

# **Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra fyzikální chemie



## **MODIFIKACE UHLÍKOVÝCH VLÁKNOVÝCH ELEKTROD FOSFOLIPIDY**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor práce:

Veronika Müllerová

Vedoucí práce:

RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Studijní program:

B1407 Chemie

Studijní obor:

Aplikovaná chemie

Forma studia:

Prezenční

Olomouc 2018

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a další zdroje informací jsou řádně uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne .....

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za odborný dohled a všechny užitečné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat Radku Jergovi za neocenitelnou pomoc při práci v laboratoři. Chtěla bych také poděkovat Katedře fyzikální chemie za umožnění studia a Katedře analytické chemie za možnost vypracování této práce. Děkuji i svým rodičům za podporu během celého studia.

## **Bibliografická identifikace**

|                    |  |
|--------------------|--|
| Autor              | Veronika Müllerová   |
| Název práce        | Modifikace uhlíkových vláknových elektrod fosfolipidy  |
| Typ práce          | Bakalářská   |
| Pracoviště         | Katedra analytické chemie  |
| Vedoucí práce      | RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.  |
| Rok obhajoby práce | 2018   |
| Abstrakt           | <p>Bakalářská práce se zabývá vývojem vhodné metody pro modifikaci elektrod z uhlíkových vláken vrstvou fosfolipidů. Pomocí elektrochemické impedanční spektroskopie byl sledován rozdíl v odporu nepokryté a pokryté elektrody. Bylo zjištěno, že odpor pokryté elektrody je přibližně třicetkrát větší než u elektrody nepokryté. Modifikované elektrody byly použity pro měření kalibračních závislostí dopaminu a jeho metabolitu kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové (DOPAC) s využitím metod diferenční pulzní voltametrie a square-wave voltametrie. Byla prokázána akumulace dopaminu ve fosfolipidové vrstvě na rozdíl od DOPAC, u které k akumulaci nedochází.</p> |
| Klíčová slova      | fosfolipidy, dopamin, kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová, elektrody z uhlíkových vláken, asolectin  |
| Počet stran        | 53   |
| Jazyk              | Český  |

## **Bibliographic identification**

|                          |   |
|--------------------------|---|
| Author                   | Veronika Müllerová  |
| Title                    | Modification of carbon fibre electrodes with phospholipids  |
| Type of thesis           | Bachelor  |
| Department               | Department of Analytical Chemistry  |
| Supervisor               | RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.   |
| The year of presentation | 2018  |
| Abstract                 | <p>Bachelor thesis deals with the development of suitable method for modification of carbon fibre electrodes by phospholipid layer. The difference in resistance of uncoated and coated electrodes was monitored by means of electrochemical impedance spectroscopy. It was found that the resistance of the coated electrode is approximately 30 times higher than resistance of the uncoated electrode. Modified electrodes were used for the measurement of calibration dependencies of dopamine and its metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) using the methods of differential pulse voltammetry and square-wave voltammetry. Dopamine accumulation in the phospholipid layer has been demonstrated, as opposed to DOPAC, where accumulation does not occur.</p> |
| Keywords                 | phospholipids, dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, carbon fibre electrodes, asolectin   |
| Number of pages          | 53  |
| Language                 | Czech   |

# OBSAH

|   |    |
|---|----|
| 1 Úvod.....   | 8  |
| 2 Teoretická část .....                                 | 9  |
| 2.1 Uhlíková vlákna .....                               | 9  |
| 2.1.1 Výroba.....                                       | 9  |
| 2.1.2 Vlastnosti a struktura .....                      | 10 |
| 2.1.3 Využití v chemii.....                             | 10 |
| 2.1.4 Modifikace uhlíkových vláknových elektrod .....   | 11 |
| 2.2 Fosfolipidy v biologických membránách.....          | 12 |
| 2.3 Modelové fosfolipidové membrány .....               | 13 |
| 2.3.1 Planární fosfolipidové dvojvrstvy .....           | 14 |
| 2.3.2 Stabilizované fosfolipidové dvojvrstvy .....      | 16 |
| 2.3.3 Ukotvené fosfolipidové dvojvrstvy.....            | 17 |
| 2.3.4 Liposomy .....                                    | 18 |
| 2.4 Studované látky.....                                | 20 |
| 2.4.1 Dopamin a 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina ..... | 20 |
| 2.5 Použité metody.....                                 | 22 |
| 2.5.1 Cyklická voltametrie .....                        | 22 |
| 2.5.2 Elektrochemická impedanční spektroskopie.....     | 23 |
| 2.5.3 Diferenční pulzní voltametrie .....               | 24 |
| 2.5.4 Square-wave voltametrie.....                      | 24 |
| 3 Experimentální část.....                              | 26 |
| 3.1 Přístrojové vybavení.....                           | 26 |
| 3.2 Použité chemikálie .....                            | 26 |
| 3.3 Příprava roztoků .....                              | 27 |
| 3.4 Experimentální postupy .....                        | 27 |
| 3.4.1 Výroba elektrod.....                              | 27 |
| 3.4.2 Čištění a elektroaktivace elektrod .....          | 29 |
| 3.4.3 Modifikace elektrod .....                         | 29 |

|   |    |
|---|----|
| 3.4.4 Cyklická voltametrie .....                    | 30 |
| 3.4.5 Elektrochemická impedanční spektroskopie..... | 30 |
| 3.4.6 Kalibrační závislost DA a DOPAC.....          | 31 |
| 4 Výsledky a diskuse .....                          | 32 |
| 4.1 Modifikace elektrod .....                       | 32 |
| 4.1.1 Cyklická voltametrie .....                    | 32 |
| 4.1.2 Elektrochemická impedanční spektroskopie..... | 37 |
| 4.2 Kalibrační závislosti.....                      | 38 |
| 4.2.1 Dopamin.....                                  | 38 |
| 4.2.2 Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová.....        | 41 |
| 5 Závěr .....                                       | 44 |
| 6 Summary.....                                      | 45 |
| Seznam zkratk .....                                 | 46 |
| Seznam použité literatury .....                     | 48 |

# 1 ÚVOD

Fosfolipidy jsou základní součástí všech biologických membrán, jejichž hlavní funkcí je oddělení buňky od okolního prostředí, případně oddělení jednotlivých organel uvnitř buňky od cytosolu. Fosfolipidy mají amfipatický charakter, skládají se tedy z hydrofilní a hydrofobní části. Ve vodném roztoku dochází ke spojení hydrofobních částí, čímž se vytvoří dvojvrstva. Ta pak slouží jako polopropustná membrána, která v biologických systémech zajišťuje, obvykle prostřednictvím do ní zabudovaných membránových proteinů, přenos látek mezi buňkou a vnějším prostředím.

Pro studium fosfolipidových membrán se využívají tzv. modelové membrány, které vykazují velmi podobné vlastnosti jako membrány biologické. Existují různé způsoby pro přípravu několika typů modelových membrán, pomocí kterých lze studovat např. jejich strukturu, mechanické vlastnosti nebo propustnost pro některé látky. Důležité je také testování vzájemné interakce membrán s léčivými, které by mohlo pomoci při vývoji nových léků. Významně se však modelové membrány uplatňují při detekci biologicky aktivních látek.

Mezi tyto látky patří také dopamin (DA) a kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (DOPAC). DA se řadí mezi katecholaminy, což jsou neurotransmitery vznikající v centrální nervové soustavě. DOPAC je metabolitem DA, ze kterého vzniká enzymovou oxidační deaminací. DA je obsažen v mozkových buňkách, kde interaguje s membránovými lipidy. Jeho hlavními funkcemi jsou zajišťování správné regulace pohybu, kontrola emocí a kognitivní funkce jako je paměť nebo pozornost. Poruchy v neurotransmisí DA mohou způsobit vážná onemocnění jako je Parkinsonova choroba, Tourettův syndrom nebo schizofrenie. K nalezení vhodné léčby zmíněných nemocí by mohlo přispět studium vzájemného působení DA a lipidů uvnitř membrán. Pro poměrně rychlé stanovení DA v organismu se díky jeho snadné oxidaci nabízí využití elektrochemických metod.

Cílem této bakalářské práce je najít vhodnou metodu pro modifikaci elektrod z uhlíkových vláken vrstvou fosfolipidů a následně zjistit možnost detegovat DA a DOPAC pomocí takto modifikovaných elektrod.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Uhlíková vlákna

Uhlíková vlákna jsou materiál obsahující minimálně 92 % uhlíku, přičemž průměr jednoho vlákna se pohybuje v rozmezí 5-15 mikrometrů. Patří mezi jedny z nejdůležitějších technických vláken využívaných v různých kompozitních materiálech, a to především díky svým dobrým chemickým, elektrickým i mechanickým vlastnostem [1]. V průmyslu jsou hodně využívána pro vývoj lehkých a odolných materiálů v odvětvích jako je například letectví a kosmonautika, kde se z nich konstruuji vesmírné satelity, trysky raket, palubní mechanismy, tlakové nádoby na palivo nebo také potahy a sedačky. Dále také slouží k výrobě karoserií, výztuh nebo ojníc do závodních automobilů. Velkou výhodou je odolnost uhlíkových vláken vůči mořské vodě, čímž se rozšiřuje jejich aplikace i na konstrukci výztuh a stožárů do lodí. Dalšími produkty, k jejichž výrobě se využívají uhlíková vlákna, jsou umělé kosti nebo šlachy, turbíny do větrných elektráren nebo sportovní náčiní jako golfové hole, tenisové rakety a lyže [2].

#### 2.1.1 Výroba

Mezi hlavní tři prekurzory pro výrobu uhlíkových vláken patří dehet, polyakrylonitrilová vlákna a viskóza. V současné době se pro výrobu uhlíkových vláken používá nejčastěji polyakrylonitril, který obsahuje 68 % uhlíku. Další možností je výroba vláken z plynných uhlovodíků, jako je například methan nebo benzen. Takto vyrobená vlákna ale tvoří pouze malou část z celkového vyrobeného množství [3].

Přestože výroba uhlíkových vláken z několika různých prekurzorů vyžaduje i různé procesy zpracování a odlišné podmínky výroby, základní postup je velmi podobný. Obecně platí, že uhlíková vlákna jsou vyráběna pyrolýzou stabilizovaných prekurzorových vláken. Prekurzorová vlákna se tedy nejprve musí stabilizovat oxidačním procesem při teplotě 200-400 °C po dobu 30-120 minut. Následně proběhne proces karbonizace, kdy se stabilizovaná vlákna zahřívají při teplotě přibližně 1000 °C v inertní atmosféře za účelem odstranění vodíku, kyslíku, dusíku a dalších neuhlíkových prvků. Takto upravená vlákna mají obsah uhlíku 92 %. Karbonizovaná vlákna mohou být dále grafitizována až při teplotě

3000 °C, aby bylo dosaženo ještě vyššího obsahu uhlíku. Vlákná, která prošla procesem grafitizace, se nazývají grafitová vlákna a obsahují až 99 % uhlíku. [4]

V případě výroby z polyakrylonitrilových vláken je třeba po grafitizaci ještě provést oxidaci povrchu vláken. Tím dojde k jeho zhrubnutí, což zajistí lepší spojení s pojivem v kompozitních materiálech. [5]

### **2.1.2 Vlastnosti a struktura**

Vlastnosti uhlíkových vláken se odvíjejí od jejich struktury, což zahrnuje například velikost krystalitů, stupeň krystalinity, obsah uhlíku, množství defektů, vzdálenost mezi uhlíkovými vrstvami a také orientaci těchto vrstev [6]. Zároveň také použití různých prekurzorů a rozdílných postupů při zpracování vláken způsobuje odlišné mechanické vlastnosti. Obecně se dá ale říct, že uhlíková vlákna mají výborné tahové vlastnosti, nízkou hustotu, vysokou tepelnou stabilitu za nepřítomnosti kyslíku (až do 3000 °C), chemickou odolnost a dobrou tepelnou i elektrickou vodivost [4].

