

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**ANALYTICKÉ METODY PRO VÝZKUM  
FOSFOLIPIDŮ**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

Autor práce:

Mgr. Hana Tomková

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí disertační práce:

doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Konzultant:

RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

**Olomouc 2017**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne .....

.....

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé disertační práce RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi věnoval. Mé velké díky patří konzultantce RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za všestrannou pomoc, praktické rady a korigování mé práce. Dále chci poděkovat RNDr. Romaně Sokolové, Ph.D. za umožnění některých experimentů a pomoc při interpretaci jejich výsledků.

Zároveň bych ráda poděkovala svému manželovi a rodině za trpělivost a nezbytnou podporu během studia.

Tato práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA\_PrF\_2016\_016, IGA\_PrF\_2017\_020).

## SOUHRN

---

Disertační práce se zabývá studiem vlastností fosfolipidových molekul a jejich agregátů různými analytickými metodami. Byly studovány agregační vlastnosti směsi fosfolipidů izolovaných ze sojových bobů, komerčně dostupné pod názvem Asolectin. Asolectin byl využit jako modifikátor uhlíkové pastové elektrody pro zvýšení citlivosti stanovení pesticidu paraquat ve vodě. Agregačních vlastností asolectinu bylo využito pro vytvoření lipidové vrstvy na povrchu elektrody ze skelného uhlíku. Cyklickou voltametrií, elektrochemickou impedanční spektroskopií a mikroskopií atomárních sil bylo zjištěno, že fosfolipidová vrstva pokrývá celý povrch elektrody, je kompaktní a její tloušťka ( $7,1 \pm 1,2$  nm) odpovídá tloušťce biologické membrány (5-10 nm). Takto připravená lipidová membrána je stabilní nejméně 24 hodin i v prostředí obsahujícím paraquat. Elektroda s lipidovou membránou byla využita pro studium interakcí s látkami různé hydrofobicity. Selektivní propustnost a schopnost akumulace lipofilních látek umožnila vyvinout elektrochemický sensor pro square wave voltametrické stanovení paraquat s mezí detekce  $2,2 \text{ nmol l}^{-1}$ .

## SUMMARY

---

The thesis deals with investigation of fundamental properties of phospholipids molecules and their aggregates using various analytical techniques. Aggregation properties of phospholipids mixture from soybeans, commercially available as Asolectin, were used for the purpose. Asolectin was employed as a modifier in carbon paste electrode to improve the sensitivity of paraquat determination in aqueous samples. Aggregation capabilities of asolectin were used for preparation of lipid layer on the surface of glassy carbon electrode. Cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy and atomic force microscopy revealed that phospholipid layer covers whole electrode surface, layer is compact and its thickness ( $7.1 \pm 1.2$  nm) equals to those of biological membrane (5-10 nm). The lipid membrane is stable enough for 24 hours even in presence of paraquat. The electrode with lipid membrane was applied for investigation of interactions with various compounds of different hydrophobicity. Selective permeability and ability to accumulate lipophilic compounds enables to develop electrochemical sensor for square wave voltammetric determination of paraquat with detection limit  $2.2 \text{ nmol l}^{-1}$ .

# OBSAH

---

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>3</b>
2.1. VÝZNAMNÉ MEMBRÁNOVÉ LIPIDY.....	3
2.1.1. Fosfolipidy .....	4
2.1.2. Glykolipidy .....	5
2.1.3. Steroidy .....	6
2.1.4. Agregované formy lipidů .....	6
2.2. BUNĚČNÉ MEMBRÁNY .....	7
2.2.1. Umělé biologické membrány .....	9
2.2.1.1. Černá lipidová membrána ( <i>black lipid membrane, BLM</i> ) .....	10
2.2.1.2. Lipidové membrány na pevných nosičích ( <i>SLBs</i> ).....	11
2.2.1.3. Hybridní lipidové membrány ( <i>HBM</i> s).....	13
2.2.1.4. Lipidové membrány podložené polymerní vrstvou.....	13
2.2.1.5. Volné a/nebo volně zavěšené lipidové membrány .....	14
2.2.1.6. Ukotvené lipidové membrány ( <i>tBLM</i> ) .....	14
2.2.1.7. Samouspořádané lipidové membrány .....	15
2.2.1.8. Liposomy .....	16
2.2.2. Metody studia biologických membrán.....	17
2.3. ELEKTROCHEMICKÉ SENSORY .....	18
2.4. PARAQUAT.....	19
2.4.1. Toxicita paraquatu.....	20
2.4.2. Stanovení paraquatu .....	21
2.4.3. Elektrochemické chování paraquatu .....	23
2.5. VYBRANÉ ANALYTICKÉ METODY PRO CHARAKTERIZACI MEMBRÁN....	24
2.5.1. Elektroanalytické metody.....	24
2.5.2. Mikroskopie atomárních sil ( <i>AFM</i> ) .....	25
2.5.3. Rentgenová fotoelektronová spektroskopie ( <i>XPS</i> ) .....	27
2.5.4. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ( <i>HPLC</i> ).....	27
<b>3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>28</b>
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>29</b>

4.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	29
4.2. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ .....	29
4.3. POUŽITÉ PRACOVNÍ POSTUPY .....	30
4.3.1. Stanovení paraquatu adsorpční rozpouštěcí diferenčně pulzní voltametrií.....	30
4.3.2. Příprava modifikované elektrody ze skelného uhlíku .....	31
4.3.3. Testování pokrytí elektrody .....	31
4.3.3.1. <i>Cyklická voltametrie (CV)</i> .....	31
4.3.3.2. <i>Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS)</i> .....	32
4.3.4. Tloušťka fosfolipidové vrstvy - měření AFM.....	32
4.3.5. Stabilita fosfolipidové vrstvy .....	33
4.3.6. Charakterizace povrchu elektrody - měření XPS.....	34
4.3.7. Interakce paraquatu s fosfolipidovou vrstvou .....	35
4.3.7.1. <i>Časová závislost</i> .....	35
4.3.7.2. <i>Závislost na rychlosti scanu</i> .....	36
4.3.8. Interakce fosfolipidové vrstvy s modelovým systémem .....	36
4.3.9. Akumulace paraquatu do fosfolipidové vrstvy .....	37
4.3.10. Vliv paraquatu na stabilitu fosfolipidové vrstvy .....	37
4.3.11. Stanovení paraquatu .....	38
<b>5. VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>40</b>
5.1. STANOVENÍ PARAQUATU POMOCÍ UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODY ....	40
5.2. PŘÍPRAVA FOSFOLIPIDOVÉ VRSTVY .....	43
5.3. VLASTNOSTI FOSFOLIPIDOVÉ VRSTVY .....	47
5.3.1. Tloušťka fosfolipidové vrstvy .....	47
5.3.2. Stabilita fosfolipidové vrstvy .....	51
5.4. VLASTNOSTI A OBNOVENÍ POVRCHU UHLÍKOVÉ ELEKTRODY .....	54
5.5. INTERAKCE FOSFOLIPIDOVÉ VRSTVY S LÁTKAMI .....	57
5.5.1. Interakce paraquatu s fosfolipidovou vrstvou .....	57
5.5.2. Interakce fosfolipidové vrstvy s modelovým systémem.....	60
5.5.3. Akumulace paraquatu do fosfolipidové vrstvy .....	66
5.5.4. Vliv paraquatu na stabilitu fosfolipidové vrstvy .....	68
5.6. STANOVENÍ PARAQUATU - ELEKTROCHEMICKÝ SENSOR.....	72
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>75</b>

<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>76</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>99</b>
<b>9. PŘÍLOHY .....</b>	<b>101</b>



# 1. ÚVOD

---

Fosfolipidy jsou velmi důležitou skupinou složených lipidů, neboť jsou základním stavebním prvkem buněčných membrán. Jsou to estery vyšších mastných kyselin s alkoholem glycerolem. Díky své struktuře mají fosfolipidy amfifilní charakter. Obsahují hydrofilní část (polární "hlavu"), tvořenou glycerolem, zbytkem kyseliny fosforečné a alkoholem a hydrofobní část (nepolární "ocas"), který je tvořen jedním nebo více uhlovodíkovými řetězci. Ve vodném prostředí vlivem hydrofobních interakcí vytváří fosfolipidy různé agregáty - micely, dvojvrstvy či liposomy, v závislosti na jejich koncentraci v roztoku.

Fosfolipidy jsou základní stavební jednotkou cytoplasmatické membrány (fosfolipidová dvojvrstva), která chrání a obklopuje každou živou buňku a odděluje její vnitřní a vnější prostor. Její polopropustnost zajišťuje, že se do buňky dostávají důležité látky a odpadní látky jsou zpět z buňky vylučovány. Avšak ne všechny látky jsou schopné přes membránu pronikat. Transport látek přes cytoplasmatickou membránu zajišťují v mnoha případech proteiny, které jsou "vnořeny" do fosfolipidové dvojvrstvy. Složení biologické membrány je závislé na typu buňky, kterou obklopuje. Obsahují různý poměr lipidů (25-79 %), proteinů (18-75 %) a sacharidů (0-8 %) v závislosti na jejich původu.

Z hlediska farmacie, medicíny a zdraví nejenom člověka je důležité porozumět tomu, jakým způsobem pronikají různé látky přes biologickou membránu a které z nich jsou nebo nejsou schopné tohoto transportu. Z tohoto důvodu se fosfolipidové dvojvrstvy (membrány) využívají jako modely ke studiu vlastností biologických membrán. Umělé fosfolipidové membrány jsou vytvářeny různými způsoby na různých typech materiálů v závislosti na tom, k jakým účelům mají sloužit. Používají se ke studiu tloušťky membrán, jejich elektrických či mechanických vlastností nebo pro objasnění interakcí různých biologicky významných látek s membránou (tedy pro simulaci interakce těchto látek s buněčnými membránami).

Příprava umělých fosfolipidových membrán je popisována pouze z čistých fosfolipidů nebo ze směsi dvou nebo tří typů fosfolipidů. Jelikož reálné buněčné membrány jsou tvořeny směsí fosfolipidů, byla v této práci použita přírodní fosfolipidová směs izolovaná ze sojových bobů (komerčně dostupná pod názvem Asolectin) ke studiu jejích agregačních vlastností na pevném povrchu. Agregační vlastnosti této směsi ve vodném prostředí byly již dříve studovány několika různými analytickými metodami a bylo také analyzováno složení této směsi.

V této práci byl asolectin využit nejdříve jako modifikátor pro zlepšení citlivosti uhlíkových pastových elektrod při analýze pesticidů. Dále byla tato látka využita pro přípravu umělé membrány na pevném povrchu a následně ke studiu jejích vlastností jako je tloušťka, kompaktnost, stabilita a interakce s různými typy látek (hydrofilní, lipofilní).

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

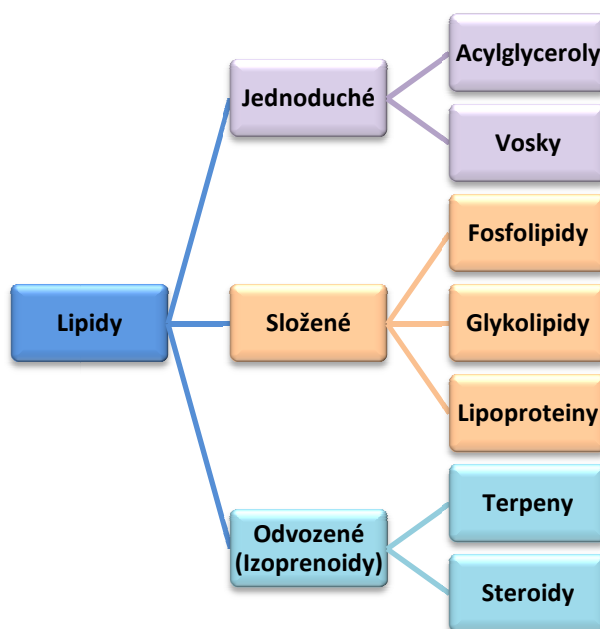
---

### 2.1. VÝZNAMNÉ MEMBRÁNOVÉ LIPIDY

---

Lipidy lze rozdělit podle stavby jejich molekul do několika skupin (obr. 1). První skupinou jsou jednoduché lipidy, což jsou estery mastných kyselin a alkoholů. Jednoduché lipidy se dále dělí na vosky (estery vyšších alifatických alkoholů) a acylglyceroly (estery glycerolu). Složené lipidy obsahují nejen vázané mastné kyseliny a alkoholy, ale také další složky, podle kterých se dále rozdělují na fosfolipidy (obsahují esterově vázanou kyselinu fosforečnou), glykolipidy (obsahují glykosidicky vázanou cukernou složku) a lipoproteiny, které vznikají spojením lipidů se specifickými bílkovinami. Poslední skupinou jsou odvozené lipidy (izoprenoidy), které mají jinou strukturu, ale s lipidy je pojí podobné vlastnosti. Patří sem terpeny a steroidy, z nichž nejvýznamnějším zástupcem je cholesterol.

Mezi hlavní membránové lipidy - tedy lipidy, které se podílejí na vzniku biologických membrán - patří fosfolipidy, glykolipidy a steroidy, kterým budou věnovány další kapitoly.



Obr. 1: Rozdělení lipidů podle jejich stavby

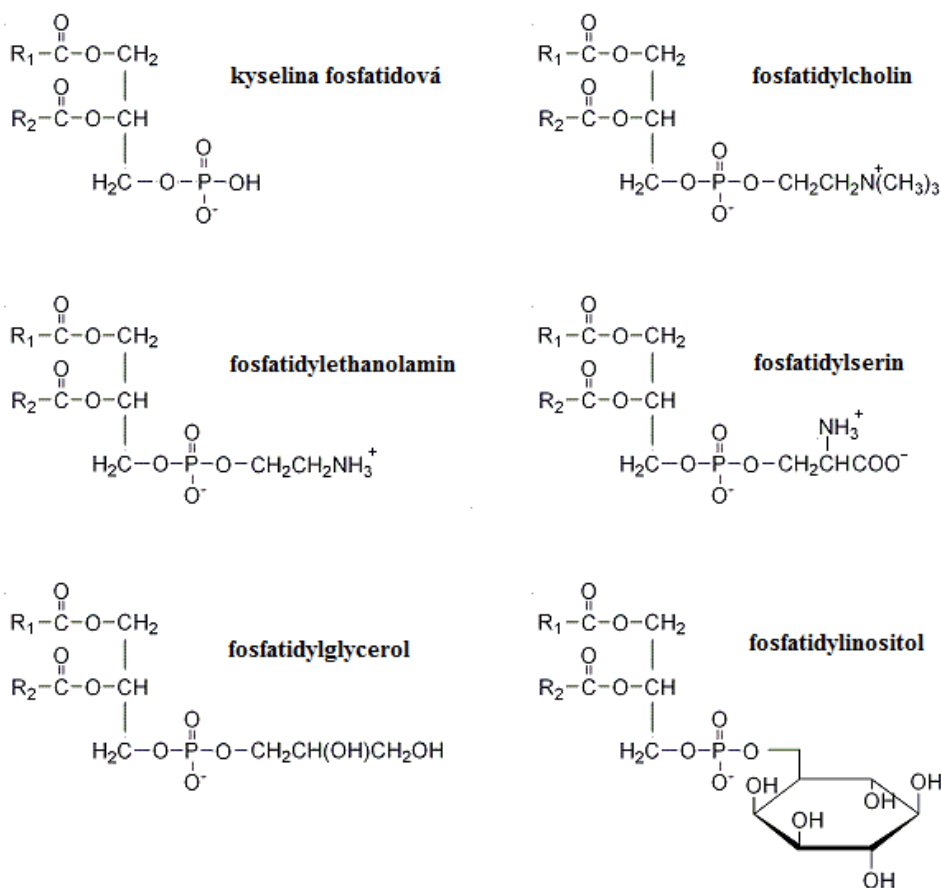
### 2.1.1. Fosfolipidy

---

Fosfolipidy jsou velmi důležitou skupinou složených lipidů, neboť jsou základním stavebním prvkem buněčných membrán. Jsou to smíšené estery vyšších mastných kyselin a kyseliny fosforečné s alkoholem glycerolem (glycerofosfolipidy) nebo sfingosinem (sfingofosfolipidy). Nejvýznamnější skupinou fosfolipidů jsou glycerofosfolipidy, které se dělí na tři základní skupiny podle počtu vázaných mastných kyselin, dalších typů vazeb a struktury dalších složek na fosfatidy, lysofosfatidy a plasmalogeny [1]. Fosfatidy jsou deriváty fosfatidylu, jehož základem je 1,2-diacyl-*sn*-glycerol, v němž je na třetím uhlíku vázána kyselina fosforečná nebo její ester. Základní sloučeninou je kyselina fosfatidová. Pokud poloha C<sub>2</sub> není obsazena acylem, nazývá se vzniklý zbytek odvozený od 1-acyl-*sn*-glycerolu lysofosfatidyl. Ve fosfatidech i lysofosfatidech je kyselina fosforečná esterifikována dalšími hydroxysloučeninami, nejčastěji cholinem, serinem, ethanolaminem, inositolem nebo glycerolem za vzniku příslušných fosfolipidů (obr. 2) [2].

Důležitou skupinou fosfolipidů jsou sfingofosfolipidy, jejichž základem je nenasycený aminoalkohol sfingosin. Na molekulu sfingosinu se mohou vázat dva zbytky mastných kyselin. Jeden z acylů se váže přes sekundární alkoholovou skupinu esterovou vazbou, druhý přes primární aminoskupinu jako substituovaný amid. Na primární alkoholovou skupinu se váže kyselina fosforečná nebo její ester, podobně jako ve fosfatidech. V přírodě nejrozšířenějším typem sfingofosfolipidů je sfingomyelin. Sfingomyeliny jsou součástí biologických membrán a zejména myelinového obalu nervových buněk [3].

Fosfolipidy jsou nezbytnou složkou živočišných i rostlinných organismů, kde jsou přítomny jednak jako součást buněčných a vnitrobuněčných membrán, jednak jako součást lipoproteinů. Na fosfolipidy jsou zvláště bohaté některé živočišné tkáně, především nervová tkáň a vaječný žloutek. Také sójové boby jsou poměrně bohatým zdrojem fosfolipidů, avšak jejich složení je značně odlišné od vaječných.



Obr. 2: Třídy fosfolipidů.

### 2.1.2. Glykolipidy

Glykolipidy jsou deriváty mastných kyselin, které obsahují vázané cukry. Pokud obsahují také vázaný glycerol, nazývají se glyceroglykolipidy, obsahují-li vázané sfingosiny, nazývají se sfingoglykolipidy. Nejčastějším vázaným cukrem je D-galaktosa, řidčeji také D-glukosa nebo D-fruktosa, ale i jiné cukry. Provázejí fosfolipidy jako součásti buněčných struktur a rovněž bývají vázány v lipoproteinech [1]. Jsou velmi rozšířené ve všech tkáních, zvláště pak v nervové tkáni, jako například v mozku. Vyskytují se zejména ve vnějším listu plasmatické membrány, kde přispívají k buněčným povrchovým sacharidům [4].

Sfingoglykolipidy mají na primární alkoholové skupině sfingosinu na místě fosfocholínu glykosidově vázaný sacharid - jsou to např. cerebrosidy a gangliosidy. Cerebrosidy obsahují na tomto místě jednu hexosu - glukosu nebo galaktosu. Gangliosidy obsahují řetězec 3 nebo více cukrů navázaných na primární alkoholovou skupinu. Jsou součástí vnějšího povrchu buněčných membrán [1,3,4].

### 2.1.3. Steroidy

---

Steroidy jsou deriváty hexadekahydro-cyklopenta[a]fenanthrenu. Jsou to hydrofobní nebo amfifilní látky, z nichž mnohé mají charakter hormonů. Strukturní a transportní význam mají steroly a žlučové kyseliny, které řadíme do skupiny lipidů [3].

Steroly se dosud běžně dělí na kategorie podle výskytu v přírodě na živočišné steroly (zoosteroly), rostlinné steroly (fytosteroly) a steroly hub (mykosteroly). Steroly jsou v organismech nezbytnou složkou lipoproteinů a tukových membrán, u živočichů jsou zvláště významné v nervových tkáních a při transportu lipidů [1].

Nejvýznamnějším zoosterolem je cholesterol. Cholesterol je významnou složkou živočišných plasmatických membrán a v menší míře se vyskytuje v membránách vnitrobuněčných organel. Jeho polární OH-skupina mu poskytuje slabý amfifilní charakter, zatímco jeho kondenzované cykly mu zaručují větší pevnost, než mají ostatní membránové lipidy. Cholesterol je tudíž důležitou látkou určující vlastnosti membrán. Je rovněž zastoupen v lipoproteinech krevní plasmy. Cholesterol je metabolický prekurzor steroidních hormonů, látek regulujících velké množství různých fyziologických funkcí včetně pohlavního vývoje a metabolismu cukrů [5].

### 2.1.4. Agregované formy lipidů

---

Výše popsané významné membránové lipidy mají amfifilní charakter - obsahují nepolární alifatické uhlovodíkové konce (hydrofobní část) a polární hlavičky (hydrofilní část). Na základě hydrofobních interakcí mezi hydrofobními řetězci mají lipidy tendenci spontánně agregovat [6] tak, aby hydrofobní oblasti byly stíněny před vodou, zatímco hydrofilní polární skupiny zůstaly ve styku s vodným prostředím. Spontánní agregace vede ke vzniku lipidových micel a vyšších lipidových struktur. Koncentrace, při níž začne docházet k agregaci molekul, se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC). Velikost a tvar micel pak závisí na chemické povaze a velikosti molekuly.

Při vyšší koncentracích vytváří lipidové molekuly velké micely, které mohou přecházet až do dvojných vrstev lipidů, ve kterých jsou uhlovodíkové řetězce orientovány k sobě, zatímco polární hlavičky jsou orientovány do vodného prostředí na obou stranách dvojvrstvy. Výsledná lipidová membrána je základním stavebním prvkem všech biologických membrán.

Lipidové dvojvrstvy se mohou dále uzavírat do sférických dutých váčků (liposomů) [7], které ve svém středu uzavírají vodnou fázi. Díky schopnosti liposomů enkapsulovat hydrofilní látky do svého vnitřního prostoru a/nebo inkorporovat hydrofobní látky do lipidové vrstvy, našly tyto agregáty uplatnění v mnoha vědních oborech a průmyslových odvětvích, především ve farmacii a lékařství [8], kosmetice či potravinářském průmyslu [9].

## 2.2. BUNĚČNÉ MEMBRÁNY

---

Každá živá buňka musí být obklopena selektivně propustnou bariérou, která chrání její vnitřní prostor před chemickými změnami a nežádoucími vlivy jejího okolí. Tímto obalem, který chrání každou živou buňku, je cytoplasmatická membrána. Její polopropustnost zajišťuje, že základní molekuly jako jsou glukosa, aminokyseliny a lipidy mohou pronikat dovnitř buňky, metabolické intermediáty zůstávají v buňce a odpadní látky jsou z buňky vylučovány [10]. Uvnitř eukaryotických buněk se nachází také vnitrobuněčné (intracelulární) membrány, které obklopují jednotlivé organely. Biologické membrány jsou rozmanité a obsahují různý poměr lipidů (25-79 %), proteinů (18-75 %) a sacharidů (0-8 %) v závislosti na jejich původu [11].

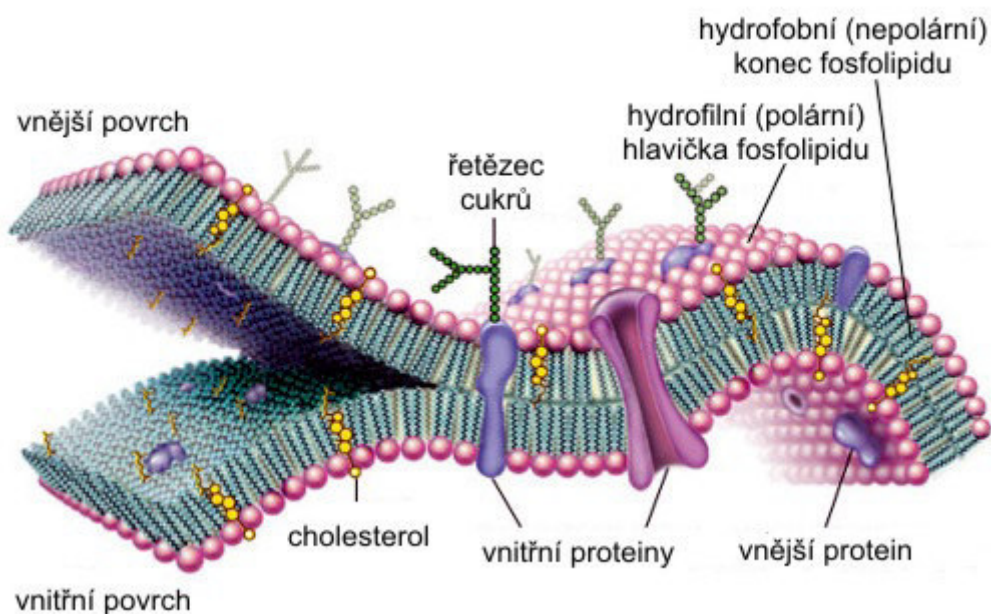
Lipidová část membrány (fosfolipidová dvojvrstva) je složitou směsí a její složení se liší podle druhu membrány. Hlavními lipidy tvořícími přírodní biologické membrány jsou glycerofosfolipidy, sfingolipidy, glykosfingolipidy a steroly. Membrána eukaryotických buněk je přibližně z 50 % tvořena fosfatidylcholinem (PC) s malými frakcemi fosfatidylethanolaminu (PE), fosfatidylserinu (PS), fosfatidylinositolu (PI) a fosfatidové kyseliny (PA) [12]. Dalšími významnými strukturními lipidy savčích buněk jsou sfingolipidy, z nichž nejvýznamnější je sfingomyelin, stejně tak jako glykosfingolipidy obsahující mono-, di- nebo oligosacharidy [13]. Poslední významnou skupinou lipidů tvořících buněčnou membránu jsou steroly, z nichž nejrozšířenějším steroidem v membránách je cholesterol. Hojněji se vyskytuje na vnější straně plasmatické membrány a výrazně ovlivňuje její fluiditu [4,14].

Membránové fosfolipidy působí jako médium zodpovědné za ukotvení membránových proteinů, které se rozdělují podle toho, jak pevně jsou spojeny s membránami (obr. 3). Integrované proteiny se těsně vážou k membránám hydrofobními vazbami a mohou být od nich odděleny pouze činidly, která membrány rozrušují (např. organická rozpouštědla, tenzidy,

apod.). Periferní proteiny se dají z membrán uvolnit relativně mírnými postupy, které membrány neporušují, jako je působení roztoků o vysoké iontové síle nebo změna pH [5].

Membránové proteiny uskutečňují velké množství specifických procesů a tak se mnoho proteinů vyskytuje pouze v membránách. Poměr proteinů k lipidům v membránách se značně liší podle funkce membrány - většina membrán je alespoň z jedné poloviny z proteinů [5]. Proteiny v membránách mají kromě transportu specifických živin, metabolitů či iontů přes lipidovou dvojnou vrstvu celou řadu dalších funkcí. Některé ukotvují membránu k makromolekulám na jedné či druhé straně. Jiné fungují jako receptory, které detegují chemické signály v okolí buňky a předávají je dovnitř buňky. Další pracují jako enzymy, které katalyzují specifické reakce. Každý typ buněčných membrán obsahuje jinou sadu proteinů odrážející specifickou funkci specifické membrány [5,15].

Membrány jsou stále více studovány pro pochopení jejich vlastností a funkcí. K vlastnímu studiu buněčných membrán lze použít buď reálné buňky nebo systém buněčnou membránu do jisté míry napodobující (modelové membrány). Z důvodu složitosti biologických membrán a náročné práce s reálnými buňkami vzrůstá zájem použít jednoduché modely napodobující buněčné membrány ke studiu membránových procesů *in vitro*.



Obr. 3: Model buněčné membrány



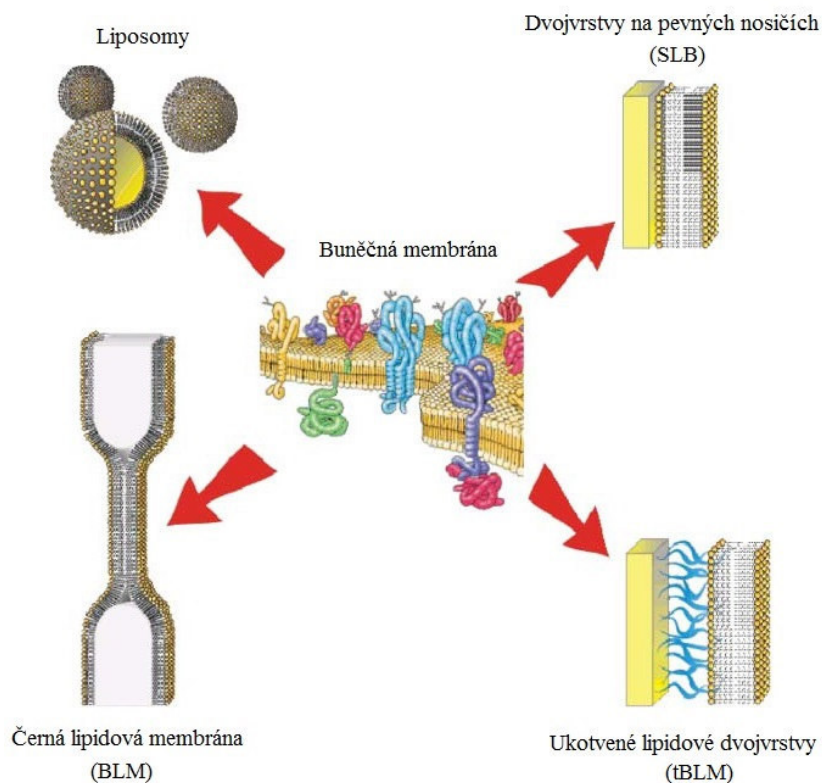
### 2.2.1. Umělé biologické membrány

---

Buněčná membrána je složitý systém, který interaguje s vnitřním i vnějším buněčným prostředím a jeho funkce je obtížné studovat přímo. Z tohoto důvodu je nutné vytvářet racionální modely membrán napodobující membránovou strukturu. V souvislosti s tímto problémem byly vyvinuty různé modely biologických membrán napodobující jejich základní funkce a poskytující systémy pro studium různých druhů membránových procesů [16]. Umělé biologické membrány jsou tvořeny jedním nebo více druhy fosfolipidů a slouží k lepšímu pochopení vlastností a funkcí biologických membrán, jako například k charakterizaci membránové struktury, ke studiu interakcí membrány s léčivými, interakcí protein-membrána a mnoha dalších membránových procesů *in vitro*. Jednoduché modely biologických membrán sestávají z purifikovaných nebo syntetizovaných fosfolipidů. Existuje několik typů lipidových membrán, které se používají jako modely pro tyto studie. Jsou to:

- černá lipidová membrána (BLM)
- lipidové membrány na pevných nosičích (SLB)
- hybridní lipidové membrány (HBM)
- lipidové membrány podložené polymerní vrstvou
- volné a/nebo volně zavěšené lipidové membrány
- ukotvené lipidové membrány (tBLMs)
- samouspořádané lipidové membrány
- liposomy

Některé z těchto membránových modelů jsou na obr. 4.



Obr. 4: Některé typy modelů biologických membrán [17].

#### 2.2.1.1. Černá lipidová membrána (*black lipid membrane, BLM*)

Jako modelový systém byla černá lipidová membrána (BLM) zavedena před více jak 50 lety a od té doby významně přispěla k současným znalostem biologických membrán. BLMs umožňují charakterizaci fyzikálně-chemických vlastností membrán a jsou zvláště citlivé na modifikace elektrických vlastností, jako je vodivost, dielektrická konstanta membrány nebo povrchový náboj [18]. Název černá lipidová membrána je odvozen od vzhledu vrstvy, pokud ji osvítime a sledujeme odražené světlo v mikroskopu. Je-li tloušťka vrstvy zanedbatelná vzhledem k vlnové délce světla, pak se membrána v mikroskopu jeví jako tmavá (černá) v důsledku interference světla odraženého od rozhraní voda/lipid a fázově posunutého světla odraženého od rozhraní lipid/voda [18].

Existuje několik metod formování BLM, všechny však zahrnují vytvoření membrány přes malý otvor, obvykle ne větší než 1 mm. Otvor je vytvořen na hydrofobním materiálu jako je např. polyethylen nebo teflon. Formování černé lipidové membrány poprvé studoval Mueller se svými kolegy a to metodou "malování" (painting) nebo nanášení roztoku lipidu

přes malý otvor [19]. Druhou nejvíce popisovanou metodou pro přípravu BLM je pak metoda skládání monovrstev [20].

První z uvedených metod spočívá v použití nanášecího štětečku (původně ze sobolí srsti, velikost 3), kterým se 1 - 2% roztok fosfolipidu v organickém rozpouštědle (nejčastěji n-dekan) nanese přes malý otvor v hydrofobním materiálu (teflon, polyethylen). Nanášení roztoku se provádí pod hladinou vodného roztoku pufru, kde dojde ke spontánnímu přeuspořádání molekul fosfolipidů a během několika minut dojde k vytvoření stabilní dvojvrstvy [19,21]. Nevýhodou této metody je, že dvojvrstva může obsahovat rozpouštědla, která se používají na rozpouštění lipidů, což ovlivňuje fyzikální vlastnosti vzniklé membrány. Proto Montal a Mueller přišli s metodou skládání monovrstev. Roztok lipidů v organickém rozpouštědle se rozprostře na hladině vodného roztoku ve dvou kompartmentech oddělených přepážkou a teflonovou folií s malým otvorem. Po odpaření rozpouštědla a spontánním uspořádání monovrstev na hladině se teflonová folie pomalu ponoří pod hladinu, přičemž se fosfolipidové monovrstvy uchytí prostřednictvím hydrofobních interakcí z obou stran folie a v místě otvoru vytvoří dvojvrstvu. Alternativně je možné skládat monovrstvy postupným nebo současným zvýšením hladin v obou kompartmentech opatrným přidáváním pufru do obou oddělených částí. Těmito způsoby vzniká dvojvrstva s velmi malým či dokonce žádným obsahem rozpouštědel [20].

Braun et al. vyvinuli metodu přípravy planární lipidové dvojvrstvy z monovrstev za pomoci vzduchové bubliny. Tato metoda kombinuje výhody metody painting a skládání monovrstev. Umožňuje rychlou přípravu stabilních dvojvrstev a rychlé snižování počtu aktivních kanálů v dvojvrstvě [22].

BLM byly použity ke studiu různých biofyzikálních procesů. Jedním z nejdůležitějších je formování kanálků ve fosfolipidové vrstvě působením peptidů [23], proteinů [24], antibiotik [25] a dalších póry-formujících biomolekul.

#### 2.2.1.2. Lipidové membrány na pevných nosičích (supported lipid bilayers, SLBs)

Lipidové dvojvrstvy na pevných nosičích jsou robustnější a stabilnější než černé lipidové membrány. Výhodou SLB je, že se mohou přímo vytvořit na povrchu, který je specifický pro určitou analytickou techniku. Aby se SLB co nejvíce přiblížily vlastnostem biologické membrány, zejména zachováním membránové fluidity, nemohou ležet přímo na pevném podkladu. Membránová fluidita je v systému SLB udržována 1-2 nm tenkou vrstvou

vody mezi membránou a substrátem [26]. Separace membrány od pevného substrátu ultratenkou vrstvou vody udržuje termodynamické a strukturní vlastnosti volné membrány [16,27].

Aby bylo možné připravit membránu vysoké kvality (tzn. membránu s malým množstvím nebo s žádnými defekty a vysokou lipidovou mobilitou), je nutné, aby povrch, na kterém se membrána připravuje, byl hydrofilní, hladký a čistý. Nejlepšími substráty pro přípravu membrán jsou křemenné sklo [26], borosilikátové sklo [28], slída [29] a zoxidovaný křemík [26].

SLB mohou být připraveny na rovném hladkém povrchu několika různými způsoby: Langmuir-Blodgett technikou, fúzí liposomů nebo kombinací obou metod.

Langmuir-Blodgett technika spočívá v postupném přenesení dvou lipidových filmů (monovrstev) z fázového rozhraní kapalina/vzduch na povrch substrátu. První vrstva je vytvořena vytáhnutím substrátu ve vertikální poloze z kapaliny na vzduch přes lipidovou monovrstvu. Na povrchu substrátu se vytvoří vrstva, kde "hlavičky" lipidů směřují k substrátu a "ocásky" volně do prostoru. Druhá vrstva je vytvořena ponořením substrátu s první vrstvou lipidů horizontálně (Langmuir-Schaeffer technika) nebo vertikálně (Langmuir-Blodgett technika) ze vzduchu do kapaliny přes lipidový film [30].

Druhá metoda přípravy fosfolipidové dvojvrstvy na pevném substrátu je adsorpce a fúze liposomů z vodné suspenze [31]. Jsou připraveny malé unilamelární vesikuly (SUV, průměr 30-50 nm) s jedinou lipidovou dvojvrstvou. Proces začíná adsorpcí liposomů z roztoku na povrch substrátu. V první fázi může dojít ke splynutí jednotlivých liposomů mezi sebou. Po kontaktu liposomu dojde k jeho prasknutí a na povrchu substrátu se vytvoří lipidová dvojvrstva [30,32].

Třetí metoda sestává z kombinace uvedených dvou metod, tedy přípravy monovrstvy pomocí Langmuir-Blodgett metody a druhé monovrstvy následnou fúzí liposomů pro vytvoření fosfolipidové dvojvrstvy [33]. Tato metoda je velice efektivní pro přípravu asymetrických dvojvrstev [34] a pro inkorporaci transmembránových proteinů do připravené vrstvy [33].

Takto připravené lipidové membrány byly použity například pro charakterizaci membránové struktury [35], studium interakcí mezi léčivem a membránou [36,37] a interakcí bílkovin s membránou [38].

### *2.2.1.3. Hybridní lipidové membrány (hybrid bilayer membranes, HBMs)*

---

K přípravě hybridních lipidových membrán se používají alkanthioly, které jsou kovalentně navázané na tenké vrstvě kovu, jako je zlato [39] či rtuť [40]. Výsledná samouspořádaná monovrstva (SAM) má díky alkanovým řetězcům hydrofobní vlastnosti napodobující lipidové řetězce. Adsorpcí liposomů na povrch SAM se vytvoří hybridní dvojvrstva, jejíž spodní vrstva je složená z alkanthiolu a horní vrstva z fosfolipidů [41].

Tyto typy membrán jsou velice stabilní a robustní. Byly použity například pro studium izolačních vlastností fosfolipidové vrstvy, aktivity proteinových pórů membrány [39] nebo pro studium interakcí receptor-ligand či buňka-buňka [42].

### *2.2.1.4. Lipidové membrány podložené polymerní vrstvou (polymer-cushioned membranes)*

---

Klasické lipidové membrány na pevných nosičích (SLB) mají mezi substrátem a dvojvrstvou 1-2 nm tenkou vrstvu vody. Tato vrstva neposkytuje dostatečný prostor pro cytosolické domény většiny transmembránových proteinů a v důsledku toho se bude protein dotýkat povrchu nosiče, deformovat se a nakonec denaturovat [43]. Aby se zabránilo kontaktu inkorporovaných proteinů s nosičem, byly vyvinuty lipidové membrány podložené polymerní vrstvou.

Tento model odděluje membránu od pevného substrátu pomocí měkkého polymerního materiálu. Polymer slouží jako lubrikační vrstva mezi membránou a substrátem a významně redukuje kontakt mezi proteiny inkorporovanými v membráně a substrátem. Tím účinně omezuje možnost denaturace proteinu - proto se tyto membrány nejvíce používají pro inkorporaci proteinu do lipidové membrány [16].

Používané polymery musí mít určité vlastnosti. Musí být schopné vytvářet homogenní tenkou vrstvu vhodnou pro formování dvojvrstvy, musí být hydrofilní a chemicky inertní tak, aby nedocházelo k nežádoucím interakcím s membránou [43]. Podle vazby polymeru s membránou se polymery rozdělují na dvě hlavní skupiny. Nezávislé (samostatné) polymery, které nejsou přímo vázané na lipidovou dvojvrstvu - např.: polyakrylamid, celulóza, agarosa nebo polyelektrolyty. Druhou skupinu tvoří vázané (připojené) polymery, které jsou celé nebo jejich části spojeny s lipidy nebo hydrofobními molekulami integrovanými v membráně -

např.: polyethylenglykol nebo poly(2-methyl-2-oxazolin) [43]. Jako polymerová podpora umělých biologických membrán byly dále studovány například polyelektrolyty, lipopolymery, biomakromolekuly jako chitosan, celulosa a streptavidin [44].

K nanášení fosfolipidové membrány na polymerní vrstvu se používají tři metody. První krok je stejný pro všechny a to vytvoření fosfolipidové monovrstvy Langmuir-Blodgettovou technikou. Druhá monovrstva pak může být nanášena fúzí malých unilamelárních liposomů, horizontální Langmuir-Schäferovou metodou nebo opět použitím Langmuir-Blodgettovy techniky [43].

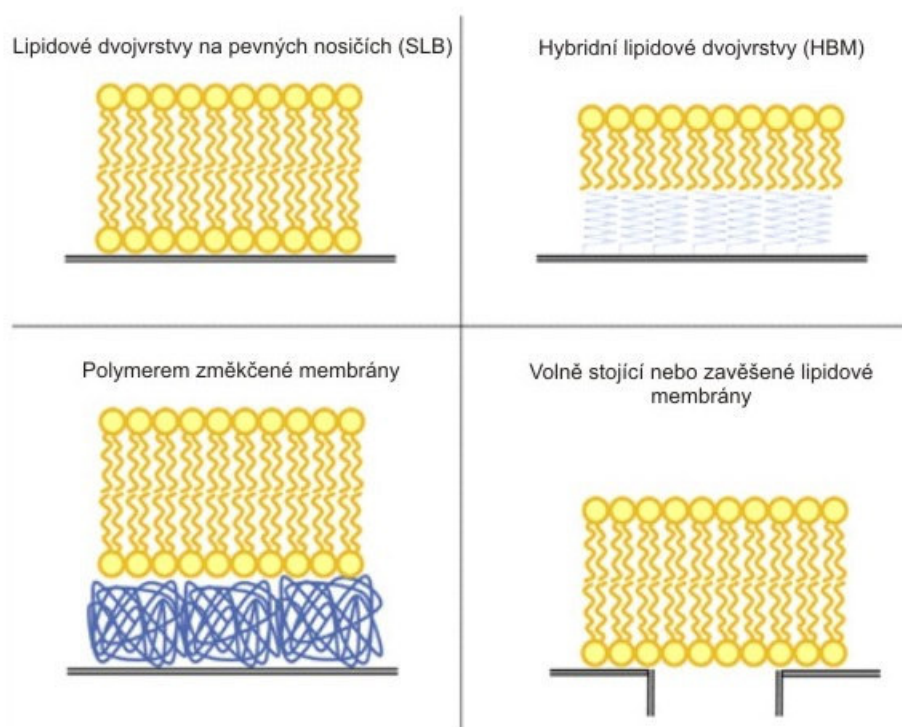
#### 2.2.1.5. Volně a/nebo volně zavěšené lipidové membrány

Volně stojící a/nebo volně zavěšené lipidové vrstvy jsou membrány formované přes póry velikosti mikrometrů nebo nanometrů [45]. Tím se stávají atraktivním modelem pro fyziologický výzkum, protože volně stojící nebo zavěšená lipidová membrána je přístupná z obou stran a poskytuje větší prostor pro analýzu [16].

#### 2.2.1.6. Ukotvené lipidové membrány (tethered lipid bilayer membranes, tBLM)

Ukotvené lipidové dvojvrstvy jsou membrány na pevných nosičích, kde spodní vrstva fosfolipidů je kovalentně vázaná k povrchu přes tzv. spacerovou skupinu. Tato skupina izoluje membránu od povrchu, kompenzuje povrchové nerovnosti substrátu a může sloužit jako rezervoár iontů pod membránou. Obvykle tyto membrány vykazují vysokou stabilitu i po dobu několika dnů nebo týdnů [17]. Tento typ membrán je používán především při studiu membránových proteinů [46].

Některé typy popisovaných umělých lipidových membrán jsou na obrázku 5.



