

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Simultánní analýza kvantových teček pomocí tištěných senzorů  
s bismutovým nebo antimonovým filmem

Bc. Jan Zelený

Diplomová práce

2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jan Zelený**  
Osobní číslo: **C16470**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Simultánní analýza kvantových teček pomocí tištěných senzorů s bismutovým nebo antimonovým filmem**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

#### Teoretická část:

Vypracovat teoretickou rešerši o přípravě a využití elektrod s pracovní elektrodou modifikovanou kovovým filmem (bismutovým nebo antimonovým). V části zabývající se přípravou modifikovaných elektrod popsat způsoby tvorby filmů, in situ, ex situ, ze zaměřením na tištěné senzory a případně na možnost tvorby filmu v průtočné cele. Další část by měla obsahovat informace o kvantových tečkách a jejich elektrochemické detekci (anodická rozpouštěcí voltametrie). Poslední hlavní část teoretické rešerše by měla obsahovat informace o aplikacích filmových elektrod nejen pro analýzu těžkých kovů, ale zejména analýzu kvantových teček a možnostech simultánní analýzy více kovů a kvantových teček na bismutových a antimonových filmových elektrodách.

#### Experimentální část:

Square wave anodická rozpouštěcí voltametrie jednotlivých kovových iontů a jejich směsi.  
Tvorba in situ a ex situ filmů bismutu, antimonu, případně jejich kombinace.  
Analýza kvantových teček na připravených filmových elektrodách.  
Tvorba filmů na elektrodách v mikroprůtokovém uspořádání s následnou analýzou směsi prvků a kvantových teček.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

Vedoucí diplomové práce:

**RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním mé práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 10.5.2018

.....

Bc. Jan Zelený

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí mé diplomové práce RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. a konzultantce Mgr. Anetě Kovářové za odborné vedení, cenné rady, profesionální a pozitivní přístup, jak při práci v laboratoři, tak při samotném zpracování diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat doc. Ing. Janě Drbohlavové, Ph.D. z výzkumného centra CEITEC v Brně, za poskytnutí kvantových teček použitých v této práci.

Hlavní poděkování patří zejména mé rodině a přítelkyni Janě, za trpělivost a neutuchající podporu po celou dobu mého studia.

## **ANOTACE**

Cílem této diplomové práce byla analýza kvantových teček pomocí tištěných senzorů s uhlíkovou pracovní elektrodou, na které byl v rámci této diplomové práce vytvořen bismutový nebo antimonový film. V počátečních experimentech jsme se zaměřili na analýzu iontů kovů, které jsou využívány při syntéze kvantových teček. Ionty byly analyzovány individuálně i ve směsích s použitím zmíněných elektrod. Po analýzách iontů kovů jsme přistoupili k analýze kvantových teček, které byly rovněž analyzovány samostatně i ve směsích. Vhodné kvantové tečky byly následně použity jako elektroaktivní značka sekundárních protilátek pro konstrukci imunosenzoru pro detekci AFP. Takto připravený konjugát byl následně použit pro označení imunokomplexu primární protilátka – antigen a elektrochemickou detekcí kovových iontů uvolněných z kvantových teček působením kyseliny byla možná detekce antigenu ve vzorku. Detekční metodou zde byla anodická rozpouštěcí voltametrie. Cílem analýzy iontů kovů, samotných kvantových teček a následně sestavení celého imunosenzoru bylo nalezení nejvhodnější varianty elektrody pro detekci finálního imunosenzoru tvořeného primárními anti-AFP protilátkami (IgG) imobilizovanými na magnetických částicích,  $\alpha$ -fetoproteinem (AFP) jako cílovým analytem a konjugátem tvořeným sekundárními kvantovými tečkami značenými anti-AFP protilátkami (IgG).

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

anodická rozpouštěcí voltametrie, tištěné uhlíkové elektrody, bismutový film, antimonový film, kvantové tečky,  $\alpha$ -fetoprotein

## **TITLE**

Simultaneous analysis of quantum dots using screen-printed electrodes modified with bismuth or antimony film

## **ANNOTATION**

The goal of this thesis was analysis of quantum dots using screen-printed carbon electrodes modified with bismuth or antimony film. First experiments were targeted on analysis of metal ions, which are used in a quantum dots synthesis. Ions were analyzed individually and in mixtures with the use of beforementioned electrodes. After analysis of metal ions, we started an analysis of quantum dots, which were also analyzed individually and in mixtures. Appropriate quantum dots were afterwards used as an electroactive mark of secondary antibodies for an immunosensor construction for an AFP detection. This prepared conjugate was afterwards used for linking an immunocomplex of primary antibody – antigen and by the electrochemical detection of metal ions released from dissolved quantum dots by an acid, the detection of the antigen in a sample was possible. Used detection method was an anodic stripping voltammetry. The goal of the metal ions and quantum dots analysis, and afterwards creating a whole immunosensor, was to find the most suitable type of an electrode for the detection of the final immunosensor consisting of primary anti-AFP antibodies (IgG), which are immobilized on magnetic particles,  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) as target analyt, and conjugate consisting of secondary anti-AFP antibodies (IgG) linked by quantum dots.

## **KEYWORDS**

anodic stripping voltammetry, screen-printed carbon electrodes, bismuth film, antimony film, quantum dots,  $\alpha$ -fetoprotein

## SEZNAM ZKRATEK

SV	rozpouštěcí voltametrie (stripping voltammetry)
ASV	anodická rozpouštěcí voltametrie (anodic stripping voltammetry)
SPEs	tištěné elektrody (screen-printed electrodes)
SPCEs	tištěné elektrody s uhlíkovou pracovní elektrodou (screen-printed carbon electrodes)
CNTs	uhlíkové nanotrubičky (carbon nanotubes)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
QDs	kvantové tečky (quantum dots)
TOP/TOPO	trioktylfosfin/trioktylfosfinoxid (trioctylphosphine/trioctylphosphine oxide)
MPA	merkaptopropionová kyselina (mercaptopropionic acid)
PEG	polyethylenglykol (polyethyleneglycol)
GSH	glutathion (glutathione)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide)
S-NHS	N-hydroxysulfosuccinimid (N-hydroxysulfosuccinimide)
CRP	C reaktivní protein (C reactive protein)
QLISA	kvantovými tečkami značená imunoanalýza (quantum dot-linked immunosorbent assay)
BC	hovězí kasein (bovine casein)
IgG	imunoglobulin G (immunoglobulin G)
HE4	lidský epididymální protein 4 (human epididymis protein 4)
AFP	$\alpha$ -fetoprotein (alpha fetoprotein)



## OBSAH

<b>0 ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>13</b>
1.1 Elektrochemie .....	13
1.2 Rozpouštěcí voltametrie.....	13
1.3 Pastové uhlíkové elektrody .....	14
1.3.1 Elektrody ze skelného uhlíku .....	14
1.3.2 Modifikace pastových uhlíkových elektrod a elektrod ze skelného uhlíku kovovým filmem .....	15
1.4 Tištěné elektrody v elektroanalytické chemii .....	20
1.4.1 Současné využití tištěných elektrod .....	21
1.4.2 Konstrukce tištěných elektrod.....	21
1.4.3 Modifikace povrchu uhlíkové pracovní elektrody .....	24
1.5 Tištěné elektrody s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou bismutovým filmem .....	25
1.5.1 Tvorba bismutového filmu na tištěných elektrodách.....	26
1.5.2 Využití tištěných elektrod modifikovaných bismutem .....	26
1.6 Tištěné elektrody s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou antimonovým filmem .....	30
1.6.1 Tvorba antimonového filmu.....	30
1.6.2 Využití tištěných elektrod modifikovaných antimonovým filmem .....	31
1.7 Kvantové tečky .....	36
1.7.1 Výroba kvantových teček.....	37
1.7.2 Elektrochemická analýza kvantových teček na uhlíkových tištěných elektrodách s bismutovým nebo antimonovým filmem .....	39
<b>2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>45</b>
2.1 Přístroje a pomůcky .....	45
2.2 Elektrochemická analýza iontů kovů na tištěných tříelektrodo- senzorech .....	46
2.2.1 Elektrochemická analýza iontů kovů na tištěných tříelektrodo- senzorech se rtuťovým filmem.....	46
2.2.2 Elektrochemická analýza iontů kovů na tištěných tříelektrodo- senzorech DRP C-110 s <i>in situ/ex situ</i> vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem.....	47
2.2.3 Elektrochemická analýza iontů kovů na tištěných tříelektrodo- senzorech OHT-000 s <i>in situ/ex situ</i> vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem.....	49
2.3 Analýza kvantových teček na tištěných elektrodách s <i>in situ/ex situ</i> vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem .....	52
2.4 Konjugace protilátek s kvantovými tečkami.....	53

2.4.1	Neorientovaná vazba jedнокrokovou karbodiimidovou metodou .....	53
2.4.2	Orientovaná vazba po oxidaci protilátek pomocí jodistanu sodného.....	54
2.5	Imobilizace antigenu AFP nebo anti-AFP protilátek na magnetické částice .....	55
2.6	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE).....	56
2.7	Optimalizace ředění konjugátu anti-AFP <sup>QDs</sup> na tištěných elektrodách s <i>in situ</i> vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem .....	59
2.8	Elektrochemická detekce $\alpha$ -fetoproteinu na tištěných elektrodách s <i>in situ</i> vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem .....	60
<b>3</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>63</b>
3.1	Elektrochemická analýza iontů kovů na tištěných tříelektrodových senzorech .....	64
3.1.1	Analýza iontů kovů na tištěných elektrodách se rtuťovým filmem .....	64
3.1.2	Analýza iontů kovů na tištěných elektrodách DRP C-110 s <i>in situ/ex situ</i> vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem .....	67
3.1.3	Analýza iontů kovů na tištěných elektrodách OHT-000 s <i>in situ/ex situ</i> vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem .....	72
3.2	Analýza kvantových teček na tištěných elektrodách s <i>in situ/ex situ</i> vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem .....	75
3.3	Konjugace protilátek s kvantovými tečkami.....	81
3.4	Imobilizace antigenu AFP na magnetické částice.....	82
3.5	Optimalizace ředění konjugátu anti-AFP <sup>QDs</sup> na tištěných elektrodách s <i>in situ</i> vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem .....	83
3.6	Imobilizace anti-AFP protilátek na magnetické částice .....	86
3.7	Detekce $\alpha$ -fetoproteinu na tištěných elektrodách s <i>in situ</i> vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem .....	87
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>ZDROJE.....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>104</b>

## 0 ÚVOD

Elektroanalytické metody zastávají v analytické chemii významnou funkci. Pomocí těchto metod je možné analyzovat široké spektrum různých látek. Elektrochemické metody jsou v dnešní době často využívány v oblasti monitorování životního prostředí, sledování kvality potravin, léčiv a v neposlední řadě také v biomedicínských analýzách. Výhodou těchto metod je vysoká citlivost a selektivita pro látky nesoucí náboj.

Jako elektrody jsou stále častěji využívány miniaturizované tištěné senzory, které obsahují pracovní, referentní i pomocnou elektrodu v rámci jednoho kompletního senzoru. Tištěné elektrody, nejen na bázi uhlíku, jsou dnes komerčně dostupné v celé řadě modifikací, které je předurčují pro konkrétní aplikace. Pro zlepšení elektrochemických vlastností, nejen tištěných uhlíkových elektrod, je dlouhou dobu využívána rtuť v podobě tenkého filmu na povrchu pracovní elektrody. Z důvodu vysoké toxicity rtuti je v poslední době všeobecným zájmem omezení jejího používání nejen v elektroanalytické chemii. Na základě této skutečnosti se výzkum v posledních letech zaměřil na hledání jiné, méně toxické alternativy ke rtuti. V této souvislosti byly velmi dobré elektrochemické vlastnosti objeveny u bismutu a později antimonu. Právě bismut a antimon byly použity jako modifikátory pracovní uhlíkové elektrody tištěných senzorů testovaných v rámci této diplomové práce. Takto modifikované senzory byly aplikovány při analýze kvantových teček, které byly použity jako elektroaktivní značky sekundárních protilátek při sestavení imunosenzoru pro detekci  $\alpha$ -fetoproteinu (AFP). Celá metoda byla v tomto případě založena na izolaci antigenu ze vzorku pomocí magnetických částic s primárními protilátkami a následném označení imunokomplexu sekundárními protilátkami konjugovanými s kvantovými tečkami (konjugátem).

V současné době působí na trhu mnoho výrobců, kteří se zaměřují na vývoj kvantových teček pro široké spektrum aplikací. Pestrost aplikací kvantových teček je umožněna zejména díky modifikacím jejich obalu zanášením funkčních skupin, které následně reagují s funkčními skupinami daného analytu. Tímto způsobem je pak možné kvantovými tečkami specificky označit různé látky biologického původu, kterými mohou být antigenní struktury, enzymy, nukleové kyseliny či právě protilátky. Stanovení zmíněných látek je pak zprostředkováno detekcí kvantových teček. Jednou z možností detekce kvantových teček, která se nabízí je použití elektrochemických metod. Toto je dáno chemickou strukturou kvantových teček, kdy je jejich jádro tvořeno atomy různých kovů.

Hlavní náplní této diplomové práce byla analýza několika druhů kvantových teček na komerčně dodávaných tištěných senzorech s uhlíkovou pracovní elektrodou, jejíž povrch byl modifikován bismutovým nebo antimonovým filmem. Kvantové tečky byly následně použity pro označení sekundárních protilátek anti-AFP, které sloužily pro označení imunokomplexu primární protilátka anti-AFP imobilizovaná na magnetických částicích – antigen AFP ( $\alpha$ -fetoprotein) vychytaný ze vzorku.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Elektrochemie

Elektroanalytické techniky hrají v moderní analytické chemii významnou roli. Podstatou těchto technik je měření elektrických veličin, tedy proudu, potenciálu a náboje a sledování jejich změn ve vztahu k analyzované látce z chemického hlediska. Elektrochemie je v současné době využívána v řadě odvětví, počínaje monitorováním látek v životním prostředí, průmyslovou kontrolou kvality produktů, kvalitou potravin a také v biomedicínských analýzách [1, 2].

Základem elektroanalytických metod je elektrochemický článek, který se skládá alespoň ze dvou elektrod (vodičů) a kontaktního roztoku – analyzovaného vzorku (elektrolytu), kterým prochází proud. Jedna ze dvou elektrod reaguje na cílový analyt a tuto elektrodu označujeme jako pracovní. Druhá elektroda je definována jako referentní neboli srovnávací, jejíž potenciál se nemění v závislosti na přítomnosti a chemické povaze analyzované látky. V současnosti je prakticky ve všech elektroanalytických systémech přítomná i třetí elektroda, která se označuje jako pomocná (podpurná). Samotný elektrochemický děj probíhá tedy na rozhraní elektroda – elektrolyt a sledují se dané parametry. V elektroanalytické chemii se setkáváme se dvěma druhy měření: potenciometrickým a potenciostatickým [3, 4].

Velkou výhodou elektroanalytických metod je jejich vysoká citlivost, selektivita pro látky nesoucí náboj a poměrně nízké náklady na analýzu [1, 3].

## 1.2 Rozpouštěcí voltametrie

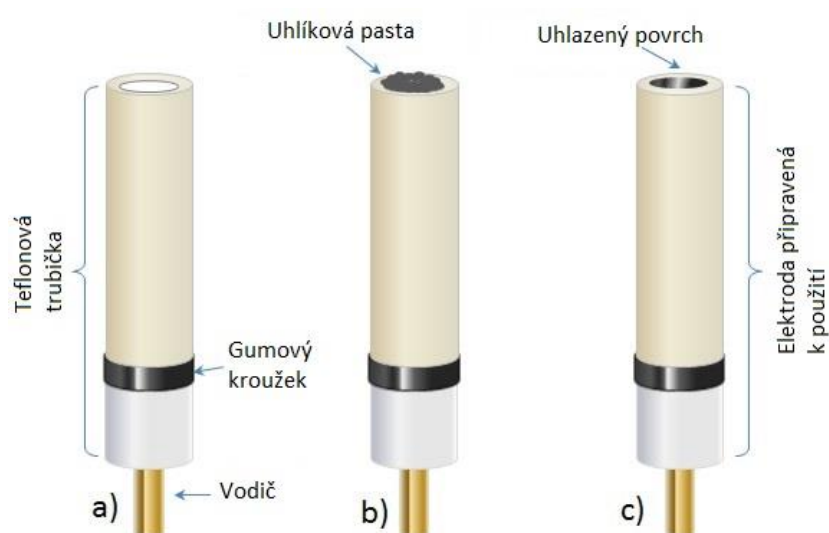
Rozpouštěcí voltametrie (SV, stripping voltammetry) je jedna z často používaných technik v elektrochemických analýzách. Podstatou této metody je stanovení analytu nesoucího náboj, který je elektrochemicky uvolněn z povrchu pracovní elektrody. Samotná analýza pomocí SV zahrnuje dva kroky: v prvním kroku dochází k nahromadění analyzované látky na povrchu pracovní elektrody (tzv. elektrodepozice). V dalším kroku dochází k elektrochemickému rozpouštění látky (reoxidaci) z povrchu pracovní elektrody a zaznamenává se změna procházejícího proudu při tomto ději. Citlivost této techniky je až  $10^{-10}$  M [5, 6].

V praxi existují dva druhy rozpouštěcí voltametrie – anodická a katodická. Předmětem této práce je využití zejména anodické rozpouštěcí voltametrie (ASV, anodic stripping voltammetry) v elektroanalýze. Podstatou této metody je redukce kovových kationtů, které se

vyloučí na povrchu pracovní elektrody v podobě tenkého kovového filmu. Následně je tento film z povrchu elektrody anodicky rozpouštěn a přechází do roztoku v iontové podobě [6, 7].

### 1.3 Pastové uhlíkové elektrody

První použití uhlíku v elektroanalytické chemii se datuje do poloviny minulého století, kdy Ralph N. Adams v roce 1958 sestrojil jakýsi analog Heyrovského polarografie využívající visící rtuťovou kapku, s tím rozdílem, že Adams chtěl nahradit rtuť uhlíkem [8]. Výroba uhlíkových pastových elektrod je založena na přípravě dvousložkové směsi tvořené uhlíkovým práškem (spektroskopický grafit) a pojivem (například parafinový olej). Takto vytvořená pasta je homogenizována a tvoří základ takzvaně nemodifikované uhlíkové pastové elektrody. Pastu je možné rovněž modifikovat dalšími složkami (například bismut, antimon apod.) za účelem zlepšení elektrochemických vlastností elektrody nebo pro lepší rozlišovací schopnost pro analyzovaný vzorek [9, 10]. Vytvořenou pastou je následně plněna zpravidla teflonová nebo skleněná trubice (Obr. 1), která zajišťuje konstantní reakční povrch definovaný vnitřním průměrem trubice vyplněné pastou. Kvalitu připravené pastové uhlíkové elektrody ovlivňuje, jak výběr složek pasty a pojiv, jejich homogenizace, tak i plnění trubice. Při samotné analýze je pak zásadní „otření“ – tedy obnova povrchu pracovní elektrody před dalším měřením. Obnova reakčního povrchu spočívá ve vytlačení pasty z těla elektrody pístem a následném otření a vyhlazení [11 – 14].



Obr. 1: Schéma přípravy uhlíkové pastové elektrody. (převzato a upraveno z: [15])

#### 1.3.1 Elektrody ze skelného uhlíku

Zvláštním druhem materiálu použitým při konstrukci uhlíkových elektrod je skelný uhlík. Jedná se o asymetrické částice monolitického negrafitujícího uhlíku o velikosti několika

mikrometrů, které jsou smíseny s plastifikátorem (parafinový olej, silikonový olej). Podstatou výroby skelného uhlíku je pyrolýza termosetových polymerů, které mají vytvořenou trojrozměrnou strukturní síť. Následná karbonizace probíhá běžně při 800 °C až 1200 °C (výjimečně, v závislosti na budoucí aplikaci, až 3000 °C). Skelný uhlík vykazuje vyšší elektrochemickou reaktivitu, širší potenciálové okno (zejména pak v anodické oblasti) a nízký zbytkový proud. K dalším výhodám, podobně jako u klasických uhlíkových pastových elektrod, patří nízké finanční náklady na výrobu, snadná příprava a použití, možnosti modifikace a snadno obnovitelný reakční povrch. Skelný uhlík je prakticky nepropustný pro plyny a kapaliny a vyznačuje se vysokou tvrdostí. Díky své struktuře je možné jej vyleštit téměř do zrcadlového lesku a zajistit tak minimální nerovnosti reakčního povrchu, s čímž přímo souvisí kvalita výstupního signálu [13, 16, 17].

### **1.3.2 Modifikace pastových uhlíkových elektrod a elektrod ze skelného uhlíku kovovým filmem**

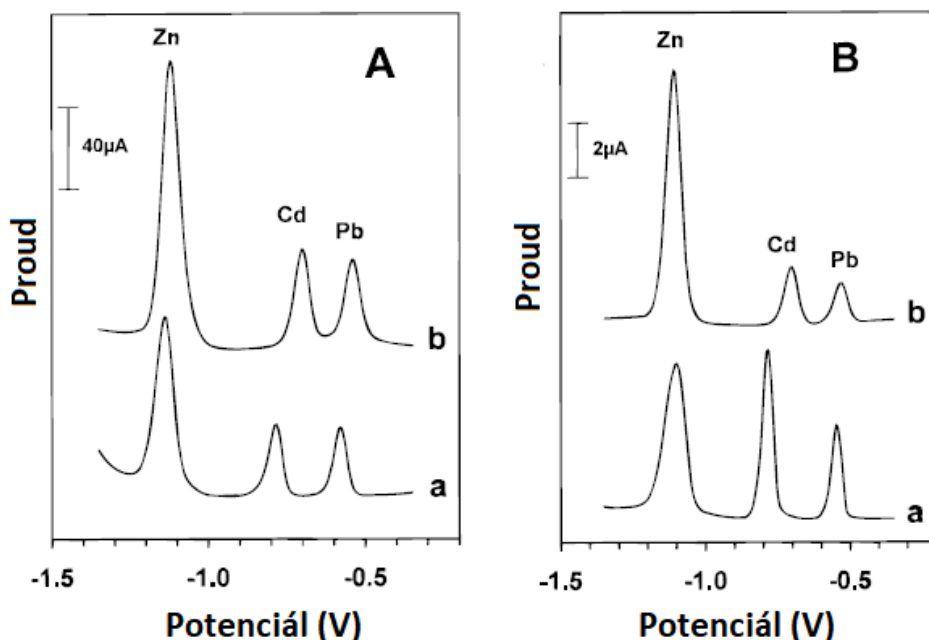
Modifikace uhlíkových pastových elektrod a elektrod ze skelného uhlíku umožňuje kvalitnější a přesnější analýzu. Uhlíkové pasty a elektrody ze skelného uhlíku představují jeden z nejvhodnějších materiálů pro přípravu modifikovaných elektrod. Při modifikaci se uplatňují nejčastěji dva hlavní postupy. První spočívá v přidání modifikátoru přímo do pasty při její výrobě a její homogenizaci. V případě druhého postupu dochází k vytvoření filmu na povrchu pracovní elektrody elektrodepozicí z roztoku obsahujícího modifikátor v iontové podobě. Při modifikaci pracovní elektrody bývala první volbou rtuť. Rtuť je výhodná pro své elektrochemické vlastnosti, zejména široké potenciálové okno. Hlavní využití elektrod obsahujících rtuť zahrnuje oblast analýzy životního prostředí, zejména při stanovování těžkých kovů v odpadních i přírodních vodách. Nevýhodou, která brání širokému používání rtuti, navzdory jejím výhodám, je její toxicita. Proto jsou hledány nové, ekologicky a zdravotně šetrnější materiály, které budou mít podobné vlastnosti, budou současně splňovat požadavky na kvalitní a přesnou analýzu a stanou se tak nástupci elektrod obsahujících rtuť. Velký potenciál v tomto směru mají bismut a antimon [14, 18 – 20].

#### **Modifikace pastových uhlíkových elektrod a elektrod ze skelného uhlíku bismutem**

Bismut se ukázal jako vhodná alternativa k doposud používané rtuti. Je ekologicky bezpečnější, zdravotně relativně nezávadný a má podobné elektrochemické vlastnosti jako rtuť. Historie použití bismutu v analytické chemii sahá do poloviny minulého století, kdy

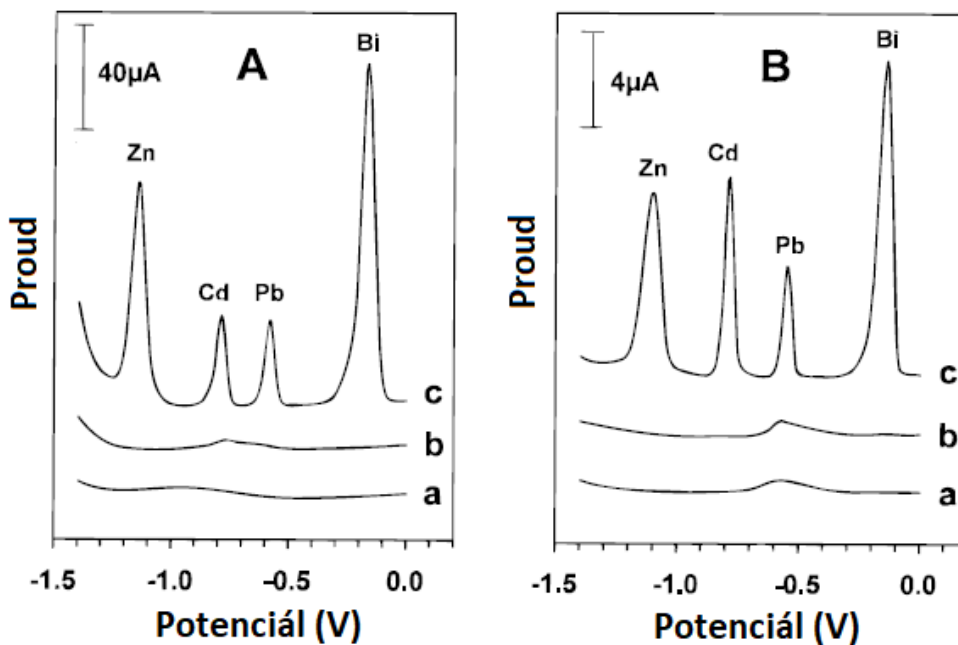
německý chemik Schwabe a kol. (1948) sestavili první bismutem modifikovanou elektrodu určenou pro měření pH. V roce 2000 Wang a kol. publikovali práci, ve které se zabývali bismutovou modifikací elektrody z uhlíkových vláken a elektrody ze skelného uhlíku. Tato elektroda byla následně použita pro stanovení olova, zinku a kadmia metodou rozpouštěcí voltametrie. Samotná modifikace spočívala v *in situ* depozici bismutu a cílových kovů (Pb, Cd, Zn) na povrch pracovní elektrody. Před samotnou analýzou byl povrch pracovní elektrody vyleštěn hliníkovou folií. Elektroda byla ponořena do roztoku 0,1 M acetátového pufru (pH 4,5) obsahujícího ionty kovů Cd(II) a Pb(II) o koncentraci 50 µg/l a Bi(III) o koncentraci 400 µg/l. Po vložení záporného napětí -1,4 V na pracovní elektrodu došlo k depozici kovů na povrch pracovní elektrody a vytvoření směsného kovového filmu. Depozice trvala 120 sekund. Následně bylo na elektrodu vloženo kladné napětí. Frekvence 20 Hz, amplituda 25 mV a potenciálový skok 5 mV. Skenování bylo ukončeno na 0,0 V a celý průběh byl zaznamenán (viz. Obr. 2). Ze záznamů je patrné, že v případě použití elektrody ze skelného uhlíku (A) byly odezvy pro Cd(II) a Pb(II) v porovnání bismutového (a) a rtuťového filmu (b) podobné, v případě Zn(II) poskytovala elektroda se rtuťovým filmem (b) mírně vyšší proudové odezvy. Při porovnání vlivu filmů na výstupní signál na elektrodě z uhlíkového vlákna (B) je patrné, že použití bismutového filmu (a) poskytlo ostřejší píky a vyšší proudové odezvy pro Cd(II) a Pb(II), naopak Zn(II) podobně jako na elektrodě ze skelného uhlíku (A) poskytl nižší signál. Za stálého míchání bylo na elektrodu vloženo napětí (+0,3 V) po dobu 30 sekund, čímž byla odstraněna zbytková množství kovů z povrchu pracovní elektrody a elektroda byla tak připravena pro další měření [20].





Obr. 2: Voltamogramy Pb(II), Cd(II) a Zn(II) měřené na elektrodě ze skelného uhlíku (A) a uhlíkovém vlákně (B) modifikovaných bismutovým (a) a rtuťovým filmem (b). Reakční prostředí: 0,1 M acetátový pufr (pH 4,5), analyzované koncentrace: 50  $\mu\text{g/l}$  (Pb(II), Cd(II), Zn(II)), Bi(III) 400  $\mu\text{g/l}$  (a), Hg(II) 10  $\text{mg/l}$  (b). (převzato a upraveno z: [20])

Měření bez modifikace elektrod neposkytovalo žádný signál při analýze stejných koncentrací Cd(II) a Pb(II) (Obr. 3) [20].



Obr. 3: Voltamogramy analýzy směsi iontů kovů na elektrodě ze skelného uhlíku (A) a uhlíkového vlákna (B). (a) 0,1 M acetátový pufr (pH 4,5), (b) 50  $\mu\text{g/l}$  Cd(II), Pb(II) a Zn(II) na nemoifikovaných elektrodách, (c) 50  $\mu\text{g/l}$  Cd(II), Pb(II) a Zn(II) na modifikovaných elektrodách (400  $\mu\text{g/l}$  Bi(III)). (převzato a upraveno z: [20])

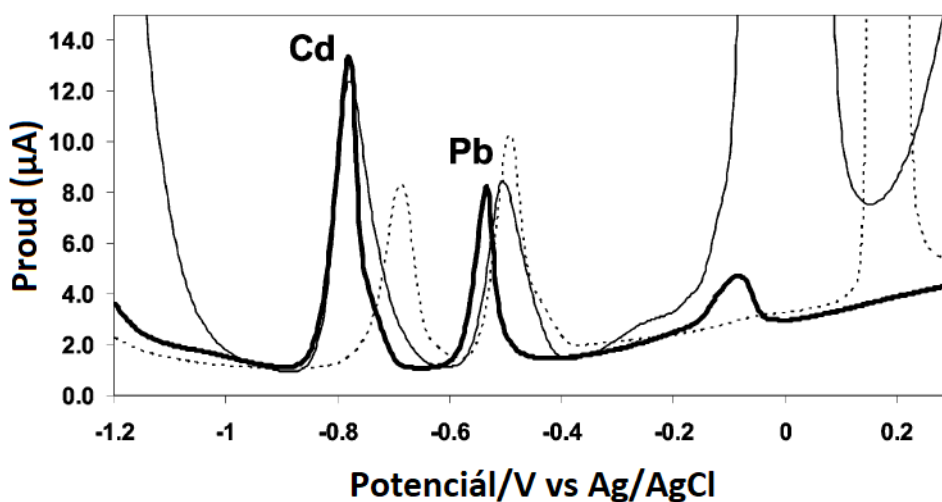
Wang tímto odstartoval nový směr, kterým se začala ubírat elektroanalytická chemie. Výzkumné skupiny po celém světě se inspirovaly jeho prací a začaly se intenzivně věnovat uhlíkovým elektrodám modifikovaných bismutem, jejich vývojem, zdokonalováním a aplikacemi v elektroanalytické chemii. Hočevar a Švancara a kol. (2005) modifikovali uhlíkové pastové elektrody přidávkem bismutového prášku k suspenzi grafitu a silikonového oleje. Aplikace takto připravené elektrody byla cílena na stanovení olova a kadmia v modelových i reálných vzorcích pitné vody metodou anodické rozpouštěcí voltametrie. S takto modifikovanou elektrodou bylo dosaženo detekčního limitu (1,2  $\mu\text{g/l}$  Cd(II); 0,9  $\mu\text{g/l}$  Pb(II)) s dobrou rozlišovací schopností pro oba kovy. Zajímavým faktem je také to, že s touto elektrodou bylo dosaženo lepších výsledků než při použití uhlíkové pastové elektrody s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem [9]. Na podobném principu byl založen výzkum Metelky a kol. (2010), kteří použili uhlíkovou pastovou elektrodu modifikovanou bismutovým práškem (17 % w/w) pro měření pH [10]. Uhlíková pastová elektroda a elektroda ze skelného uhlíku modifikované *in situ* vytvořeným bismutovým filmem byly použity při analýze přítomnosti těžkých kovů v modelových vzorcích [21 – 23].

Bismutem modifikované uhlíkové nanotrubičky, které tvořily základ uhlíkové pastové pracovní elektrody, byly použity pro stanovení kadmia v modelových vzorcích metodou anodické rozpouštěcí voltametrie s detekčním limitem 0,3  $\mu\text{g/l}$  Cd(II) [24]. Bismutem modifikované nanotrubičky byly použity také v práci Hwanga a jeho kolegů (2008) pro stanovení těžkých kovů (Cd, Pb). Bylo dosaženo detekčních limitů (1,3  $\mu\text{g/l}$  pro Pb(II) a 0,7  $\mu\text{g/l}$  pro Cd(II)) [25]. Také bismutový film vytvořený *ex situ* elektrodepozicí přinesl dobré výsledky při stanovení niklu a kobaltu ve vzorcích odpadních vod, kdy dosáhli detekčních limitů 69 ng/l pro Co(II) a 56 ng/l pro Ni(II) [26].