Struktura uhlíkových vláken může být buď turbostratická (tzn. neuspořádaná), grafitová nebo hybridní, která je kombinací obou struktur. Grafitovou strukturu lze získat výrobou vláken z dehtu, viskózy, popřípadě z plyných uhlovodíků, zatímco turbostratická struktura vzniká výrobou z polyakrylonitrilových vláken. V grafitové struktuře mají atomy uhlíku  $sp^2$  hybridizaci a jsou uspořádány ve tvaru pravidelného šestiúhelníku ve více vrstvách, které leží rovnoběžně s osou uhlíkového vlákna. Mezi jednotlivými vrstvami jsou atomy uhlíku vázány van der Waalovými silami, zatímco v rámci jedné vrstvy jsou vázány kovalentní vazbou nebo vazbou kovovou. Právě tyto rozdílné vazebné interakce způsobují vysokou pružnost v tahu ve směru uhlíkového vlákna. V turbostratické struktuře jsou vrstvy atomů uhlíku nepravidelně rozprostřené nebo mohou být různě složené, nakloněné a rozštěpené. Tato vlákna mají sice také menší krystality, ale zato u nich pozorujeme mnohem vyšší pevnost v tahu. Díky této vlastnosti jsou nejvíce využívanými vlákny právě ta polyakrylonitrilová oproti vláknům vyrobeným z dehtu nebo viskózy [4,6].

### **2.1.3 Využití v chemii**

Uhlíková vlákna jsou pro své vynikající elektrochemické vlastnosti vhodná k výrobě elektrod. Jedním z možných využití je aplikace uhlíkových mikroelektrod v amperometrických detektorech pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC).

Toto spojení umožňuje vylepšit detekční limity a v detektorech vykazují uhlíkové mikroelektrody vynikající citlivost a stabilitu signálu [7].

Uhlíkové elektrody nacházejí uplatnění také v oblasti biosenzorů. Příkladem je stanovení fenolických sloučenin, které jsou hlavním organickým odpadem v průmyslových odpadních vodách a mají škodlivé účinky na zvířata i rostliny. De Calvarho a kol. popisují stanovení hydrochinonu a pyrokatecholu za pomoci diferenční pulzní voltametrie (DPV) s elektrodou modifikovanou oxidem titaničitým [8]. Dále je lze aplikovat jako mikrosenzory pro stanovení hemoglobinu v krvi [9] nebo pro detekci peroxidu vodíku vylučovaného rakovinnými buňkami, což by mohlo pomoci při odhalení rakoviny již v raném stádiu [10]. Uhlíkové elektrody byly také použity k zajištění rychlejšího růstu bakterií v mikrobiálních palivových článcích, což jsou zařízení pro výrobu elektrické energie při čištění odpadních vod [11].

#### **2.1.4 Modifikace uhlíkových vláknových elektrod**

Jedním ze způsobů modifikace uhlíkových vláknových elektrod (CFE) je jejich pokrytí vodivými polymery. Ty slouží jako permselektivní bariéry, jejichž účelem je zlepšení selektivity senzorů a udržení stability elektrodové odezvy. Jamal a kol. popisují použití čtyř různých druhů monomerů pro výrobu kopolymerů, kterými modifikovali CFE a ty následně použili pro elektrochemickou detekci *p*-aminofenolu. Elektrody pokryté kopolymerem vykazovaly větší citlivost na *p*-aminofenol oproti elektrodám nepokrytým [12]. Xiang-Qin a kol. modifikovali CFE vrstvou cholinu, která byla následně pokryta tenkou vrstvou polymeru Nafionu. Takto modifikovanou elektrodu využili ke stanovení dopaminu v mozku živých myší. Vrstva Nafionu na vláknech elektrody zabraňovala interferenci signálu dopaminu se signály jiných koexistujících látek v mozku, jako je kyselina askorbová nebo kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová, která je metabolitem dopaminu. Elektroda má dobrou citlivost, stabilitu, odolnost proti interferencím, poskytuje rychlé odezvy, a proto je vhodná pro *in vivo* detekce [13].

Další možnou modifikací je pokrytí CFE elektrochemicky redukováným oxidem grafenu metodou elektrodopozice. Získaná elektroda byla použita pro současné stanovení kyseliny askorbové, kyseliny močové a dopaminu. Ve srovnání s nepokrytou CFE, modifikovaná elektroda prokazovala vyšší katalytickou aktivitu vůči elektrochemické

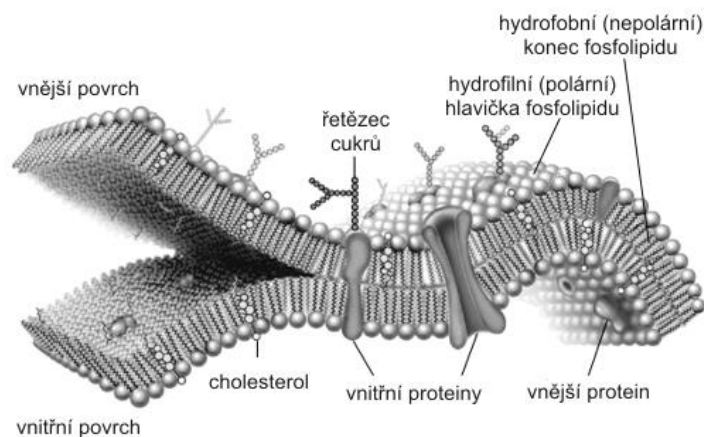
oxidaci všech tří látek. Zároveň také vykazovala dobrou stabilitu a je tedy vhodná pro opakované použití [14].

Salazar a kol. použili CFE modifikovanou berlínskou modří jako mikrobiosenzor při stanovení L-glutamátu v centrální nervové soustavě. Zároveň je možné tyto elektrody využít i pro detekci peroxidu vodíku, který vzniká působením enzymů, přímo v organismu. Pro zlepšení stability a selektivity byl použit polymer poly-*o*-fenylendiamin. Získaný mikrobiosenzor má vysokou citlivost, odolnost proti interferencím a také velmi malé rozměry, což může být výhodou při dalším studiu centrální nervové soustavy [15].

## 2.2 Fosfolipidy v biologických membránách

Biologické membrány patří mezi nejdůležitější součásti všech buněk. Jejich hlavní funkcí je oddělení některých organel od zbytku vnitřního prostoru buňky, a v případě prokaryotických buněk vymezuje biologická membrána celý obsah buňky. Další neopomenutelnou funkcí je přenos látek z vnějšího prostředí dovnitř buňky a naopak. Transport látek přes membránu zabezpečují membránové proteiny, které dovolují například některým sacharidům, vitamínům a aminokyselinám vstoupit do buňky a dále pak určitým metabolickým produktům vystoupit z buňky ven.

Základní stavební složkou všech biologických membrán jsou fosfolipidové dvojvrstvy (obr. 1). Molekuly fosfolipidů patří mezi amfipatické biomolekuly, mají tedy hydrofobní i hydrofilní charakter [16]. Hydrofilní molekuly obsahují ionty nebo polární skupiny, které ochotně reagují s vodou a tvoří s ní vodíkové můstky. V případě fosfolipidů obsahuje hydrofilní hlavička zpravidla fosfátovou skupinu, glycerol a také molekulu cholinu, protože nejvíce zastoupeným fosfolipidem je v lipidové membráně právě fosfatidylcholin. Hydrofobní molekuly naopak žádné polární skupiny ani nabitě atomy neobsahují, proto s vodou nereagují a snaží se interagovat s dalšími hydrofobními molekulami. Tuto vlastnost mají v molekule fosfolipidu dva uhlíkaté řetězce mastných kyselin vázaných esterovou vazbou na glycerol [17]. Ve vodném roztoku se tedy fosfolipidy formují do dvojvrstvy tak, že hydrofobní konce fosfolipidů se natočí k sobě, zatímco hydrofilní hlavičky směřují do vodného roztoku. Tím se vytvoří stabilní lipidová dvojvrstva, která slouží jako přirozená polopropustná bariéra [16,17].



*Obr. 1. Biologická membrána tvořená fosfolipidovou dvojrstvou [32].*

V lipidových dvojrstvách se kromě fosfolipidů nachází i další molekuly amfipatických lipidů, například glykolipidy, sfingolipidy nebo cholesterol [16]. Na množství cholesterolu silně závisí tekutost membrány, která je velmi důležitá pro její správnou funkci. Molekuly cholesterolu se dostávají do mezer mezi molekuly fosfolipidů, čímž dochází ke zpevnění membrány, a tedy i ke snížení její tekutosti. Tekutost membrány umožňuje fosfolipidům pohybovat se ve dvojrstvě, vyměňovat si navzájem svá místa, a tím zajistit například rovnoměrné rozdělení molekul při buněčném dělení nebo také rychlou interakci mezi membránovými proteiny. Míra tekutosti dále závisí na délce uhlíkových řetězců a na počtu dvojných vazeb. Čím je řetězec kratší a čím více dvojných vazeb obsahuje, tím je membrána tekutější [17].

## 2.3 Modelové fosfolipidové membrány

Kvůli složitosti přirozených biologických membrán se pro lepší pochopení jejich vlastností používají modelové fosfolipidové membrány. Ty zachovávají fyzikální vlastnosti lipidové dvojrstvy ve zjednodušeném systému a umožňují studovat funkce jednotlivých složek v membráně [18]. V závislosti na použití různých technik přípravy dvojrstev existuje několik typů modelových membrán. Patří mezi ně planární fosfolipidové dvojrstvy, stabilizované fosfolipidové dvojrstvy, ukotvené lipidové dvojrstvy a liposomy.

Při testování membrán se na základě konkrétních studovaných vlastností používají různé typy dvojrstev. Například pro testování textury a propustnosti membrán je vhodné použít planární fosfolipidové dvojrstvy, zatímco pro studium mechanických vlastností se používají především stabilizované dvojrstvy díky jejich vyšší stabilitě [19,20].

Mezi nejvíce používané metody pro charakterizaci membrán patří hlavně mikroskopie atomárních sil (AFM), fluorescenční mikroskopie (FM) a rentgenová difrakce [20]. Možné je i použití dalších spektrálních metod jako NMR spektroskopie a UV/VIS spektroskopie [21], nebo dále elektrochemických metod zahrnujících například elektrochemickou impedanční spektroskopii a voltametrii [22].

Modelové membrány mohou být využity jako součást elektrochemických detektorů pro detekci nebo průběžné sledování široké škály sloučenin například v potravinách nebo životním prostředí, protože poskytují rychlou odezvu a vysokou citlivost [23]. Největší uplatnění ale nalézají ve vývoji vysoce citlivých biosenzorů [24]. Příkladem může být detekce toxinu cholery pomocí chemiluminiscenčního biosenzoru na stabilizované fosfolipidové dvojvrstvě [25], nebo také detekce dopingových látek v moči [26]. Dále je lze aplikovat při testování interakce léků s biologickými membránami, což může mít velký vliv na vývoj nových léčiv nebo systémů pro podávání léků [27].

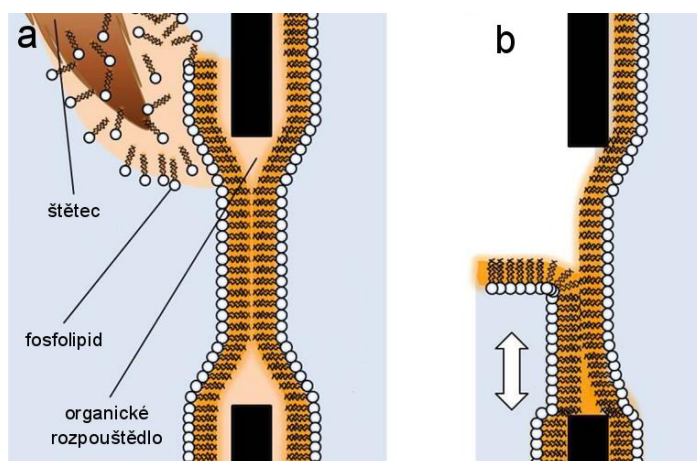
### **2.3.1 Planární fosfolipidové dvojvrstvy**

Planární fosfolipidové dvojvrstvy (p-PLB) jsou membrány o tloušťce v řádu mikrometrů až nanometrů vytvořené na hydrofobních porézních podkladech jako je teflon, nylon nebo polykarbonát [28]. Byly vyvinuty Muellerem v 60. letech 20. století a původně byly definovány jako černé lipidové membrány (BLM – black lipid membranes). Důvodem byl fakt, že se membrány pod mikroskopem v odraženém světle jevíly černě zbarvené. Tento jev je způsoben negativní interferencí světla, kdy světlo odražené od zadní strany dvojvrstvy interferuje se světlem odraženým od přední vrstvy. Tato skutečnost potvrzuje opravdu velmi malou tloušťku membrány [29].