Obr. 5: Některé typy umělých lipidových membrán [16]

#### 2.2.1.7. Samouspořádané lipidové membrány (self-assembled lipid bilayers)

Vytváření samoorganizovaných lipidových dvojvrstev na pevných elektrodách poprvé publikoval Tien a Salamon [47]. Přišli s jednoduchou metodou přípravy fosfolipidové membrány na pevném substrátu. Izolovaný kovový drátek (například teflonem obalený Pt drátek) je čerstvě odříznut po jeho ponoření do roztoku fosfolipidů. Hydrofilní polární skupiny lipidových molekul vytvoří monovrstvu na povrchu čerstvě odříznutého kovu, čímž vytvoří základ pro formování druhé vrstvy, která se na základě hydrofobních interakcí sama uspořádá [48]. Jako substrát pro takto vytvořené membrány byly použity například stříbro [49], zlato [50], rtuť [51], agarový gel [48], skelný uhlík [52] a jiné materiály [53].

Takto připravené membrány jsou stále více využívány v membránovém výzkumu neboť mají mnoho výhod: jednoduchá a reprodukovatelná příprava, dlouhá mechanická stabilita, použitelnost pro elektrochemické analýzy a povrchovou detekci [47]. Jsou mnohem stabilnější než klasické BLMs, mohou tak být dále využity pro základní výzkum biomembrán a jsou vhodné k přípravě biosensorů, jako jsou například enzymatické nebo DNA biosensory [54].

### 2.2.1.8. Liposomy

---

Liposomy jsou koloidní sférické měchýřky skládající se z jedné nebo několika fosfolipidových dvojvrstev uzavírajících vodnou fázi. Díky tomu mohou liposomy sloužit jako nosiče jak pro rozmanité hydrofilní látky rozpuštěné v roztoku enkapsulovaném uvnitř liposomu, tak pro hydrofobní sloučeniny inkorporované v lipidových dvojvrstvách [55-57].

Velikost liposomů se pohybuje v rozmezí od 25 nm do 150  $\mu\text{m}$ . Podle způsobu přípravy mohou vznikat různé typy liposomů - unilamelární, oligolamelární nebo multilamelární obsahující jednu, více nebo mnoho koncentrických fosfolipidových dvojvrstev (lamel). Nejčastěji se liposomy rozdělují podle velikosti a lamelarity na [58] :

- malé unilamelární liposomy (small unilamellar vesicles, SUVs)
- velké unilamelární liposomy (large unilamellar vesicles, LUVs)
- obří unilamelární liposomy (giant unilamellar vesicles, GUVs)
- velké oligolamelární liposomy (oligolamellar large vesicles, OLVs)
- multilamelární liposomy (multilamellar vesicles, MLVs)
- mnohováčkovité liposomy (multivesicular vesicles, MVVs)

Jako první popsal přípravu liposomů v 60. letech minulého století Bangham [59]. Od té doby bylo vyvinuto mnoho různých metod přípravy liposomů. Metodou přípravy a využitím dalších procesů během nebo bezprostředně po přípravě liposomů (např. extruze, sonifikace, apod.) lze ovlivnit jejich vlastnosti, jako například velikost, stabilitu, fluiditu, apod. [55]. V závislosti na tom, k jakému účelu jsou liposomy připravovány, se volí vhodná metoda přípravy. Obecně se rozdělují na:

- mechanické metody [56,59]
- metody založené na výměně rozpouštědla [60-62]
- metody založené na odstranění detergentu [63]
- freeze-thaw metoda [64]
- metoda spontánní revesikulace [65]

Liposomy se využívají v mnoha výzkumných oblastech jako jsou biochemie a molekulární biologie [66], kosmetická a potravinářská výroba [67,68] a především jako nástroj pro cílené dávkování léčiv v *in vivo* farmakologii [69].



### *2.2.2. Metody studia biologických membrán*

---

Fyzikální vlastnosti uměle připravených biologických membrán (jako jsou tloušťka vrstvy, povrchový náboj, molekulární dynamika, apod.) byly studovány různými metodami. Mezi nejvíce používané metody patří nukleární magnetická rezonance ( $^2\text{H}$  NMR), která je široce používaná pro charakterizaci fyzikálních vlastností a dynamiky modelových a biologických membrán [70,71] a také pro stanovení tloušťky připravené vrstvy [72,73]. Touto metodou byla například studována interakce antimikrobiálního peptidu magaininu s umělou membránou [74].  $^{31}\text{P}$  NMR byla použita pro sledování tvorby hexagonální fáze některých typů fosfolipidů [35]. Dalšími metodami pro měření tloušťky fosfolipidové membrány jsou měření rozptylu rentgenového záření (x-ray scattering) [75,76] a elipsometrie [77].

Pro charakterizaci membránové struktury s vysokým rozlišením se používá mikroskopie atomárních sil (AFM) [35,78-81]. Tato metoda se dále používá pro studium interakcí membrány s některými typy látek jako jsou léčiva [36,37], enzymy [82,83], peptidy [84] a iontové kapaliny [85].

Cyklická voltametrie (CV), elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS) a další elektroanalytické techniky byly použity pro studium elektrických vlastností a principů přenosu elektronu přes lipidovou membránu [54,86,87]. Těmito metodami byly také studovány interakce biologicky aktivních látek s umělými lipidovými membránami. Z peptidů byly tímto způsobem studovány například surfactin - lipopeptid s amfifilním charakterem [88] a nisin - antibakteriální peptid [89]. Z léčiv to byly například ibuprofen - dobře známé nesteroidní protizánětlivé léčivo [90] a amphotericin B - polyenové antibiotikum používané k léčbě hluboce zakořeněných houbových infekcí [91]. Z dalších molekul to byly například antioxidant resveratrol [92] a flavonoid kvercetin [93].

Difúzní charakteristiky lipidů a membránových proteinů byly studovány metodou obnovení opticky vybělené fluorescence (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP), kde intenzivní laserový pulz vybělí fluoreskující značku v malé oblasti na povrchu fluorescenčně značené buňky. Fluorescenčním mikroskopem se sleduje obnovení fluorescence v důsledku difúze fluoreskujících molekul z okolních částí buňky do vybělené oblasti. Z rychlosti obnovy fluorescence je možné určit rychlost difúze značených molekul [5,94-96]. Další metodou pro sledování difúzních charakteristik je fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) [97].

Křemenné krystalové mikrováhy (dissipative quartz crystal microbalance) byly použity pro studium adsorpce/fúze liposomů a formování fosfolipidové membrány [44] nebo pro sledování vzniku defektů ve fosfolipidové vrstvě v důsledku působení iontových kapalin [85].

Metodami používanými pro charakterizaci struktury, složení a vlastností lipidových filmů jsou fluorescenční mikroskopie [98], Brewsterův mikroskop (Brewster angle microscopy, BAM) [99], rentgenová reflexe a difrakce [100,101] a neutronová reflektivita [102]. Povrchová plasmonová resonance (surface plasmon resonance, SPR), povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (SERS) a reflektanční-absorpční infračervená spektroskopie (RAIRS) byly použity pro monitorování formování lipidových filmů a vázání s biomolekulami [103-105]. Statická hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (static secondary-ion mass spectrometry SSIMS) poskytuje specifické informace o složení, struktuře, orientaci a tloušťce lipidové vrstvy [106].

### *2.3. ELEKTROCHEMICKÉ SENSORY*

---

Sledování interakcí mezi různými typy molekul a lipidovou dvojrůstvou vedlo k vývoji elektrochemických biosenzorů. Pro vytvoření citlivého a selektivního senzoru se mohou různé typy elektrodových povrchů modifikovat různými typy látek. Například uhlíkové pastové elektrody (CPEs) jsou často modifikovány lipidy nebo mastnými kyselinami pro zvýšení jejich citlivosti a selektivity. Pastové elektrody modifikované asolectinem, fosfatidylcholinem či kardiolipinem byly použity pro stanovení léčiv a farmakologicky významných látek - například k prekoncentraci a stanovení léčiv jako jsou promethazin [107], adriamycin a epirubicin [108], celiptium [109] a marcellomycin [110]. Mastné kyseliny, konkrétně kyselina laurová, stearová a lignocerová (tetrakosanová), byly použity k modifikaci CPE a pro stanovení léčiv jako trimipramin [111], piroxicam a tenoxicam [112].

Některé fosfolipidové vrstvy na pevných nosičích byly modifikovány vhodnými látkami ke zlepšení selektivity a citlivosti na analyt. Xanthinový biosenzor byl vyroben modifikací fosfolipidové vrstvy streptavidin-biotin technologií k vazbě s hydrofilním enzymem xanthin oxidasou [113]. Podobná metoda byla použita pro přípravu glukosového minisenzoru [114]. Křenuv peroxidasa (horseradish peroxidase, HRP) byla zakotvena ve fosfatidylcholinové dvojrůstvě pomocí dithiotreitolu a byla použita jako biosenzor ke stanovení dopaminu [115]. Pro stanovení atenololu byl použit lipidový film stabilizovaný polymerizací [116].

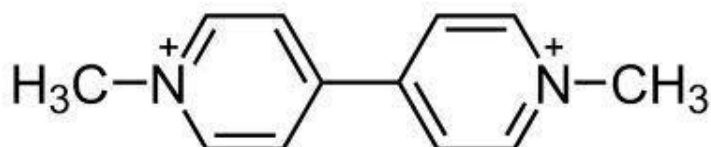
Stabilizovaný lipidový film je schopný akumulovat organické látky v závislosti na jejich náboji a hydrofilním-hydrofobním charakteru. Tato jejich vlastnost bývá využita pro přípravu selektivních biosensorů. Například stabilizovaný lipidový film s inkorporovanou ureasou byl použit pro rychlou, selektivní a citlivou detekci močoviny v mléce [117]. Siontorou et al. vyvinuli biosensor pro stanovení oxidu uhličitého založený na hemoglobinu inkorporovaném ve fosfolipidové vrstvě na kovovém substrátu [118] a minisensor na kyanidové ionty založený na methemoglobinu inkorporovaném v membráně [119]. Pro stanovení aflatoxinu M<sub>1</sub> v sýru byla použita na filtru vytvořená fosfolipidová membrána s inkorporovanou DNA [120]. Chování a vlastnosti DNA inkorporované v umělé membráně byly studovány metodami cyklické voltametrie, diferenčně pulzní voltametrie a mikroskopií atomárních sil [121,122].

Schopnost mnoha organických látek, jako jsou pesticidy, léčiva a jiné farmakologicky významné sloučeniny, interagovat s fosfolipidy a akumulovat se v lipidových membránách, byla využita pro jejich stanovení. Některá léčiva nebo pesticidy je možné inkorporovat (akumulovat) do fosfolipidové vrstvy vytvořené na povrchu elektrody a poté tyto látky elektrochemicky detegovat. Tato metoda byla použita například pro stanovení protinádorového léčiva marcellomycinu [123].

#### 2.4. PARAQUAT

---

Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-dipiridinium dichlorid; methylviologen; Gramoxon) je kvartérní dusíkatý herbicid. Jeho struktura je na obr. 6. Poprvé byl syntetizován v roce 1882. Jeho herbicidní vlastnosti byly objeveny v roce 1955 a registrovány v Anglii v roce 1962 [124]. V celosvětovém měřítku patří k nejpoužívanějším herbicidům [125]. Je to širokospektrální, neselektivní a rychle působící kontaktní biocid, který ničí rostlinné buňky tím, že interferuje s nitrobuněčným systémem přenosu elektronů [126,127].



Obr. 6: Struktura paraquatu.

Ačkoliv je paraquat zakázán v Evropské Unii [128], je stále používán v rozvojových zemích jako je Thajsko nebo Filipíny [129] a v dalších asi 130 zemích [130] v ovocných sadech a na plantážích produkujících různé plodiny jako jsou káva, kakao, kokosové ořechy, olejové palmy, banány, vinná réva, olivy, čaj, vojtěška, cibule, pórek, řepa cukrovka a chřest. Je používán jako desikant a defoliant pro ananas, cukrovou třtinu, sojové boby a slunečnici [131]. Paraquat se může z ošetřených plodin dostávat (mimo jiné) do potravin, pitné vody a do zemědělských kanálů [132].

Paraquat má dlouhou perzistenci v životním prostředí, neboť nedochází k jeho hydrolyze, nepodléhá fotodegradaci ve vodném prostředí a je rezistentní k mikrobiální degradaci za aerobních i anaerobních podmínek [133,134]. Paraquat je velice dobře rozpustný ve vodě (620 g l<sup>-1</sup> při 25 °C) [135]. Ve vodném prostředí je však silně adsorbován na nerozpustných částicích a sedimentech. Adsorpce paraquatu z vodné fáze na sedimenty je velice rychlá - v čerstvé vodě je to 50 % po 36 hodinách a 100 % po 4 týdnech [136]. Poločas rozpadu paraquatu ve vodném prostředí v podmínkách střední Evropy se odhaduje v rozmezí 2 až 820 let v závislosti na intenzitě slunečního záření a hloubce vody [124].

V půdě je paraquat velmi perzistentní. Snadno a silně se váže na jílovité materiály a organickou hmotu a může být neaktivní po dlouhou dobu. Jeho sorpční koeficient je v rozsahu od 8400 do 40000000 [137]. Poločas rozpadu paraquatu v půdě může být až 20 let. Přesto může docházet k jeho desorpci a může se opět stát biologicky aktivním. Jeho rezidua byla zjištěna v povrchové vodě, pitné vodě a podzemní vodě, přestože se předpokládá, že je v půdě neaktivní a nedochází k jeho vyluhování do podzemních vod [124].

#### 2.4.1. Toxicita paraquatu

Paraquat je extrémně toxický jak pro člověka (LD<sub>50</sub> 35 mg kg<sup>-1</sup>), tak i pro zvířata (myši: LD<sub>50</sub> 110-150 mg kg<sup>-1</sup>) [138]. Biochemický mechanismus toxicity paraquatu je spojen s cyklickou oxidací a redukcí paraquatu, která probíhá v plicních buňkách a je spojena s produkcí vysoké koncentrace superoxidového aniontu a dalších cytotoxických volných radikálů kyslíku. Tyto anionty a volné radikály způsobují peroxidaci membránových lipidů a tím dochází k poškození tkání a případně až k smrti [136,139]. Může způsobovat poškození plic, ledvin, jater nebo jícnu [140-142]. Epidemiologické studie [143,144] ukazují, že paraquat může přispívat k neurodegenerativním poruchám jako jsou například Parkinsonova choroba [144-149], plicní fibróza nebo rakovinný nádor žláz [150] a oxidativnímu stresu

ovlivňujícímu funkci jater [150,151]. Proto je nutné sledovat, zda zbytky této látky nepřekračují limit daný Evropskou komisí ( $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  pro většinu plodin) [152].

#### 2.4.2. Stanovení paraquatu

---

Od 70. let minulého století vědci vyvíjí citlivé a rychlé metody pro stanovení paraquatu v životním prostředí a biologických materiálech. Nejvíce používanou technikou pro stanovení paraquatu v různých typech vzorků je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Pro stanovení paraquatu ve vodě byla použita HPLC s UV-Vis detektorem s diodovým polem [153,154] nebo metoda LC/MS/MS [155]. V biologických materiálech byl paraquat pomocí HPLC stanovován v lidském séru [156,157], moči [158,159], v plasmě [160], v krvi [161] či v mozku myši, které byly vystaveny působení paraquatu [162,163].

Další významnou metodou pro stanovení paraquatu je plynová chromatografie (GC). Vzhledem k iontovému charakteru paraquatu je nutné nejdříve použít chemickou redukci (např. pomocí  $\text{NaBH}_4$  nebo  $\text{NaBH}_4\text{-NiCl}_2$ ) pro získání těkavějších sloučenin. Vzniká perhydrogenovaný paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipiperidin), který je vhodný pro GC analýzu [164]. Metodou GC/MS byl paraquat stanoven ve vodě [165], v plasmě a v moči [165,166], v mekoniu [164] a v posmrtných vzorcích krve, moči, jater, plic a ledvin [167].

Elektrochemické metody jsou široce používané pro analýzu paraquatu v životním prostředí a v biologických vzorcích, protože jsou rychlé, levné a mají nízké detekční limity. Nejvíce používanou elektrochemickou metodou pro stanovení paraquatu je square wave voltametrie (SWV) a diferenčně pulzní voltametrie (DPV). Tyto metody byly použity pro stanovení tohoto pesticidu ve vodě, jablkách a bramborách s různými typy elektrod. Přehled metod, vzorků a použitých elektrod je v tabulce 1.

Některé sensory pro stanovení paraquatu byly vyvinuty na základě tekutých membrán iontově selektivních elektrod [168,169] a oktamethylcyklotetrasiloxanem modifikované elektrody [170,171].

Tabulka 1: Přehled elektrochemických metod a použitých elektrod pro stanovení paraquatu.

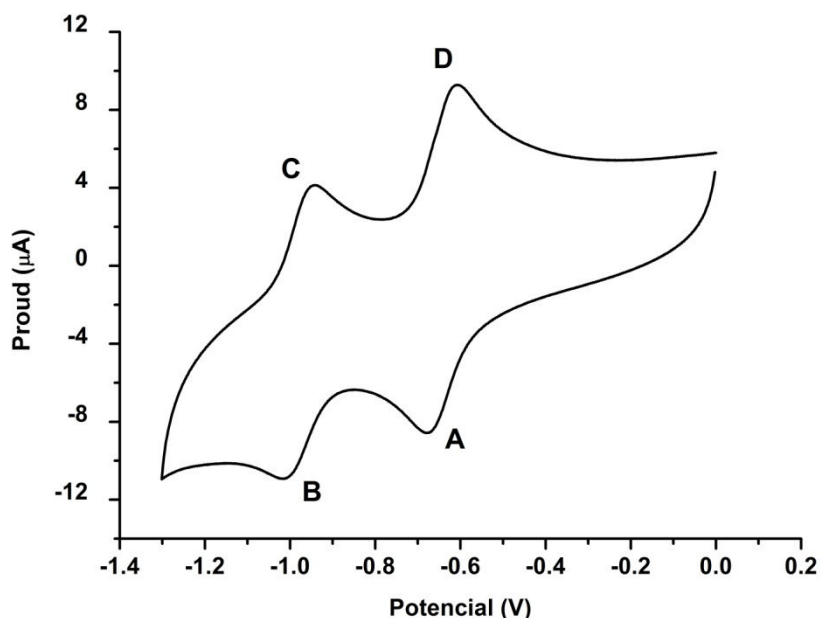
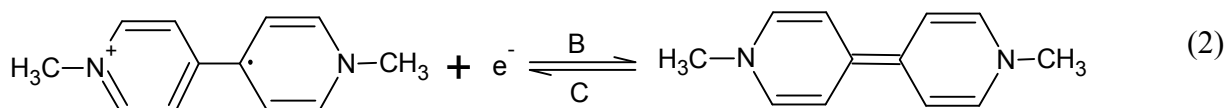
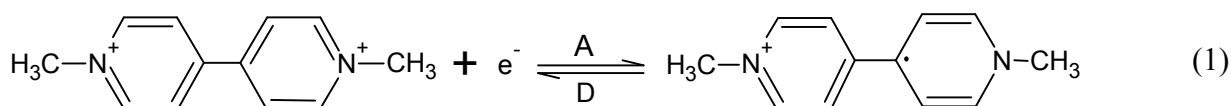
Metoda	Vzorek	Typ elektrody	Citace
SWV	voda	CPE modifikovaná přírodním fosfátem (NP-CPE)	130
SWV	voda	borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE)	172
SWV	voda	CPE modifikovaná hydroxyapatitem (HAP-CPE)	173
SWV	voda	visící rtuťová kapková elektroda (HMDE)	174
SWV	voda	elektroda z pyrolytického grafitu s metalloftalokaninem	175
SWV	voda	GCE s mnohostěnými uhlíkovými nanotrubičkami (MWCNTs)	176
SWV	jablka, brambory	CPE impregnovaná fluoroapatitem (FAP-CPE)	177
SWV	brambory	statická rtuťová kapková elektroda (SMDE)	178
SWV, DPV	voda	zlatá mikroelektroda	179
SWV, DPV, CV	nespecifikováno	DNA modifikované zlaté nanočástice na zlaté elektrodě	180
SWV, CV	voda	CPE s kaolínem (KCPE)	181
SWASV	olivový olej, olivy	CPE s chitinem (Chit-CPE)	138
DPV	voda	bismutová filmová elektroda (BiFE)	182
DPV	voda	GCE pokrytá nafionem (NFGCE)	183

Kapilární elektroforéza byla použita pro stanovení reziduí paraquatu v pitné vodě [184,185], bramborách [186] a marihuaně [187].

V literatuře najdeme mnoho dalších metod pro stanovení paraquatu včetně Ramanovy spektroskopie [188,189], spektrofotometrie [190,191], spektrofluorimetrie [192], fluorimetrie [193] či dielektroforetické frakcionace tokem v poli (dFFF) [194]. Velmi rychlé a spolehlivé techniky pro detekci paraquatu v biologických vzorcích jsou imunochemické analytické metody jako ELISA [195,196] nebo radioimunoanalýza [197].

### 2.4.3. Elektrochemické chování paraquatu

Elektrochemické chování paraquatu je známé a bylo již popsáno v literatuře [176,198,199]. Cyklický voltamogram paraquatu je na obr. 5, kde jsou vidět dva katodické a dva anodické píky (označené A až D). Katodický pík A blízko -0,7 V (vs. Ag/AgCl) odpovídá rychlé reverzibilní redukci paraquatu dikationtu na modrý kation radikál (rovnice 1). Pík blízko -1,0 V je považován za redukci methyl viologen kation radikálu na jeho redukovanou molekulární formu (1,1'-dimethyl-1,1'-dihydro-4,4'-bipyridin), jak popisuje rovnice 2 [176]. Kation radikál může v koncentrovaných vodných roztocích reversibilně tvořit dimer [198,199].



Obr. 5: Cyklický voltamogram paraquatu.

## 2.5. VYBRANÉ ANALYTICKÉ METODY PRO CHARAKTERIZACI MEMBRÁN

---

### 2.5.1. Elektroanalytické metody

---

Jak již bylo popsáno výše, elektroanalytické metody jsou hojně využívány pro studium jak umělých biologických membrán, tak pro stanovení pesticidu paraquatu (viz kap. 2.2. a 2.4.2.). V této práci byly použity především cyklická voltametrie (CV), diferenčně pulzní voltametrie (DPV), square wave voltametrie (SWV) a elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS).

Cyklická voltametrie (CV) je často používaná metoda pro studium fluidity fosfolipidové vrstvy a propustnosti membrány pro různé látky, jako je například ferrokyanid, který se používá jako modelová látka pro ověření úplného pokrytí povrchu elektrody fosfolipidovou vrstvou [90,200]. Cyklickou voltametrií byly studovány interakce i dalších látek s fosfolipidovou membránou - například peptidů, léčiv či antioxidantů [88-92], dále pak ionoforu gramicidinu A [201] či sterolů [202]. Touto metodou bylo také zjištěno, že některé látky mohou narušovat fosfolipidovou vrstvu, například peptid nisin [89] nebo melittin [203].

Diferenčně pulzní voltametrie (DPV) je jednou z nejvíce používaných elektroanalytických metod především pro stanovení stopového množství organických i anorganických látek. Při této metodě se na potenciál, který se lineárně mění s časem, vkládají napěťové pulzy a registruje se rozdíl proudů změřených těsně před vložením pulzu a na jeho konci. Poloha píku na potenciálové ose je dána kvalitou analytu a jeho výška závisí na koncentraci [204]. DPV byla použita pro sledování inkorporace DNA do fosfolipidové vrstvy na povrchu elektrody ze skelného uhlíku (GCE) [121]. Tato metoda byla využita pro sledování iontového přenosu různých typů léčiv nebo dopaminu přes nelipidové membrány [205,206] nebo pro stanovení pesticidu paraquatu s použitím různých typů elektrod [182,183,207].

Square wave voltametrie (SWV) je jednou z nejcitlivějších elektrochemických metod používaných k přímému stanovení koncentrace řady sloučenin. SW voltamogram vyjadřuje závislost procházejícího proudu na vloženém potenciálu. Kvantita stanovovaných látek odpovídá ploše píku, kvalitativní informace odpovídá specifickému potenciálu, při němž se pík objevuje. Jak již bylo uvedeno výše, SWV se hojně používá pro stanovení reziduí paraquatu v různých typech vzorků s použitím různých typů elektrod (tab. 1).



Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS) je metoda, kdy se na pracovní elektrodu vkládá konstantní potenciál se superponovaným střídavým napětím o určité amplitudě (nejčastěji v rozsahu 5-10 mV) a měří se střídavá složka proudové odezvy. Frekvence střídavého napětí se při měření mění s časem. Obvykle se měří od vyšších frekvencí k nižším. Používané frekvence se pohybují od 1 MHz do 0,1 mHz a pro měření se obvykle používá potenciostat v tříelektrodevém zapojení [208]. EIS je neinvazivní metoda a používá se pro charakterizaci elektrických vlastností mnoha systémů. Dnes se využívá, mimo jiné, pro detailní studie struktury a funkce umělých biologických membrán [209]. Tato metoda byla použita pro ověření pokrytí tuhé elektrody fosfolipidovou vrstvou [210], pro stanovení tloušťky lipidové vrstvy [200] nebo pro sledování interakcí různých látek s membránou [88] či studium narušování vrstvy různými látkami [203].

### 2.5.2. Mikroskopie atomárních sil (AFM)

AFM používá ostrý hrot na konci ohebného nosníku především ke zkoumání topografických a mechanických vlastností vzorku. Síly působící mezi povrchem a sondou způsobují vychýlení nosníku, které je zaznamenáno laserovým paprskem odrážejícím se od zadní strany nosníku (obr. 6). Informace o vychýlení nosníku je pak použita pro vytvoření obrázku topografie vzorku [211].

AFM je metoda s vysokým rozlišením, široce používaná pro výzkum struktury a mechanických vlastností biologických materiálů. Je to efektivní nástroj k výzkumu struktury a funkce organických tenkých filmů, včetně biomembrán [212,213] a pro stanovení jejich tloušťky [214]. AFM studie bývají prováděny pro biologické procesy zahrnující fyzikální vlastnosti uměle připravených lipidových membrán [79,215,216], sledování hydrolýzy a kinetiky degradace fosfolipidové vrstvy působením fosfolipasy A<sub>2</sub> [217,218] či interaktivní síly mezi biomolekulami. Byla vyvinuta metoda pro přímou inkorporaci membránových proteinů do detergentem destabilizované umělé lipidové membrány [219]. Pomocí AFM byl sledován vliv různých typů peptidů na vlastnosti fosfolipidové membrány a jejich vzájemné interakce [220,221]. Bylo zjištěno, že některé peptidy mohou narušovat vrstvu nebo způsobovat její řidnutí [222,223].

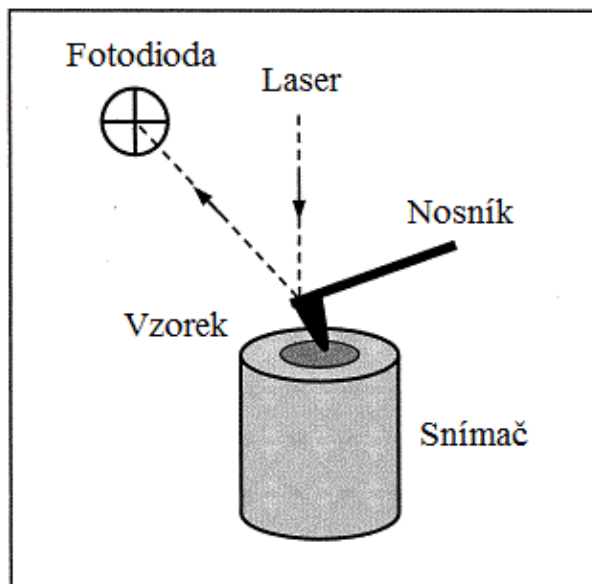
Studium interakcí fosfolipidové membrány s léčivými na molekulární úrovni je dalším širokým uplatněním modelových membrán. Ve farmakologii je dobře známo, že struktura a

vlastnosti biologické membrány mohou být silně ovlivněny interakcí s léčiv. Tyto interakce ovlivňují aktivitu či toxicitu léčiva. Byly studovány interakce antibiotik s membránou, jako například fluorochinolonová antibiotika [224] nebo azitromycin [36]. Anestetika představují další důležitou skupinu léčiv, protože je důležité objasnit jejich působení na plasmatickou membránu buněk neuronů. Molekulová teorie působení anestetik zahrnuje hypotézu že anestetika narušují strukturu lipidové membrány a tím i biofyzikální vlastnosti membrány [37]. Pomocí AFM byla studována například anestetika dibucain [225] nebo halothan [37].

AFM bylo dále použito i pro zobrazení různých membránových proteinů a jejich interakcí s membránami [38,79,226,227]. Proteiny inkorporované do buněčné membrány hrají zásadní roli v membránových procesech a více souvisí s fyziologií člověka. Proto je tento model membrán biologicky významný.

Z těchto výzkumů mohou být získány informace pro vyvinutí biosensorů a nových metod pro přenášení léčiv a genů. AFM může být použito pro výzkum stabilizovaných fosfolipidových vrstev na pevných substrátech. V takovém případě jsou formovány velké bezdefektové plochy, které slouží jako modely buněčných membrán [78].

Přehled dalších aplikací AFM ve spojení s fosfolipidovými membránami je uveden v přehledových člancích [105,213,228].



Obr. 6: Princip AFM [105].

### *2.5.3. Rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS)*

---

XPS je spektroskopická metoda měřící energetické spektrum elektronů uvolněných z atomu po excitaci elektromagnetickým zářením. Z měření energetického rozdělení elektronů emitovaných povrchem měřené pevné látky v důsledku fotoelektrického jevu lze určit chemické složení a stav povrchu pevných látek. Jako excitační zdroj se používá rentgenové záření (50 - 25000 eV), které má relativně vysokou energii a vede proto k emisi vnitřních elektronů. Energie elektronů se určuje pomocí zakřivení dráhy v magnetickém či elektrickém poli. Pomocí této metody lze studovat ionizační energie atomů v povrchové vrstvě vzorku. XPS je v současnosti jednou z nejrozšířenějších metod studia povrchů látek a velmi tenkých vrstev. Mezi její přednosti patří schopnost získat informace nejen o tom, z jakých prvků je povrch složen, ale i o vazbách atomů k jejich okolí. Metoda podává kvantitativní informace a složení, umožňuje určit tloušťku velmi tenkých vrstev a pomocí úhlově závislých měření také rozložení sledovaných atomů v závislosti na hloubce pod povrchem vzorku [229].

Elektrochemicky předupravený povrch elektrody ze skelného uhlíku byl studován pomocí XPS, pro charakterizaci povrchových změn [230] a tato metoda byla použita i pro další úpravy povrchu této elektrody [231]. XPS může poskytnout informace o chemickém složení lipidových filmů a také o jejich molekulární organizaci [106,232,233], a proto byla použita pro charakterizaci připravených umělých lipidových filmů [234,235].

### *2.5.4. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)*

---

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z nejvíce používaných separačních metod. V souvislosti s fosfolipidy se HPLC používá pro určení složení fosfolipidových směsí a membrán, případně pro určování změn v jejich složení vlivem různých aspektů [236,237]. Tato metoda byla také použita pro sledování orientace a vazby peptidů melittinu a gramicidinu A v membránách, liposomech a micelách [238,239]. Fosfolipidy mohou být také využity jako stacionární fáze, kde slouží k objasnění interakcí mezi různými léčivy a biologickými membránami [240]. HPLC se velice často používá také pro analýzu pesticidu paraquat, jak již bylo uvedeno dříve (viz kap. 2.4.2.).

### 3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

---

Cílem předložené disertační práce bylo prostudovat vlastnosti fosfolipidů a jejich agregátů vybranými analytickými metodami. Konkrétněji se tato práce zabývá studiem agregačních vlastností směsi fosfolipidů ze sojových bobů (komerčně dostupné pod názvem Asolectin) především na pevných površích. Agregační vlastnosti této fosfolipidové směsi byly využity pro přípravu umělé lipidové membrány na povrchu elektrody ze skelného uhlíku. Cíle této práce můžeme shrnout následovně:

- využít asolectin jako modifikátor uhlíkové pastové elektrody pro stanovení lipofilních látek ve vodném prostředí
- prostudovat agregační vlastnosti asolectinu na pevném povrchu
- připravit umělou lipidovou membránu z této fosfolipidové směsi na povrchu elektrody ze skelného uhlíku
- prostudovat vlastnosti připravené membrány jako jsou tloušťka vrstvy, její kompaktnost, stabilita, apod.
- optimalizovat čištění a obnovení povrchu elektrody po její modifikaci pro její další použití
- prostudovat interakce připravené vrstvy s modelovým systémem různých typů látek
- využít fosfolipidy modifikovanou uhlíkovou elektrodu jako sensor pro stanovení lipofilních látek ve vodném prostředí

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

---

### 4.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

---

Pro experimentální měření byl použit asolectin ze sojových bobů (směs fosfolipidů) s obsahem fosfatidylcholinu minimálně 25 % (Fluka, Buchs, Švýcarsko). Paraquat chloristan (methylviologen chloristan) byl vysrážen z komerčně dostupného preparátu (Gramoxon) roztokem chloristanu sodného, rekrystalizován z deionizované vody a sušen ve vakuovém eksikátoru s oxidem fosforečným [241]. Dále byly použity kyselina fosforečná (Fluka, Buchs, Švýcarsko), síran měďnatý, ferrokyanid draselný, alumina, grafitový prášek, kyselina octová a kyselina trifluoroctová (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), hexan, ferrikyanid draselný, kyselina chlorovodíková, kyselina boritá, uhličitan sodný, chlorid sodný a síran sodný (krystalický,  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ) (Lachema, Brno, Česká republika), chlorid draselný (99,999 % Suprapur) (Merck, Praha, Česká republika), kyselina sírová, methanol (Penta, Praha, Česká republika), peroxid vodíku, hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika), chloroform p.a. (Onex Chemie, Rožnov pod Radhoštěm, Česká republika).

Všechny použité chemikálie byly analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak. Pro přípravu všech roztoků byla použita deionizovaná voda (Milipore, 18,2 M $\Omega$ ).

SPE kolonky Strata Si-1 silica (55  $\mu\text{m}$ , 70 Å, 500 mg/3 ml, Phenomenex, USA) byly použity pro prekoncentraci paraquatu v modelovém vzorku vody.

### 4.2. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

---

Roztok asolectinu o koncentraci 3 mg ml<sup>-1</sup> [242] pro přípravu fosfolipidové vrstvy byl připraven v hexanu.

Fosfátový pufr o pH 7,0 byl připraven z roztoku kyseliny fosforečné o koncentraci 50 mmol l<sup>-1</sup> a 50 % hydroxidu sodného. Pro měření pH byl použit pH metr inoLab 720 s kombinovanou skleněnou elektrodou SenTix 21 (WTW, Weilheim, Německo).

Britton-Robinsonův pufr obsahoval kyselinu boritou, kyselinu octovou a kyselinu fosforečnou, každá o koncentraci 40 mmol l<sup>-1</sup>. Pomocí 50% hydroxidu sodného bylo upraveno pH pufru na hodnotu 6,0.

Všechny ostatní roztoky byly připraveny vždy rozpuštěním odpovídajícího množství látky v deionizované vodě.

### 4.3. POUŽITÉ PRACOVNÍ POSTUPY

---

#### 4.3.1. Stanovení paraquatu adsorpční rozpouštěcí diferenčně pulzní voltametrií

---

Uhlíková pastová elektroda (CPE) byla připravena důkladným smícháním grafitového prášku s parafinovým olejem v poměru 70:30 (m/m) v achátové třecí misce. Homogenní uhlíková pasta byla naplněna do těla elektrody z plexiskla. Připravená CPE byla ponechána několik dní na vzduchu při laboratorních podmínkách. Fosfolipidy modifikovaná uhlíková pastová elektroda (LMCPE) byla připravena ze zralé uhlíkové pasty, která byla smíchána v třecí misce s asolectinem rozpuštěným v minimálním množství chloroformu. Poměr uhlíkové pasty a pevného asolectinu byl 95:5 (m/m). Tento poměr byl převzat z literatury [107,109]. Rozpouštědlo bylo přes noc odpařeno při laboratorní teplotě. Dobře zhomogenizovaná pasta byla naplněna do elektrodového těla, stejně jako v předchozím případě.

SPE kolonky Strata Si-1 silica (55  $\mu\text{m}$ , 70  $\text{\AA}$ , 500 mg/3 ml, Phenomenex, USA) a Visiprep SPE vacuum Manifold (Sigma-Aldrich, Německo) byly použity pro prekoncentraci paraquatu v modelovém vzorku vody. SPE kolonky byly nejdříve kondicionovány promytím 6 ml deionizované vody (pH 9), 6 ml kyseliny chlorovodíkové (6 mol  $\text{l}^{-1}$ ) v 8% (v/v) methanolu a 6 ml deionizované vody (pH 9). Modelový vzorek byl připraven přidáváním standardního roztoku paraquatu do deionizované vody (200 ml) v koncentračním rozsahu 0,5 až 3  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Vzorek byl zalkalizován na pH 9 a aplikován na SPE kolonku ve vakuovém systému s rychlostí průtoku 2 ml  $\text{min}^{-1}$ . Následně byla SPE kolonka promyta 2 ml deionizované vody (pH 9) a systém byl vysušen pod vakuem (10 min). Eluce byla provedena 2 ml kyseliny chlorovodíkové (6 mol  $\text{l}^{-1}$ ) v 8% methanolu [154,184,185,191,243]. Před měřením byl získaný eluát zalkalizován přídatkem uhličitanu sodného o koncentraci 2 mol  $\text{l}^{-1}$  na pH 6.

Měření adsorpční rozpouštěcí diferenčně pulzní voltametrie (AdSDPV) bylo provedeno na Eco-Tribo Polarografu (ECO-TREND PLUS, Praha, Česká republika) v tříelektrodovém zapojení s CPE a LMCPE jako pracovními elektrodami, Ag|AgCl|1M-KCl jako referentní elektrodou a platinovým drátkem jako pomocnou elektrodou. Před každým měřením byl

elektrodový povrch obnoven vytačením cca 1 mm pasty a vyleštěním na hladkém papíře. Všechna měření byla prováděna v potenciálovém rozsahu od -0,1 do -1,3 V. Doba akumulace byla 300 s pro měření při koncentracích vyšších než  $5 \mu\text{mol l}^{-1}$  pro obě elektrody. Pro koncentrace nižší než  $5 \mu\text{mol l}^{-1}$  byla použita doba akumulace 300 s pro CPE a 600 s pro LMCPE. Optimální potenciál pro akumulaci paraquatu byl -500 mV. Výška pulzu byla -50 mV a šířka pulzu 100 ms. Všechna měření byla prováděna v prostředí Britton-Robinsonova pufru o pH 6,0. Každý vzorek byl měřen třikrát.

#### *4.3.2. Příprava modifikované elektrody ze skelného uhlíku*

---

Čistá elektroda ze skelného uhlíku (GCE) byla vyleštěna aluminou ( $0,05 \mu\text{m}$ ) a vložena do ultrazvukové lázně na 1 min v deionizované vodě. Povrch elektrody byl následně upraven elektrochemicky v prostředí chloridu sodného o koncentraci  $9 \text{ g l}^{-1}$  vložení potenciálu 1,5 V (vs. Ag|AgCl|3M-KCl) po dobu 3 min [90]. Poté byla elektroda vysušena proudem dusíku. Na povrch GCE bylo nanášeno 5  $\mu\text{l}$  roztoku asolectinu v hexanu ( $3 \text{ mg ml}^{-1}$ ) a elektroda byla ihned ponořena do roztoku NaCl ( $9 \text{ g l}^{-1}$ ) na 30 minut. Následně byla lipidem modifikovaná uhlíková elektroda (LMGCE) opatrně opláchnuta deionizovanou vodou a použita k měření.

#### *4.3.3. Testování pokrytí elektrody*

---

##### *4.3.3.1. Cyklická voltametrie (CV)*

---

Elektrochemické měření bylo prováděno na přístroji Autolab PGSTAT128N (Metrohm Autolab, Utrecht, Nizozemí) v tříelektrodovém zapojení. Jako referentní elektroda byla použita Ag|AgCl|3M-KCl a platinový drátek jako pomocná elektroda. Jako pracovní elektroda byla použita čistá GCE (průměr disku 3 mm, Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA) nebo GCE modifikovaná fosfolipidovou vrstvou (LMGCE).

Úprava povrchu elektrody a proces její modifikace je popsán v kapitole 4.3.2. Připravená LMGCE byla opláchnuta deionizovanou vodou a ponořena do roztoku ferrokyanidu draselného o koncentraci  $5 \text{ mmol l}^{-1}$ , který byl použit jako elektroaktivní značka, v prostředí  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  KCl. Takto připravený roztok byl před měřením zbaven rozpuštěného kyslíku probubláním dusíkem po dobu 10 minut. Cyklické voltamogramy byly

zaznamenány v potenciálovém rozsahu od -0,4 V do 0,7 V, s rychlostí polarizace elektrody  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Vždy byly zaznamenány dva cykly. Získané cyklické voltamogramy na LMGCE byly porovnávány s voltamogramy získanými na čisté GCE. Naměřená data byla vyhodnocena a zpracována v softwaru Nova 1.10 (Metrohm Autolab, Utrecht, Nizozemí).

#### 4.3.3.2. Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS)

Měření EIS byla prováděna na stejném přístroji Autolab jako voltametrické měření s použitím stejného tříelektrodového zapojení (kap. 4.3.3.1.). Modifikovaná elektroda, připravená podle postupu popsaného v kapitole 4.3.2., byla opláchnuta deionizovanou vodou a ponořena do roztoku ekvimolární směsi  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]:\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (1:1) o koncentraci jednotlivých složek  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  v přítomnosti KCl o koncentraci  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ . Tento roztok byl zbaven rozpuštěného kyslíku probubláním dusíkem po dobu 10 minut. Před měřením EIS byl zaznamenán cyklický voltamogram připraveného roztoku na čisté GCE, z jehož záznamu se získala hodnota potenciálu pro měření EIS - v tomto případě 0,27 V, což je hodnota blízká formálnímu potenciálu redoxního páru  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  v daném prostředí. Dále byly nastaveny parametry metody EIS: frekvence v rozsahu od 50 kHz do 0,1 Hz s amplitudou 10 mV, počet frekvencí 50. Následně byla zaznamenána impedanční spektra pro LMGCE. Pro srovnání byla stejným postupem měřena impedanční spektra i s čistou GCE. Naměřená data byla vyhodnocena a zpracována v softwaru Nova 1.10.

#### 4.3.4. Tloušťka fosfolipidové vrstvy - měření AFM

Všechny nádoby, které byly použity pro přípravu roztoků, byly vyčištěny čerstvě připravenou směsí koncentrované kyseliny sírové a koncentrovaného peroxidu vodíku (3:1 v/v), opláchnuty deionizovanou vodou a vysušeny na vzduchu.

Čistá GCE byla přečištěna aluminou ( $0,05 \text{ }\mu\text{m}$ ) a vložena v deionizované vodě na 2 minuty do ultrazvukové lázně. Povrch elektrody byl následně upraven elektrochemicky v prostředí chloridu draselného o koncentraci  $9 \text{ g l}^{-1}$  vložení potenciálu 1,5 V (vs. Ag|AgCl|3M-KCl) po dobu 3 min a poté byl opláchnut deionizovanou vodou a vysušen pod proudem argonu.



Fosfolipidová vrstva na povrchu GCE pro měření AFM byla připravena stejným postupem, jak bylo popsáno v kap. 4.3.2. s tím rozdílem, že místo roztoku NaCl byl použit roztok KCl o stejné koncentraci. Po přípravě fosfolipidové vrstvy byla elektroda opláchnuta deionizovanou vodou a vysušena proudem argonu.

Všechna měření AFM byla provedena *ex-situ* na přístroji Agilent 5500 SPM (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Pro měření byl použit hrot s magnetickým pokrytím (Type II MAClevers) s nominální hodnotou rezonanční frekvence 75 kHz a nominální silovou konstantou  $2,8 \text{ N m}^{-1}$ . Všechny obrázky byly měřeny v tapping modu s rychlostí záznamu 0,8 řádků za sekundu. Kromě informace o topografii vzorku byly zároveň zaznamenávány fázový posun a amplituda oscilace hrotu. Tím byly získány kompletní kvalitativní informace o struktuře povrchu. Nanoshaving (odstraňování molekul z povrchu vzorku) byl prováděn konstantní silou v kontaktním modu stejným hrotem. Síla byla vypočítána z Hookova zákona a byla v rozmezí 640-700 nN. Všechny obrázky byly zaznamenány s rozlišením 512 pixelů a byly zpracovány v softwaru Gwyddion 2.7 (Český metrologický institut, Česká republika). Výsledky z měření topografie (jako výška vrstvy apod.) byly zpracovány softwarem PicoView 1.10.7 (Agilent Technologies) a analyzovány v Origin 8 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Všechny uvedené obrázky jsou vyhlazené (plane-corrected). Uvedené hodnoty drsnosti povrchu a tloušťky vrstvy získané z histogramu jsou zaokrouhlené na jedno desetinné místo, což je v souladu s limitem přesnosti AFM.