### **Modifikace pastových uhlíkových elektrod a elektrod ze skelného uhlíku antimonem**

Antimon nabízí podobně jako výše popisovaný bismut velký potenciál pro konstrukci elektrod v elektroanalytické chemii. Použití antimonu v elektroanalytické chemii také není úplnou novinkou. Již na počátku 30. let minulého století byly navrženy elektrody obsahující antimon/oxid antimonitý pro potenciometrická měření pH [27]. Nicméně antimon jako materiál pro konstrukci elektrod v rozpouštěcích analýzách byl popsán až v roce 2007. V tomto roce byl publikován článek Švancary a kol., kteří použili antimonem modifikovanou elektrodu ze skelného uhlíku pro stanovení olova a kadmia v kyselém prostředí (pH 2)

metodou anodické rozpouštěcí voltametrie a cyklické voltametrie. Právě antimon vykazuje dobré elektrochemické vlastnosti při měření v kyselém pH. Před použitím byla elektroda ze skelného uhlíku vyleštěna hliníkovou folií, samotná příprava filmu *in situ* pak byla provedena elektrodepozicí antimonu na povrch elektrody z roztoku 0,01 M HCl obsahujícího Sb(III), Cd(II), Pb(II). Stejným způsobem byly vytvořeny také rtuťový a bismutový film pro porovnání účinnosti. Depozice proběhla při -1,2 V po dobu 120 sekund. Po analýze bylo provedeno „čištění“ povrchu elektrody vložení napětí +0,1 V po dobu 30 sekund. Bylo zjištěno, že nově použitý antimonový film (tučná čára) poskytuje podobné výsledky při analýze těžkých kovů ve vzorku stejně jako elektroda modifikovaná bismutem (tenká čára) (Obr. 4). Proudové odezvy pro Cd(II) i Pb(II) byly srovnatelné. V případě porovnání se rtuťovým filmem (přerušovaná čára) je evidentní, že jak bismutový, tak antimonový film jsou vhodnější pro detekci Cd(II). V případě detekce Pb(II) je nepatrně lepší rtuťový film než bismutový nebo antimonový [28].



Obr. 4: Voltamogramy Pb(II) a Cd(II) na skelném uhlíku s *in situ* antimonovým filmem (tučná čára), rtuťovým filmem (přerušovaná čára) a bismutovým filmem (tenká čára). Reakční prostředí: 0,01 M HCl (pH 2), koncentrace: 50 µg/l Cd(II) a Pb(II), 1 mg/l Sb(III), Bi(III) nebo Hg(II). (převzato a upraveno z: [28])

Elektroda vykazovala linearitu v rozmezí koncentrací 20 – 140 µg/l s detekčními limity 0,7 µg/l pro Cd(II) a 0,9 µg/l pro Pb(II). Při použití antimonu jako modifikátoru bylo dosaženo nižšího detekčního limitu pro Cd(II) než při použití bismutem modifikované elektrody, kdy bylo dosaženo detekčního limitu 1,2 µg/l pro Cd(II) [9]. Pro Pb(II) bylo dosaženo stejných detekčních limitů [28].

Od prvního použití antimonu v elektroanalytické chemii jako náhrady za toxickou rtuť, byla publikována řada prací využívajících antimon jako modifikátor pracovní elektrody. Například Svobodová-Tesařová a kol. (2011) analyzovali modelové vzorky obsahující

kadmium a olovo metodou anodické rozpouštěcí voltametrie na antimonem modifikované uhlíkové pastové elektrodě. Uhlíková pasta byla modifikována přídatkem antimonového prášku (17 % w/w). S takto připravenou elektrodou bylo dosaženo limitů detekce 0,9 µg/l pro Pb(II) a 1,4 µg/l pro Cd(II). Ve srovnání s bismutem modifikovanou elektrodou vyrobenou stejným způsobem (17 % w/w bismutového prášku) byl pozorován o něco vyšší signál (pro oba kovy) a zároveň v porovnání s elektrodou s *in situ* vytvořeným antimonovým filmem poskytla elektroda nižší signál pro kadmium [29]. Analýze těžkých kovů (kadmia a olova) metodou anodické rozpouštěcí voltametrie se věnoval také Jovanovski a kol. (2009), kteří použili elektrodu ze skelného uhlíku, na které byl vytvořen antimonový film *ex situ*. Dosáhli nižších limitů detekce než Svobodová-Tesařová a kol., konkrétně 1,1 µg/l pro Cd(II) a 0,3 µg/l pro Pb(II) [30]. Gajdár a kol. (2016) se zabývali stanovením pesticidu Trifluralinu ve vzorcích přírodních vod. Při analýze použili antimonem modifikovanou elektrodu ze skelného uhlíku (*in situ*). Na této elektrodě bylo dosaženo detekčního limitu 1,2 µM [31]. Stanovení toxické rtuti se věnoval Vytrás a kol. (2011), kteří použili uhlíkovou pastovou elektrodu modifikovanou *in situ* vytvořeným antimonovým filmem metodou anodické rozpouštěcí voltametrie. Tato metoda byla úspěšně aplikována na reálné vzorky přírodních vod a bylo dosaženo detekčního limitu 1,3 µg/l [32]. Stejný tým pracoval také na stanovení mědi v reálných vzorcích přírodních vod a bylo dosaženo detekčního limitu 1,1 µg/l [33].

Také uhlíková pastová pracovní elektroda modifikovaná uhlíkovými nanotrubicemi v kombinaci s antimonem se ukázala jako efektivní při stanovení těžkých kovů olova a kadmia v pšeničné mouce. Nanotrubice byly adsorbovány na pracovní elektrodu *ex situ* a následně na nich byl vytvořen antimonový film *in situ*. Anodickou rozpouštěcí voltametrií byl stanoven obsah těžkých kovů v reálných vzorcích mouky. Detekční limity dosažené při této metodě byly: 0,77 µg/l pro Cd(II) a 0,65 µg/l pro Pb(II) [34]. Cesarino a kol. (2013) se zabývali analýzou léčiv Trimethoprimu a Sulfamethoxazolu ve vzorcích přírodních vod. Při práci použili antimonem modifikované uhlíkové nanotrubice. Použitím této techniky bylo dosaženo detekčních limitů 6,1 µg/l pro Sulfamethoxazol a 9,0 µg/l pro Trimethoprim [35].

#### 1.4 Tištěné elektrody v elektroanalytické chemii

V posledních letech jsou stále častěji využívány tištěné elektrody (SPE, z angl. screen-printed electrodes). Jedním z důvodů je současný trend miniaturizace, požadavky na rychlou a přesnou analýzu, a to vše při minimálních finančních nákladech. Tuto možnost

nabízí právě tištěné elektrody s různými modifikacemi jako alternativa k tradičně používaným elektrodám [36].

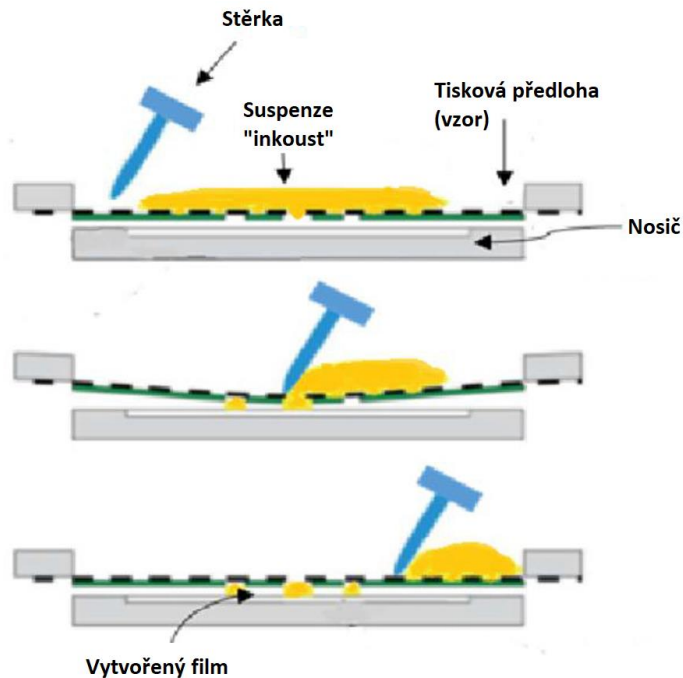
#### **1.4.1 Současné využití tištěných elektrod**

Výhodami tištěných elektrod jsou: snadné použití, malá spotřeba vzorku a reagensů a jak bylo zmíněno výše rychlá a přesná analýza při relativně nízkých finančních nárocích na analýzu. Tištěné senzory nachází uplatnění například v analýzách odpadních a přírodních vod při detekci kovů (olovo, kadmium, měď, rtuť, arsen) a jiných toxických látek [2, 11, 37], v oblasti monitorování životního prostředí při detekci pesticidů v půdě, přírodní vodě nebo i v potravinách [38]. Tištěné senzory jsou využitelné i při biomedicínských analýzách při stanovení čistoty léčiv a drog, při průkazu řady biologicky aktivních látek v biologickém materiálu a jejich kvantifikaci [36, 39, 40]. Výhodou tištěných elektrod je možnost modifikace povrchu pracovní elektrody, a tím lze ještě více rozšířit možnosti jejich aplikace. Modifikace povrchu pracovní elektrody biologicky aktivními látkami (např. antigeny, protilátkami, enzymy apod.) umožňuje přesné stanovení množství aktivních látek v biologickém materiálu. Tohoto principu je využíváno například při stanovení nádorových markerů [41]. Zajímavá je také modifikace povrchu pracovní elektrody nukleovými kyselinami, díky čemuž je možné detegovat cizorodou DNA ve vzorku. Tohoto lze využít při detekci některých virů či bakteriální DNA [42].

#### **1.4.2 Konstrukce tištěných elektrod**

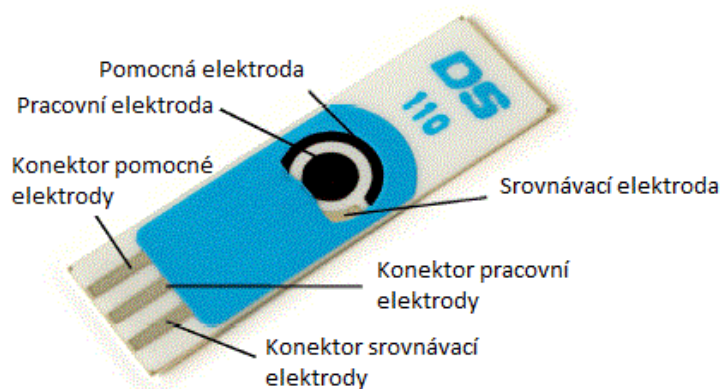
Konstrukce tištěných elektrod je založena na nanášení požadovaného materiálu nejčastěji na plastový, keramický nebo skleněný povrch (nosič). Běžně používaným materiálem pro konstrukci tištěných elektrod je zlato a různé modifikace uhlíku (pracovní elektroda). Stříbro či platina pak pro konstrukci referentních elektrod. Obvyklým způsobem, jakým jsou tyto látky na nosič nanášeny, je aplikace ve formě speciální viskózní suspenze – „inkoustu“. „Inkoust“ obsahuje dále pojiva (polyvinylchlorid, acetát celulózy, polyanilin, ftaláty, pojiva na bázi křemíku), plastifikátory a rozpouštědla, která zajistí lepší přilnavost na nosič [36, 43 – 45]. Schéma výroby tištěných elektrod je popsáno na Obr. 5. Po nanesení inkoustu je vrstva upravena na požadovanou velikost a tvar. Tyto části, které tvoří vlastní elektrodový systém, jsou následně fixovány na povrch nosiče, zpravidla zahřátím po určitou dobu. Doba a teplota fixace se může mírně lišit v závislosti na konkrétním druhu tištěné elektrody, použitých pojivech a rozpouštědlech. Zpravidla je upřednostňován keramický povrch před plastovým, protože při vytvrzování může být aplikována vyšší teplota a hotový

produkt – senzor – tím získá lepší elektrochemické vlastnosti. To se projeví na kvalitě výstupního signálu, reprodukovatelnosti analýzy a na životnosti elektrody, díky které je možné provést více měření na jedné elektrodě. Existují ovšem i další možnosti, jakými jsou tištěné elektrody vyráběny, respektive postupy, jakými jsou jednotlivé části fixovány na povrch nosiče. Jako další způsoby můžeme uvést například nanosení kapky disperze grafenu na povrch nosiče. V takovém případě je grafen rozptýlen v rozpouštědle (například: voda, ethanol, aceton nebo hexan). Tohoto principu bylo rovněž využito i při nanášení jiných látek (například oxidů mědi apod.) Následná fixace naneseného materiálu je provedena odpařením rozpouštědla [46 – 48]. Mezi často aplikované způsoby nanosení požadovaného materiálu (grafenu apod.) na povrch nosiče patří elektrodepozice. Tato technika je založena na vložení napětí na elektrodu, která je ponořena v roztoku obsahujícího složky, které mají být nanoseny na její povrch. Touto technikou je možné přesně kontrolovat zejména tloušťku vytvořeného povrchu. Na druhou stranu nevýhodou je nákladnost a náročnost této techniky pro produkci elektrod ve větším měřítku [49 – 52]. Při konstrukci tištěných elektrod lze využít i elektrospreje. Tato technika je založena na vložení vysokého napětí do prostředí obsahujícího disperzi grafenu, v důsledku toho dojde k rozptýlení roztoku na velmi malé kapičky (aerrosol), které jsou nanášeny na povrch pracovní elektrody, která je připojena k zemnicímu konektoru. Bylo dokázáno, že senzory vyrobené tímto způsobem vykazují lepší elektrochemické vlastnosti v porovnání se senzory vyrobenými pouhým nanesením kapky disperze a odpařením rozpouštědla. Důvodem je vytvoření kvalitnější (více homogenní) vrstvy na povrchu pracovní elektrody prostřednictvím elektrospreje [53, 54].

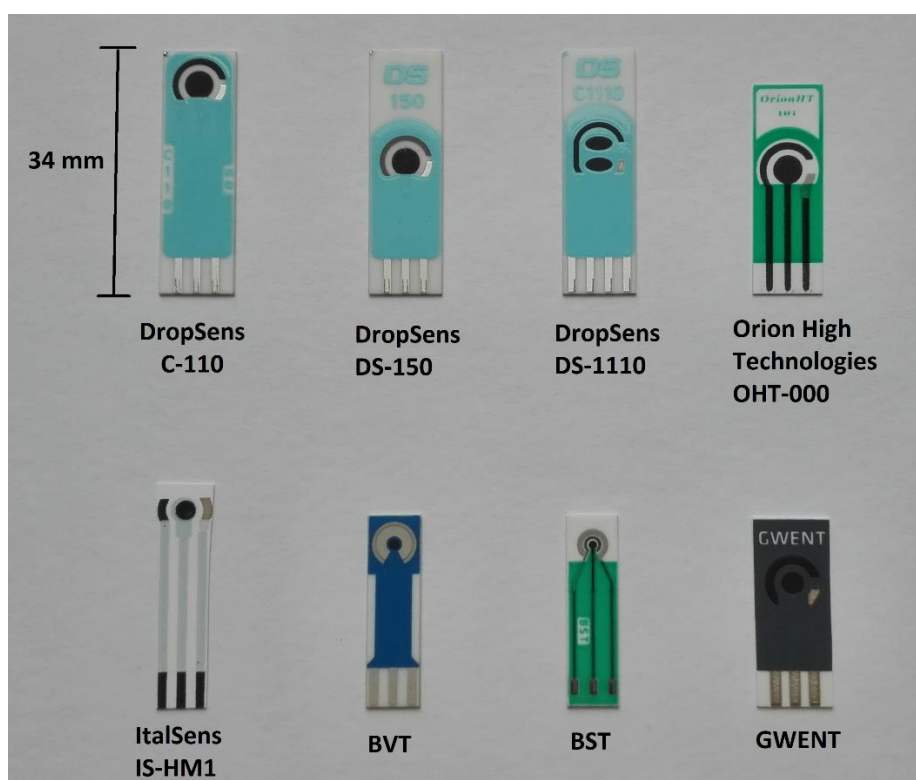


Obr. 5: Schéma výroby tištěných elektrod. (převzato a upraveno z: [55])

Takto vytvořené senzory tvoří elektrochemický člunek a provedení analýzy spočívá v ponoření elektrody do malého objemu vzorku nebo v nanesení kapky vzorku na její povrch [55, 56]. Výrobou tištěných senzorů se zabývá řada firem a v současné době jsou již běžně komerčně dostupné. Mezi hlavní výrobce tištěných elektrod patří společnost DropSens (Španělsko, [www.dropsens.com](http://www.dropsens.com)), jejichž produkt je schematicky popsán na Obr. 6. Dále pak společnosti Orion High Technologies (Španělsko, [www.orion-hitech.com](http://www.orion-hitech.com)), ItalSens (Nizozemí, [www.palmsens.com](http://www.palmsens.com)), BVT Technologies (Česká Republika, [www.bvt.cz](http://www.bvt.cz)), Bio Sensor Technology (Německo, [www.bst-biosensor.de](http://www.bst-biosensor.de)), Kanichi (Velká Británie, [www.breathsensing.com](http://www.breathsensing.com)), Gwent (Velká Británie, [www.gwent.org](http://www.gwent.org)) a Zensor (Taiwan, [www.zensor.com.tw](http://www.zensor.com.tw)) [56]. Příklady tištěných senzorů od různých výrobců jsou znázorněny na Obr. 7.



Obr. 6: Tištěný senzor od firmy DropSens – popis jednotlivých částí. (převzato a upraveno z: [57])



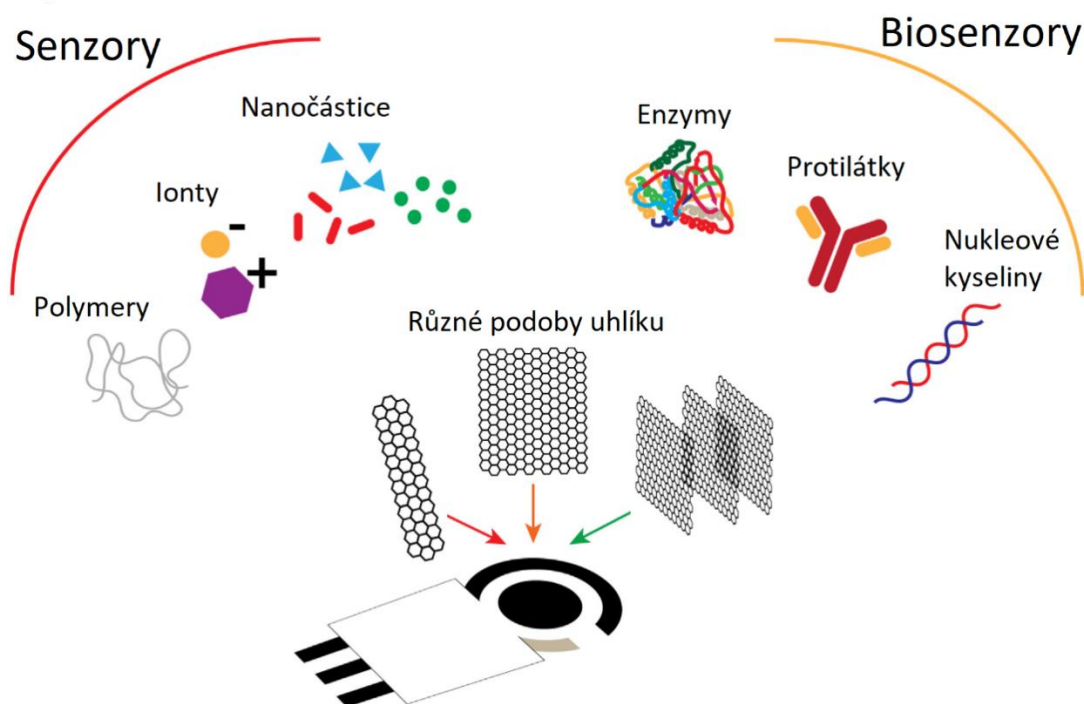
Obr. 7: Různé druhy tištěných elektrod.

### 1.4.3 Modifikace povrchu uhlíkové pracovní elektrody

Uhlík je často používán pro konstrukci tištěných elektrod z několika důvodů. K těm hlavním patří: dostačující elektrická vodivost, poměrně snadno obnovitelný povrch, široké potenciálové okno a chemická inertnost. Výhodou jsou i nízké náklady na výrobu. Pro širší využití tištěných senzorů jsou využívány modifikace povrchu nemoifikované uhlíkové pracovní elektrody (SPCEs z angl. screen-printed carbon electrodes) různými uhlíkovými materiály. K těmto modifikacím můžeme zařadit například grafenové tištěné elektrody



(grafenové SPEs), grafitové tištěné elektrody (grafitové SPEs) a tištěné elektrody tvořené uhlíkovými nanotrubicemi (CNTs z angl. carbon nanotubes SPEs). Dále jsou tištěné elektrody modifikovány například vytvořením kovového filmu na povrchu pracovní elektrody, imobilizací enzymů, nanočástic, protilátek či různých polymerů. Tato úprava je provedena tak, aby daný senzor co nejvíce splňoval požadavky pro analýzu konkrétních analytů. Možnosti modifikace povrchu pracovní elektrody jsou schematicky znázorněny na Obr. 8 [49]. V řadě aplikací již tištěné elektrody nahrazují jejich předchůdce – klasické pastové uhlíkové elektrody [36, 54].



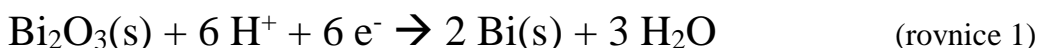
Obr. 8: Modifikace povrchu pracovní elektrody. (převzato a upraveno z: [49])

## 1.5 Tištěné elektrody s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou bismutovým filmem

Vedle prací zabývajících se modifikací klasických elektrod existují i práce o modifikaci tištěných uhlíkových elektrod bismutovým filmem. Takto modifikované elektrody dosahují dobrých výsledků s nízkými detekčními limity při analýze léčiv, monitorování těžkých kovů a jiných polutantů v životním prostředí a v neposlední řadě našly tyto elektrody využití také v biomedicínských aplikacích. Tištěná elektroda se v tomto případě běžně skládá z uhlíkové pracovní a pomocné elektrody a z Ag/AgCl nebo referenční elektrody [58 – 61].

### 1.5.1 Tvorba bismutového filmu na tištěných elektrodách

Samotná modifikace povrchu pracovní uhlíkové elektrody je založena na vytvoření filmu buď *in situ* nebo *ex situ*. Bismut může být také obsažen v nanášeném tiskovém materiálu, ze kterého je pracovní elektroda zkonstruována. Vytvoření filmu na povrchu pracovní elektrody spočívá v ponoření elektrody do roztoku obsahujícího Bi(III) (běžně Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nebo citrát bismutitý). Vložním vhodného potenciálu na pracovní elektrodu dojde k elektrochemické redukci a vytvoření kovového filmu na jejím povrchu (rovnice 1) [36, 59].



#### Tvorba *in situ* filmu

Tvorba filmu *in situ* je založena na elektrodepozici bismutu současně s analyzovanými látkami v roztoku. Tvorba bismutového filmu a depozice analytů na povrch pracovní uhlíkové elektrody není tedy oddělena, ale probíhá v jednom kroku z roztoku obsahujícího analyty a bismut v iontové podobě [36, 58, 59].

#### Tvorba *ex situ* filmu

Na rozdíl od vytvoření filmu *in situ* tvorba filmu *ex situ* probíhá samostatně – před vlastní analýzou vzorku. Nejprve je na elektrodě vytvořen bismutový film elektrodepozicí z roztoku obsahujícího Bi(III). Poté následuje opláchnutí elektrody (zpravidla čistým reakčním roztokem, ve kterém vzápětí probíhá analýza nebo redestilovanou vodou) a poté je elektroda již připravena pro analýzu [36, 58, 59].

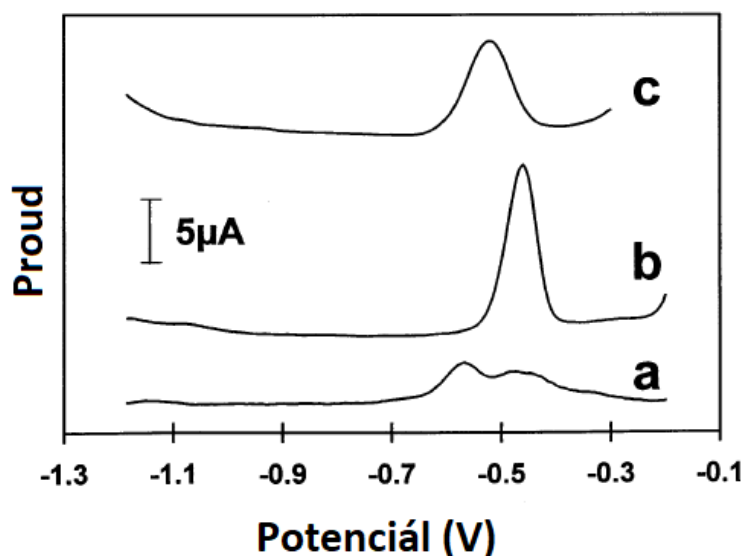
#### Bismut jako součást tiskového materiálu

Další možností, jak probíhá modifikace povrchu pracovní uhlíkové elektrody tištěných senzorů je přidání bismutu do tiskového materiálu, ze kterého je elektroda tvořena. Vložním vhodného potenciálu na pracovní elektrodu pak dojde k redukci Bi(III) na kovový bismut. Tento krok probíhá současně s elektrodepozicí cílových analytů [59].

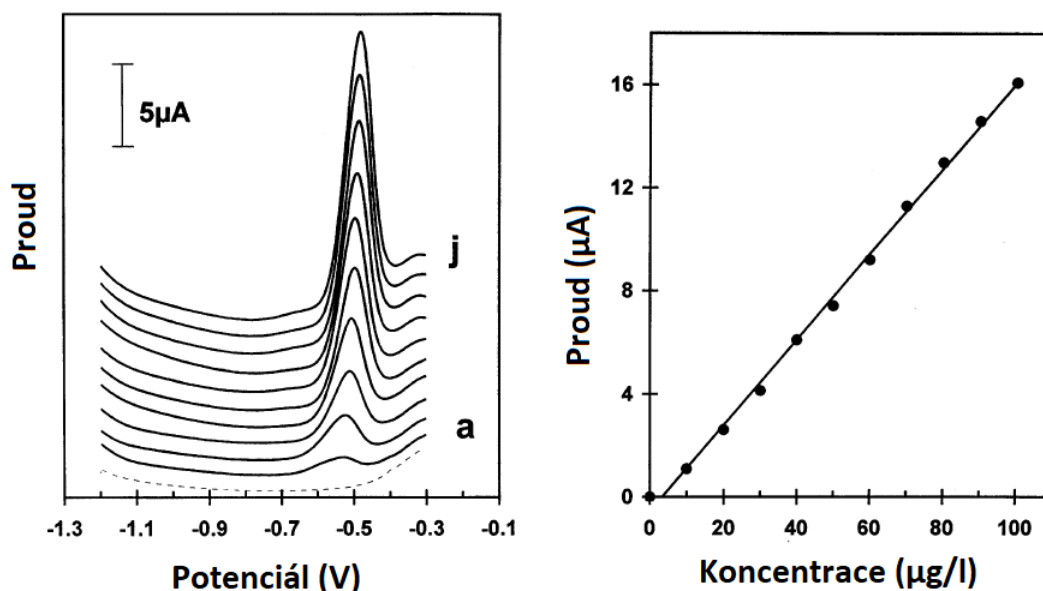
### 1.5.2 Využití tištěných elektrod modifikovaných bismutem

Jednou z prvních prací, při které byly použity tištěné elektrody s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou bismutovým filmem byl výzkum Wanga a kol. z roku 2001. S takto modifikovanou elektrodou stanovovali olovo ve vzorcích přírodních vod metodou anodické rozpouštěcí voltametrie. Získané výsledky byly porovnány s měřeními

na nemodifikované elektrodě a elektrodě modifikované rtuťovým filmem (Obr. 9). Dosáhli limitu detekce Pb(II) 0,3  $\mu\text{g/l}$ . Elektroda vykazovala linearitu při rostoucí koncentraci olova v modelovém vzorku v rozsahu 10 – 100  $\mu\text{g/l}$  (Obr. 10). Samotná příprava elektrody zahrnovala vytvoření bismutového filmu *ex situ*. Nemodifikovaná elektroda byla ponořena do 0,1 M acetátového pufru (pH 4,5) obsahujícího Bi(III) o koncentraci 100 mg/l. Na pracovní elektrodu byl vložen potenciál -0,8 V po dobu 4 minut, čímž došlo k elektrodepozici bismutu na povrch pracovní elektrody a vytvoření filmu. Elektroda byla poté opláchnuta redestilovanou vodou a použita k měření vzorku obsahující Pb(II) o koncentraci 50  $\mu\text{g/l}$ . Na záznamu (Obr. 9) je možné pozorovat markantní rozdíl při použití modifikované a nemodifikované elektrody. Měření s nemodifikovanou elektrodou (a) poskytlo nehodnotitelný signál, zatímco vytvoření filmu rtuťového (b) a bismutového (c) poskytlo signály, ze kterých je možné kvantifikovat obsah Pb(II) ve vzorku. V této práci poskytuje elektroda se rtuťovým filmem (b) lepší proudové odezvy než elektroda s bismutovým filmem [58].

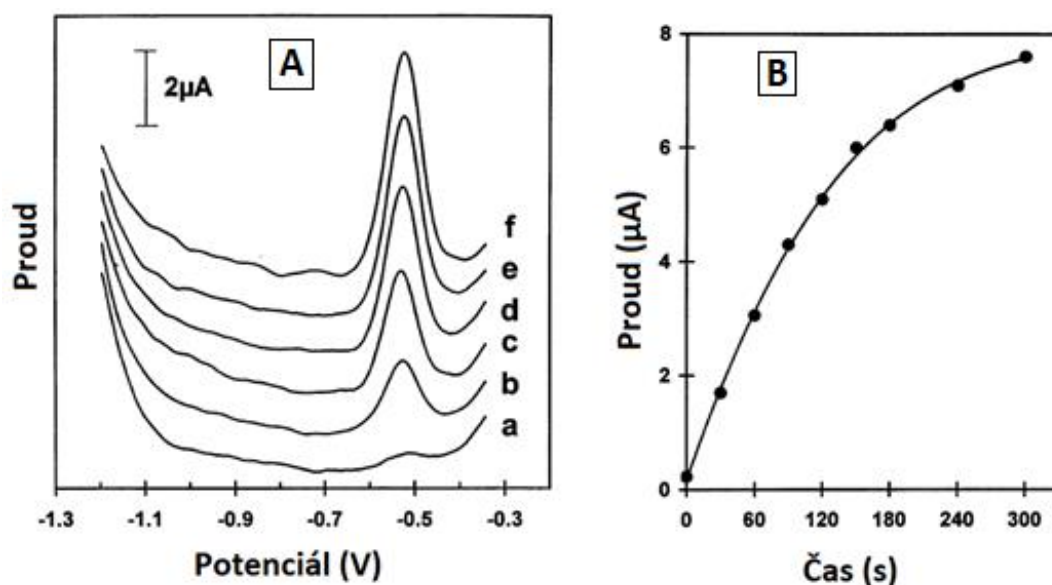


Obr. 9: Voltamogramy Pb(II) s použitím nemodifikované uhlíkové tištěné elektrody (a), rtuťovým filmem (b) a bismutovým filmem modifikované tištěné uhlíkové elektrody (c). Reakční prostředí: 0,01 M acetátový pufr (pH 4,5) s obsahem 50  $\mu\text{g/l}$  Pb(II), depozice 120 sekund při -1,2 V, záznam: frekvence 25 Hz, potenciálový skok 4 mV, amplituda 25 mV. (převzato a upraveno z: [58])



Obr. 10: Voltamogram Pb(II) v rozsahu koncentrací 10 – 100 µg/l Pb(II). Depozice 120 sekund při -1,2 V, reakční prostředí: 0,01 M acetátový pufr (pH 4,5), záznam: frekvence 25 Hz, potenciálový skok 4 mV, amplituda 25 mV. (převzato a upraveno z: [58])

Testovali také vliv depozičního času na výstupní signál (Obr. 11), kde je patrné, že nejvhodnější depoziční čas pro následnou detekci byl za daných podmínek 120 sekund (lineární část – graf B).