První metodou pro přípravu BLM je natírací (tzv. „painting“) technika (obr. 2a). Dvě vodní nádrže jsou od sebe odděleny tenkou vrstvou hydrofobního materiálu (nejčastěji teflonu), která má uprostřed malý otvor o průměru v rozmezí 50-500  $\mu\text{m}$ . Roztok fosfolipidů v organickém hydrofobním rozpouštědle je poté štětcem nebo tyčinkou ručně nanesen přes tento otvor. Na povrchu se vytvoří hustý lipidový film a na rozhraní mezi organickou a vodnou fází na obou stranách filmu se spontánně zformuje lipidová monovrstva. Postupně dochází k samovolnému ztenčení této monovrstvy, kdy se ve středu otvoru vytvoří lipidová dvojvrstva, zatímco u okraje otvoru zůstane hustší lipidový film ve tvaru prstence. Tato metoda je sice poměrně rychlá, ale vytvořené membrány zpravidla

obsahují molekuly rozpouštědla, které mění tloušťku membrány a mohou ovlivnit i její tekutost [29].

Druhým způsobem pro vytvoření BLM je skládací (tzv. „folding“) technika (obr. 2b), kterou zavedli Montal s Muellerem [30]. Cílem bylo vyvinout metodu, při které by uvnitř vytvořených membrán nezůstávaly přebytečné molekuly rozpouštědla. Při této technice jsou opět potřeba dvě nádoby, mezi kterými se nachází tenká teflonová fólie s malým otvorem, který ale není v tomto případě ponořen do vody. Roztok lipidů je nanesen na hladinu, což umožňuje odpaření organického rozpouštědla a vytvoření lipidové monovrstvy. Poté se postupně zvedne vodní hladina v jedné nádobě, následně ve druhé, a jakmile otvor klesne pod hladinu, obě monovrstvy přicházejí do kontaktu a vytvoří dvojvrstvu spojením svých uhlíkatých řetězců [30,31].



**Obr. 2.** Příprava BLM natírací (a) a skládací (b) technikou [31].

Další metodou pro vytvoření BLM bez molekul rozpouštědla je Langmuir-Blodgett technika. Nejdříve je opět třeba na vodní hladinu nanést roztok fosfolipidů, které se samy uspořádají do monovrstvy. Následně dochází k postupnému stlačování monovrstvy pomocí pohyblivých stěn nádoby, což způsobí odstranění mezer mezi jednotlivými molekulami fosfolipidu. Přes vodní hladinu se vysune podkladový materiál, na který se naváže monovrstva fosfolipidů. Tím se vytvoří lipidový film (tzv. Langmuirův film), který má specifickou vnitřní strukturu a jednotnou tloušťku [32].

### 2.3.2 Stabilizované fosfolipidové dvojvrstvy

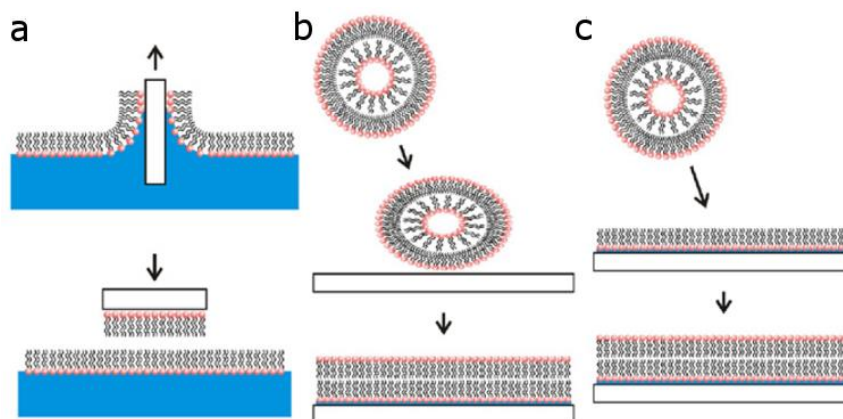
Stabilizované fosfolipidové dvojvrstvy (s-PLB) byly poprvé popsány McConnellem v 80. letech 20. století [32]. Jsou to membrány vytvořené na pevných rovných hydrofilních podkladech a jsou stabilnější než BLM. Tekutost membrány je udržována tenkou vodní vrstvou, která se nachází mezi substrátem a lipidovou membránou. Aby byla zachována kvalita membrány (tzn. vysoká tekutost a žádné defekty), je potřeba aby povrch substrátu byl čistý a hladký. Proto se pro vytváření s-PLB využívají materiály jako oxid křemičitý, borosilikátové sklo a slída [33,34].

Mezi nejznámější metody pro přípravu s-PLB patří technika splynutí váčků (tzv. „vesicle fusion“) a spojení metod Langmuir-Blodgett (LB) a Langmuir-Schaefer (LS). Metoda LB/LS (obr. 3a) využívá sjednocení dvou lipidových monovrstev (Langmuirových filmů). Hydrofilní substrát přechází z vodného prostředí přes stlačenou lipidovou monovrstvu na hladině do prostředí vzduchu, tím dojde ke kontaktu lipidových hlaviček se substrátem a hydrofobní konce fosfolipidů zůstanou volně orientované na povrchu. Vytvoří se tak první lipidová vrstva. Následně dojde k vertikálnímu (LB) nebo častěji k horizontálnímu (LS) zatlačení substrátu s první vrstvou přes druhou lipidovou vrstvu pod hladinu, čímž se na substrátu vytvoří fosfolipidová dvojvrstva [35]. Výhodou této metody je možnost kontrolovat pevnost vrstev a také vytvářet asymetrické lipidové dvojvrstvy, tedy aby každá z obou monovrstev měla různé lipidové složení. Tato asymetrie je právě důležitou vlastností přírodních fosfolipidových membrán [36].

Metoda splynutí váčků (obr. 3b) zahrnuje přípravu suspenze malých unilamelárních vezikul (SUV) o velikosti v rozmezí 25-80 nm, vytvořených buď sonikací nebo extruzí přes porézní filtr [36]. Tato suspenze je ponechána v kontaktu s pevným nosičem, čímž dojde k adsorpci vezikul na jeho povrch. V počátečních fázích adsorpce se jednotlivé vezikuly navzájem propojí. Následně dojde k jejich deformaci a poté prasknutí. Zformuje se tak lipidová dvojvrstva vzniklá srovnáním prasknutých vezikul do jedné roviny [34,36].

Další možností je kombinace obou předešlých metod. Spočívá ve vytvoření Langmuirovy monovrstvy a poté ve sloučení SUV s touto monovrstvou (obr. 3c). Tato metoda slouží k vytvoření asymetrických dvojvrstev a také zakomponování požadovaných membránových proteinů do této dvojvrstvy [34].





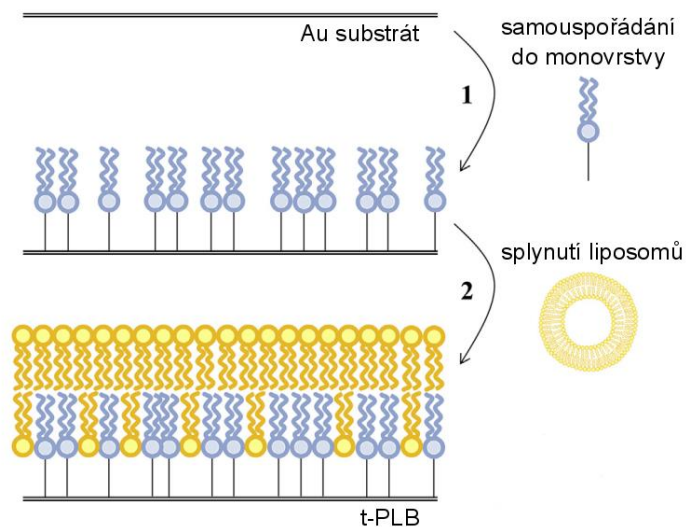
*Obr. 3. Tvorba s-PLB metodami LB/LS (a), metodou splnutí váček (b) a kombinací obou metod (c) [34].*

### 2.3.3 Ukotvené fosfolipidové dvojvrstvy

Ukotvené lipidové membrány (t-PLB) jsou membrány na pevném kovovém nosiči, kde je vnitřní vrstva lipidové membrány kovalentně spojena s povrchem substrátu přes kotvící jednotku. Tato vrstva se skládá z kotevních lipidů a spolu s kotvící jednotkou tvoří tzv. „spacer“ skupinu [37,38]. Ve většině případů se jako kotvící jednotky používají látky obsahující thiolovou skupinu a jako pevný nosič zlato. Známé je ale i použití hliníkových nebo křemíkových povrchů [39].

Mezi lipidovou dvojvrstvou a substrátem se nachází volný prostor, který umožňuje začlenění membránových proteinů a slouží jako zásobník pro transportované ionty a malé molekuly. Použitím vodivého povrchu tak lze elektrochemicky charakterizovat transportní vlastnosti proteinů [40].

Dříve se k vytvoření t-PLB používala metoda Langmuir-Blodgett, v současnosti se ale kvůli jednoduchosti a vysoké reprodukovatelnosti využívá technik založených na samouspořádání lipidových vrstev [32]. Příprava t-PLB začíná vytvořením vrstvy kotevních lipidů. Pevný nosič se ponoří do roztoku s lipidy, tím se lipidy kovalentně navážou na substrát a dojde k samovolnému uspořádání do monovrstvy. Následně se použije suspenze liposomů, kdy po kontaktu s vrstvou lipidů dojde k jejich splnutí a prasknutí, čímž se vytvoří lipidová dvojvrstva [37]. Vytvoření t-PLB znázorňuje obr. 4.

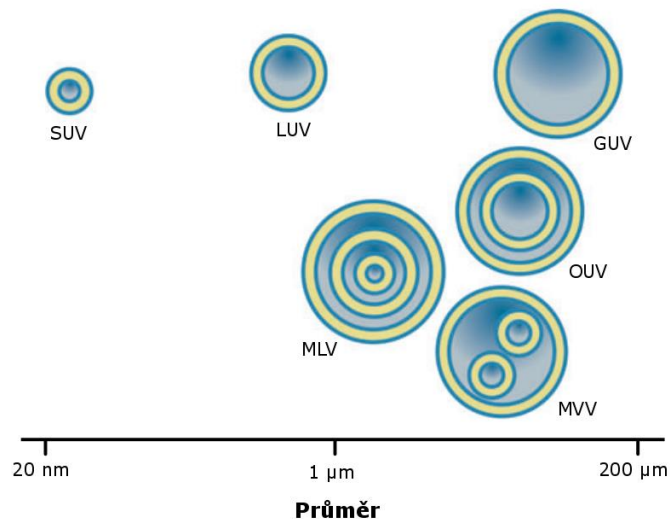


**Obr. 4.** Tvorba t-PLB [37].

### 2.3.4 Liposomy

Liposomy jsou definovány jako malé váčky o průměru v rozmezí od 30 nm do několika mikrometrů, které byly poprvé popsány v polovině 60. let Banghamem. Jsou tvořeny fosfolipidovými dvojvrstvami, které se samy uspořádají do kulovitých vezikul, přičemž uvnitř uzavírají část vodného roztoku [41].

Liposomy jsou z morfologického hlediska nejčastěji klasifikovány podle jejich velikosti a počtu lipidových dvojvrstev (tzv. lamel). Všechny typy liposomů lze vidět na obr. 5. Nejjednodušším typem jsou unilamelární vezikuly, které jsou tvořeny pouze jednou lipidovou membránou. Ze všech typů liposomů mají největší uplatnění pro analytické aplikace, protože jsou velmi snadno připravitelné a mají dobře charakterizované vlastnosti. Jsou rozděleny do tří velikostí, a to malé (SUV), velké (LUV) a obří (GUV) [42]. Liposomy obsahující více dvojvrstev se podle jejich počtu nazývají buď oligolamelární (OUV), které se skládají většinou z 5 dvojvrstev, nebo multilamelární (MLV), které obsahují přibližně 5-20 dvojvrstev [29]. MLV vykazují poměrně odlišné vlastnosti od vezikul unilamelárních a využívají se například v kosmetickém nebo farmaceutickém průmyslu. Posledním typem jsou multivezikulární vezikuly (MVV), což jsou liposomy, které uvnitř zapouzdřují další menší vezikuly [42].