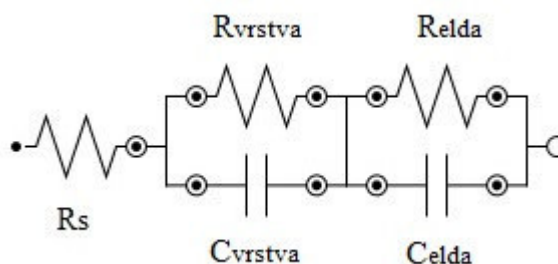
#### 4.3.5. Stabilita fosfolipidové vrstvy

Stabilita připravené fosfolipidové vrstvy byla testována pomocí cyklické voltametrie (CV) a elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS). Elektrochemická měření byla prováděna na stejném přístroji Autolab se stejným tříelektrodovým zapojením, jak je popsáno v kapitole 4.3.3.1, postup pro modifikaci elektrody je uveden v kapitole 4.3.2.

Pro měření CV byla připravená LMGCE opláchnuta ponořením do deionizované vody a vložena do roztoku ferrokyanidu draselného o konc.  $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$  v prostředí NaCl ( $9 \text{ g l}^{-1}$ ). Po odstranění rozpuštěného kyslíku probubláním dusíkem (10 minut) byl změřen CV v potenciálovém rozsahu od -0,4 do 0,7 V s rychlostí polarizace elektrody  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Následně byla elektroda ponechána v roztoku a každých 5 minut byl zaznamenán CV znovu až do doby 140 minut. Naměřená data byla vyhodnocena a zpracována v softwaru Nova 1.10.

Měření EIS bylo provedeno na stejném přístroji a ve stejném tříelektrodovém zapojení. Nejdříve byla čistá GCE vložena do roztoku ekvimolární směsi  $K_4[Fe(CN)_6]:K_3[Fe(CN)_6]$  (1:1) o koncentraci jednotlivých složek  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  v přítomnosti KCl o koncentraci  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  zbaveného rozpuštěného kyslíku probubláním dusíkem (10 minut) a byl zaznamenán CV této směsi pro stanovení vhodného potenciálu pro měření EIS. Ve stejném roztoku bylo s LMGCE zaznamenáno impedanční spektrum za těchto podmínek: potenciál 0,180 V, rozsah frekvencí od 50 kHz do 0,1 Hz, amplituda 10 mV, počet frekvencí 50, technika single sine. Spektra byla ve stejném roztoku měřena opakovaně každých 5 minut až do 150 minut. Získané hodnoty byly vyhodnoceny v softwaru Nova tak, že data byla proložena křivkou odpovídající zvolenému ekvivalentnímu obvodu (obr. 7), kde  $R_s$  je odpor roztoku,  $R_{vrstva}$  je odpor fosfolipidové vrstvy,  $C_{vrstva}$  je kapacita fosfolipidové vrstvy,  $R_{elda}$  je odpor elektrody a  $C_{elda}$  je kapacita elektrody. Program iterační metodou vypočítal hodnoty jednotlivých prvků v obvodu.



Obr. 7: Ekvivalentní obvod pro vyhodnocení EIS na LMGCE.

#### 4.3.6. Charakterizace povrchu elektrody - měření XPS

Pro přípravu čistého elektrodového povrchu a pro jeho úpravu před vytvářením fosfolipidové vrstvy byly použity následující tři postupy:

(i) GCE byla leštěna aluminou ( $0,05 \mu\text{m}$ ) a následně ponořena do deionizované vody a ultrazvukové lázně na 2 minuty, (ii) GCE byla vyleštěna aluminou ( $0,05 \mu\text{m}$ ), ponořena do deionizované vody a ultrazvukové lázně na 2 minuty a následně byl povrch anodicky upraven třiminutovou polarizací při  $1,5 \text{ V}$  (vs.  $\text{Ag|AgCl|3M-KCl}$ ) v roztoku  $\text{NaCl}$  ( $9 \text{ g l}^{-1}$ ) a (iii) GCE

byla vyleštěna aluminou (0,05  $\mu\text{m}$ ) a ponořena do deionizované vody a ultrazvukové lázně na 2 minuty a následně byl její povrch katodicky upraven v roztoku HCl (0,1 mol  $\text{l}^{-1}$ ) polarizací -1,5 V (vs. Ag|AgCl|3M-KCl) po dobu 3 minut.

Fosfolipidy modifikovaná GCE byla připravena postupem, který je popsán v kapitole 4.3.2.

Odstranění fosfolipidové vrstvy a obnovení elektrodového povrchu bylo provedeno procedurami popsány v bodech (i), (iii) a procedurou (iv), která zahrnuje leštění elektrody aluminou, dvouminutové čištění v deionizované vodě v ultrazvukové lázni, sušení v proudu argonu a následně ultrazvukové čištění v hexanu, methanolu a deionizované vodě, v každém rozpouštědle 15 minut.

Měření rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS) bylo provedeno následovně: vzorek byl upevněn v držáku na vzorky (o velikosti 1 palec v průměru) pomocí oboustranné lepicí pásky Scotch (3M, St. Paul, USA). Měření bylo prováděno na přístroji PHI VersaProbe II XPS system (Physical Electronics, Chanhassen, USA) s hemisférickým analyzátozem a monochromatickým zářením Al-K $\alpha$  (15 kV, 50 W), energie fotonu 1486,7 eV. Všechna spektra byla měřena ve vakuu ( $1,3 \cdot 10^{-8}$  Pa) a při teplotě 20 °C. Přehledová spektra byla měřena s procházející energií 187,850 eV s elektronovým skokem 0,8 eV v rozsahu vazebných energií (BE) 0-1300 eV, zatímco pro spektra vysokého rozlišení byla použita procházející energie 23,500 eV a elektronový skok 0,2 eV. Pro všechna měření byla použita kompenzace povrchového náboje. Získaná spektra byla vyhodnocována v softwaru MultiPak (verze 9.4.0.7., ULVAC-PHI, Kanagawa, Japonsko). Všechny hodnoty vazebných energií byly vztaženy k píku uhlíku C 1s při 284,80 eV.

#### *4.3.7. Interakce paraquatu s fosfolipidovou vrstvou*

---

##### *4.3.7.1. Časová závislost*

---

Pro sledování interakce paraquatu s fosfolipidovou vrstvou v závislosti na čase byla LMGCE, respektive GCE ponořena do roztoku paraquatu o koncentraci 1 mmol  $\text{l}^{-1}$  v 50 mmol  $\text{l}^{-1}$  fosfátovém pufru o pH 7. Roztok byl zbaven rozpuštěného kyslíku 10 minutovým probubláním dusíkem. Byl zaznamenán CV na stejném přístroji Autolab a se stejným tříelektrodovým zapojením, jak je popsáno výše (kap. 4.3.3.1.) v potenciálovém rozsahu

od 0 do -1,3 V s rychlostí polarizace elektrody  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Poté každých 5 minut byl zaznamenán další CV v časovém rozsahu 0 - 60 minut. Během celého měření byl nad měřený roztok přiváděn dusík. Získaná data byla vyhodnocena a zpracována v softwaru Nova 1.10.

#### 4.3.7.2. Závislost na rychlosti scanu

Cyklická voltametrie byla také použita pro měření závislosti na rychlosti scanu v roztoku paraquatu na čisté a modifikované GCE. Elektroda byla ponořena do  $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$  roztoku paraquatu v  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  fosfátovém pufru o pH 7. Roztok byl zbaven rozpuštěného kyslíku probubláním dusíkem 10 minut a poté byly zaznamenávány cyklické voltamogramy v potenciálovém rozsahu 0 až -1,3 V s rychlostí scanu od  $20 \text{ mV s}^{-1}$  do  $1000 \text{ mV s}^{-1}$  na čisté i modifikované GCE na stejném přístroji Autolab (kap. 4.3.3.1.). Naměřená data byla vyhodnocena a zpracována v softwaru Nova 1.10.

#### 4.3.8. Interakce fosfolipidové vrstvy s modelovým systémem

Pro měření interakce připravené fosfolipidové vrstvy se síranem měďnatým (model hydrofilní látky) a pesticidem paraquatem (model lipofilní látky) byla použita cyklická voltametrie. Měření CV bylo prováděno na stejném přístroji Autolab se stejným tříelektrodovým zapojením, jak je popsáno výše v kapitole 4.3.3.1. Nejdříve byly zaznamenány voltamogramy každé látky zvlášť, poté směsi obou látek a to jak na čisté tak na modifikované GCE.

Roztoky  $\text{CuSO}_4$  a paraquatu byly připraveny v rozsahu koncentrací od  $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$  do  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  v prostředí  $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$  a pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 5,0 pomocí  $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ . Směsi obou látek byly připraveny rovněž v  $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$  (pH 5). Při měření směsi obou látek byla koncentrace jedné ze složek konstantní ( $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) a koncentrace druhé se měnila v rozsahu 0,1; 0,2; 0,5; 0,7 a  $1 \text{ mmol l}^{-1}$ . Před každým měřením byl roztok zbaven rozpuštěného kyslíku probubláním dusíkem po dobu 10 minut. Na GCE a LMGCE byly postupně zaznamenávány cyklické voltamogramy pro jednotlivé koncentrace v potenciálovém rozsahu od 0,5 V do -1,3 V s rychlostí scanu  $50 \text{ mV s}^{-1}$  a získaná data byla vyhodnocena a zpracována v softwaru Nova 1.10.

#### 4.3.9. Akumulace paraquatu do fosfolipidové vrstvy

Akumulace paraquatu do fosfolipidové vrstvy byla studována na LMGCE pomocí square wave voltametrie (SWV) na stejném přístroji Autolab a ve stejném tříelektrodovém zapojení, jak je popsáno výše (kap. 4.3.3.1.). SWV byly zaznamenávány v roztoku paraquatu o koncentracích 0,05; 0,1 a 0,5  $\mu\text{mol l}^{-1}$  v prostředí  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (0,01  $\text{mol l}^{-1}$ ) v potenciálovém rozsahu od 0 do -1,3 V za optimálních podmínek: frekvence 40 Hz, amplituda -80 mV a přírůstek -3 mV. LMGCE byla ponořena do roztoku paraquatu zbaveného rozpuštěného kyslíku probubláním dusíkem (10 minut) a byl zaznamenán SWV. Dále byla elektroda ponechána v míchaném roztoku paraquatu po určitou dobu (doba akumulace v rozsahu od 1 do 120 min) bez vloženého potenciálu a poté byl v nemíchaném roztoku zaznamenán SWV. Pro měření každé z koncentrací na LMGCE byla vždy připravena nová fosfolipidová vrstva. Pro porovnání bylo stejné měření provedeno i na čisté GCE. Získaná data byla vyhodnocena a zpracována v softwaru Nova 1.10.

#### 4.3.10. Vliv paraquatu na stabilitu fosfolipidové vrstvy

Vliv paraquatu na stabilitu fosfolipidové vrstvy byl testován pomocí cyklické voltametrie a elektrochemické impedanční spektroskopie. Všechna měření byla provedena na stejném přístroji a se stejným tříelektrodovým zapojením, jak je popsáno výše (kap. 4.3.3.1.).

Čerstvě připravená LMGCE byla opláchnuta ponořením do deionizované vody a vložena do roztoku ferrokyanidu draselného o koncentraci 5  $\text{mmol l}^{-1}$  v 0,01  $\text{mol l}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SO}_4$  zbaveného rozpuštěného kyslíku probubláním dusíkem (10 minut). Cyklické voltamogramy byly zaznamenány za stejných podmínek, jak je popsáno výše (kap. 4.3.5.). Následně byly se stejnou LMGCE zaznamenána impedanční spektra za podmínek popsaných výše (kap. 4.3.5.). Poté byla elektroda opláchnuta a vložena do roztoku paraquatu o koncentraci 1  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , respektive 0,4  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , a nechána ponořena 15 minut (bez míchání). Poté byla opět opláchnuta a proměřen znovu CV a EIS. Tímto způsobem byla proměřena časová závislost od 0 min do 24 hodin ponoření elektrody v roztoku paraquatu. Získané hodnoty byly vyhodnoceny v softwaru Nova tak, že data byla proložena křivkou odpovídající zvolenému modelu pro daný systém. Ekvivalentní obvod pro tento model je na obrázku 7, kde  $R_s$  je odpor roztoku,  $R_{\text{vrstva}}$  je odpor fosfolipidové vrstvy,  $C_{\text{vrstva}}$  je kapacita fosfolipidové vrstvy,

Relda je odpor elektrody a Celda je kapacita elektrody. Program iterační metodou vypočítal hodnoty jednotlivých prvků v obvodu.

#### 4.3.11. Stanovení paraquatu

Kalibrační závislost paraquatu na čisté a modifikované GCE byla měřena pomocí square wave voltametrie (SWV) na stejném zařízení a ve stejném tříelektrodovém zapojení, jak je popsáno výše (kap. 4.3.3.1.). Elektroda byla ponořena do roztoku základního elektrolytu ( $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ ) předem zbaveného kyslíku probubláním dusíkem (10 minut) a byl zaznamenán SWV. Roztok paraquatu o koncentraci  $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$  byl přidáván do základního elektrolytu tak, aby jeho výsledná koncentrace v roztoku byla  $0,05$ ;  $0,1$ ;  $0,2$ ;  $0,4$  a  $0,6 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ . Po každém přidavku byl roztok 10 minut míchán (doba akumulace) a poté byl zaznamenán SWV v potenciálovém rozsahu od 0 do  $-1,3 \text{ V}$  za optimálních podmínek: frekvence  $40 \text{ Hz}$ , amplituda  $-80 \text{ mV}$  a potenciálový krok  $-3 \text{ mV}$ . Získaná data byla vyhodnocena v softwaru Nova 1.10 a následně zpracována v programu OriginPro 8.

SWV byla za stejných podmínek dále použita pro stanovení paraquatu v deionizované vodě na koncentračních úrovních  $0,1$ ;  $0,2$  a  $0,4 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  a následně pro stanovení paraquatu ve vzorku říční vody. Vzorek říční vody byl zfiltrován přes filtr Whatman (velikost pórů  $1 \text{ } \mu\text{m}$ ) pro odstranění hrubých částic. Ke vzorku vody byl přidán pevný  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ( $c = 0,01 \text{ mol l}^{-1}$ ) jako základní elektrolyt a standardní roztok paraquatu na výslednou koncentraci  $0,1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ .

Diferenčně pulzní voltametrie (DPV) na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) byla měřena na Eco-Tribo Polarografu (ECO-TREND PLUS, Praha, Česká republika) v tříelektrodovém zapojení s  $\text{Ag|AgCl|1M-KCl}$  jako referentní elektrodou a platinovým drátkem jako pomocnou elektrodou. Všechna měření byla prováděna v potenciálovém rozsahu od 0 do  $-1,1 \text{ V}$  s rychlostí scanu  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitudou  $-50 \text{ mV}$  a šířkou pulzu  $100 \text{ ms}$ . DPV byla použita pro stanovení paraquatu v deionizované a říční vodě.

Měření HPLC bylo použito pro stanovení paraquatu v deionizované a říční vodě. Pro měření HPLC byl použit chromatograf sestávající z pumpy Alpha 10 Plus a UV-VIS detektoru Sapphire 800 (vše ECOM, Praha, Česká republika). Metoda byla modifikována z literatury [153], byla použita kolona core-shell Kinetex ( $100 \times 4,60 \text{ mm}$ ,  $2,6 \text{ } \mu\text{m}$  C18, Phenomenex, USA), mobilní fáze obsahovala  $0,2 \%$  trifluoroctovou kyselinu v deionizované vodě, průtoková rychlost byla  $0,4 \text{ ml min}^{-1}$  a nastřikovaný objem  $20 \text{ } \mu\text{l}$ . Vzorek vody ( $100 \text{ ml}$ )

byl lyofilizován přístrojem Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Německo), rozpuštěn v 1 ml deionizované vody a analyzován pomocí HPLC s UV detekcí při 257 nm.

## 5. VÝSLEDKY A DISKUSE

---

Agregace fosfolipidových molekul byla již studována jak v roztoku, tak i na tuhých površích, o čemž lze nalézt velké množství odborných publikací (viz kap. 2.2.1.). V literatuře se však popisují agregační vlastnosti pouze čistých fosfolipidů, respektive definované směsi dvou nebo tří typů (fosfo)lipidů. Cílem této disertační práce bylo prostudovat agregační vlastnosti přírodní směsi fosfolipidů získané ze sojových bobů (komerčně dostupnou pod názvem Asolectin). Již dříve byly studovány vlastnosti této směsi ve vodném prostředí. Agregační koncentrace asolectinu ve vodném prostředí byly stanoveny elektrokapilárním měřením, cyklickou voltametrií a nefelometricky. Vzniklé agregáty byly dále vizuálně studovány elektronovým mikroskopem [244,245]. Asolectin byl použit k vývoji nové metody přípravy liposomů bez použití organických rozpouštědel - spontánní revesikulaci. Tato metoda je založena na postupné titraci koncentrovaného vodného fosfolipidového roztoku do vodné fáze, kde dochází k rozpadu již vzniklých agregátů a k jejich přeuspořádání [65]. Proto je tato metoda použitelná pouze pro fosfolipidy relativně rozpustné ve vodném prostředí, což jsou přírodní lipidové směsi rostlinného a živočišného původu (především ze soji a vaječného žloutku). Metodou GC/MS byl stanoven obsah mastných kyselin a fosforu v této fosfolipidové směsi [246], dále byla tato metoda využita pro stanovení kritické liposomální koncentrace asolectinu a stanovení rozdělovacího koeficientu eugenolu v systému liposom-voda [247].

### 5.1. STANOVENÍ PARAQUATU POMOCÍ UHLÍKOVÉ PASTOVÉ ELEKTRODY

---

V návaznosti na předchozí výzkum byl asolectin použit jako modifikátor uhlíkových pastových elektrod (CPE) [248,249]. Čistá CPE a CPE modifikovaná asolectinem (LMCPE) byly použity pro stanovení pesticidu paraquatu v modelovém vzorku vody pomocí adsorpční rozpouštěcí diferenčně pulzní voltametrie (AdSDPV). Připravená CPE a LMCPE byly vždy ponechány zrát 1 týden na vzduchu při laboratorních podmínkách, poté byly jejich signály stabilní nejméně 10 dní.

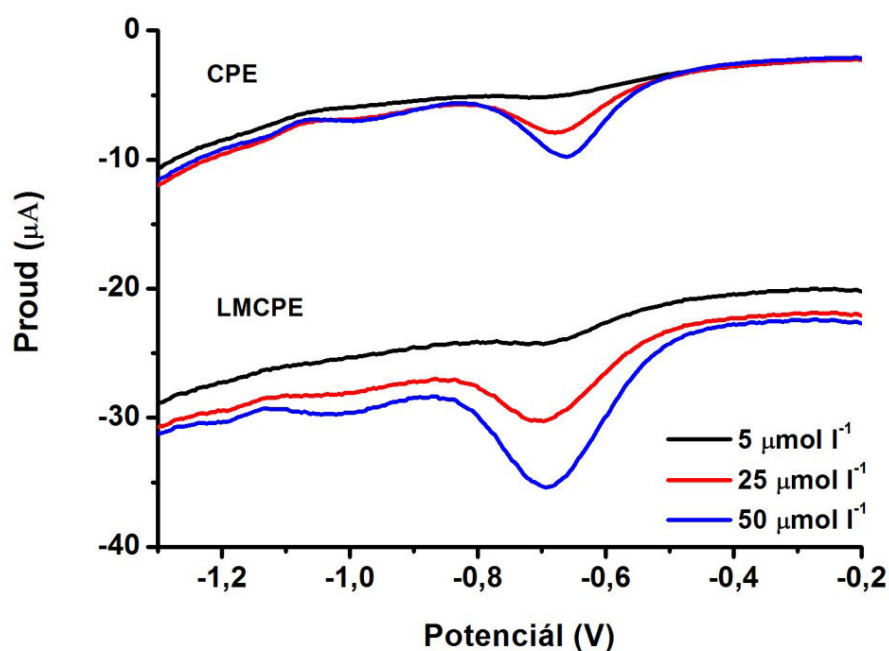
Nejdříve byly optimalizovány podmínky pro měření paraquatu pomocí AdSDPV na CPE a LMCPE. Jako analytický signál byl vybrán první katodický pík při potenciálu -0,7 V, protože druhý katodický pík při potenciálu -1 V byl zaznamenán pouze při vyšších



koncentracích. Vliv potenciálu na výšku píku paraquatu byl optimalizován v rozsahu 0 až -0,5 V. Nejvyšší proudová odezva byla získána při potenciálu -0,5 V. Vliv doby akumulace na výšku píku paraquatu byl studován při jeho různých koncentracích v roztoku. Pro koncentrace vyšší než  $5 \mu\text{mol l}^{-1}$  byl zaznamenán nejvyšší pík při době akumulace 300 s. Při koncentracích nižších než  $5 \mu\text{mol l}^{-1}$  byla optimální doba akumulace stanovena na 300 s pro CPE a 600 s pro LMCPE, kdy byly odezvy paraquatu nejvyšší.

Kalibrační závislosti paraquatu byly zaznamenány na CPE a LMCPE v koncentračním rozsahu od 0,5 do  $50 \mu\text{mol l}^{-1}$  za optimálních podmínek. Diferenčně pulzní voltamogramy byly získány s rychlostí scanu  $30 \text{ mV s}^{-1}$  při akumulačním potenciálu -0,5 V pro obě elektrody. Doba akumulace byla v závislosti na koncentraci paraquatu a použité elektrodě 300 s nebo 600 s (viz výše). Obrázek 8 ukazuje DP voltamogramy paraquatu při koncentracích 5, 25 a  $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Z obrázku je vidět, že existují zřejmé rozdíly mezi voltamogramy získanými na CPE a LMCPE. Vyšší proudové pozadí u voltamogramů změřených na LMCPE může být způsobené modifikací CPE málo vodivým asolectinem. Z kalibračních závislostí byly vypočítány meze detekce podle rovnice  $\text{LOD} = 3s_a/b$ , kde  $s_a$  je směrodatná odchylka (SD) úseku a  $b$  je směrnice regresní kalibrační přímky [250]. Nejnižší hodnota LOD byla  $0,8 \mu\text{mol l}^{-1}$  pro CPE a  $0,2 \mu\text{mol l}^{-1}$  pro LMCPE. Zlepšení meze detekce na LMCPE pro paraquat souhlasí s již dříve získanými daty pro různá léčiva a farmaceuticky významné látky [107,111,112]. Pro více hydrofobní látky lze očekávat podstatně vyšší efekt [111]. Směrnice regresní kalibračních přímek pro stejný koncentrační rozsah paraquatu byly  $51 \pm 1 \text{ nA l } \mu\text{mol}^{-1}$  pro CPE a  $240 \pm 40 \text{ nA l } \mu\text{mol}^{-1}$  pro LMCPE. Ze získaných hodnot vyplývá, že citlivost LMCPE na paraquat je 4,7 krát vyšší ve srovnání s CPE.

Následně byl paraquat stanovován v modelovém vzorku vody pomocí AdSDPV na obou elektrodách. Byly připraveny tři modelové vzorky paraquatu o koncentracích 0,5; 1 a  $3 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Pro prekoncentraci paraquatu byla použita extrakce pevnou fází na SPE kolonkách. Tabulka 2 ukazuje výtěžky extrakční procedury získané měřením na CPE a LMCPE. Hodnoty výtěžností v rozsahu 93-98 % ukazují, že extrakční proces je velice efektivní i při nízkých koncentracích paraquatu.



Obr. 8: Diferenčně pulzní voltamogramy paraquatu v Britton-Robinsonově pufru pH 6 v koncentračním rozsahu 5-50  $\mu\text{mol l}^{-1}$  získaný na CPE a LMCPE. Doba akumulace 300 s, akumulací potenciál -0,5 V, rychlost scanu 30  $\text{mV s}^{-1}$ .

Tabulka 2: Výtěžnosti SPE extrakce paraquatu z modelového vzorku vody měřené AdSDPV na CPE a LMCPE.

Koncentrace paraquatu ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	Výtěžnost CPE (%)	Výtěžnost LMCPE (%)
0,5	97,3 ± 1,4	98,0 ± 0,6
1,0	96,6 ± 0,2	98,9 ± 0,5
3,0	97,4 ± 3,5	92,9 ± 3,3

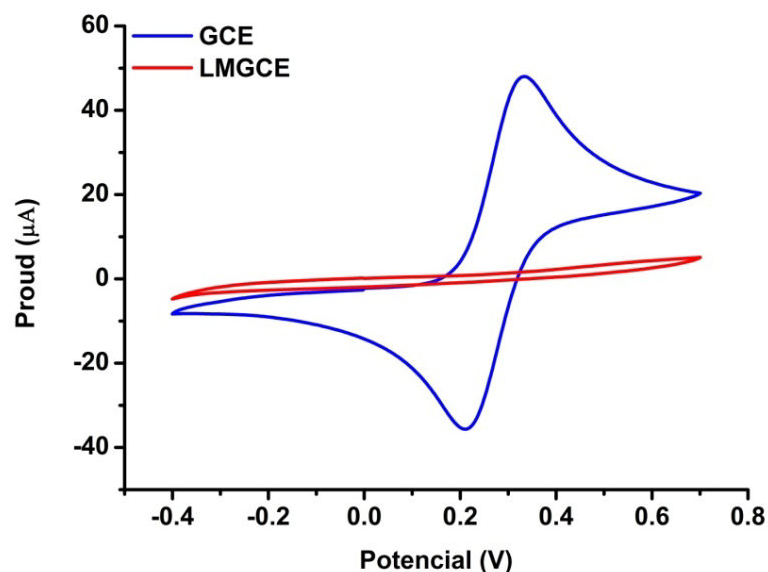
Z uvedených výsledků vyplývá, že asolectin zvyšuje citlivost uhlíkové pastové elektrody především k lipofilním látkám, jako je například paraquat. Další výzkum směřoval k prostudování agregačních vlastností této látky na pevném povrchu, k modifikaci pevné elektrody asolectinem a k dosažení nižšího detekčního limitu pro stanovení paraquatu ve vodě.

## 5.2. PŘÍPRAVA FOSFOLIPIDOVÉ VRSTVY

---

Agregační vlastnosti asolectinu byly studovány na povrchu elektrody ze skelného uhlíku (GCE). Cílem této práce bylo připravit fosfolipidovou dvojvrstvu na povrchu GCE jako model biologické membrány. Příprava samouspořádané fosfolipidové vrstvy na povrchu elektrod z různých materiálů byla popsána v řadě publikací (kap. 2.2.1.7.), avšak pouze s použitím čistých fosfolipidů. Asolectin byl zvolen jako komerčně dostupná směs fosfolipidů, která je izolovaná z přírodního materiálu a proto bude lépe modelovat reálnou biologickou membránu než čisté fosfolipidy. Relativně dobrá rozpustnost asolectinu ve vodě usnadňuje přípravu membrány bez nutnosti použít organická rozpouštědla. Navíc je asolectin cenově dostupný, což spolu s nízkou cenou a ekologickou nezávadností vody jako možného rozpouštědla otevírá zajímavé možnosti případných průmyslových aplikací.

Postup modifikace elektrody ze skelného uhlíku byl částečně převzat z literatury [90], avšak pro použití směsi fosfolipidů bylo nutné tento postup pozměnit. Základním principem pro vytvoření samoorganizované fosfolipidové vrstvy je nanesení roztoku fosfolipidů na čistý a suchý povrch GCE a ponoření do roztoku solí, kde dojde k uspořádání fosfolipidové vrstvy. Bylo však nutné optimalizovat podmínky tohoto procesu, jako jsou koncentrace roztoku fosfolipidů pro pokrývání, rozpouštědlo pro přípravu tohoto roztoku, objem roztoku nanášeného na povrch elektrody, doba ponoření do roztoku formujícího vrstvu a předúprava povrchu samotné elektrody. Během optimalizace byl změněn vždy pouze jeden parametr a přítomnost fosfolipidové vrstvy byla vždy prokázána záznamem cyklického voltamogramu v roztoku ferrokyanidu draselného o koncentraci 5 mmol l<sup>-1</sup> v prostředí KCl o koncentraci 0,1 mol l<sup>-1</sup>. Obrázek 9 ukazuje cyklické voltamogramy ferrokyanidu zaznamenané na čisté GCE a modifikované GCE (LMGCE). Na nepokryté elektrodě jsou zřetelné reverzibilní píky redoxního páru Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-/3-</sup>, zatímco na LMGCE nebyly zaznamenány žádné odezvy. To je způsobené tím, že fosfolipidová vrstva vytváří účinnou bariéru pro přenos náboje mezi elektrolytem a povrchem elektrody. Za její přítomnosti se tak ionty hexakynoželeznatanu draselného nedostávají až k povrchu elektrody, nedochází tak k jeho elektrochemické přeměně a proto nejsou zaznamenány žádné píky (obr. 9). Úplné potlačení signálu ferrokyanidu znamená, že fosfolipidová vrstva je kompaktní a pokrývá celý povrch elektrody.



Obr. 9: Cyklické voltamogramy 5 mmol l<sup>-1</sup> ferrokyanidu draselného v roztoku 0,1 mol l<sup>-1</sup> KCl, rychlost scanu 50 mV s<sup>-1</sup>, referentní elektroda Ag|AgCl|3M-KCl. Voltamogramy zaznamenané na čisté a modifikované elektrodě.

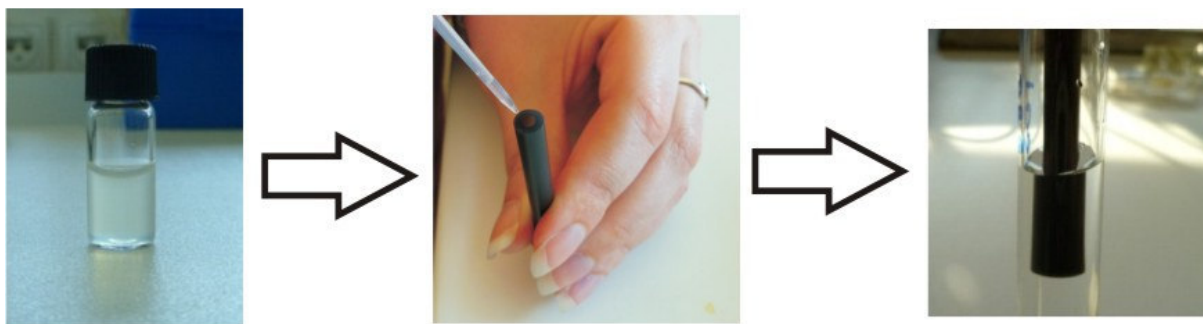
Roztok asolectinu byl připraven v koncentračním rozsahu 1 - 6 mg ml<sup>-1</sup>, jako rozpouštědla byly použity hexan a chloroform. Nejlepších výsledků, tedy úplného pokrytí elektrody fosfolipidovou vrstvou, bylo dosaženo při použití hexanového roztoku o koncentraci 3 mg ml<sup>-1</sup>, což je koncentrace, která je často uváděna také v literatuře. Dalším krokem optimalizace procesu bylo zjištění vhodného objemu pro nanášení roztoku asolectinu na GCE. Testovaný objem byl v rozsahu 5 - 20 μl roztoku. K úplnému pokrytí elektrody (průměr disku 3 mm) došlo při nanesení 5 μl roztoku asolectinu. Menší množství roztoku nestačilo na rovnoměrné smočení aktivního povrchu elektrody, větší objem vedl pravděpodobně k nerovnoměrnému pokrytí a vzniku nehomogenní vrstvy. Dalším krokem při pokrývání je ponoření elektrody po nanesení fosfolipidů do roztoku soli, kde se na základě hydrofobních interakcí samouspořádá lipidová vrstva. Bylo testováno několik různých přístupů po nanesení fosfolipidů a před ponořením elektrody do roztoku:

- po odpaření rozpouštědla elektrodu ihned ponořit do roztoku soli
- po odpaření rozpouštědla nechat "zaschnout" delší čas a poté elektrodu ponořit do roztoku soli

- po nanesení fosfolipidů nechat uschnout do druhého dne a následně elektrodu ponořit do roztoku soli
- ihned po nanesení fosfolipidů vložit elektrodu do roztoku soli

Nejlepších výsledků, tedy úplného pokrytí elektrody, bylo dosaženo při postupu, kdy se ihned po nanesení fosfolipidů elektroda vložila do roztoku soli, aniž by se předem odpařilo rozpouštědlo. Pravděpodobně se díky přítomnosti rozpouštědla lépe zprostředkují hydrofobní interakce při zachování dostatečné fluidity během samouspořádání vrstvy. Dále byly testovány 2 druhy roztoků podporující samouspořádání vrstvy:  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  chlorid draselný a  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  fosfátový pufr, pH 7. K lepšímu a především stabilnějšímu uspořádání vrstvy docházelo v roztoku KCl.

Důležitým bodem optimalizace procesu byla také doba, na kterou se GCE ponoří do roztoku soli. Doba ponoření byla testována v rozsahu od 10 do 60 minut. Nejlepších výsledků (tedy úplného potlačení signálu ferrokyanidu při měření CV) bylo dosaženo při ponoření elektrody do roztoku na 30 minut. Při delší době v roztoku dochází pravděpodobně k vymývání vrstvy nebo není vrstva stabilní (viz dále), kratší doba pak pravděpodobně není dostačující k celkovému uspořádání vrstvy. Proces vytváření fosfolipidové vrstvy na povrchu uhlíkové elektrody je znázorněn na obrázku 10.

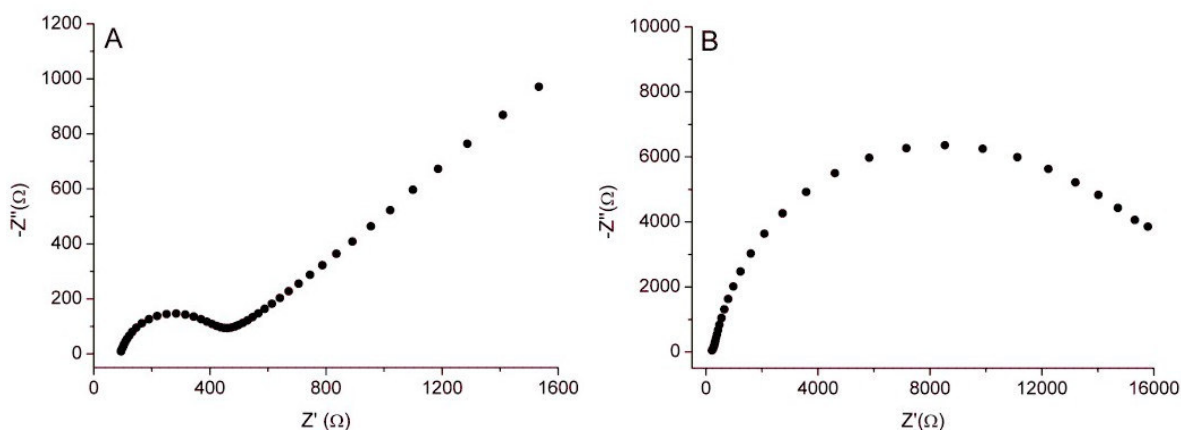


Obr. 10: Proces vytváření fosfolipidové vrstvy na povrchu GCE.

Optimalizací uvedených podmínek byla vyvinuta metoda pro vytváření fosfolipidové vrstvy na povrchu GCE. Avšak takto připravená vrstva nevykazovala dobrou stabilitu. Při opakovaném ponořování do roztoku docházelo k jejímu narušení a vymývání. Proto byl studován vliv elektrochemické předúpravy povrchu elektrody před nanášením vrstvy na její stabilitu. GCE přečištěná aluminou byla ponořena do roztoku KCl a byl na ni vložen potenciál  $1 \text{ V}$  (vs.  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{3M-KCl}$ ) po dobu 3 minut, následně byla elektroda

vysušena pod dusíkem a pokryta fosfolipidovou vrstvou dle optimalizovaného postupu. Pokrytí bylo pak otestováno pomocí CV v roztoku ferrokyanidu draselného. Dále byly testovány podmínky jako jsou vkládaný potenciál -1,5 V; -1 V a 1,5 V a prostředí (KCl, fosfátový pufr o pH 7). Elektrochemická úprava (elektrooxidace, elektoredukce) povrchu uhlíkové elektrody má vliv na povrchové funkční skupiny a tím na hydrofilnost/hydrofobnost povrchu elektrody [251,252]. Studie také ukázaly, že prostředí, ve kterém dochází k elektrochemické úpravě, má významný vliv na výsledný povrch elektrody [253]. Vlastnosti povrchu elektrody mají vliv na uspořádání fosfolipidové vrstvy. Jako nejvhodnější se ukázal roztok KCl a vložený potenciál 1,5 V. Připravený hydrofilní povrch elektrody způsobí, že fosfolipidové molekuly se orientují hlavičkami k povrchu GCE a tak se mohou lépe uspořádat do dvojvrstvy. Takto připravená fosfolipidová vrstva je stabilní a vhodná pro další použití.

Jako druhá metoda byla pro potvrzení vzniku kompaktní fosfolipidové vrstvy na povrchu elektrody použita elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS), což je efektivní metoda pro studium vlastností povrchově modifikovaných elektrod [93]. Elektroda byla ponořena do roztoku ekvimolární směsi  $K_4[Fe(CN)_6]:K_3[Fe(CN)_6]$  (1:1) o koncentraci jednotlivých složek  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  v přítomnosti KCl o koncentraci  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  a nejdříve byl v tomto systému proměřen CV. Z jeho záznamu se získá hodnota potenciálu pro měření EIS - v tomto případě  $0,27 \text{ V}$ , což je hodnota blízká formálnímu potenciálu redoxního páru  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  v daném prostředí. Získané hodnoty z měření EIS se zobrazují jako frekvenční charakteristiky, tzv. Nyquistův graf. Jedná se o závislost imaginárních složek impedancí ( $-Z''$ ) na reálných složkách impedance ( $Z'$ ) při měnící se frekvenci. Nyquistův graf zaznamenaný na čisté a modifikované GCE je na obrázku 11. Na obrázku 11A je vidět typická frekvenční charakteristika pro čistou elektrodu, kde lineární část se směrnici blízko 1 odpovídá limitnímu difusnímu kroku elektrochemického procesu. V přítomnosti lipidové vrstvy se impedanční spektrum významně změní (obr. 11B). Získaný půlkruh s hodnotami impedance v řádu  $k\Omega$  a nepřítomnost lineární části difusního kroku ukazuje, že na povrchu elektrody neprobíhá elektrochemická reakce, což dokazuje kompaktnost lipidové vrstvy dokonale bránící přístupu elektroaktivních složek k povrchu elektrody.

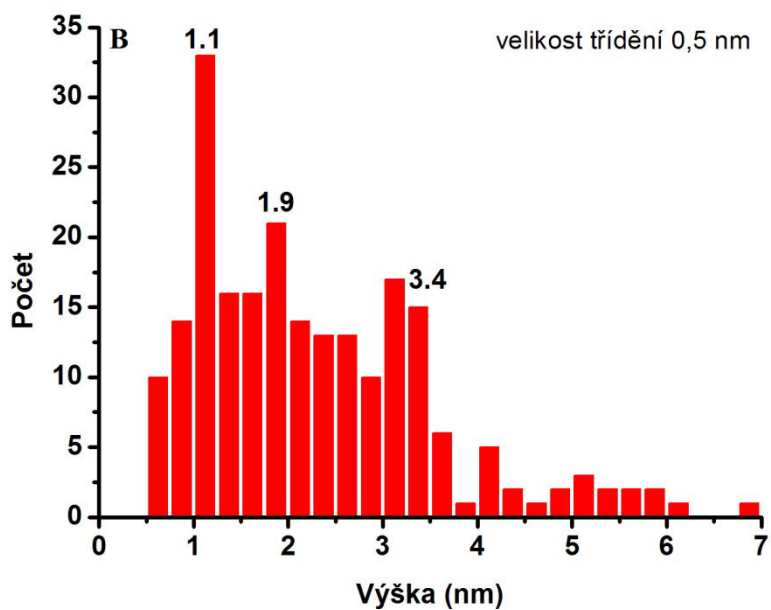
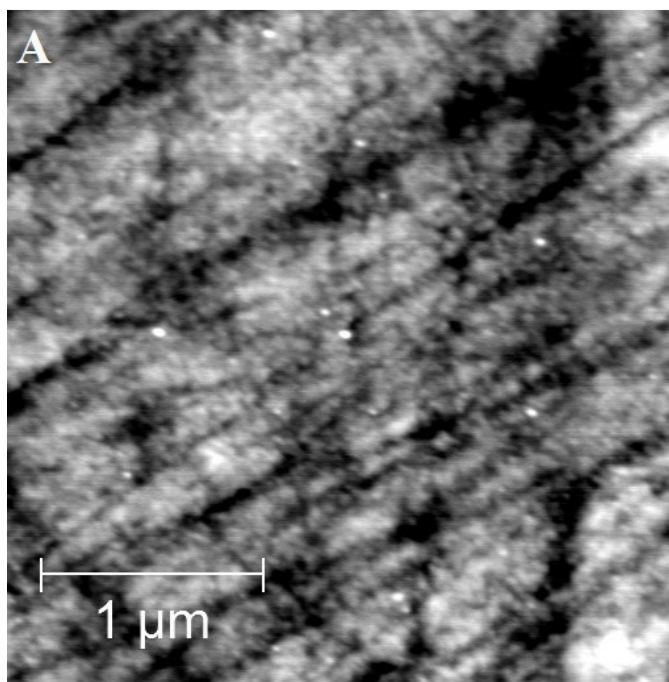


Obr. 11: Frekvenční charakteristika (Nyquistův graf) na čisté GCE (A) a LMGCE (B) v  $5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Fe(CN)}_6^{3-/4-}$  (1:1) obsahující  $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$ . Frekvenční rozsah  $50 \text{ kHz}$  až  $0,1 \text{ Hz}$ , měřeno při formálním redox potenciálu systému.

### 5.3. VLASTNOSTI FOSFOLIPIDOVÉ VRSTVY

#### 5.3.1. Tloušťka fosfolipidové vrstvy

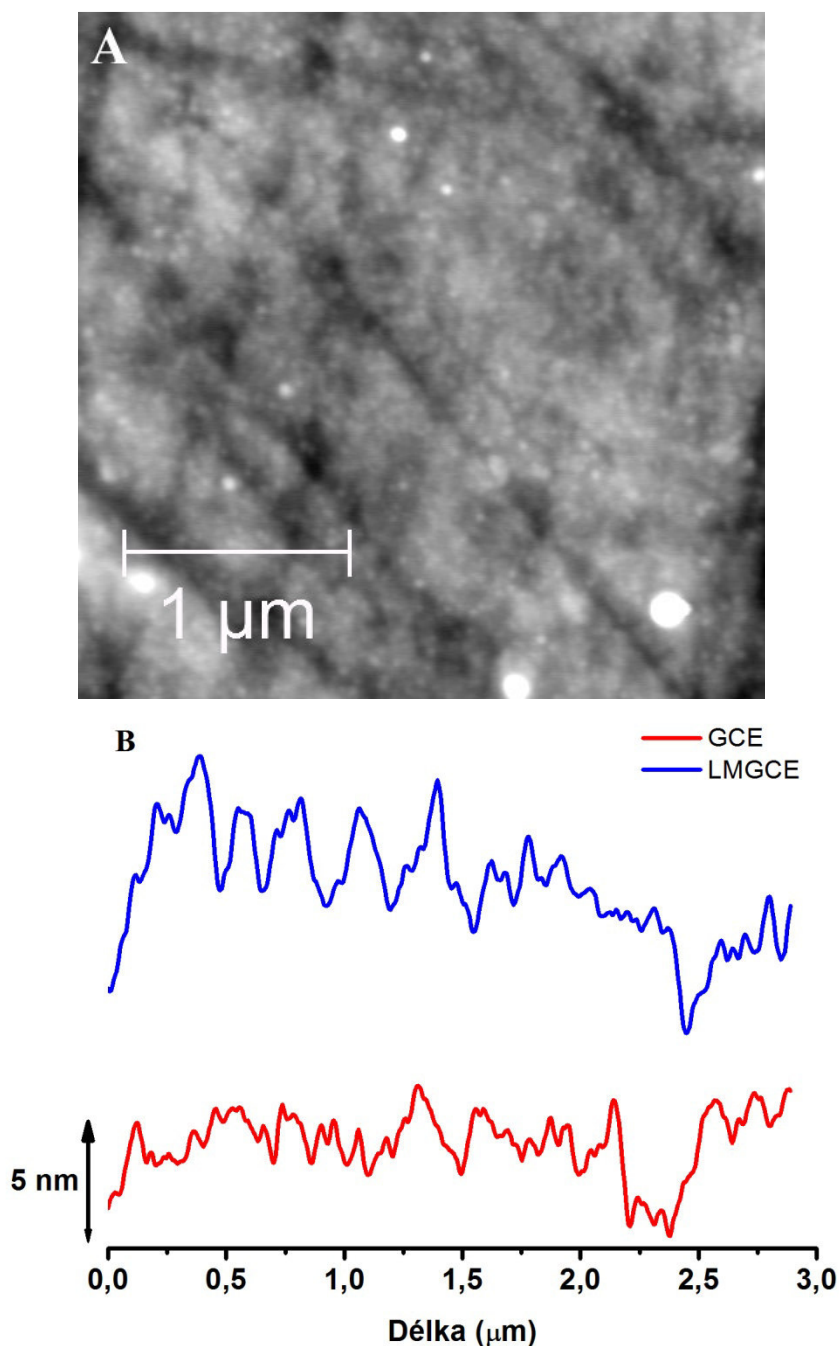
Pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) byly studovány vlastnosti připravené fosfolipidové vrstvy na povrchu GCE - především její kompaktnost a tloušťka [249]. Měření AFM bylo prováděno *ex-situ* na různých místech povrchu elektrody. Nejdříve byl proměřen povrch čisté GC elektrody, která byla před měřením přečištěna aluminou a vložena do ultrazvuku. AFM měření na čisté GCE ukázalo, že povrch elektrody je relativně drsný s mnoha rýhami, které mohly být způsobené během výroby elektrody a/nebo mechanickým čištěním jejího povrchu (obr. 12A). Z profilů a histogramů porosity (obr. 12B) bylo dále zjištěno, že drsnost povrchu elektrody je  $3,3 \pm 0,9 \text{ nm}$  s rýhami hlubokými kolem  $5,4 \pm 1,3 \text{ nm}$ . Jemné rýhy odpovídají mechanickému leštění povrchu elektrody aluminou, jak již bylo uvedeno v literatuře [254].