Obr. 11: Voltamogramy pro koncentraci Pb(II) 60 µg/l při různých depozičních časech (A): a) 0 s, b) 30 s, c) 60 s, d) 90 s, e) 120 s, f) 150 s. Závislost proudové odezvy na depozičním čase (B). Depoziční potenciál -1,2 V, reakční prostředí: 0,01 M acetátový pufr (pH 4,5), záznam: frekvence 25 Hz, potenciálový skok 4 mV, amplituda 25 mV. (převzato a upraveno z: [58])

V dalších letech se používání tištěných elektrod s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou bismutem začalo rozšiřovat. Uplatnění našly tyto elektrody hlavně

v monitorování těžkých kovů v životním prostředí. Serrano a kol. (2010) analyzovali vzorky přírodních povrchových vod metodou anodické rozpouštěcí voltametrie a bylo dosaženo detekčních limitů 3,9  $\mu\text{g/l}$  pro Cd(II), 0,5  $\mu\text{g/l}$  pro Pb(II), 3,5  $\mu\text{g/l}$  pro Zn(II) a lineární odezvy v rozmezí 5 – 600  $\mu\text{g/l}$  pro Cd(II), 20 – 50  $\mu\text{g/l}$  pro Pb(II), 7 – 250  $\mu\text{g/l}$  pro Zn(II) [60]. Detekci kadmia v povrchových vodách se zabýval Zaouak a kol. (2009) a dosáhli detekčního limitu 1,3  $\mu\text{g/l}$  a linearitu v rozmezí koncentrací 5,6 – 45  $\mu\text{g/l}$  [61]. Quintana a kol. (2011) sledoval vliv *in/ex situ* vytvořeného bismutového filmu na kvalitu a intenzitu signálu při detekci olova v přírodní minerální vodě. Dosáhli detekčního limitu pro Pb(II) 1  $\mu\text{g/l}$  (*ex situ*) a 0,3  $\mu\text{g/l}$  (*in situ*) [62]. Dobrých výsledků při detekci olova a kadmia bylo dosaženo také při tvorbě filmu modifikací inkoustu citrátem bismutitým (6 % w/w). Práce zahrnovala porovnání rozdílů při použití různých sloučenin Bi(III) na tvorbu filmu a kvalitu výstupního signálu. Byly testovány titanát bismutitý, zirkonát bismutitý, hlinitan bismutitý, oxid bismutitý a citrát bismutitý. Právě citrát bismutitý poskytl nejlepší výsledky. Detekční limity byly 0,9  $\mu\text{g/l}$  pro Pb(II) a 1,1  $\mu\text{g/l}$  pro Cd(II) [63]. Také práce María-Hormigos a kol. (2016) se zabývala použitím tištěné uhlíkové elektrody modifikované bismutem pro stanovení olova a kadmia ve vzorcích pitné vody. Dosáhli detekčních limitů 0,27  $\mu\text{g/l}$  pro Pb(II) a 0,1  $\mu\text{g/l}$  pro Cd(II) [64]. Tištěné elektrody s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou *ex situ* vytvořeným bismutovým filmem použili také Serrano a kol. (2010), kteří se zabývali analýzou roztoků obsahujících Pb(II), Cd(II) a Zn(II). Dosáhli přesných výsledků s limity detekce 0,3  $\mu\text{g/l}$  pro Cd(II) a Pb(II) a 0,7  $\mu\text{g/l}$  pro Zn(II) [65]. Detekci stejných analytů jako Serrano se zabývali Rico a kol. (2009), kteří použili tištěné uhlíkové elektrody modifikované bismutovými nanočásticemi. Příprava bismutových nanočástic spočívala v přidání 50 mg bismutu do 30 ml parafinového oleje. Takto připravená směs byla za stálého míchání zahřívána při 230 °C. Došlo k roztavení bismutu a po následném ochlazení byly získány bismutové částice, které byly přečištěny a vysušeny. Následná modifikace povrchu pracovní uhlíkové elektrody spočívala v nanosení 10  $\mu\text{l}$  dispergovaných bismutových nanočástic a odpaření rozpouštědla. S takto modifikovanou tištěnou elektrodou dosáhli vynikajících výsledků s limity detekce 4,9 ng/ml pro Zn(II), 1,7 ng/ml pro Cd(II) a 1,3 ng/ml pro Pb(II) [66]. Aplikací tištěných elektrod s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou *ex situ* vytvořeným bismutovým filmem se zabývali také Riman a kol. (2015). Analyzovali odpadní vody, ve kterých stanovovali Cd(II) a Pb(II) a dosáhli detekčních limitů 0,2  $\mu\text{g/l}$  pro oba kovy [67]. Tištěné elektrody s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem použili také Kadara a kol. (2004), kteří svou práci zaměřili na detekci a kvantifikaci těžkých kovů ve vzorcích půdy. I zde bylo dosaženo přesných výsledků s detekčními limity 10 nM pro Pb(II) a 8 nM

pro Cd(II) [68]. Tištěné elektrody s *ex situ* vytvořeným bismutovým filmem použili také Rojas-Roma a kol. (2016), kteří se zabývali stanovením antimonu v povrchových vodách. Dosáhli detekčního limitu 1,2 µg/l [69]. Bismutovým filmem modifikované uhlíkové tištěné elektrody se osvědčily také při kvantifikaci kobaltu a niklu v práci Borga a kol. (2015). Dosáhli detekčních limitů 27 ng/l pro Ni(II) a 94 ng/l pro Co(II) [70]. Rostoucí používání a těžba platinových kovů (platina, palladium, rhodium) zejména v jižní Africe vyžaduje monitorování těchto kovů v životním prostředí. Silwano a kol. (2014) k detekci těchto kovů používali tištěné elektrody s uhlíkovou pracovní elektrodou s *ex situ* vytvořeným bismutovým filmem a dosáhli detekčních limitů 0,008 µg/l pro Pd(II), 0,006 µg/l pro Pt(II) a 0,005 µg/l pro Rh(III) [71]. Mandil a kol. (2012) se zabývali modifikací povrchu tištěné elektrody bismutem modifikovanými uhlíkovými nanotrubicemi. Tyto nanotrubice se ukázaly jako vhodné pro modifikaci elektrod použitých při analýze těžkých kovů v modelových roztocích, kde dosáhli limitů detekce 0,17 µg/l pro Cd(II), 0,15 µg/l pro Pb(II) a 0,73 µg/l pro Zn(II) [72]. Uhlíkové nanotrubice modifikované bismutovým filmem byly použity také v publikaci Hwanga a kol. (2008), kteří se zabývali stanovením olova, kadmia a zinku v říčních vodách pomocí tištěných senzorů s detekčními limity 1,3 µg/l pro Pb(II), 0,7 µg/l pro Cd(II), 12 µg/l pro Zn(II) [25].

## **1.6 Tištěné elektrody s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou antimonovým filmem**

Vedle bismutového filmu existují i práce využívající pro modifikaci povrchu pracovní uhlíkové elektrody antimonový film. K výhodám antimonu patří zejména široké potenciálové okno a již zmiňovaná aplikovatelnost v kyselém prostředí, což je výhodné pro detekci a kvantifikaci těžkých kovů. Konstrukce takových elektrod je v podstatě stejná, jako je tomu v případě bismutovým filmem modifikovaných tištěných elektrod. I zde je základem uhlíková pracovní elektroda, která je následně modifikována antimonovým filmem, uhlíková nebo platinová pomocná elektroda a Ag/AgCl referentní elektroda [73].

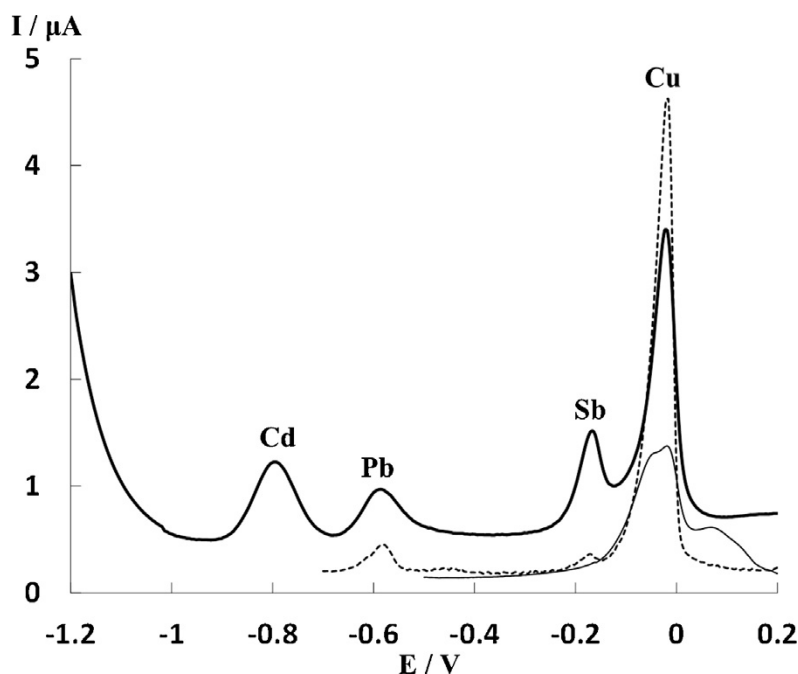
### **1.6.1 Tvorba antimonového filmu**

Antimonový film je možné vytvořit buď *in situ*, *ex situ* nebo může být antimon obsažen již přímo v tiskovém materiálu při výrobě tištěné elektrody. Nejčastěji používanou sloučeninou pro výrobu antimonového filmu je v těchto případech Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Vložením vhodného potenciálu na pracovní elektrodu dojde k redukci Sb(III) na kovový antimon [29, 73].

## 1.6.2 Využití tištěných elektrod modifikovaných antimonovým filmem

Tištěné elektrody s uhlíkovou pracovní elektrodou s *in situ* vytvořeným antimonovým použili při své práci Sosa a kol. (2015). Zaměřili se na simultánní detekci a kvantifikaci Pb(II), Cd(II) a Cu(II) ve vzorcích certifikované přírodní vody metodou anodické rozpouštěcí voltametrie a dosáhli limitů detekce 5  $\mu\text{g/l}$  pro Pb(II), 3,4  $\mu\text{g/l}$  pro Cd(II) a 1,6  $\mu\text{g/l}$  pro Cu(II), velké rozlišovací schopnosti pro všechny tři kovy, linearity při rostoucí koncentraci analytů (11,5 – 72,4  $\mu\text{g/l}$  pro Cd(II), 16,8 – 62,6  $\mu\text{g/l}$  pro Pb(II), 5,3 – 99,8  $\mu\text{g/l}$  pro Cu(II)) a vysoké přesnosti výsledků v porovnání s deklarovaným obsahem kovů ve vzorku. Antimonový film byl vytvořen ponořením elektrody do roztoku 0,01 M acetátového pufru (pH 4,5) obsahujícího Sb(III) o koncentraci 0,5 mg/l a vzorek přírodní vody. Součástí pufru byl také KNO<sub>3</sub> (0,01 M) jako podpůrný elektrolyt. Pro tvorbu optimálního filmu testovali vliv potenciálu na depozici antimonu a analytů z roztoku (Obr. 12), depozičního času a pH při analýze (Obr. 13) [74].

Testované depoziční potenciály byly: -0,5 V (tenká čára), -0,7 V (přerušovaná čára) a -1,2 V (tučná čára). Čas depozice byl 120 sekund [74].



Obr. 12: Voltamogram – porovnání vlivu různých depozičních potenciálů. (převzato z: [74])

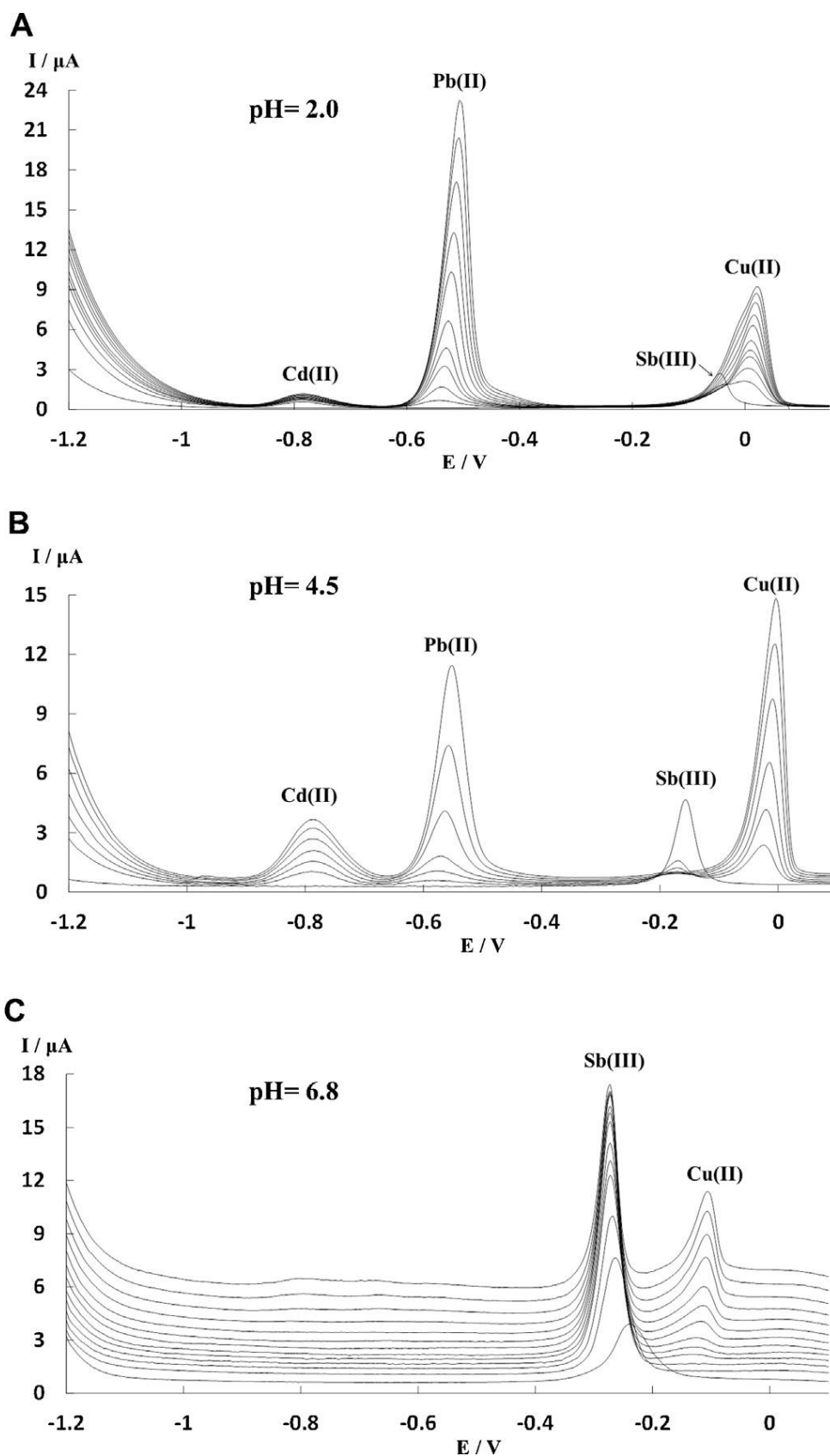
Ze záznamu na Obr. 12 je zřejmé, že při depozičním potenciálu -0,7 V bylo možné stanovit současně Pb(II) a Cu(II). Píky jsou dobře definovatelné. Nicméně nejlepšího výsledku dosáhli při depozičním potenciálu -1,2 V po dobu 120 sekund. V takovém případě byly píky pro

všechny kovy ostré, dobře definovatelné, nedocházelo k jejich překryvu a byla možná kvantifikace jednotlivých kovů [74].

Na Obr. 13 je pak uveden voltamogram zaznamenávající vliv různého pH reakčního prostředí na stanovení kovů. Pro tuto analýzu použili standardy všech tří kovů (Cu(II), Pb(II) a Cd(II)) v rozmezí koncentrací  $1,0 \times 10^{-7}$  M –  $2,0 \times 10^{-6}$  M. Roztoky o různém pH byly: (A) HCl (pH 2), (B) acetátový pufr (pH 4,5) a (C) kyselina maleinová/maleinát (pH 6,8), kdy nejlepších výsledků dosáhli při použití acetátového pufru (pH 4,5) [74].

V případě antimonového filmu nebyla pozorována žádná interference mezi antimonem a mědí, která by v konečném důsledku způsobovala zkreslení výstupního signálu a znemožňovala stanovení mědi. Právě s tímto problémem se potýkali jiní při použití bismutového filmu [74, 75].

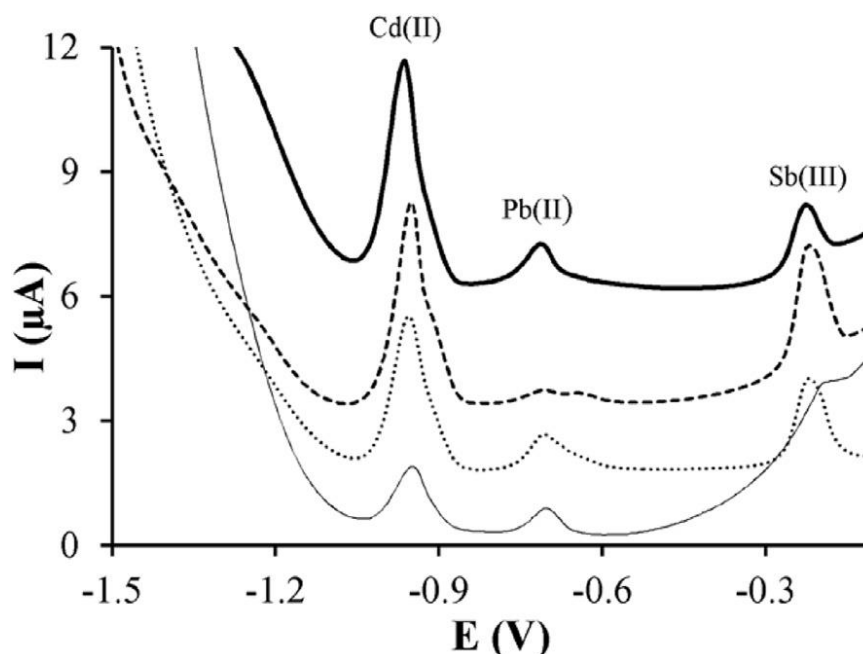




Obr. 13: Voltamogram – porovnání vlivu odlišného pH reakčního prostředí. (A) HCl (pH 2), (B) acetátový pufr (pH 4,5) a (C) kyselina maleinová/maleinát (pH 6,8). (převzato z: [74])

Antimonem modifikované tištěné elektrody byly použity i v jiných pracích zabývajících se stanovením těžkých kovů. Maczuga a kol. (2013) využívali tištěné elektrody s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou antimonovým filmem vytvořeným *in situ* pro analýzu vzorků přírodních vod na přítomnost těžkých kovů (olovo a kadmium) s detekčními limity 1  $\mu\text{g/l}$  pro Pb(II) a 2,7  $\mu\text{g/l}$  pro Cd(II). Současně testovali vliv koncentrace Sb(III) pro tvorbu filmu na kvalitu výsledného signálu. Jako nejvhodnější koncentrace Sb(III) pro tvorbu filmu *in situ* se ukázala koncentrace 1 mg/l Sb(III) [76]. Tištěné uhlíkové elektrody modifikované uhlíkovými nanotrubicemi s antimonovým filmem použili při detekci a kvantifikaci rtuti ve vzorcích pitné a odpadní vody metodou anodické rozpouštěcí voltametrie Niu a kol. (2011). Pro vytvoření filmu použili koncentraci Sb(III) 1 mg/l. Reakce probíhala v prostředí HCl při pH 1,5. Depoziční potenciál byl -0,8 V a depoziční čas 120 sekund. Za těchto podmínek dosáhli detekčního limitu Hg(II) 0,36  $\mu\text{g/l}$ . Současně bylo možné pozorovat i linearitu při rovnoměrném zvyšování koncentrace rtuti ve vzorku. V této práci byl tento druh elektrod úspěšně aplikován také na detekci a kvantifikaci olova v modelovém vzorku (roztoku) s obsahem 100  $\mu\text{g/l}$  Pb(II). Při stanovení olova byl pak depoziční potenciál -1,2 V [77].

V roce 2016 Perez-Rafols a kol. publikovali práci, ve které se zabývali porovnáním čtyř druhů tištěných uhlíkových elektrod modifikovaných antimonovým filmem. Tato práce zahrnovala porovnání schopnosti detegovat a kvantifikovat těžké kovy kadmium a olovo pomocí grafenové, grafitové, nanotrubicemi modifikované a uhlíkovými nanovláknky modifikované tištěné elektrody. Na všech typech elektrod byl vytvořen *in situ* antimonový film ponořením elektrody do roztoku obsahujícího Sb(III) o koncentraci 0,5 mg/l a stanovované kovy o koncentraci 100  $\mu\text{g/l}$ . Měření probíhalo v kyselém prostředí HCl (pH 2) s 0,01 M KNO<sub>3</sub> (podpůrný elektrolyt). Na elektrodu byl vložen depoziční potenciál -1,5 V po dobu 120 sekund, čímž došlo k depozici antimonu a cílových kovů na povrch pracovní elektrody. Při použití všech zmíněných druhů elektrod dosáhli detekčních limitů v řádech několika  $\mu\text{g/l}$  pro oba kovy. Záznamy analýzy jsou uvedeny na Obr. 14 [73].



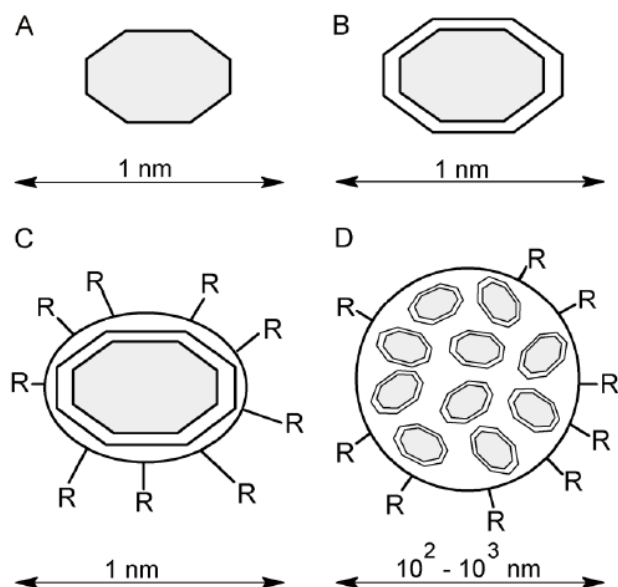
Obr. 14: Voltamogramy různých druhů tištěných uhlíkových elektrod modifikovaných antimonovým filmem. Grafenová elektroda (tenká čára), grafitová elektroda (tenká přerušovaná čára), nanotubicemi modifikovaná elektroda (tučná přerušovaná čára), elektroda modifikovaná uhlíkovými nanovláknky (tučná čára). (převzato z: [73])

Nejlepších výsledků při detegování těžkých kovů dosáhli s použitím tištěných elektrod s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou uhlíkovými nanovláknky s *in situ* vytvořeným antimonovým filmem (tučná čára). Detekční limity byly 2,1 µg/l pro Pb(II) a 1,1 µg/l pro Cd(II). Tištěné elektrody modifikované uhlíkovými nanovláknky s antimonovým filmem použité v této práci byly využity při analýze reálných vzorků přírodní vody pro stanovení olova a kadmia, kdy byly pouze malé odchylky oproti deklarovanému obsahu daných kovů v přírodní vodě (0,4 % pro olovo a 2,2 % pro kadmium) [73]. Pérez-Ràfols a kol. (2017) na tištěných uhlíkových elektrodách s *ex situ* vytvořeným antimonovým filmem detegovali a kvantifikovali palladium (Pd(II)) ve vzorcích přírodních vod metodou anodické rozpouštěcí voltametrie za použití dimethylglyoximu jako chelatačního činidla. Při tvorbě filmu byl vložen potenciál -0,5 V po dobu 300 sekund. Tvorba filmu probíhala v prostředí 0,01 M HCl a Sb(III) o koncentraci 50 mg/l. Analýza vzorku následně probíhala v prostředí 0,1 M acetátového pufru (pH 4,5), depoziční potenciál -0,6 V byl vložen po dobu 180 sekund. Linearita byla v rozmezí koncentrací 9,0 – 100,2 µg/l a limit detekce 2,7 µg/l pro Pd(II) [78]. Antimonem modifikované (*ex situ*) tištěné uhlíkové elektrody používali také Barceló a kol. (2016), kteří stanovovali nikl v odpadních vodách metodou anodické rozpouštěcí voltametrie pomocí dimethylglyoximu, jako chelatačního činidla. Při tvorbě antimonového filmu použili stejný postup, jako v práci [78]. Samotná analýza pak probíhala v prostředí amonného pufru (pH 9,2) s depozičním potenciálem -0,7 V po dobu 120 sekund. Linearita byla v rozmezí

koncentrací 3,1 – 197  $\mu\text{g/l}$  s limitem detekce 0,9  $\mu\text{g/l}$  pro Ni(II). V porovnání s tištěnou uhlíkovou elektrodou s bismutovým filmem dosáhli lepších výsledků s elektrodou s antimonovým filmem [79].

## 1.7 Kvantové tečky

Pojem „kvantové tečky“ (QDs) definuje polovodičové nanokrystaly s charakteristickými optickými a elektrochemickými vlastnostmi. Jedná se o částice velikosti několika nanometrů (obvykle 1 – 20 nm). Mohou existovat buď samostatně, nebo jsou uspořádány do shluků (klastřů). Nejběžnějším uspořádáním je, že jeden typ polovodiče tvoří jádro („core“) a jiný typ polovodiče vytváří obal („shell“) (Obr. 15). Kvantová tečka s tímto uspořádáním se nazývá „core – shell“. Modifikací kvantových teček je možné vytvořit na jejich povrchu funkční skupiny vhodné pro konjugační reakce. Tyto funkční skupiny následně reagují s funkční skupinou cílového analytu za vzniku kovalentní vazby. Tento jev je následně využíván při detekci a kvantifikaci cílových analytů prostřednictvím detekce kvantových teček. Kvantové tečky nacházejí široké uplatnění v biologii a v bioanalytické chemii zejména pro své optické vlastnosti. V mnoha metodách jsou využívány jako alternativa k dlouho známým organickým fluoroforům. Dalším způsobem, kterým lze kvantové tečky detegovat, jsou elektrochemické metody. Tato skutečnost vyplývá z jejich chemické struktury, kdy je jádro kvantové tečky tvořeno kovem. Kvantové tečky nacházejí využití například při detekci buněk a sledování intracelulárních procesů, při detekci DNA, RNA, proteinů, protilátek a antigenních struktur. Dále pak při imunohistochemii pro rozpoznání tkáňových změn v souvislosti s nádory, ale i pro analýzu jiných biologických struktur a objektů [80 – 82].

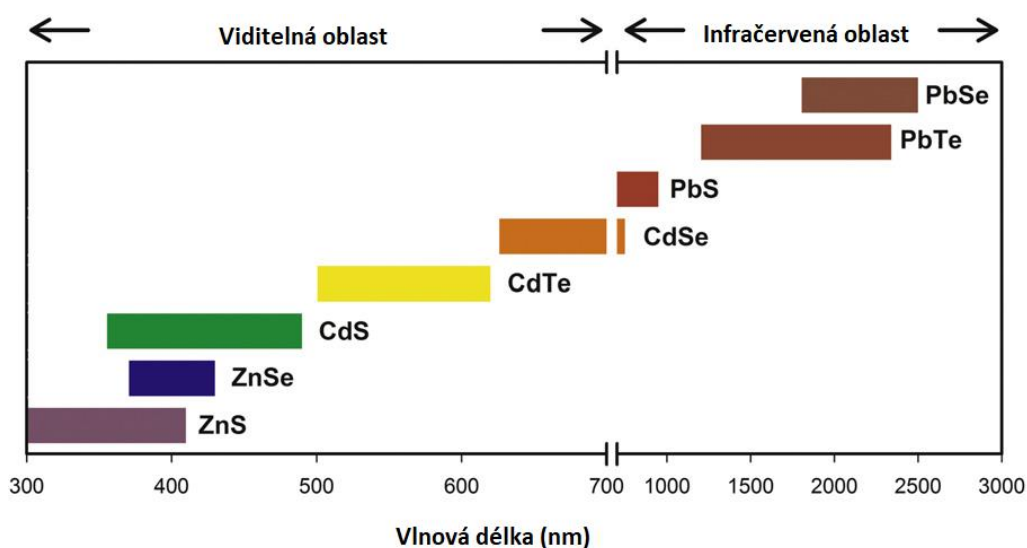


Obr. 15: Schéma struktury kvantových teček. (A) QD tvořená jedním typem polovodiče, (B) QD tvořená dvěma typy polovodičů, (C) QD obalená vnějším obalem, který umožňuje solvataci ve vodném roztoku a nese reaktivní skupiny R nutné pro konjugaci, (D) Polymerní částice obsahující několik QD s povrchovými reaktivními skupinami R. (převzato z: [80])

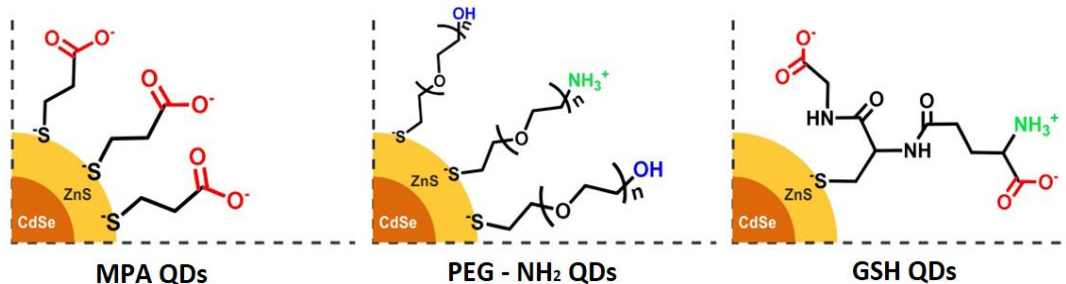
### 1.7.1 Výroba kvantových teček

Existuje celá řada materiálů, ze kterých jsou kvantové tečky vyráběny. Při jejich výrobě jsou často používány těžké kovy kadmium a olovo, které spolu s dalšími prvky (běžně prvky ze skupiny chalcogenů – tellur, selen nebo síra) tvoří kvantovou tečku. K běžně používaným kvantovým tečkám vyrobeným z těchto materiálů patří CdSe QDs, CdSe/ZnS QDs, CdTe QDs a CdTe/CdS QDs nebo také PbS QDs, PbTe QDs případně PbSe QDs. Kromě kvantových teček vyrobených z těžkých kovů, jsou často využívány také materiály, jako je zinek (ZnS QDs, ZnSe QDs) nebo indium (InP/ZnS QDs). V současnosti jsou kvantové tečky komerčně dostupné v široké škále materiálů a modifikací. K významným výrobcům kvantových teček patří například společnosti Suzhou Xingshuo Nanotech ([www.mesolight.com](http://www.mesolight.com)), MKnano ([www.mknano.com](http://www.mknano.com)) nebo ThermoFisher ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)). Mimo komerční dostupnost kvantových teček je možná i jejich výroba v laboratoři v malém měřítku. Kvantové tečky je možné připravovat ve vodných i v nevodných rozpouštědlech. V obou případech dochází k formování nanokrystalů v přítomnosti stabilizujících ligandů, díky kterým dojde k solvataci v daném prostředí. V organickém prostředí se pro stabilizaci používá nejčastěji směs trioktylfosfin/trioktylfosfinoxid (TOP/TOPO) a ve vodném sulfanylethanová kyselina a jiné thiooly. K formování nanokrystalů dochází po zahřátí směsi obsahující konkrétní prekurzory. Teplota reakce a doba zahřívání je zcela zásadní pro vlastnosti finálního produktu.

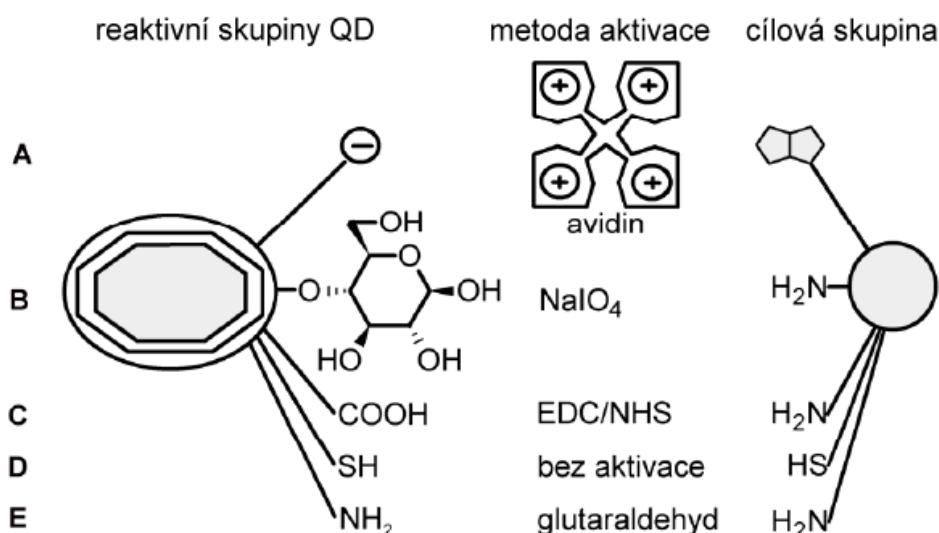
Experimentálně bylo zjištěno, že aplikace rozdílné teploty v různých časových intervalech vede ke změnám absorpčního a emisního spektra dané kvantové tečky. Na Obr. 16 jsou uvedena emisní spektra konkrétních kvantových teček. Jak bylo zmíněno výše, zásadním krokem z hlediska budoucího využití kvantových teček je modifikace jejich povrchu různými funkčními skupinami, které umožňují konjugaci s jinými molekulami. Následná aktivace funkčních skupin na povrchu kvantových teček umožní vznik specifické vazby s daným analytem. Na trhu jsou dostupné například kvantové tečky s kyselinou 3-merkaptopropionovou (MPA) na povrchu, která je použita pro zavedení karboxylových skupin, dále pak kvantové tečky jejichž obal tvoří polyethylenglykol (PEG) pro zavedení amino skupin a hydroxylových skupin nebo může být obal kvantových teček tvořen glutathionem (GSH), díky čemuž se vytvoří amino i karboxylové skupiny na povrchu kvantových teček (Obr. 17). Příklady konjugačních metod jsou uvedeny na Obr. 18. A – povrch kvantových teček nesoucích záporný náboj je možné pokrýt pozitivně nabitým avidinem. Tyto částice lze konjugovat s biotinylovanými molekulami. B – sacharidové jednotky na povrchu nanočástic, po aktivaci oxidací jodistanem sodným vznikají aldehydové skupiny vhodné pro připojení biomolekul přes aminoskupiny. C – karboxylové skupiny se aktivují prostřednictvím EDC/NHS a poté mohou reagovat s aminoskupinou biomolekuly za vzniku amidové vazby. D – thiolové skupiny nanočástice a biomolekuly lze přímo spojit disulfidickým můstkem. E – aminoskupiny nanočástice a biomolekuly se spojují působením glutaraldehydu [80, 81, 83, 84].



Obr. 16: Emisní spektrum konkrétních kvantových teček. (převzato z: [83])



Obr. 17: Metody zavádění funkčních skupin na povrchu kvantových teček. (převzato a upraveno z: [85])



Obr. 18: Metody konjugace kvantových teček. (převzato z: [80])

### 1.7.2 Elektrochemická analýza kvantových teček na uhlíkových tištěných elektrodách s bismutovým nebo antimonovým filmem

Jednou z možností jejich detekce a kvantifikace jsou elektrochemické metody. K nejčastěji používaným elektrochemickým technikám pro analýzu kovů, a tedy kvantových teček patří anodická rozpouštěcí voltametrie. Podstatou této techniky je detekce kovových iontů, které jsou nejdříve uvolněny ze struktury kvantové tečky jejím rozpuštěním v kyselém prostředí. Vložení vhodného potenciálu na pracovní elektrodu dojde k redukci kovu na povrchu pracovní elektrody a při následné oxidaci se zaznamená proudová odezva příslušných kovových iontů, které tvořily jádro kvantové tečky [86].