*Obr. 5. Schématické znázornění rozdělení liposomů [42].*

Pro tvorbu liposomů bylo vyvinuto několik možných postupů. Jedna z obvyklých metod zahrnuje hydrataci tenkého filmu. Nejdříve se nechá z roztoku fosfolipidů za velmi nízkého tlaku odpařit organické rozpouštědlo, čímž se na substrátu (např. stěna nádoby) uchytlí fosfolipidová dvojitá vrstva. Následně se vysušený film znovu hydratuje vodným roztokem. Výsledná suspenze obsahuje MLV s rozdílnou velikostí vezikul a různým počtem lamel [42,43]. Z MLV se pak dále dají připravit další unilamelární vezikuly. Nejčastěji používanou metodou pro přeměnu MLV na SUV a LUV je membránová extruze, kde se suspenze MLV několikrát protlačí přes rovnoměrné válcové póry na polykarbonátové membráně. Výsledná velikost vezikul pak závisí na velikosti těchto pórů. Další je metoda sonikace, kdy ultrazvukové vlny narušují strukturu MLV a vytváří se vezikuly o velikosti 30-50 nm [43]. Alternativním způsobem přípravy SUV je technika injekce rozpouštědla. Roztok fosfolipidů v ethanolu se rychle vstříkne do roztoku pufru, kde pak spontánně dochází k tvorbě vezikul. Pro přípravu LUV existuje metoda odpaření reverzní fáze. Nejdříve se roztok fosfolipidů v organické fázi (většinou diethylether nebo isopropylether) hydratuje přidáním vody za intenzivního míchání [44]. Z vytvořené emulze se poté nechá za sníženého tlaku odpařit organická fáze a dojde k vytvoření suspenze obsahující LUV a MLV. Velikost a lamelarita vzniklých vezikul pak závisí na koncentraci fosfolipidů v roztoku [43]. K přípravě fosfolipidových liposomů neobsahujících zbytky organických rozpouštědel byla vyvinuta metoda spontánní revezikulace [45]. Tato metoda je založena na postupném titrování koncentrovaného vodného roztoku fosfolipidů do vodného prostředí. Při tomto procesu nejprve dochází k rozpadu velkých liposomů na

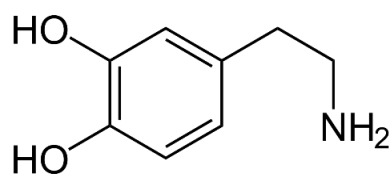
menší částice (micely), které se postupně se zvyšováním koncentrace fosfolipidů samovolně formují do liposomů.

Liposomy jsou netoxické, biokompatibilní a velmi snadno biologicky odbouratelné, proto se používají jako nosiče léčiv. Molekuly léčiva se uzavřou buď ve vnitřním prostoru liposomu, nebo uvnitř fosfolipidové dvojvrstvy. Liposomy jsou zároveň také neimunogenní a biologicky inertní, díky čemuž je léčivo transportováno na určené místo bez rychlé degradace a s minimálními vedlejšími účinky [46].

## 2.4 Studované látky

### 2.4.1 Dopamin a 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina

Dopamin (DA) patří do skupiny neurotransmiterů nazývaných katecholaminy, vznikajících v centrální nervové soustavě. Jejich charakteristickými strukturálními rysy je jádro katecholu (benzenové jádro se dvěma hydroxylovými skupinami v *ortho* poloze) a postranní řetězec ethylaminu nebo některého z jeho derivátů [47]. Struktura dopaminu je znázorněna na obr. 6.

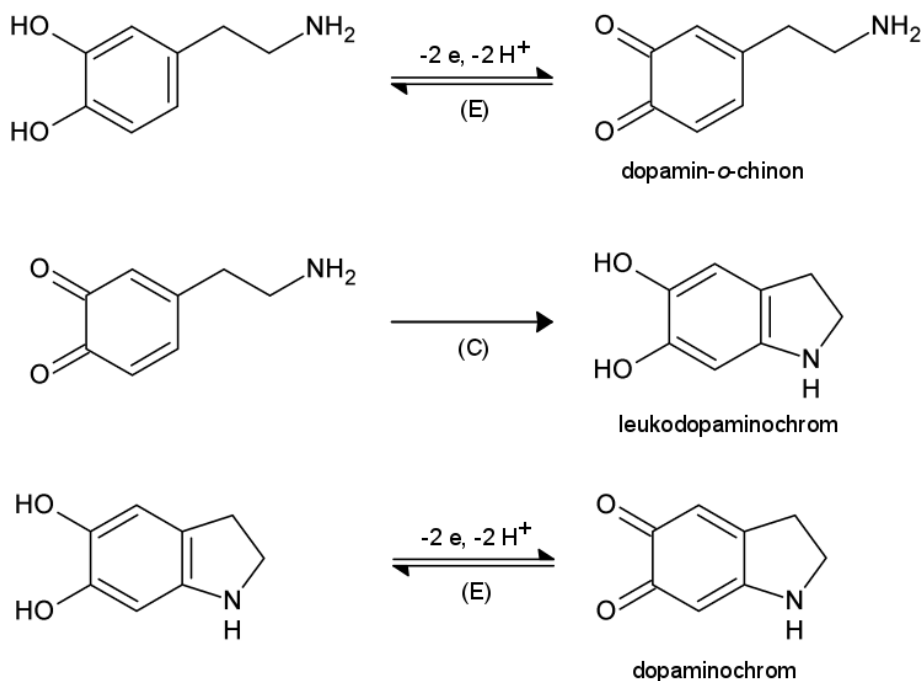


*Obr. 6. Dopamin.*

DA představuje přibližně 80 % obsahu katecholaminů v mozku [47]. Hraje důležitou roli ve čtyřech dopaminergních drahách a jeho funkcí je například regulace pohybu, neuroendokrinní sekrece nebo kontrola emocí a kognitivní funkce. Změny v neurotransmisi DA pak mohou způsobit mozkové dysfunkce. Například degenerace neuronů v jedné z dopaminergních drah přispívá ke vzniku Parkinsonovy choroby. Dalšími nemocemi způsobenými poruchou řízení dopaminergních přenosů jsou i Tourettův syndrom, schizofrenie a hyperprolaktinémie [48].

Pro včasnou diagnózu těchto onemocnění je tak nezbytné vyvinout jednoduchou a rychlou metodu stanovení DA v organismu. Protože se DA velmi snadno oxiduje, jsou pro jeho stanovení vhodné elektrochemické metody. Elektrochemická oxidace dopaminu

prochází třemi kroky (obr. 7). DA je v prvním kroku oxidován za vzniku dopamin-*o*-chinonu. Ve druhém kroku dojde k 1,4-adici a následné cyklizaci za vzniku leukodopaminochromu. Ten se poté v posledním kroku snadno oxiduje na dopaminochrom [49].



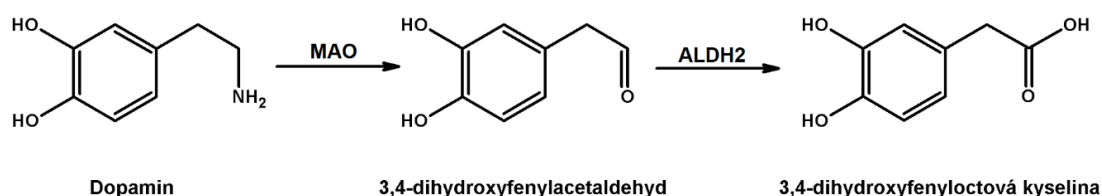
**Obr. 7.** Schéma oxidace dopaminu (*E* a *C* označují elektrochemický a chemický krok) [49].

Bylo však zjištěno, že elektrochemické stanovení DA je silně ovlivněno dvěma problémy. V důsledku akumulace oxidačních produktů na povrchu elektrody dochází k jeho pasivaci, čímž se zkomplikuje opakovatelnost stanovení DA. Dalším problémem je skutečnost, že v biologických systémech DA koexistuje s jinými snadno oxidovatelnými neurotransmitery, a to s kyselinou askorbovou a kyselinou močovou. Tyto látky se na elektrodách oxidují s velmi podobným oxidačním potenciálem jako dopamin, a dochází tedy k interferenci voltametričského signálu oxidace DA a signálu těchto kyselin [50]. Pro řešení zmíněných problémů je možné jako senzory DA použít uhlíkové elektrody modifikované polymerními filmy. Získané elektrody jsou pak charakterizovány vysokou citlivostí, selektivitou a chemickou stabilitou filmů. [49].

Dopamin, stejně jako všechny neurotransmitery, je obsažen v lipidových membránových strukturách a s těmito lipidy také interaguje. Studium chování DA a jeho interakcí s lipidy v mozkových buňkách by tedy mohlo pomoci při rozvoji léčby

onemocnění spojených se špatnou funkcí dopaminergních drah, a to prostřednictvím apoptózy (buněčné smrti) poškozených neuronů biochemickými způsoby [51].

Jedním z metabolických produktů dopaminu je 3,4-dihydroxyfenylactová kyselina (DOPAC). Ta vzniká z dopaminu oxidační deaminací za působení enzymu monoaminoxidasy a následné oxidace zprostředkované aldehyddehydrogenasou (obr. 8). Při metabolismu dopaminu je důležitá, především v souvislosti s Parkinsonovou chorobou, přeměna vznikajícího meziprojektu 3,4-dihydroxyfenylacetaldehydu (DOPAL). Tento meziprojekt je endogenní neurotoxin, který je toxický pro dopaminergní buňky a způsobuje degeneraci neuronů. Bylo dokázáno, že jedním z faktorů patogeneze Parkinsonovy choroby je i oxidační stres, který je příčinou vzniku řady reaktivních látek, mezi které patří např. 4-hydroxy-2-nonenal. Ten je inhibátorem mitochondriální aldehyddehydrogenasy a může tedy napomáhat při rozvoji Parkinsonovy choroby [52].

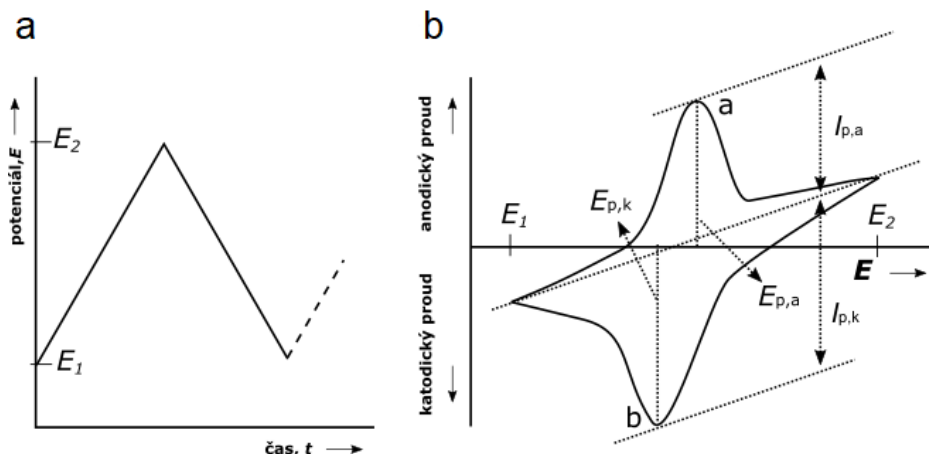


*Obr. 8. Oxidace dopaminu na kyselinu 3,4-dihydroxyfenylactovou přes meziprojekt 3,4-dihydroxyfenylacetaldehyd [52].*

## 2.5 Použité metody

### 2.5.1 Cyklická voltametrie

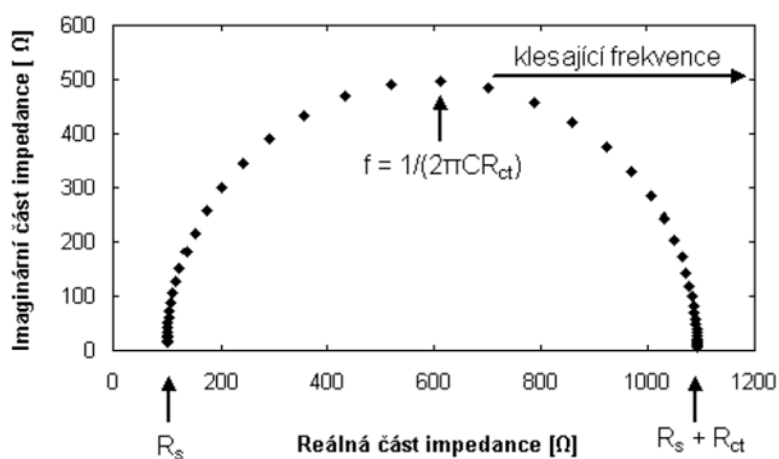
Cyklická voltametrie (CV) je elektrochemická metoda, při které se na pracovní elektrodu v nemíchaném roztoku aplikuje počáteční potenciál, který se dále lineárně zvyšuje až k tzv. přepínacímu potenciálu, odkud se začne snižovat zpět k počáteční hodnotě [53]. Na obr. 8a je znázorněn trojúhelníkový průběh vkládaného potenciálu na pracovní elektrodu. Měření lze podle potřeby provádět v jednom nebo v několika cyklech. Výsledný cyklický voltamogram (obr. 8b) představuje závislost proudové odezvy na vloženém potenciálu. CV lze využít při studiu mechanismu elektrodoých reakcí, např. z průběhu katodických a anodických křivek lze posoudit reverzibilitu reakce [54].