Obr. 12: AFM topografie čisté GCE (A) a její velikost třídění (B).

V případě fosfolipidové vrstvy na povrchu uhlíkové elektrody (LMGCE) bylo AFM použito pro studium její kompaktnosti a k určení její tloušťky. Jak je vidět z AFM topografie LMGCE a z profilů na čisté a modifikované elektrodě (obr. 13), fosfolipidová vrstva kompletně pokrývá povrch elektrody a kopíruje tak její drsnost a rýhy.





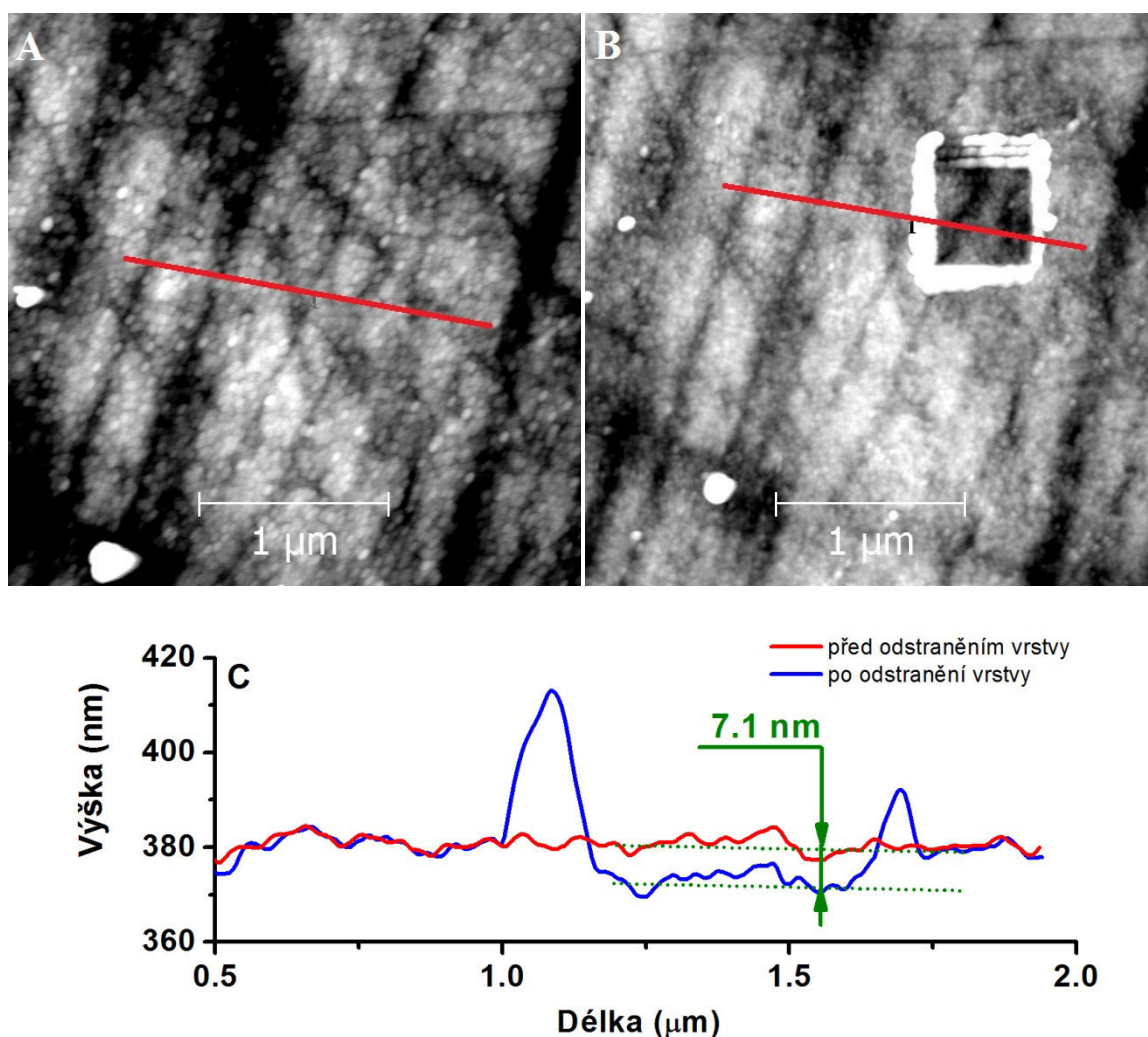
Obr. 13: AFM topografie LMGCE (A) a profily povrchu čisté a modifikované elektrody (B).

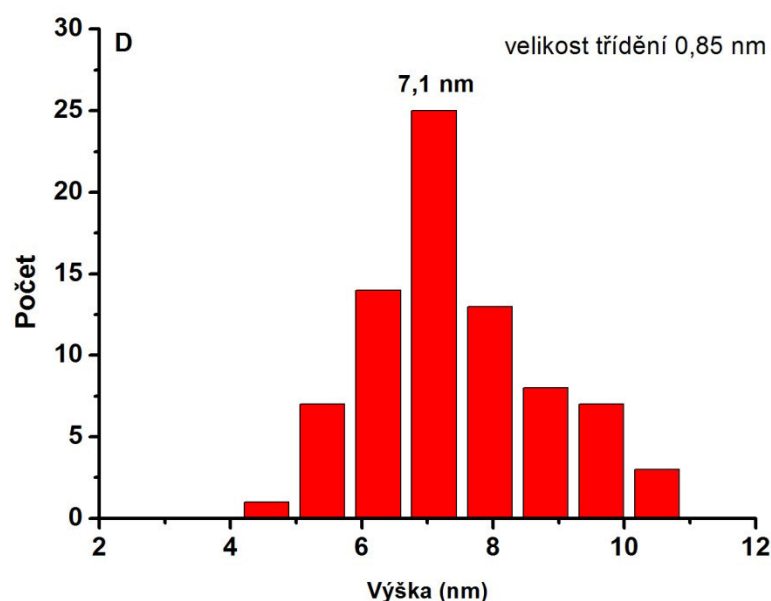
Tloušťka vrstvy byla získána metodou "nanoshaving" [214,255], při které je pomocí AFM sondy odstraněn film z povrchu vzorku. Struktura filmu je nejdříve charakterizována pomocí tapping modu (obr. 14A), následně je použita větší síla k odstranění filmu na vybrané ploše (500 nm x 500 nm) pomocí kontaktního modu a prostor je znovu zmapován pomocí

tapping modu (obr. 14B). Pokud není substrát poškozen použitou silou, hloubka odstraněné plochy se rovná tloušťce filmu [214].

Výška fosfolipidové vrstvy pak byla získána z rozdílu obou profilů před a po odstranění fosfolipidů (obr. 14C). Tloušťka připravené fosfolipidové vrstvy byla stanovena na  $7,1 \pm 1,2$  nm (obr. 14C,D). Tato hodnota odpovídá tloušťce fosfolipidové vrstvy udávané pro běžné buněčné membrány (5-10 nm v závislosti na lipidovém složení zahrnujícím především stupeň nasycení a délku uhlíkového řetězce) [76]. Na některých místech byla tloušťka vrstvy stanovena na  $11,9 \pm 1,9$  nm. To může být způsobeno nerovnoměrným rozložením roztoku fosfolipidu během přípravy vrstvy, což vede k tvorbě tlustší vrstvy než odpovídá dvojvrstvě.

Výsledky získané pomocí AFM potvrdily, že připravená fosfolipidová vrstva na povrchu GCE je kompaktní a její tloušťka odpovídá dvojvrstvě na většině povrchu. Připravená vrstva tedy má charakter buněčné membrány.



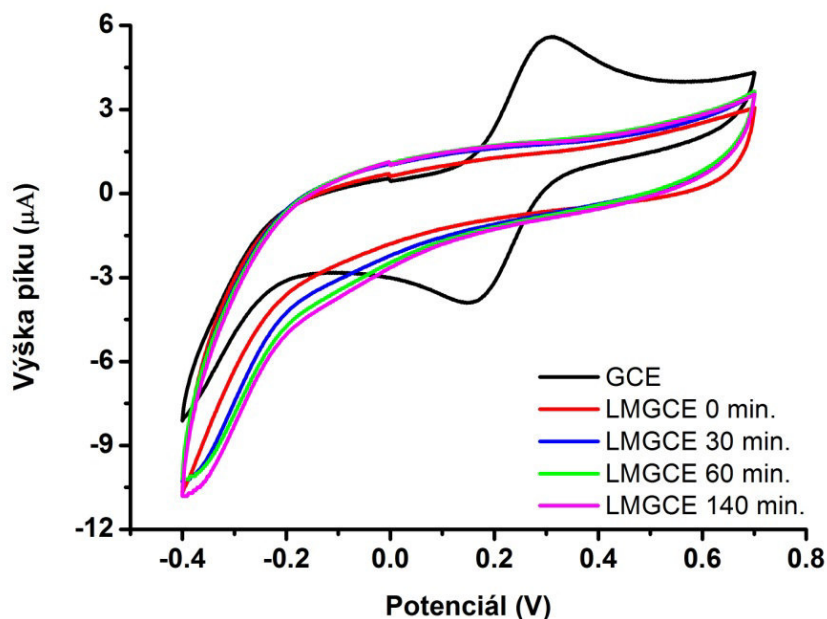


Obr. 14: AFM topografie LMGCE (A) a LMGCE po nanoshavingu (B). Profil LMGCE před a po nanoshaving (C) a histogram výšky fosfolipidové vrstvy na GCE (D).

### 5.3.2. Stabilita fosfolipidové vrstvy

Stabilita připravené fosfolipidové vrstvy byla testována pomocí dvou elektrochemických metod - cyklické voltametrie (CV) a elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS).

Připravená modifikovaná elektroda (LMGCE) byla vložena do roztoku ferrokyanidu draselného o koncentraci  $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ , který byl použit jako elektroaktivní značka neprocházející fosfolipidovou vrstvou, a byl zaznamenán cyklický voltamogram. Srovnáním s CV získaným na čisté elektrodě bylo zřejmé, že elektroda je zcela pokryta fosfolipidovou vrstvou, neboť nebyly zaznamenány žádné odezvy ferrokyanidu. Následně byla elektroda ponechána v roztoku a v závislosti na čase bylo sledováno, zda je vrstva stabilní a nedochází k jejímu vymývání během ponoření v roztoku. Každých 5 minut byl zaznamenán CV a to až do 60 minut. Poté byl časový interval prodloužen a měření bylo provedeno až do 140 minut. Na obrázku 15 jsou získané CV pro čistou GCE a následně pro pokrytou elektrodu v časech 0, 30, 60 a 140 minut. Je vidět, že v žádném z těchto časů nebyly zaznamenány odezvy ferrokyanidu a to ani po 140 minutách ponoření elektrody do jeho roztoku. Z těchto výsledků tedy vyplývá, že připravená vrstva je kompaktní, stabilní a nedochází k jejímu narušování.

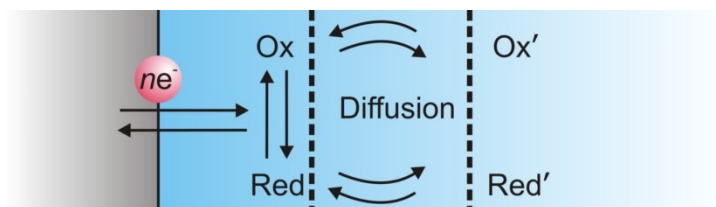


Obr. 15: Cyklické voltamogramy na GCE a LMGCE v  $0,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  v  $\text{NaCl}$  ( $9 \text{ g l}^{-1}$ ) ; ref. elektroda  $\text{Ag}|\text{AgCl}|3\text{M-KCl}$ , rychlost scanu  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Stabilita vrstvy byla dále studována také elektrochemickou impedanční spektroskopií. Čerstvě připravená modifikovaná elektroda byla ponořena do roztoku ekvimolární směsi  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]:\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (1:1) o koncentraci jednotlivých složek  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  v přítomnosti  $\text{KCl}$  ( $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ ) a bylo zaznamenáno EIS. Následně byla stejným způsobem jako u CV elektroda nechána v měřeném roztoku a bylo sledováno, zda nedochází k narušování vrstvy. Každých 5 minut byla zaznamenána impedanční spektra až do doby 150 minut.

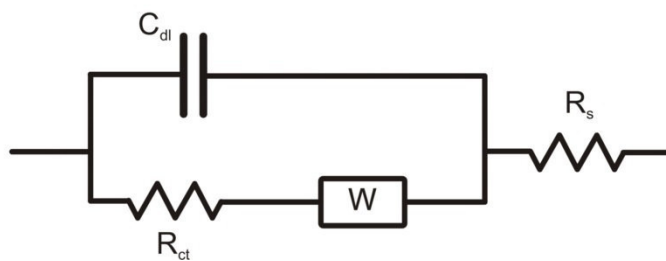
Pro vyhodnocení získaných dat v programu Nova se používá prokládání experimentálních dat parametry vhodného ekvivalentního obvodu, který se volí podle charakteru systému. V případě čisté elektrody ponořené do roztoku elektrolytu je možné tento systém popsat základním obvodem, který je na obrázku 16, kde  $R_s$  je odpor roztoku,  $W$  je Warburgův prvek (popisuje difuzi látek k elektrodě),  $C_{dl}$  je kapacita elektrické dvojvrstvy na povrchu elektrody a  $R_{dl}$  je odpor této dvojvrstvy. V případě složitějšího systému, například modifikace povrchu elektrody, je třeba zvolit takový ekvivalentní obvod, který popisuje dané uspořádání a zároveň je dostatečně jednoduchý. V případě elektrody modifikované fosfolipidovou vrstvou je nutné do obvodu zahrnout i odpor a kapacitu této vrstvy. Data získaná na LMGCE byla vyhodnocována podle ekvivalentního obvodu, který je na obrázku 17, kde  $R_s$  je odpor roztoku,  $R_{vrstva}$  je odpor fosfolipidové vrstvy,  $C_{vrstva}$  je

kapacita fosfolipidové vrstvy,  $R_{\text{elda}}$  je odpor elektrody a  $C_{\text{elda}}$  je kapacita elektrody. Program následně iterační metodou vypočítá hodnoty jednotlivých prvků v daném obvodu. Výsledky jsou zobrazovány jako Nyquistův graf (tedy závislost imaginární složky impedance na reálné složce impedance).

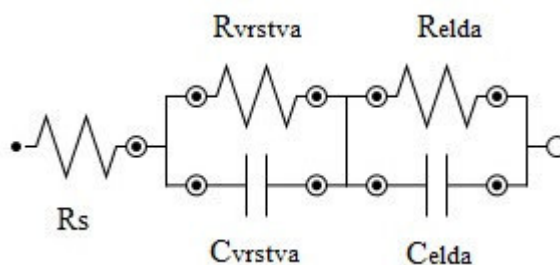


**Elektroda**

**Dvojvrstva    Difúzní vrstva    Roztok**



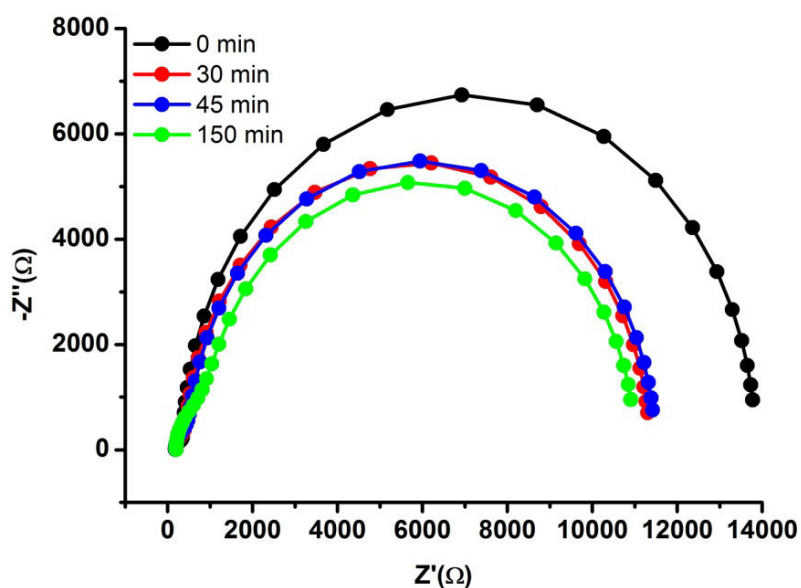
Obr. 16: Ekvivalentní obvod pro systém čisté elektrody ponořené do elektrolytu.



Obr. 17: Ekvivalentní obvod použitý pro vyhodnocení dat získaných na LMGCE.

Po vyhodnocení naměřených dat byly získány Nyquistovy grafy, které jsou v časech 0, 30, 45 a 150 minut na obrázku 18. Ihned po pokrytí elektrody byl získán graf v čase 0 minut, jehož reálná složka impedance dosahuje hodnot okolo 14 k $\Omega$ . Tyto výsledky ukazují, že povrch elektrody je pokryt fosfolipidovou vrstvou, čemuž odpovídají vysoké hodnoty impedance. Po 30 minutách, kdy byla elektroda ponořena do roztoku, došlo k mírnému

poklesu impedance na hodnotu okolo 11 k $\Omega$ . Lze předpokládat, že dochází k interakci mezi ionty přítomnými v měřeném roztoku a fosfolipidovou vrstvou, čímž se ionty mohou dostávat do relativně fluidní vrstvy fosfolipidů a to může přispět k poklesu impedance jak zvýšením koncentrace nabitých částic ve vrstvě, tak stlačením fosfolipidové vrstvy působením coulombických sil. Po ustavení rovnováhy (po dalších 15 minutách) se impedance již dále nemění (obr. 18). Získané výsledky ukazují, že vrstva zůstává po celou dobu měření kompaktní, pokrývá celý povrch elektrody a je stabilní.



Obr. 18: Frekvenční charakteristika (Nyquistův graf) pro LMGCE v závislosti na čase v 5 mmol l<sup>-1</sup> Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> (1:1) obsahující 0,1 mol l<sup>-1</sup> KCl. Frekvenční rozsah 50 kHz až 0,1 Hz, potenciál 0,180 V.

#### 5.4. VLASTNOSTI A OBNOVENÍ POVRCHU UHLÍKOVÉ ELEKTRODY

Pomocí rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS) byl studován vliv různých typů elektrochemických předúprav na vlastnosti povrchu GCE a jeho prvkové složení [249]. Byly použity tři typy předúpravy povrchu GCE: (i) leštění aluminou a čištění v ultrazvukové lázni (označovaný jako "leštěný"), (ii) leštění aluminou a anodická polarizace v roztoku NaCl o koncentraci 9 g l<sup>-1</sup> při potenciálu 1,5 V (vs. Ag|AgCl|3M-KCl) po dobu 3 minut

(označovaný jako "anodizovaný") a (iii) leštění aluminou a katodická polarizace v roztoku HCl o konc. 0,1 mol l<sup>-1</sup> při potenciálu -1,5 V (vs. Ag|AgCl|3M-KCl) po dobu 3 minut (označovaný jako "katodizovaný"). Po úpravě povrchu byly elektrody opláchnuty deionizovanou vodou a vysušeny proudem dusíku při laboratorní teplotě. Hlavním cílem používaných úprav povrchu GCE bylo získat čistý, hladký a polární povrch pro přípravu fosfolipidové vrstvy. V takovém případě jsou polární skupiny fosfolipidových molekul (hlavičky) orientovány k povrchu elektrody a tak mohou vytvořit fosfolipidovou dvojvrstvu. Procentuální zastoupení jednotlivých prvků na povrchu GCE po různých typech jeho úpravy je shrnuto v tabulce 3.

Tabulka 3: Procentuální prvkové zastoupení na povrchu GCE po různých typech úpravy.

Předúprava povrchu GCE	Leštěný [%]	Anodizovaný [%]	Katodizovaný [%]
C1s	85.9	81.2	85.2
O1s	11.8	13.6	12.4
N1s	1.4	-	1.4
Cl2p	-	3.6	0.1
Al2p	0.7	0.9	0.6

Výsledky XPS ukázaly, že kontaminace povrchu elektrody aluminou na všech typech vzorků je zanedbatelná. Koncentrace hliníku ve formě Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (pík Al2p, BE = 74,6 eV) na čisté nemodifikované GCE nepřesáhla 1% (tab. 3).

Na všech vzorcích však bylo nalezeno významné množství kyslíku. Přestože celková koncentrace kyslíku na leštěném, anodizovaném i katodizovaném povrchu byla srovnatelná, na vzorcích upravených anodizací i katodizací bylo pozorováno zvýšení koncentrace sp<sup>3</sup> formy (C-O, BE = 532 eV) a snížení koncentrace sp<sup>2</sup> formy (C=O, BE = 533 eV) ve srovnání s mechanicky leštěným vzorkem. Nicméně tento jev nemá zřejmě významný vliv na stabilitu fosfolipidové vrstvy.

Významnější je vyšší obsah organického chloru (přibližně 3,5 %) s vazebnou energií 200 eV [256], který byl nalezen na anodizované elektrodě, zatímco na ostatních dvou elektrodách byl obsah chloru pod mezí detekce (~ 0,1 %). To je jediná významná změna

v elementárním složení, která nebyla pozorována u žádné jiné úpravy elektrody. Organický chlor je generován na povrchu elektrody v průběhu anodizace a přispívá k vyšší stabilitě fosfolipidové vrstvy pravděpodobně díky vyšší polarizovatelnosti povrchu, který je bohatý na atomy chloru ve srovnání s atomy kyslíku. Z tohoto důvodu byla anodizace povrchu uhlíkové elektrody vybrána jako proces předúpravy před modifikací GCE fosfolipidy, což je také v souladu s výsledky získanými při optimalizaci procesu modifikace elektrody (kap. 5.2.).

Po modifikaci anodizované elektrody fosfolipidy bylo na jejím povrchu nalezeno přibližně 1,3 % fosforu ve formě fosforečnanu (BE ~ 133 eV). Tato hodnota odpovídá přibližně jedné polovině obsahu fosforu v asolectinu, který byl stanovován již dříve [246]. Byl nalezen také chlor (přibližně 2,3 %), nicméně v tomto případě se vyskytoval ve formě chloridu kovu (BE ~ 198,5 eV), který pravděpodobně pocházel z roztoku NaCl, který se používá během přípravy fosfolipidové vrstvy. Nalezený obsah sodných iontů (přibližně 1,6 %, BE ~ 1071 eV) potvrzuje tuto teorii.

Po měření modifikovanou elektrodou (LMGCE) je nutné očistit a obnovit povrch elektrody pro její další použití. V případě čištění jenom aluminou byly pozorovány vysoké hodnoty slepých pokusů (při měření základního elektrolytu). Proto byly testovány tři různé způsoby čištění povrchu elektrody a z analýzy XPS bylo porovnáno elementární prvkové složení na každém povrchu.

Pro odstranění fosfolipidové vrstvy a regeneraci povrchu elektrody byly testovány tři čisticí procesy označené (i), (iii) a (iv), (kap. 4.3.6.). Leštění LMGCE aluminou (i) vykazovalo vyšší obsah hliníku (4 % jako oxid hlinitý, BE = 74,6 eV, tab. 4), který významně převyšuje hodnotu získanou na nemodifikované elektrodě (přibližně 1 %, tab. 3). Následné elektrochemické přečištění v roztoku HCl v tomto případě nezvýšilo čistotu povrchu - hodnoty byly srovnatelné s výsledky získanými pouze leštěním elektrody (tabulka 4). Přítomnost fosfolipidové vrstvy se tak zdá být hlavní příčinou akumulace hliníku, který byl následně použit jako marker pro sledování čistoty povrchu. Proto bylo navrženo efektivní chemické čištění zahrnující použití nepolárního rozpouštědla pro důkladné odstranění zbytků fosfolipidů a hliníku. Konečný proces čištění LMGCE (iv) sestává z leštění elektrody aluminou, čištění v ultrazvukové lázni ve vodě, vysušení elektrody a následné čištění v hexanu, methanolu a vodě (vždy 15 min. v ultrazvukové lázni v každém rozpouštědle). Po tomto čisticím procesu nebylo na povrchu elektrody nalezeno žádné znečištění (viz tabulka 4). Tento způsob regenerace povrchu uhlíkové elektrody byl používán po každém



měření LMGCE. V základním elektrolytu pak nebyl detegován žádný analyt. Tento způsob čištění významně přispěl k tomu, že se podařilo dosáhnout nízkého detekčního limitu pro stanovení paraquatu (viz dále).

Tabulka 4: Procentuální prvkové zastoupení na povrchu GCE po různých typech čištění LMGCE.

Čištění povrchu LMGCE	Leštěný povrch [%]	Katodizovaný povrch [%]	Chemické čištění [%]
C1s	76.0	74.6	86.8
O1s	17.2	18.7	10.2
N1s	1.5	1.1	1.2
Cl2p	0.8	0.5	-
Al2p	4.0	4.2	-

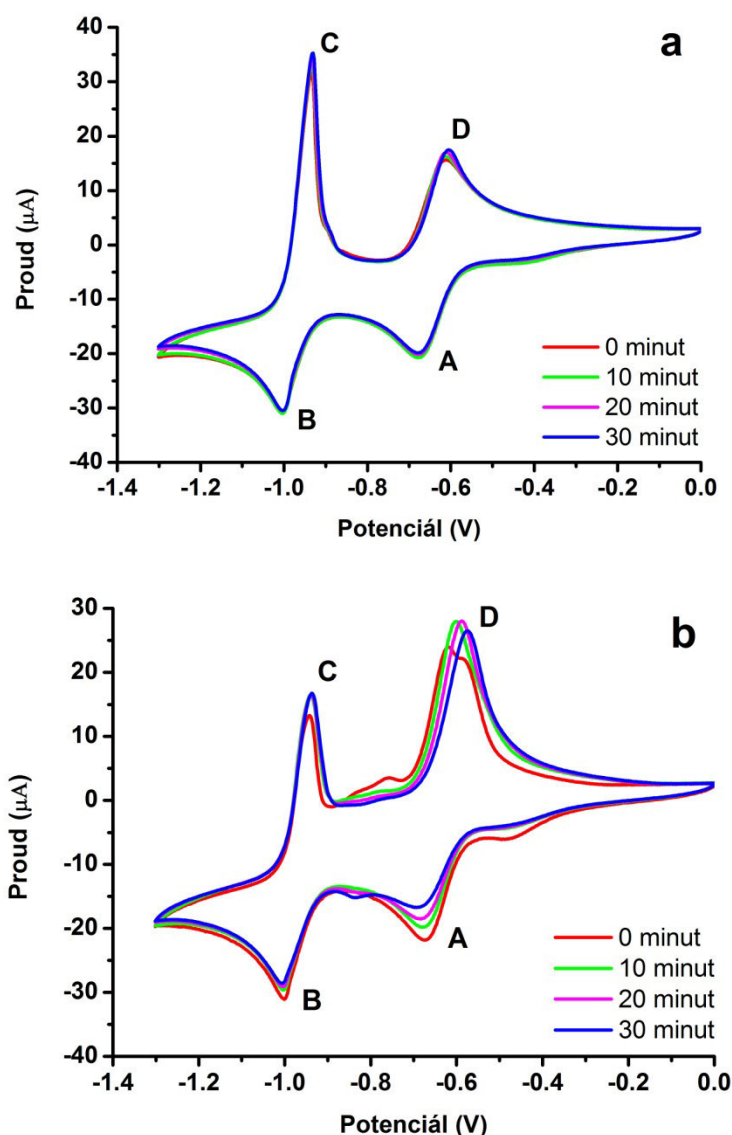
## 5.5. INTERAKCE FOSFOLIPIDOVÉ VRSTVY S LÁTKAMI

### 5.5.1. Interakce paraquatu s fosfolipidovou vrstvou

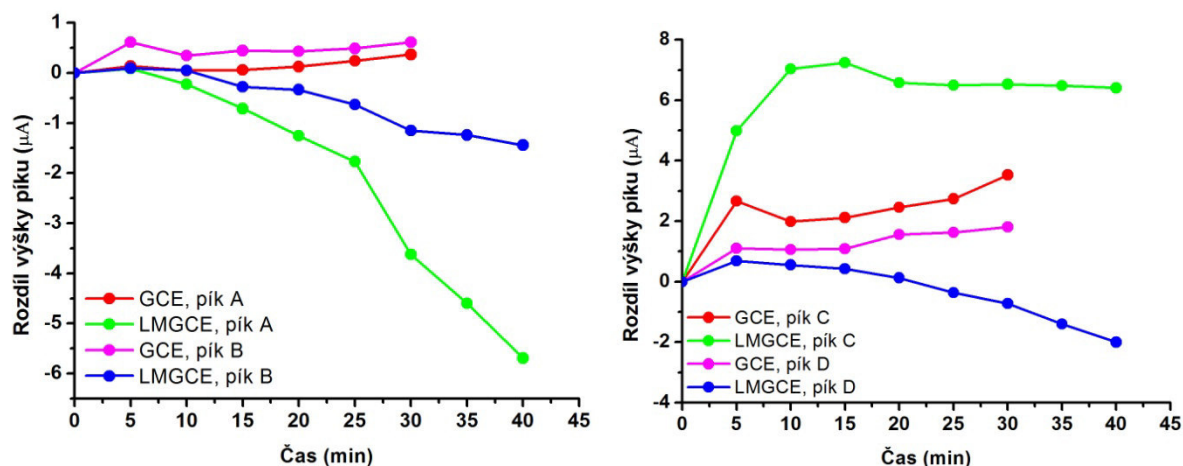
Herbicide paraquat byl zvolen jako model lipofilní látky a byly studovány interakce mezi touto látkou a lipidovou vrstvou pomocí cyklické voltametrie.

Nejdříve bylo sledováno, zda se paraquat adsorbuje na čistý povrch uhlíkové elektrody. GCE byla ponořena do roztoku paraquatu o koncentraci  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  v přítomnosti  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  fosfátového pufru (pH 7) a každých 5 minut byly zaznamenány cyklické voltamogramy (obr. 19). S čistou GCE nebyly pozorovány výrazné proudové změny ani po 30 minutách (obr. 19a) z čehož vyplývá, že nedochází k adsorpci této látky na povrch GCE. U elektrody modifikované lipidovou vrstvou dochází k významnému poklesu píku A v katodickém směru polarizace a v anodickém směru je zřejmý nárůst píku C (obr. 19b). Lze předpokládat, že paraquat difunduje přes fosfolipidovou vrstvu k povrchu elektrody, kde dochází k jeho redukci na kationradikál (pík A) a dále až na neutrální látku (pík B), která se může zpětně oxidovat v anodickém směru polarizace na původní dikation (píky C a D, obr. 19). Neutrální redukována forma paraquatu má pravděpodobně tendenci se zadržovat ve fosfolipidové

vrstvě. Tím dochází po určitou dobu k nárůstu proudu anodického píku C odpovídajícího oxidaci na kationradikál. Zadržováním této látky ve fosfolipidové vrstvě může mít za následek zpomalení difuze paraquatu k povrchu elektrody a snížení proudu redukčních píků, zejména ve druhém cyklu (obr. 19b). Tyto výsledky potvrzuje také obrázek 20, na kterém jsou znázorněny závislosti změny výšky píků (jednotlivě pro píky A až D) na čase získané na čisté a modifikované GCE.

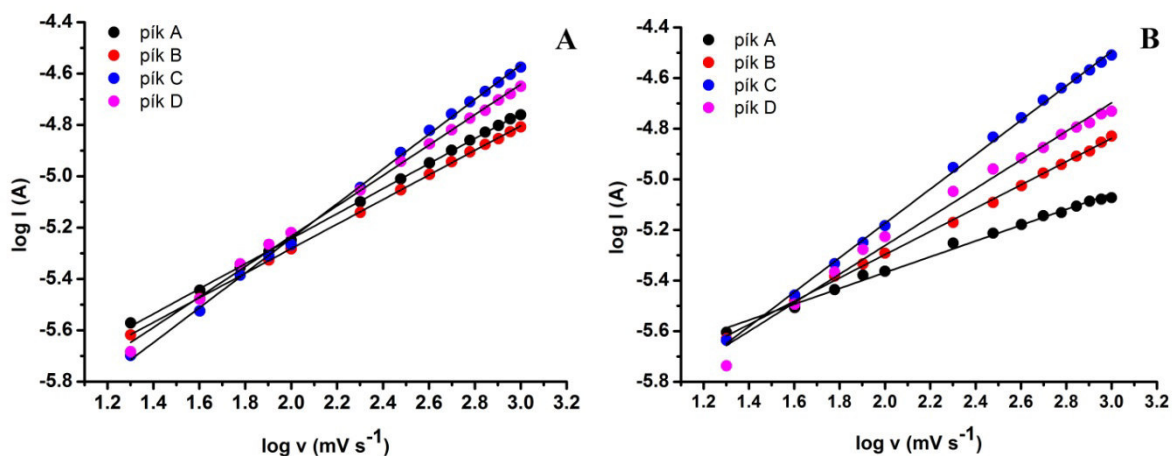


Obr. 19: Cyklické voltamogramy 1 mmol l<sup>-1</sup> paraquatu v 50 mmol l<sup>-1</sup> fosfátovém pufru, pH 7 v závislosti na čase: GCE (a), LMGCE (b); rychlost scanu 50 mV s<sup>-1</sup>, ref. elektroda Ag|AgCl|3M-KCl.



Obr. 20: Závislost změny výšky píku na čase na GCE a LMGCE.

Na obou elektrodách byl dále sledován vliv rychlosti scanu na odezvy paraquatu. Rychlost polarizace elektrody byla studována v rozsahu od 20 do 1000  $\text{mV s}^{-1}$  v roztoku paraquatu o koncentraci  $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$  v  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  fosfátovém pufru o pH 7. Na obrázku 21 jsou grafy závislosti logaritmu proudu všech píků na logaritmu rychlosti polarizace elektrody získané pro čistou (obr. 21a) i fosfolipidy modifikovanou GCE (obr. 21b). Směrnice takto získaných regresních přímek a jejich relativní směrodatné odchylky pro obě elektrody jsou uvedeny v tabulce 5. Ze závislosti proudu píků na rychlosti polarizace vyplývá, že děj je převážně řízen difusí, přičemž v anodickém směru (píky C a D) se částečně uplatňuje adsorpční děj. To je v souladu s představou zadržování produktů redukce ať už na povrchu elektrody nebo v lipidové vrstvě. Výrazně nižší směrnice závislosti proudu píku A na LMGCE může souviset s kinetikou chemické reakce, která předchází reakci přenosu náboje [257]. Tato reakce zřejmě vychází z interakce paraquatu s fosfolipidovou vrstvou a jako limitující krok patrně určuje celkovou rychlost elektrodového děje.



Obr. 21: Graf závislosti logaritmu proudu na logaritmu rychlosti polarizace elektrody; rychlost polarizace 20 - 1000  $\text{mV s}^{-1}$ , paraquat o konc.  $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$  v  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  PBS, pH 7; GCE (A); LMGCE (B).

Tabulka 5: Směrnice regresních přímek a jejich relativní směrodatné odchylky získané na čisté a modifikované GCE.

Směrnice přímky se směrodatnou odchylkou [A s $\text{mV}^{-1}$ ]		
Označení píku	GCE	LMGCE
A	<b><math>0,49 \pm 0,01</math></b>	<b><math>0,33 \pm 0,01</math></b>
B	<b><math>0,48 \pm 0,01</math></b>	<b><math>0,46 \pm 0,01</math></b>
C	<b><math>0,68 \pm 0,01</math></b>	<b><math>0,69 \pm 0,01</math></b>
D	<b><math>0,61 \pm 0,01</math></b>	<b><math>0,60 \pm 0,03</math></b>

### 5.5.2. Interakce fosfolipidové vrstvy s modelovým systémem

Jak již bylo popsáno výše, fosfolipidová vrstva připravená na povrchu uhlíkové elektrody je schopná zabraňovat pronikání hydrofilních látek k povrchu elektrody (např. ferrokyanidu draselného) a blokuje tak jejich elektrochemickou přeměnu, zatímco lipofilní látky jsou schopné přes tuto membránu procházet a tak se elektrochemicky přeměňovat (např. paraquat). Proto byl připraven modelový systém jako směs obou typů látek

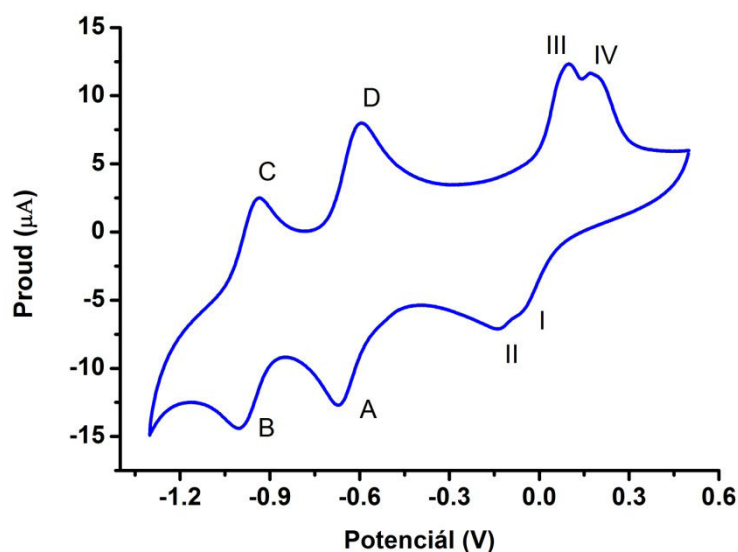
(hydrofilní a lipofilní) a bylo sledováno, zda je fosfolipidová vrstva schopná selektivně detegovat lipofilní látku v roztoku i v přítomnosti interferentu ve formě hydrofilní látky [258].

Nejdříve byla testována směs ferrokyanid draselný, jako model elektroaktivní hydrofilní látky, a paraquat, jako model lipofilního elektroaktivního pesticidu. Bylo však zjištěno, že tyto dvě látky spolu reagují a výsledky pronikání těchto látek přes membránu jsou pak zkreslené. Proto byl jako model hydrofilní látky zvolen síran měďnatý. Měďnaté sloučeniny se také často používají jako složka při přípravě pesticidních prostředků. V důsledku toho, že pro další měření byl používán roztok síranu měďnatého, byl jako základní elektrolyt použit síran sodný ( $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ ) a pH roztoku bylo upravováno na hodnotu 5, neboť při vyšších hodnotách pH docházelo ke srážení měďnatých iontů.

Nejdříve byly zaznamenány cyklické voltamogramy každé látky zvlášť na GCE i LMGCE. Cyklické voltamogramy síranu měďnatého byly získány v koncentračním rozsahu od  $0,1$  do  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  v potenciálovém rozsahu od  $0,5$  do  $-1,3 \text{ V}$  v prostředí síranu sodného o pH 5. Paraquat jako model lipofilní látky byl studován za stejných podmínek jako  $\text{CuSO}_4$ . Analýzy obou látek ukázaly, že píky těchto sloučenin se nepřekrývají, jsou dostatečně rozlišené a mohou tedy být použity jako modelová směs hydrofilní a lipofilní značky pro další výzkum.

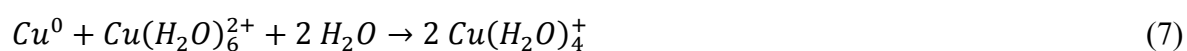
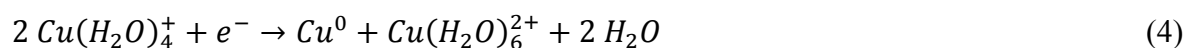
Dále byla připravena směs obou látek: paraquat ( $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) a síran měďnatý ( $0,25 \text{ mmol l}^{-1}$ ) v prostředí  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  o pH 5 a byl zaznamenán CV této směsi na čisté GCE (obr. 22). Na voltamogramu je vidět osm píků - dva katodické a dva anodické píky (označené I až IV) související se síranem měďnatým a dva páry katodických a anodických píků (označené A až D) odpovídající paraquatu.

Elektrochemické chování  $\text{CuSO}_4$  na povrchu elektrody ze skelného uhlíku bylo již dříve popsáno v literatuře [259,260]. Katodický pík, označený I, byl přiřazen redukci měďnatých iontů na ionty měďné, reakce (3). Poté následuje disproportionační reakce vyprodukovaných měďných iontů na kovovou měď a měďnaté ionty, reakce (4). Pík I je ihned následován druhým katodickým píkem II, odpovídajícím přímé redukci měďnatých iontů na kovovou měď, podle rovnice (5). Redukční reakce (5) se charakteristicky projevuje u potenciálu, který je negativnější než potenciál rovnovážný a závisí na rychlosti scanu [259].



Obr. 22: Cyklický voltamogram směsi  $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$  paraquatu a  $0,25 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  v  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 5 na čisté GCE; rychlost scanu  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , referentní elektroda  $\text{Ag}|\text{AgCl}|3\text{M-KCl}$ .

V anodickém směru polarizace se objevují dva píky, nicméně při pomalejším scanu je vidět pouze jeden anodický pík označený III. Se zvyšující se rychlostí scanu se objevuje pík označený IV nejprve jako rameno na kladné straně píku III a následně jako separovaný pík [259]. Lze předpokládat, že první anodická reakce, pík III, odpovídá oxidaci kovové mědi na měďnaté ionty, reakce (6). Oddělení ramene IV indikuje následnou chemickou reakci (7) mezi měďnatými ionty a zbývající elementární mědí. Vznikající měďné ionty jsou následně elektrochemicky oxidovány podle reakce (8), což odpovídá píku IV. Na konci píku IV klesá proud k nule, což znamená, že všechna kovová měď z povrchu je vyčerpaná a že měďné ionty jsou zoxidovány na měďnaté [259].

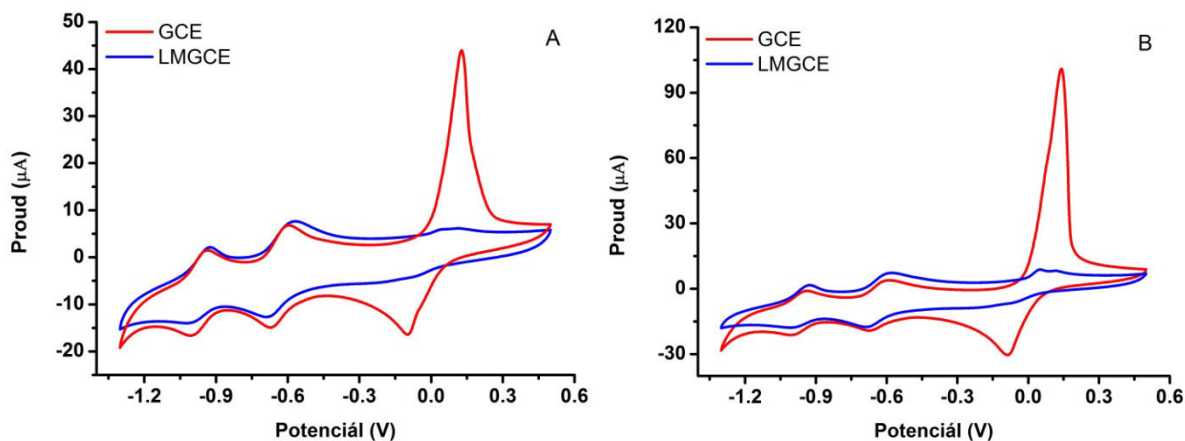


Píky označené A až D v obrázku 22 odpovídají elektrochemickému chování paraquatu na čisté elektrodě, které bylo již popsáno v kapitole 2.4.3.

