 (2008) 657-668
- [16] ROHÁČEK K, SOUKUPOVÁ J.: Fluorescence, fotosyntéza a stress: jak to spolu souvisí?, <http://archiv.otevrenaveda.cz/> (březen 2011)
- [17] AHMED S., KISHIKAWA N., OHYAMA K., MAKIC T., KUROSAKID H., NAKASHIMA K., KURODA N.: An ultrasensitive and highly selective determination method for quinones by high-performance liquid chromatography with photochemically initiated luminol chemiluminescence, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 3977-3984
- [18] KRČMOVÁ I., NOVOSAD J.: Bronchiální astma – praktické aspekty, Ústav klinické imunologie a alergologie – Fakultní nemocnice Hradec Králové, *Interní Med.* 12 (2010) 196-199
- [19] KISHIKAWA N., OHKUBO N., OHYAMA K., NAKASHIMA K., KURODA N.: Selective determination of ubiquinone in human plasma by HPLC with chemiluminescence reaction based on the redox cycle of quinone, *Anal. Bioanal. Chem.* 2 (2011) 381-385
- [20] AHMED S., KISHIKAWA N., NAKASHIMA K., KURODA N.: Determination of vitamin K homologues by high-performance liquid chromatography with on-line photoreactor and peroxyoxalate chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta* 22 (2007) 148-54
- [21] PÉREZ-RUIZ T., MARTÍNEZ-LOZANO C., TOMÁS V., MARTÍN J.: Determination of ATP via the photochemical generation of hydrogen peroxide using flow injection luminol chemiluminescence detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 189-194
- [22] PÉREZ-RUIZ T., MARTÍNEZ-LOZANO C., TOMÁS V., MARTÍN J.: Flow-injection chemiluminescence determination of DNA based on a photochemical reaction, *Anal. Chim. Acta* 402 (1999) 13-19
- [23] YAMASHOJI S., ASAKAWA A., KAWASAKI S., KAWAMOTOC S.: Chemiluminescent assay for detection of viable microorganisms, *Anal. Biochem.* 333 (2004) 303-308
- [24] CHO K. A., STEFANO D. E., YING Y., RODRIGUEZ CH., SCHMITZ A. D., KUMAGAI Y., MIGUEL H. A., FERNANDEZ-EIGUREN A., KOBAYASHI T., AVOL E., FROINES J.: Determination of Four Quinones in Diesel Exhaust Particles, SRM 1649a, and Atmospheric PM_{2,5}, *Aerosol Sci. Tech.* 38 (2004) 68-81
- [25] SVOBODOVÁ I., HEZINOVÁ V, LIŠKOVÁ M., MADĚRÁNKOVÁ D., PŘIKRYL J., KLEPÁRNÍK, K., FORET F.: Příprava, fyzikálně-chemické vlastnosti a využití nanočástic v bioanalýze, Ústav analytické chemie AV ČR, Nanocon Brno 2009

- [26] KUBÍNEK R.: Nanotechnologie a jejich aplikace, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2010
- [27] KRÁL V., OTOLA J., NEUWIRTH P., KEJÍK Z., ZÁRUBA K., MARTÁSEK P.: Nanomedicína – současný stav a perspektivy: Velký potenciál nebo jen módní slogan?, Chem. Listy 100 (2006) 4-9
- [28] The future of fluorescence Qdot[®] nanocrystal technology, Invitrogen 2008, www.invitrogen.com (březen 2011)
- [29] QD Technocolour Displays are here (QDTV[™]), Nanoco Technologies Ltd, Manchester, UK 13 February 2009, www.nanocotechnologies.com (březen 2011)
- [30] FRASCO F. M., CHANIOTAKIS N., Bioconjugated quantum dots as fluorescent probes for bioanalytical applications, Anal. Bioanal. Chem. 396 (2010) 229-240
- [31] PASEKOVÁ H., POLÁŠEK M., SOLICH P.: Sekvenční injekční analýza, Chem. Listy 93 (1999) 354-359
- [32] TZANAVARAS P., ECONOMOU A., ZACHARIS C., THEMELIS D.: Sequential Injection Analysis: The second generation of Flow injection techniques, SciTopics, 2009, http://www.scitopics.com/Sequential_Injection_Analysis.html (duben 2011)
- [33] KUBÁŇ V., DOČEKAL B., HEITMANN U., ČERNOHORSKÝ T., DVORSKÝ M., KREJČOVÁ A., KOMÁREK J., RYCHLOVSKÝ P., ATAMAN O. Y., DĚDINA J., PELCOVÁ P., ČERVENKA A. R., ARRUDA M. A. Z.: Inovace v atomové absorpční a fluorescenční spektroskopii, VŠCHT Praha, Praha 2007, <http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/Inovace.pdf> (duben 2011)
- [34] <http://www.flowinjection.com/flowinjection/> (březen 2011)
- [35] SKLENÁŘOVÁ H., SVOBODA A., SOLICH P., POLÁŠEK M., KARLÍČEK R.: Simple laboratory-made automated sequential injection analysis (SIA) device II. SIA operational software based on LabVIEW programming language, Instrum. Sci. Technol. 30 (2002) 353-360
- [36] DRBOHLAVOVÁ J., ADAM V., KÍZEK R., HUBÁLEK J.: Quantum Dots - characterization, preparation and usage in biological systems, Int. J. Mol. Sci. 10 (2009) 656-673