**Obr. 9.** a) trojúhelníkový průběh potenciálu při CV, b) cyklický voltamogram (pík a představuje oxidaci elektroaktivní látky a pík b její zpětnou redukci) [54].

## 2.5.2 Elektrochemická impedanční spektroskopie

Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS) je metoda, která spočívá ve vkládání střídavého napětí s určitou amplitudou a proměnlivou hodnotou frekvence na pracovní elektrodu, přičemž se měří proudová odezva. Rozsah frekvencí střídavého napětí se zpravidla pohybuje v rozmezí od 1 MHz po 0,1 mHz a v průběhu měření se frekvence postupně snižuje od nejvyšší k nejnižší. Nejpoužívanějšími grafy pro zobrazení dat jsou Nyquistův a Bodeho graf. Nyquistův graf zobrazuje závislost imaginární složky impedance na její reálné složce (obr. 10), zatímco Bodeho graf znázorňuje závislost absolutní hodnoty impedance na frekvenci nebo fázového posunu na frekvenci.

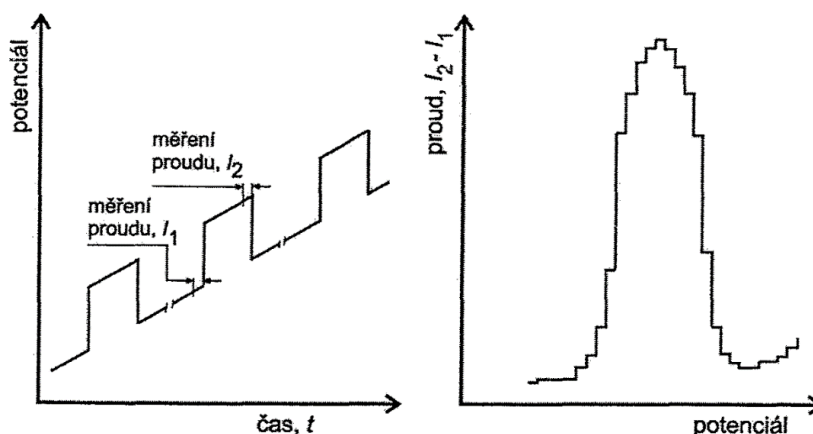


**Obr. 10.** Nyquistův graf pro Randlesův obvod [55].

Pro vyhodnocení naměřených dat je třeba najít ekvivalentní obvod popisující daný systém a jemu odpovídající křivkou proložit naměřená data. Ekvivalentní obvod je složen ze sériově a paralelně zapojených elektrických prvků jako je rezistor, kondenzátor a cívka. Existují ale i prvky specifické pouze pro elektrochemii, mezi které patří např. Warburgova nebo Gerishova impedance. Nejjednodušším ekvivalentním obvodem je tzv. Randlesův obvod [55,56].

### 2.5.3 Diferenční pulzní voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie (DPV) je elektrochemická metoda, která je založena na vkládání potenciálu na pracovní elektrodu lineárně rostoucího s časem. Na tento potenciál (tzv. potenciálovou rampu) se v určitých časových intervalech (řádově desítky milisekund) vloží napěťový puls o amplitudě 10-100 mV, přičemž se měří proud těsně před vložením a na konci pulsu po dobu 10-100 ms. Grafem je pak závislost rozdílu těchto dvou proudových hodnot na vloženém potenciálu, která má tvar píku (obr. 11) [54].



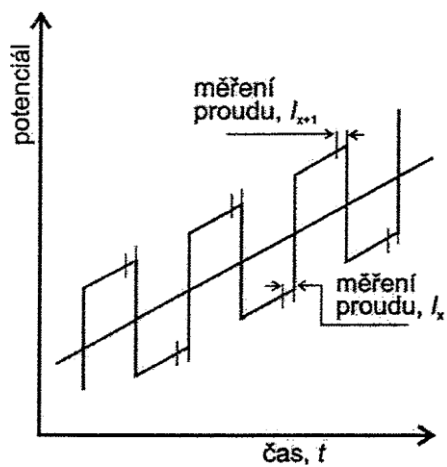
Obr. 11. Potenciálový program a odpovídající proudová odezva při DPV [54].

### 2.5.4 Square-wave voltametrie

Při square-wave voltametrii (SWV) se stejně jako u DPV na pracovní elektrodu vkládá potenciál lineárně rostoucí s časem modulovaný napěťovými pulsy. Ty jsou ale na rozdíl od DPV pozitivní nebo negativní vzhledem k potenciálové rampě a mají nízkou amplitudu (10–50 mV). Proud se snímá na konci každého vloženého pulsu (pozitivního i negativního) po dobu asi 2 ms a proudové hodnoty pozitivního pulsu a předchozího negativního pulsu se od sebe odečtou (obr. 12). Voltamogram tedy opět představuje rozdíl proudů vyneseny



proti potenciálu. Ve srovnání s DPV je SWV mnohem rychlejší a citlivější metodou, zároveň dokáže pracovat i při rychlých změnách potenciálu [54,57].



*Obr. 12. Potenciálový program při SWV [54].*

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Přístrojové vybavení

Žihání uhlíkových vláken pro následnou tvorbu uhlíkových vláknových elektrod (CFE) probíhalo v muflové peci LE 15/11 (LAC, Hrušovany u Brna, Česká republika). Při čištění CFE byly použity ultrazvukové lázně Sonorex Digitec (Bandelin, Berlín, Německo) a Sonic 6 (Polsonic, Varšava, Polsko).

Pro všechna měření byl použit přístroj Autolab PGSTAT128N (Metrohm Autolab, Utrecht, Nizozemsko) se softwarem Nova (verze 1.10 a 1.11) (Metrohm Autolab, Utrecht, Nizozemsko). Pracovalo se v tříelektrodovém zapojení s CFE jako pracovní elektrodou, referentní argentchloridovou elektrodou a pomocnou platinovou elektrodou.

Pro přípravu fosfátového pufru a kontrolu jeho pH byl využíván pH metr inoLab pH 720 (WTW, Weilheim, Německo) se skleněnou elektrodou SenTix 41 (WTW, Weilheim, Německo). Většina navážek pro přípravu roztoků byla provedena na vahách Kern ALS 220-4 (Kern&Sohn, Balingen, Německo). Pro navážku DA a DOPAC byly použity váhy XSE205 Dual Range (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA).

### 3.2 Použité chemikálie

Pro modifikaci CFE byl použit asolectin – směs fosfolipidů získaná ze sojových bobů s obsahem fosfatidylcholinu přibližně 25 % (Fluka, Buchs, Švýcarsko). Pro experimenty byly použity dopamin hydrochlorid p.a. a kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová p.a. Obě látky byly získány od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo).

Dalšími použitými chemikáliemi byly aceton p.a. (Lach-ner, Neratovice, Česká republika), methylalkohol p.a. (Penta, Chrudim, Česká republika), hexan p.a. (Lach-ner, Neratovice, Česká republika), kyselina sírová 96% p.a. (Penta, Chrudim, Česká republika), chlorid sodný p.a. (Lach-ner, Neratovice, Česká republika), kyselina orthofosforečná 85% p.a. (Penta, Chrudim, Česká republika), chlorid draselný p.a. (Úředně autorizovaný výzkumný a zkušební ústav Spolku pro chemickou a hutní výrobu, národní podnik Pardubice), hydroxid sodný (Lach-ner, Neratovice, Česká republika), ferrikyanid

draselný p.a. a ferrokyanid draselný p.a. (obě látky od společnosti Lachema, Brno, Česká republika).

### 3.3 Příprava roztoků

Pro přípravu roztoku asolectinu bylo třeba rozpustit odpovídající množství této látky v hexanu. Byly použity roztoky o koncentracích 3 mg/ml, 10 mg/ml a 20 mg/ml.

Roztok asolectinu ve vodě o koncentraci 8 g/l byl připraven nejdříve rozpuštěním potřebného množství látky v malém objemu destilované vody. Roztok byl třepán na třepačce Vibramax 100 (Heidolph, Schwabach, Německo) po dobu nejméně 12 hodin a poté byl doplněn destilovanou vodou na požadovaný objem. Roztok vydržel stabilní nejdéle po dobu 1 týdne. Pro experimentální měření byl použit zředěný roztok o koncentraci 1,2 g/l.

Fosfátový pufr o pH 6,5 byl připraven z kyseliny orthofosforečné o koncentraci 0,1 mol/l a z 50% hydroxidu sodného.

Roztoky dopaminu a kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové byly připraveny rozpuštěním daného množství látky v deionizované vodě (Milipore, 18,2 M $\Omega$ ). Byl použit roztok dopaminu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l, v případě DOPAC měl roztok koncentraci  $1 \cdot 10^{-2}$  mol/l.

Ostatní roztoky byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího množství látky v destilované vodě.

## 3.4 Experimentální postupy

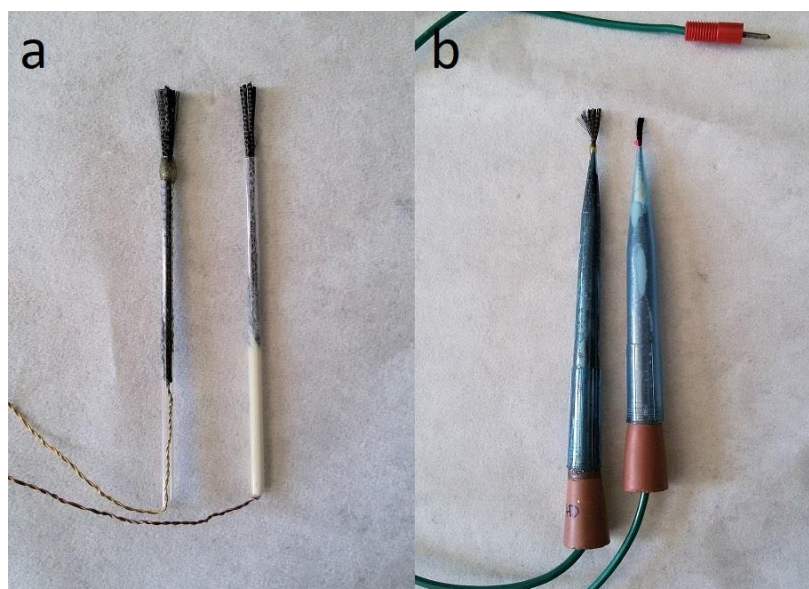
### 3.4.1 Výroba elektrod

Pro výrobu elektrod byla použita uhlíková vlákna z grafitové tkaniny KTC-03 (Karbotechnik, Plzeň, Česká republika), která byla nejprve vyžehána v muflové peci při 500 °C po dobu 30 minut. Následně byly vyrobeny celkem dva druhy elektrod.

Prvním druhem jsou elektrody skládající se z uhlíkového vlákna a měděného drátku uzavřené uvnitř skleněné kapiláry (CFBE – carbon fibre brush electrode) (obr. 13a). K jednomu nebo ke dvěma svazkům uhlíkových vláken byl v jejich středu připojen

měděný drátek tak, aby bylo možné jej zakroutit okolo vláken a vytvořit spirálu. Drátek spojený s vlákny byl zasunut do skleněné kapiláry SMP 1/4 Stuart (Cole-Parmer, Stone, Velká Británie) tak, aby uvnitř zůstaly přibližně 3 cm délky vláken, přičemž vnější část vláken byla odštíhnutá v délce 0,8–1 cm od ústí kapiláry. Následně byly elektrody zalepeny, přičemž byly použity dva druhy lepidel. Prvním z nich bylo epoxidové lepidlo Epoxiceys standard (Ceys, Český Brod, Česká republika). Vlákna byla povytažena z kapiláry, poté na ně byla nanášena vrstva lepidla a následným vtažením vláken zpět do kapiláry došlo k navrstvení lepidla u okraje kapiláry. Dalším druhem lepidla byl silikonový tmel Lukopren N1522 + Katalyzátor N (Lučební závody, Kolín, Česká republika). Prostřednictvím injekční stříkačky byl vyplněn vnitřní prostor kapiláry od jejího ústí po začátek měděného drátku.

Druhým typem elektrod jsou elektrody vyrobené ze špiček pro pipety (CFTE – carbon fibre tip electrode) (obr. 13b). Dva svazky uhlíkových vláken byly uprostřed svázány nití, pomocí které byly následně protaženy ústím špičky. Stejně jako u CFBE byly k zalepení elektrod použity epoxidové lepidlo a silikonový tmel, které byly dovnitř špičky nanášeny za pomoci injekční stříkačky. Celý vnitřní prostor špičky byl vyplněn grafitovými vločkami (Sigma-Aldrich, Buchs, Švýcarsko). Širší konec špičky byl utěsněn pryžovou zátkou s měděným drátem jako elektrickým kontaktem.