Kvantové tečky CdSe/ZnS mohou být použity jako značky při stanovení biotinu metodou anodické rozpouštěcí voltametrie na tištěných elektrodách s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou *in situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem i jejich kombinací

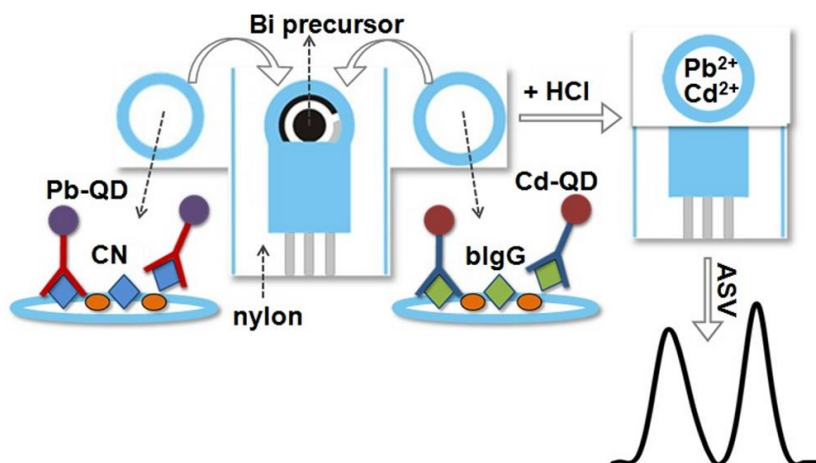
(Martin-Yerga a kol., 2013). Principem byla afinitní interakce mezi streptavidinem (imobilizovaným na povrchu pracovní uhlíkové elektrody) a biotinem. Kvantové tečky byly použity pro označení biotinu a následná reakce měla kompetitivní charakter mezi přidaným značeným biotinem a neznačeným biotinem ze vzorku. Pro detekci byly Cd(II) z jádra kvantové tečky uvolněny okyselením ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  nebo  $\text{HCl}$ ) a byl přidán Bi (III)/Sb (III) pro vytvoření *in situ* filmu. Nejlepší výsledky byly pozorovány po přidání 1 M  $\text{HCl}$  a Bi(III) (0,5 mg/l). Na elektrodu byl vložen depoziční potenciál -1,1 V po dobu 300 sekund. V tomto kroku došlo k vytvoření bismutového filmu a akumulaci kadmia na povrchu pracovní elektrody. Následně byl vložen potenciál od -1,10 V po -0,65 V a byla zaznamenána proudová odezva. V tomto uspořádání bylo dosaženo limitu detekce biotinu 1,4 nM [87].

Kvantové tečky (PbS a CdSe/ZnS) použili Kokkinos a kol. (2015) jako značky při stanovení C reaktivního proteinu (CRP). Pro jejich detekci použili tištěné elektrody s uhlíkovou pracovní elektrodu s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem metodou anodické rozpouštěcí voltametrie. Celé stanovení bylo založeno na principu sendvičové QLISA metody (quantum dot-linked immunosorbent assay). Na povrchu pracovní elektrody byly imobilizovány specifické protilátky proti CRP. Po přidání vzorku obsahujícího CRP došlo ke specifické reakci za tvorby imunokomplexu fixovaného na povrchu pracovní elektrody. V dalším kroku byly přidány biotinem značené sekundární protilátky proti CRP. Po jejich navázání byl k takto vytvořenému komplexu přidán konjugát streptavidinu s kvantovými tečkami. Detekce spočívala v Pb(II)/Cd(II) z kvantových teček, redukci iontů na povrchu pracovní elektrody a zaznamenání proudové odezvy při opětovném uvolnění do roztoku. Reakce probíhala v prostředí 0,1 M acetátového pufru (pH 4,5) obsahujícího Bi(III) o koncentraci 1 mg/l, k uvolnění Pb(II)/Cd(II) z jádra kvantové tečky byla použita 0,05 M  $\text{HNO}_3$  a vložením depozičního potenciálu -1,4 V po dobu 360 sekund došlo k vytvoření směsného kovového filmu na povrchu pracovní elektrody. Lepších výsledků dosáhli při použití PbS kvantových teček. Linearita byla v rozmezí koncentrací CRP 0,2 – 100 ng/ml s limitem detekce 0,05 ng/ml. Tato metoda byla také ověřena analýzou reálných vzorků lidského séra obsahujících CRP [88].

Se zajímavou možností přišli Kokkinos a kol. (2016), kteří navrhli systém pro detekci dvou různých analytů ve vzorku v rámci jedné analýzy na jedné elektrodě. I při této práci byly použity tištěné uhlíkové elektrody s bismutovým filmem v kombinaci se dvěma druhy kvantových teček použitých jako značky pro cílové analyty. Stanovení kvantových teček bylo založené na anodické rozpouštěcí voltametrii. Při práci použili kvantové tečky CdSe/ZnS



a PbS, které byly konjugovány se streptavidinem. Systém použili pro stanovení hovězího kaseinu (BC) a imunoglobulinu G (IgG) jako modelových proteinů. Schéma a princip jsou uvedeny na Obr. 19. Vlastní analýza zahrnovala navázání biotinem značených protilátek s cílovými analyty na oddělených terčících mimo pracovní elektrodu. K takto vytvořenému imunokomplexu byl přidán streptavidin konjugovaný s kvantovými tečkami, který se navázal na biotinylované protilátky. Další krok zahrnoval okyselení 0,1 M HCl pro uvolnění Pb(II)/Cd(II). Následně byly oba roztoky obsahující Pb(II) a Cd(II) přidány k 0,1 M acetátovému pufru (pH 4,5) a „složeny“ na tiskěnou elektrodu. Bi(III) byl již součástí tiskového materiálu při výrobě vlastního senzoru. Vložením depozičního potenciálu -1,4 V po dobu 240 sekund došlo k redukci Bi(III), Pb(II) a Cd(II) a vytvoření kovového filmu na povrchu pracovní elektrody. Po ukončení depozice bylo na pracovní elektrodu vloženo kladné napětí. Potenciál byl v rozmezí od -1,2 V po -0,3 V a byla zaznamenána proudová odezva pro oba kovy a tedy analyty. Pro oba analyty bylo dosaženo nízkých limitů detekce, konkrétně 0,04  $\mu\text{g/ml}$  pro kasein a 0,02  $\mu\text{g/ml}$  pro IgG [89]. Toto uspořádání ukazuje potenciál kvantových teček v analýze více analytů současně v jednom stanovení.



Obr. 19: Schéma principu detekce hovězího kaseinu a IgG v rámci jedné elektrody. (převzato z: [89])

Kvantové tečky v kombinaci s tiskěnými elektrodami s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou bismutovým filmem se osvědčily také při stanovení lidského IgG (Medina-Sanchez a kol., 2016), kdy CdSe/ZnS kvantové tečky byly použity jako značka a celá analýza probíhala v mikro průtokovém systému. Princip analýzy spočíval v sendvičovém uspořádání. Protilátky proti IgG byly imobilizovány na magnetických částicích a po přidání vzorku obsahujícího IgG došlo k vychytání IgG na imobilizovaných protilátkách. Po přidání sekundárních biotinylovaných protilátek došlo k vytvoření komplexu, ke kterému byly následně přidány kvantové tečky konjugované se streptavidinem, který se specificky vázal

na biotinylované sekundární protilátky. Došlo tak ke specifickému označení imunokomplexů. Následnou aplikací 1 M HCl došlo k uvolnění Cd(II) z kvantové tečky. Kadmium uvolněné působením kyseliny bylo detegováno anodickou rozpouštěcí voltametrií s použitím tištěné uhlíkové elektrody s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem umístěné na výstupu mikro průtokového systému. Byl vložen depoziční potenciál -1,1 V po dobu 400 sekund. Následně bylo vloženo kladné napětí a byl zaznamenán potenciál od -1,1 V do -0,15 V a průběh byl zaznamenán na voltamogram. Touto metodou bylo dosaženo detekčního limitu IgG 3,5 ng/ml [90].

Analýzou kvantových teček na tištěných senzorech s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou bismutovým filmem vytvořeným *in situ* se zabývala Korecká a kol. V této práci se zaměřili na detekci a kvantifikaci lidského epididymálního proteinu 4 (HE4), který je důležitým diagnostickým markerem při detekci karcinomu ovarií. Kvantové tečky CdSe/ZnS zde byly použity k označení sekundárních protilátek anti-HE4 IgG. Takto připravený konjugát byl následně přidán k imunokomplexu primární protilátky anti-HE4 IgG imobilizované na magnetických částicích – protein HE4 vycytený ze vzorku. Navázáním značených protilátek na imunokomplex došlo k vytvoření finálního imunokomplexu anti-HE4 IgG – HE4 – anti-HE4 IgG<sup>CdSe/ZnS</sup>. Následný postup zahrnoval uvolnění Cd(II) z jádra QDs iknubací v kyselém prostředí HCl, dávkování na povrch tištěného senzoru a spuštění analýzy. Samotná analýza byla provedena metodou anodické rozpouštěcí voltametrie. Měření probíhalo v přítomnosti 0,1 M HCl a 0,1 M octanového pufru (pH 4,5) s přidavkem 500 ppb Bi(III). Na elektrodu byl vložen potenciál -1,0 V po dobu 120 sekund, kdy došlo k redukci kadmia a bismutu na povrchu pracovní elektrody. Následně bylo na elektrodu vloženo kladné napětí a sledovala se proudová odezva. Skenování bylo ukončeno na potenciálu -0,15 V a celý průběh analýzy byl zaznamenán na voltamogram. Při této metodě dosáhli linearit v rozmezí koncentrací proteinu HE4 0,02 – 20 nM a limitu detekce proteinu HE4 5,27 pM [91].

Kombinace kvantových teček a tištěných elektrod s uhlíkovou pracovní elektrodou s bismutovým filmem se osvědčila také při elektrochemické detekci DNA metodou anodické rozpouštěcí voltametrie (Kokkinos a kol., 2015). Podstatou analýzy byla imobilizace sondy (jednovláknové DNA) na povrchu uhlíkové pracovní elektrody. K takto imobilizované sondě byl následně přidán roztok obsahující biotinylovaný cílový oligonukleotid. Na základě pravidel komplementarity došlo k navázání cílového oligonukleotidu na sondu na povrchu uhlíkové pracovní elektrody. V dalším kroku byl přidán konjugát streptavidinu s kvantovými

tečkami (PbS). Přídavek 0,01 M HCl vedl k uvolnění Pb(II) z kvantových teček. V dalším kroku byl přidán 0,1 M acetátový pufr (pH 4,5) obsahující Bi(III) o koncentraci 1 mg/l. Na elektrodu byl vložen potenciál -1,4 V po dobu 360 sekund a došlo k redukci kovů na povrchu pracovní elektrody. Změna potenciálu byla zaznamenána v rozmezí hodnot -1,0 V až -0,4 V. V tomto kroku došlo k uvolnění Pb(II) do roztoku a zaznamenání signálu. Závislost proudové odezvy Pb(II) na koncentraci cílové DNA vykazovala linearitu v rozmezí koncentrací od 0,1 pM po 10 nM s limitem detekce 0,03 pM [92].

Dobrých výsledků bylo rovněž dosaženo při detekci cizorodé nekódující RNA pomocí kvantových teček v kombinaci s tištěnými senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou *in situ* vytvořeným bismutovým filmem metodou anodické rozpouštěcí voltametrie (Vijian a kol., 2016). Byla detegována nekódující RNA bakterií *Vibrio cholerae*, *Salmonella sp.* a *Shigella sp.* Pomocí specificky upravených primerů (modifikace thiolovou skupinou na 5' konci) použitých v PCR reakci bylo možné označit cílové molekuly RNA konjugací s kvantovými tečkami (PbS, CdS nebo ZnS). Dalším důležitým krokem byla imobilizace komplementárních oligonukleotidů (sond) na povrchu pracovní uhlíkové elektrody. Po přidání vzorku obsahujícího značenou RNA (každý druh kvantové tečky byl konjugován s jedním konkrétním druhem patogenní nekódující RNA) došlo na základě pravidel komplementarity k hybridizaci na povrchu pracovní elektrody. Následný postup spočíval v rozpuštění kvantové tečky a uvolnění kovů, jejich elektrodepozici na povrchu pracovní elektrody, následném uvolnění zpět do roztoku a zaznamenání příslušných signálů. Bismutový film byl vytvořen *in situ* aplikací Bi(III) o koncentraci 1 mg/l. Pro rozpuštění kvantové tečky byla použita HNO<sub>3</sub>. Při analýze bylo dosaženo dobrých výsledků s vysokou rozlišovací schopností elektrody pro všechny tři kovy, a tedy i pro všechny tři druhy nekódující RNA. Tato technika by v budoucnu mohla být použita pro analýzu PCR produktů jednotlivě i ve směsích [93].

Kvantové tečky (CdSe a CdSe/ZnS) byly analyzovány na tištěných elektrodách s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou *in situ* vytvořeným bismutovým filmem také v práci Martín-Yergy a kol. (2015). Cílem práce byla detekce, kvantifikace a charakterizace velikosti použitých kvantových teček metodou diferenčně pulsní voltametrie ve vodném prostředí i v prostředí organického rozpouštědla. V případě stanovení v organickém rozpouštědle bylo nejdříve nutné odstranit veškeré rozpouštědlo (v tomto případě CHCl<sub>3</sub>) odpařením. Reakce probíhala v prostředí 0,1 M acetátového pufru (pH 5) s přídavkem Bi(III) v koncentraci 1 mg/l. Uvolnění Cd(II) z kvantové tečky bylo dosaženo přidáním 1 M HClO<sub>4</sub>

(pro stanovení v organickém prostředí, s následnou neutralizací pomocí NaOH) a 1 M HCl (pro stanovení ve vodném prostředí). Vložením depozičního potenciálu -1,3 V po dobu 200 sekund (pro stanovení koncentrace) a 120 sekund (pro stanovení velikosti) došlo k vytvoření filmu na povrchu pracovní elektrody. V následujícím kroku byl vložen potenciál od -1,3 V do -0,8 V (prostředí organického rozpouštědla) nebo od -1,1 V do -0,8 V (vodné prostředí) a došlo k zaznamenání proudové odezvy. Této techniky by bylo možné v budoucnu využít již při výrobě kvantových teček k jejich přesné specifikaci a kontrole kvality [94].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Přístroje a pomůcky

- pH metr model Orion 420A plus (Orion Research Inc, Beverly, USA)
- váhy KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- denzitometr ChemiDoc™ XRS+ System s Image Lab™ softwarem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- centrifuga miniSpin (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- magnetický separátor Dynal – MPC-S (Dynal Biotech, Oslo, Norsko)
- rotátor Grant-Bio PTR-30 (Wolf-Laboratories, UK)
- potenciostat PalmSens (PalmSens, Houten, Nizozemí)
- potenciostat EmStat Blue (PalmSens, Houten, Nizozemí)
- tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou rtuťovým filmem (C(Hg)-C-Ag/AgCl) (IS-HM1, PalmSens, Nizozemí)
- tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou (C-C-Ag/AgCl) (OHT-000, Orion High Technologies, Španělsko)
- tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou (C-C-Ag/AgCl) (DRP C-110, DropSens, Španělsko)
- software PStace (PalmSens, Houten, Nizozemí)
- aparatura pro diskontinuální elektroforézu Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, USA)
- zdroj napětí PowerPac 200 (Bio-Rad, USA)
- třepačka – multifunkční Orbital Shaker, P5U-20i (Biosan, Lotyšsko)
- ultrazvuk – SONOREX DIGITECH (Bandelin, Berlín, Německo)

## 2.2 Elektrochemická analýza iontů kovů na tištěných tříelektrodových senzorech

Pro analýzu modelových vzorků obsahující ionty kovů a jejich směsi byly zvoleny tištěné tříelektrodové senzory IS-HM1, DRP C-110 a OHT-000. Ionty kovů byly detegovány metodou anodické rozpouštěcí voltametrie.

### 2.2.1 Elektrochemická analýza iontů kovů na tištěných tříelektrodových senzorech se rtuťovým filmem

#### Potřeby:

- Tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou rtuťovým filmem (C(Hg)-C-Ag/AgCl) (IS-HM1, PalmSens, Nizozemí)

#### Chemikálie:

- Kyselina chlorovodíková p. a. (HCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Standardní roztok In(III) (Indium atomic absorption standard solution) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Standardní roztok Pb(II) (Lead atomic absorption standard solution) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Standardní roztok Cd(II) (Cadmium standard solution) (Merc KGaA, Darmstadt, Germany)
- Standardní roztok Zn(II) (Zinc atomic absorption standard solution) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

#### Roztoky:

- 0,02 M HCl, 0,1 M HCl, 0,5 M HCl, 1 M HCl
- 1 ppm Pb(II), Cd(II), In(III), Zn(II)
- 10 ppm Pb(II), Cd(II), In(III)
- 1000 ppm Pb(II), Cd(II), In(III)

#### Postup:

Vzorky byly připraveny z příslušných zásobních roztoků standardů kovů v koncentracích 1 – 1000 ppb In(III) a Cd(II), 1 – 100 ppb Pb(II), 1 – 20 ppb Zn(II). Kovy byly analyzovány individuálně i ve směsích v přítomnosti 0,1 M HCl v celkovém objemu 50  $\mu$ l. Před měřením vzorků bylo nutné provést dvou-krokové přečištění elektrody s použitím 50  $\mu$ l 20 mM HCl následované měřením slepého vzorku (50  $\mu$ l 0,1 M HCl), přičemž samotné ionty kovů byly

analyzovány metodou square wave anodické rozpouštěcí voltametrie. Elektroda byla mezi měřeními jednotlivých vzorků promyta 3× 0,1 M HCl. Přečištění elektrody i samotné měření vzorků bylo prováděno podle parametrů uvedených v Tabulce 1. Vzniklé voltamogramy byly vyhodnocovány v programu PsTrace. Proudové odezvy pro příslušné ionty kovů byly odečteny při potenciálech: -0,5 V pro Pb(II), -0,7 V pro Cd(II), -0,6 V pro In(III) a -1,1 V pro Zn(II).

Tabulka 1: Parametry analýzy s tištěnými tříelektrodoými senzory IS-HM1

	<b>Přečištění elektrody 1</b>	<b>Přečištění elektrody 2</b>	<b>Měření</b>
<b>E stav</b>	-0,15 V	-0,15 V	-0,15 V
<b>t stav</b>	30 s	30 s	45 s
<b>E depozice</b>	-1,1 V	-1,1 V	-1,0 V (-1,4 V Zn(II))
<b>t depozice</b>	300 s	0 s	120 s (Cd(II), Pb(II), Zn(II)) 180 s (In(III))
<b>t ekvilibrace</b>	5 s	5 s	5 s
<b>E počáteční</b>	-1,1 V	-1,1 V	-1,0 V (-1,4 V Zn(II))
<b>E koncový</b>	-0,15 V	-0,15 V	-0,15 V
<b>E skok</b>	0,003 V	0,003 V	0,003 V (Cd(II), Pb(II), (In(III)) (0,005 V Zn(II))
<b>Amplituda</b>	0,02805 V	0,02805 V	0,02805 V
<b>Frekvence</b>	20 Hz	15 Hz	25 Hz

### 2.2.2 Elektrochemická analýza iontů kovů na tištěných tříelektrodoých senzorech DRP C-110 s *in situ/ex situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem

#### Potřeby:

- Tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou (C-C-Ag/AgCl) (DRP C-110, DropSens, Španělsko)

#### Chemikálie:

- Kyselina chlorovodíková p. a. (HCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Standardní roztok Pb(II) (Lead atomic absorption standard solution) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Standardní roztok Cd(II) (Cadmium standard solution) (Merc KGaA, Darmstadt, Germany)
- Standardní roztok Bi(III) (Bismuth nitrate pentahydrate) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Standardní roztok Sb(III) (Antimony standard solution) (Merc KGaA, Darmstadt, Germany)
- Ostatní chemikálie čistoty p. a. (Penta, Chrudim, ČR)

#### Roztoky:

- 0,1 M HCl, 0,5 M HCl, 1 M HCl
- 0,1 M octanový pufr pH 4,4
- 5 ppm Bi(III), Sb(III)
- 1 ppm Pb(II), Cd(II)
- 10 ppm Pb(II), Cd(II)

#### Postup:

- a) Detekce iontů kovů na DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem

Vzorky byly připraveny z příslušných zásobních roztoků standardů kovů v koncentracích 1 – 100 ppb Cd(II) a Pb(II). Kovy byly analyzovány individuálně i ve směsích po přidavku 500 ppb Bi(III) nebo Sb(III) v přítomnosti 0,1 M HCl v celkovém objemu 100  $\mu$ l.

Další testovanou variantou bylo měření vzorků v koncentracích 20 – 100 ppb pro Cd(II) a Pb(II) s přidavkem 500 ppb Bi(III) v roztoku octanového pufru okyseleného 10  $\mu$ l 0,1 M HCl o celkovém objemu 100  $\mu$ l.

- b) Detekce iontů kovů na DRP C-110 s *ex situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem

Vzorky pro elektrochemické měření byly připraveny z příslušných standardů kovů v koncentracích 10 – 100 ppb Cd(II) a Pb(II). Před samotným měřením byl povrch pracovní elektrody nejprve modifikován bismutovým nebo antimonovým filmem vytvořeným elektrodepozicí ze 100  $\mu$ l roztoku obsahujícího Bi(III) nebo Sb(III) o koncentraci 500 ppb za podmínek uvedených v Tabulce 2. Poté byla elektroda promyta



2× 0,1 M HCl a připravena pro analýzu. Kovy byly analyzovány individuálně i ve směsích v přítomnosti 0,1 M HCl v celkovém objemu 100 µl.

Ionty kovů byly analyzovány metodou square wave anodické rozpouštěcí voltametrie. Celý objem modelového vzorku byl nanášen na tištěný tříelektrodový senzor a samotné měření vzorků probíhalo podle parametrů uvedených v Tabulce 2. Vzniklé voltamogramy byly vyhodnocovány v programu PsTrace. Proudové odezvy pro příslušné ionty kovů byly odečteny při potenciálech: -0,6 V pro Pb(II) a -0,87 V pro Cd(II).

Tabulka 2: Parametry analýzy s tištěnými tříelektrodovými senzory DRP C-110

	<b>Měření vzorků (<i>In situ a Ex situ film</i>)</b>	<b>Tvorba filmu <i>Ex situ</i> (bismutový i antimonový)</b>
<b>E stav</b>	-0,15 V	-0,15 V
<b>t stav</b>	0 s	0 s
<b>E depozice</b>	-1,0 V	-0,8 V
<b>t depozice</b>	120 s	300 s
<b>t ekvilibrace</b>	2 s	2 s
<b>E počáteční</b>	-1,0 V	-1,0 V
<b>E koncový</b>	0,0 V	0,0 V
<b>E skok</b>	0,003 V	0,003 V
<b>Amplituda</b>	0,02805 V	0,02805 V
<b>Frekvence</b>	25 Hz	25 Hz

### 2.2.3 Elektrochemická analýza iontů kovů na tištěných tříelektrodových senzorech OHT-000 s *in situ/ex situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem

#### Potřeby:

- Tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou (C-C-Ag/AgCl) (OHT-000, Orion High Technologies, Španělsko)

#### Chemikálie:

- Kyselina chlorovodíková p. a. (HCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Standardní roztok Pb(II) (Lead atomic absorption standard solution) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Standardní roztok Cd(II) (Cadmium standard solution) (Merc KGaA, Darmstadt, Germany)
- Standardní roztok Zn(II) (Zinc atomic absorption standard solution) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Standardní roztok Bi(III) (Bismuth nitrate pentahydrate) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Standardní roztok Sb(III) (Antimony standard solution) (Merc KGaA, Darmstadt, Germany)

Roztoky:

- 0,1 M HCl, 1 M HCl
- 5 ppm Bi(III), Sb(III)
- 1 ppm Pb(II), Cd(II), Zn(II)
- 10 ppm Pb(II), Cd(II)

Postup:

- a) Detekce iontů kovů na OHT-000 s *in situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem

Vzorky pro elektrochemické měření byly připraveny z příslušných standardů kovů v koncentracích 1 – 100 ppb Cd(II) a Pb(II). Před samotným měřením bylo nutné provést přečištění elektrody metodou SWV s použitím 100  $\mu$ l 0,1 M HCl (deset cyklů) následované měřením slepého vzorku (100  $\mu$ l 0,1 M HCl). Kovy byly analyzovány individuálně i ve směsích po přidavku 500 ppb Bi(III) nebo Sb(III) v přítomnosti 0,1 M HCl v celkovém objemu 100  $\mu$ l. Mezi jednotlivými měřeními byla elektroda promyta 2 $\times$  0,1 M HCl.

- b) Detekce iontů kovů na OHT-000 s *ex situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem

Vzorky pro elektrochemické měření byly připraveny z příslušných standardů kovů v koncentracích 10 – 100 ppb pro Cd(II) a Pb(II) a 1 – 10 ppb pro Zn(II). Pro optimální fungování elektrody bylo nutné provést její deseti-krokové přečištění metodou SWV s použitím 100  $\mu$ l 0,1 M HCl. Povrch pracovní elektrody byl následně modifikován bismutovým nebo antimonovým filmem vytvořeným elektrodopozicí ze 100  $\mu$ l roztoku obsahujícího Bi(III) nebo Sb(III) o koncentraci 500 ppb za podmínek uvedených

v Tabulce 3. Poté byla elektroda promyta  $2 \times 0,1$  M HCl a vlastní analýzu iontů kovů ještě předcházelo měření slepého vzorku (100  $\mu$ l 0,1 M HCl). Kovy byly analyzovány individuálně i ve směsích v přítomnosti 0,1 M HCl v celkovém objemu 100  $\mu$ l. Mezi jednotlivými měřeními byla elektroda promyta  $2 \times 0,1$  M HCl.

Ionty kovů byly analyzovány metodou square wave anodické rozpouštěcí voltametrie. Celý objem modelového vzorku byl nanášen na tištěný tříelektrodový senzor a samotné měření vzorků probíhalo podle parametrů uvedených v Tabulce 3. Vzniklé voltamogramy byly vyhodnocovány v programu PsTrace. Proudové odezvy pro příslušné ionty kovů byly odečteny při potenciálech: -0,6 V pro Pb(II), -0,87 V pro Cd(II) a -1,1 V pro Zn(II).

Tabulka 3: Parametry analýzy s tištěnými tříelektrodovými senzory OHT-000

	<b>Přečištění elektrody</b>	<b>Měření vzorků (<i>In situ</i> a <i>Ex situ</i> film)</b>	<b>Tvorba filmu <i>Ex situ</i> (bismutový i antimonový)</b>
<b>E stav</b>	-0,15 V	-0,15 V	-0,15 V
<b>t stav</b>	0 s	0 s (45 s Zn(II))	0 s
<b>E depozice</b>	-1,0 V	-1,0 V (-1,4 V Zn(II))	-0,8 V
<b>t depozice</b>	0 s	120 s	300 s
<b>t ekvibrace</b>	2 s	2 s (5 s Zn(II))	2 s
<b>E počáteční</b>	-1,0 V	-1,0 V (-1,4 V Zn(II))	-1,0 V
<b>E koncový</b>	0,0 V	0,0 V (0,15 V Zn(II))	0,0 V
<b>E skok</b>	0,003 V	0,003 V (0,005 V Zn(II))	0,003 V
<b>Amplituda</b>	0,02805 V	0,02805 V	0,02805 V
<b>Frekvence</b>	25 Hz	25 Hz	25 Hz

## 2.3 Analýza kvantových teček na tištěných elektrodách s *in situ/ex situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem

Pro analýzu vzorků roztoků kvantových teček (QDs) byly zvoleny tištěné tříelektrodové senzory DRP C-110 a OHT-000. Kvantové tečky byly analyzovány metodou square wave anodické rozpouštěcí voltametrie. Vzniklé voltamogramy byly vyhodnocovány v programu PsTrace.

### Potřeby:

- Tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou (C-C-Ag/AgCl) (OHT-000, Orion High Technologies, Španělsko)
- Tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou (C-C-Ag/AgCl) (DRP C-110, DropSens, Španělsko)

### Chemikálie:

- Kyselina chlorovodíková p. a. (HCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Standardní roztok Bi(III) (Bismuth nitrate pentahydrate) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Standardní roztok Sb(III) (Antimony standard solution) (Merc KGaA, Darmstadt, Germany)
- Kvantové tečky PbS-PEG-COOH (Suzhou Xingshuo Nanotech Co., Suzhou Industrial Park, Čína)
- Kvantové tečky PbS-PEG-NH<sub>2</sub> (Suzhou Xingshuo Nanotech Co., Suzhou Industrial Park, Čína)
- Kvantové tečky CdTe-MPA (CEITEC, Brno, ČR)
- Kvantové tečky CdS/ZnS-PEG-NH<sub>2</sub> (Suzhou Xingshuo Nanotech Co., Suzhou Industrial Park, Čína)
- Kvantové tečky CdTe-GSH (CEITEC, Brno, ČR)

### Roztoky:

- 1 M HCl
- 5 ppm Bi(III), Sb(III)
- 0,1 nM PbS-PEG-COOH
- 0,1 nM PbS-PEG-NH<sub>2</sub>
- 6 µg/ml CdTe-MPA
- 0,1 nM CdS/ZnS-PEG-NH<sub>2</sub>

- 500 µg/ml CdTe-GSH

#### Postup:

- a) Elektrochemická analýza kvantových teček na tištěných senzorech DRP C-110 a OHT-000 s *in situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem

Na tištěných elektrodách DRP C-110 a OHT-000 s *in situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem bylo analyzováno různé množství QDs (2, 5 a 10 µl). QDs byly měřeny samostatně i ve směsích obsahujících různé poměry jednotlivých typů QDs. Celkový objem vzorku po přidavku 500 ppb Bi(III) nebo Sb(III) a 10 µl 1 M HCl byl 100 µl. Vzorek byl analyzován po tří minutové inkubaci. Parametry analýzy a podrobný postup měření na elektrodách DRP C-110 a OHT-000 je uveden v kapitolách 2.2.2 a 2.2.3.

- b) Elektrochemická analýza kvantových teček na tištěných senzorech DRP C-110 a OHT-000 s *ex situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem

Na tištěných elektrodách DRP C-110 a OHT-000 s *ex situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem bylo analyzováno různé množství QDs (2, 5 a 10 µl). QDs byly měřeny samostatně i ve směsích obsahujících různé poměry jednotlivých QDs. Celkový reakční objem po přidavku 10 µl 1 M HCl byl 100 µl. Vzorek byl analyzován po tří minutové inkubaci na elektrodě modifikované Bi(III) nebo Sb(III) filmem vytvořeným elektrodepozicí z roztoků příslušných kovů o koncentraci 500 ppb. Parametry analýzy a podrobný postup měření na elektrodách DRP C-110 a OHT-000 je uveden v kapitolách 2.2.2 a 2.2.3.

## **2.4 Konjugace protilátek s kvantovými tečkami**

### **2.4.1 Neorientovaná vazba jedнокrokovou karbodiimidovou metodou**

#### Potřeby:

- Protein LoBind Tubes (2 ml) (Eppendorf, Hamburk, Německo)

#### Chemikálie:

- Polyklonální králičí protilátky anti-AFP IgG (pAb anti-AFP) (1 mg/ml, YoProteins, Huddinge, Švédsko)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Kvantové tečky PbS-PEG-NH<sub>2</sub> (Suzhou Xingshuo Nanotech Co., Suzhou Industrial Park, Čína)
- Kvantové tečky CdTe-GSH (CEITEC, Brno, ČR)
- Ostatní chemikálie čistoty p. a. (Penta, Chrudim, ČR)

#### Roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 10 nM PbS-PEG-NH<sub>2</sub>
- 10 mg/ml CdTe-GSH

#### Postup:

K 50 µg pAb anti-AFP byl přidán 1 mg EDC předem rozpuštěný ve 100 µl 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3. Takto připravená směs byla inkubována při laboratorní teplotě 10 minut na rotátoru. Po inkubaci byl celý objem rozdělen na 2 × 75 µl. K jednomu alikvotu aktivovaných protilátek byly přidány 4 µl PbS-PEG-NH<sub>2</sub> QDs a k druhému 20 µl CdTe-GSH QDs, oba roztoky byly doplněny 0,1 M fosfátovým pufrem pH 7,3 na 400 µl. Z obou směsí byl odebrán původní vzorek (10 µl) na SDS-PAGE analýzu pro ověření konjugace. Zbylá směs byla inkubována přes noc při 4 °C na rotátoru. Po inkubaci byl opět odebrán vzorek (10 µl) na SDS-PAGE analýzu.

### **2.4.2 Orientovaná vazba po oxidaci protilátek pomocí jodistanu sodného**

#### Potřeby:

- Odolovací kolonky Amicon Ultra-0,5 ml, 100 K (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA)
- Protein LoBind Tubes (2 ml) (Eppendorf, Hamburk, Německo)

#### Chemikálie:

- Polyklonální králičí protilátky anti-AFP IgG (1 mg/ml, YoProteins, Huddinge, Švédsko)
- Monoklonální myší protilátky anti-AFP IgG (klon 5H7) (4 mg/ml, HyTest, Turku, Finland)
- Jodistan sodný (NaIO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kvantové tečky PbS-PEG-NH<sub>2</sub> (Suzhou Xingshuo Nanotech Co., Suzhou Industrial Park, Čína)
- Kvantové tečky CdTe-GSH (CEITEC, Brno, ČR)

- Ostatní chemikálie čistoty p. a. (Penta, Chrudim, ČR a Lach-Ner, Neratovice, ČR)

#### Roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 10 nM PbS-PEG-NH<sub>2</sub>
- 10 mg/ml CdTe-GSH

#### Postup:

20 µg protilátek bylo naředěno do 150 µl 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3. K protilátkám bylo přidáno 1,25 mg jodistanu sodného předem rozpuštěného ve 100 µl 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3. Připravená směs byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě za mírného otáčení na rotátoru ve tmě. Po inkubaci byla reakce zastavena přidáním 0,5 µl ethylenglykolu. Zoxidované protilátky byly zbaveny oxidačního činidla s použitím odsolovacích kolonek Amincon 100 K, kde se postupovalo podle pokynů výrobce. Roztok protilátek byl napipetován do horní části kolonky a byla provedena desetiminutová centrifugace při 13 000 rpm. Ve druhém kroku byla kolonka otočena a umístěna do nové mikrozkušavky a následovala centrifugace 5 minut při 3 500 rpm. Získané přečištěné protilátky byly rozděleny na dva alikvoty. K jednomu byly přidány 4 µl PbS-PEG-NH<sub>2</sub> QDs a k druhému 20 µl CdTe-GSH QDs, oba roztoky byly doplněny 0,1 M fosfátovým pufrem pH 7,3 na celkový objem 400 µl. Pro ověření konjugace byl odebrán původní vzorek (10 µl) pro SDS-PAGE. Zbýlá směs byla inkubována přes noc při 4 °C na rotátoru. Po inkubaci byl opět odebrán vzorek (10 µl) na SDS-PAGE analýzu.