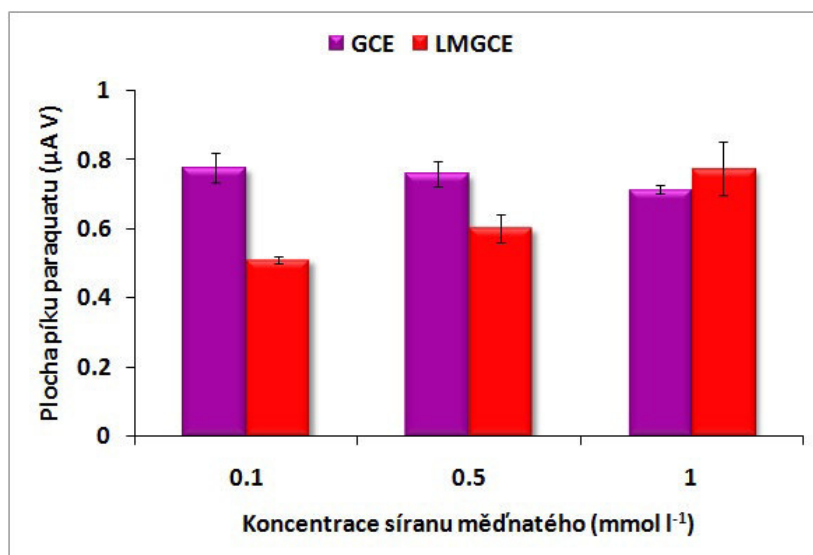
Selektivita fosfolipidy modifikované elektrody byla studována v roztoku síranu sodného o koncentraci  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  (pH 5) v závislosti na koncentraci obou látek v roztoku. Cyklické voltamogramy byly nejdříve zaznamenány v roztoku  $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$  paraquatu s přísádkou síranu měďnatého v koncentračním rozsahu od  $0,1$  do  $1 \text{ mmol l}^{-1}$ . Zároveň bylo do roztoku přidáváno vypočítané množství paraquatu tak, aby byla jeho koncentrace udržována stále na hodnotě  $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ . Obdobně byly získány cyklické voltamogramy v roztoku  $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$  síranu měďnatého při různých koncentracích paraquatu v rozmezí od  $0,1$  do  $1 \text{ mmol l}^{-1}$ . Obrázek 23A ukazuje cyklické voltamogramy získané v ekvimolární směsi paraquatu a síranu měďnatého ( $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) na GCE a LMGCE. Na fosfolipidy modifikované elektrodě byl zaznamenán významný pokles signálu síranu měďnatého (o 80 %), zatímco signál paraquatu zůstal stejný. Tento fakt dokazuje, že měďnaté ionty nejsou schopné pronikat přes fosfolipidovou vrstvu a tak nemohou být elektrochemicky redukovány na povrchu uhlíkové elektrody, jestliže je vrstva kompaktní a pokrývá celý elektrodový povrch. Na druhé straně, lipofilnější paraquat proniká do fosfolipidové vrstvy a difunduje jí až k povrchu elektrody, kde dochází k jeho elektrochemické reakci. LMGCE je tak schopná selektivně detegovat lipofilní látky a to i v přítomnosti interferentu ve formě hydrofilní látky. Následně byl připraven roztok, ve kterém byla dvojnásobná koncentrace  $\text{CuSO}_4$  ve srovnání s koncentrací paraquatu. Cyklické voltamogramy získané při dvojnásobné koncentraci měďnatých iontů ( $1 \text{ mmol l}^{-1}$ ) na čisté a modifikované elektrodě jsou na obrázku 23B. I v tomto případě došlo k výraznému poklesu píku odpovídajícího měďnatým iontům na LMGCE, zatímco odezva paraquatu zůstává stále stejná na obou elektrodách. LMGCE je tak schopná selektivně detegovat paraquat i v přítomnosti nadbytku hydrofilní látky.

Pro kvantitativní vyhodnocení byl vybrán katodický pík síranu měďnatého při potenciálu  $-0,1 \text{ V}$  a první katodický pík paraquatu při potenciálu  $-0,7 \text{ V}$ , které vykazují lineární nárůst s koncentrací v širším koncentračním rozsahu. Z obrázku 24 je vidět, že koncentrace síranu měďnatého v roztoku má jen malý vliv na plochu píku paraquatu. Malý pokles píku paraquatu na čisté GCE při vyšší koncentraci měďnatých iontů v roztoku může být způsoben tím, že měďnaté ionty se na povrchu elektrody redukují na kovovou měď a tím omezují prostor pro difuzi a elektrochemickou přeměnu paraquatu. Na modifikované GCE můžeme sledovat mírné zvýšení plochy píku paraquatu s rostoucí koncentrací

měďnatých iontů v roztoku. Paraquat difunduje přes fosfolipidovou vrstvu k povrchu elektrody. Produkty jeho elektrochemické přeměny nemohou zcela difundovat zpět do roztoku a akumulují se v lipidové vrstvě. Proto vzrůstá signál při dalším měření (obr. 24). Měření závislosti výšky píku na rychlosti scanu bylo zjištěno, že je tento proces řízený difusí (kap. 5.5.1.).



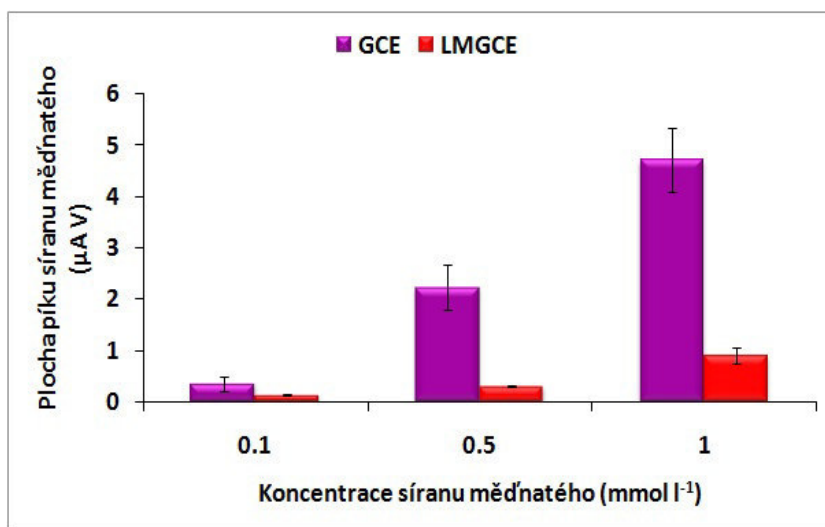
Obr. 23: Cyklické voltamogramy směsi  $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$  paraquatu a: (A)  $0,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ CuSO}_4$ ; (B)  $1 \text{ mmol l}^{-1} \text{ CuSO}_4$  v prostředí  $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ , pH 5; rychlost scanu  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , referentní elektroda Ag|AgCl|3M-KCl.



Obr. 24: Závislost plochy píku paraquatu ( $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) na koncentraci  $\text{CuSO}_4$  v roztoku na čisté a modifikované GCE.



Obrázek 25 ukazuje velké rozdíly mezi odezvami měďnatých iontů při různých koncentracích síranu měďnatého v roztoku na čisté a modifikované elektrodě. Tyto výsledky potvrzují, že měďnaté ionty nejsou schopny pronikat přes fosfolipidovou vrstvu na rozdíl od paraquatu, který přes membránu proniká. Výsledky také korespondují se směrnici kalibračních závislostí paraquatu a síranu měďnatého získanými na obou typech elektrod (tabulka 6).



Obr. 25: Závislost plochy píku CuSO<sub>4</sub> na jeho koncentraci v roztoku na čisté a modifikované GCE.

Kalibrační závislosti paraquatu a síranu měďnatého byly studovány na čisté i fosfolipidy modifikované GCE pro každou látku zvlášť v prostředí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,01 mol l<sup>-1</sup>). V tabulce 6 jsou uvedeny hodnoty směrnice těchto kalibračních závislostí a jejich směrodatné odchylky. Je-li směrnice kalibrační závislosti mírou citlivosti měřicího systému [261], je možné odvodit, že citlivost LMGCE vůči měďnatým iontům je 12,5 krát nižší ve srovnání s čistou GCE při zachování citlivosti vůči paraquatu. Tyto výsledky ukazují že fosfolipidová vrstva na povrchu uhlíkové elektrody má výrazný vliv na její selektivitu.

Stabilita fosfolipidové vrstvy na povrchu uhlíkové elektrody byla testována cyklickou voltametrií s použitím ferrokyanidu draselného jako elektroaktivní značky. Vrstva byla dostatečně stabilní nejméně 10 po sobě následujících měřeních (pH 7) pokud byla chráněna před extrémně silným proudem kapaliny a pokud byla ponořena v měřeném roztoku.

Tabulka 6: Směrnice kalibračních závislostí a jejich směrodatné odchylky získané na GCE a LMGCE pro paraquat a síran měďnatý.

Analyt	Směrnice kalibrační závislosti (mA V l mol <sup>-1</sup> )	
	GCE	LMGCE
Cu <sup>2+</sup>	5,0 ± 0,5	0,4 ± 0,3
paraquat	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,2

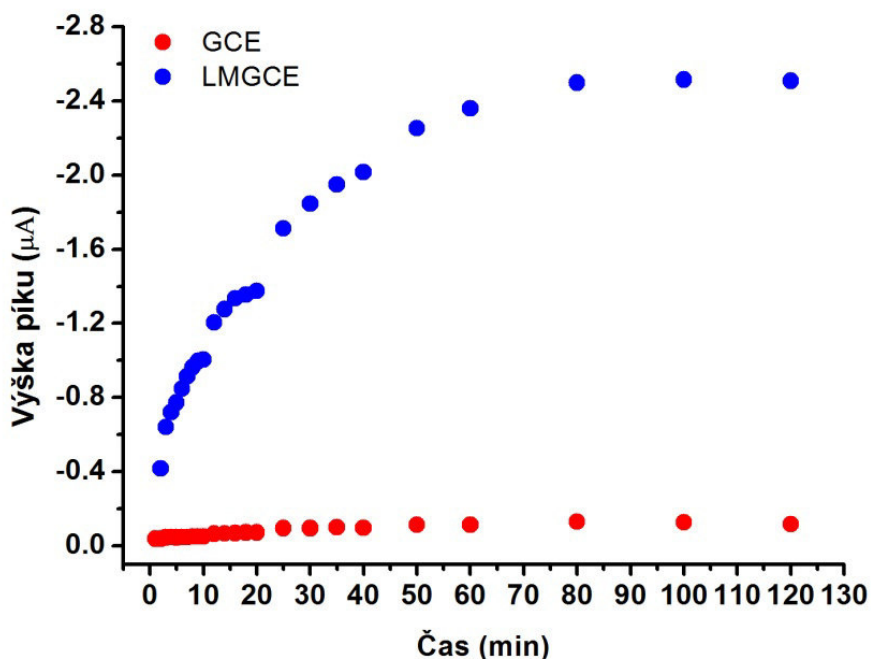
### 5.5.3. Akumulace paraquatu do fosfolipidové vrstvy

Z předchozích měření interakce paraquatu s fosfolipidovou vrstvou bylo zjištěno, že paraquat je pravděpodobně schopen se zadržovat v membráně a tuto jeho vlastnost je možné využít pro prekoncentraci a stanovení nízkých koncentrací této látky ve vzorcích vody.

Pomocí SW voltametrie byla sledována interakce mezi paraquatem a fosfolipidovou vrstvou ve srovnání s čistou elektrodou. Square wave voltamogramy byly zaznamenávány za optimálních podmínek v potenciálovém rozsahu od 0 do -1,3 V. Frekvence byla optimalizována v rozsahu od 10 do 90 Hz a v celém rozsahu byl pozorován pík rostoucí s rostoucí frekvencí. Závislost výšky píku na odmocnině frekvence se odchyluje od lineárního průběhu při frekvencích vyšších než 50 Hz, což může být způsobeno rostoucím vlivem nekompensovaného odporu v cele při vyšších frekvencích. Pro další měření byla jako kompromis zvolena frekvence 40 Hz. Podobně roste i výška píku téměř lineárně s rostoucí hodnotou amplitudy a to v celém rozsahu od -10 do -110 mV. Nicméně vysoké hodnoty amplitudy (zvláště při vyšších SW frekvencích) zvyšují vliv nekompensovaného kapacitního proudu a snižují selektivitu. Proto byla pro další měření zvolena hodnota -80 mV. Potenciálový krok byl optimalizován v rozsahu od -1 do -7 mV. Nejnižší hodnotě potenciálového kroku odpovídal nejvyšší pík, ale analýza trvala delší čas. Pro další experimenty byla zvolena hodnota -3 mV jako kompromis. Proces optimalizace a získané hodnoty souhlasí s hodnotami uváděnými v literatuře pro podobná měření [176].

Elektroda (GCE, respektive LMGCE) byla ponořena do roztoku paraquatu o koncentraci 0,05 μmol l<sup>-1</sup> v 0,01 mol l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a v závislosti na čase akumulace v rozsahu 1-120 minut byly zaznamenávány SW voltamogramy za optimálních podmínek. Mezi

jednotlivými měřeními byl roztok míchán pro podpoření adsorpce respektive inkorporace paraquatu. Stejným způsobem byly proměřeny i koncentrace 0,1 a 0,5  $\mu\text{mol l}^{-1}$  na čisté i modifikované GCE. Na obrázku 26 je závislost výšky píku paraquatu na čase akumulace získaná na GCE a LMGCE pro koncentraci 0,1  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Na čisté elektrodě nebyly zaznamenány téměř žádné změny ve výšce píku paraquatu - nedochází tedy k významné adsorpci této látky na povrch elektrody. Na modifikované elektrodě však byla získána hyperbolická závislost, která značí nasycení fosfolipidové vrstvy po 60 minutách. Nasycení vrstvy představuje rovnovážný stav, při kterém detekovaný pík závisí více na celkové kapacitě vrstvy než na koncentraci látky v roztoku. Podobné závislosti byly získány také pro další dvě koncentrace paraquatu. Schopnost paraquatu se akumulovat do fosfolipidové vrstvy byla dále využita pro stanovení této látky v modelových vzorcích vody. Pro praktické použití se zvolí akumulací čas z lineární části závislosti. Pro další měření byl zvolen čas akumulace 10 minut jako vhodný pro citlivé a reprodukovatelné stanovení paraquatu i ve zředěných vzorcích.



Obr. 26: Závislosti výšky píku paraquatu ( $0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) na čase získané na GCE a LMGCE.

#### 5.5.4. Vliv paraquatu na stabilitu fosfolipidové vrstvy

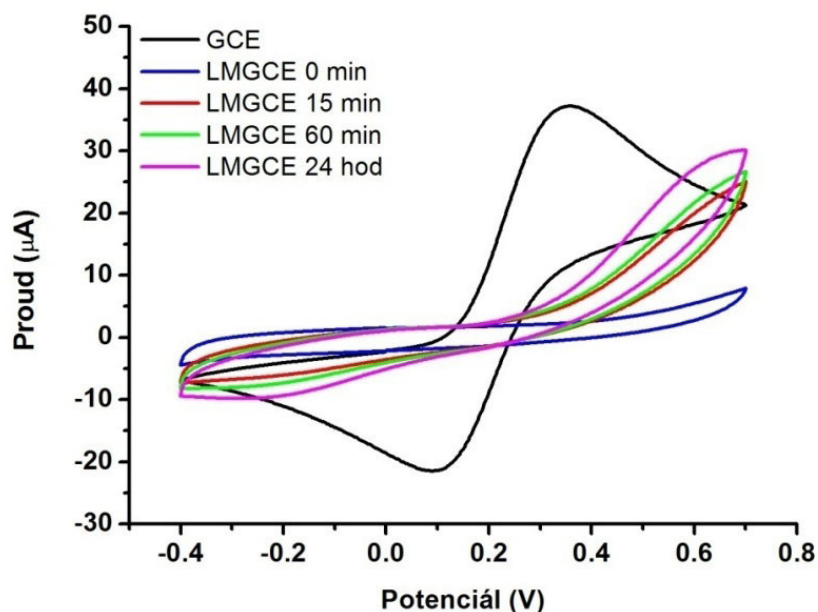
---

Předchozími experimenty bylo prokázáno, že paraquat je schopen pronikat přes fosfolipidovou vrstvu k povrchu elektrody, kde tak může probíhat jeho elektrochemická přeměna a zároveň že je schopen se v této vrstvě akumulovat. Jelikož jsou známé studie, kde například peptidy narušují strukturu buněčné membrány [89,203], bylo testováno, zda paraquat nemá podobné účinky na lipidovou membránu.

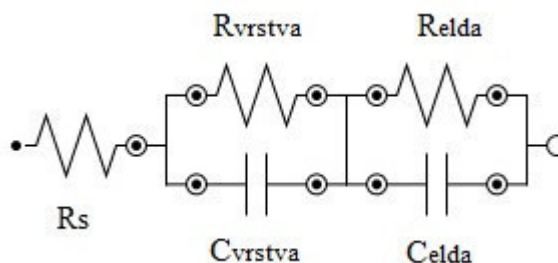
Stabilita vrstvy byla sledována pomocí CV a EIS v roztoku paraquatu o koncentraci 1 a 0,4  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . LMGCE byla ponořena do roztoku paraquatu na určitou dobu, poté opláchnuta deionizovanou vodou a byl zaznamenán CV v prostředí 5  $\text{mmol l}^{-1}$   $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  a následně impedanční spektra v prostředí 5  $\text{mmol l}^{-1}$   $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  (1:1) obsahující 0,1  $\text{mol l}^{-1}$  KCl. Měření bylo prováděno v časech 0, 15, 30, 45, 60, 120 a 240 min, dále po 17 a 24 hodinách.

Na obrázku 27 jsou cyklické voltamogramy získané při měření v roztoku paraquatu o koncentraci 1  $\mu\text{mol l}^{-1}$  v časech 0, 15, 60 minut a 24 hodin. Čas 0 min byl zaznamenán ihned po pokrytí elektrody, aniž by byla elektroda ponořena do roztoku paraquatu. Jak je zřejmé z obrázku, po pokrytí elektrody nebyly zaznamenány žádné odezvy ferrokyanidu, což souvisí s úplným pokrytím povrchu elektrody. Ani po 24 hodinách, kdy byla LMGCE ponořena do roztoku paraquatu, nebyly zaznamenány žádné signály ferrokyanidu, což znamená, že fosfolipidová vrstva není narušována a je stabilní po celou tuto dobu.

Tyto výsledky potvrzují i data získaná měřením EIS za stejných podmínek. Data byla vyhodnocena v softwaru Nova a to proložením parametry ekvivalentního obvodu, který je na obrázku 28, kde  $R_s$  je odpor roztoku,  $R_{\text{vrstva}}$  je odpor fosfolipidové vrstvy,  $C_{\text{vrstva}}$  je kapacita fosfolipidové vrstvy,  $R_{\text{elda}}$  je odpor elektrody a  $C_{\text{elda}}$  je kapacita elektrody.



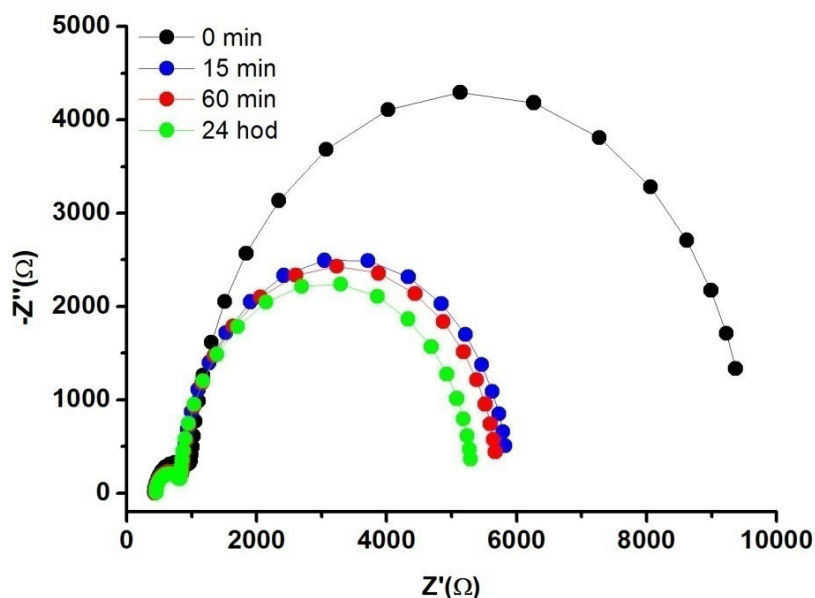
Obr. 27: Cyklické voltamogramy  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  ferrokyanidu draselného zaznamenané na čistém GCE a na LMGCE po ponoření do roztoku paraquatu ( $1 \text{ μmol l}^{-1}$ ) v závislosti na čase; rychlost scanu  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , referenční elektroda Ag|AgCl|3M-KCl.



Obr. 28: Ekvivalentní obvod pro vyhodnocení EIS.

Výsledné Nyquistovy grafy v časech 0, 15, 60 minut a 24 hodin jsou na obrázku 29. Čerstvá vrstva LMGCE vykazuje hodnoty reálné složky impedance přibližně  $9,5 \text{ k}\Omega$ . Na obrázku 29 je vidět, že po 15 minutách dojde ke změně odporu fosfolipidové vrstvy, kdy se hodnota impedance sníží na přibližně  $6 \text{ k}\Omega$ , avšak elektroda zůstává stále pokrytá. Lze předpokládat (podobně jak bylo již uvedeno výše), že dikation paraquatu se inkorporuje do relativně fluidní fosfolipidové vrstvy a může přispět k poklesu impedance jak zvýšením koncentrace nabitých částic uvnitř vrstvy, tak stlačením fosfolipidové vrstvy působením coulombických sil. Pokud je elektroda v roztoku paraquatu ponořena déle (60 min a 24 hod),

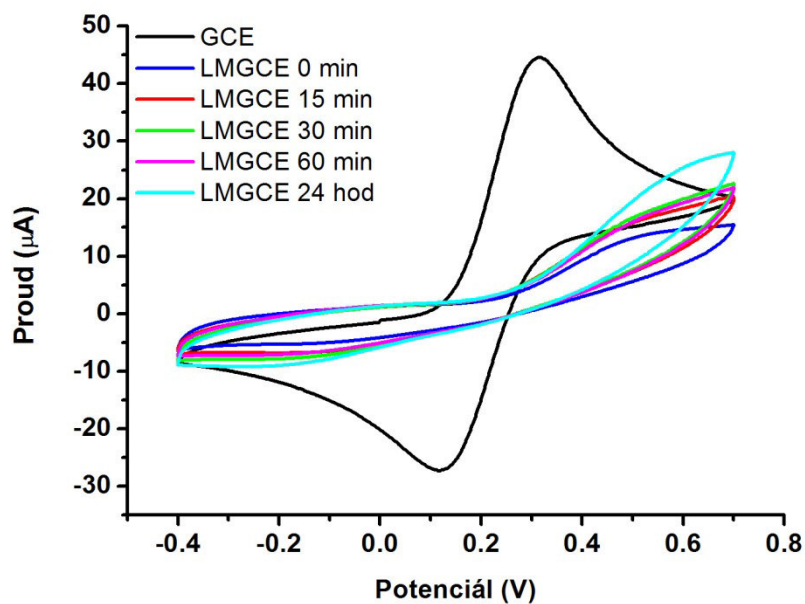
frekvenční charakteristika zůstává téměř stejná, bez významných změn, neboť dojde k ustavení rovnováhy, kdy se impedance již dále nemění. Tyto výsledky ukazují, že vrstva je stabilní po dobu minimálně 24 hodin i v přítomnosti paraquatu.



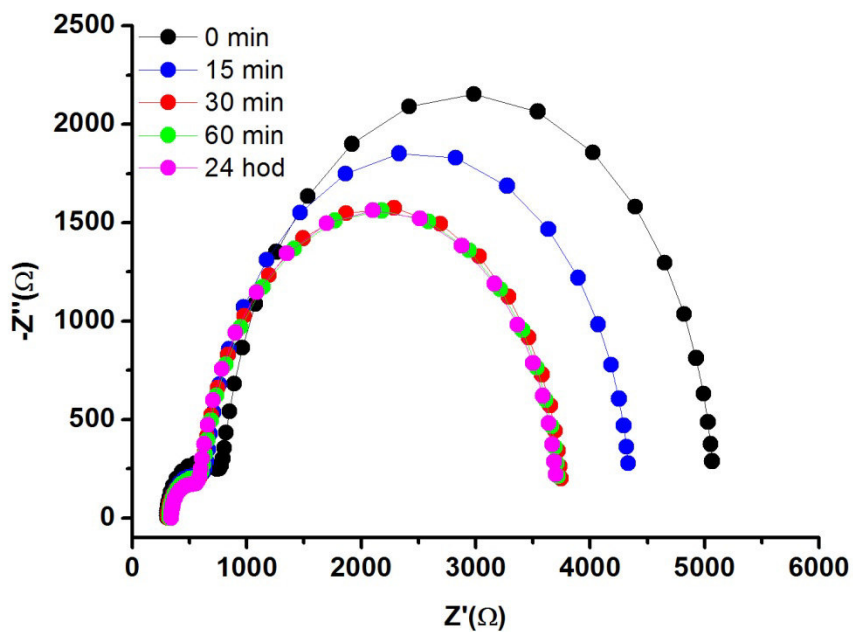
Obr. 29: Frekvenční charakteristika (Nyquistův graf) pro LMGCE v roztoku  $1 \mu\text{mol l}^{-1}$  paraquatu v závislosti na čase; EIS měřeno v prostředí  $5 \text{ mmol l}^{-1} \text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$  (1:1) obsahující  $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{KCl}$ . Frekvenční rozsah 50 kHz až 0,1 Hz, potenciál 0,22 V.

Stejný postup měření byl také použit pro nižší koncentraci paraquatu ( $0,4 \mu\text{mol l}^{-1}$ ). Jak je vidět na obrázku 30, povrch elektrody je zcela pokryt fosfolipidovou vrstvou, neboť nebyl zaznamenán žádný signál ferrokyanidu. Cyklické voltamogramy zůstávají téměř stejné po celou dobu měření a ani po 24 hodinách nedochází k narušení fosfolipidové vrstvy paraquatem.

Data EIS byla vyhodnocena podle stejného ekvivalentního obvodu (obr. 28). Na Nyquistově grafech (obr. 31) je vidět, že také dochází ke snížení impedance, nicméně vlivem nižší koncentrace paraquatu dochází k tomuto snížení pomaleji (až po 30 minutách) než u předchozího měření (15 minut). Snížování impedance tedy souvisí s koncentrací paraquatu a s jeho "zabudováváním" do lipidové vrstvy. Nicméně při dalších měřeních se už záznam dále nemění a můžeme tedy říct, že se ustavila rovnováha, vrstva pokrývá celý povrch elektrody a je stabilní po dobu 24 hodin nezávisle na koncentraci paraquatu v roztoku. Paraquat tedy nenarušuje fosfolipidovou membránu.



Obr. 30: Cyklické voltamogramy  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  ferrokyanidu draselného zaznamenané na čisté GCE a na LMGCE po ponoření do roztoku paraquatu ( $0,4 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ ) v závislosti na čase; rychlost scanu  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , referentní elektroda Ag|AgCl|3M-KCl.

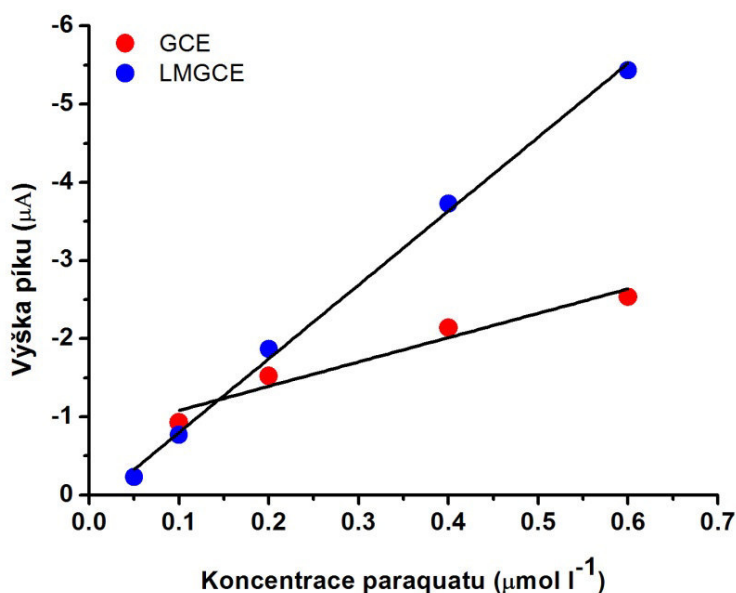


Obr. 31: Frekvenční charakteristika (Nyquistův graf) pro LMGCE v roztoku  $0,4 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  paraquatu v závislosti na čase; EIS měřeno v prostředí  $5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Fe(CN)}_6^{3-/4-}$  (1:1) obsahující  $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$ . Frekvenční rozsah 50 kHz až 0,1 Hz, potenciál 0,22 V.

## 5.6. STANOVENÍ PARAQUATU - ELEKTROCHEMICKÝ SENSOR

Fosfolipidová vrstva na povrchu uhlíkové elektrody zvyšuje selektivitu k lipofilním látkám a je schopná tyto látky zadržovat (akumulovat). Proto byla LMGCE použita jako elektrochemický sensor pro stanovení paraquatu ve vodě pomocí square wave voltametrie jako pokročilého nástroje pro získávání analytického signálu ze sensoru [249].

Vysoká citlivost SW metody byla kombinována s efektivní akumulací paraquatu do fosfolipidové vrstvy. Byl zvolen čas akumulace 10 minut (jak je uvedeno výše) pro citlivé a reprodukovatelné stanovení paraquatu. Kalibrační závislosti byly měřeny v koncentračním rozsahu od 0,05 do 0,60  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a byly srovnávány s hodnotami získanými na čisté GCE (obr. 32). Zatímco LMGCE je schopná detegovat paraquat v celém koncentračním rozsahu, snahy detegovat nemodifikovanou GCE nejnižší koncentraci (0,05  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) nebyly úspěšné. LMGCE vykazuje významně vyšší hodnoty směrnice kalibrační závislosti udávající třikrát vyšší citlivost ve srovnání s čistou GCE (hodnoty -9,45 a/nebo -3,11  $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ ). Navíc LMGCE vykazuje lepší linearitu kalibrační závislosti, což je zřejmé ve srovnání s nemodifikovanou GCE, kde jsou vidět vysloveně nelineární deformace v blízkosti meze detekce na čisté GCE (obr. 32).



Obr. 32: Kalibrační závislost paraquatu získaná na čisté a modifikované GCE.



Vysoká citlivost SWV v kombinaci s efektivní akumulací paraquatů do fosfolipidové vrstvy umožnila dosažení meze detekce  $2,2 \text{ nmol l}^{-1}$ , která byla získána z kalibrační závislosti. Tato hodnota je významně nižší ve srovnání s většinou běžných typů pevných elektrod a jejich modifikací [174-176,178-183] s výjimkou relativně drahé borem dopované diamantové elektrody (BDDE), na které byly dosaženy srovnatelné meze detekce v nanomolární úrovni, jako například  $1,5 \text{ nmol l}^{-1}$  [172] nebo  $70 \text{ nmol l}^{-1}$  [262], které byly publikovány.

Dále byla testována výtěžnost analytického procesu založeného na SW voltametrické s LMGCE v modelovém vzorku obsahujícím paraquat. Byly připraveny vzorky s koncentracemi paraquatů  $0,1$ ;  $0,2$  a  $0,4 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ , vložena modifikovaná elektroda a po akumulaci 10 minut byl zaznamenán SWV. V tabulce 7 jsou uvedené koncentrace nalezené v modelovém vzorku s hodnotami směrodatných odchylek a také výtěžnosti tohoto procesu. Uvedené hodnoty ukazují na vysokou efektivnost analytického procesu s výtěžností 88 - 92 %.

Tabulka 7: Koncentrace paraquatů nalezené ve vzorcích deionizované vody s jejich směrodatnými odchylkami, respektive výtěžnostmi.

Vzorky deionizované vody		
Přidané množství ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	Nalezené množství ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	Výtěžnost (%)
0,1	$0,08 \pm 0,01$	88
0,2	$0,18 \pm 0,04$	91
0,4	$0,37 \pm 0,11$	92

Celý analytický proces byl testován také na reálném vzorku říční vody, který byl odebrán z řeky Moravy. Řeka protéká otevřenou krajinou, která je ve velké míře využívána pro zemědělskou a průmyslovou produkci. Vzorek byl nejdříve zfiltrován přes filtr Whatman (velikost pórů  $1 \text{ } \mu\text{m}$ ), po přidavku paraquatů na výslednou koncentraci  $0,1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  byl homogenizován a analyzován pomocí SWV s LMGCE. Nalezená koncentrace v tomto vzorku byla  $0,071 \pm 0,010 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ . Významně nižší výtěžnost (71 % v porovnání s 88 % ve vzorku deionizované vody) může být z velké části připsána adsorpci paraquatů na pevných či

koloidních částicích v reálném vzorku, což má nepříznivý vliv na výsledky bez ohledu na použitou analytickou metodu. DPV na visící rtuťové kapkové elektrodě a HPLC s UV detekcí byly vybrány jako referenční metody pro stanovení paraquatu ve vzorku vody. Zatímco DPV poskytuje výsledky  $0,061 \pm 0,008 \mu\text{mol l}^{-1}$  bez použití prekoncentrace, pro analýzu pomocí HPLC bylo nutné vzorek vody nejdříve stokrát zakoncentrovat pomocí lyofilizace. Koncentrace paraquatu nalezená ve vzorku vody po lyofilizaci pomocí HPLC byla  $0,050 \pm 0,010 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Výsledky všech tří metod mohou být považovány za vzájemně srovnatelné v rámci experimentální chyby. Nicméně, SWV s LMGCE poskytla nejlepší střední hodnotu ze všech výtěžností v reálném vzorku vody. Tato skutečnost ukazuje na znatelnou spolehlivost vyvinuté metody a otevírá cestu k mnoha dalším analytických aplikacím.

## 6. ZÁVĚR

---

Předložená disertační práce je věnována studiu agregačních vlastností přírodní fosfolipidové směsi ze sojových bobů (*Asolectinu*), především na pevném povrchu. Tento výzkum navazuje na předchozí studium vlastností *asolectinu* ve vodném prostředí a na jeho použití při vývoji nové metody přípravy liposomů bez použití organických rozpouštědel [65,245].

Nejdříve byl *asolectin* použit jako modifikátor uhlíkové pastové elektrody a takto připravená elektroda byla použita pro stanovení pesticidu paraquat u ve vodě. Bylo zjištěno, že modifikovaná elektroda je citlivější při stanovení tohoto pesticidu. Tato vlastnost *asolectinu* byla dále využita pro modifikaci elektrody ze skelného uhlíku s cílem připravit na elektrodě vrstvu s vlastnostmi biomimetické membrány.

Vlastnosti *asolectinové* membrány byly studovány pomocí cyklické voltametrie a elektrochemické impedanční spektroskopie a bylo zjištěno, že navrženou metodou pokrývání vzniká na povrchu elektrody kompaktní fosfolipidová vrstva, která pokrývá celý povrch elektrody. Tloušťka vrstvy byla určena mikroskopií atomárních sil a činí  $7,1 \pm 1,2$  nm, což odpovídá tloušťce fosfolipidové dvojvrstvy v buněčných membránách. Dalšími experimenty bylo zjištěno, že připravená vrstva je stabilní nejméně 24 hodin a nedochází k jejímu narušování ani vlivem paraquat. Byla rovněž vyvinuta metoda pro odstranění lipidové vrstvy a obnovení čistého povrchu elektrody. Účinnost mechanického čištění v kombinaci s chemickým čištěním působením hexanu, methanolu a vody v ultrazvukové lázni byla kontrolována rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií.

Modifikovaná elektroda byla využita pro studium interakcí lipidové membrány s různými typy látek (ferokyanidové ionty, měďnaté ionty, paraquat). Lipidová membrána vykazuje selektivní propustnost pro lipofilní látky a umožňuje akumulaci paraquat a produktů jeho elektrochemické přeměny. Těchto vlastností bylo využito pro vytvoření elektrochemického sensoru, který s využitím square wave voltametrie umožnil stanovení paraquat s detekčním limitem  $2,2 \text{ nmol l}^{-1}$ . Vyvinutý sensor byl využit pro stanovení paraquat ve vzorku říční vody. Square wave voltametrie s nově vyvinutým senzorem, diferenčně pulzní voltametrie s visící rtuťovou kapkovou elektrodou a vysokoúčinná kapalinová chromatografie poskytly výtěžnosti 71, 61 a 50 %.

## 7. LITERATURA

---

1. Velíšek J., Hajšlová J., *Chemie potravin*, 3. vydání, OSSIS, Havlíčkův Brod, 2009.
2. Vodrážka Z.: *Biochemie*. Akademia, Praha 2007.
3. Šípal Z., Anzenbacher P., Peč P., Pospíšil J., Růžičky I., *Biochemie*, Státní pedagogické nakladatelství, Praha (1992).
4. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W., *Harperova biochemie*, 23. vydání, Nakladatelství H+H, Jinočany, 2002.
5. Voet D., Voet J. G.: *Biochemie*, pp. 296 – 340, Victoria Publishing, Praha 1995.
6. Holmberg K., Jönsson B., Kronberg B., Lindman B.: *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. John Wiley & Sons, Chichester 2003.
7. Sessa G., Weissman G., Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes, *J. Lipid Res.* 9 (1968) 310-318.
8. Torchilin V. P., Weissig V. (Eds): *Liposomes: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York 2003.
9. Lasic D. D., Barenholz Y. (Eds.): *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes*. CRC Press, Boca Raton 1996.
10. Guidelli R., *Bioelectrochemistry of biomembranes and biomimetic membranes*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2017.
11. Gunstone F.D., *Phospholipid technology and applications*, Woodhead Publishing Limited, UK, 2008.
12. Meer van G., Cellular lipidomics, *EMBO J.* 24 (2005) 3159-3165.
13. Seddon A. M., Casey D., Law R. V., Gee A., Templer R. H., Ces O., Drug interactions with lipid membranes, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 2509-2519.
14. Meer van G., Voelker D. R., Feigenson G. W., Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat. Rev. Mol. Cel Biol.* 9 (2008) 112-124.
15. Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie buňky*, Espero Publishing, Ústí nad Labem, 2005.
16. Rebaud S., Maniti O., Girard-Egrot A. P., Tethered bilayer lipid membranes (tBLMs): Interest and applications for biological membrane investigations, *Biochimie* 107 (2014) 135-142.

17. Köper I., Insulating tethered bilayer lipid membranes to study membrane proteins, *Mol. BioSyst.* 3 (2007) 651-657.
18. Winterhalter M., Black lipid membranes, *Curr. Opin. Colloid In.* 5 (2000) 250-255.
19. Mueller P., Rudin D. O., Tien H. T., Wescott W. C., Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system, *Nature* 194 (1962) 979-980.
20. Montal M., Mueller P., Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69 (1972) 3561-3566.
21. Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C., Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution, *J. Phys. Chem.* 67 (1963) 534-535.
22. Braun C. J., Baer T., Moroni A., Thiel G., Pseudo painting/air bubble technique for planar lipid bilayers, *J. Neurosci. Meth.* 233 (2014) 13-17.
23. Bamberg E., Alpes H., Apell H. J., Bradley R., Harter B., Quelle M. J., Urry D. W., Formation of ionic channels in black lipid membranes by succinic derivatives of Gramicidin A, *J. Membrane Biol.* 50 (1979) 257-270.
24. Gómez-Lagunas F., Pena A., Liévano A., Darszon A., Incorporation of ionic channels from yeast plasma membranes into black lipid membranes, *Biophys. J.* 56 (1989) 115-119.
25. Bezrukov S. M., Vodyanoy I., Probing alamethicin channels with water-soluble polymers. Effect on conductance of channel states, *Biophys. J.* 64 (1993) 16-25.
26. Tamm L. K., McConnell H. M., Supported phospholipid bilayers, *Biophys. J.* 47 (1985) 105-113.
27. Sackmann E., Supported membranes: scientific and practical applications, *Science* 271 (1996) 43-48.
28. Cremer P. S., Boxer S. G., Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 2554-2559.
29. Egawa H., Furusawa K., Liposome adhesion on mica studied by atomic force microscopy, *Langmuir* 15 (1999) 1660-1666.
30. Ma Z., Janmey P. A., Sharp K. A., Finkel T. H., Improved method of preparation supported planar lipid bilayers as artificial membranes for antigen presentation, *Microsc. res. techniq* 74 (2011) 1174-1185.

31. Brian A. A., McConnell H. M., Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6159-6163.
32. Hamai C., Yang T., Kataoka S., Cremer P. S., Musser S. M., Effect of average phospholipid curvature on supported bilayer formation on glass by vesicle fusion, *Biophys. J.* 90 (2006) 1241-1248.
33. Kalb E., Frey S., Tamm L. K., Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1103 (1992) 307-316.
34. Crane J. M., Kiessling V., Tamm L. K., Measuring lipid asymmetry in planar supported bilayers by fluorescence interference contrast microscopy, *Langmuir* 21 (2005) 1377-1388.
35. Doménech O., Morros A., Cabanas M. E., Montero M. T., Hernández-Borrell J., Supported planar bilayers from hexagonal phases, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 100-106.
36. Berquand A., Mingeot-Leclercq M.-P., Dufrene Y. F., Real-time imaging of drug-membrane interactions by atomic force microscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1664 (2004) 198-205.
37. Leonenko Z., Finot E., Cramb D., AFM study of interaction forces in supported planar DPPC bilayer in the presence of general anesthetic halothane, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 487-492.
38. Mueller H., Butt H.-J., Bamberg E., Adsorption of membrane-associated proteins to lipid bilayers studied with an atomic force microscopy: Myelin basic protein and cytochrome c, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 4552-4559.
39. Plant A. L., Self-assembled phospholipid/alkanethiol biomimetic bilayers on gold, *Langmuir* 9 (1993) 2764-2767.
40. Guidelli R., Becucci L., Dolfi A., Moncelli M. R., Buoninsegni F. T., Some bioelectrochemical applications of self-assembled films on mercury, *Solid State Ionics* 150 (2002) 13-26.
41. Silin V. I., Wieder H., Woodward J. T., Valincius G., Offenhausser A., Plant A. L., The role of surface free energy on the formation of hybrid bilayer membranes, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 14676-14683.

42. Plant A. L., Brigham-Burke M., Petrella E. C., O'Shannessy D. J., Phospholipid/alkanethiol bilayers for cell-surface receptor studies by surface plasmon resonance, *Anal. Biochem.* 226 (1995) 342-348.
43. McCabe I.P., Forstner M.B., Polymer supported lipid bilayers, *Open Journal of Biophysics* 3 (2013) 59-69.
44. Tang Y., Wang Z., Xiao J., Yang S., Wang Y. J., Tong P., Studies of phospholipid vesicle deposition/transformation on a polymer surface by dissipative quartz crystal microbalance and atomic force microscopy, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 14925-14933.
45. Reimhult E., Kumar K., Membrane biosensor platforms using nano- and microporous supports, *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 82-89.
46. Naumann R., Schmidt E. K., Jonczyk A., Fendler K., Kadenbach B., Liebermann T., Offenhäusser A., Knoll W., The peptide-tethered lipid membrane as a biomimetic system to incorporate cytochrome c oxidase in a functionally active form, *Biosens.Bioelectron.* 14 (1999) 651-662.
47. Tien H. T., Salamon Z., Formation of self-assembled lipid bilayers on solid substrates, *Bioelectroch. Bioener.* 22 (1989) 211-218.
48. Tien H. T., Ottova A. L., Supported planar lipid bilayers (s-BLMs) as electrochemical biosensors, *Electrochim. Acta* 43 (1998) 3587-3610.
49. Siontorou Ch. G., Nikolelis D. P., Miernik A., Krull U. J., Rapid methods for detection of Aflatoxin M-1 based on electrochemical transduction by self-assembled metal-supported bilayer lipid membranes (s-BLM) and on interferences with transduction of DNA hybridization, *Electrochim. Acta* 43 (1998) 3611-3617.
50. Cannes C., Kanoufi F., Bard A., Cyclic voltammetry and scanning electrochemical microscopy of ferrocenemethanol at monolayer and bilayer-modified gold electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 547 (2003) 83-91.
51. Nelson A., Electrochemistry of mercury supported phospholipid monolayers and bilayers, *Curr. Opin. Colloid In.* 15 (2010) 455-466.
52. Garcia O. J., Quintela P. A., Kaifer A. E., Electrodes modified with a film of phosphatidylcholine - electrochemistry inside a lipid layer, *Anal. Chem.* 61 (1989) 979-981.