**Obr. 13.** Vyrobené elektrody z uhlíkových vláken. a) CFBE, b) CFTE.

### 3.4.2 Čištění a elektroaktivace elektrod

Před každým měřením a modifikací elektrod vrstvou fosfolipidů bylo třeba odstranit nečistoty z povrchu elektrod. Čištění probíhalo v ultrazvukové lázni ve čtyřech různých rozpouštědlech, v každém z nich byla elektroda sonifikována 15 minut. Použitými rozpouštědly byly aceton, hexan, methanol a destilovaná voda.

Každou nově vytvořenou elektrodu bylo třeba elektrochemicky aktivovat. Použit byl roztok kyseliny sírové (0,1 mol/l). Elektroaktivace probíhala s použitím následujících parametrů:

- Rychlost scanu: 0,5 V/s
- Potenciálový rozsah: od -1,7 V do 1,7 V
- Počet cyklů: 50

### 3.4.3 Modifikace elektrod

Nejprve byla elektroda vyčištěna rozpouštědly v ultrazvukové lázni. Následně byla provedena preanodizace, kdy byl na pracovní elektrodu v roztoku NaCl o koncentraci 9 g/l vkládán potenciál 1,5 V po dobu 3 minut. Elektroda byla opláchnuta destilovanou vodou a sušena proudem dusíku po dobu 1 hodiny. Pro samotné pokrývání elektrod bylo vyzkoušeno několik postupů.

Při prvním postupu (postup A) byla vysušená elektroda ponořena na 1 minutu do roztoku asolectinu v hexanu. Vyzkoušeno bylo více koncentrací roztoku, konkrétně 3 mg/ml, 10 mg/ml a 20 mg/ml. Po vytažení z roztoku asolectinu byla elektroda vložena do roztoku NaCl (9 g/l) po dobu 30 minut z důvodu zformování a stabilizace fosfolipidové vrstvy. Následně byla elektroda lehce opláchnuta ponořením do kádinky s destilovanou vodou.

Při postupu B byla použita magnetická míchačka s ohřevem Hei-Standard (Heidolph, Schwabach, Německo). Na tuto míchačku byl umístěn roztok asolectinu v hexanu (20 mg/ml), do kterého byla vložena elektroda. Byla měněna doba ponoření elektrody v roztoku. Prvním způsobem bylo ponoření elektrody do roztoku na 1 minutu za stálého míchání. Při druhém způsobu byla celková doba ponoření v roztoku 5 minut, přičemž pouze první minutu byl roztok míchán. Následovalo opět formování a stabilizace vrstvy v NaCl (9 g/l) a oplach destilovanou vodou.

Při postupu C byla elektroda po vysušení nejdříve hydrofobizována ponořením do roztoku asolectinu v hexanu (20 mg/ml) na 15 sekund. Následně byla vložena do roztoku asolectinu ve vodě o koncentraci 1,2 g/l po dobu 1 hodiny. Stejně jako v předchozích postupech byla elektroda vložena do roztoku NaCl (9 g/l) na 30 minut a opláchnuta destilovanou vodou.

Postup D spočíval v ponoření vysušené elektrody do roztoku asolectinu v hexanu (20 mg/ml), po 1 minutě byla elektroda z roztoku vyjmuta a hexan na jejím povrchu se nechal odpařit. Ponoření a následné vyjmutí z roztoku bylo opakováno ještě dvakrát. Elektroda byla vložena do roztoku ferrikyanidu draselného (1 mmol/l) a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l) na 30 minut.

#### **3.4.4 Cyklická voltametrie**

Cyklická voltametrie byla použita pro testování kompaktnosti fosfolipidové dvojvrstvy na povrchu elektrody. Pro srovnání byla vždy měřena i nepokrytá elektroda. Při modifikaci elektrod podle postupů A, B a C probíhalo měření v roztoku ferrokyanidu draselného (5 mmol/l) a ferrikyanidu draselného (5 mmol/l) v KCl o koncentraci 1 mol/l. Pro měření po modifikaci postupem D byl použit roztok ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) a ferrikyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l). Nastavené parametry při této metodě:

- Rychlost scanu: 30 mV
- Potenciálový rozsah: od -0,3 V do 0,7 V

#### **3.4.5 Elektrochemická impedanční spektroskopie**

Pro měření EIS byl použit roztok ferrokyanidu draselného (5 mmol/l) a ferrikyanidu draselného (5 mmol/l) v KCl (1 mol/l). Hodnota konstantního potenciálu byla odečtena z cyklického voltamogramu zaznamenaného se stejnou elektrodou před měřením EIS. Nastavení parametrů pro tuto metodu:

- Počet frekvencí: 50
- Rozsah frekvencí (nepokrytá elektroda): 30 kHz – 1 Hz
- Rozsah frekvencí (pokrytá elektroda): 300 kHz – 0,1 Hz
- Konstantní potenciál (nepokrytá elektroda): 0,230 V
- Konstantní potenciál (pokrytá elektroda): 0,250 V
- Amplituda: 10 mV

### 3.4.6 Kalibrační závislost DA a DOPAC

Pro měření kalibračních závislostí DA a DOPAC byly použity metody diferenční pulzní voltametrie a square-wave voltametrie. Kalibrační řada byla měřena s nepokrytou i pokrytou elektrodou. Základním elektrolytem (ZE) byl fosfátový pufr o pH 6,5, ke kterému byla postupně přidávána malá množství sledované látky. S každým přídatkem byl po 30 s promíchání změřen záznam DPV i SWV. Pro dopamin měla kalibrační řada rozmezí koncentrací  $5 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l. V případě DOPAC byla kalibrační řada měřena pro koncentrace v rozmezí  $5 \cdot 10^{-5}$  až  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l. Parametry nastavené pro měření kalibrační závislosti metodou DPV:

- Rychlost scanu: 0,02 V/s
- Potenciálový rozsah: od -0,1 V do 0,8 V
- Amplituda pulsu: 0,05 V
- Doba trvání pulsu: 0,08 s

Parametry nastavené pro měření kalibrační závislosti metodou SWV:

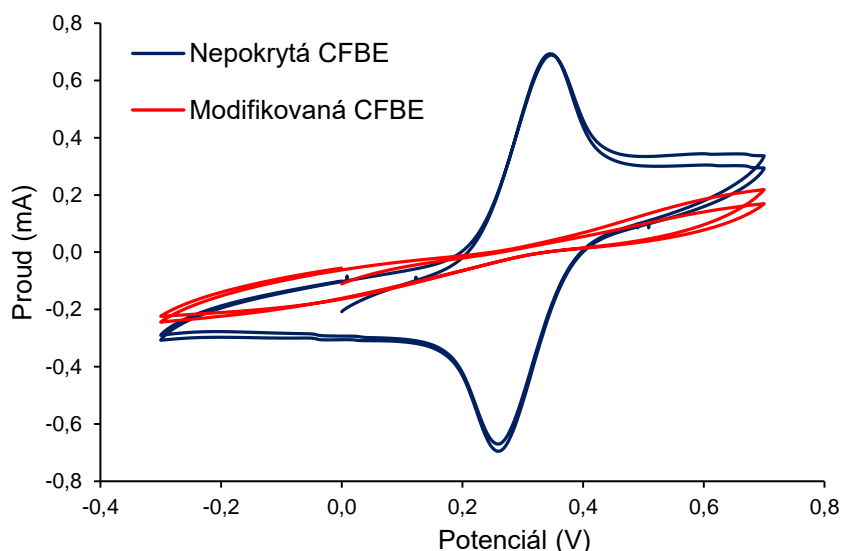
- Rychlost scanu: 0,02 V/s
- Potenciálový rozsah: od -0,1 V do 0,8 V
- Amplituda: 0,05 V
- Frekvence: 10 Hz

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Modifikace elektrod

#### 4.1.1 Cyklická voltametrie

Cyklickou voltametrií bylo kontrolováno pokrytí elektrody fosfolipidovou vrstvou. Pro modifikaci byla v tomto případě použita CFBE a pokrytí probíhalo podle postupu A. Nejvíce se osvědčila koncentrace roztoku asolectinu 20 mg/ml, ostatní koncentrace nebyly dostatečné pro pokrytí celého povrchu elektrody. Záznam cyklických voltamogramů naměřených s nepokrytou i s modifikovanou elektrodou je zobrazen na obr. 14. Při měření s nepokrytou CFBE lze v grafu vidět píky, které odpovídají oxidaci ferrokyanidu a zpětné redukci vzniklého ferrikyanidu. Rozdíl potenciálů anodického a katodického píku je 89 mV. Na křivce odpovídající modifikované CFBE naopak nejsou viditelné žádné píky. Je to způsobeno tím, že hydrofobní vrstva fosfolipidů zabránila průniku elektroaktivních aniontů z roztoku k povrchu elektrody, kde tak nemůže dojít k jejich elektrochemické přeměně.



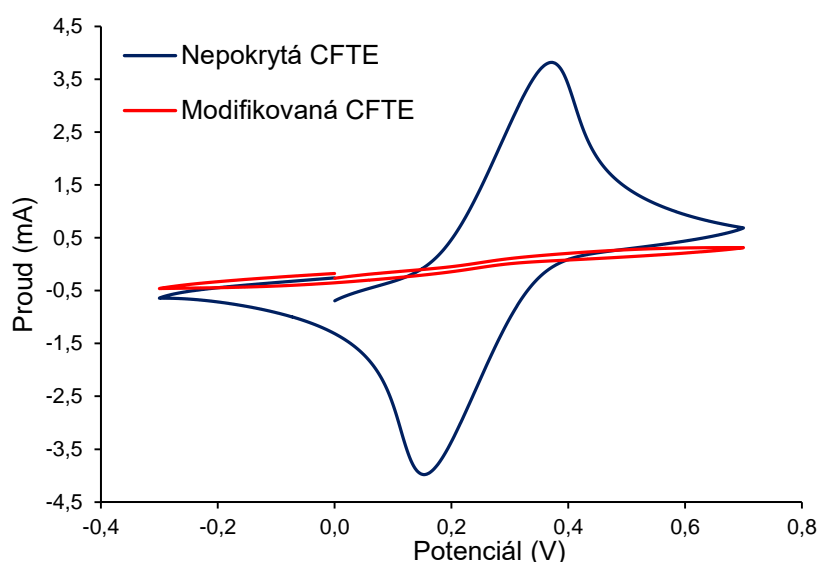
**Obr. 14.** *Cyklický voltamogram CFBE před a po modifikaci podle postupu A. Měřeno v roztoku ferrikyanidu a ferrokyanidu draselného (5 mmol/l) v KCl (1 mol/l).*

Stejným postupem byla pro srovnání modifikována i CFTE. Cyklické voltamogramy čisté i modifikované elektrody jsou zobrazeny na obr. 15. Ve srovnání s CFBE zmíněnou výše je proudová odezva čisté CFTE asi 6krát vyšší. Důvodem je větší



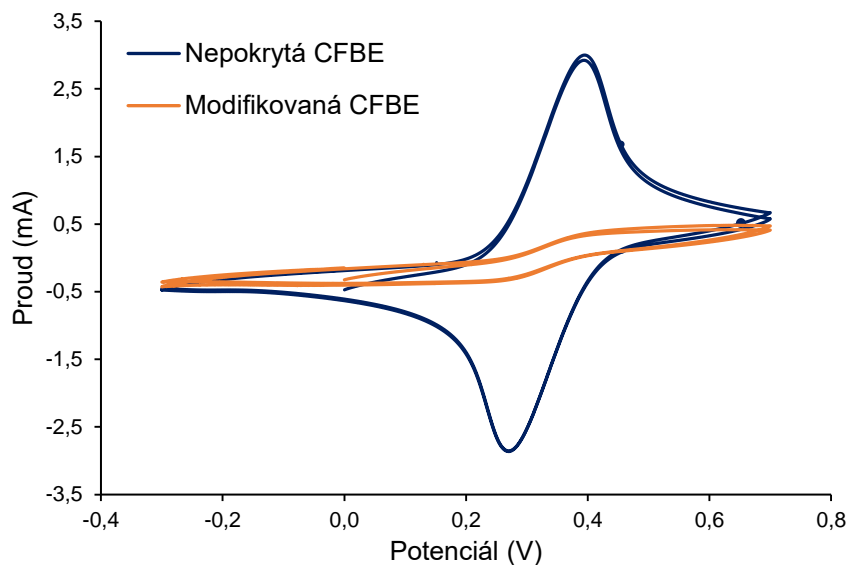
povrch elektrody, který mohl být zapříčiněn větším počtem vláken ve svazku či více svazky použitých k výrobě elektrody. Zároveň také u elektrod s nižší proudovou odezvou mohlo dojít ke spleení některých vláken dohromady, což také může způsobit snížení jejich aktivního povrchu. Rozdíl potenciálů píků byl v tomto případě 199 mV a je tedy větší než při měření s CFBE. To patrně souvisí s větším povrchem elektrody a s ním spojeným větším ohmickým úbytkem napětí [58].