Z důvodu velké sorpce reakční směsi na stěny běžných mikrozkušavek byly používány mikrozkušavky Protein LoBind Tubes s upraveným povrchem stěn pomocí speciálního polymeru, který vytváří hydrofilní film a minimalizuje nespecifickou sorpci na plastový povrch zkušavky. Ve stejných mikrozkušavkách byly připravené konjugáty i skladovány.

## **2.5 Imobilizace antigenu AFP nebo anti-AFP protilátek na magnetické částice**

#### Potřeby:

- Magnetické částice SiMAG – Carboxyl (1 µm, Chemicell, Berlín, Německo)
- Protein LoBind Tubes (2 ml) (Eppendorf, Hamburk, Německo)

#### Chemikálie:

- AFP ( $\alpha$ -fetoprotein) (1 mg/ml, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)

- Monoklonální myší protilátky anti-AFP IgG (klon 4A3) (4,3 mg/ml, HyTest, Turku, Finland)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosuccinimid sodný (S-NHS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid hydrate (MES) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ostatní chemikálie čistoty p. a. (Penta, Chrudim, ČR a Lach-Ner, Neratovice, ČR)

#### Roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,1 M PBS pufr pH 7,4
- 0,1 M MES pH 5

#### Postup:

1 mg magnetických částic SiMAG – Carboxyl byl 5× promyt 1 ml 0,1 M MES pH 5. Separace magnetických částic byla prováděna s použitím magnetického separátoru. K promytým magnetickým částicím bylo postupně přidáno 7,5 mg EDC rozpuštěného ve 300 µl 0,1 M MES pH 5 a 1,25 mg S-NHS rozpuštěného ve 200 µl 0,1 M MES pH 5. Suspenze magnetických částic byla inkubována při laboratorní teplotě na rotátoru ve tmě po dobu 30 minut. Po inkubaci byly částice promyty 2× 1 ml 0,1 M MES pH 5. K částicím bylo následně přidáno 50 µg AFP nebo monoklonálních anti-AFP protilátek předem rozpuštěných v 1 ml 0,1 M MES pH 5. Pro ověření konjugace byl odebrán původní vzorek (10 µl) pro SDS-PAGE. Imobilizace probíhala přes noc při teplotě 4 °C za mírného otáčení na rotátoru. Po inkubaci byly magnetické částice promyty 2× 1 ml 0,1 M MES pH 5 a 2× 1 ml PBS pH 7,4. Vzorek po imobilizaci a všechny promývací frakce byly odebrány a uchovány pro SDS-PAGE analýzu.

## **2.6 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)**

#### Chemikálie:

- Akrylamid (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N'-methylen-bis-akrylamid (C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)



- Tris(hydroxymethyl) - aminomethan ( $C_4H_{11}NO_3$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dodecylsulfát sodný (SDS,  $C_{12}H_{25}NaO_4S$ ) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Persíran amonný ( $(NH_4)_2S_2O_8$ ) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- N,N,N',N'- tetramethylethylendiamin (TEMED,  $C_6H_{16}N_2$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Standard molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Standards – Unstained, Mr 10 – 250 kDa, (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Ostatní chemikálie čistoty p. a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

#### Roztoky:

- roztok A: 30 % směs akrylamidu a N,N'-metylen-bis-akrylamidu
- roztok B: 1,5 M Tris-HCl pufr pH 8,8 (úprava pH pomocí 6 M HCl)
- roztok C: 1,0 M Tris-HCl pufr pH 6,8 (úprava pH pomocí 6 M HCl)
- roztok D: 10 % roztok SDS
- roztok E: 10 % roztok persíranu amonného (připravit vždy čerstvý)
- 2x Laemmlí Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- elektrodový pufr pH 8,3 – 8,6: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin a 0,1 % SDS

#### Postup:

Nejdříve byl ve zkumavce připraven dělicí gel (10 %) smícháním roztoků podle Tabulky 4. Do zkumavky byla postupně napipetována destilovaná voda a roztoky A, B, D, TEMED a na závěr roztok E. Směs byla promíchána a napipetována po rysku do prostoru mezi dvě skla fixovaná ve stojánku. Následně byl nalitý gel převrstven destilovanou vodou až po okraj krycího skla. Gel zpolymeroval během 20 - 30 minut a mezi gelem a vodou se vytvořilo ostré rozhraní. Přebytná voda nad dělicím gelem byla odsáta filtračním papírem. V následujícím kroku byl podle Tabulky 4 připraven zaostřovací gel (5 %). Do zkumavky byly opět postupně napipetovány roztoky ve stejném pořadí, jako při přípravě dělicího gelu. Směs byla promíchána a napipetována do prostoru mezi dvě skla na dělicí gel až po okraj krycího skla. V závěru byla mezi dvě skla vložena šablona („hřebínek“) pro vytvoření jamek v zaostřovacím gelu. Po ukončení polymerace (přibližně 15 minut) byla šablona vyjmuta, skla s gelem byla umístěna do stojánku, který byl vložen do elektroforetické aparatury („vany“). Do vany a prostoru mezi skly s gely byl nalit elektrodový pufr po označené rysky tak, že pufrem byly zaplněny i dávkovací jamky v zaostřovacím gelu.

Tabulka 4: Příprava gelů pro SDS-PAGE

	<b>Zaostřovací gel 5 % (ml)</b>	<b>Dělicí gel 10 % (ml)</b>
<b>Destilovaná voda</b>	1,4	2,0
<b>Roztok A</b>	0,33	1,65
<b>Roztok B</b>	-	1,25
<b>Roztok C</b>	0,25	-
<b>Roztok D</b>	0,02	0,05
<b>Roztok E</b>	0,02	0,05
<b>TEMED</b>	0,002	0,002

Vzorky pro elektroforetické dělení byly připraveny smícháním roztoku vzorku a vzorkového roztoku v poměru 1:1 (v/v). Směs byla povařena po dobu 3 minut. Standard molekulových hmotností (marker) byl na gel dávkován bez povaření. Pomocí Hamiltonovy stříkačky byly na gel dákovány jednotlivé roztoky vzorků (15  $\mu$ l) a markeru (4  $\mu$ l). Hodnota konstantního napětí byla nastavena na 180 V a proud na 30 mA (pro jeden gel) a bylo spuštěno elektroforetické dělení. Dělení bylo ukončeno po doputování bromfenolové modři po spodní okraj skel (cca 50 minut). Po ukončení dělení byly gely vyjmuty a přeneseny do Petriho misky, ve které probíhalo barvení gelu.

### **Barvení gelu pomocí roztoku amoniakálního stříbra**

#### Chemikálie:

- Kyselina octová (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Ethanol (bez označení)
- Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dusičnan stříbrný p. a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Amoniak (Merc KGaA, Darmstadt, Germany)
- Hydroxid sodný p. a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina citronová (Penta, Chrudim, ČR)
- Formaldehyd (Penta, Chrudim, ČR)

#### Roztoky:

- Fixační roztok: 5 % kyselina octová + 50 % ethanol (skladovat při laboratorní teplotě)
- 10 % roztok glutaraldehydu (nutno připravovat vždy čerstvý)

- Roztok amoniakálního stříbra: 20 % dusičnan stříbrný byl přikapáván k roztoku (21 ml destilované vody, 1,4 ml vodného roztoku amoniaku a 239  $\mu$ l 9 M hydroxidu sodného) až do vzniku světle hnědého zákalu. Poté byl roztok doplněn na 100 ml destilovanou vodou.
- Vyvolávací roztok: 0,05 % kyselina citrónová + 0,04 % formaldehyd (nutno skladovat při pokojové teplotě a v tmavé lahvi)
- Ustalovací roztok: 5 % kyselina octová

#### Postup:

Po elektroforetickém dělení byl gel propláchnut vodou a fixován při 4 °C ve fixačním roztoku přes noc. Po fixaci byl gel zpětně rehydratován v destilované vodě po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po rehydrataci následovala inkubace v roztoku 10 % glutaraldehydu po dobu 30 minut. Následně byl gel promýván destilovanou vodou (6 $\times$  10 minut) a inkubován v roztoku amoniakálního stříbra po dobu 15 minut. Poté byl gel opláchnut destilovanou vodou a přelit vyvolávacím roztokem. Po vyvolání gelu do požadované intenzity proteinových proužků byl vyvolávací roztok slit a gel byl přelit ustalovacím roztokem, který umožňuje delší dobu skladování gelu. Gel byl vyfocen a denzitometricky vyhodnocen na stanici Bio-Rad Chemidoc XRS+ a software Image Lab.

## **2.7 Optimalizace ředění konjugátu anti-AFP<sup>QDs</sup> na tištěných elektrodách s *in situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem**

#### Potřeby:

- Tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou (C-C-Ag/AgCl) (OHT-000, Orion High Technologies, Španělsko)
- Tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou (C-C-Ag/AgCl) (DRP C-110, DropSens, Španělsko)
- Magnetické částice SiMAG – Carboxyl s imobilizovaným AFP (viz. kapitola 2.5)
- Polyklonální králičí anti-AFP IgG nebo monoklonální myší anti-AFP IgG (klon 5H7) protilátky konjugované s kvantovými tečkami PbS-PEG-NH<sub>2</sub> nebo CdTe-GSH (viz. kapitola 2.4)
- Protein LoBind Tubes (2 ml) (Eppendorf, Hamburk, Německo)

#### Chemikálie:

- Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková (HCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Standardní roztok Bi(III) (Bismuth nitrate pentahydrate) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Standardní roztok Sb(III) (Antimony standard solution) (Merc KGaA, Darmstadt, Germany)
- Ostatní chemikálie čistoty p. a. (Penta, Chrudim, ČR)

#### Roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3 s 1 M NaCl
- 0,1 M HCl
- blokační roztok: 0,2 % BSA + 0,1 % Tween 20 v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3
- 5 ppm Bi(III), Sb(III)

#### Postup:

Částice SiMAG – Carboxyl s navázaným antigenem AFP (1  $\mu\text{g}$ ) byly promyty  $5 \times 1$  ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3. K promytým částicím byly přidány příslušné objemy konjugátů v rozmezí koncentrací protilátek 1 až 6  $\mu\text{g}$  a blokační roztok v objemu 500  $\mu\text{l}$ . Vzorky byly doplněny do 1 ml 0,1 M fosfátovým pufrům pH 7,3 a následně inkubovány 60 minut při laboratorní teplotě na rotátoru. Po inkubaci byl nosič promyt  $2 \times 1$  ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 s 1 M NaCl a  $3 \times 1$  ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3. Další krok zahrnoval přidání 100  $\mu\text{l}$  roztoku 0,1 M HCl s obsahem 500 ppb Bi(III) nebo Sb(III). Následovala tři minutová inkubace a poté byl roztok dávkován na tištěnou elektrodu a byla spuštěna analýza. Podmínky analýzy včetně parametrů nastavených při měření na jednotlivých elektrodách byly stejné jako v kapitolách 2.2.2 a 2.2.3. Vzniklé voltamogramy byly vyhodnocovány v programu PsTrace.

## **2.8 Elektrochemická detekce $\alpha$ -fetoproteinu na tištěných elektrodách s *in situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem**

#### Potřeby:

- Tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou (C-C-Ag/AgCl) (OHT-000, Orion High Technologies, Španělsko)

- Tištěné tříelektrodové senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou (C-C-Ag/AgCl) (DRP C-110, DropSens, Španělsko)
- Magnetické částice SiMAG – Carboxyl s imobilizovanými monoklonálními myšími protilátkami anti-AFP IgG (klon 4A3) (viz. kapitola 2.5)
- Protein LoBind Tubes (2 ml) (Eppendorf, Hamburk, Německo)

#### Chemikálie:

- AFP ( $\alpha$ -fetoprotein) (1 mg/ml, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Monoklonální myší protilátky anti-AFP IgG (klon 5H7) konjugované s kvantovými tečkami PbS-PEG-NH<sub>2</sub> (viz. kapitola 2.4)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková (HCl) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Standardní roztok Bi(III) (Bismuth nitrate pentahydrate) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Standardní roztok Sb(III) (Antimony standard solution) (Merc KGaA, Darmstadt, Germany)
- Ostatní chemikálie čistoty p. a. (Penta, Chrudim, ČR)

#### Roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3 s 1 M NaCl
- 0,1 M HCl
- blokační roztok: 0,2 % BSA + 0,1 % Tween 20 v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3
- 5 ppm (Bi(III), Sb(III))

#### Postup:

Částice SiMAG – Carboxyl s navázanými monoklonálními protilátkami anti-AFP (2  $\mu$ g) byly promyty 5 $\times$  1 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3. K promytým částicím byl přidán antigen AFP v koncentracích od 1 ng do 500 ng a blokační roztok v objemu 500  $\mu$ l. Vzorky byly doplněny na objem 1 ml 0,1 M fosfátovým pufrům pH 7,3 a inkubovány 60 minut při laboratorní teplotě na rotátoru. Po inkubaci byl nosič promyt 3 $\times$  1 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3. Poté byl k nosiči přidán konjugát v objemu 40  $\mu$ l (2  $\mu$ g mAb anti-AFP<sup>PbS QDs</sup>) a blokační roztok v objemu 500  $\mu$ l. Vzorky byly doplněny na objem 1 ml 0,1 M fosfátovým pufrům pH 7,3 a inkubovány 60 minut při laboratorní teplotě na rotátoru. Následný postup

zahrnoval promytí nosiče  $2 \times 1$  ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 s 1 M NaCl a  $3 \times 1$  ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3. Po promytí bylo k částicím přidáno 100  $\mu$ l roztoku 0,1 M HCl s obsahem 500 ppb Bi(III) nebo Sb(III). Vzorby byly inkubovány tři minuty a dávkovány na povrch tištěného tříelektrodeového senzoru. Podmínky analýzy včetně parametrů nastavených při měření na jednotlivých elektrodách jsou uvedeny v kapitolách 2.2.2 a 2.2.3. Vzniklé voltamogramy byly vyhodnocovány v programu PsTrace.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Náplní této diplomové práce bylo testování vybraných tištěných tříelektrodoých senzorů s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou bismutovým nebo antimonovým filmem. Byly testovány jednorázové komerční tříelektrodové tištěné senzory s uhlíkovou pracovní elektrodou DRP C-110 (DropSens, Španělsko) a OHT-000 (Orion High Technologies, Španělsko). Byly vyzkoušeny dvě varianty přípravy těchto filmů (*in situ* a *ex situ*). Takto modifikované elektrody byly použity nejprve pro analýzu roztoků kovových iontů individuálně i ve směsi a následně kvantových teček, a to jednotlivě nebo ve směsi. Jako elektrochemická detekční metoda byla použita square wave anodická rozpouštěcí voltametrie.

Analýza roztoků kovových iontů před samotnou analýzou kvantových teček byla důležitá, protože právě tyto kovy jsou často využívány při konstrukci kvantových teček a jejich analýzou jsme získali představu o funkčnosti modifikovaných elektrod při analýze kvantových teček. Po analýze vzorků obsahujících ionty kovů jsme se zaměřili na elektrochemickou analýzu kvantových teček PbS-PEG-NH<sub>2</sub>, CdS/ZnS-PEG-NH<sub>2</sub> a PbS-PEG-COOH od společnosti Suzhou Xingshuo Nanotech Co. (Suzhou Industrial Park, Čína) a kvantových teček CdTe-GSH a CdTe-MPA od společnosti CEITEC (Brno, ČR). Kvantové tečky byly analyzovány jednotlivě i ve směsích o různé koncentraci za podmínek testovaných pro směsi iontů.

Další část práce byla zaměřena na použití testovaných kvantových teček pro přípravu konjugátů, přesněji tzv. sekundárních protilátek značených kvantovými tečkami. Tyto značené protilátky byly následně využívány jako protilátky umožňující detekci proteinu  $\alpha$ -fetoproteinu pomocí imunomagnetického senzoru. Ten v principu sestává z primárních anti-AFP protilátek imobilizovaných na magnetických částicích, pomocí kterých je ze vzorku vychytán stanovovaný protein, který je následně detegován pomocí připravených konjugátů. V případě použití směsi kvantových teček z různých materiálů lze stanovit více proteinů ze vzorku současně. To je umožněno rozdílnými detekčními potenciály kovových iontů, které tvoří kvantové tečky. Z toho důvodu byly testovány směsi kvantových teček a byly optimalizovány podmínky detekce.

Na základě analýzy kvantových teček a porovnání voltamogramů jsme vybrali kvantové tečky, které vyhovují našim požadavkům pro vytvoření konjugátu a současně jsme eliminovali nevhodné kvantové tečky. Pro tvorbu konjugátu byly vybrány dva druhy

kvantových teček. Jednalo se o kvantové tečky PbS-PEG-NH<sub>2</sub> (Suzhou Xingshuo Nanotech Co., Suzhou Industrial Park, Čína) a CdTe-GSH (CEITEC, Brno, ČR). Tyto kvantové tečky byly následně použity pro označení polyklonálních králičích protilátek anti-AFP IgG (YoProteins, Huddinge, Švédsko) nebo monoklonálních myších protilátek anti-AFP IgG (klon 5H7) (HyTest, Turku, Finland). Testování připravených konjugátů zahrnovalo ověření jejich funkčnosti a schopnosti vázat antigen i po označení kvantovými tečkami. Toto ověření bylo provedeno detekcí vzniklého imunokomplexu prostřednictvím elektrochemické detekce iontů kovů, uvolněných z jádra kvantových teček v kyselém prostředí.

Nejprve byl konjugát testován při sestavení tzv. polovičního imunokomplexu tvořeného antigenem AFP imobilizovaným na magnetických částicích a anti-AFP<sup>QDs</sup>. Po testování polovičního imunokomplexu a optimalizaci ředění konjugátu byl konjugát použit při detekci finálního imunokomplexu anti-AFP – AFP – anti-AFP<sup>QDs</sup>.

### **3.1 Elektrochemická analýza iontů kovů na tištěných tříelektrodových senzorech**

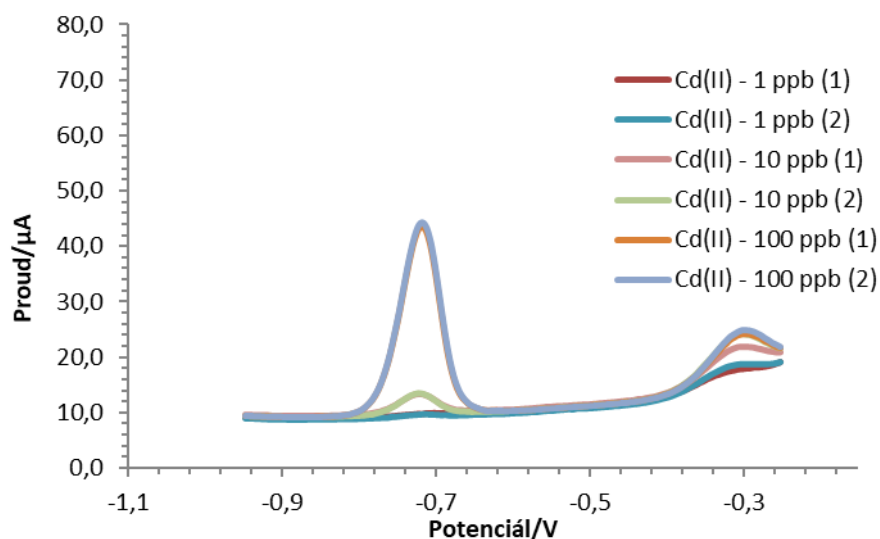
#### **3.1.1 Analýza iontů kovů na tištěných elektrodách se rtuťovým filmem**

Tištěné senzory IS-HM1 jsou komerčně dostupné a primárně výrobcem doporučované pro tento druh aplikací. Tyto senzory jsou standardně používány v našich laboratořích, a proto byly zvoleny pro počáteční experimenty. Na senzorech IS-HM1 byly analyzovány roztoky obsahující ionty kovů Cd(II), Pb(II), In(III) a Zn(II) (viz. kapitola 2.2.1). Vzorokly byly analyzovány v objemu 50  $\mu$ l. Záznamy analýz jsou uvedeny na Obr. 20 – 22. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku. Konkrétně -0,7 V pro Cd(II), -0,5 V pro Pb(II) a -0,6 V pro In(III). Přesné hodnoty proudových odezev jednotlivých iontů kovů jsou uvedeny v Tabulce 5. Proudové odezvy pro Zn(II) nebylo možné ze záznamu odečíst.

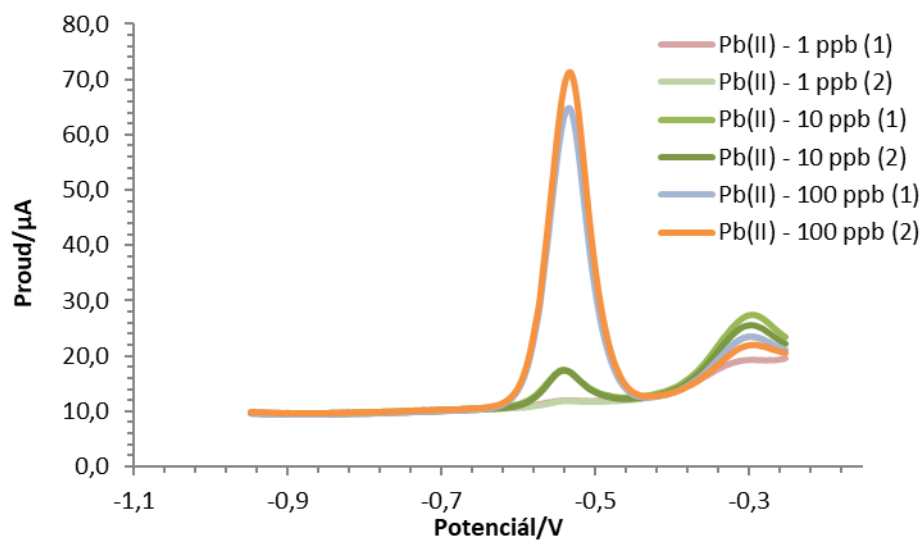


Tabulka 5: Souhrnná data analýzy jednotlivých kovových iontů Cd(II), Pb(II) a In(III) na IS-MH1 se rtuťovým filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku. Konkrétně -0,7 V pro Cd(II), -0,5 V pro Pb(II) a -0,6 V pro In(III).

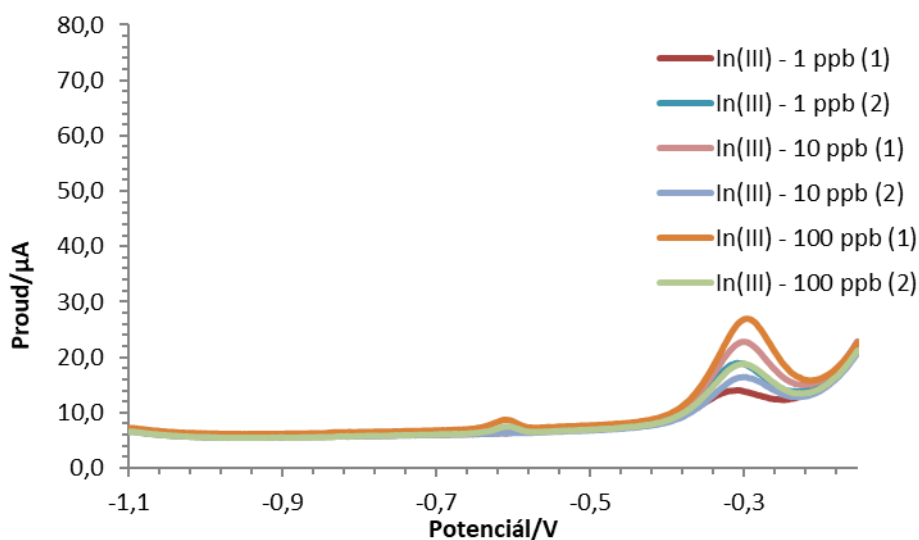
	Proud [ $\mu\text{A}$ ]							
	Cd(II) (viz. Obr. 22)		Pb(II) (viz. Obr. 22)		In(III) (viz. Obr. 22)		Zn(II)	
Koncentrace [ppb]	1. měření	2. měření	1. měření	2. měření	1. měření	2. měření	1. měření	2. měření
1	0,327	0,385	0,557	0,501	0	0	0	0
10	3,390	3,715	5,890	5,965	0	0	0	0
100	33,665	34,441	59,496	53,081	1,121	1,613	0	0



Obr. 20: Voltamogram detekce Cd(II) v rozmezí koncentrací 1 – 100 ppb na IS-HM1 se rtuťovým filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku. Konkrétně -0,7 V pro Cd(II).

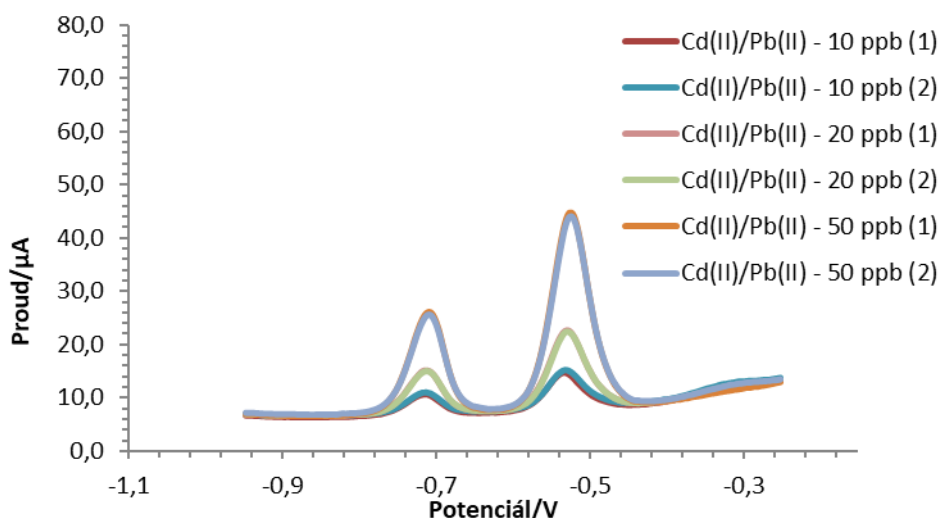


Obr. 21: Voltamogram detekce Pb(II) v rozmezí koncentrací 1 – 100 ppb na IS-HM1 se rtuťovým filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku. Konkrétně -0,5 V pro Pb(II).



Obr. 22: Voltamogram detekce In(III) v rozmezí koncentrací 1 – 100 ppb na IS-HM1 se rtuťovým filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku. Konkrétně -0,6 V pro In(III).

Po analýze jednotlivých iontů kovů samostatně jsme prováděli také analýzu jejich směsí, kdy byly jednotlivé ionty kovů přidávány ve stejných koncentracích (Obr. 23). Důvodem bylo ověření, zda bude možné analyzovat ionty kovů (a následně pak kvantové tečky) ve směsi vedle sebe v rámci analýzy na jedné elektrodě.



Obr. 23: Voltamogram simultánní analýzy Cd(II) a Pb(II) v rozmezí koncentrací 10 – 50 ppb na IS-HM1 se rtuťovým filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku. Konkrétně -0,7 V pro Cd(II) a -0,5 V pro Pb(II).

Tištěné senzory IS-HM1 se osvědčily při analýze modelových vzorků obsahujících ionty Cd(II) a Pb(II) jednotlivě i ve směsích. Při porovnání proudových odezev pro In(III) s proudovými odezvami pro Cd(II) a Pb(II) při stejných koncentracích daných iontů můžeme pozorovat výrazně nižší signály pro In(III) (viz. Tabulka 5 a Obr. 20 – 22). Senzor IS-HM1 tedy není vhodný pro analýzu iontů In(III) z důvodu nízké citlivosti. Podobných, dokonce horších výsledků bylo dosaženo při analýze vzorků obsahujících Zn(II). Ani zde nebylo dosaženo kvalitních dobře definovatelných píků, podle kterých by bylo možné kvantifikovat Zn(II) ve vzorku. Navíc zde byly pozorovány parazitní píky a dvojpíky (data nejsou uvedena).

### 3.1.2 Analýza iontů kovů na tištěných elektrodách DRP C-110 s *in situ/ex situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem

Po analýzách iontů kovů na tištěných senzorech IS-HM1 jsme se již zaměřili na přípravu a testování bismutového a antimonového filmu, kterým byla modifikována pracovní uhlíková elektroda tištěných senzorů DRP C-110 od firmy DropSens a poté i OHT-000 firmy Orion High Technologies. Bismut a antimon byly zvoleny jako méně toxická alternativa ke rtuťovému filmu.

V této části jsme nejprve použili senzory DRP C-110 pro analýzu vzorků obsahujících ionty kovů Cd(II) a Pb(II). Kovy byly analyzovány individuálně i ve směsích podle postupu uvedeného v experimentální části (viz. kapitola 2.2.2)

Povrch pracovní uhlíkové elektrody byl v tomto případě modifikován bismutovým nebo antimonovým filmem, vytvořeným *in situ* nebo *ex situ* z roztoku obsahujícího 500 ppb Bi(III)/Sb(III). Tvorba filmu *in situ* byla založena na elektrodepozici bismutu/antimonu současně s analyzovanými látkami (ionty kovů) z roztoku. V případě *ex situ* filmu probíhá elektrodepozice samostatně – před vlastní analýzou vzorku. Při práci jsme se soustředili na porovnání typu použitého filmu (bismutový nebo antimonový) a způsobu jeho přípravy (*in situ* nebo *ex situ*). Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku. Konkrétně -0,85 V (+/- 0,02 V) pro Cd(II) a -0,6 V pro Pb(II). Přesné hodnoty jsou uvedeny v Tabulkách 6 a 7.

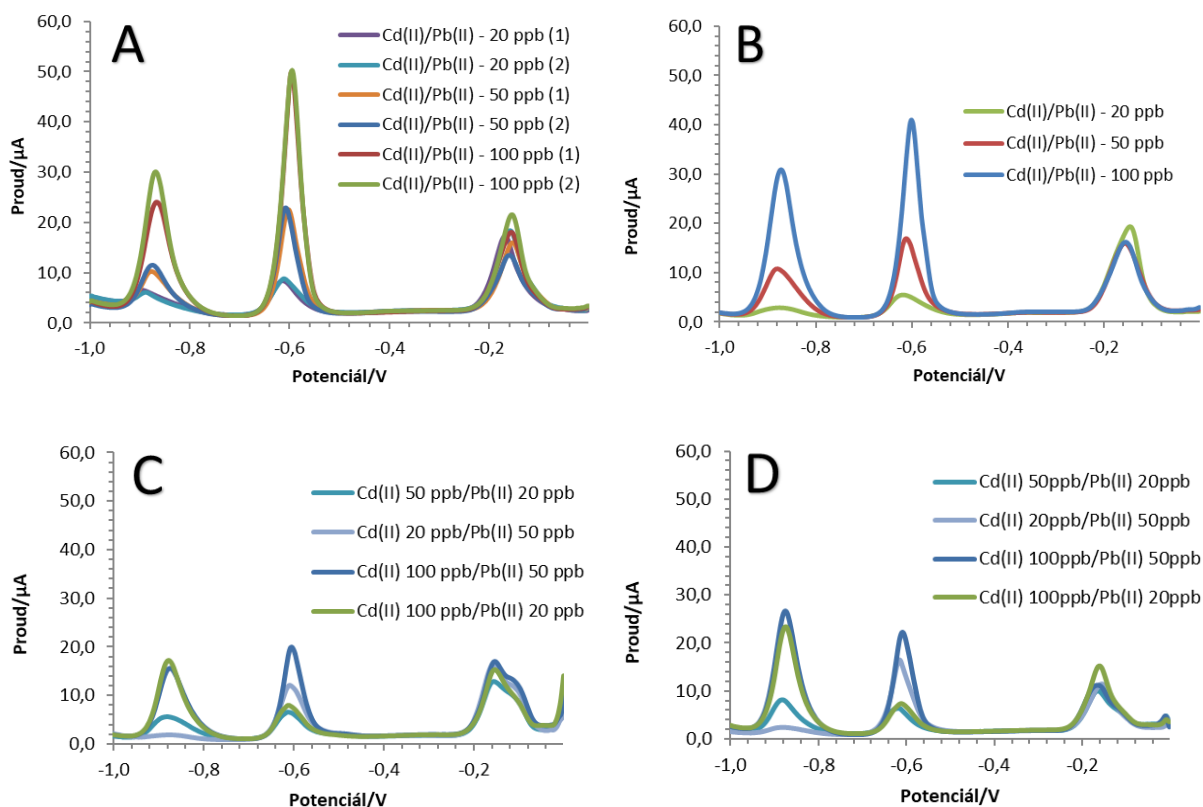
Tabulka 6: Souhrnná data analýzy jednotlivých kovových iontů Cd(II) a Pb(II) na DRP C-110 s *in situ* nebo *ex situ* vytvořeným bismutovým filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku. Konkrétně -0,85 V pro Cd(II) a -0,6 V pro Pb(II). Pozn.: proškrtnuté pole = daná koncentrace nebyla měřena.

Koncentrace [ppb]	Proud [ $\mu$ A]			
	<i>In situ</i>		<i>Ex situ</i>	
	Cd(II)	Pb(II)	Cd(II)	Pb(II)
<b>1</b>	0	0,353	–	–
<b>10</b>	0	2,116	0 + výskyt parazitního píku s vrcholem při potenciálu -0,5 V	72,503
<b>50</b>	–	–	2,861 + výskyt parazitního píku s vrcholem při potenciálu -0,5 V	5,674
<b>100</b>	13,477	39,449	4,171 + výskyt parazitního píku s vrcholem při potenciálu -0,5 V	17,362

Tabulka 7: Souhrnná data analýzy jednotlivých kovových iontů Cd(II) a Pb(II) na DRP C-110 s *in situ* nebo *ex situ* vytvořeným antimonovým filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku. Konkrétně -0,85 V pro Cd(II) a -0,6 V pro Pb(II). Pozn.: proškrtnuté pole = daná koncentrace nebyla měřena.