53. Nikolelis D. P., Hianik T., Nikoleli G.-P., Stabilized lipid films in electrochemical biosensors, *Electroanal.* 22 (2010) 2747-2763.
54. Asaka K., Tien H. T., Ottova A., Voltammetric study of charge transfer across supported bilayer lipid membranes (s-BLMs), *J. Biochem. Biophys. Methods* 40 (1999) 27-37.
55. Wiedmer S. K., Hautala J., Holopainen J. M., Kinnunen P. K. J., Riekkola M.-L., Study on liposomes by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 22 (2001) 1305-1313.
56. Rongen H. A. H., Bult A., van Bennekom W. P., Liposomes and immunoassays, *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 105-133.
57. Gómez-Hens A., Fernández-Romero J. M., The role of liposomes in analytical processes, *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 24 (2005) 9-19.
58. Franzen U., Østergaard J., Physico-chemical characterization of liposomes and drug substance-liposome interactions in pharmaceuticals using capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A* 1267 (2012) 32-44.
59. Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 238.
60. Vemuri S., Rhodes C. T., Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review, *Pharm. Acta Helv.* 70 (1995) 95-111.
61. Hope M. J., Bally M. B., Mayer L. D., Janoff A. S., Cullis P. R., Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles, *Chem. Phys. Lipids* 40 (1986) 89-107.
62. Buboltz J. T., Feigenson G. W., A novel strategy for the preparation of liposomes: rapid solvent exchange, *Biochim. Biophys. Acta* 1417 (1999) 232-245.
63. Enoch H. G., Strittmatter P., Formation and properties of 100-Å-diameter, single-bilayer phospholipid vesicles, *P.Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 145-149.
64. Ohsawa T., Miura H., Harada K., Improvement of encapsulation efficiency of water-soluble drugs in liposomes formed by the freeze-thawing method, *Chem. Pharm. Bull.* 33 (1985) 3945-3952.
65. Megová M., Müller L., Barták P., Spontaneous revesiculation - new method for the preparation of liposomes, *Chemica* 47 (2007) 1-7.
66. Lasic D. D., Novel applications of liposomes, *Trends Biotechnol.* 16 (1998) 307-321.



67. Strauss G., Liposomes: From theoretical model to cosmetic tool, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 40 (1989) 51-60.
68. Keller B. C., Liposomes in nutrition, *Trends Food Sci. Tech.* 12 (2001) 25-31.
69. Desormeaux A., Bergeron M. G., Liposomes as drug delivery system: a strategic approach for the treatment of HIV infection, *J. Drug Target.* 6 (1998) 1-15.
70. Thurmond R. L., Dodd S. W., Brown M. F., Molecular areas of phospholipids as determined by <sup>2</sup>H NMR spectroscopy, *Biophys. J.* 59 (1991) 108-113.
71. Monck M. A., Bloom M., Lafleur M., Lewis R. N. A. H., McElhaney R. N., Cullis P. R., Influence of lipid composition on the orientational order in *Acholeplasma laidlawii* strain B membranes: A deuterium NMR study, *Biochemistry* 31 (1992) 10037-10043.
72. Nezil F. A., Bloom M., Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic peptides upon bilayer thickness in model membranes, *Biophys. J.* 61 (1992) 1176-1183.
73. Thurmond R. L., Niemi A. R., Lindblom G., Wieslander Å, Rilfors L., Membrane thickness and molecular ordering in *acholeplasma-laidlawii* strain-A studied by H-2 NMR-spectroscopy, *Biochemistry* 33 (1994) 13178-13188.
74. Matsuzaki K., Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1376 (1998) 391-400.
75. Lewis B. A., Engelman D. M., Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles, *J. Mol. Biol.* 166 (1983) 211-217.
76. Mitra K., Ubarretxena-Belandia I., Taguchi T., Warren G., Engelman D. M., Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol, *PNAS* 101 (2004) 4083-4088.
77. Chiang K.-L., Krull U. J., Nikolelis D. P., Ellipsometric determination of the structure of surface-stabilized bilayer lipid membranes on silver metal, *Anal. Chim Acta* 357 (1997) 73-77.
78. Spangenberg T., De Mello N. F., Creczynski-Pasa T. B., Pasa A. A., Niehus H., AFM in-situ characterization of supported phospholipid layers formed by solution spreading, *Phys. Stat. Sol.* 201 (2004) 857-860.
79. Doménech O., Merino-Montero S., Montero M. T., Hernández-Borrell J., Surface planar bilayers of phospholipids used in protein membrane reconstitution: An atomic force microscopy study, *Colloid. Surface B* 47 (2006) 102-106.

80. Garcia-Manyes S., Oncis G., Sanz F., Effect of pH and ionic strength on phospholipid nanomechanics and on deposition process onto hydrophilic surfaces measured by AFM, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 5029-5036.
81. Nussio M. R., Voelcker N. H., Sykes M. J., McInnes S.J.P., Gibson Ch.T., Lowe R.D., Miners J. O., Shapter J. G., Lateral heterogeneities in supported bilayers from pure and mixed phosphatidylethanolamine demonstrating hydrogen bonding capacity, *Biointerphases* 3 (2008) 96-104.
82. Nussio M. R., Voelcker N. H., Miners J. O., Lewis B. C., Sykes M. J., Shapter J. G., AFM study of the interaction of cytochrome P450 2C9 with phospholipid bilayers, *Chem. Phys. Lipids* 163 (2010) 182-189.
83. Wu H. L., Yu L., Tong Y., Ge A., Yau S., Osawa M., Ye S., Enzyme-catalyzed hydrolysis of the supported phospholipid bilayers studied by atomic force microscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 642-651.
84. Weronki K. J., Diez-Pérez I., Busquets M. A., López-Iglesias C., Girona V., Prat J., Interaction of lipidated GBV-C/HGV NS3 (513-522) and (505-514) peptides with phospholipids monolayer. An AFM study, *Colloid Surface B* 75 (2010) 25-33.
85. Evans K. O., Supported phospholipid bilayer interaction with components found in typical room-temperature ionic liquids - a QCM-D and AFM study, *Int. J. Mol. Sci.* 9 (2008) 498-511.
86. Gu L., Wang L., Xun J., Ottova-Leitmannova A., Tien H. T., A new method for the determination of electrical properties of supported bilayer lipid membranes by cyclic voltammetry, *Bioelectroch. Bioener.* 39 (1996) 275-283.
87. Naumowicz M., Petelska A. D., Figaszewski Z. A., Impedance analysis of phosphatidylcholine-cholesterol system in bilayer lipid membranes, *Electrochim. Acta* 50 (2005) 2155-2161.
88. Liu X., Huang W., Wang E., An electrochemical study on the interaction of surfactin with a supported bilayer lipid membrane on a glassy carbon electrode, *J. Electroanal. Chem.* 577 (2005) 349-354.
89. Huang W., Zhang Z., Han X., Wang J., Tang J., Dong S., Wang E., Concentration-dependent behavior of nisin interaction with supported bilayer lipid membrane, *Biophys. Chem.* 99 (2002) 271-279.

90. Du L., Liu X., Huang W., Wang E., A study on the interaction between ibuprofen and bilayer lipid membrane, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 5754-5760.
91. Huang W., Zhang Z., Han X., Tang J., Wang J., Dong S., Wang E., Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy, *Biophys. J.* 83 (2002) 3245-3255.
92. Caddeo C., Manconi M., Cardia M. C., Díez-Sales O., Fadda A. M., Sinico C., Investigating the interactions of resveratrol with phospholipid vesicle bilayer and the skin: NMR studies and confocal imaging, *Int. J. Pharm.* 484 (2015) 138-145.
93. Lu X., Liao T., Ding L., Liu X., Zhang Y., Cheng Y., Du J., Interaction of quercetin with supported bilayer lipid membranes on glassy carbon electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.* 3 (2008) 797-805.
94. Criado M., Vaz W. L. C., Barrantes F. J., Jovin T. M., Translational diffusion of acetylcholine receptor (monomeric and dimeric forms) of *Torpedo marmorata* reconstituted into phospholipid bilayers studied by fluorescence recovery after photobleaching, *Biochemistry* 21 (1982) 5750-5755.
95. Wu E.-S., Jacobson K., Papahadjopoulos D., Lateral diffusion in phospholipid multibilayers measured by fluorescence recovery after photobleaching, *Biochemistry* 16 (1977) 3936-3941.
96. Grossutti M., Seenath R., Noël J. A., Lipkowski J., Infrared and fluorescence spectroscopic studies of a phospholipid bilayer supported by a soft cationic hydrogel scaffold, *J. Colloid Interf. Sci.* 473 (2016) 162-171.
97. Hess S. T., Huang S., Heikal A., Webb W. W., Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review, *Biochemistry* 41 (2002) 697-705.
98. Heyn S.-P., Egger M., Gaub H. E., Lipid and lipid-protein monolayers spread from a vesicle suspension: a microfluorescence film balance study, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 5073-5078.
99. Györvary E., Albers W. M., Peltonen J., Miscibility in binary monolayers of phospholipids and linker lipid, *Langmuir* 15 (1999) 2516-2524.
100. Baltés H., Schwendler M., Helm C. A., Möhwald H., Tail and head group interactions in phospholipid monolayers, *J. Colloid Interf. Sci.* 178 (1996) 135-143.

101. Möhwald H., Direct characterization of monolayers at the air-water interface, *Thin solid films* 159 (1988) 1-15.
102. Koenig B. W., Krueger S., Orts W. J., Majkrzak C. F., Berk N. F., Silverton J. V., Gawrisch K., Neutron reflectivity and atomic force microscopy studies of a lipid bilayer in water adsorbed to the surface of a silicon single crystal, *Langmuir* 12 (1996) 1343-1350.
103. Florin E.-L., Gaub H. E., Painted supported lipid membranes, *Biophys. J.* 64 (1993) 375-383.
104. Meuse C. W., Krueger S., Majkrzak Ch. F., Dura J. A., Fu J., Connor J. T., Plant A. L., Hybrid bilayer membranes in air and water: infrared spectroscopy and neutron reflectivity studies, *Biophys. J.* 74 (1998) 1388-1398.
105. Dufrene Y. F., Lee G. U., Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1509 (2000) 14-41.
106. Linton R., Guarisco V., Lee J. J., Hagenhoff B., Benninghoven A., Analytical surface spectroscopy of phospholipid Langmuir-Blodgett films, *Thin Solid Films* 210 (1992) 565-570.
107. Khodari M., Kauffmann J. M., Patriarche G. J., Ghandour M. A., Preconcentration and determination of promethazine at lipid-modified carbon paste electrode, *Electroanal.* 1 (1989) 501-505.
108. Kauffmann J. M., Chastel O., Quarin G., Patriarche G. J., Electrochemical behaviour of drugs at lipid modified carbon paste electrode, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 23 (1990) 167-175.
109. Kauffmann J. M., Patriarche G. J., Voltammetric determination of celiptium with carbon paste and lipid-modified carbon paste electrode, *Anal. Chim. Acta* 236 (1990) 299-305.
110. Chastel O., Kauffmann J. M., Patriarche G. J., Christian G. R., Electrochemical-behavior of marcellomycin at lipid-modified carbon-paste electrodes, *Talanta* 37 (1990) 213-217.
111. Khodari M., Voltammetric determination of the antidepressant trimipramine at a lipid-modified carbon-paste electrode, *Electroanal.* 5 (1993) 521-523.

112. El-Maali N. A., Hassan F. M., Electrooxidation and determination of the anti-inflammatory drugs piroxicam and tenoxicam at the carbon paste electrode, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 24 (1990) 155-163.
113. Reháč M., Šnejdárková M., Otto M., Application of biotin-streptavidin technology in developing a xanthine biosensor based on a self-assembled phospholipid membrane, *Biosens. Bioelectron.* 9 (1994) 337-341.
114. Šnejdárková M., Reháč M., Otto M., Design of a glucose minisensor based on streptavidin glucose-oxidase complex coupling with self-assembled biotinylated phospholipid membrane on solid support, *Anal. Chem.* 65 (1993) 665-668.
115. Fritzen-Garcia M. B., Zoldan V. C., Oliveira I. R. W. Z., Soldi V., Pasa A. A., Creczynski-Pasa T. B., Peroxidase immobilized on phospholipid bilayers supported on Au (111) by DTT self-assembled monolayers: application to dopamine determination, *Biotechnol. Bioeng.* 110 (2013) 374-382.
116. Nikolelis D. P., Mitrokotsa M., Stabilized lipid film based biosensor for atenolol, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 565-572.
117. Nikoleli G.-P., Nikolelis D. P., Mathenitis C., Construction of a simple optical sensor based on air stable lipid film with incorporated urease for the rapid detection of urea in milk, *Anal. Chim. Acta* 675 (2010) 58-63.
118. Siontorou C. G., Nikolelis D. P., Krull U. J., A carbon dioxide biosensor based on hemoglobin incorporated in metal supported bilayer lipid membranes (BLMs): Investigations for enhancement of response characteristics by using platelet-activating factor, *Electroanal.* 9 (1997) 1043-1048.
119. Siontorou C. G., Nikolelis D. P., Cyanide ion minisensor based on methemoglobin incorporated in metal supported self-assembled bilayer lipid membranes and modified with platelet-activating factor, *Anal. Chim. Acta* 355 (1997) 227-234.
120. Siontorou C. G., Andreou V. G., Nikolelis D. P., Krull U. J., Flow injection monitoring of aflatoxin M1 in cheese using filter-supported bilayer lipid membranes with incorporated DNA, *Electroanal.* 12 (2000) 747-751.
121. Siontorou C. G., Brett A.-M. O., Nikolelis D. P., Evaluation of a glassy carbon electrode modified by a layer membrane with incorporated DNA, *Talanta* 43 (1996) 1137-1144.

122. Tong Y., Han X., Song Y., Jiang J., Wang E., Characterization and property of DNA incorporated bilayer lipid membranes, *Biophys. Chem.* 105 (2003) 1-9.
123. Chastel O., Kauffmann J.-M., Patriarche G. J., Christian G. D., Hydrophobic stripping voltammetry using a lipid-modified glassy carbon electrode, *Anal. Chem.* 61 (1989) 170-173.
124. Watts M: Paraquat, Pesticide action network Asia and the Pacific, 2011.
125. Grube A., Donaldson D., Kiely T., Wu L.: Pesticides Industry Sales and Usage, U. S. EPA, Washington (2011).
126. Fernandez M., Ibáñez M., Picó Y., Manes J., Spatial and temporal trends of paraquat, diquat and difenzoquat contamination in water from marsh areas of the Valencian community (Spain), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35 (1998) 377-384.
127. Roberts T.R. (Eds.): *Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part 1: Herbicides and Plant Growth Regulators*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, pp. 163.
128. Court of first instance in Case T-229/04 Sweden 2007.
129. Sorolla II M. G., Dalida M. L., Khemthong P., Grisdanurak N., Photocatalytic degradation of paraquat using nano-sized Cu-TiO<sub>2</sub>/SBA-15 under UV and visible light, *J. Environ. Sci.* 24 (2012) 1125-1132.
130. El Mhammedi M.A., Bakasse M., Chtaini A., Electrochemical studies and square wave voltammetry of paraquat at natural phosphate modified carbon paste electrode, *J. Hazard. Mater.* 145 (2007) 1-7.
131. Tomlin C.: *The Pesticide Manual: Incorporating the Agrochemicals Handbook*. 10th ed., Cambridge: Farnham Surrey, UK: British Crop Protection Council (1994).
132. Bacigalupo M. A., Meroni G., Mirasoli M., Parisi D., Longhi R., Ultrasensitive quantitative determination of paraquat: Application to river, ground and drinking water analysis in an agricultural area, *J. Agr. Food Chem.* 53 (2005) 216-219.
133. Yao F., Liu H., Wang G., Du L., Yin X., Fu Y., Determination of paraquat in water samples using a sensitive fluorescent probe titration method, *J. Environ. Sci.* 25 (2013) 1245-1251.
134. US EPA, Risks of paraquat use to federally threatened California red-legged frog (*Rana aurora draytonii*), Pesticide effects determination, Environmental fate and effects division, Office of pesticide programs, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C. (2009).

- <http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=P10063I0.txt>
135. Halfon E., Galassi S., Brüggemann R., Provini A., Selection of priority properties to assess environmental hazard of pesticides, *Chemosphere*, 33 (1996) 1543-1562.
  136. Eisler R., Paraquat hazards to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review, Biological report 85 (1.22) in Contaminant hazard reviews, report 22, U.S. Fish and wildlife service patuxent wildlife research center, Laurel, Maryland (1990).
  137. Review report for the active substance paraquat, SANCO/10382/2002-final, Health & Consumer Protection Directorate-General, European Commission, Brussels (2003).  
<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1669>
  138. El Harmoudi H., Achak M., Farahi A., Lahrich S., El Gaini L., Abdennouri M., Bouzidi A., Bakasse M., El Mhammedi M. A., Sensitive determination of paraquat by square wave anodic stripping voltammetry with chitin modified carbon paste electrode, *Talanta* 115 (2013) 172-177.
  139. Dinis-Oliveira R. J., Remiao F., Carmo H., Duarte J. A., Navarro A. S., Bastos M. L., Carvalho F., Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease, *Neurotoxicology*, 27 (2006) 1110-1122.
  140. IPCS International Programm on Chemical Safety, INCHEM: Environmental Health Criteria 39, Paraquat and Diquat.  
<<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc39.htm#SubSectionNumber:3.1.1>>.
  141. Neumeister L. & Isenring R.: Paraquat. Unacceptable health risks for users. 3rd Edition. Berne Declaration, Pesticide Action Network UK, PAN Asia and the Pacific (2011).
  142. Roberts J.R., Reigart J.R.: Recognition and Management of Pesticide Poisonings. 6th Edition. U.S. Environmental Protection Agency, Washington (2013).  
<http://www2.epa.gov/pesticide-worker-safety>
  143. Yang C.-J., Lin J.-L., Lin-Tan D.-T., Weng C.-H., Hsu C.-W., Lee S.-Y., Lee S.-H., Chang C.-M., Lin W.-R., Yen T.-H., Spectrum of toxic hepatitis following intentional paraquat ingestion: analysis of 187 cases, *Liver Int.* 32 (2012) 1400-1406.
  144. Lee P.-C., Bordelon Y., Bronstein J., Ritz B., Traumatic brain injury, paraquat exposure, and their relationship to Parkinson disease, *Neurology* 79 (2012) 2061-2066.

145. Yadav S., Gupta S. P., Srivastava G., Srivastava P. K., Singh M. P., Role of secondary mediators in caffeine-mediated neuroprotection in maneb- and paraquat- induced Parkinson's disease phenotype in the mouse, *Neurochem. Res.* 37 (2012) 875-884.
146. Berry C., La Vecchia C., Nicotera P., Paraquat and Parkinson's disease, *Cell Death Differ.* 17 (2010) 1115-1125.
147. Moretto A., Colosio C., The role of pesticide exposure in the genesis of Parkinson's disease: epidemiological studies and experimental data, *Toxicology* 307 (2013) 24-34.
148. Freire C., Koifman S., Pesticide exposure and Parkinson's disease: epidemiological evidence of association, *Neurotoxicology* 33 (2012) 947-971.
149. Tanner C. M., Kamel F., Ross G. W., Hoppin J. A., Goldman S. M., Korell M., Marras C., Bhudhikanok G. S., Kasten M., Chade A. R., Comyns K., Richards M. B., Meng C., Priestley B., Fernandez H. H., Cambi F., Umbach D. M., Blair A., Sandler D. P., Langston J. W., Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease, *Environ. Health Perspec.* 119 (2011) 866-872.
150. Podder B., Kim Y.-S., Zerlin T., Song H.-Y., Antioxidant effect of silymarin on paraquat-induced human lung adenocarcinoma A549 cell line, *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 3206-3214.
151. Novaes R. D., Goncalves R. V., Santos Marques D. C., Cupertino M. D., Peluzio M. D. G., Leite J. P. V., Maldonado I. R. D. C., Effect of bark extract of *Bathysa cuspidata* on hepatic oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat, *Toxicol. Pathol.* 40 (2012) 62-70.
152. Commission TE (2011) Commission Regulation (EU) No 520/2011.520/2011.
153. Kambhampati I., Roinestad K. S., Hartman T. G., Rosen J. D., Fukuda E. K., Lippincott R. L., Rosen R. T., Determination of diquat and paraquat in water using high-performance liquid-chromatography with confirmation by liquid-chromatography particle-beam mass-spectrometry, *J. Chromatogr. A* 688 (1994) 67-73.
154. Rial-Otero R., Cancho-Grade B., Perez-Lamela C., Simal-Gándara J., Arias-Estévez M., Simultaneous determination of the herbicides diquat and paraquat in water, *J. Chromatogr. Sci.* 44 (2006) 539-542.
155. Hao C., Zhao X., Morse D., Yang P., Taguchi V., Morra F., Optimized liquid chromatography tandem mass spectrometry approach for the determination of diquat and paraquat herbicides, *J. Chromatogr. A* 1304 (2013) 169-176.



156. Hara S., Sasaki N., Takase D., Shiotsuka S., Ogata K., Futagami K., Tamura K., Rapid and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of paraquat and diquat in human serum, *Anal. Sci.* 23 (2007) 523-526.
157. Ito M., Hori Y., Fujisawa M., Oda A., Katsuyama S., Hirose Y., Yoshioka T., Rapid analysis method for paraquat and diquat in the serum using ion-pair high-performance liquid chromatography, *Biol. Pharm. Bull.* 28 (2005) 725-728.
158. Lee X.-P., Kumazawa T., Fujishiro M., Hasegawa C., Arinobu T., Seno H., Ishii A., Sato K., Determination of paraquat and diquat in human body fluids by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 1147-1152.
159. Whitehead R. D. Jr., Montesano M. A., Jayatilaka N. K., Buckley B., Winnik B., Needham L. L., Barr D. B., Method for measurement of the quaternary amine compounds paraquat and diquat in human urine using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 2548-2553.
160. Paixao P., Costa P., Bugalho T., Fidalgo C., Pereira L. M., Simple method for determination of paraquat in plasma and serum of human patients by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 775 (2002) 109-113.
161. Zhang W., Su Y., Shi J., Zhang M., Wu B., Chen S., Hu S., Rao Z., Zheng J., Reversed-phase high performance liquid chromatography method for the determination of paraquat in whole blood, *Anal. Methods* 6 (2014) 6560.
162. Corasaniti M. T., Nistico G., Determination of paraquat in rat brain by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 643 (1993) 419-425.
163. Jovanovic M. C., Djukic M., Vasiljevic I., Ninkovic M., Jovanovic M., Determination of paraquat by the IE-HPLC-UV method in the brain tissues of Wistar rats poisoned with paraquat, *J. Serb. Chem. Soc.* 72 (2007) 347-356.
164. Posecion N. C., Ostrea E. M., Bielawski D. M., Quantitative determination of paraquat in meconium by sodium borohydride-nickel chloride chemical reduction and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), *J. Chromatogr. B* 862 (2008) 93-99.
165. Gao L., Liu J., Yuan H., Deng X., Solid-phase microextraction combined with GC-MS for determination of diquat and paraquat residues in water, *Chromatographia* 78 (2015) 125-130.

166. De Almeida R. M., Yonamine M., Gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of the herbicides paraquat and diquat in plasma and urine samples, *J. Chromatogr. B* 853 (2007) 260-264.
167. Moreira P. N., De Pinho P. G., Baltazar M. T., Bastos M. L., Carvalho F., Dinis-Oliveira R. J., Quantification of paraquat in postmortem samples by gas chromatography-ion trap mass spectrometry and review of the literature, *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 338-349.
168. Moody G. J., Owusu R. K., Thomas J. D. R., Liquid membrane ion-selective electrodes for diquat and paraquat, *Analyst* 112 (1987) 121-127.
169. Moody G. J., Owusu R. K., Thomas J. D. R., Studies on crown ether based potentiometric sensors for 4,4'-dipyridinium and related dications, *Analyst* 113 (1988) 65-69.
170. Saad B., Tahir M., Ahmad M. N., Saleh M. I., Jab M. S., Paraquat sensors based on cyclotetrasiloxanes, *Anal. Chim. Acta* 285 (1994) 271-276.
171. Saad B., Ariffin M. M., Saleh M. I., Paraquat sensors containing membrane components of high lipophilicities, *Anal. Chim. Acta* 338 (1997) 89-96.
172. Tyszczyk-Rotko K., Beczkowska I., Nosal-Wiercinska A., Simple, selective and sensitive voltammetric method for the determination of herbicide (paraquat) using a bare boron-doped diamond electrode, *Diam. Relat. Mater.* 50 (2014) 86-90.
173. El Mhammedi M. A., Bakasse M., Chtaini A., Square-wave voltammetric determination of paraquat at carbon paste electrode modified with hydroxyapatite, *Electroanal.* 19 (2007) 1727-1733.
174. Dos Santos L. B. O., Infante C. M. C., Masini J. C., Development of a sequential injection-square wave voltammetry method for determination of paraquat in water samples employing the hanging mercury drop electrode, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 1897-1903.
175. Lopes I. C., Souza D. D., Machado S. A. S., Tanaka A. A., Voltammetric detection of paraquat pesticide on a phtalocynine-based pyrolitic graphite electrode, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1907-1914.
176. Garcia L. L. C., Figueiredo-Filho L. C. S., Oliveira G. G., Fatibello-Filho O., Banks C. E., Square-wave voltammetric determination of paraquat using a glassy carbon electrode modified with multiwalled carbon nanotubes within a

- dihexadecylhydrogenphosphate (DHP) film, *Sensor Actuat. B-Chem* 181 (2013) 306-311.
177. El Mhammedi M. A., Bakasse M., Bachirat R., Chtaini A., Square wave voltammetry for analytical determination of paraquat at carbon paste electrode modified with fluoroapatite, *Food Chem.* 110 (2008) 1001-1006.
  178. Walcarius A., Lamberts L., Square wave voltammetric determination of paraquat and diquat in aqueous solution, *J. Electroanal. Chem.* 406 (1996) 59-68.
  179. Da Silva O. B., Machado S. A. S., Evaluation of the detection and quantification limits in electroanalysis using two popular methods: application in the case study of paraquat determination, *Anal. Methods* 4 (2012) 2348.
  180. Ribeiro J. A., Carreira C. A., Lee H. J., Silva F., Martins A., Pereira C. M., Voltammetric determination of paraquat at DNA-gold nanoparticles composite electrodes, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 7892-7896.
  181. El Mhammedi M. A., Achak M., Bakasse M., Bachirat R., Chtaini A., Accumulation and trace measurement of paraquat at kaolin-modified carbon paste electrode, *Mat. Sci. Eng. C* 30 (2010) 833-838.
  182. De Figueiredo-Filho L. C. S., Dos Santos V. B., Janegitz B. C., Guerreiro T. B., Fatibello O., Faria R. C., Marcolino L. H., Differential pulse voltammetric determination of paraquat using a bismuth-film electrode, *Electroanal.* 22 (2010) 1260-1266.
  183. Lu T.-H., Sun I.-W., Electrocatalytic determination of paraquat using a nafion film coated glassy carbon electrode, *Talanta* 53 (2000) 443-451.
  184. Mallat E., Barzen C., Abuknesha R., Gauglitz G., Barceló D., Fast determination of paraquat residues in water by an optical immunosensor and validation using capillary electrophoresis-ultraviolet detection, *Anal. Chim. Acta* 427 (2001) 165-171.
  185. Núñez O., Moyano E., Galceran M. T., Solid-phase extraction and sample stacking-capillary electrophoresis for the determination of quaternary ammonium herbicides in drinking water, *J. Chromatogr. A* 946 (2002) 275-282.
  186. Wigfield Y. Y., McCormack K. A., Grant R., Simultaneous determination of residues of paraquat and diquat in potatoes using high-performance capillary electrophoresis with a ultraviolet detection, *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 2315-2318.

187. Lanaro R., Costa J. L., Cazenave S. O. S., Zanolli-Filho L. A., Tavares M. F. M., Chasin A. A. M., Determination of herbicides paraquat, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid in marijuana samples by capillary electrophoresis, *J. Forensic Sci.* 60 (2015) S241-S247.
188. Lu T., Birke R. L., Lombardi J. R., Surface Raman spectroscopy of the three redox forms of methylviologen, *Langmuir*, 2 (1986) 305-309.
189. Feng Q., Yue W., Cotton T. M., Surface-enhanced resonance Raman scattering from methylviologen at a silver electrode: evidence for two distinct adsorption interactions, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 2082-2091.
190. Rai M. K., Das J. V., Gupta V. K., A sensitive determination of paraquat by spectrophotometry, *Talanta* 45 (1997) 343-348.
191. Picó Y., Font G., Moltó J. C., Mañes J., Solid-phase extraction of quaternary ammonium herbicides, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 251-271.
192. Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., Tomás V., Fenoll J., Spectrofluorimetric determination of paraquat by manual and flow injection methods, *Analyst* 123 (1998) 1577-1581.
193. Janda E., Parafati M., Aprigliano S., Carresi C., Visalli V., Sacco I., Ventrice D., Mega T., Vadala N., Rinaldi S., Musolino V., Palma E., Gratteri S., Rotiroti D., Mollace V., The antidote effect of quinone oxidoreductase 2 inhibitor against paraquat-induced toxicity in vitro and in vivo, *British J. Pharmacol.* 168 (2013) 46-59.
194. Pui-ock S., Ruchirawat M., Gascoyne P., Dielectrophoretic field-flow fractionation system for detection of aquatic toxicants, *Anal. Chem.* 80 (2008) 7727-7734.
195. Spinks C. A., Wang B., Mills E. N. C., Morgan M. R. A., Development of an ELISA for paraquat: improvement of antibody characteristics by reversed affinity chromatography, *Analyst* 124 (1999) 847-850.
196. Abuknesha R. A., Luk C., Paraquat enzyme-immunoassay in biological samples: assessment of the effects of hapten-protein bridge structures on assay sensitivity, *Analyst* 130 (2005) 956-963.
197. Bowles M. R., Eyles D. W., Hampson E. C. G. M., Pond S. M., Quantitation of paraquat in biological samples by radioimmunoassay using a monoclonal antibody, *Fund. Appl. Toxicol.* 19 (1992) 375-379.

198. Park J. W., Ko S. H., Park J.-Y., Electrochemical studies of viologens in homogeneous aqueous and sodium dodecyl-sulfate micellar solutions, *Bull. Korean Chem. Soc.* 13 (1992) 259-265.
199. Heyrovský M., The electroreduction of methyl viologen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1987) 1856-1857.
200. Wu Z., Wang B., Cheng Z., Yang X., Dong S., Wang E., A facile approach to immobilize protein for biosensor: self-assembled supported bilayer lipid membranes on glassy carbon electrode, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 47-52.
201. Shirai O., Yoshida Y., Kihara S., Ohnuki T., Uehara A., Yamana H., Ion transport across a bilayer lipid membrane facilitated by gramicidin A - effect of counter anions on the cation transport, *J. Electroanal. Chem.* 595 (2006) 53-59.
202. Ding L., Wang E., Electrochemical studies of lipophilic ion transport through BLM. The influence of sterols on its transport, *Electroanal.* 8 (1996) 922-926.
203. Juhaniwicz J., Sek S., Atomic force microscopy and electrochemical studies of melittin action on lipid bilayers supported on gold electrodes, *Electrochim. Acta* 162 (2015) 53-61.
204. Barek J., Opekar F., Štulík K., *Elektroanalytická chemie*, Karolinum, Praha (2005), str. 112.
205. Lin X., Gong J., Electrocatalytic oxidation and selective detection of dopamine at a 5,5-ditetradecyl-2-(2-trimethyl-ammonioethyl)-1,3-dioxane bromide self-assembled bilayer membrane modified glassy carbon electrode, *Anal. Chim. Acta* 507 (2004) 255-261.
206. Ortuno J.A., Gil A., Serna C., Molina A., Voltammetry of some catamphilic drugs with solvent polymeric membrane ion sensors, *J. Electroanal. Chem.* 605 (2007) 157-161.
207. Mai N., Liu X., Wei W., Luo S., Liu W., Electrochemical determination of paraquat using a DNA-modified carbon ionic liquid electrode, *Microchim. Acta* 174 (2011) 89-95.
208. Tatarkovič M., Broncová G., Křond'ák M., Elektroimpedanční spektroskopie a její využití v chemické analýze, *Chem. Listy* 106 (2012) 1067-1074.

209. Naumowicz M., Petelska A. D., Figaszewski Z. A., Physicochemical analysis of phosphatidylcholine-ceramide system in bilayer lipid membranes, *Acta Biochim. Pol.* 55 (2008) 721-730.
210. Steinem C., Janshoff A., Ulrich W.-P., Sieber M., Galla H.-J., Impedance analysis of supported lipid bilayer membranes: a scrutiny of different preparation techniques, *Biochim. Biophys. Acta* 1279 (1996) 169-180.
211. Zlatanova J., Lindsay S. M., Leuba S. H., Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope, *Prog. Biophys. Mol. Bio.* 74 (2000) 37-61.
212. Zasadzinski J. A. N., Helm C. A., Longo M. L., Weisenhorn A. L., Gould S. A. C., Hansma P. K., Atomic force microscopy of hydrated phosphatidylethanolamine bilayers, *Biophys. J.* 59 (1991) 755-760.
213. Goksu E. I., Vanegas J. M., Blanchette C. D., Lin W.-Ch., Longo M. L., AFM for structure and dynamics of biomembranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 254-266.
214. Kalivoška V., Gál M., Lachmanová Š., Janda P., Sokolová R., Hromadová M., Nanoshaving of bovine serum albumin films adsorbed on monocrystalline surfaces and interfaces, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 76 (2011) 1075-1087.
215. Chiantia S., Ries J., Kahya N., Schwille P., Combined AFM and two-focus SFCS study of raft-exhibiting model membranes, *Chem. Phys. Chem.* 7 (2006) 2409-2418.
216. Dieluweit S., Csiszár A., Rubner W., Fleischhauer J., Houben S., Merkel R., Mechanical properties of bare and protein-coated giant unilamellar phospholipid vesicles. A comparative study of micropipet aspiration and atomic force microscopy, *Langmuir* 26 (2010) 11041-11049.
217. Grandbois M., Clausen-Schumann H., Gaub H., Atomic force microscope imaging of phospholipid bilayer degradation by phospholipase A2, *Biophys. J.* 74 (1998) 2398-2404.
218. Balashev K., Atanasov V., Mitewa M., Petrova S., Bjørnholm T., Kinetics of degradation of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayers as a result of vipoxin phospholipase A2 activity: an atomic force microscopy (AFM) approach, *Biochim. Biophys. Acta* 1808 (2011) 191-198.

219. Milhiet P.-E., Gubellini F., Berquand A., Dosset P., Rigaud J.-L., Le Grimmellec Ch., Lévy D., High-resolution AFM of membrane proteins directly incorporated at high density in planar lipid bilayer, *Biophys. J.* 91 (2006) 3268-3275.
220. Rinia H. A., Kik R. A., Demel R. A., Snel M. M. E., Killian J. A., van der Eerden J. P. J. M., de Kruijff B., Visualization of highly ordered striated domains induced by transmembrane peptides in supported phosphatidylcholine bilayers, *Biochemistry* 39 (2000) 5852-5858.
221. Mou J., Czajkowsky D. M., Shao Z., Gramicidin A aggregation in supported gel state phosphatidylcholine bilayers, *Biochemistry* 35 (1996) 3222-3226.
222. Pedersen T. B., Kaasgaard T., Jensen M. Ø., Frokjaer S., Mouritsen O. G., Jørgensen K., Phase behavior and nanoscale structure of phospholipid membranes incorporated with acylated C14-peptides, *Biophys. J.* 89 (2005) 2494-2503.
223. Steinem C., Galla H.-J., Janshoff A., Interaction of melittin with solid supported membranes, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2 (2000) 4580-4585.
224. Bensikaddour H., Fa N., Burton I., Deleu M., Lins L., Schanck A., Brasseur R., Dufrière Y. F., Goormaghtigh E., Mingeot-Leclercq M.-P., Characterization of the interactions between fluoroquinolone antibiotics and lipids: a multitechnique approach, *Biophys. J.* 94 (2008) 3035-3046.
225. Lorite G. S., Nobre T. M., Zaniquelli M. E. D., de Paula E., Cotta M. A., Dibucaine effects on structural and elastic properties of lipid bilayers, *Biophys. Chem.* 139 (2009) 75-83.
226. You H. X., Yu L., Qi X., Phospholipid membrane restructuring induced by saposin C: a topographic study using atomic force microscopy, *FEBS Letters* 503 (2001) 97-102.
227. Murray J., Cuccia L., Ianoul A., Cheetham J. J., Johnston L. J., Imaging the selective binding of synapsin to anionic membrane domains, *ChemBioChem* 5 (2004) 1489-1494.
228. El Kirat K., Morandat S., Dufrière Y. F., Nanoscale analysis of supported lipid bilayers using atomic force microscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1798 (2010) 750-765.
229. Čechal J., Šíkola T.: Metoda XPS v Laboratoři povrchů a tenkých vrstev ÚFI
230. Engstrom R. C., Strasser V. A., Characterization of electrochemically pretreated galssy-carbon electrodes, *Anal. Chem.* 56 (1984) 136-141.

231. Cabaniss G. E., Diamantis A. A., Murphy W. R., Linton R. W. Jr., Meyer T. J., Electrocatalysis of proton-coupled electron-transfer reactions at glassy-carbon electrodes, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 1845-1853.
232. Solletti J. M., Botreau M., Sommer F., Brunat W. L., Kasas S., Duc T. M., Celio M. R., Elaboration and characterization of phospholipid Langmuir-Blodgett films, *Langmuir* 12 (1996) 5379-5386.
233. Deleu M., Paquot M., Jacques P., Thonart P., Adriaensen Y., Dufrêne Y. F., Nanometer scale organization of mixed surfactin/phosphatidylcholine monolayers, *Biophys. J.* 77 (1999) 2304-2310.
234. Liu H., Faucher K. M., Sun X.-L., Feng J., Johnson T. L., Orban J. M., Apkarian R. P., Dluhy R. A., Chaikof E. L., A membrane-mimetic barrier for cell encapsulation, *Langmuir* 18 (2002) 1332-1339.
235. Turner D. C., Peek B. M., Wertz T. E., Archibald D. D., Geer R. E., Gaber B. P., Enzymatic modification of a chemisorbed lipid monolayer, *Langmuir* 12 (1996) 4411-4416.
236. Yoon S., Kazusaka A., Fujita S., FTIR spectroscopic and HPLC chromatographic studies of carbon tetrachloride induced acute hepatitis in rats: damage in liver phospholipid membrane, *Biopolymers* 57 (2000) 267-271.
237. Szachowicz-Petelska B., Dobrzyńska I., Skrzydlewska E., Figaszewski Z.A., Changes in phospholipid composition studied by HPLC and electric properties of liver cell membrane of ethanol-poisoned rats, *Toxicol. Mech. Method* 18 (2008) 525-530.
238. Niu W., Wu Y., Sui S.-F., Orientation of membrane-bound melittin studied by a combination of HPLC and liquid secondary ion mass spectrometry (LSIMS), *IUBMB Life* 50 (2000) 215-219.
239. Banó M.C., Braco L., Abad C., HPLC study on the 'history' dependence of gramicidin A conformation in phospholipid model membranes, *FEBS Letters* 250 (1989) 67-71.
240. Barbato F., Martino di G., Grumetto L., Rotonda La M.I., Prediction of drug-membrane interactions by IAM-HPLC: effects of different phospholipid stationary phases on the partition of bases, *Eur. J. Pharm. Sci.* 22 (2004) 261-269.
241. Stránský Z., Isotachophoresis of cationic herbicides in waters and soils, *J. Chromatogr.* 320 (1985) 219-231.



242. Zhang H., Zhang Z., Li J., Cai S., Effects of direct current bias voltages on supported bilayer lipid membranes on a glassy carbon electrode, *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 605-609.
243. Carneiro M.C., Puignou L., Galceran M.T., Comparison of silica and porous graphitic carbon as solid-phase extraction materials for the analysis of cationic herbicides in water by liquid chromatography and capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta* 408 (2000) 263-269.
244. Součková J., Studium liposomů fyzikálně-chemickými metodami, disertační práce, Olomouc (2011).
245. Součková J., Skopalová J., Švecová H., Barták P., Fused-silica capillary dropping mercury electrode for electrocapillary measurements, *Electroanal.* 25 (2013) 174-178.
246. Součková J., Plačková L., Skopalová J., Baizová P., Čáp L., Barták P., On GC/MS in phospholipid research I: Determination of fatty acid profile and phosphorus content, *Acta Univ. Palacki Olomouc, Fac. Rerum Natur. Chemica* 48 (2011) 1-7.
247. Součková J., Skopalová J., Švecová H., Čáp L., Bednář P., Barták P., On GC/MS in phospholipid research II: Investigation of liposome formation and liposome-water partitioning, *Acta Univ. Palacki Olomouc, Fac. Rerum Natur. Chemica* 48 (2011) 8-13.
248. Pyszková M., Využití uhlíkových pastových elektrod při voltametrické analýze pesticidů, diplomová práce, Olomouc (2013).
249. Tomková H., Sokolová R., Opletal T., Kučerová P., Kučera L., Součková J., Skopalová J., Barták P., Electrochemical sensor based on phospholipid modified glassy carbon electrode - determination of paraquat, článek v tisku.
250. Skogerboe R.K., Grant L.C., Comments OH the definitions of the terms sensitivity and detection limit, *Spectrosc. Lett.* 215 (1970) 215-220.
251. Kepley J.L., Bard A.J., Ellipsometric, electrochemical and elemental characterization of the surface phase produced on glassy carbon electrodes by electrochemical activation, *Anal. Chem.* 60 (1986) 1459-1467.
252. Zhao Q.-L., Bao L., Luo Q.-Y., Zhankg M., Lin Y., Pang D.-W., Zhang Z.-L., Surface manipulation for improving the sensitivity and selectivity of glassy carbon electrodes by electrochemical treatment, *Biosens. Bioelectrons.* 24 (2009) 3003-3007.

253. Proctor A., Sherwood P.M.A., X-ray photoelectron spectroscopic studies of carbon fibre surfaces - II: The effect of electrochemical treatment, *Carbon* 21 (1983) 53-59.
254. Riquelme M. A., Lucero M. A., Villagran M., Arevalo M. C., Hernandez-Creus A., Velez J. H., Aguirre M. J., Arce R., Ramirez G., Glassy carbon modified electrode: polymer and supramolecular assembly of Co(II)-[Tetra(O-aminophenyl)porphyrin] new material for electrocatalytic assays, *Int. J. Electrochem. Sci.* 7 (2012) 9738-9747.
255. Bulíčková J., Sokolová R., Adsorption of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine on Au (111) and HOPG, in: XXXIII. Modern Electrochemical Methods, Best servis Ústí n. L., 2013, pp 29-31.
256. Babai-Cline M., Wightman J. P., Surface analysis and peel strength of aged, oxygen-plasma-modified unplasticized poly(vinyl chloride) films, *Int. J. Adhesion and Adhesives* 15 (1995) 185-190.
257. Trnková L., Identification of current nature by elimination voltammetry with linear scan, *J. Electroanal. Chem.* 582 (2005) 258-266.
258. Švecová H., Součková J., Pyszková M., Svítková J., Labuda J., Skopalová J., Barták P., Phospholipid improve selectivity and sensitivity of carbon electrodes: Determination of pesticide Paraquat, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116 (2014) 1247-1255.
259. Grujicic D., Pesic B., Reaction and nucleation mechanisms of copper electrodeposition from ammoniacal solutions on vitreous carbon, *Electrochim. Acta* 50 (2005) 4426-4443.
260. García-Rodríguez D. E., Mendoza-Huizar L. H., Rios-Reyes C. H., Alatorre-Ordaz M. A., Copper electrodeposition on glassy carbon and highly oriented pyrolytic graphite substrates from perchlorate solutions, *Quim. Nova* 35 (2012) 699-704.
261. International Vocabulary of Metrology - Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM), 3rd Edn., 2008, version with minor corrections, JCGM 200:2012 (E/F), <<http://www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html>>.
262. Selva T.M.G., Araujo de W.R., Paixao da T.R.L.C., Non-invasive salivary electrochemical quantification of paraquat poisoning using boron doped diamond electrode, *Electroanal.* 27 (2015) 1642-1648.