Z grafu lze podle průběhu křivky patřící modifikované CFTE usoudit, že pokrytí vrstvou fosfolipidů bylo rovněž úspěšné jako v případě CFBE. Lze tedy konstatovat, že postup A použitý pro modifikaci fosfolipidovou vrstvou je pro oba typy elektrod (CFBE i CFTE) vhodný a modifikované elektrody lze použít pro další analytické aplikace.



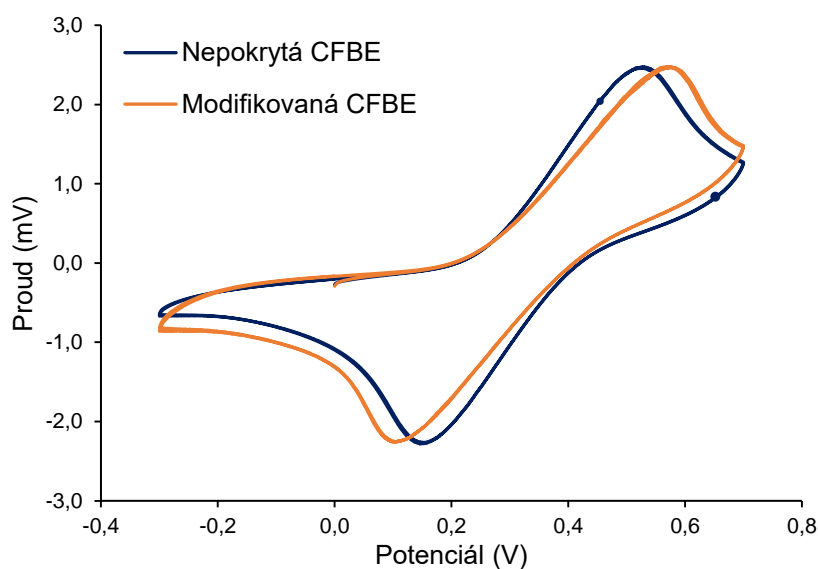
**Obr. 15.** Cyklický voltamogram CFTE před a po modifikaci podle postupu A. Měřeno v roztoku ferrikyanidu a ferrokyanidu draselného (5 mmol/l) v KCl (1 mol/l).

Postup B spočíval v použití magnetické míchačky. Při tomto postupu byly vyzkoušeny dva způsoby pokrytí lišící se v době ponoření elektrody v roztoku asolectinu v hexanu (20 mg/ml). V obou případech byla pro měření použita CFBE. Při prvním způsobu byla elektroda ponořena do roztoku za stálého míchání na 1 minutu. Z cyklického voltamogramu (obr. 16) lze vyvodit, že tento způsob pokrytí byl poměrně efektivní, neboť na křivkách zaznamenaných s modifikovanou elektrodou jsou pouze nepatrné proudové odezvy redoxního systému ferro/ferrikyanidových iontů.



**Obr. 16.** *Cyklický voltamogram CFBE před a po modifikaci podle prvního způsobu při postupu B. Měřeno v roztoku ferrikyanidu a ferrokyanidu draselného (5 mmol/l) v KCl (1 mol/l).*

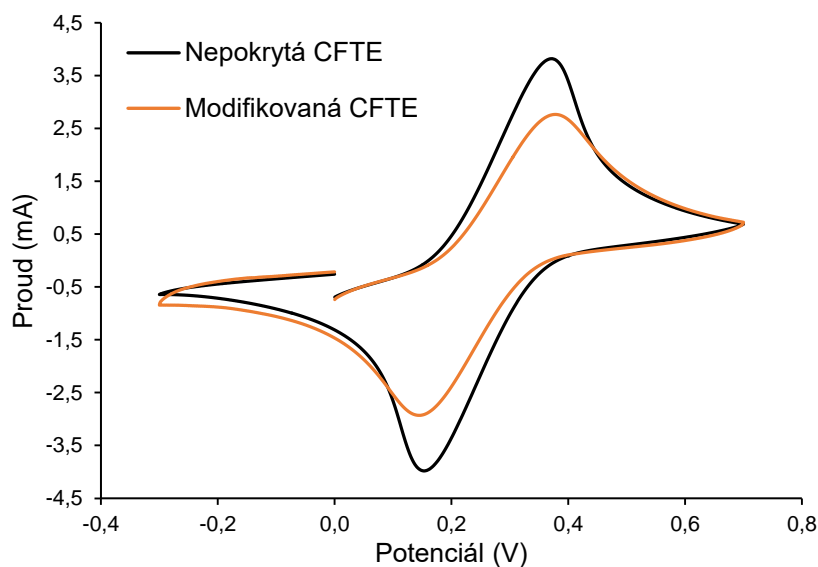
Druhým způsobem bylo ponoření elektrody do roztoku po dobu celkově 5 minut, roztok byl ale míchán pouze první minutu. Obr. 17 zobrazuje záznamy naměřené pomocí CV s nepokrytou i pokrytou CFBE. Obě křivky mají téměř totožnou proudovou odezvu, z čehož lze usoudit, že na povrch elektrody se nepodařilo nanést vrstvu fosfolipidů. To mohlo být způsobeno kontaktem uhlíkových vláken s míchadlem při samotné modifikaci nebo neopatrným zacházením s již modifikovanou elektrodou.



**Obr. 17.** *Cyklický voltamogram CFBE před a po modifikaci podle druhého způsobu při postupu B. Měřeno v roztoku ferrikyanidu a ferrokyanidu draselného (5 mmol/l) v KCl (1 mol/l).*

Postup B se neukázal jako vhodná metoda pro modifikaci elektrod i přes to, že při použití prvního způsobu došlo k velkému snížení naměřených proudů, a tudíž bylo dosaženo téměř dokonalého pokrytí. Při dalších pokusech o modifikaci pomocí tohoto postupu se však již nepodařilo elektrody jakéhokoliv typu pokrýt fosfolipidovou vrstvou, čímž bylo dokázáno, že tato metoda není dobře reprodukovatelná. Zároveň při tomto postupu může vlivem míchání teoreticky docházet ke strhávání vrstvy fosfolipidů z elektrody, případně se fosfolipidy vůbec nemusí na elektrodě uchytit.

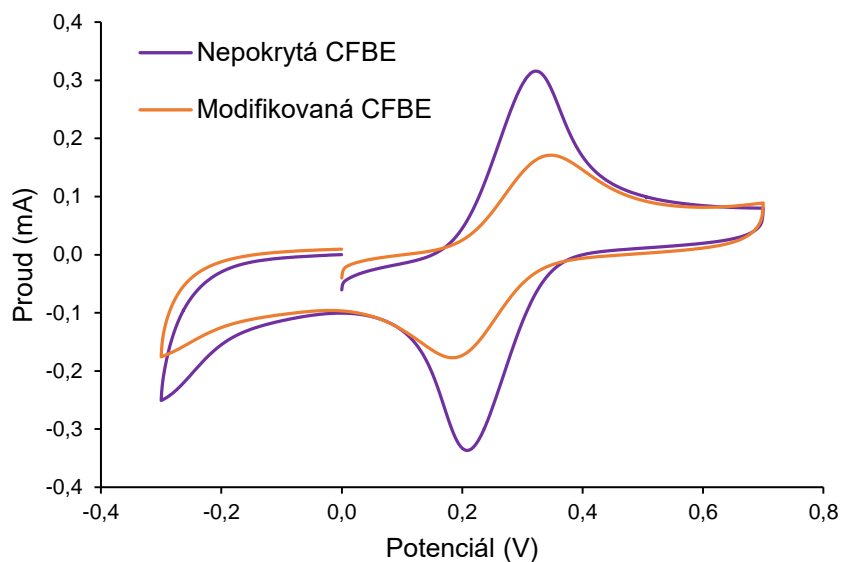
Postup C zahrnoval nejdříve hydrofobizaci elektrody a následně pokrývání v roztoku asolectinu ve vodě (1,2 g/l). Pro tento postup byla použita CFTE. V grafu (obr. 18) lze vidět, že proudová odezva modifikované elektrody je asi o 1 mA nižší, než u elektrody čisté. Lze to vysvětlit tím, že část fosfolipidů se sice mohla zachytit na elektrodě, to však nestačilo pro zabránění průchodu ferrikyanidu a ferrokyanidu draselného k povrchu elektrody. Postup C se tedy nedá považovat za účinný způsob modifikace. Problém při použití tohoto postupu mohl představovat roztok asolectinu ve vodě, jehož koncentrace 1,2 g/l nemusela být dostačující pro modifikaci celého povrchu elektrody. Dalším důvodem neúspěšného pokrytí mohla být i krátká doba hydrofobizace (15 s).



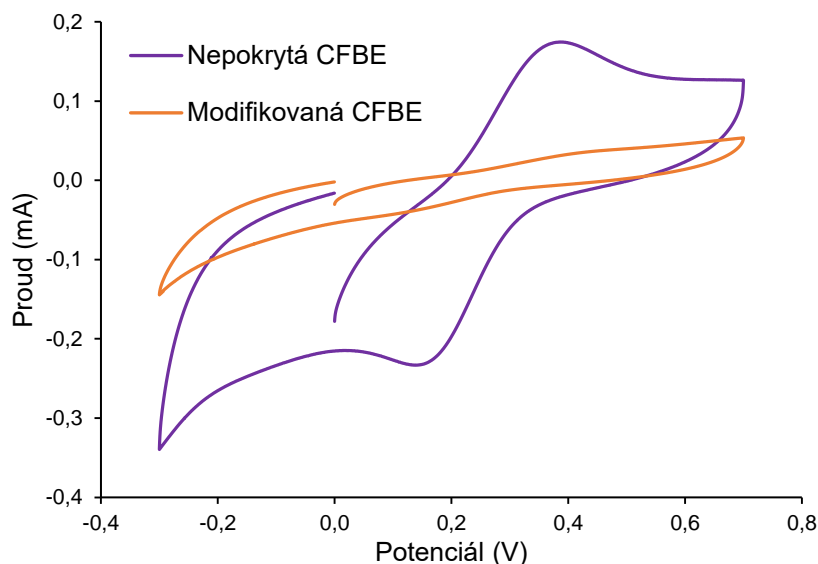
**Obr. 18.** Cyklický voltamogram CFTE před a po modifikaci podle postupu C. Měřeno v roztoku ferrikyanidu a ferrokyanidu draselného (5 mmol/l) v KCl (1 mol/l).

Pro modifikaci podle postupu D byla použita CFBE. Tento postup spočíval v opakovaném ponoření elektrody do roztoku asolectinu v hexanu (20 mg/ml), přičemž po každém vyjmutí z roztoku se hexan nechal odpařit. V grafu na obr. 19 je znázorněno

snížení proudů přibližně na poloviční hodnotu naměřených s modifikovanou elektrodou vzhledem k elektrodě čisté. Tento pokles značí, že bylo dosaženo pouze částečného pokrytí elektrody. Lze jej tedy srovnat s výsledkem měření při použití postupu C, kde také došlo pouze k mírnému snížení proudové odezvy.



**Obr. 19.** Cyklický voltamogram CFBE před a po modifikaci podle postupu D. Měřeno v roztoku ferrikyanidu a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l).



**Obr. 20.** Cyklický voltamogram CFBE před a po modifikaci za použití kombinace postupů A a D. Měřeno v roztoku ferrikyanidu a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l).