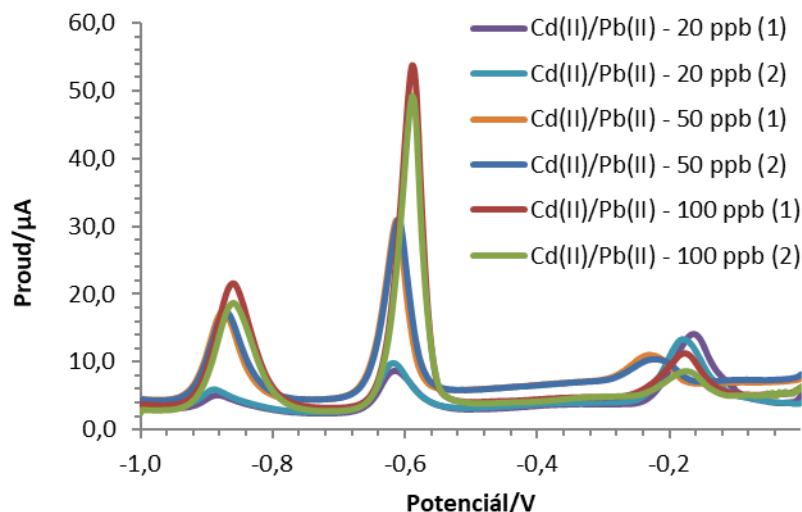
Proud [ $\mu$ A]				
Koncentrace [ppb]	<i>In situ</i>		<i>Ex situ</i>	
	Cd(II)	Pb(II)	Cd(II)	Pb(II)
1	–	–	–	–
10	0,402	9,064	0,113 + výskyt parazitního píku s vrcholem při potenciálu -0,6 V	1,620
50	13,813	15,837	10,222 + výskyt parazitního píku s vrcholem při potenciálu -0,6 V	14,345
100	28,301	24,554	29,856 + výskyt parazitního píku s vrcholem při potenciálu -0,6 V	93,519

Po analýze Cd(II) a Pb(II) individuálně byly ionty analyzovány i ve směsích, kdy byl každý z iontů nejprve přidán ve stejné a pak v různých koncentracích. Naším cílem bylo opět ověření, zda bude možné analyzovat kovové ionty (potažmo kvantové tečky) ve směsi vedle sebe v rámci analýzy na jedné elektrodě. Záznamy simultánních analýz na DRP C-110 s bismutovým nebo antimonovým filmem vytvořeným *in situ* nebo *ex situ* jsou uvedeny na Obr. 24.



Obr. 24: Voltamogramy simultánní analýzy Cd(II) a Pb(II) v rozmezí koncentrací 20 – 100 ppb na DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem a na DRP C-110 s *ex situ* vytvořeným bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku. Konkrétně -0,85 V (+/- 0,02 V) pro Cd(II) a -0,6 V pro Pb(II).

Další testovanou variantou bylo měření modelových vzorků obsahujících Cd(II) a Pb(II) v prostředí octanového pufru (viz. kapitola 2.2.2). V tomto případě byla pracovní uhlíková elektroda modifikována *in situ* vytvořeným bismutovým filmem (Obr. 25). Důvodem pro zkoušení analýzy v prostředí octanového pufru bylo to, že tato metoda byla v literatuře zmíněna [54,74,78]



Obr. 25: Voltamogram simultánní analýzy Cd(II) a Pb(II) v rozmezí koncentrací 20 – 100 ppb na DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem v prostředí octanového pufru. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícím maximu výšky píku. Konkrétně -0,85 V pro Cd(II) a -0,6 V pro Pb(II).

I v případě měření v prostředí octanového pufru bylo dosaženo kvalitních, dobře definovatelných a oddělených píků pro oba ionty (Obr. 25) a může být tedy použito. Tato skutečnost koresponduje s literaturou. Nicméně v naší aplikaci s daným druhem elektrod se na rozdíl od literatury neprokázala vyšší citlivost metody.

Porovnání záznamů měření na DRP C-110 s bismutovým nebo antimonovým filmem vytvořeným *in situ* ukazuje, že nejlepšími výsledky při detekci iontů Cd(II) individuálně bylo dosaženo s DRP C-110 s *in situ* vytvořeným antimonovým filmem (Tabulka 7). Při detekci Pb(II) individuálně se osvědčil *in situ* vytvořený bismutový film (Tabulka 6). V případě použití *ex situ* filmů nebylo dosaženo tak kvalitních a dobře definovatelných píků ani pro jeden ze dvou kovů při porovnání s *in situ* vytvořenými filmy. Proudové odezvy nebyly lineární, a navíc bylo možné pozorovat parazitní píky (zejména při detekci Cd(II)).

Při simultánní analýze Cd(II) a Pb(II) jsme dosáhli nejlepších výsledků s DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem (Obr. 24 A). V tomto případě byly píky nejvyšší, dobře definovatelné, bez výskytu parazitních píků a proudová odezva rostla lineárně se zvyšující se koncentrací iontů kovů ve vzorku. V případě použití *ex situ* filmů (bismutového i antimonového) (Obr. 24 C a D) bylo dosaženo nižších signálů než s *in situ* filmy. Při pohledu na záznamy na Obr. 24 můžeme vidět, že při simultánní analýze Cd(II) a Pb(II) bylo ve všech případech dosaženo ostrých, dobře definovatelných píků a nevyskytovaly se zde parazitní píky.

### 3.1.3 Analýza iontů kovů na tištěných elektrodách OHT-000 s *in situ/ex situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem

Po analýzách na DRP C-110 jsme přešli na testování senzorů OHT-000. I na těchto senzorech byly analyzovány vzorky obsahující ionty Cd(II) a Pb(II) a navíc ještě Zn(II). Stejně jako tomu bylo při analýzách na DRP C-110, i zde jsme testovali bismutový a antimonový film vytvořený *in situ* nebo *ex situ* z roztoku obsahujícího Bi(III)/Sb(III) v koncentraci 500 ppb (viz. kapitola 2.2.3) a sledovali jejich vliv na výstupní signál. Roztoky iontů kovů byly analyzovány individuálně v koncentracích uvedených v Tabulkách 8 a 9 a poté i ve směsích (Obr. 26). Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu píku. Konkrétně -0,85 V (+/- 0,02 V) pro Cd(II) a -0,6 V (+/- 0,02 V) pro Pb(II). Při použití těchto elektrod byl pozorován nepatrný posun potenciálu maxima píku v rámci jedné série analýz na jedné elektrodě.

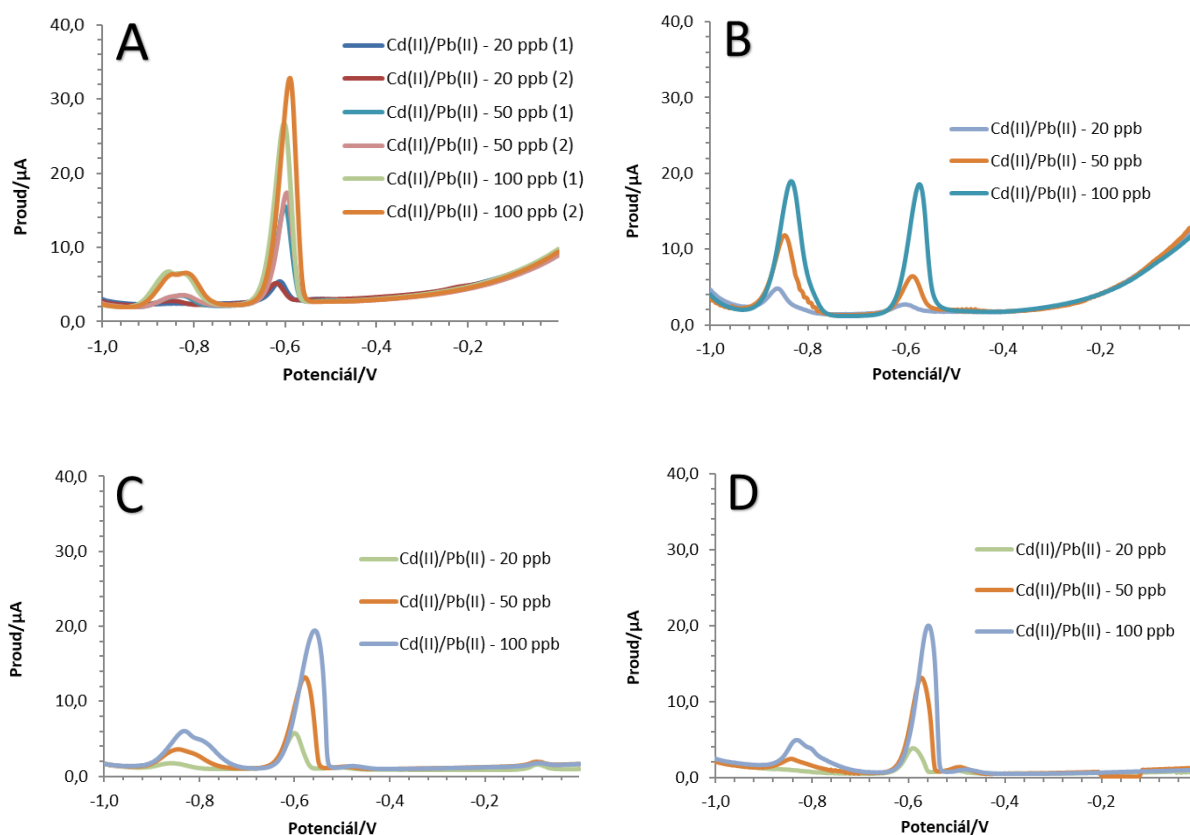
Tabulka 8: Souhrnná data analýzy jednotlivých kovových iontů Cd(II) a Pb(II) a Zn(II) na OHT-000 s *in situ* nebo *ex situ* vytvořeným bismutovým filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu píku. Konkrétně -0,85 V (+/- 0,02 V) pro Cd(II) a -0,6 V (+/- 0,02 V) pro Pb(II). Pozn.: proškrtnuté pole = daná koncentrace nebyla měřena.

Proud [ $\mu$ A]					
Koncentrace [ppb]	<i>In situ</i>		<i>Ex situ</i>		
	Cd(II)	Pb(II)	Cd(II)	Pb(II)	Zn(II)
<b>1</b>	0	0,085	–	–	<b>1 ppb = 0</b>
<b>10</b>	1,521	0,657	2,112	1,359	<b>3 ppb = 0</b>
<b>50</b>	–	–	16,551	14,964	<b>5 ppb = 0</b>
<b>100</b>	31,153	28,918	32,079	27,399	–



Tabulka 9: Souhrnná data analýzy jednotlivých kovových iontů Cd(II) a Pb(II) na OHT-000 s *in situ* nebo *ex situ* vytvořeným antimonovým filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku. Konkrétně -0,85 V (+/- 0,02 V) pro Cd(II) a -0,6 V (+/- 0,02 V) pro Pb(II). Pozn.: proškrtnuté pole = daná koncentrace nebyla měřena.

Koncentrace [ppb]	Proud [ $\mu$ A]			
	<i>In situ</i>		<i>Ex situ</i>	
	Cd(II)	Pb(II)	Cd(II)	Pb(II)
1	–	–	–	–
10	0,772	0,198	1,158	1,361
50	7,015	2,681	12,595	10,445
100	13,784	9,561	24,006	18,111



Obr. 26: Voltamogramy simultánní analýzy Cd(II) a Pb(II) v rozmezí koncentrací 20 – 100 ppb na OHT-000 s *in situ* vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem a na DRP C-110 s *ex situ* vytvořeným bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku. Konkrétně -0,85 V pro Cd(II) a -0,6 V (+/- 0,02 V) pro Pb(II).

Jak ukazují výsledky (viz Obr. 26) měření vzorků obsahujících Cd(II) a Pb(II) na elektrodách OHT-000 s *in situ* vytvořeným bismutovým (A) filmem, bylo dosaženo vysoké proudové odezvy na přítomnost Pb(II) již při nízkých koncentracích. Píky pro Pb(II) byly ostré a dobře definovatelné. Naopak píky pro Cd(II) ostré nebyly a při vyšší koncentraci Cd(II) se vyskytoval dvojpík. Proudová odezva i pro vyšší koncentrace byla pro Cd(II) výrazně menší než pro Pb(II). Při pohledu na záznam je viditelné, že pík nemá požadovaný tvar, což velmi zkresluje možnost přesné kvantifikace Cd(II) ve vzorku.

Při porovnání výsledků simultánní analýzy Cd(II) a Pb(II) s měřením na DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem (Obr. 24 A) bylo dosaženo lepších výsledků se senzorem DRP C-110. Proudové odezvy byly v tomto případě vyšší pro oba kovy a nebyly zde pozorovány žádné parazitní píky nebo dvojpíky. Tyto elektrody se tedy jeví jako vhodnější pro naše aplikace.

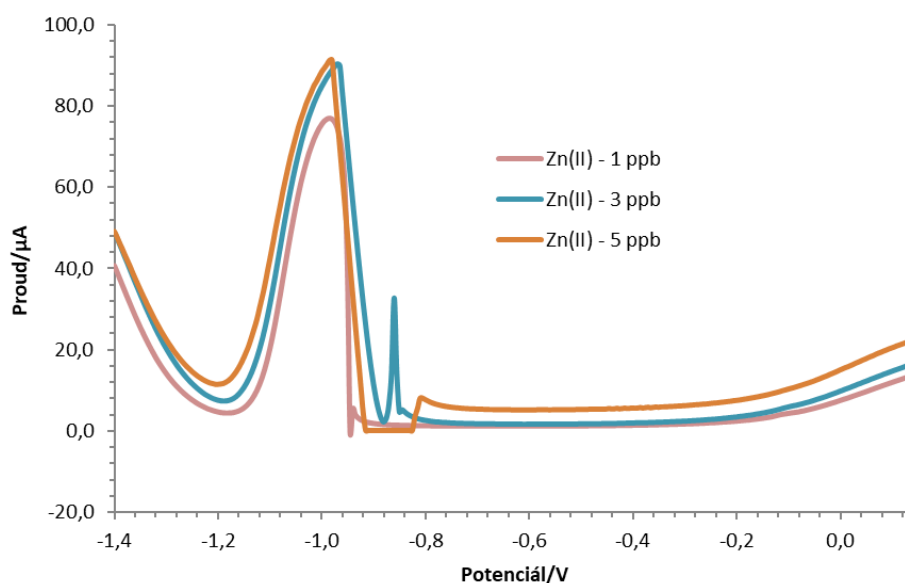
Při porovnání OHT-000 s *in situ* vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem je zřejmé, že při použití OHT-000 s *in situ* vytvořeným antimonovým filmem (B) došlo k výraznému zlepšení elektrochemických vlastností senzoru. Bylo zde dosaženo vyšších signálů při detekci Cd(II). Píky jsou ostré, bez jakékoliv deformace. Rovněž proudové odezvy rostly lineárně s rostoucí koncentrací daných iontů kovů ve vzorku. Porovnáním *in situ* vytvořených antimonových filmů na OHT-000 (Obr. 26 B) a DRP C-110 (Obr. 24 B) je zřejmé, že lepších výsledků bylo dosaženo s použitím DRP C-110. Píky pro oba ionty byly v tomto případě vyšší.

Při pohledu na záznamy měření vzorků obsahujících ionty Cd(II) a Pb(II) na OHT-000 s bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem vytvořeným *ex situ* je možné pozorovat dobře definovatelné píky pro Pb(II) pro oba typy filmů. Pro Cd(II) jsou proudové odezvy v případě použití obou modifikací (C) i (D) výrazně nižší než pro Pb(II). Píky nemají zcela ideální tvar a rovněž citlivost stanovení je nízká. Nicméně i navzdory nízké citlivosti je zachována linearita nárůstu proudových odezev v závislosti na koncentraci daných iontů kovů ve vzorku.

Při porovnání záznamů měření se senzorem OHT-000 s bismutovým nebo antimonovým filmem vytvořeným *in situ* nebo *ex situ* můžeme konstatovat, že pro analýzu vzorků s obsahem Cd(II) a Pb(II) ve směsi je jednoznačně OHT-000 s *in situ* vytvořeným antimonovým filmem (Obr. 26 B) vhodnější volbou. Naopak pokud jsou ionty Cd(II) a Pb(II) detegovány individuálně, je vhodnější použití senzoru OHT-000 s *in situ*, případně *ex situ*

vytvořeným bismutovým filmem (Tabulka 8 a 9). Nicméně z důvodu časové náročnosti přípravy *ex situ* filmu je *in situ* film vhodnější variantou.

Na tištěných senzorech OHT-000 s *ex situ* vytvořeným bismutovým filmem byly analyzovány také vzorky obsahující zinek (viz. kapitola 2.2.3). Nicméně se ukázalo, že takto modifikovaná elektroda není pro analýzu vzorků obsahujících Zn(II) vhodná. Na základě výsledků měření nebylo možné přesně stanovit obsah zinku ve vzorku (Obr. 27).

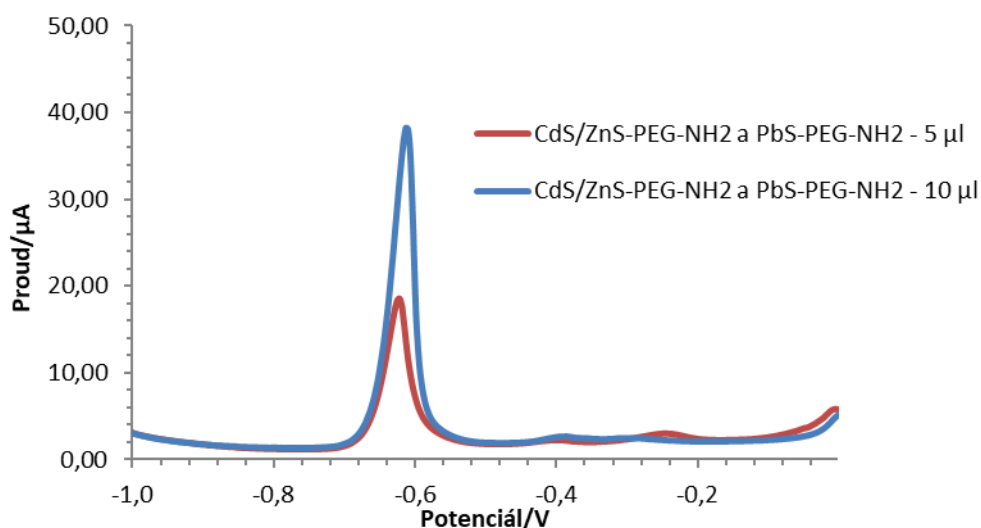


Obr. 27: Voltamogram detekce Zn(II) v rozmezí koncentrací 1 – 5 ppb na OHT-000 s *ex situ* vytvořeným bismutovým filmem.

### 3.2 Analýza kvantových teček na tištěných elektrodách s *in situ/ex situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem

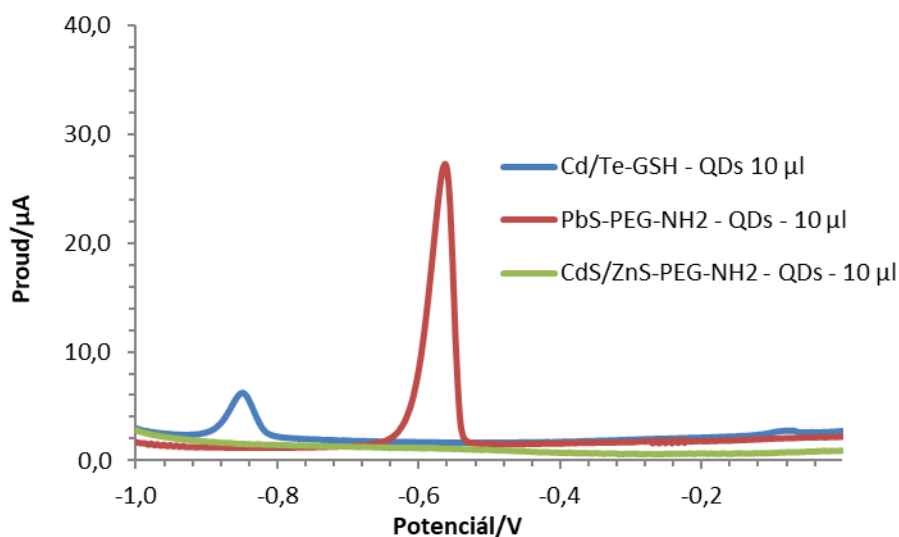
Po analýze iontů kovů jsme přistoupili k elektrochemické analýze kvantových teček. Pro testování byly zvoleny komerčně dostupné kvantové tečky PbS-PEG-NH<sub>2</sub> a CdS/ZnS-PEG-NH<sub>2</sub> od společnosti Suzhou Xingshuo Nanotech Co. (Suzhou Industrial Park, Čína) a kvantové tečky CdTe-GSH syntetizované v laboratořích CEITEC (Brno, ČR) (Obr. 28 a 29). Kvantové tečky byly analyzovány jednotlivě i ve směsích o různé koncentraci metodou anodické rozpouštěcí voltametrie po předchozí inkubaci s 0,1 M HCl, kdy došlo k rozpouštění obalu kvantové tečky a uvolnění iontů kovů, které tvořily její jádro (v našem případě Cd(II) a Pb(II)). Analýza byla provedena na senzorech DRP C-110 a OHT-000 s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou bismutovým nebo antimonovým filmem vytvořeným *in situ* nebo *ex situ* (viz. kapitola 2.3). Vzorky jednotlivých kvantových teček pro analýzu byly připraveny ze zásobních roztoků o koncentracích: 0,1 nM PbS-PEG-NH<sub>2</sub>,

0,1 nM CdS/ZnS-PEG-NH<sub>2</sub> a 100 µg/ml CdTe-GSH odebráním vždy stejného objemu roztoku kvantových teček od každého druhu. Příprava vzorku pak byla pro všechny jednotlivé vzorky stejná, tj. přidavek 0,1 M HCl a roztoku Bi(III)/Sb(III) o koncentraci 500 ppb do celkového objemu 100 µl v případě *in situ* filmu. V případě *ex situ* filmu byla přidána pouze 0,1 M HCl do celkového objemu 100 µl neboť film byl vytvořen předem elektrodepozicí bismutu nebo antimonu (viz. kapitola 2.2.2 a 2.2.3). Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku, konkrétně -0,85 V (+/- 0,02 V) pro Cd(II) a -0,6 V (+/- 0,02 V) pro Pb(II).



Obr. 28: Voltamogram simultánní analýzy dvou druhů kvantových teček (CdS/ZnS-PEG-NH<sub>2</sub> a PbS-PEG-NH<sub>2</sub>) přidaných v objemu 5 a 10 µl na DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku. Konkrétně -0,6 V pro Pb(II). Cd(II) QDs neposkytly žádnou proudovou odezvu.

Jelikož kvantové tečky CdS/ZnS-PEG-NH<sub>2</sub> neposkytly žádný signál, přistoupili jsme k testování jiného druhu kvantových teček s Cd(II) jádrem. Těmito tečkami byly CdTe-GSH syntetizované v laboratořích CEITEC (Brno, ČR). Záznam analýzy kvantových teček CdTe-GSH spolu s CdS/ZnS-PEG-NH<sub>2</sub> a PbS-PEG-NH<sub>2</sub> na OHT-000 s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem je na Obr. 29.

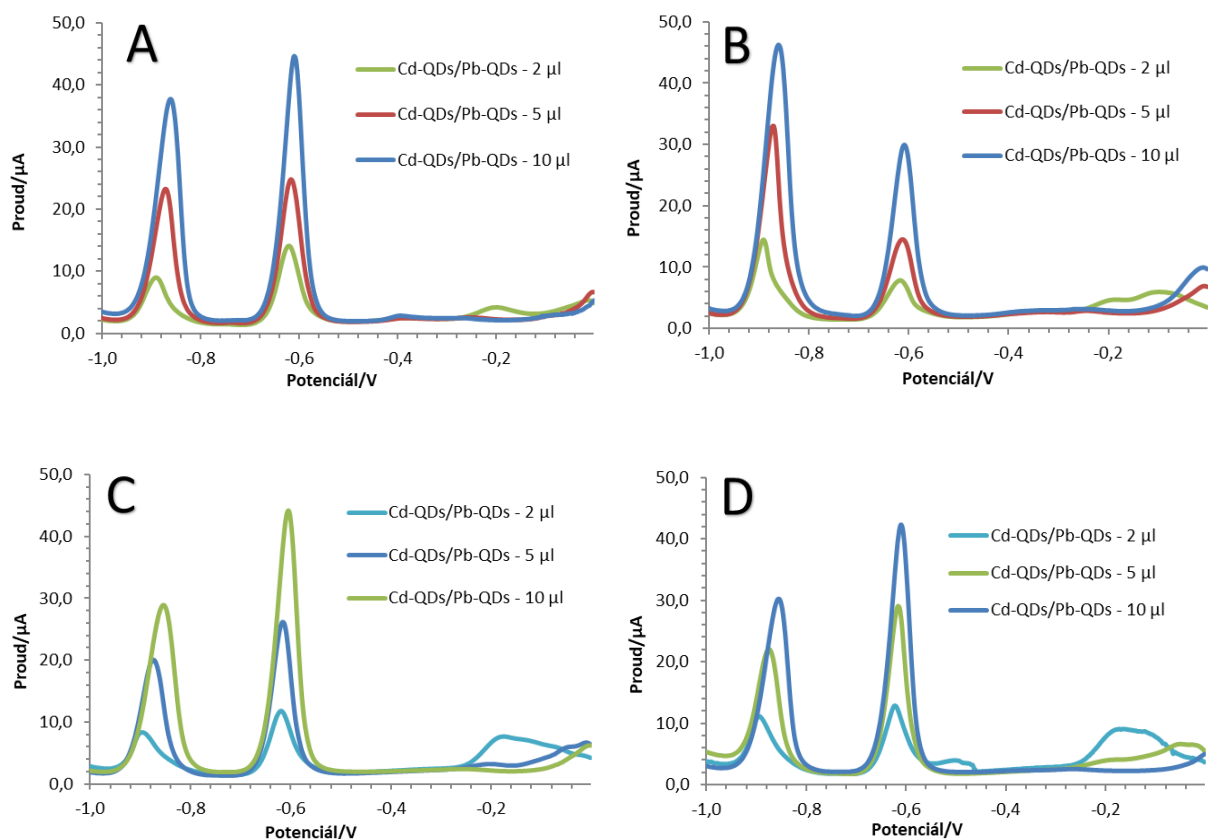


Obr. 29: Voltamogram analýzy kvantových teček CdTe-GSH, PbS-PEG-NH<sub>2</sub> a CdS/ZnS-PEG-NH<sub>2</sub> přidaných v objemu 10 µl na OHT-000 s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku. Konkrétně -0,85 V pro Cd(II) a -0,58 V pro Pb(II).

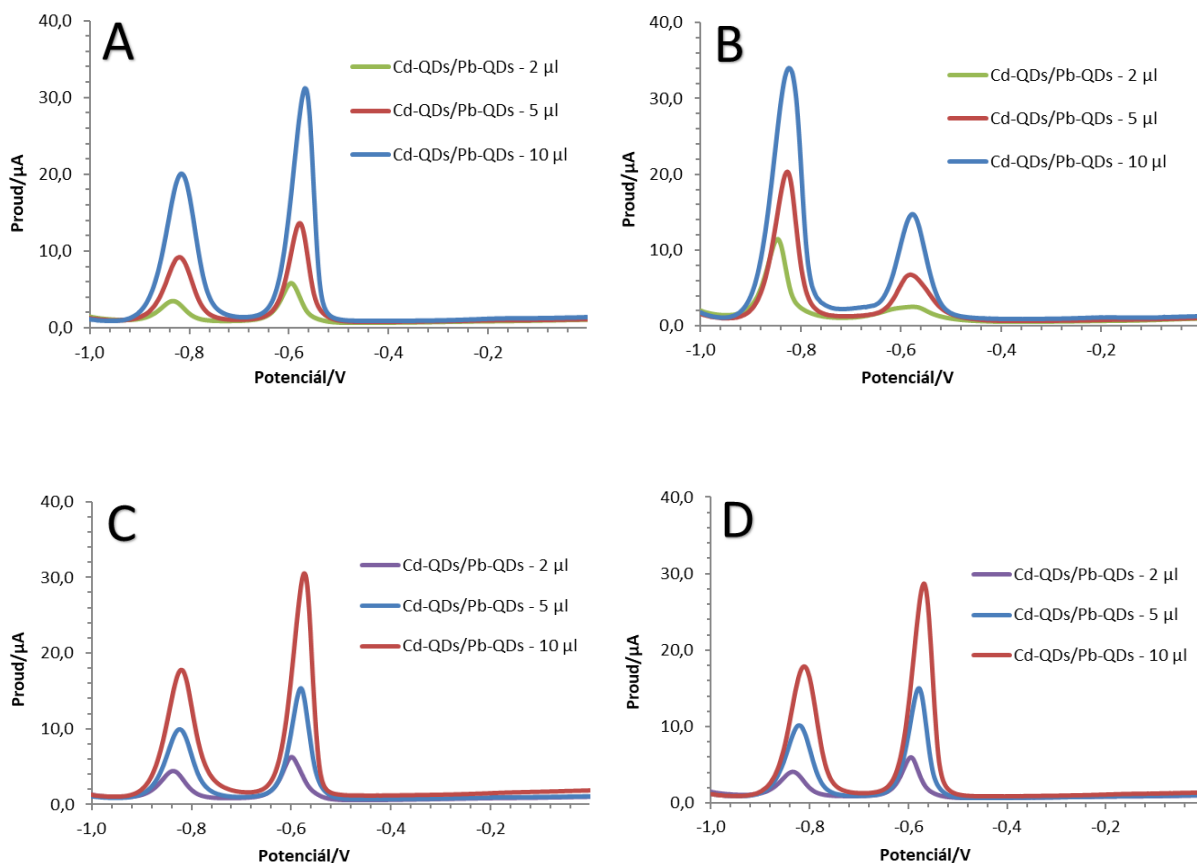
Na záznamu analýzy můžeme pozorovat pík odpovídající Cd(II) (CdTe-GSH) při potenciálu -0,85 V a pík odpovídající Pb(II) (PbS-PEG-NH<sub>2</sub>) při potenciálu -0,58 V. Komerční kvantové tečky CdS/ZnS-PEG-NH<sub>2</sub> ani v tomto případě neposkytly žádný signál a z dalších testování byly vyřazeny. Ze záznamu je rovněž patrná relativně nízká proudová odezva pro CdTe-GSH ve srovnání s PbS-PEG-NH<sub>2</sub> při stejném přidávaném objemu do modelového vzorku. Nízké signály pro Cd(II) mohly být v tomto případě zapříčiněny tím, že neznáme přesnou molární koncentraci kvantových teček CdTe-GSH. Na základě této skutečnosti jsme se rozhodli pro další analýzu zvýšit koncentraci zásobního roztoku CdTe-GSH 5× (tedy na 500 µg/ml).

Na základě výsledků analýz kvantových teček (viz. Obr. 28 a 29) jsme pro další použití při analýze vyřadili kvantové tečky CdS/ZnS-PEG-NH<sub>2</sub>, které neposkytovaly signál a dále se věnovali pouze analýze kvantových teček CdTe-GSH a PbS-PEG-NH<sub>2</sub> na senzorech DRP C-110 a OHT-000 modifikovaných bismutovým nebo antimonovým filmem vytvořeným *in situ* nebo *ex situ*. Vzorky jednotlivých kvantových teček byly připraveny přidáním 2, 5 a 10 µl od každého druhu z připravených zásobních roztoků a doplněny na objem 100 µl 0,1 M HCl a roztokem Bi(III)/Sb(III) o koncentraci 500 ppb v případě *in situ* filmu. V případě *ex situ* filmu byla přidána pouze 0,1 M HCl. Následovala tří minutová inkubace a samotná analýza. Při měřeních jsme pozorovali vliv použitého filmu na daných elektrodách na výstupní signál, a zda proudové odezvy rostou lineárně s rostoucím objemem přidávaných roztoků daných kvantových teček. Současně jsme se zaměřili na hodnocení

záznamů ve smyslu pozorování atypických a parazitních píků. Záznamy měření na DRP C-110 jsou uvedeny na Obr. 30. Měření na OHT-000 pak na Obr. 31.



Obr. 30: Voltamogramy simultánní analýzy kvantových teček CdTe-GSH a PbS-PEG-NH<sub>2</sub> přidaných v objemu 2, 5 a 10 μl na DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem a na DRP C-110 s *ex situ* vytvořeným bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku. Konkrétně -0,85 V pro Cd(II) a -0,6 V pro Pb(II).

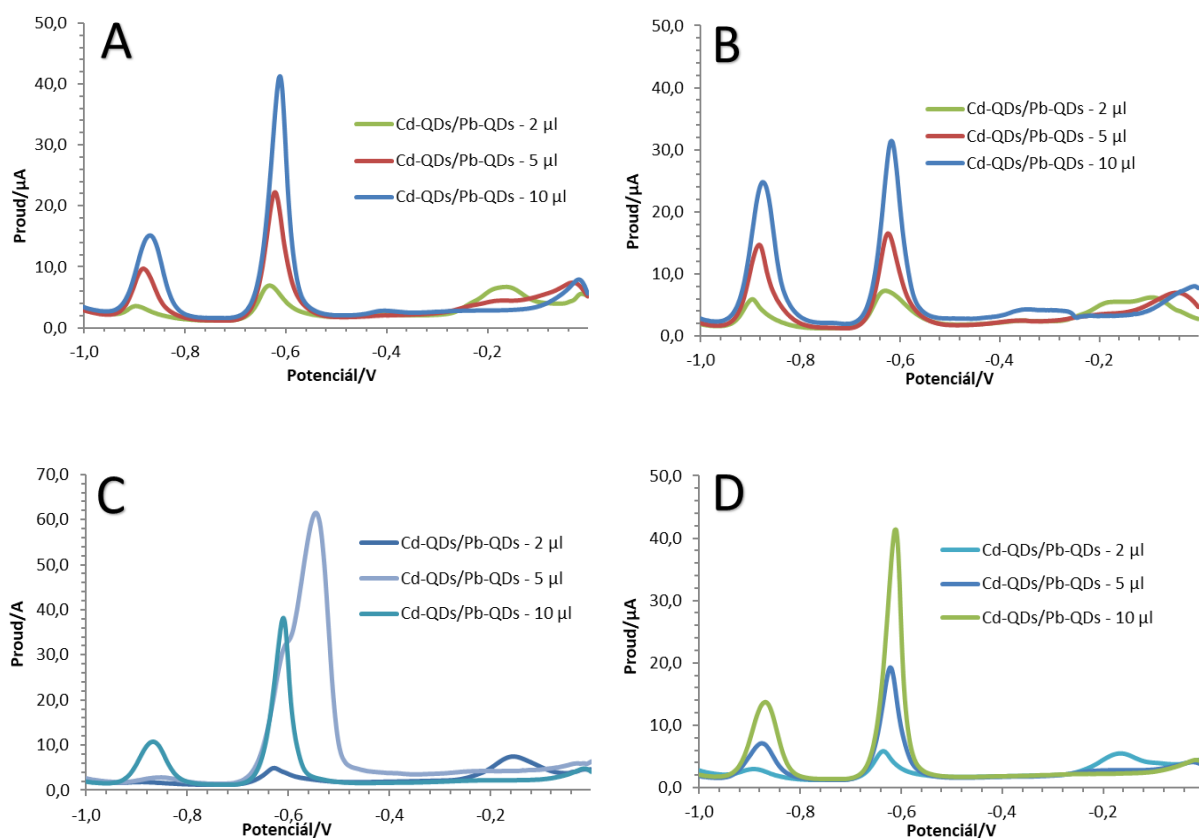


Obr. 31: Voltamogramy simultánní analýzy kvantových teček CdTe-GSH a PbS-PEG-NH<sub>2</sub> přidaných v objemu 2, 5 a 10  $\mu$ l na OHT-000 s *in situ* vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem a na OHT-000 s *ex situ* vytvořeným bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky pík. Konkrétně -0,83 V pro Cd(II) a -0,58 V pro Pb(II).