## 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

---

AdSDPV	adsorpční rozpouštěcí diferenčně pulzní voltametrie
AFM	mikroskopie atomárních sil
BAM	Brewsterův mikroskop
BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda
BE	vazebná energie
BiFE	bismutová filmová elektroda
BLM	černá lipidová membrána
CMC	kritická micelární koncentrace
CPE	uhlíková pastová elektroda
CV	cyklická voltametrie
dFFF	dielektroforetická frakcionace tokem v poli
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPV	diferenčně pulzní voltametrie
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
ELISA	imunologická metoda sloužící k detekci protilátek
FAP-CPE	uhlíková pastová elektroda impregnovaná fluoroapatitem
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie
FRAP	obnovení opticky vybělené fluorescence
GC	plynová chromatografie
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
GUV	obří unilamelární liposomy
HAP-CPE	uhlíková pastová elektroda modifikovaná hydroxyapatitem
HBM	hybridní lipidové dvojvrstvy
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HRP	křenová peroxidasa
Chit-CPE	uhlíková pastová elektroda s chitinem
KCPE	uhlíková pastová elektroda s kaolínem
LC/MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí

LD <sub>50</sub>	smrtelná (letální) dávka
LMCPE	lipidy modifikovaná uhlíková pastová elektroda
LMGCE	lipidy modifikovaná elektroda ze skelného uhlíku
LOD	limit detekce
LUV	velké unilamelární liposomy
MLV	multilamelární liposomy
MVV	mnohováčekovité liposomy
MWCNT	mnohostěnné uhlíkové nanotrubky
NFGCE	elektroda ze skelného uhlíku pokrytá nafionem
NMR	nukleární magnetická rezonance
NP-CPE	uhlíková pastová elektroda modifikovaná přírodním fosfátem
OLV	velké oligolamelární liposomy
PA	fosfatidová kyselina
PC	fosfatidylcholin
PE	fosfatidylethanolamin
PI	fosfatidylinositol
PS	fosfatidylserin
RAIRS	reflection-absorption infračervená spektroskopie
RTG	rentgenové záření
SAM	samouspořádané monovrstvy
SD	směrodatná odchylka
SERS	povrchově zesílená Ramanova spektroskopie
SLB	lipidové dvojvrstvy na pevných nosičích
SMDE	statická rtuťová kapková elektroda
SPR	povrchová plasmová resonance
SSIMS	statická hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů
SUV	malé unilamelární liposomy
SWV	square wave voltametrie
tBLM	ukotvené lipidové membrány
UV	ultrafialové záření
XPS	rentgenová fotoelektronová spektroskopie
ZE	základní elektrolyt

## 9. PŘÍLOHY

---

Přílohy obsahují reprints publikovaných článků, rukopis článku zaslaného k publikaci a profesní životopis autorky.

- Příloha č. 1: **Švecová H.**, Součková J., Skopalová J., Novotný R., Barták P., Studium agregace fosfolipidových molekul, Chem. Listy 106 (2012) 200-205.
- Příloha č. 2: **Švecová H.**, Součková J., Pyszková M., Svítková J., Labuda J., Skopalová J., Barták P., Phospholipid improve selectivity and sensitivity of carbon electrodes: Determination of pesticide Paraquat, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 116 (2014) 1247-1255.
- Příloha č. 3: **Tomková H.**, Sokolová R., Opletal T., Kučerová P., Kučera L., Součková J., Skopalová J., Barták P., Electrochemical sensor based on phospholipid modified glassy carbon electrode - determination of paraquat, (2017) - odesláno k publikaci (rukopis)
- Příloha č. 4: Součková J., Skopalová J., **Švecová H.**, Čáp L., Bednář P., Barták P., On GC/MS in phospholipid research II: Investigation of liposome formation and liposome-water partitioning, Acta Univ. Palacki Olomouc, Fac. Rerum Natur. Chemica 48 (2011) 8-13.
- Příloha č. 5: Součková J., Skopalová J., **Švecová H.**, Barták P., Fused-silica capillary dropping mercury electrode for electrocapillary measurements, Electroanal. 25 (2013) 174-178.
- Příloha č. 6: Profesní životopis

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

# **AUTOREFERÁT**

k disertační práci

## **ANALYTICKÉ METODY PRO VÝZKUM FOSFOLIPIDŮ**

Autor :	Mgr. Hana Tomková
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
Konzultant:	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

OLOMOUC 2017

## SUMMARY

---

The thesis deals with investigation of fundamental properties of phospholipids molecules and their aggregates using various analytical techniques. Aggregation properties of phospholipids mixture from soybeans, commercially available as Asolectin, were used for the purpose. Asolectin was employed as a modifier in carbon paste electrode to improve the sensitivity of paraquat determination in aqueous samples. Aggregation capabilities of asolectin were used for preparation of lipid layer on the surface of glassy carbon electrode. Cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy and atomic force microscopy revealed that phospholipid layer covers whole electrode surface, layer is compact and its thickness ( $7.1 \pm 1.2$  nm) equals to those of biological membrane (5-10 nm). The lipid membrane is stable enough for 24 hours even in presence of paraquat. The electrode with lipid membrane was applied for investigation of interactions with various compounds of different hydrophobicity. Selective permeability and ability to accumulate lipophilic compounds enables to develop electrochemical sensor for square wave voltammetric determination of paraquat with detection limit  $2.2 \text{ nmol l}^{-1}$ .

## SOUHRN

---

Disertační práce se zabývá studiem vlastností fosfolipidových molekul a jejich agregátů různými analytickými metodami. Byly studovány agregační vlastnosti směsi fosfolipidů izolovaných ze sojových bobů, komerčně dostupné pod názvem Asolectin. Asolectin byl využit jako modifikátor uhlíkové pastové elektrody pro zvýšení citlivosti stanovení pesticidu paraquat ve vodě. Agregačních vlastností asolectinu bylo využito pro vytvoření lipidové vrstvy na povrchu elektrody ze skelného uhlíku. Cyklickou voltametrií, elektrochemickou impedanční spektroskopií a mikroskopií atomárních sil bylo zjištěno, že fosfolipidová vrstva pokrývá celý povrch elektrody, je kompaktní a její tloušťka ( $7,1 \pm 1,2$  nm) odpovídá tloušťce biologické membrány (5-10 nm). Takto připravená lipidová membrána je stabilní nejméně 24 hodin i v prostředí obsahujícím paraquat. Elektroda s lipidovou membránou byla využita pro studium interakcí s látkami různé hydrofobicity. Selektivní propustnost a schopnost akumulace lipofilních látek umožnila vyvinout elektrochemický sensor pro square wave voltametrické stanovení paraquat s mezí detekce  $2,2 \text{ nmol l}^{-1}$ .



# OBSAH

---

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. PŘEHLED AKTUÁLNÍHO STAVU PROBLEMATIKY.....</b>	<b>2</b>
<b>3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>5</b>
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>6</b>
4.1. Příprava fosfolipidové vrstvy na povrchu elektrody ze skelného uhlíku .....	6
4.2. Tloušťka fosfolipidové vrstvy .....	7
4.3. Vlastnosti a obnovení povrchu uhlíkové elektrody .....	10
4.4. Interakce fosfolipidové vrstvy s modelovým systémem .....	12
4.5. Vliv paraquatu na stabilitu fosfolipidové vrstvy .....	15
4.6. Stanovení paraquatu - elektrochemický sensor .....	17
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>20</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>27</b>

## 1. ÚVOD

---

Fosfolipidy jsou velmi důležitou skupinou složených lipidů, neboť jsou základním stavebním prvkem buněčných membrán. Jsou to estery vyšších mastných kyselin s alkoholem glycerolem. Díky své struktuře mají fosfolipidy amfifilní charakter. Obsahují hydrofilní část (polární "hlavu"), tvořenou glycerolem, zbytkem kyseliny fosforečné a alkoholem a hydrofobní část (nepolární "ocas"), který je tvořen jedním nebo více uhlovodíkovými řetězci. Ve vodném prostředí vlivem hydrofobních interakcí vytváří fosfolipidy různé agregáty - micely, dvojvrstvy či liposomy, v závislosti na jejich koncentraci v roztoku.

Fosfolipidy jsou základní stavební jednotkou cytoplasmatické membrány (fosfolipidová dvojvrstva), která chrání a obklopuje každou živou buňku a odděluje její vnitřní a vnější prostor. Její polopropustnost zajišťuje, že se do buňky dostávají důležité látky a odpadní látky jsou zpět z buňky vylučovány. Avšak ne všechny látky jsou schopné přes membránu pronikat. Transport látek přes cytoplasmatickou membránu zajišťují v mnoha případech proteiny, které jsou "vnořeny" do fosfolipidové dvojvrstvy.

Z hlediska farmacie, medicíny a zdraví nejenom člověka je důležité porozumět tomu, jakým způsobem pronikají různé látky přes biologickou membránu a které z nich jsou nebo nejsou schopné tohoto transportu. Z tohoto důvodu se fosfolipidové dvojvrstvy (membrány) využívají jako modely ke studiu vlastností biologických membrán. Umělé fosfolipidové membrány jsou vytvářeny různými způsoby na různých typech materiálů v závislosti na tom, k jakým účelům mají sloužit. Používají se ke studiu tloušťky membrán, jejich elektrických či mechanických vlastností nebo pro objasnění interakcí různých biologicky významných látek s membránou (tedy pro simulaci interakce těchto látek s buněčnými membránami).

Příprava umělých fosfolipidových membrán je popisována pouze z čistých fosfolipidů nebo ze směsi dvou nebo tří typů (fosfo)lipidů. Jelikož reálné buněčné membrány jsou tvořeny směsí fosfolipidů, byla v této práci použita přírodní fosfolipidová směs izolovaná ze sojových bobů (komerčně dostupná pod názvem Asolectin) ke studiu jejich agregačních vlastností na pevném povrchu. Agregační vlastnosti této směsi ve vodném prostředí byly již dříve studovány několika různými analytickými metodami a bylo také analyzováno složení této směsi.

V této práci byl asolectin využit nejdříve jako modifikátor pro zlepšení citlivosti uhlíkových pastových elektrod při analýze pesticidů. Dále byla tato látka využita pro přípravu umělé membrány na pevném povrchu a následně ke studiu jejich vlastností jako je tloušťka, kompaktnost, stabilita a interakce s různými typy látek (hydrofilní, lipofilní).

## 2. PŘEHLED AKTUÁLNÍHO STAVU PROBLEMATIKY

---

Fosfolipidy jsou velmi důležitou skupinou složených lipidů, neboť jsou základním stavebním prvkem buněčných membrán. Jsou to smíšené estery vyšších mastných kyselin a kyseliny fosforečné s alkoholem glycerolem (glycerofosfolipidy) nebo sfingosinem (sfingofosfolipidy). Fosfolipidy jsou nezbytnou složkou živočišných i rostlinných organismů, kde jsou přítomny jednak jakou součástí buněčných a vnitrobuněčných membrán, jednak jako součástí lipoproteinů. Na fosfolipidy jsou zvláště bohaté některé živočišné tkáně, především nervová tkáň a vaječný žloutek. Také sójové boby jsou poměrně bohatým zdrojem fosfolipidů, avšak jejich složení je značně odlišné od vaječných. Fosfolipidy mají amfifilní charakter - obsahují nepolární alifatické uhlovodíkové konce (hydrofobní část) a polární hlavičky (hydrofilní část). Na základě hydrofobních interakcí mezi hydrofobními řetězci mají lipidy tendenci spontánně agregovat [1] tak, aby hydrofobní oblasti byly stíněny před vodou, zatímco hydrofilní polární skupiny zůstaly ve styku s vodným prostředím. Spontánní agregace vede ke vzniku lipidových micel a vyšších lipidových struktur. Při vyšší koncentracích vytváří lipidové molekuly velké micely, které mohou přecházet až do dvojných vrstev lipidů, ve kterých jsou uhlovodíkové řetězce orientovány k sobě, zatímco polární hlavičky jsou orientovány do vodného prostředí na obou stranách dvojvrstvy. Lipidové dvojvrstvy se mohou dále uzavírat do sférických dutých váčků (liposomů) [2], které ve svém středu uzavírají vodnou fázi.

Každá živá buňka musí být obklopena selektivně propustnou bariérou, která chrání její vnitřní prostor před chemickými změnami a nežádoucími vlivy jejího okolí. Tímto obalem, který chrání každou živou buňku, je cytoplasmatická membrána. Její polopropustnost zajišťuje, že základní molekuly jako jsou glukosa, aminokyseliny a lipidy mohou pronikat dovnitř buňky, metabolické intermediáty zůstávají v buňce a odpadní látky jsou z buňky vylučovány [3]. Biologické membrány jsou rozmanité a obsahují různý poměr lipidů (25-79 %), proteinů (18-75 %) a sacharidů (0-8 %) v závislosti na jejich původu [4]. Lipidová část membrány (fosfolipidová dvojvrstva) je složitou směsí a její složení se liší podle druhu membrány. Hlavními lipidy tvořícími přírodní biologické membrány jsou glycerofosfolipidy, sfingolipidy, glykosfingolipidy a steroly.

Membrány jsou stále více studovány pro pochopení jejich vlastností a funkcí. K vlastnímu studiu buněčných membrán lze použít buď reálné buňky nebo systém buněčnou membránu do jisté míry napodobující (modelové membrány). Z důvodu složitosti biologických membrán a náročné práce s reálnými buňkami, vzrůstá zájem použít jednoduché

modely napodobující buněčné membrány ke studiu membránových procesů *in vitro*. Jednoduché modely biologických membrán sestávají z purifikovaných nebo syntetizovaných fosfolipidů. Existuje několik typů lipidových membrán, které se používají jako modely pro tyto studie. Jsou to: černá lipidová membrána (BLM) [5], lipidové membrány na pevných nosičích (SLB) [6], hybridní lipidové membrány (HBM) [7], lipidové membrány podložené polymerní vrstvou [8], volné a/nebo volně zavěšené lipidové membrány [9], ukotvené lipidové membrány (tBLMs) [10], samouspořádané lipidové membrány [11] a liposomy [12].

Pro charakterizaci membránové struktury s vysokým rozlišením se používá mikroskopie atomárních sil (AFM) [13-16]. Tato metoda se dále používá pro studium interakcí membrány s některými typy látek jako jsou léčiva [17], enzymy [18] a peptidy [19]. Cyklická voltametrie (CV), elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS) a další elektroanalytické techniky byly použity pro studium elektrických vlastností a principů přenosu elektronu přes lipidovou membránu [20,21,22]. Těmito metodami byly také studovány interakce biologicky aktivních látek s umělými lipidovými membránami. Z peptidů byly tímto způsobem studovány surfactin [23] a nisin [24]. Z léčiv to byly například ibuprofen [25] a amphotericin B [26].

Sledování interakcí mezi různými typy molekul a lipidovou dvojvrstvou vedlo k vývoji elektrochemických biosensorů. Pro vytvoření citlivého a selektivního sensoru se mohou různé typy elektrodových povrchů modifikovat různými typy látek. Například uhlíkové pastové elektrody (CPEs) jsou často modifikovány lipidy nebo mastnými kyselinami pro zvýšení jejich citlivosti a selektivity [27,28]. Některé fosfolipidové vrstvy na pevných nosičích byly modifikovány vhodnými látkami ke zlepšení selektivity a citlivosti na analyt [29,30]. Stabilizovaný lipidový film na pevném povrchu je schopný akumulovat organické látky v závislosti na jejich náboji a hydrofilním-hydrofobním charakteru. Tato jejich vlastnost bývá využita pro přípravu selektivních biosensorů [31,32]. Některá léčiva nebo pesticidy je možné inkorporovat (akumulovat) do fosfolipidové vrstvy vytvořené na povrchu elektrody a poté tyto látky elektrochemicky detegovat. Tato metoda byla použita například pro stanovení protinádorového léčiva marcellomycinu [33].

Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-dipiridinium dichlorid; methylviologen; Gramoxon) je kvartérní dusíkatý herbicid, který v celosvětovém měřítku patří k nejpoužívanějším herbicidům [34]. Je to širokospektrální, neselektivní a rychle působící kontaktní biocid, který ničí rostlinné buňky tím, že interferuje s nitrobuněčným systémem přenosu elektronů [35,36]. Ačkoliv je paraquat zakázán v Evropské Unii [37], je stále používán v rozvojových zemích jako je Thajsko nebo Filipíny [38] a v dalších asi 130 zemích [39] v ovocných sadech a na plantážích produkujících různé plodiny. Paraquat se může z ošetřených plodin dostávat

(mimo jiné) do potravin, pitné vody a do zemědělských kanálů [40]. Je extrémně toxický jak pro člověka ( $LD_{50}$  35 mg  $kg^{-1}$ ), tak i pro zvířata (myši:  $LD_{50}$  110-150 mg  $kg^{-1}$ ) [41]. Proto je nutné sledovat, zda zbytky této látky nepřekračují limit daný Evropskou komisí (20  $\mu g$   $kg^{-1}$  pro většinu plodin) [42].

Elektrochemické metody jsou široce používané pro analýzu paraquatu v životním prostředí a v biologických vzorcích, protože jsou rychlé, levné a mají nízké detekční limity. Nejvíce používanou elektrochemickou metodou pro stanovení paraquatu je square wave voltametrie (SWV) a diferenčně pulzní voltametrie (DPV). Tyto metody byly použity pro stanovení tohoto pesticidu ve vodě, jablkách a bramborách s různými typy elektrod [43,44].

### 3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

---

Cílem předložené disertační práce bylo prostudovat vlastnosti fosfolipidů a jejich agregátů vybranými analytickými metodami. Konkrétněji se tato práce zabývá studiem agregčních vlastností směsi fosfolipidů ze sojových bobů (komerčně dostupné pod názvem Asolectin) především na pevných površích. Agregční vlastnosti této fosfolipidové směsi byly využity pro přípravu umělé lipidové membrány na povrchu elektrody ze skelného uhlíku. Cíle této práce můžeme shrnout následovně:

- využít asolectin jako modifikátor uhlíkové pastové elektrody pro stanovení lipofilních látek ve vodném prostředí
- prostudovat agregční vlastnosti asolectinu na pevném povrchu
- připravit umělou lipidovou membránu z této fosfolipidové směsi na povrchu elektrody ze skelného uhlíku
- prostudovat vlastnosti připravené membrány jako jsou tloušťka vrstvy, její kompaktnost, stabilita, apod.
- optimalizovat čištění a obnovení povrchu elektrody po její modifikaci pro její další použití
- prostudovat interakce připravené vrstvy s modelovým systémem různých typů látek
- využít fosfolipidy modifikovanou uhlíkovou elektrodu jako sensor pro stanovení lipofilních látek ve vodném prostředí

## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

---

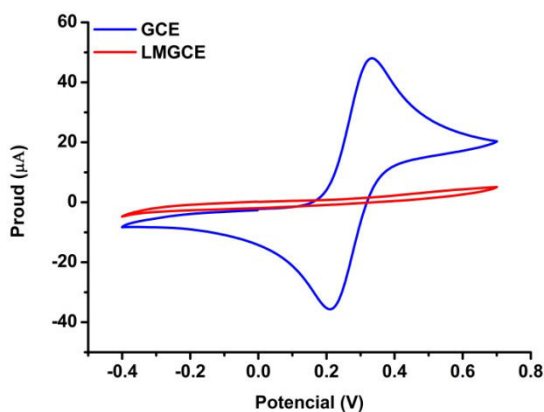
Agregace fosfolipidových molekul byla již studována jak v roztoku, tak i na tuhých površích, o čemž lze nalézt velké množství odborných publikací. V literatuře se však popisují agregační vlastnosti pouze čistých fosfolipidů, respektive definované směsi dvou nebo tří typů (fosfo)lipidů. Cílem této disertační práce bylo prostudovat agregační vlastnosti přírodní směsi fosfolipidů získané ze sojových bobů (komerčně dostupnou pod názvem Asolectin). Již dříve byly studovány vlastnosti této směsi ve vodném prostředí. Agregační koncentrace asolectinu ve vodném prostředí byly stanoveny elektrokapilárním měřením, cyklickou voltametrií a nefelometricky. Vzniklé agregáty byly dále vizuálně studovány elektronovým mikroskopem [45,46]. Asolectin byl použit k vývoji nové metody přípravy liposomů bez použití organických rozpouštědel - spontánní revesikulaci. Tato metoda je založena na postupné titraci koncentrovaného vodného fosfolipidového roztoku do vodné fáze, kde dochází k rozpadu již vzniklých agregátů a k jejich přeuspořádání [47]. Proto je tato metoda použitelná pouze pro fosfolipidy relativně rozpustné ve vodném prostředí, což jsou přírodní lipidové směsi rostlinného a živočišného původu (především ze soji a vaječného žloutku). Metodou GC/MS byl stanoven obsah mastných kyselin a fosforu v této fosfolipidové směsi [48], dále byla tato metoda využita pro stanovení kritické liposomální koncentrace asolectinu a stanovení rozdělovacího koeficientu eugenolu v systému liposom-voda [49].

### 4.1. Příprava fosfolipidové vrstvy na povrchu elektrody ze skelného uhlíku

---

Postup modifikace elektrody ze skelného uhlíku byl částečně převzat z literatury [25], avšak pro použití směsi fosfolipidů bylo nutné tento postup pozměnit. Základním principem pro vytvoření samoorganizované fosfolipidové vrstvy je nanesení roztoku fosfolipidů na čistý a suchý povrch GCE a ponoření do roztoku soli, kde dojde k uspořádání fosfolipidové vrstvy. Bylo však nutné optimalizovat podmínky tohoto procesu jako jsou koncentrace roztoku fosfolipidů pro pokrývání, rozpouštědlo pro přípravu tohoto roztoku, objem roztoku nanášeného na povrch elektrody, doba ponoření do roztoku formujícího vrstvu a předúprava povrchu samotné elektrody. Během optimalizace byl změněn vždy pouze jeden parametr a přítomnost fosfolipidové vrstvy byla vždy prokázána záznamem cyklického voltamogramu v roztoku ferrokyanidu draselného o koncentraci  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  v prostředí KCl o koncentraci  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ . Obrázek 1 ukazuje cyklické voltamogramy ferrokyanidu zaznamenané na čistém GCE a modifikovaném GCE (LMGCE). Na nepokryté elektrodě jsou zřetelné reverzibilní píky

redoxního páru  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ , zatímco na LMGCE nebyly zaznamenány žádné odezvy. To je způsobené tím, že fosfolipidová vrstva vytváří účinnou bariéru pro přenos náboje mezi elektrolytem a povrchem elektrody. Za její přítomnosti se tak ionty hexakynoželeznatanu draselného nedostávají až k povrchu elektrody, nedochází tak k jeho elektrochemické přeměně a proto nejsou zaznamenány žádné píky (obr. 1). Úplné potlačení signálu ferrokyanidu znamená, že fosfolipidová vrstva je kompaktní a pokrývá celý povrch elektrody. Po optimalizaci všech parametrů byla vyvinuta metoda pro pokrývání elektrody ze skelného uhlíku fosfolipidovou vrstvou: čistá elektroda (GCE) byla vyleštěna aluminou ( $0,05 \mu\text{m}$ ) a vložena do ultrazvukové lázně na 1 min v deionizované vodě. Povrch elektrody byl následně upraven elektrochemicky v prostředí chloridu sodného o koncentraci  $9 \text{ g l}^{-1}$  vložení potenciálu  $1,5 \text{ V}$  (vs.  $\text{Ag}|\text{AgCl}|3\text{M-KCl}$ ) po dobu 3 min [25]. Poté byla elektroda vysušena proudem dusíku. Na povrch GCE bylo nanášeno  $5 \mu\text{l}$  roztoku asolectinu v hexanu ( $3 \text{ mg ml}^{-1}$ ) a elektroda byla ihned ponořena do roztoku  $\text{NaCl}$  ( $9 \text{ g l}^{-1}$ ) na 30 minut. Následně byla lipidem modifikovaná uhlíková elektroda (LMGCE) opatrně opláchnuta deionizovanou vodou a použita k měření.



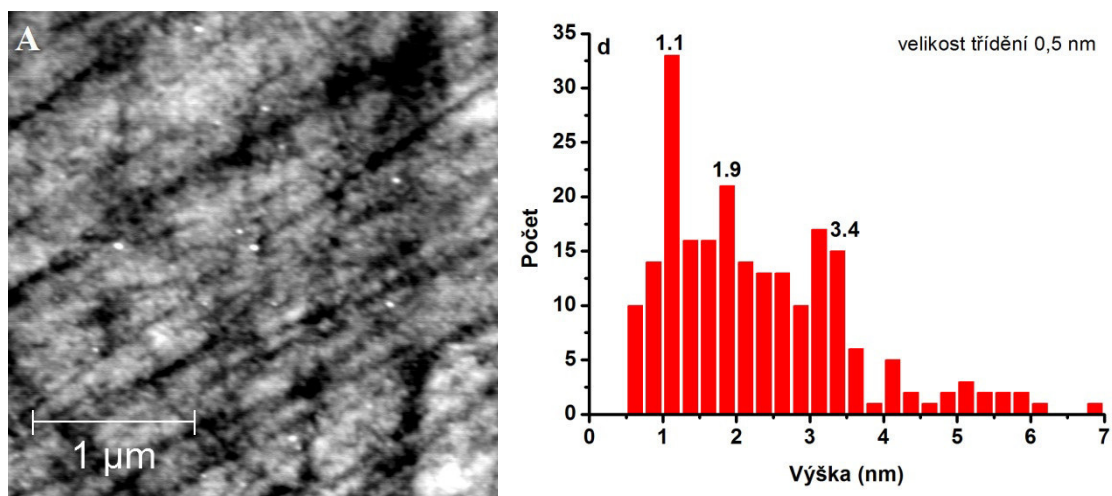
Obr. 1: Cyklické voltamogramy  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  ferrokyanidu draselného v roztoku  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$   $\text{KCl}$ , rychlost scenu  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , referentní elektroda  $\text{Ag}|\text{AgCl}|3\text{M-KCl}$ . Voltamogramy zaznamenané na čisté a modifikované elektrodě.

#### 4.2. Tloušťka fosfolipidové vrstvy

Pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) byly studovány vlastnosti připravené fosfolipidové vrstvy na povrchu GCE - především její kompaktnost a tloušťka [50]. Měření AFM bylo prováděno *ex-situ* na různých místech povrchu elektrody. Nejdříve byl proměřen povrch čisté GC elektrody, která byla před měřením přečištěna aluminou a vložena do ultrazvuku. AFM měření na čisté GCE ukázalo, že povrch elektrody je relativně drsný s mnoha rýhami, které mohly být způsobené během výroby elektrody a/nebo mechanickým čištěním jejího povrchu (obr. 2A). Z profilů a histogramů porosity (obr. 2B) bylo dále zjištěno, že drsnost povrchu elektrody je  $3,3 \pm 0,9 \text{ nm}$  s rýhami hlubokými kolem

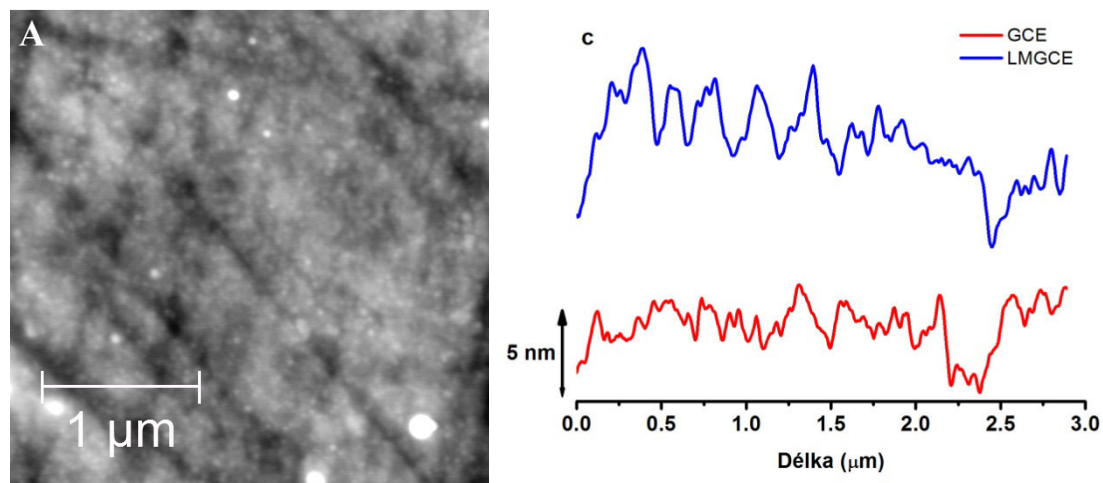


$5,4 \pm 1,3$  nm. Jemné rýhy odpovídají mechanickému leštění povrchu elektrody aluminou, jak již bylo uvedeno v literatuře [51].



Obr. 2: AFM topografie čisté GCE (A) a její velikost třídění (B).

V případě fosfolipidové vrstvy na povrchu uhlíkové elektrody (LMGCE) bylo AFM použito pro studium její kompaktnosti a k určení její tloušťky. Jak je vidět z AFM topografie LMGCE a z profilů na čisté a modifikované elektrodě (obr. 3), fosfolipidová vrstva kompletně pokrývá povrch elektrody a kopíruje tak její drsnost a rýhy.



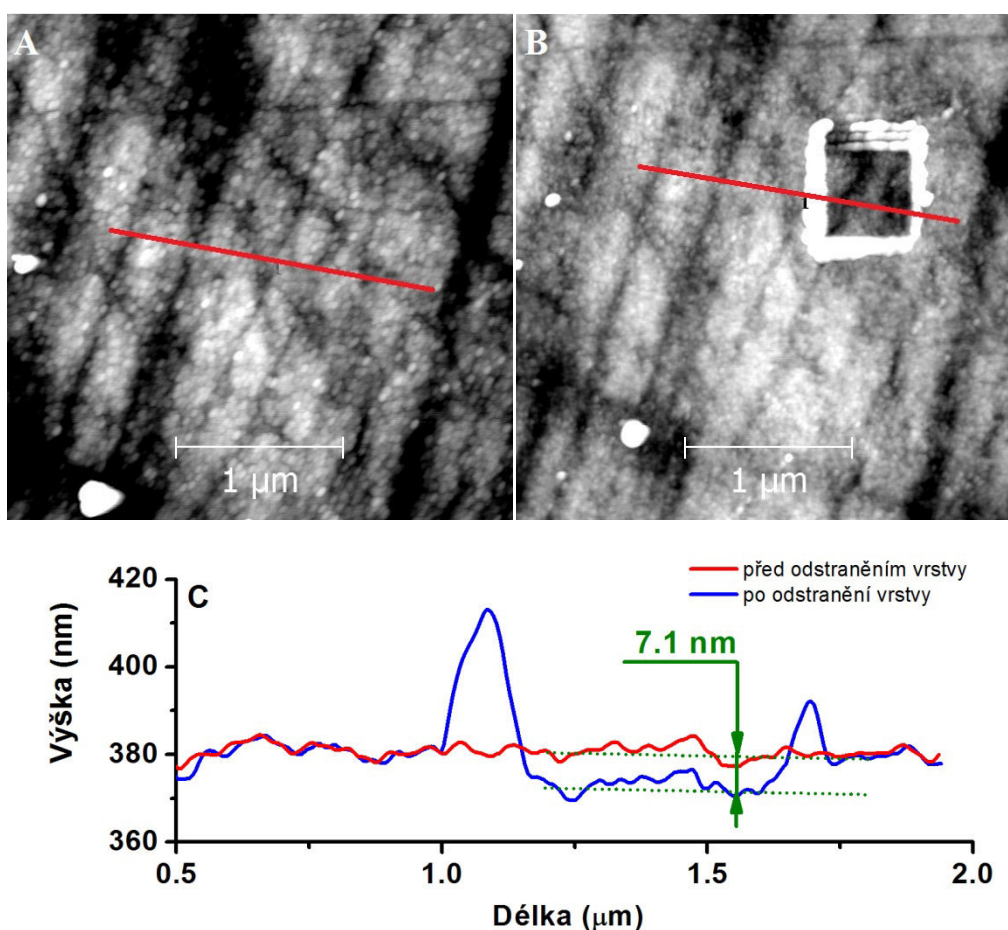
Obr. 3: AFM topografie LMGCE (A) a profily povrchu čisté a modifikované elektrody (B).

Tloušťka vrstvy byla získána metodou "nanoshaving" [52,53], při které je pomocí AFM sondy odstraněn film z povrchu vzorku. Struktura filmu je nejdříve charakterizována pomocí tapping modu (obr. 4A), následně je použita větší síla k odstranění filmu na vybrané ploše (500 nm x 500 nm) pomocí kontaktního modu a prostor je znovu zmapován pomocí tapping

modu (obr. 4B). Pokud není substrát poškozen použitou silou, hloubka odstraněné plochy se rovná tloušťce filmu [52].

Výška fosfolipidové vrstvy pak byla získána z rozdílu obou profilů před a po odstranění fosfolipidů (obr. 4C). Tloušťka připravené fosfolipidové vrstvy byla stanovena na  $7,1 \pm 1,2$  nm (obr. 4C). Tato hodnota odpovídá tloušťce fosfolipidové vrstvy udávané pro běžné buněčné membrány (5-10 nm v závislosti na lipidovém složení zahrnujícím především stupeň nasycení a délku uhlíkového řetězce) [54]. Na některých místech byla tloušťka vrstvy stanovena na  $11,9 \pm 1,9$  nm. To může být způsobeno nerovnoměrným rozložením roztoku fosfolipidu během přípravy vrstvy, což vede k tvorbě tlustší vrstvy než odpovídá dvojvrstvě.

Výsledky získané pomocí AFM potvrdily, že připravená fosfolipidová vrstva na povrchu GCE je kompaktní a její tloušťka odpovídá dvojvrstvě na většině povrchu. Připravená vrstva tedy má charakter buněčné membrány.



Obr. 4: AFM topografie LMGCE (A) a LMGCE po nanoshavingu (B).

Profil LMGCE před a po nanoshaving (C).

### 4.3. Vlastnosti a obnova povrchu uhlíkové elektrody

Pomocí rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS) byl studován vliv různých typů elektrochemických předúprav na vlastnosti povrchu GCE a jeho prvkové složení [50]. Byly použity tři typy předúpravy povrchu GCE: (i) leštění aluminou a čištění v ultrazvukové lázni (označovaný jako "leštěný"), (ii) leštění aluminou a anodická polarizace v roztoku NaCl o koncentraci  $9 \text{ g l}^{-1}$  při potenciálu  $1,5 \text{ V}$  (vs. Ag|AgCl|3M-KCl) po dobu 3 minut (označovaný jako "anodizovaný") a (iii) leštění aluminou a katodická polarizace v roztoku HCl o konc.  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  při potenciálu  $-1,5 \text{ V}$  (vs. Ag|AgCl|3M-KCl) po dobu 3 minut (označovaný jako "katodizovaný"). Po úpravě povrchu byly elektrody opláchnuty deionizovanou vodou a vysušeny proudem dusíku při laboratorní teplotě. Hlavním cílem používaných úprav povrchu GCE bylo získat čistý, hladký a polární povrch pro přípravu fosfolipidové vrstvy. V takovém případě jsou polární skupiny fosfolipidových molekul (hlavičky) orientovány k povrchu elektrody a tak mohou vytvořit fosfolipidovou dvojvrstvu. Procentuální zastoupení jednotlivých prvků na povrchu GCE po různých typech jeho úpravy je shrnuto v tabulce 1.

Tabulka 1: Procentuální prvkové zastoupení na povrchu GCE po různých typech úpravy.

Předúprava povrchu GCE	Leštěný [%]	Anodizovaný [%]	Katodizovaný [%]
C1s	85.9	81.2	85.2
O1s	11.8	13.6	12.4
N1s	1.4	-	1.4
Cl2p	-	3.6	0.1
Al2p	0.7	0.9	0.6

Výsledky XPS ukázaly, že kontaminace povrchu elektrody aluminou na všech typech vzorků je zanedbatelná. Koncentrace hliníku ve formě  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (pík Al2p, BE = 74,6 eV) na čisté nemodifikované GCE nepřesáhla 1% (tab. 3).

Na všech vzorcích však bylo nalezeno významné množství kyslíku. Přestože celková koncentrace kyslíku na leštěném, anodizovaném i katodizovaném povrchu byla srovnatelná, na vzorcích upravených anodizací i katodizací bylo pozorováno zvýšení koncentrace  $\text{sp}^3$  formy (C-O, BE = 532 eV) a snížení koncentrace  $\text{sp}^2$  formy (C=O, BE = 533 eV) ve

srovnání s mechanicky leštěným vzorkem. Nicméně tento jev nemá zřejmě významný vliv na stabilitu fosfolipidové vrstvy.

Významnější je vyšší obsah organického chloru (přibližně 3,5 %) s vazebnou energií 200 eV [55], který byl nalezen na anodizované elektrodě, zatímco na ostatních dvou elektrodách byl obsah chloru pod mezí detekce (~ 0,1 %). To je jediná významná změna v elementárním složení, která nebyla pozorována u žádné jiné úpravy elektrody. Organický chlor je generován na povrchu elektrody v průběhu anodizace a přispívá k vyšší stabilitě fosfolipidové vrstvy pravděpodobně díky vyšší polarizovatelnosti povrchu, který je bohatý na atomy chloru ve srovnání s atomy kyslíku. Z tohoto důvodu byla anodizace povrchu uhlíkové elektrody vybrána jako proces předúpravy před modifikací GCE fosfolipidy, což je také v souladu s výsledky získanými při optimalizaci procesu modifikace elektrody (kap. 5.2.).

Po modifikaci anodizované elektrody fosfolipidy bylo na jejím povrchu nalezeno přibližně 1,3 % fosforu ve formě fosforečnanu (BE ~ 133 eV). Tato hodnota odpovídá přibližně jedné polovině obsahu fosforu v asolectinu, který byl stanovován již dříve [48]. Byl nalezen také chlor (přibližně 2,3 %), nicméně v tomto případě se vyskytoval ve formě chloridu kovu (BE ~ 198,5 eV), který pravděpodobně pocházel z roztoku NaCl, který se používá během přípravy fosfolipidové vrstvy. Nalezený obsah sodných iontů (přibližně 1,6 %, BE ~ 1071 eV) potvrzuje tuto teorii.

Po měření modifikovanou elektrodou (LMGCE) je nutné očistit a obnovit povrch elektrody pro její další použití. V případě čištění jenom aluminou byly pozorovány vysoké hodnoty slepých pokusů (při měření základního elektrolytu). Proto byly testovány tři různé způsoby čištění povrchu elektrody a z analýzy XPS bylo porovnáno elementární prvkové složení na každém povrchu.

Pro odstranění fosfolipidové vrstvy a regeneraci povrchu elektrody byly testovány tři čisticí procesy označené (i), (iii) a (iv), (kap. 4.3.6.). Leštění LMGCE aluminou (i) vykazovalo vyšší obsah hliníku (4 % jako oxid hlinitý, BE = 74,6 eV, tab. 4), který významně převyšuje hodnotu získanou na nemodifikované elektrodě (přibližně 1 %, tab. 3). Následné elektrochemické přečištění v roztoku HCl v tomto případě nezvýšilo čistotu povrchu - hodnoty byly srovnatelné s výsledky získanými pouze leštěním elektrody (tabulka 4). Přítomnost fosfolipidové vrstvy se tak zdá být hlavní příčinou akumulace hliníku, který byl následně použit jako marker pro sledování čistoty povrchu. Proto bylo navrženo efektivní chemické čištění zahrnující použití nepolárního rozpouštědla pro důkladné odstranění zbytků fosfolipidů a hliníku. Konečný proces čištění LMGCE (iv) sestává z leštění elektrody aluminou, čištění v ultrazvukové lázni ve vodě, vysušení elektrody a následné čištění v

hexanu, methanolu a vodě (vždy 15 min. v ultrazvukové lázni v každém rozpouštědle). Po tomto čistícím procesu nebylo na povrchu elektrody nalezeno žádné znečištění (viz tabulka 4). Tento způsob regenerace povrchu uhlíkové elektrody byl používán po každém měření LMGCE. V základním elektrolytu pak nebyl detegován žádný analyt. Tento způsob čištění významně přispěl k tomu, že se podařilo dosáhnout nízkého detekčního limitu pro stanovení paraquat (viz dále).

Tabulka 2: Procentuální prvkové zastoupení na povrchu GCE po různých typech čištění LMGCE.

Čištění povrchu LMGCE	Leštěný povrch [%]	Katodizovaný povrch [%]	Chemické čištění [%]
C1s	76.0	74.6	86.8
O1s	17.2	18.7	10.2
N1s	1.5	1.1	1.2
Cl2p	0.8	0.5	-
Al2p	4.0	4.2	-

#### 4.4. Interakce fosfolipidové vrstvy s modelovým systémem

Jak již bylo popsáno výše, fosfolipidová vrstva připravená na povrchu uhlíkové elektrody je schopná zabraňovat pronikání hydrofilních látek k povrchu elektrody (např. ferrokyanidu draselného) a blokuje tak jejich elektrochemickou přeměnu, zatímco lipofilní látky jsou schopné přes tuto membránu procházet a tak se elektrochemicky přeměňovat (např. paraquat). Proto byl připraven modelový systém jako směs obou typů látek (hydrofilní a lipofilní) a bylo sledováno, zda je fosfolipidová vrstva schopná selektivně detegovat lipofilní látku v roztoku i v přítomnosti interferentu ve formě hydrofilní látky [56].

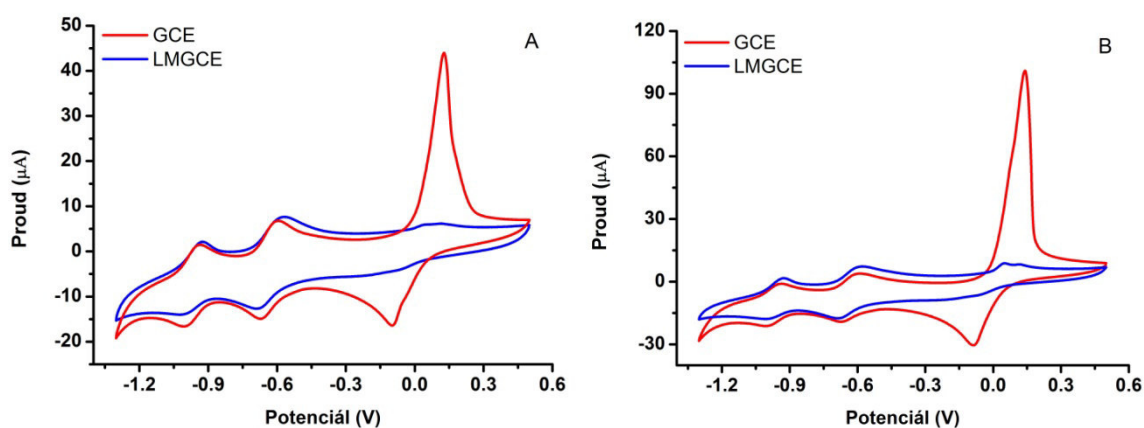
Nejdříve byla testována směs ferrokyanid draselný, jako model elektroaktivní hydrofilní látky, a paraquat, jako model lipofilního elektroaktivního pesticidu. Bylo však zjištěno, že tyto dvě látky spolu reagují a výsledky pronikání těchto látek přes membránu jsou pak zkreslené. Proto byl jako model hydrofilní látky zvolen síran měďnatý. Měďnaté sloučeniny se také často používají jako složka při přípravě pesticidních prostředků. V důsledku toho, že pro další měření byl používán roztok síranu měďnatého, byl jako základní elektrolyt použit síran sodný ( $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ ) a pH roztoku bylo upravováno na hodnotu 5, neboť při vyšších hodnotách pH docházelo ke srážení měďnatých iontů.

Nejdříve byly zaznamenány cyklické voltamogramy každé látky zvlášť na GCE i LMGCE. Cyklické voltamogramy síranu měďnatého byly získány v koncentračním rozsahu od 0,1 do 1 mmol l<sup>-1</sup> v potenciálovém rozsahu od 0,5 do -1,3 V v prostředí síranu sodného o pH 5. Paraquat jako model lipofilní látky byl studován za stejných podmínek jako CuSO<sub>4</sub>. Analýzy obou látek ukázaly, že píky těchto sloučenin se nepřekrývají, jsou dostatečně rozlišené a mohou tedy být použity jako modelová směs hydrofilní a lipofilní značky pro další výzkum.