Při porovnání záznamů simultánní analýzy kvantových teček CdTe-GSH a PbS-PEG-NH<sub>2</sub> na tištěných senzorech DRP C-110 (Obr. 30) a OHT-000 (Obr. 31) s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou bismutovým nebo antimonovým filmem vytvořeným *in situ* nebo *ex situ* bylo dosaženo ve všech případech ostrých, dobře definovatelných píků pro oba kovy (Cd(II) i Pb(II)) bez výskytu parazitních píků. Při detailním porovnání záznamů je patrné, že nejlepších výsledků bylo dosaženo při analýze na senzoru DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem (Obr. 30 A). Současně zde bylo možné pozorovat nejvyšší vzájemné výšky píků obou kovů. Také měření s DRP C-110 s *in situ* vytvořeným antimonovým filmem (Obr. 30 B) přineslo slibné výsledky. V tomto případě bylo dosaženo vyšší proudové odezvy pro Cd(II) než při použití DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem (Obr. 30 A). Naopak signál pro Pb(II) byl v tomto případě nižší.

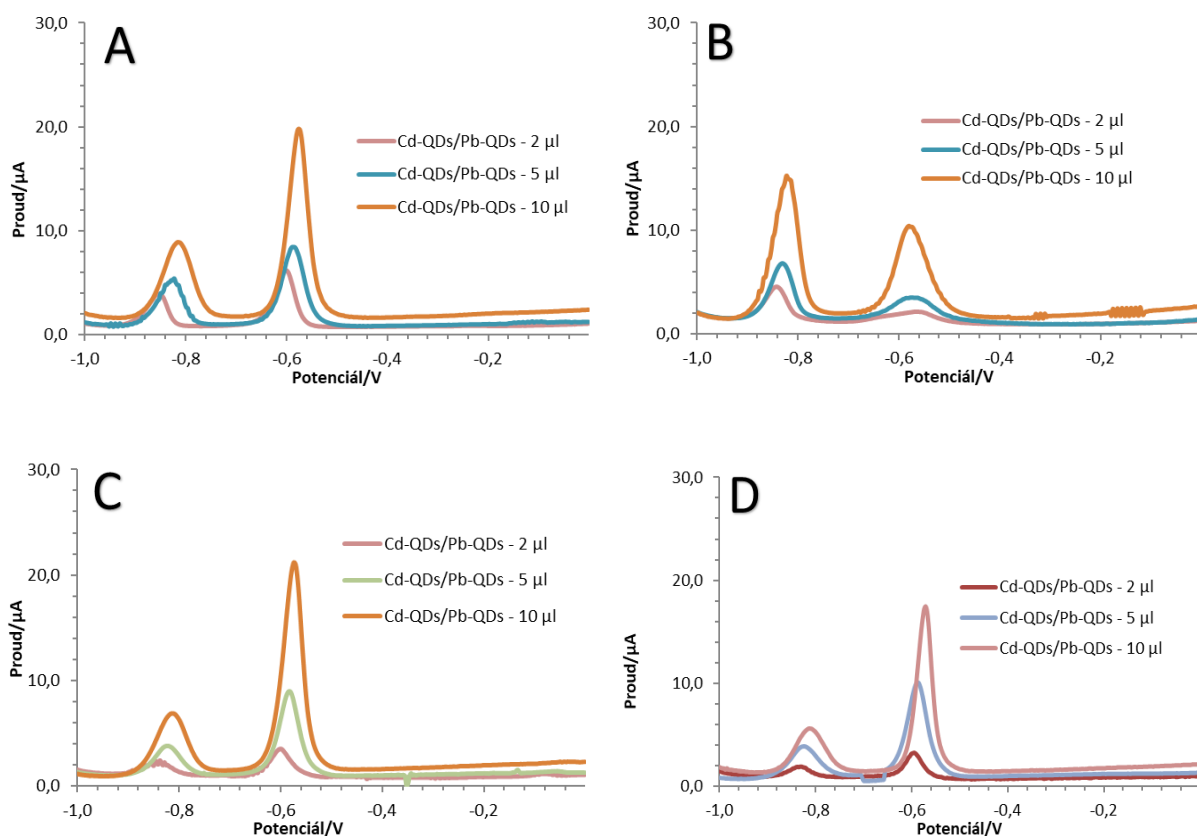
Vedle analýzy kvantových teček s amino funkčními skupinami byly na stejných senzorech se stejnými modifikacemi analyzovány také kvantové tečky s karboxylovými funkčními skupinami CdTe-MPA a PbS-PEG-COOH od společnosti Suzhou Xingshuo Nanotech Co.

(Suzhou Industrial Park, Čína). Modelové vzorky s obsahem jednotlivých kvantových teček byly připraveny ze zásobních roztoků o koncentracích: 0,1 nM PbS-PEG-COOH a 6  $\mu\text{g/ml}$  CdTe-MPA. Jednotlivé kvantové tečky byly přidány v objemu 2, 5 a 10  $\mu\text{l}$  od každého druhu z připravených zásobních roztoků a doplněny na objem 100  $\mu\text{l}$  0,1 M HCl a roztokem Bi(III)/Sb(III) o koncentraci 500 ppb v případě *in situ* filmu. V případě *ex situ* filmu byla přidána pouze 0,1 M HCl. Následovala tři minutová inkubace a poté samotná analýza. Záznamy simultánní analýzy kvantových CdTe-MPA a PbS-PEG-COOH na DRP C-110 jsou uvedeny na Obr. 32. Záznamy měření na OHT-000 pak na Obr. 33.



Obr. 32: Voltamogramy simultánní analýzy kvantových teček CdTe-MPA a PbS-PEG-COOH přidávaných v objemu 2, 5 a 10  $\mu\text{l}$  na DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem a na DRP C-110 s *ex situ* vytvořeným bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícím maximu výšky píku. Konkrétně -0,87 V pro Cd(II) a -0,6 V pro Pb(II).





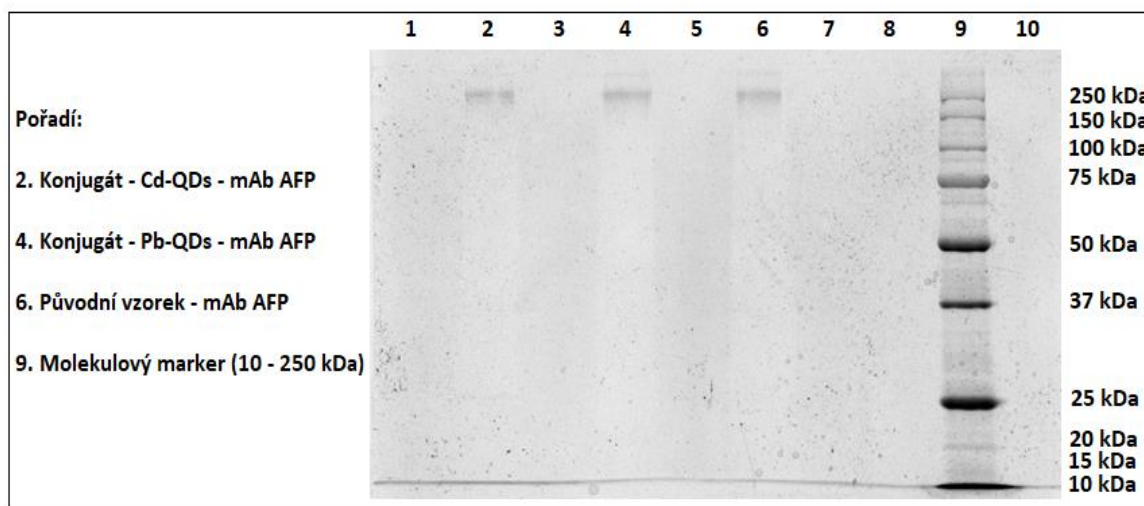
Obr. 33: Voltamogramy simultánní analýzy kvantových teček CdTe-MPA a PbS-PEG-COOH přidávaných v objemu 2, 5 a 10  $\mu\text{l}$  na OHT-000 s *in situ* vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem a na OHT-000 s *ex situ* vytvořeným bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícímu maximu výšky píku. Konkrétně -0,83 V pro Cd(II) a -0,58 V pro Pb(II).

V případě všech prováděných analýz kvantových teček CdTe-MPA a PbS-PEG-COOH (viz. Obr. 32 a 33) bylo dosaženo ostrých, dobře definovatelných píků s výjimkou měření na DRP C-110 s *ex situ* vytvořeným bismutovým filmem, kdy po přidavku 5  $\mu\text{l}$  roztoku kvantových teček poskytla elektroda nestandardní, deformovaný pík. Ve všech ostatních analýzách se proudové odezvy lineárně zvyšovaly s rostoucím přidávaným objemem roztoků daných kvantových teček do vzorku. Nejlepších výsledků při analýze kvantových teček CdTe-MPA a PbS-PEG-COOH na tištěných senzorech DRP C-110 a OHT-000 bylo dosaženo za použití DRP C-110 s *in situ* vytvořeným antimonovým filmem (Obr. 32 B). V tomto případě byly píky pro Cd(II) i Pb(II) ostré, dobře definovatelné a jejich vzájemná výška byla nejvyšší ze všech testovaných variant.

### 3.3 Konjugace protilátek s kvantovými tečkami

Na základě výsledků analýz kvantových teček jsme pro přípravu konjugátů vybrali kvantové tečky CdTe-GSH a PbS-PEG-NH<sub>2</sub>. Samotná konjugace byla provedena pomocí dvou metod. Jednou z testovaných variant byla neorientovaná vazba jednokrokovou

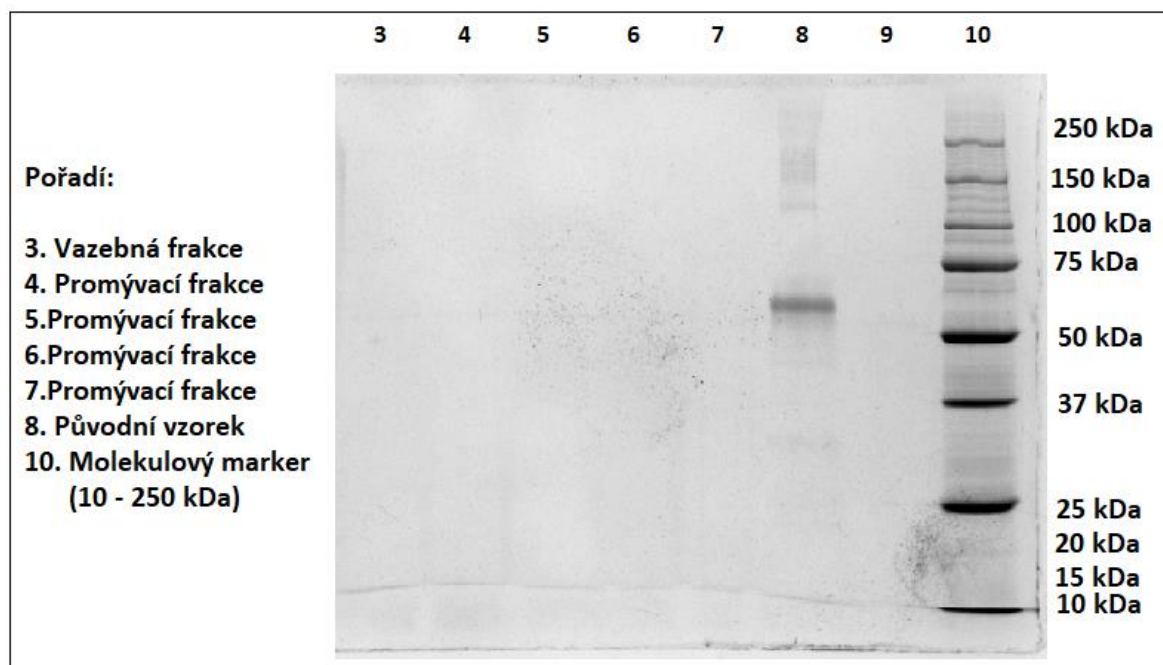
karbodiimidovou metodou (viz. kapitola 2.4.1). Tímto způsobem byly označeny polyklonální králičí protilátky anti-AFP kvantovými tečkami CdTe-GSH a PbS-PEG-NH<sub>2</sub>. Druhou variantou přípravy konjugátů byla orientovaná vazba s využitím oxidovaných protilátek pomocí jodistanu sodného (viz. kapitola 2.4.2). Touto metodou byly kvantovými tečkami CdTe-GSH a PbS-PEG-NH<sub>2</sub> označeny polyklonální králičí protilátky anti-AFP a monoklonální myší protilátky anti-AFP (klon 5H7). Připravené konjugáty byly analyzovány pomocí SDS-PAGE pro ověření účinnosti konjugace (Obr. 34).



Obr. 34: SDS-PAGE pro ověření účinnosti konjugace monoklonálních protilátek anti-AFP (klon 5H7) s kvantovými tečkami CdTe-GSH a PbS-PEG-NH<sub>2</sub>. 10 % polyakrylamidový dělicí gel, barveno roztokem amoniakálního stříbra. Jamky 1, 3, 5, 7, 8 a 10 jsou prázdné.

### 3.4 Imobilizace antigenu AFP na magnetické částice

Funkčnost připravených konjugátů, tedy prokázání skutečnosti, že i po označení kvantovými tečkami protilátka neztrácí schopnost vázat antigen, byla ověřena sestavením imunokomplexu mezi antigenem AFP, který byl imobilizován na magnetických částicích SiMAG – Carboxyl a připravenými protilátkami anti-AFP, označenými kvantovými tečkami. Magnetické částice s imobilizovaným antigenem AFP pak sloužily i pro optimalizaci ředění konjugátu, tedy množství protilátek, které je pak optimální pro budoucí aplikaci při sestavování finálního imunosenzoru pro stanovení AFP. Pro kontrolu účinnosti imobilizace antigenu AFP byla provedena SDS-PAGE analýza (Obr. 35).



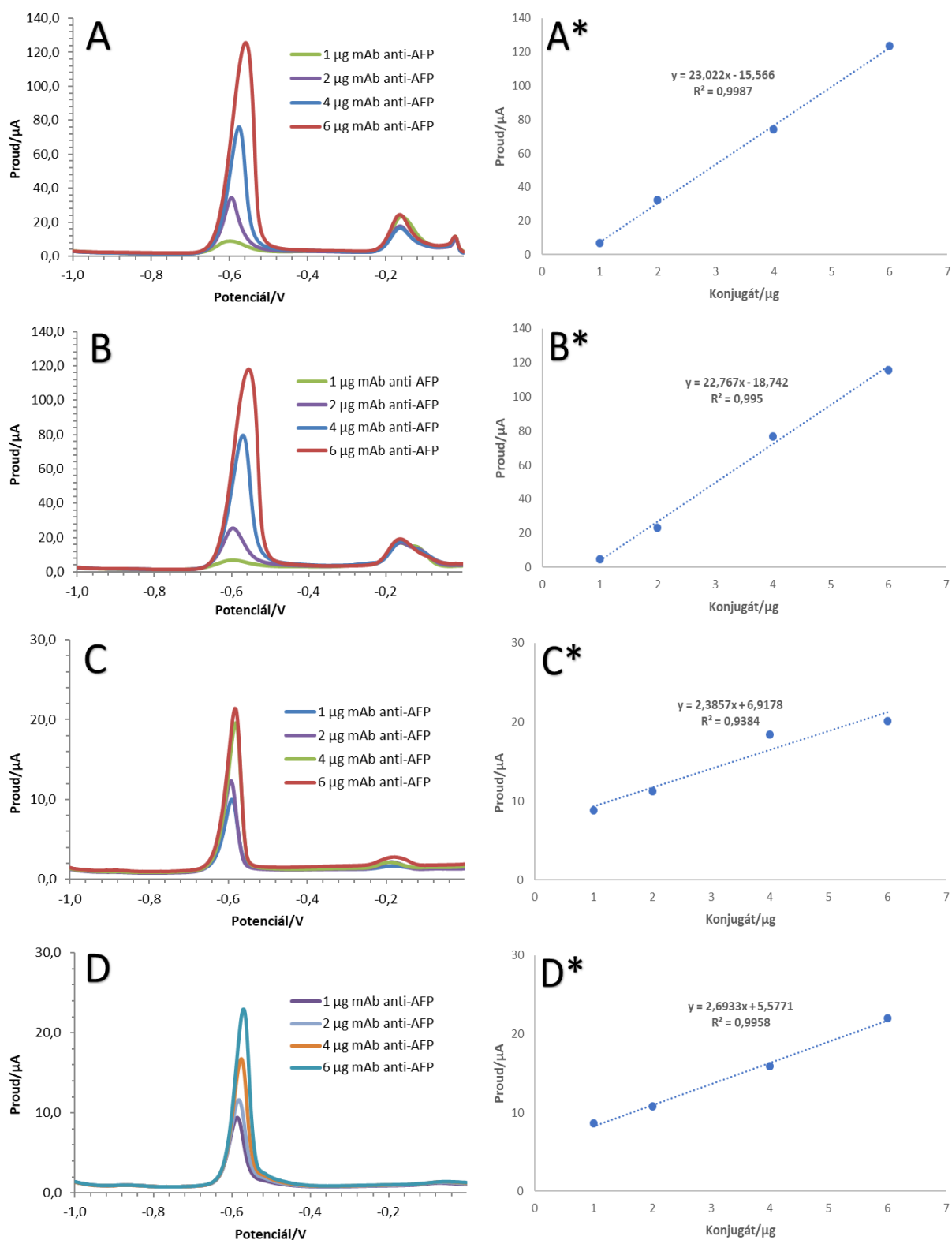
Obr. 35: SDS-PAGE – ověření imobilizace antigenu AFP na SiMAG – Carboxyl. 10 % polyakrylamidový dělicí gel, barveno roztokem amoniakálního stříbra. Jamka 9 je prázdná.

Při porovnání vazebné frakce (jamka 3), promývacích frakcí (jamky 4 – 7) a jamky s původním vzorkem (jamka 8) můžeme vidět jasný proužek v jamce s původním vzorkem odpovídající  $\alpha$ -fetoproteinu, který má molekulovou hmotnost 69 kDa. V ostatních jamkách se tento proužek nevyskytuje, nebo není tak výrazný jako v jamce 7. To naznačuje vysokou úspěšnost imobilizace antigenu AFP na magnetické částice. Při denzitometrickém vyhodnocení byla účinnost imobilizace 100 % (Obr. 35). Pozn.: Jamky 1 a 2 byly ze záznamu záměrně odstraněny. V těchto jamkách byl analyzován konjugát z jiné analýzy a nebylo třeba jej zde uvádět.

### 3.5 Optimalizace ředění konjugátu anti-AFP<sup>QDs</sup> na tištěných elektrodách *in situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem

Prostřednictvím sestavení polovičního imunokomplexu antigen AFP – mAb anti-AFP<sup>QDs</sup> (PbS-PEG-NH<sub>2</sub> nebo CdTe-GSH) byla ověřena funkčnost připravených konjugátů a jejich optimální ředění. Vzniklý imunokomplex byl následně detegován pomocí elektrochemické detekce iontů kovů Cd(II) a Pb(II) uvolněných z kvantových teček v kyselém prostředí. Na základě předchozích analýz samotných kvantových teček PbS-PEG-NH<sub>2</sub> a CdTe-GSH byly pro analýzu použity tištěné senzory DRP C-110 a OHT-000 *in situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem a byly odečteny proudové odezvy pro dané kovy na jednotlivých elektrodách.

Konjugáty byly testovány v rozmezí koncentrací protilátek 1 – 6  $\mu\text{g}$ , které byly přidávány k 1  $\mu\text{g}$  antigenu AFP imobilizovaného na magnetických částicích. Na základě elektrochemické analýzy polovičního imunokomplexu, tj. antigen AFP – mAb anti-AFP<sup>QDs</sup> jsme dospěli k závěru, že ani jeden z konjugátů připravených z polyklonálních králíčích protilátek anti-AFP nebyl funkční. Při elektrochemické analýze nebyly pozorovány žádné signály pro Cd(II) ani pro Pb(II). Ani při analýze konjugátů připravených z monoklonálních myších protilátek anti-AFP (klon 5H7) nebyly funkční oba. Pouze konjugát připravený s použitím kvantových teček PbS-PEG-NH<sub>2</sub> poskytl při elektrochemické analýze imunokomplexu proudovou odezvu. Záznamy analýz (A, B, C, D) včetně kalibračních přímek (A\*, B\*, C\*, D\*) jsou uvedeny na Obr. 36.

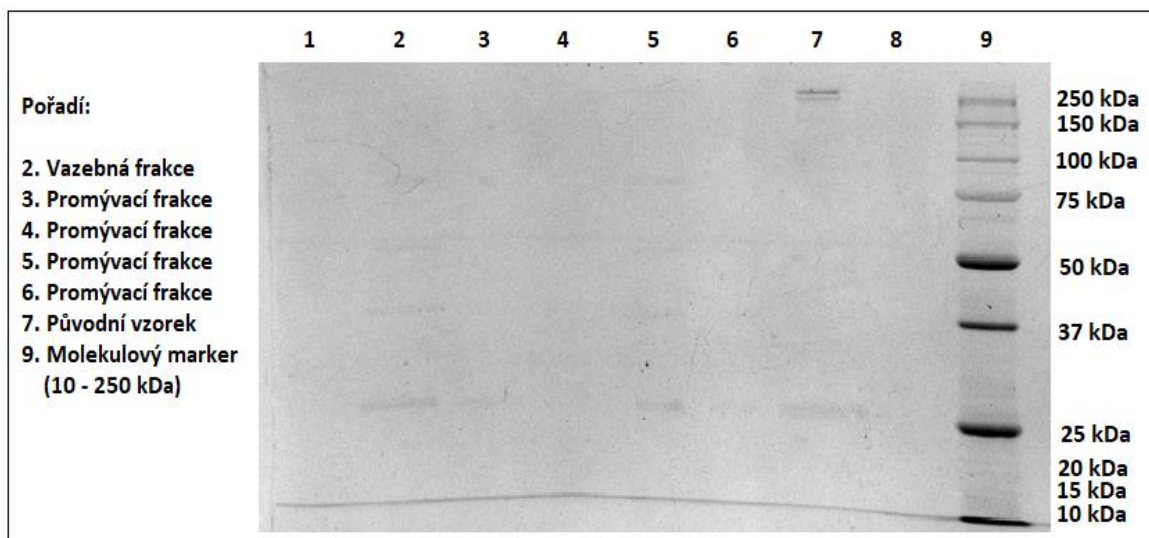


Obr. 36: Voltamogramy – optimalizace ředění konjugátu v rozmezí koncentrací monoklonálních myších protilátek (klon 5H7) 1 – 6  $\mu\text{g}$  označených kvantovými tečkami PbS-PEG-NH<sub>2</sub> na senzoru DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem a na senzoru OHT-000 s *in situ* vytvořeným bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem. Kalibrační přímky: DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým (A\*) nebo antimonovým (B\*) filmem a OHT-000 s *in situ* vytvořeným bismutovým (C\*) nebo antimonovým (D\*) filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícím maximu výšky píku. Konkrétně -0,58 V (+/- 0,02 V) pro Pb(II).

Z voltamogramů je zřejmé, že nejlepších výsledků bylo dosaženo se senzorem DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem (Obr. 36 A). Píky byly ostré, dobře definovatelné a rovněž jejich výška byla ze všech testovaných variant nejvyšší. Nicméně také senzor DRP C-110 s *in situ* vytvořeným antimonovým filmem (Obr. 36 B) poskytl při analýze dobré výsledky. V obou případech bylo v nejvyšším bodě kalibrace, tedy po přidání 6  $\mu\text{g}$  konjugátu, dosaženo proudové odezvy přesahující 115  $\mu\text{A}$ . Senzor OHT-000 s *in situ* vytvořeným bismutovým (Obr. 36 C) i antimonovým (Obr. 36 D) filmem vykazoval při elektrochemické detekci imunokomplexu nižší citlivost. V nejvyšším bodě kalibrace, tedy při analýze 6  $\mu\text{g}$  konjugátu byla proudová odezva v případě obou filmů (C i D) pouze cca 20  $\mu\text{A}$ . Nicméně i v tomto případě byly píky ostré a dobře definovatelné bez výskytu parazitních píků. Při měření na všech typech elektrod s bismutovým i antimonovým filmem bylo dosaženo linearit v rozmezí koncentrací konjugátu 1 – 6  $\mu\text{g}$ . Optimální množství přidávaných značených protilátek pro budoucí aplikaci při sestavování finálního imunokomplexu bylo zvoleno množství 2  $\mu\text{g}$  mAb anti-AFP<sup>PbS QDs</sup>.

### **3.6 Imobilizace anti-AFP protilátek na magnetické částice**

Imobilizované monoklonální myši protilátky anti-AFP (klon 4A3) sloužily pro vychytání  $\alpha$ -fetoproteinu z připraveného modelového vzorku při sestavení finálního imunosenzoru tvořeného primárními anti-AFP protilátkami imobilizovanými na magnetických částicích,  $\alpha$ -fetoproteinem (AFP) jako antigenem vychytaným ze vzorku a kvantovými tečkami značenými sekundárními protilátkami anti-AFP. Pro kontrolu účinnosti imobilizace protilátek byla provedena SDS-PAGE analýza (Obr. 37).



Obr. 37: SDS-PAGE – ověření imobilizace monoklonálních myších protilátek anti-AFP (klon 4A3) na SiMAG – Carboxyl. 10 % polyakrylamidový dělicí gel, barveno roztokem amoniakálního stříbra. Jamky 1, 8 a 10 jsou prázdné.

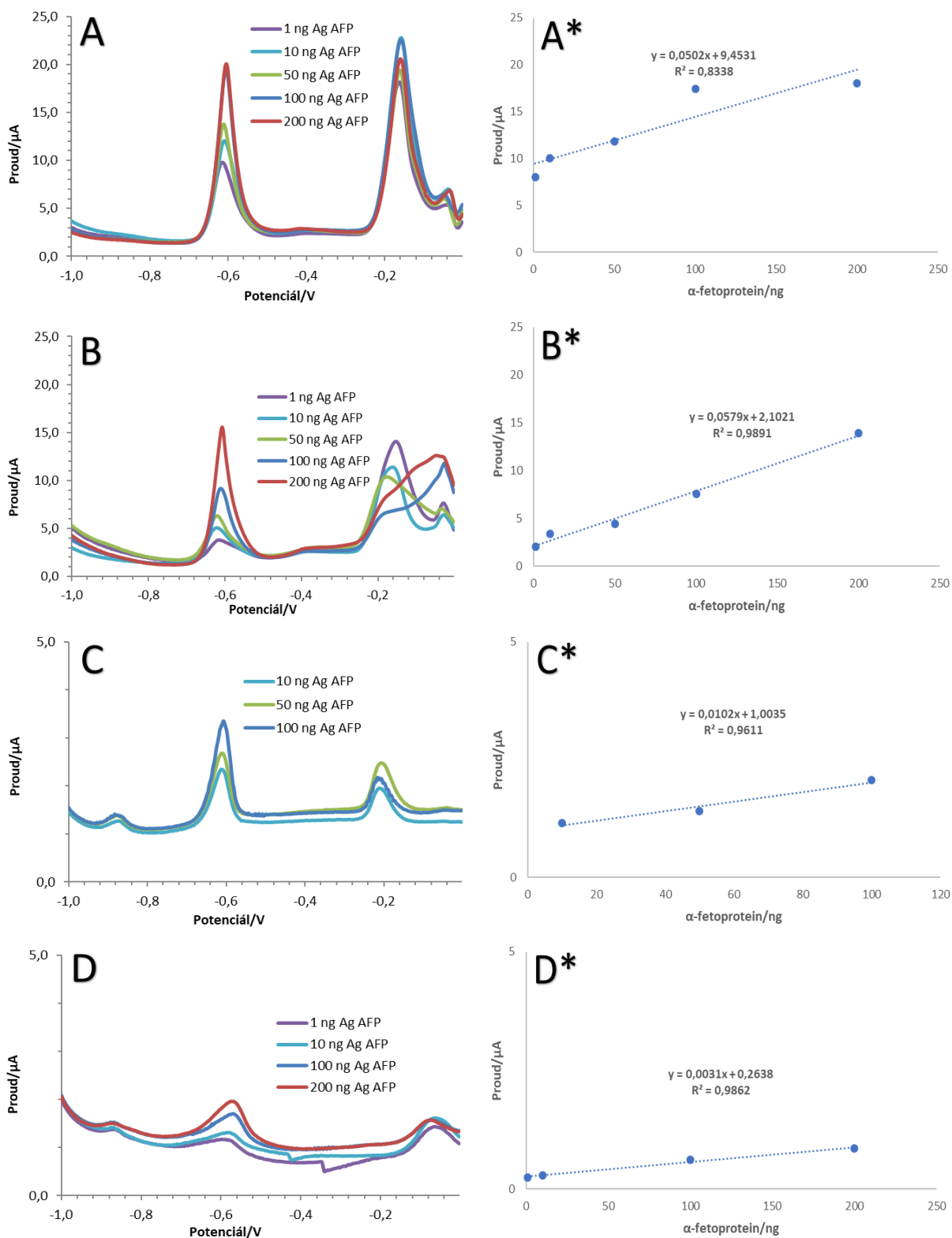
Při porovnání vazebné frakce (jamka 2), promývacích frakcí (jamky 3 – 6) a jamky s původním vzorkem (jamka 7) je viditelný jasný proužek v jamce s původním vzorkem, zatímco v ostatních jamkách se tento proužek nevyskytuje (nebo není tak výrazný). To naznačuje vysoké procento úspěšnosti imobilizace protilátek na magnetické částice. Při denzitometrickém vyhodnocení byla imobilizace protilátek na magnetické částice úspěšná z 89 %. Došlo tedy k navázání 44,5  $\mu\text{g}$  z původního množství 50  $\mu\text{g}$  (Obr. 37).

### 3.7 Detekce $\alpha$ -fetoproteinu na tištěných elektrodách s *in situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem

Po výběru vhodného konjugátu a optimalizaci jeho ředění jsme se již zaměřili na sestavení celého imunokomplexu jehož podstatou byla samotná detekce  $\alpha$ -fetoproteinu v připraveném modelovém vzorku. Na základě předchozích analýz byl jako nejvhodnější zvolen konjugát skládající se z monoklonálních myších protilátek anti-AFP (klon 5H7) značených kvantovými tečkami PbS-PEG-NH<sub>2</sub>. Optimální koncentrace přidávaného konjugátu byla na podkladě výsledků (viz. kapitola 3.5) zvolena 2  $\mu\text{g}$  mAb anti-AFP<sup>PbS QDs</sup>. Celý systém byl pak tvořen imobilizovanými primárními monoklonálními protilátkami anti-AFP (klon 4A3) (2  $\mu\text{g}$ ) na magnetických částicích SiMAG – Carboxyl, které sloužily pro vychytání  $\alpha$ -fetoproteinu ze vzorku a k takto vytvořenému imunokomplexu byl následně přidán konjugát, tedy mAb anti-AFP<sup>PbS QDs</sup>. Následná elektrochemická detekce vzniklého imunokomplexu byla zprostředkována detekcí iontů Pb(II) uvolněných z kvantových teček působením HCl. Analýza byla provedena na tištěných senzorech DRP C-110 a OHT-000 s *in situ* vytvořeným

bismutovým nebo antimonovým filmem (viz. kapitola 2.8). Záznamy analýz včetně kalibračních přímk jsou uvedeny na Obr. 38.





Obr. 38: Voltamogramy – elektrochemická detekce  $\alpha$ -fetoproteinů v rozmezí koncentrací 1 – 200 ng na senzoru DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem a na OHT-000 s *in situ* vytvořeným bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem. Kalibrační přímky: DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým (A\*) nebo antimonovým (B\*) filmem a OHT-000 s *in situ* vytvořeným bismutovým (C\*) nebo antimonovým (D\*) filmem. Proudové odezvy byly zaznamenány při potenciálu odpovídajícím maximu výšky píku. Konkrétně -0,6 V pro Pb(II).

Při porovnání záznamů elektrochemické detekce  $\alpha$ -fetoproteinu označeného konjugátem mAb anti-AFP<sup>PbS QDs</sup> na senzorech DRP C-110 a OHT-000 je zřejmé, že nejlepších výsledků bylo dosaženo za použití senzoru DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem (Obr. 38 A). Píky byly v tomto případě ostré, dobře definovatelné a bez výskytu parazitních píků. Proudová odezva rostla lineárně s rostoucí koncentrací  $\alpha$ -fetoproteinu ve vzorku. Dobrých výsledků bylo rovněž dosaženo také se senzorem DRP C-110 s *in situ* vytvořeným antimonovým filmem (Obr. 38 B), ale proudové odezvy byly výrazně nižší. V případě použití senzorů OHT-000 s *in situ* bismutovým (Obr. 38 C) i antimonovým (Obr. 38 D) filmem byla pozorována výrazně nižší citlivost a schopnost detegovat finální imunokomplex. Píky v tomto případě nebyly ostré a bylo možné pozorovat parazitní píky. Nicméně i zde rostla proudová odezva lineárně s rostoucí koncentrací  $\alpha$ -fetoproteinu ve vzorku.

## 4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla modifikace pracovní uhlíkové elektrody komerčně dodávaných tištěných senzorů DRP C-110 a OHT-000 bismutovým nebo antimonovým filmem. Oba typy filmů byly vytvořeny elektrodepozicí z roztoku metodou přípravy *in situ* nebo *ex situ*. Takto modifikované tištěné elektrody byly nejprve použity při analýzách vzorků obsahujících ionty kovů. Ionty kovů byly analyzovány samostatně a následně i ve směsích. Poté byly tyto senzory použity při analýze kvantových teček. V této práci bylo testováno několik druhů kvantových teček a cílem bylo vytipování nejvhodnějších kvantových teček, které mohou být použity jako elektroaktivní značky protilátek (tzv. konjugátu) při sestavení elektrochemického imunosenzoru pro detekci proteinového antigenu. V rámci optimalizací jsme se soustředili na nalezení nejvhodnějšího senzoru pro analýzu daných vzorků. Detekční metodou byla v těchto případech anodická rozpouštěcí voltametrie.

Při simultánní analýze iontů kovů Cd(II) a Pb(II) bylo nejlepších výsledků dosaženo s použitím DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem. Také antimonovým filmem vytvořeným na DRP C-110 *in situ* poskytl při analýze dobré výsledky. V případě použití OHT-000 byla pozorována nižší citlivost senzorů a rovněž výskyt parazitních píků. Při analýzách kvantových teček bylo nejlepších výsledků dosaženo na DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým, případně antimonovým filmem.

V další části práce jsme se již zaměřili na přípravu konjugátů, tedy sekundárních kvantovými tečkami značených protilátek, konkrétně anti-AFP IgG. Na základě předešlých analýz jsme pro přípravu konjugátů použili kvantové tečky PbS-PEG-NH<sub>2</sub> a CdTe-GSH. V práci jsme se soustředili na výběr vhodných protilátek pro přípravu konjugátu, vhodné metody konjugace kvantových teček s protilátkami a po konjugaci také na ověření funkčnosti připravených konjugátů elektrochemicky. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití monoklonálních myších protilátek (mAb anti-AFP IgG) (klon 5H7), které byly kvantovými tečkami označeny metodou orientované vazby s využitím oxidace protilátek pomocí jodistanu sodného. Ověření účinnosti konjugace elektrochemicky přes tvorbu imunokomplexu antigen AFP – mAb anti-AFP IgG<sup>QDs</sup> potvrdilo funkčnost připraveného konjugátu, a to konkrétně při použití kvantových teček PbS-PEG-NH<sub>2</sub>. V tomto uspořádání bylo také optimalizováno ředění konjugátu pro budoucí využití při sestavení finálního imunosenzoru. Při těchto analýzách se opět nejvíce osvědčily senzory DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem. Na závěr byly všechny poznatky získané při optimalizačních

krocích využity při sestavení celého imunosenzoru pro detekci  $\alpha$ -fetoproteinu (AFP). K záchytu antigenu AFP byly použity primární monoklonální myší protilátky (mAb anti-AFP IgG) (klon 4A3) imobilizované na magnetických částicích. A pro detekci vzniklého imunokomplexu byl použit připravený konjugát.

Pro samotnou elektrochemickou detekci byly opět použity dva druhy tištěných senzorů (DRP C-110 a OHT-000) s uhlíkovou pracovní elektrodou modifikovanou *in situ* vytvořeným bismutovým nebo antimonovým filmem, z nichž, podobně jako v předešlých analýzách, bylo nejlepších výsledků dosaženo s použitím senzoru DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým filmem. Nicméně také v případě použití senzoru DRP C-110 s *in situ* vytvořeným antimonovým filmem bylo dosaženo dobrých výsledků, ale s nižšími proudovými odezvami. V případě analýzy na DRP C-110 s *in situ* vytvořeným bismutovým i antimonovým filmem byla citlivost senzoru v rozmezí koncentrací  $\alpha$ -fetoproteinu 1 – 200 ng.

## 5 ZDROJE

1. Wang J., ANALYTICAL ELECTROCHEMISTRY, Third Edition, ISBN-13 978-0-471-67879-3
2. Omanović D., Garnier C., Gibbon–Walsh K., Pižeta I., Electroanalysis in environmental monitoring: Tracking trace metals—A mini review, *Electrochemistry Communications*, 2015, vol. 61, s. 78 – 83
3. Rossi M., Wallmersperger T., Padberg-Gehle K., Modeling and Simulation of Electrochemical Cells under Applied Voltage, *Electrochimica Acta*, 2017, vol. 258, s. 241 – 254
4. White H., Kelvey K., Redox cycling in nanogap electrochemical cells, *Current Opinion in Electrochemistry*, 2018, vol. 7, s. 48 – 53
5. Manivannan A., Kawasaki R., Tryk D. A., Fujishima A., Interaction of Pb and Cd during anodic stripping voltammetric analysis at boron-doped diamond electrodes, *Electrochimica Acta*, 2014, vol. 49, s. 3313 – 3318
6. Holzbecher Z., Churáček J., *Analytická chemie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987, s. 664
7. Barek J. a kol.: *Elektroanalytická chemie*. Praha: Karolinum, 2005, s. 188, ISBN 80-246-1146-5
8. Adams R. N., *Carbon Paste Electrodes*, *Analytical Chemistry*, 1958, vol. 30, s. 1576
9. Hočevar S. B., Švancara I., Vytřas K., Ogorevc B., Novel electrode for electrochemical stripping analysis based on carbon paste modified with bismuth powder, *Electrochimica Acta*, 2005, vol. 51, s. 706 – 710
10. Metelka R., Žeravík M., Vytřas K., Carbon Paste Electrode Containing Dispersed Bismuth Powder for pH Measurements, *Sensing in Electroanalysis*, 2010, vol. 5, s. 257 – 267
11. Somerset V., Iwuoha E., Hernandez L., Stripping Voltammetric Measurement of Trace Metal Ions at Screen-printed Carbon and Carbon Paste Electrodes, *Procedia Chemistry*, 2009, vol. 1, s. 1279 – 1282
12. Mikysek T., Stočes M., Švancara I., Vytřas K., Možnosti charakterizace uhlíkových pastových elektrod, *Chemické listy*, 2014, vol. 108, s. 513 – 518
13. Wang J., Kirgoz A., Mo J. W., Lu J., Kawde A. N., Muck A., Glassy carbon paste electrodes, *Electrochemistry Communications*, 2001, vol. 3, s. 203 – 208

14. Vytřas K., Švancara I., Metelka R., Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2009, vol. 74, s. 1021 – 1033
15. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/source/html/16725/media/image4.jpeg> [6.2.2018]
16. Grégr J., Moderní pohled na formy a modifikace uhlíku, ResearchGate, 2015
17. Van der Linden, Dieker J. W., Glassy carbon as electrode material in electro-analytical chemistry, *Analytica Chimica Acta*, 1980, vol. 119, s. 1 – 24
18. Barek J., Fogg A., Muck A., Zima J., Polarography and Voltammetry at Mercury Electrodes, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2010, vol. 31, s. 291 – 309
19. Arino C., Serrano N., Díaz-Cruz J. M., Esteban M., Voltametric determination of metal ions beyond mercury electrodes. A review, *Analytica Chimica Acta*, 2017, vol. 990, s. 11 – 53
20. Wang J., Lu J., Hocevar S. B., Farias P. A. M., Bismuth-Coated Carbon Electrodes for Anodic Stripping Voltammetry, *Analytical Chemistry*, 2000, vol. 72, s. 3218 – 3222
21. Królicka A., Pauliukaite R., Švancara I., Metelka R., Bobrowski A., Norkus E., Kalcher K., Vytřas K., Bismuth-film-plated carbon paste electrodes, *Electrochemistry Communications*, 2002, vol. 4, s. 193 – 196
22. Hočevár S. B., Ogorevc B., Wang J., Pihlar B., *Electroanalysis*, 2002, vol. 14, s. 1707
23. Zhou H., Hou H., Dai L., Li Y., Zhu J., Wang L., Preparation of dendritic bismuth filmelectrodes and their application for detection of trace Pb (II) and Cd (II), *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2016, vol. 24, s. 410 – 414
24. Luo J. H., Jiao X. X., Li N. B., Luo H. Q., Sensitive determination of Cd(II) by square wave anodic stripping voltammetry with *in situ* bismuth-modified multiwalled carbon nanotubes doped carbon paste electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2013, vol. 689, s. 130 – 134
25. Hwang H. G., Han W. K., Park J. S., Kang S. G., Determination of trace metals by anodic stripping voltammetry using a bismuth-modified carbon nanotube electrode, *Talanta*, 2008, vol. 76, s. 301 – 308
26. Hutton E. A., Hočevár S. B., Ogorevc B., Smyth M. R., Bismuth film electrode for simultaneous adsorptive stripping analysis of trace cobalt and nickel using constant current chronopotentiometric and voltammetric protocol, *Electrochemical Communication*, 2003, vol. 5, s. 765 – 769
27. Uhl A., Kerstanek W., Die elektrometrische Titration von Säuren und Basen mit der Antimon-Indikatorelektrode, *Monatshefte für Chemie*, 1923, vol. 44, s. 29 – 34

28. Hocevar S. B., Švancara I., Ogorevc B., Vytřas K., Antimony Film Electrode for Electrochemical Stripping Analysis, *Analytical Chemistry*, 2007, vol. 79, s. 8639 – 8643
29. Svobodova-Tesarova E., Baldrianova L., Stoces M., Svancara I., Vytras K., Hocevar S. B., Ogorevc B., Antimony powder-modified carbon paste electrodes for electrochemical stripping determination of trace heavy metals, *Electrochimica Acta*, 2011, vol. 56, s. 6673 – 6677
30. Jovanovski V., Hočevar S. B., Ogorevc B., *Ex Situ* Prepared Antimony Film Electrode for Electrochemical Stripping Measurement of Heavy Metal Ions, *Electroanalysis*, 2009, vol. 21, s. 2321 – 2324
31. Gajdár J., Barek J., Fischer J., Antimony film electrodes for voltammetric determination of pesticide trifluralin, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2016, vol. 778, s. 1 – 6
32. Ashrafi A., Vytřas K., Stripping voltammetric determination of mercury(II) at antimony-coated carbon paste electrode, *Talanta*, 2011, vol. 85, s. 2700 – 2702
33. Ashrafi A., Vytřas K., New procedures for voltammetric determination of copper (II) using antimony film-coated carbon paste electrodes, *Electrochimica Acta*, 2012, vol. 73, s. 112 – 117
34. Ashrafi A., Cerovac S., Mudric S., Guzsvány V., Husáková L., Urbanová I., Vytřas K., Antimony nanoparticle-multiwalled carbon nanotubes composite immobilized at carbon paste electrode for determination of trace heavy metals, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, vol. 191, s. 320 – 325
35. Cesarino I., Cesarino V., Lanza M. R. V., Carbon nanotubes modified with antimony nanoparticles in a paraffin composite electrode: Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, vol. 188, s. 1293 – 1299
36. Renedo D. O., Alonso-Lomillo M.A., Arcos Martínez M.J., Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications, *Talanta*, 2007, vol. 73, s. 202 – 219
37. Li M., Li Da. W., Xiu G., Long T., Review Article Applications of screen-printed electrodes in current environmental analysis, *Current Opinion in Electrochemistry*, 2017, vol. 3, s. 137 – 143
38. Jirasirichote A., Punrat E., Suea-Ngama A., Chailapakula O., Chuanuwatanakula S., Voltammetric detection of carbofuran determination using screen-printed carbon

- electrodes modified with gold nanoparticles and graphene oxide, *Talanta*, 2017, vol. 175, s. 331 – 337
39. Sarakbi A., Aydogmus Z., Sidali T., Gokce G., Kauffmann J. M., Simultaneous Determination of Acetaminophen (Paracetamol) and Ascorbic Acid in Pharmaceutical Formulations by LC Coupled to a Screen Printed Carbon Based Amperometric Detector, *Electroanalysis*, 2011, vol. 23, s. 29 – 36
40. Arribas L. A., Alonso-Lomillo M. A., Renedo O. D., Martínez J. M., Sensitive and selective cocaine electrochemical detection using disposable sensors, *Analytica Chimica Acta*, 2014, vol. 834, s. 30 – 36
41. Chikkaveeraiah B. V., Bhirde A., Morgan N. Y., Eden H. S., Chen X., Electrochemical Immunosensors for Detection of Cancer Protein Biomarkers, 2012, vol. 6, s. 6546 – 6561
42. Abdul Rashid J. I., Azah Yusof N., The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review, *Sensing and Bio-Sensing Research*, 2017, vol. 16, s. 19 – 31
43. Worrapong K. A., Aricha O., Chakrit S., Chanpen K., Adisorn T., Anurat W., Werayut S., Alongkorn P., Disposable paper-based electrochemical sensor utilizing inkjet-printed Polyaniline modified screen-printed carbon electrode for Ascorbic acid detection, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2012, vol. 685, s. 72 – 78
44. Khaled E., Hassan H. N. A., A. Girgis, Metelka R. Construction of novel simple phosphate screen-printed and carbon paste ion-selective electrodes, *Talanta*, 2008, vol. 77, s. 737 – 743
45. Riberi W. I., Tarditto L. V., Arévalo F. J., Fernández H., Development of an electrochemical immunosensor to determine zearalenone in maize using carbon screen printed electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes/polyethyleneimine dispersions, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, vol. 254, s. 1271 – 1277
46. Sun CH. L., Cheng W. L., Hsu T. K., Chang Ch. W., Chang J. L., Zen J. M., Ultrasensitive and highly stable nonenzymatic glucose sensor by a CuO/graphene-modified screen-printed carbon electrode integrated with flow-injection analysis, *Electrochemistry Communications*, 2013, vol. 30, s. 91 – 94
47. Dhara K., Thiagarajan R., Nair B. G., Thekkedath G. S. B., Highly sensitive and wide-range nonenzymatic disposable glucose sensor based on a screen printed carbon electrode modified with reduced graphene oxide and Pd-CuO nanoparticles, *Microchimica Acta*, 2015, vol. 182, s. 2183 – 2192



48. Gilje S., Han S., Wang M., Wang K. L., Kaner R. B., A Chemical Route to Graphene for Device Applications, 2007, vol. 7, s. 3394 - 3398
49. Cinti S., Arduini F., Graphene-based screen-printed electrochemical (bio)sensors and their applications: Efforts and criticisms, *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, vol. 89, s. 107 – 122
50. Paredes J.I., Villar-Rodil S., Martínez-Alonso S., Tascón J. M. D., Graphene Oxide Dispersions in Organic Solvents, *Langmuir*, 2008, vol. 24, s. 10560 – 10564
51. Yang J., Yu J. H., Strickler J. R., Chang W. J., Gunasekaran S., Nickel nanoparticle–chitosan-reduced graphene oxide-modified screen-printed electrodes for enzyme-free glucose sensing in portable microfluidic devices, *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, vol. 47, s. 530 – 538
52. Istrate O. M., Rotariu L., Bala C., Electrochemical determination of NADH using screen printed carbon electrodes modified with reduced graphene oxide and poly(allylamine hydrochloride), *Microchimica Acta*, 2016, vol. 183, s. 57 – 65
53. Ruecha N., Rodthongkum N., Cate D. M., Volckens J., Sensitive electrochemical sensors using a graphene nanocomposite for simultaneous detection of Zn(II), Cd(II) and Pb(II), *Analytica Chimica Acta*, 2015, vol. 874, s. 40 – 48
54. Fernández B. P., Yerga D. M., García A. C., Galvanostatic electrodeposition of copper nanoparticles on screen-printed carbon electrodes and their application for reducing sugars determination, *Talanta*, 2017, vol. 175, s. 108 – 113
55. Heba M. M., Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments, *Trends in Analytical Chemistry*, 2016, vol. 82, s. 1 – 11
56. Kadara R., Jenkinson N., Banks C. E., Characterisation of commercially available electrochemical sensing platforms, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009, vol. 138, s. 556 – 562
57. Dostupné z: [http://www.dropsens.com/en/img/productos/screen\\_printed\\_elect2.gif](http://www.dropsens.com/en/img/productos/screen_printed_elect2.gif) [6.2.2018]
58. Wang J., Lu J., Hocevar S. B., Ogorevc B., Bismuth-Coated Screen-Printed Electrodes for Stripping Voltammetric Measurements of Trace Lead, *Electroanalysis*, 2001, vol. 13, s. 13 – 16
59. Serrano N., Alberich A., Díaz-Cruz J. M., Arino C., Esteban M., Coating methods, modifiers and applications of bismuth screen-printed electrodes, *Trends in Analytical Chemistry*, 2013. vol. 46, s. 15 – 29

60. Serrano N., Diaz-Cruz J. M., Arino C., Esteban M., Stripping analysis of heavy metals in tap water using the bismuth film electrode, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, vol. 393, s. 1365 – 1369
61. Zaouak A., Authier L., Cugnet C., Castetbon A., Potin-Gautier M., Bismuth-Coated Screen-Printed Microband Electrodes for On-Field Labile Cadmium Determination, *Electroanalysis*, 2009, vol. 21, s. 689 – 695
62. Quintana J. C., Arduini F., Amine A., Punzo F., Destri G. L., Bianchini C., Zane D., Curulli A., Palleschi G., Moscone D., *Analytica Chimica Acta*, 2011, vol. 707, s. 171 – 177
63. Lezi N., Economou A., Dimovasilis P. A., Trikalitis P. S., Prodromidis M. I., Disposable screen-printed sensors modified with bismuth precursor compounds for the rapid voltammetric screening of trace Pb(II) and Cd(II), *Analytica Chimica Acta*, 2012, vol. 728, s. 1 – 8
64. María-Hormigos R., Gismera J., Procopio J. R., Sevilla T., Disposable screen-printed electrode modified with bismuth–PSS composites as high sensitive sensor for cadmium and lead determination, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2016, vol. 767, s. 114 – 122
65. Serrano N., Cruz J. M., Arino C., Esteban M., *Ex situ* Deposited Bismuth Film on Screen-Printed Carbon Electrode: A Disposable Device for Stripping Voltammetry of Heavy Metal Ions, *Electroanalysis*, 2010, vol. 22, s. 1460 – 1467
66. Rico M. G., Marin M., Gil E. P., Modification of carbon screen-printed electrodes by adsorption of chemically synthesized Bi nanoparticles for the voltammetric stripping detection of Zn(II), Cd(II) and Pb(II), *Talanta*, 2009, vol. 80, s. 631 – 635
67. Riman D., Jirovsky D., Hrbac J., Prodromidis M. I., Green and facile electrode modification by spark discharge: Bismuth oxide-screen printed electrodes for the screening of ultra-trace Cd(II) and Pb(II), *Electrochemistry Communications*, 2015, vol. 50, s. 20 – 23
68. Kadara R. O., Tothill I. E., Stripping chronopotentiometric measurements of lead(II) and cadmium(II) in soils extracts and wastewaters using a bismuth film screen-printed electrode assembly, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2004, vol. 378, s. 770 – 775
69. Romo C. R., Serrano N., Arino C., Arancibia V., Díaz-Cruz M., Esteban M., Determination of Sb(III) using an *ex-situ* bismuth screen-printed carbon electrode by adsorptive stripping voltammetry, *Talanta*, 2016, vol. 155, s. 21 – 27

70. Borgo S. D., Sopha H., Smarzewska S., Hočevar S. B., Švancara I., Metelka R. Macroporous Bismuth Film Screen-Printed Carbon Electrode for Simultaneous Determination of Ni(II) and Co(II), *Electroanalysis*, 2015, vol. 27, s. 209 – 216
71. Silwana B., Horst Ch., Iwuoha E., Somerset V., Screen-printed carbon electrodes modified with a bismuth film for stripping voltammetric analysis of platinum group metals in environmental samples, *Electrochimica Acta*, 2014, vol. 128, s. 119 – 127
72. Mandil A., Pauliukaite R., Amine A., Brett CH. A., Electrochemical characterization of and stripping voltammetry at screen printed electrodes modified with different brands of multiwall carbon nanotubes and bismuth films, *Analytical Letters*, 2012, vol. 45, s. 395 – 407
73. Perez-Rafols C., Serrano N., Díaz-Cruz J. M., Arino, Esteban M., New approaches to antimony film screen-printed electrodes using carbon-based nanomaterials substrates, *Analytica Chimica Acta*, 2016, vol. 916, s. 17 – 23
74. Sosa V., Barceló Ch., Serrano N., Arino Ch., Díaz-Cruz J. M., Esteban M., Antimony film screen-printed carbon electrode for stripping analysis of Cd(II), Pb(II), and Cu(II) in natural samples, *Analytica Chimica Acta*, 2015, vol. 855, s. 34 – 40
75. Wang J., Lu J., Kirgöz U. A., Hočevar S. B., Ogorevc B., Insights into the anodic stripping voltammetric behavior of bismuth film electrodes, *Analytica Chimica Acta*, 2001, vol. 434, s. 29 – 34
76. Maczuga M., Economou A., Bobrowski A., Prodromidis M. I., Novel screen-printed antimony and tin voltammetric sensors for anodic stripping detection of Pb(II) and Cd(II), *Electrochimica Acta*, 2013, vol. 114, s. 758 – 765
77. Niua X., Zhao H., Lan M., Disposable screen-printed antimony film electrode modified with carbon nanotubes/ionic liquid for electrochemical stripping measurement, *Electrochimica Acta*, 2011, vol. 56, s. 9921 – 9925
78. Pérez-Rafols C., Trechera P., Serrano N., Díaz-Cruz J. M., Ariño C., Esteban M., Determination of Pd(II) using an antimony film coated on a screen-printed electrode by adsorptive stripping voltammetry, *Talanta*, 2017, vol. 167, s. 1 – 7
79. Barceló C., Serrano N., Ariño C., Díaz-Cruz J. M., Esteban M., *Ex-situ* Antimony Screen-printed Carbon Electrode for Voltammetric Determination of Ni(II)-ions in Wastewater, *Electroanalysis*, 2016, vol. 28, s. 640 – 644
80. Hlaváček A., Skládal P., Kvantové tečky: příprava, konjugace a využití v bioanalytické chemii a biologii, *Chemické listy*, 2010, vol. 105, s. 611 – 615

81. Hardman R., A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors, *Environmental Health Perspective*, 2006, vol. 114, s. 165 – 172
82. Vasudevan D., Gaddam R. R., Trinchi A., Cole I., Core–shell quantum dots: Properties and applications, *Journal of Alloys and Compounds*, 2015, vol. 636, s. 395 – 404
83. Esteve-Turrillas F. A., Abad-Fuentes A., Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes, *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, vol. 41, s. 12 – 29
84. Reiss P., Protiere M., Li L., Core/Shell Semiconductor Nanocrystals, *Small*, 2009, vol. 5, s. 154 – 168
85. Dostupné z: <http://www.mesolight.com/d/file/products/water/2018-05-08/d5dd51578d50b0d5f856377c0fb874b3.jpg> [10.5.2018]
86. Amelia M., Lincheneau Ch., Silvi S., Credi A., Electrochemical properties of CdSe and CdTe quantum dots, *Chemical Society Reviews*, 2012, vol. 41, s. 5728 – 5743
87. Martin-Yerga D., Begona M., González-García M. B., Costa-García A., Biosensor array based on the *in situ* detection of quantum dots as electrochemical label, *Sensors and Actuators B*, 2013, vol. 182, s. 184 – 189
88. Kokkinos Ch., Prodromidis M., Economou A., Petrou P., Kakabakos S., Disposable integrated bismuth citrate-modified screen-printed immunosensor for ultrasensitive quantum dot-based electrochemical assay of C-reactive protein in human serum, *Analytica Chimica Acta*, 2015, vol. 886, s. 29 – 36
89. Kokkinos Ch., Angelopoulou M., Economou A., Prodromidis M., Florou A., Haasnoot W., Petrou P., Kakabakos S., Lab-on-a-Membrane Foldable Devices for Duplex Drop-Volume Electrochemical Biosensing Using Quantum Dot Tags, *Analytical Chemistry*, 2016, vol. 88, s. 6897 – 6904
90. Medina-Sanchez M., Miserere S., Cadevall M., Merkoci A., Enhanced detection of quantum dots labeled protein by simultaneous bismuth electrodeposition into microfluidic channel, *Electrophoresis*, 2016, vol. 37, s. 432 – 437
91. Čadková M., Kovářová A., Dvořáková V., Metelka R., Bílková Z., Korecká L., Electrochemical quantum dots-based magneto-immunoassay for detection of HE4 protein on metal film-modified screen-printed carbon electrodes, *Talanta*, 2018, vol. 182, s. 111 – 115
92. Kokkinos Ch., Prodromidis M., Economou A., Petrou P., Kakabakos S., Quantum dot-based electrochemical DNA biosensor using a screen-printed graphite surface with

embedded bismuth precursor, *Electrochemistry Communications*, 2015, vol. 60, s. 47 – 51

93. Vijian D., Chinni S. V., Yin L. S., Lertanantawong B., Surareungchai W., Non-protein coding RNA-based genosensor with quantum dots as electrochemical labels for attomolar detection of multiple pathogens, *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, vol. 77, s. 805 – 811
94. Martín-Yerga D., Bouzas-Ramos D., Menéndez-Miranda M., Bustos A. M., Encinar J. R., Costa-Fernández J. M., Sanz-Medel A., Costa-García A., Voltammetric determination of size and particle concentration of Cd-based quantum dots, *Electrochimica Acta*, 2015, vol. 166, s. 100 – 106

## 6 SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obr. 1:</b> Schéma přípravy uhlíkové pastové elektrody. ....	14
<b>Obr. 2:</b> Voltamogramy Pb(II), Cd(II) a Zn(II) měřené na elektrodě ze skelného uhlíku (A) a uhlíkovém vlákne (B) modifikovaných bismutovým (a) a rtuťovým filmem (b). ....	17
<b>Obr. 3:</b> Voltamogramy analýzy směsi iontů kovů na elektrodě ze skelného uhlíku a uhlíkového vlákna .....	17
<b>Obr. 4:</b> Voltamogramy Pb(II) a Cd(II) na skelném uhlíku s <i>in situ</i> antimonovým filmem (tučná čára), rtuťovým filmem (přerušovaná čára) a bismutovým filmem (tenká čára). ....	19
<b>Obr. 5:</b> Schéma výroby tištěných elektrod. ....	23
<b>Obr. 6:</b> Tištěný senzor od firmy DropSens – popis jednotlivých částí. ....	24
<b>Obr. 7:</b> Různé druhy tištěných elektrod. ....	24
<b>Obr. 8:</b> Modifikace povrchu pracovní elektrody. ....	25
<b>Obr. 9:</b> Voltamogramy Pb(II) s použitím nemodifikované uhlíkové tištěné elektrody (a), rtuťovým filmem (b) a bismutovým filmem modifikované tištěné uhlíkové elektrody (c). ....	27
<b>Obr. 10:</b> Voltamogram Pb(II) v rozsahu koncentrací 10 – 100 µg/l Pb(II). ....	28
<b>Obr. 11:</b> Voltamogramy pro koncentraci Pb(II) 60 µg/l při různých depozičních časech (A). Závislost proudové odezvy na depozičním čase (B). ....	28
<b>Obr. 12:</b> Voltamogram – porovnání vlivu různých depozičních potenciálů. ....	31
<b>Obr. 13:</b> Voltamogram – porovnání vlivu odlišného pH reakčního prostředí. ....	33
<b>Obr. 14:</b> Voltamogramy různých druhů tištěných uhlíkových elektrod modifikovaných antimonovým filmem. ....	35
<b>Obr. 15:</b> Schéma struktury kvantových teček. ....	37
<b>Obr. 16:</b> Emisní spektrum konkrétních kvantových teček. ....	38
<b>Obr. 17:</b> Metody zavádění funkčních skupin na povrchu kvantových teček. ....	39
<b>Obr. 18:</b> Metody konjugace kvantových teček. ....	39
<b>Obr. 19:</b> Schéma principu detekce hovězího kaseinu a IgG v rámci jedné elektrody. ....	41
<b>Obr. 20:</b> Voltamogram detekce Cd(II) v rozmezí koncentrací 1 – 100 ppb na IS-HM1 se rtuťovým filmem. ....	65
<b>Obr. 21:</b> Voltamogram detekce Pb(II) v rozmezí koncentrací 1 – 100 ppb na IS-HM1 se rtuťovým filmem. ....	66
<b>Obr. 22:</b> Voltamogram detekce In(III) v rozmezí koncentrací 1 – 100 ppb na IS-HM1 se rtuťovým filmem. ....	66
<b>Obr. 23:</b> Voltamogram simultánní analýzy Cd(II) a Pb(II) v rozmezí koncentrací 10 – 50 ppb na IS-HM1 se rtuťovým filmem. ....	67
<b>Obr. 24:</b> Voltamogramy simultánní analýzy Cd(II) a Pb(II) v rozmezí koncentrací 20 – 100 ppb na DRP C-110 s <i>in situ</i> vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem a na DRP C-110 s <i>ex situ</i> vytvořeným bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem. ....	70
<b>Obr. 25:</b> Voltamogram simultánní analýzy Cd(II) a Pb(II) v rozmezí koncentrací 20 – 100 ppb na DRP C-110 s <i>in situ</i> vytvořeným bismutovým filmem v prostředí octanového pufru. ....	71
<b>Obr. 26:</b> Voltamogramy simultánní analýzy Cd(II) a Pb(II) v rozmezí koncentrací 20 – 100 ppb na OHT-000 s <i>in situ</i> vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem a na DRP C-110 s <i>ex situ</i> vytvořeným bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem. ....	73
<b>Obr. 27:</b> Voltamogram detekce Zn(II) v rozmezí koncentrací 1 – 5 ppb na OHT-000 s <i>ex situ</i> vytvořeným bismutovým filmem. ....	75
<b>Obr. 28:</b> Voltamogram simultánní analýzy dvou druhů kvantových teček (CdS/ZnS-PEG-NH <sub>2</sub> a PbS-PEG-NH <sub>2</sub> ) přidaných v objemu 5 a 10 µl na DRP C-110 s <i>in situ</i> vytvořeným bismutovým filmem. ....	76
<b>Obr. 29:</b> Voltamogram analýzy kvantových teček CdTe-GSH, PbS-PEG-NH <sub>2</sub> a CdS/ZnS-PEG-NH <sub>2</sub> přidaných v objemu 10 µl na OHT-000 s <i>in situ</i> vytvořeným bismutovým filmem. ....	77
<b>Obr. 30:</b> Voltamogramy simultánní analýzy kvantových teček CdTe-GSH a PbS-PEG-NH <sub>2</sub> přidaných v objemu 2, 5 a 10 µl na DRP C-110 s <i>in situ</i> vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem a na DRP C-110 s <i>ex situ</i> vytvořeným bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem. ....	78
<b>Obr. 31:</b> Voltamogramy simultánní analýzy kvantových teček CdTe-GSH a PbS-PEG-NH <sub>2</sub> přidaných v objemu 2, 5 a 10 µl na OHT-000 s <i>in situ</i> vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem a na OHT-000 s <i>ex situ</i> vytvořeným bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem. ....	79
<b>Obr. 32:</b> Voltamogramy simultánní analýzy kvantových teček CdTe-MPA a PbS-PEG-COOH přidaných v objemu 2, 5 a 10 µl na DRP C-110 s <i>in situ</i> vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem a na DRP C-110 s <i>ex situ</i> vytvořeným bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem. ....	80
<b>Obr. 33:</b> Voltamogramy simultánní analýzy kvantových teček CdTe-MPA a PbS-PEG-COOH přidaných v objemu 2, 5 a 10 µl na OHT-000 s <i>in situ</i> vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem a na OHT-000 s <i>ex situ</i> vytvořeným bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem. ....	81
<b>Obr. 34:</b> SDS-PAGE pro ověření účinnosti konjugace monoklonálních protilátek anti-AFP (klon 5H7) s kvantovými tečkami CdTe-GSH a PbS-PEG-NH <sub>2</sub> . ....	82
<b>Obr. 35:</b> SDS-PAGE – ověření imobilizace antigenu AFP na SiMAG – Carboxyl. ....	83
<b>Obr. 36:</b> Voltamogramy – optimalizace ředění konjugátu v rozmezí koncentrací monoklonálních myších protilátek (klon 5H7) 1 – 6 µg označených kvantovými tečkami PbS-PEG-NH <sub>2</sub> na senzoru DRP C-110 s <i>in situ</i>	

vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem a na senzoru OHT-000 s <i>in situ</i> vytvořeným bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem. ....	85
<b>Obr. 37:</b> SDS-PAGE – ověření imobilizace monoklonálních myších protilátek anti-AFP (klon 4A3) na SiMAG – Carboxyl. ....	87
<b>Obr. 38:</b> Voltamogramy – elektrochemická detekce $\alpha$ -fetoproteinu v rozmezí koncentrací 1 – 200 ng na senzoru DRP C-110 s <i>in situ</i> vytvořeným bismutovým (A) nebo antimonovým (B) filmem a na OHT-000 s <i>in situ</i> vytvořeným bismutovým (C) nebo antimonovým (D) filmem. ....	89

## 7 SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Parametry analýzy s tištěnými tříelektrodovými senzory IS-HM1 .....	47
<b>Tabulka 2:</b> Parametry analýzy s tištěnými tříelektrodovými senzory DRP C-110 .....	49
<b>Tabulka 3:</b> Parametry analýzy s tištěnými tříelektrodovými senzory OHT-000 .....	51
<b>Tabulka 4:</b> Příprava gelů pro SDS-PAGE.....	58
<b>Tabulka 5:</b> Souhrnná data analýzy jednotlivých kovových iontů Cd(II), Pb(II) a In(III) na IS-MH1 se rtuťovým filmem. ....	65
<b>Tabulka 6:</b> Souhrnná data analýzy jednotlivých kovových iontů Cd(II) a Pb(II) na DRP C-110 s <i>in situ</i> nebo <i>ex situ</i> vytvořeným bismutovým filmem.....	68
<b>Tabulka 7:</b> Souhrnná data analýzy jednotlivých kovových iontů Cd(II) a Pb(II) na DRP C-110 s <i>in situ</i> nebo <i>ex situ</i> vytvořeným antimonovým filmem.....	69
<b>Tabulka 8:</b> Souhrnná data analýzy jednotlivých kovových iontů Cd(II) a Pb(II) a Zn(II) na OHT-000 s <i>in situ</i> nebo <i>ex situ</i> vytvořeným bismutovým filmem. ....	72
<b>Tabulka 9:</b> Souhrnná data analýzy jednotlivých kovových iontů Cd(II) a Pb(II) na OHT-000 s <i>in situ</i> nebo <i>ex situ</i> vytvořeným antimonovým filmem.....	73