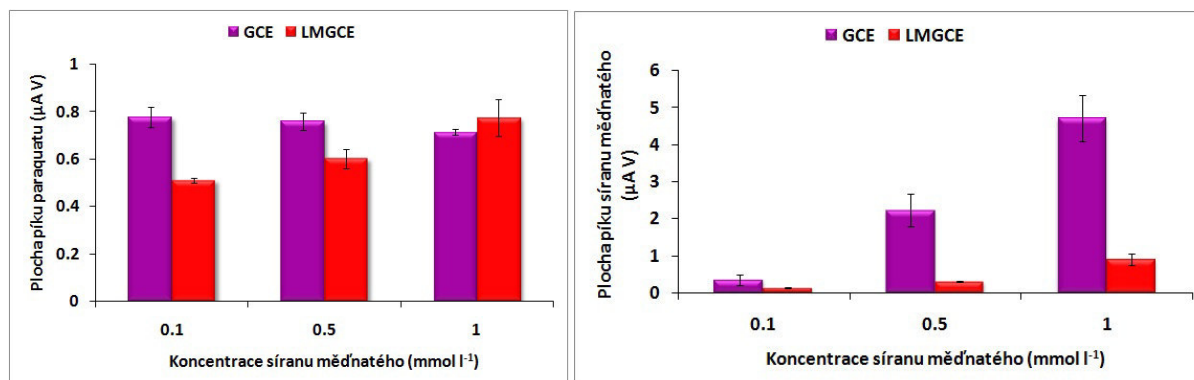
Selektivita fosfolipidy modifikované elektrody byla studována v roztoku síranu sodného o koncentraci 0,01 mol l<sup>-1</sup> (pH 5) v závislosti na koncentraci obou látek v roztoku. Cyklické voltamogramy byly nejdříve zaznamenány v roztoku 0,5 mmol l<sup>-1</sup> paraquatu s přísádky síranu měďnatého v koncentračním rozsahu od 0,1 do 1 mmol l<sup>-1</sup>. Zároveň bylo do roztoku přidáváno vypočítané množství paraquatu tak, aby byla jeho koncentrace udržována stále na hodnotě 0,5 mmol l<sup>-1</sup>. Obdobně byly získány cyklické voltamogramy v roztoku 0,5 mmol l<sup>-1</sup> síranu měďnatého při různých koncentracích paraquatu v rozmezí od 0,1 do 1 mmol l<sup>-1</sup>. Obrázek 5A ukazuje cyklické voltamogramy získané v ekvimolární směsi paraquatu a síranu měďnatého (0,5 mmol l<sup>-1</sup>) na GCE a LMGCE. Na fosfolipidy modifikované elektrodě byl zaznamenán významný pokles signálu síranu měďnatého (o 80 %), zatímco signál paraquatu zůstal stejný. Tento fakt dokazuje, že měďnaté ionty nejsou schopné pronikat přes fosfolipidovou vrstvu a tak nemohou být elektrochemicky redukovány na povrchu uhlíkové elektrody, jestliže je vrstva kompaktní a pokrývá celý elektrodový povrch. Na druhé straně, lipofilnější paraquat proniká do fosfolipidové vrstvy a difunduje jí až k povrchu elektrody, kde dochází k jeho elektrochemické reakci. LMGCE je tak schopná selektivně detegovat lipofilní látky a to i v přítomnosti interferentu ve formě hydrofilní látky. Následně byl připraven roztok, ve kterém byla dvojnásobná koncentrace CuSO<sub>4</sub> ve srovnání s koncentrací paraquatu. Cyklické voltamogramy získané při dvojnásobné koncentraci měďnatých iontů (1 mmol l<sup>-1</sup>) na čisté a modifikované elektrodě jsou na obrázku 5B. I v tomto případě došlo k výraznému poklesu píku odpovídajícího měďnatým iontům na LMGCE, zatímco odezva paraquatu zůstává stále stejná na obou elektrodách. LMGCE je tak schopná selektivně detegovat paraquat i v přítomnosti nadbytku hydrofilní látky.

Pro kvantitativní vyhodnocení byl vybrán katodický pík síranu měďnatého při potenciálu -0,1 V a první katodický pík paraquatu při potenciálu -0,7 V, které vykazují lineární nárůst s koncentrací v širším koncentračním rozsahu. Z obrázku 6 je vidět, že koncentrace síranu měďnatého v roztoku má jen malý vliv na plochu píku paraquatu. Malý pokles píku paraquatu na čisté GCE při vyšší koncentraci měďnatých iontů v roztoku

může být způsoben tím, že měďnaté ionty se na povrchu elektrody redukují na kovovou měď a tím omezují prostor pro difuzi a elektrochemickou přeměnu paraquatu. Na modifikované GCE můžeme sledovat mírné zvýšení plochy píku paraquatu s rostoucí koncentrací měďnatých iontů v roztoku. Paraquat difunduje přes fosfolipidovou vrstvu k povrchu elektrody. Produkty jeho elektrochemické přeměny nemohou zcela difundovat zpět do roztoku a akumulují se v lipidové vrstvě. Proto vzrůstá signál při dalším měření (obr. 6). Měření závislosti výšky píku na rychlosti scanu bylo zjištěno, že je tento proces řízený difusí.



Obr. 5: Cyklické voltamogramy směsi 0,5 mmol l<sup>-1</sup> paraquatu a: (A) 0,5 mmol l<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>; (B) 1 mmol l<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> v prostředí 0,01 mol l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 5; rychlost scanu 50 mV s<sup>-1</sup>, referenční elektroda Ag|AgCl|3M-KCl.



Obr. 6: Závislost plochy píku paraquatu (0,5 mmol l<sup>-1</sup>) na koncentraci CuSO<sub>4</sub> v roztoku na čisté a modifikované GCE a závislost plochy píku CuSO<sub>4</sub> na jeho koncentraci v roztoku na čisté a modifikované GCE.

Obrázek 6 ukazuje velké rozdíly mezi odezvami měďnatých iontů při různých koncentracích síranu měďnatého v roztoku na čisté a modifikované elektrodě. Tyto výsledky potvrzují, že měďnaté ionty nejsou schopny pronikat přes fosfolipidovou vrstvu na rozdíl od paraquatu, který přes membránu proniká. Výsledky také korespondují se směrnici

kalibračních závislostí paraquatu a síranu měďnatého získanými na obou typech elektrod (tabulka 3).

Kalibrační závislosti paraquatu a síranu měďnatého byly studovány na čisté i fosfolipidy modifikované GCE pro každou látku zvlášť v prostředí  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ( $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ ). V tabulce 3 jsou uvedeny hodnoty směrnic těchto kalibračních závislostí a jejich směrodatné odchylky. Je-li směrnice kalibrační závislosti mírou citlivosti měřicího systému [57], je možné odvodit, že citlivost LMGCE vůči měďnatým iontům je 12,5 krát nižší ve srovnání s čistou GCE při zachování citlivosti vůči paraquatu. Tyto výsledky ukazují že fosfolipidová vrstva na povrchu uhlíkové elektrody má výrazný vliv na její selektivitu.

Stabilita fosfolipidové vrstvy na povrchu uhlíkové elektrody byla testována cyklickou voltametrií s použitím ferrokyanidu draselného jako elektroaktivní značky. Vrstva byla dostatečně stabilní nejméně 10 po sobě následujících měřeních (pH 7) pokud byla chráněna před extrémně silným proudem kapaliny a pokud byla ponořena v měřeném roztoku.

Tabulka 3: Směrnice kalibračních závislostí a jejich směrodatné odchylky získané na GCE a LMGCE pro paraquat a síran měďnatý.

Analyt	Směrnice kalibrační závislosti ( $\text{mA V l mol}^{-1}$ )	
	GCE	LMGCE
$\text{Cu}^{2+}$	$5,0 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,3$
paraquat	$1,4 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$

#### 4.5. Vliv paraquatu na stabilitu fosfolipidové vrstvy

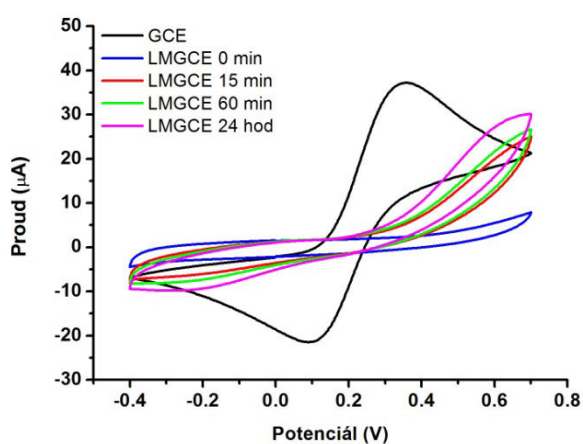
Předchozími experimenty bylo prokázáno, že paraquat je schopen pronikat přes fosfolipidovou vrstvu k povrchu elektrody, kde tak může probíhat jeho elektrochemická přeměna a zároveň že je schopen se v této vrstvě akumulovat. Jelikož jsou známé studie, kde například peptidy narušují strukturu buněčné membrány [24,58], bylo testováno, zda paraquat nemá podobné účinky na lipidovou membránu.

Stabilita vrstvy byla sledována pomocí CV a EIS v roztoku paraquatu o koncentraci 1 a  $0,4 \mu\text{mol l}^{-1}$ . LMGCE byla ponořena do roztoku paraquatu na určitou dobu, poté opláchnuta deionizovanou vodou a byl zaznamenán CV v prostředí  $5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  a následně impedanční spektra v prostředí  $5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  (1:1) obsahující

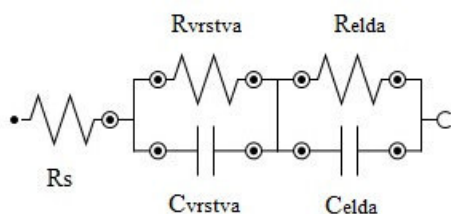


0,1 mol l<sup>-1</sup> KCl. Měření bylo prováděno v časech 0, 15, 30, 45, 60, 120 a 240 min, dále po 17 a 24 hodinách.

Na obrázku 7 jsou cyklické voltamogramy získané při měření v roztoku paraquatu o koncentraci 1 μmol l<sup>-1</sup> v časech 0, 15, 60 minut a 24 hodin. Čas 0 min byl zaznamenán ihned po pokrytí elektrody, aniž by byla elektroda ponořena do roztoku paraquatu. Jak je zřejmé z obrázku, po pokrytí elektrody nebyly zaznamenány žádné odezvy ferrokyanidu, což souvisí s úplným pokrytím povrchu elektrody. Ani po 24 hodinách, kdy byla LMGCE ponořena do roztoku paraquatu, nebyly zaznamenány žádné signály ferrokyanidu, což znamená, že fosfolipidová vrstva není narušována a je stabilní po celou tuto dobu.



Obr. 7: Cyklické voltamogramy 5 mmol l<sup>-1</sup> ferrokyanidu draselného zaznamenané na čisté GCE a na LMGCE po ponoření do roztoku paraquatu (1 μmol l<sup>-1</sup>) v závislosti na čase; rychlost scanu 50 mV s<sup>-1</sup>, referentní elektroda Ag|AgCl|3M-KCl.



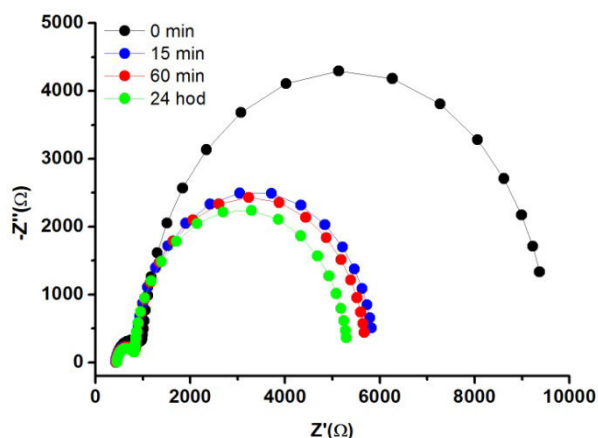
Obr. 8: Ekvivalentní obvod pro vyhodnocení EIS.

Tyto výsledky potvrzují i data získaná měření EIS za stejných podmínek. Data byla vyhodnocena v softwaru Nova a to proložením parametry ekvivalentního obvodu, který je na obrázku 8, kde Rs je odpor roztoku, Rvrstva je odpor fosfolipidové vrstvy, Cvrstva je kapacita fosfolipidové vrstvy, Relda je odpor elektrody a Celda je kapacita elektrody.

Výsledné Nyquistovy grafy v časech 0, 15, 60 minut a 24 hodin jsou na obrázku 9. Čerstvá vrstva LMGCE vykazuje hodnoty reálné složky impedance přibližně 9,5 kΩ. Na obrázku 9 je vidět, že po 15 minutách dojde ke změně odporu fosfolipidové vrstvy, kdy se hodnota impedance sníží na přibližně 6 kΩ, avšak elektroda zůstává stále pokrytá. Lze předpokládat (podobně jak bylo již uvedeno výše), že dikation paraquatu se inkorporuje do relativně fluidní fosfolipidové vrstvy a může přispět k poklesu impedance jak zvýšením koncentrace nabitých částic uvnitř vrstvy, tak stlačením fosfolipidové vrstvy působením

coulombických sil. Pokud je elektroda v roztoku paraquatu ponořena déle (60 min a 24 hod), frekvenční charakteristika zůstává téměř stejná, bez významných změn, neboť dojde k ustavení rovnováhy, kdy se impedance již dále nemění. Tyto výsledky ukazují, že vrstva je stabilní po dobu minimálně 24 hodin i v přítomnosti paraquatu.

Stejný postup měření byl také použit pro nižší koncentraci paraquatu ( $0,4 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) se stejnými výsledky, pouze k ustalování rovnováhy dochází pomaleji.

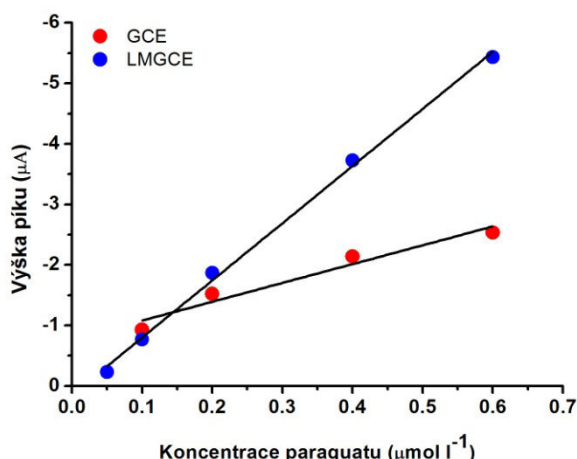


Obr. 9: Frekvenční charakteristika (Nyquistův graf) pro LMGCE v roztoku  $1 \mu\text{mol l}^{-1}$  paraquatu v závislosti na čase; EIS měřeno v prostředí  $5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  (1:1) obsahující  $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$ . Frekvenční rozsah 50 kHz až 0,1 Hz, potenciál 0,22 V.

#### 4.6. Stanovení paraquatu - elektrochemický sensor

Fosfolipidová vrstva na povrchu uhlíkové elektrody zvyšuje selektivitu k lipofilním látkám a je schopná tyto látky zadržovat (akumulovat). Proto byla LMGCE použita jako elektrochemický sensor pro stanovení paraquatu ve vodě pomocí square wave voltametrie jako pokročilého nástroje pro získávání analytického signálu ze sensoru [50].

Vysoká citlivost SW metody byla kombinována s efektivní akumulací paraquatu do fosfolipidové vrstvy. Byl zvolen čas akumulace 10 minut (jak je uvedeno výše) pro citlivé a reprodukovatelné stanovení paraquatu. Kalibrační závislosti byly měřeny v koncentračním rozsahu od  $0,05$  do  $0,60 \mu\text{mol l}^{-1}$  a byly srovnávány s hodnotami získanými na čisté GCE (obr. 10). Zatímco LMGCE je schopná detegovat paraquat v celém koncentračním rozsahu, snahy detegovat nemodifikovanou GCE nejnižší koncentraci ( $0,05 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) nebyly úspěšné. LMGCE vykazuje významně vyšší hodnoty směrnice kalibrační závislosti udávající třikrát vyšší citlivost ve srovnání s čistou GCE (hodnoty  $-9,45$  a/nebo  $-3,11 \mu\text{A L} \mu\text{mol}^{-1}$ ). Navíc LMGCE vykazuje lepší linearitu kalibrační závislosti, což je zřejmé ve srovnání s nemodifikovanou GCE, kde jsou vidět vysloveně nelineární deformace v blízkosti meze detekce na čisté GCE (obr. 10).



Obr. 10: Kalibrační závislost paraquatu získaná na čisté a modifikované GCE.

Vysoká citlivost SWV v kombinaci s efektivní akumulací paraquatu do fosfolipidové vrstvy umožnila dosažení meze detekce  $2,2 \text{ nmol l}^{-1}$ , která byla získána z kalibrační závislosti. Tato hodnota je významně nižší ve srovnání s většinou běžných typů pevných elektrod a jejich modifikací [43,44,59-65] s výjimkou relativně drahé borem dopované diamantové elektrody (BDDE), na které byly dosaženy srovnatelné meze detekce v nanomolární úrovni, jako například  $1,5 \text{ nmol l}^{-1}$  [66] nebo  $70 \text{ nmol l}^{-1}$  [67], které byly publikovány.

Měřením adsorpční rozpouštěcí diferenčně pulzní voltametrie s uhlíkovou pastovou elektrodou modifikovanou (CPE) asolectinem bylo zjištěno, že modifikovaná elektroda je citlivější pro stanovení paraquatu ve vodě ve srovnání s čistou CPE. Meze detekce byly stanoveny na  $0,8 \mu\text{mol l}^{-1}$  pro CPE a  $0,2 \mu\text{mol l}^{-1}$  pro modifikovanou CPE. Zlepšení meze detekce na LMCPE pro paraquat souhlasí s již dříve získanými daty pro různá léčiva a farmaceuticky významné látky [27,68,69]. Nicméně použití LMGCE s kombinací akumulace paraquatu do fosfolipidové vrstvy vykazuje mnohem nižší meze detekce.

Dále byla testována výtěžnost analytického procesu založeného na SW voltametrii s LMGCE v modelovém vzorku obsahujícím paraquat. Byly připraveny vzorky s koncentracemi paraquatu  $0,1$ ;  $0,2$  a  $0,4 \mu\text{mol l}^{-1}$ , vložena modifikovaná elektroda a po akumulaci 10 minut byl zaznamenán SWV. V tabulce 4 jsou uvedené koncentrace nalezené v modelovém vzorku s hodnotami směrodatných odchylek a také výtěžnosti tohoto procesu. Uvedené hodnoty ukazují na vysokou efektivnost analytického procesu s výtěžností 88 - 92 %.

Tabulka 4: Koncentrace paraquatu nalezené ve vzorcích deionizované vody s jejich směrodatnými odchylkami, respektive výtěžnostmi.

Vzorky deionizované vody		
Přidané množství ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	Nalezené množství ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	Výtěžnost (%)
0,1	<b>0,08 <math>\pm</math> 0,01</b>	<b>88</b>
0,2	<b>0,18 <math>\pm</math> 0,04</b>	<b>91</b>
0,4	<b>0,37 <math>\pm</math> 0,11</b>	<b>92</b>

Celý analytický proces byl testován také na reálném vzorku říční vody, který byl odebrán z řeky Moravy. Řeka protéká otevřenou krajinou, která je ve velké míře využívána pro zemědělskou a průmyslovou produkci. Vzorek byl nejdříve zfiltrován přes filtr Whatman (velikost pórů 1  $\mu\text{m}$ ), po přidavku paraquatu na výslednou koncentraci 0,1  $\mu\text{mol l}^{-1}$  byl homogenizován a analyzován pomocí SWV s LMGCE. Nalezená koncentrace v tomto vzorku byla 0,071  $\pm$  0,010  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Významně nižší výtěžnost (71 % v porovnání s 88 % ve vzorku deionizované vody) může být z velké části připsána adsorpci paraquatu na pevných či koloidních částicích v reálném vzorku, což má nepříznivý vliv na výsledky bez ohledu na použítou analytickou metodu. DPV na visící rtuťové kapkové elektrodě a HPLC s UV detekcí byly vybrány jako referenční metody pro stanovení paraquatu ve vzorku vody. Zatímco DPV poskytuje výsledky 0,061  $\pm$  0,008  $\mu\text{mol l}^{-1}$  bez použití prekoncentrace, pro analýzu pomocí HPLC bylo nutné vzorek vody nejdříve stokrát zakoncentrovat pomocí lyofilizace. Koncentrace paraquatu nalezená ve vzorku vody po lyofilizaci pomocí HPLC byla 0,050  $\pm$  0,010  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Výsledky všech tří metod mohou být považovány za vzájemně srovnatelné v rámci experimentální chyby. Nicméně, SWV s LMGCE poskytla nejlepší střední hodnotu ze všech výtěžností v reálném vzorku vody. Tato skutečnost ukazuje na znatelnou spolehlivost vyvinuté metody a otevírá cestu k mnoha dalším analytických aplikacím.

## 5. ZÁVĚR

---

Předložená disertační práce je věnována studiu agregačních vlastností přírodní fosfolipidové směsi ze sojových bobů (*Asolectinu*), především na pevném povrchu. Tento výzkum navazuje na předchozí studium vlastností *asolectinu* ve vodném prostředí a na jeho použití při vývoji nové metody přípravy liposomů bez použití organických rozpouštědel [47,46].

Nejdříve byl *asolectin* použit jako modifikátor uhlíkové pastové elektrody a takto připravená elektroda byla použita pro stanovení pesticidu paraquat ve vodě. Bylo zjištěno, že modifikovaná elektroda je citlivější při stanovení tohoto pesticidu. Tato vlastnost *asolectinu* byla dále využita pro modifikaci elektrody ze skelného uhlíku s cílem připravit na elektrodě vrstvu s vlastnostmi biomimetické membrány.

Vlastnosti *asolectinové* membrány byly studovány pomocí cyklické voltametrie a elektrochemické impedanční spektroskopie a bylo zjištěno, že navrženou metodou pokrývání vzniká na povrchu elektrody kompaktní fosfolipidová vrstva, která pokrývá celý povrch elektrody. Tloušťka vrstvy byla určena mikroskopií atomárních sil a činí  $7,1 \pm 1,2$  nm, což odpovídá tloušťce fosfolipidové dvojvrstvy v buněčných membránách. Dalšími experimenty bylo zjištěno, že připravená vrstva je stabilní nejméně 24 hodin a nedochází k jejímu narušování ani vlivem paraquat. Byla rovněž vyvinuta metoda pro odstranění lipidové vrstvy a obnovení čistého povrchu elektrody. Účinnost mechanického čištění v kombinaci s chemickým čištěním působením hexanu, methanolu a vody v ultrazvukové lázni byla kontrolována rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií.

Modifikovaná elektroda byla využita pro studium interakcí lipidové membrány s různými typy látek (ferokyanidové ionty, měďnaté ionty, paraquat). Lipidová membrána vykazuje selektivní propustnost pro lipofilní látky a umožňuje akumulaci paraquat a produktů jeho elektrochemické přeměny. Těchto vlastností bylo využito pro vytvoření elektrochemického sensoru, který s využitím square wave voltametrie umožnil stanovení paraquat s detekčním limitem  $2,2 \text{ nmol l}^{-1}$ . Vyvinutý sensor byl využit pro stanovení paraquat ve vzorku říční vody. Square wave voltametrie s nově vyvinutým senzorem, diferenčně pulzní voltametrie s visící rtuťovou kapkovou elektrodou a vysokoúčinná kapalinová chromatografie poskytly výtěžnosti 71, 61 a 50 %.

## 6. LITERATURA

---

1. Holmberg K., Jönsson B., Kronberg B., Lindman B.: Surfactants and Polymers in Aqueous Solution. John Wiley & Sons, Chichester 2003.
2. Sessa G., Weissman G., Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes, *J. Lipid Res.* 9 (1968) 310-318.
3. Guidelli R., Bioelectrochemistry of biomembranes and biomimetic membranes, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2017.
4. Gunstone F.D., Phospholipid technology and applications, Woodhead Publishing Limited, UK, 2008.
5. Winterhalter M., Black lipid membranes, *Curr. Opin. Colloid In.* 5 (2000) 250-255.
6. Tamm L. K., McConnell H. M., Supported phospholipid bilayers, *Biophys. J.* 47 (1985) 105-113.
7. Silin V. I., Wieder H., Woodward J. T., Valincius G., Offenhausser A., Plant A. L., The role of surface free energy on the formation of hybrid bilayer membranes, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 14676-14683.
8. McCabe I.P., Forstner M.B., Polymer supported lipid bilayers, *Open Journal of Biophysics* 3 (2013) 59-69.
9. Reimhult E., Kumar K., Membrane biosensor platforms using nano- and microporous supports, *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 82-89.
10. Köper I., Insulating tethered bilayer lipid membranes to study membrane proteins, *Mol. BioSyst.* 3 (2007) 651-657.
11. Tien H. T., Salamon Z., Formation of self-assembled lipid bilayers on solid substrates, *Bioelectroch. Bioener.* 22 (1989) 211-218.
12. Franzen U., Østergaard J., Physico-chemical characterization of liposomes and drug substance-liposome interactions in pharmaceuticals using capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A* 1267 (2012) 32-44.
13. Spangenberg T., De Mello N. F., Creczynski-Pasa T. B., Pasa A. A., Niehus H., AFM in-situ characterization of supported phospholipid layers formed by solution spreading, *Phys. Stat. Sol.* 201 (2004) 857-860.
14. Doménech O., Merino-Montero S., Montero M. T., Hernández-Borrell J., Surface planar bilayers of phospholipids used in protein membrane reconstitution: An atomic force microscopy study, *Colloid. Surface B* 47 (2006) 102-106.

15. Garcia-Manyes S., Oncis G., Sanz F., Effect of pH and ionic strength on phospholipid nanomechanics and on deposition process onto hydrophilic surfaces measured by AFM, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 5029-5036.
16. Nussio M. R., Voelcker N. H., Sykes M. J., McInnes S.J.P., Gibson Ch.T., Lowe R.D., Miners J. O., Shapter J. G., Lateral heterogeneities in supported bilayers from pure and mixed phosphatidylethanolamine demonstrating hydrogen bonding capacity, *Biointerphases* 3 (2008) 96-104.
17. Berquand A., Mingeot-Leclercq M.-P., Dufrene Y. F., Real-time imaging of drug-membrane interactions by atomic force microscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1664 (2004) 198-205.
18. Nussio M. R., Voelcker N. H., Miners J. O., Lewis B. C., Sykes M. J., Shapter J. G., AFM study of the interaction of cytochrome P450 2C9 with phospholipid bilayers, *Chem. Phys. Lipids* 163 (2010) 182-189.
19. Weronki K. J., Diez-Pérez I., Busquets M. A., López-Iglesias C., Girona V., Prat J., Interaction of lipidated GBV-C/HGV NS3 (513-522) and (505-514) peptides with phospholipids monolayer. An AFM study, *Colloid Surface B* 75 (2010) 25-33.
20. Asaka K., Tien H. T., Ottova A., Voltammetric study of charge transfer across supported bilayer lipid membranes (s-BLMs), *J. Biochem. Biophys. Methods* 40 (1999) 27-37.
21. Gu L., Wang L., Xun J., Ottova-Leitmannova A., Tien H. T., A new method for the determination of electrical properties of supported bilayer lipid membranes by cyclic voltammetry, *Bioelectroch. Bioener.* 39 (1996) 275-283.
22. Naumowicz M., Petelska A. D., Figaszewski Z. A., Impedance analysis of phosphatidylcholine-cholesterol system in bilayer lipid membranes, *Electrochim. Acta* 50 (2005) 2155-2161.
23. Liu X., Huang W., Wang E., An electrochemical study on the interaction of surfactin with a supported bilayer lipid membrane on a glassy carbon electrode, *J. Electroanal. Chem.* 577 (2005) 349-354.
24. Huang W., Zhang Z., Han X., Wang J., Tang J., Dong S., Wang E., Concentration-dependent behavior of nisin interaction with supported bilayer lipid membrane, *Biophys. Chem.* 99 (2002) 271-279.
25. Du L., Liu X., Huang W., Wang E., A study on the interaction between ibuprofen and bilayer lipid membrane, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 5754-5760.

26. Huang W., Zhang Z., Han X., Tang J., Wang J., Dong S., Wang E., Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy, *Biophys. J.* 83 (2002) 3245-3255.
27. Khodari M., Kauffmann J. M., Patriarche G. J., Ghandour M. A., Preconcentration and determination of promethazine at lipid-modified carbon paste electrode, *Electroanal.* 1 (1989) 501-505.
28. Kauffmann J. M., Chastel O., Quarin G., Patriarche G. J., Electrochemical behaviour of drugs at lipid modified carbon paste electrode, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 23 (1990) 167-175.
29. Reháč M., Šnejdárková M., Otto M., Application of biotin-streptavidin technology in developing a xanthine biosensor based on a self-assembled phospholipid membrane, *Biosens. Bioelectron.* 9 (1994) 337-341.
30. Šnejdárková M., Reháč M., Otto M., Design of a glucose minisensor based on streptavidin glucose-oxidase complex coupling with self-assembled biotinylated phospholipid membrane on solid support, *Anal. Chem.* 65 (1993) 665-668.
31. Nikoleli G.-P., Nikolelis D. P., Mathenitis C., Construction of a simple optical sensor based on air stable lipid film with incorporated urease for the rapid detection of urea in milk, *Anal. Chim. Acta* 675 (2010) 58-63.
32. Siontorou C. G., Nikolelis D. P., Krull U. J., A carbon dioxide biosensor based on hemoglobin incorporated in metal supported bilayer lipid membranes (BLMs): Investigations for enhancement of response characteristics by using platelet-activating factor, *Electroanal.* 9 (1997) 1043-1048.
33. Chastel O., Kauffmann J.-M., Patriarche G. J., Christian G. D., Hydrophobic stripping voltammetry using a lipid-modified glassy carbon electrode, *Anal. Chem.* 61 (1989) 170-173.
34. Grube A., Donaldson D., Kiely T., Wu L.: *Pesticides Industry Sales and Usage*, U. S. EPA, Washington (2011).
35. Fernandez M., Ibáñez M., Picó Y., Manes J., Spatial and temporal trends of paraquat, diquat and difenzoquat contamination in water from marsh areas of the Valencian community (Spain), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35 (1998) 377-384.
36. Roberts T.R. (Eds.): *Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part 1: Herbicides and Plant Growth Regulators*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1198, pp. 163.
37. Court of first instance in Case T-229/04 Sweden 2007.



38. Sorolla II M. G., Dalida M. L., Khemthong P., Grisdanurak N., Photocatalytic degradation of paraquat using nano-sized Cu-TiO<sub>2</sub>/SBA-15 under UV and visible light, *J. Environ. Sci.* 24 (2012) 1125-1132.
39. El Mhammedi M.A., Bakasse M., Chtaini A., Electrochemical studies and square wave voltammetry of paraquat at natural phosphate modified carbon paste electrode, *J. Hazard. Mater.* 145 (2007) 1-7.
40. Bacigalupo M. A., Meroni G., Mirasoli M., Parisi D., Longhi R., Ultrasensitive quantitative determination of paraquat: Application to river, ground and drinking water analysis in an agricultural area, *J. Agr. Food Chem.* 53 (2005) 216-219.
41. El Harmoudi H., Achak M., Farahi A., Lahrich S., El Gaini L., Abdennouri M., Bouzidi A., Bakasse M., El Mhammedi M. A., Sensitive determination of paraquat by square wave anodic stripping voltammetry with chitin modified carbon paste electrode, *Talanta* 115 (2013) 172-177.
42. Commission TE (2011) Commission Regulation (EU) No 520/2011.520/2011.
43. Dos Santos L. B. O., Infante C. M. C., Masini J. C., Development of a sequential injection-square wave voltammetry method for determination of paraquat in water samples employing the hanging mercury drop electrode, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 1897-1903.
44. Da Silva O. B., Machado S. A. S., Evaluation of the detection and quantification limits in electroanalysis using two popular methods: application in the case study of paraquat determination, *Anal. Methods* 4 (2012) 2348.
45. Součková J., Studium liposomů fyzikálně-chemickými metodami, disertační práce, Olomouc (2011).
46. Součková J., Skopalová J., Švecová H., Barták P., Fused-silica capillary dropping mercury electrode for electrocapillary measurements, *Electroanal.* 25 (2013) 174-178.
47. Megová M., Müller L., Barták P., Spontaneous revesiculation - new method for the preparation of liposomes, *Chemica* 47 (2007) 1-7.
48. Součková J., Plačková L., Skopalová J., Baizová P., Čáp L., Barták P., On GC/MS in phospholipid research I: Determination of fatty acid profile and phosphorus content, *Acta Univ. Palacki Olomouc, Fac. Rerum Natur. Chemica* 48 (2011) 1-7.
49. Součková J., Skopalová J., Švecová H., Čáp L., Bednář P., Barták P., On GC/MS in phospholipid research II: Investigation of liposome formation and liposome-water partitioning, *Acta Univ. Palacki Olomouc, Fac. Rerum Natur. Chemica* 48 (2011) 8-13.

50. Tomková H., Sokolová R., Opletal T., Kučerová P., Kučera L., Součková J., Skopalová J., Barták P., Electrochemical sensor based on phospholipid modified glassy carbon electrode - determination of paraquat, *článek v tisku*.
51. Riquelme M. A., Lucero M. A., Villagran M., Arevalo M. C., Hernandez-Creus A., Velez J. H., Aguirre M. J., Arce R., Ramirez G., Glassy carbon modified electrode: polymer and supramolecular assembly of Co(II)-[Tetra(O-aminophenyl)porphyrin] new material for electrocatalytic assays, *Int. J. Electrochem. Sci.* 7 (2012) 9738-9747.
52. Kalivoška V., Gál M., Lachmanová Š., Janda P., Sokolová R., Hromadová M., Nanoshaving of bovine serum albumin films adsorbed on monocrystalline surfaces and interfaces, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 76 (2011) 1075-1087.
53. Bulíčková J., Sokolová R., Adsorption of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine on Au (111) and HOPG, in: XXXIII. Modern Electrochemical Methods, Best servis Ústí n. L., 2013, pp 29-31.
54. Mitra K., Ubarretxena-Belandia I., Taguchi T., Warren G., Engelman D. M., Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol, *PNAS* 101 (2004) 4083-4088.
55. Babai-Cline M., Wightman J. P., Surface analysis and peel strength of aged, oxygen-plasma-modified unplasticized poly(vinyl chloride) films, *Int. J. Adhesion and Adhesives* 15 (1995) 185-190.
56. Švecová H., Součková J., Pyszková M., Svítková J., Labuda J., Skopalová J., Barták P., Phospholipid improve selectivity and sensitivity of carbon electrodes: Determination of pesticide Paraquat, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116 (2014) 1247-1255.
57. International Vocabulary of Metrology - Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM), 3rd Edn., 2008, version with minor corrections, JCGM 200:2012 (E/F), <<http://www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html>>.
58. Juhaniwicz J., Sek S., Atomic force microscopy and electrochemical studies of melittin action on lipid bilayers supported on gold electrodes, *Electrochim. Acta* 162 (2015) 53-61.
59. Lopes I. C., Souza D. D., Machado S. A. S., Tanaka A. A., Voltammetric detection of paraquat pesticide on a phtalocynine-based pyrolytic graphite electrode, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1907-1914.
60. Garcia L. L. C., Figueiredo-Filho L. C. S., Oliveira G. G., Fatibello-Filho O., Banks C. E., Square-wave voltammetric determination of paraquat using a glassy carbon

- electrode modified with multiwalled carbon nanotubes within a dihexadecylhydrogenphosphate (DHP) film, *Sensor Actuat. B-Chem* 181 (2013) 306-311.
61. Walcarius A., Lamberts L., Square wave voltammetric determination of paraquat and diquat in aqueous solution, *J. Electroanal. Chem.* 406 (1996) 59-68.
  62. Ribeiro J. A., Carreira C. A., Lee H. J., Silva F., Martins A., Pereira C. M., Voltammetric determination of paraquat at DNA-gold nanoparticles composite electrodes, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 7892-7896.
  63. El Mhammedi M. A., Achak M., Bakasse M., Bachirat R., Chtaini A., Accumulation and trace measurement of paraquat at kaolin-modified carbon paste electrode, *Mat. Sci. Eng. C* 30 (2010) 833-838.
  64. De Figueiredo-Filho L. C. S., Dos Santos V. B., Janegitz B. C., Guerreiro T. B., Fatibello O., Faria R. C., Marcolino L. H., Differential pulse voltammetric determination of paraquat using a bismuth-film electrode, *Electroanal.* 22 (2010) 1260-1266.
  65. Lu T.-H., Sun I.-W., Electrocatalytic determination of paraquat using a nafion film coated glassy carbon electrode, *Talanta* 53 (2000) 443-451.
  66. Tyszczyk-Rotko K., Beczkowska I., Nosal-Wiercinska A., Simple, selective and sensitive voltammetric method for the determination of herbicide (paraquat) using a bare boron-doped diamond electrode, *Diam. Relat. Mater.* 50 (2014) 86-90.
  67. Selva T.M.G., Araujo de W.R., Paixao da T.R.L.C., Non-invasive salivary electrochemical quantification of paraquat poisoning using boron doped diamond electrode, *Electroanal.* 27 (2015) 1642-1648.
  68. Khodari M., Voltammetric determination of the antidepressant trimipramine at a lipid-modified carbon-paste electrode, *Electroanal.* 5 (1993) 521-523.
  69. El-Maali N. A., Hassan F. M., Electrooxidation and determination of the antiinflammatory drugs piroxicam and tenoxicam at the carbon paste electrode, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 24 (1990) 155-163.

## CURRICULUM VITAE

---

Jméno, příjmení, titul: Hana Tomková, Mgr.  
Rodné příjmení: Švecová  
Datum a místo narození: 8. května 1987, Třebíč  
Bydliště: Na Kopci 14, Jihlava 586 01

### Vzdělání

---

2011–dosud	Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci <i>doktorské studium, obor Analytická chemie</i>
2009–2011	Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci <i>navazující magisterské studium, obor Analytická chemie</i>
2006–2009	Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci <i>bakalářské studium, obor Chemie</i>

### Zaměstnání

---

2016-dosud	vědecký pracovník, RCPTM, Katedra analytické chemie, UP v Olomouci
------------	--

### Stáže a odborné praxe

---

červenec–říjen 2015	Teva Pharmaceuticals ČR, s. r. o., Opava
duben–červen 2014	University of Fribourg, Fribourg, Švýcarsko
červenec 2011	Teva Pharmaceuticals ČR, s. r. o., Opava
únor 2011	Synthon s. r. o., Blansko
srpen 2010	Synthon s. r. o., Blansko
únor 2010	Teva Pharmaceuticals ČR, s. r. o., Opava
duben 2009	Vodárenská akciová společnost, a. s., Jihlava
červenec 2008	Státní veterinární ústav Jihlava

### Podíl na výzkumné činnosti, řešené projekty

---

Projekt Fondu Rozvoje Vysokých škol 1442/2013/G6 – Podpora analýzy reálných vzorků v praxi z analytické chemie – spoluřešitel

OP VK "Modulární výuka jako nástroj odezvy vzdělávacího systému na potřeby praxe"  
Registrační číslo projektu: CZ.1.07/2.2.00/28.0029 – člen týmu

Interní grantová agentura UP PrF\_2012\_020 - Selektivita a analýza složitých matic - člen týmu

Interní grantová agentura UP PrF\_2013\_030 - Úprava vzorku při analýze složitých matic - člen týmu

Interní grantová agentura UP IGA\_PrF\_2014031 - Matricový efekt a jeho vliv na výtěžnost analytického postupu - člen týmu

Interní grantová agentura UP IGA\_PrF\_2015\_020 - Matricový efekt a jeho potlačení při analýze vzorků - člen týmu

Interní grantová agentura UP IGA\_PrF\_2016\_016 - Bioanalýza a analýza potravin - člen týmu

Grantová agentura České republiky 17-05387S - Nové přístupy pro sledování přenosu zvolených xenobiotik přes biomimetické membrány (2017-2020) - člen týmu

## Odborné zaměření

---

elektroanalytické techniky, fosfolipidy, biosensory, analytická chemie, mikroskopie atomárních sil

## Pedagogická činnost

---

Laboratorní cvičení - Cvičení z analytické chemie, Aplikovaná analytická chemie, Laboratorní cvičení z analytické chemie

## Popularizační činnost

---

Přírodovědný jarmark Univerzity Palackého  
Univerzita dětského věku  
Univerzita třetího věku  
Dny otevřených dveří  
Exkurze a experimenty pro žáky ZŠ a studenty SŠ

## Souhrn publikační činnosti

---

- Součková J., Skopalová J., Švecová H., Čáp L., Bednář P., Barták P., On GC/MS in phospholipid research II: Investigation of liposome formation and liposome-water partitioning, Acta Univ. Palacki Olomouc, Fac. Rerum Natur. Chemica 48 (2011) 8-13.

- **Švecová H.**, Součková J., Skopalová J., Novotný R., Barták P., Studium agregace fosfolipidových molekul, Chem. Listy 106 (2012) 200-205.
- Součková J., Skopalová J., **Švecová H.**, Barták P., Fused-silica capillary dropping mercury electrode for electrocapillary measurements, Electroanal. 25 (2013) 174-178.
- **Švecová H.**, Součková J., Pyszková M., Svítková J., Labuda J., Skopalová J., Barták P., Phospholipid improve selectivity and sensitivity of carbon electrodes: Determination of pesticide Paraquat, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 116 (2014) 1247-1255.
- **Tomková H.**, Sokolová R., Opletal T., Kučerová P., Kučera L., Součková J., Skopalová J., Barták P., Electrochemical sensor based on phospholipid modified glassy carbon electrode - determination of paraquat, Anal. Chim. Acta (2017).

### **Impaktované časopisy mimo disertační práci:**

---

- Škríba A., Janková Š., Váňa J., Barták P., Bednář P., Fryčák P., Kučera L., Kurka O., Lemr K., Macíková P., Marková E., Nováková P., Papoušková B., Skopalová J., **Švecová H.**, Roithová J., Protonation sites and fragmentations of para-aminophenol, Int. J. Mass Spectrom. 337 (2013) 18 – 23.
- Kučerová P., Skopalová J., Kučera L., Táborský J., **Švecová H.**, Lemr K., Cankář P., Barták P., Electrochemical oxidation of 5-hydroxymethyl tolterodine and identification of its oxidation products using liquid chromatography and mass spectrometry, Electrochim. Acta 215 (2016) 617-625.
- Kučerová P., Komenská P., **Tomková H.**, Skopalová J., Barták P., Determination of lactose in milk products: a comparison of three-enzyme amperometric biosensor and gas chromatography/tandem mass spectrometry, Monatsh. Chem. 148 (2017) 517-524.
- Skopalová J., Barták P., Bednář P., **Tomková H.**, Ingr T., Lorencová I., Kučerová P., Papoušek R., Borovcová L., Lemr K., Carbon fiber brush electrode as a novel substrate for atmospheric solids analysis probe mass spectrometry: electrochemical oxidation of brominated phenols, Anal. Chim. Acta (2017).

### **Prezentace na konferencích formou posterů**

---

- **Švecová H.**, Marková E., Nováková P., Součková J., Skopalová J., Barták P.: Studium agregace fosfolipidů voltametričnými metodami, ACP 2012 - Súčasný stav a perspektívy analytickej chémie v praxi, Bratislava, 8.-11. 5. 2012.
- **Švecová H.**, Marková E., Součková J., Skopalová J., Barták P.: Aggregation of phospholipids and its influence on the selectivity of glassy carbon electrode, 29<sup>th</sup> International symposium on chromatography, Toruň, 9.-12. 9. 2012

- **Švecová H.**, Součková J., Svítková J., Labuda J., Skopalová J., Barták P.: Interaction of small molecules with a phospholipid layer supported on glassy carbon electrode, Symposium Phospholipids in pharmaceutical research, Heidelberg, 16.-17. 9. 2013.
- **Švecová H.**, Součková J., Marková E., Macíková P., Táborský J., Skopalová J., Barták P.: Influence of phospholipid layer on the selectivity of glassy carbon electrode for the determination of paraquat, 15<sup>th</sup> International conference on electroanalysis, Malmö, 11.-15. 6. 2014.

#### **Prezentace na konferencích formou přednášky**

---

- **Švecová H.**, Sokolová R., Součková J., Skopalová J., Barták P.: Phospholipid modified glassy carbon electrode and its application for determination of pesticides, XXXVI. Moderní elektrochemické metody, Jetřichovice, 23.-27. 5. 2016.