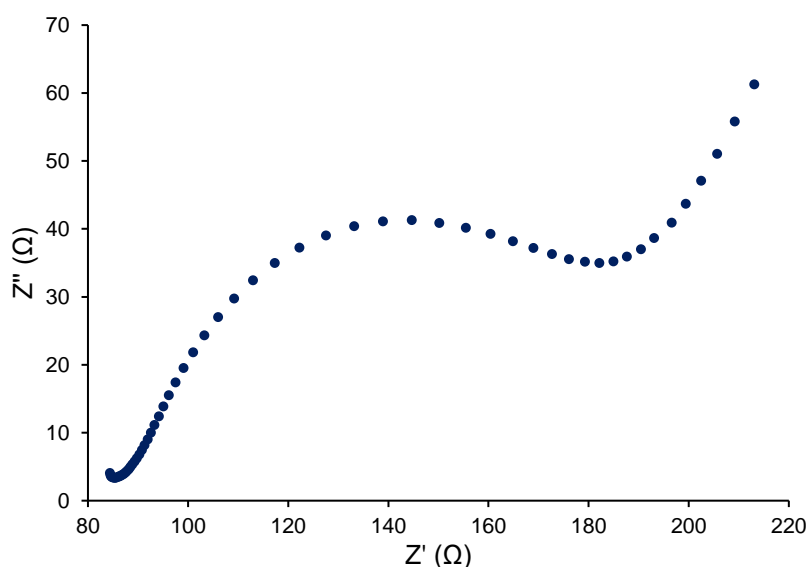
Dalším pokusem o modifikaci elektrod byla metoda kombinující postupy A a D. Při tomto postupu byla elektroda vložena do roztoku asolectinu v hexanu (20 mg/ml) pouze na 1 minutu, bez následného opakování s odpařením hexanu. Poté byla elektroda vložena do

roztoku ferrikyanidu draselného (1 mmol/l) a ferrokyanidu draselného (1 mmol/l) v NaCl (9 g/l) z důvodu stabilizace vrstvy fosfolipidů. V tomto roztoku byl poté i změřen cyklický voltamogram (obr. 20).

Kombinace postupů A a D se ukázala jako vcelku efektivní způsob pokrytí elektrod. Vynecháním opakovaného vytažení elektrody kvůli odpaření hexanu značně poklesly naměřené proudové hodnoty a elektrodu bylo možné považovat za zcela pokrytou. Při tomto experimentu bylo tedy dokázáno, že jako nejlepší technika pokrytí se jeví pouze prosté ponoření elektrody do roztoku asolectinu v hexanu (20 mg/ml) na 1 minutu. Zároveň bylo zjištěno, že stabilizaci fosfolipidové vrstvy není třeba provádět v samotném roztoku NaCl (9 g/l), ale lze ji provést i ve směsném roztoku použitým při této metodě.

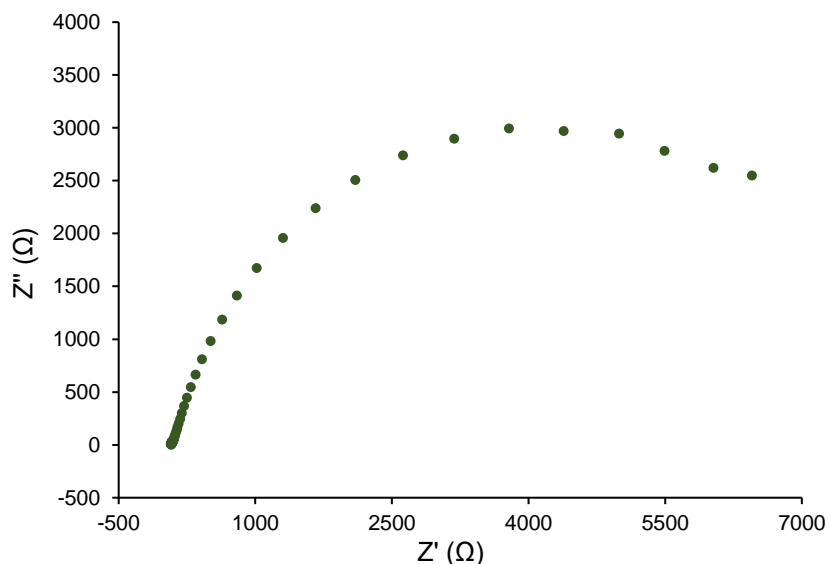
#### 4.1.2 Elektrochemická impedanční spektroskopie

Měření elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) bylo prováděno za účelem zjištění rozdílu hodnot odporu mezi nepokrytou a pokrytou elektrodou, přičemž pokrytá elektroda by měla vykazovat vyšší odpor než elektroda nepokrytá. Je to způsobeno tím, že fosfolipidová vrstva jakožto nevodivé prostředí zabraňuje vedení elektrického proudu mezi roztokem a elektrodou, čímž se zvyšuje výsledný odpor. Vzhledem k výsledkům jednotlivých postupů modifikace elektrod byly záznamy EIS měřeny pouze po použití postupu A, který se zdál jako nejúspěšnější.



**Obr. 21.** Nyquistův diagram naměřený s nepokrytou CFBE. Měřeno v roztoku ferrikyanidu draselného (5 mmol/l) a ferrokyanidu draselného (5 mmol/l) v KCl (1 mol/l).

Na obr. 21 lze vidět Nyquistův graf s čistou CFBE. Reálná složka impedance zde dosahuje hodnoty necelých 200  $\Omega$ , zatímco v grafu zaznamenaném pro modifikovanou CFBE (obr. 22) se hodnota odporu pohybuje okolo 6000  $\Omega$  a je tedy přibližně třicetkrát větší.



**Obr. 22.** Nyquistův diagram naměřený s pokrytou CFBE. Měřeno v roztoku ferrikyanidu draselného (5 mmol/l) a ferrokyanidu draselného (5 mmol/l) v KCl (1 mol/l).

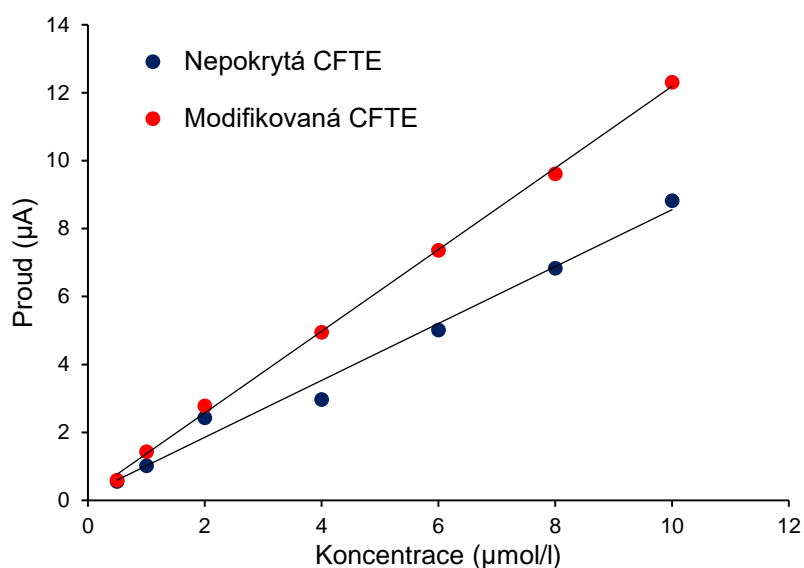
Při určitých hodnotách impedance lze na obr. 21 vidět vznikající přímku rostoucí pod úhlem 45°. Jedná se o tzv. Warburgovu impedanci, která popisuje elektrodovou reakci řízenou pouze pomalými difúzními ději [54]. V tomto případě jde o difuzi elektroaktivních ferro/ferrikyanidových iontů k povrchu nepokryté elektrody. Nepřítomnost Warburgovy impedance na obr. 22 ukazuje na úplné pokrytí elektrodového povrchu fosfolipidy.

## 4.2 Kalibrační závislosti

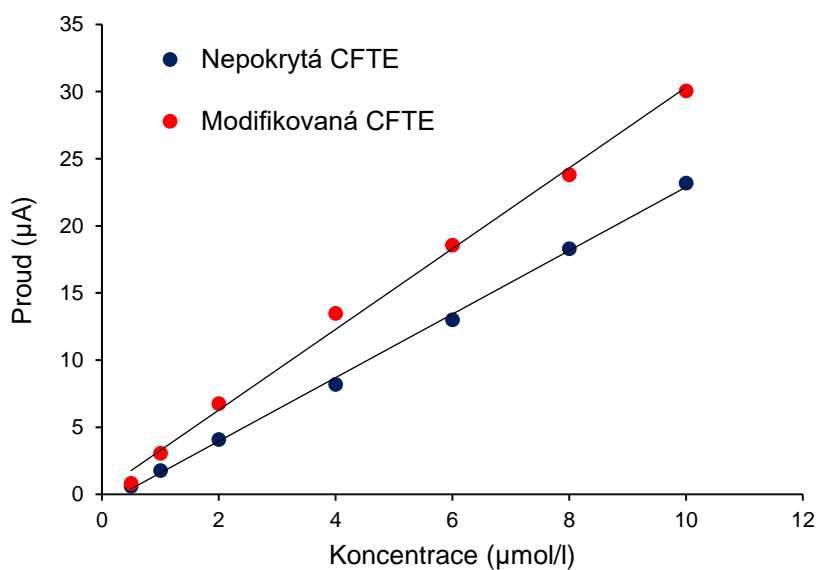
### 4.2.1 Dopamin

Kalibrační závislost DA byla sestrojena z proudu píků vyhodnocených ze záznamů DPV (obr. 23) a SWV (obr. 24) naměřených pomocí CFTE. Obě voltametrické metody vykazovaly velmi podobné výsledky. Jediným větším rozdílem jsou vyšší naměřené proudy při měření SWV, což je způsobeno tím, že SWV je při reverzibilních elektrodových reakcích, kterou je i oxidace dopaminu, podstatně citlivější metodou než DPV. V případě obou těchto metod byly proudové odezvy modifikované elektrody vyšší

než u elektrody čisté. Důvodem může být to, že kladně nabitá aminoskupina, kterou obsahuje dopamin v použitém elektrolytu o pH 6,5 (disociační konstanta DA  $pK_{a1} = 8,9$  pro aminoskupinu,  $pK_{a2} = 10,6$  pro fenolovou skupinu [59]), elektrostaticky interaguje se záporně nabitou fosfátovou skupinou v hlavičce fosfolipidu. Tato skutečnost způsobuje akumulaci dopaminu ve fosfolipidové vrstvě, což má za následek zvýšení hodnot naměřených proudů. Důsledkem této akumulace je také vyšší hodnota směrnice regresní přímky a tedy vyšší citlivost.



**Obr. 23.** Kalibrační závislosti DA získané měřením DPV pomocí CFTE. Jako ZE byl použit fosfátový pufr (pH 6,5).



**Obr. 24.** Kalibrační závislosti DA získané měřením SWV pomocí CFTE. Jako ZE byl použit fosfátový pufr (pH 6,5).

Pro obě měření s nepokrytou i pokrytou CFTE byla z rovnice regresní přímky vypočítána mez detekce podle vztahu:

$$LOD = \frac{3 \cdot s_b}{a} \quad (1)$$

kde  $s_b$  je směrodatná odchylka koeficientu  $b$  z rovnice regresní přímky a  $a$  představuje směrnici této přímky. V tabulce I jsou uvedeny parametry regresní přímky i s vypočítanou mezí detekce pro jednotlivá měření.

**Tab. I.** Regresní parametry kalibračních přímek  $y = ax + b$  pro dopamin (počet kalibračních bodů  $n = 7$ ).

| Metoda                | $a \pm s_a$<br>( $\mu\text{A}\cdot\text{l}/\mu\text{mol}$ ) | $b \pm s_b$<br>( $\mu\text{A}$ ) | $R^2$  | LOD<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) |
|-----------------------|---|----------------------------------|--------|------------------------------|
| DPV<br>nepokrytá CFTE | $0,836 \pm 0,235$   | $0,188 \pm 0,042$                | 0,9877 | 0,15                         |
| DPV<br>pokrytá CFTE   | $1,202 \pm 0,098$   | $0,169 \pm 0,018$                | 0,9989 | 0,04                         |
| SWV<br>nepokrytá CFTE | $2,366 \pm 0,225$   | $-0,774 \pm 0,040$               | 0,9986 | 0,05                         |
| SWV<br>pokrytá CFTE   | $3,005 \pm 0,485$   | $0,267 \pm 0,086$                | 0,9959 | 0,09                         |

Pro metodu DPV byla mez detekce nepokryté elektrody 0,15  $\mu\text{mol/l}$ , pokryté elektrody 0,04  $\mu\text{mol/l}$ . Při měření SWV byla hodnota meze detekce nepokryté elektrody 0,05  $\mu\text{mol/l}$  a pokryté elektrody 0,09  $\mu\text{mol/l}$ . Všechny vypočtené hodnoty limitů detekce jsou menší než koncentrace, při kterých byl proudový signál dopaminu vyhodnotitelný. Důvodem mohl být vysoký šum při měření.

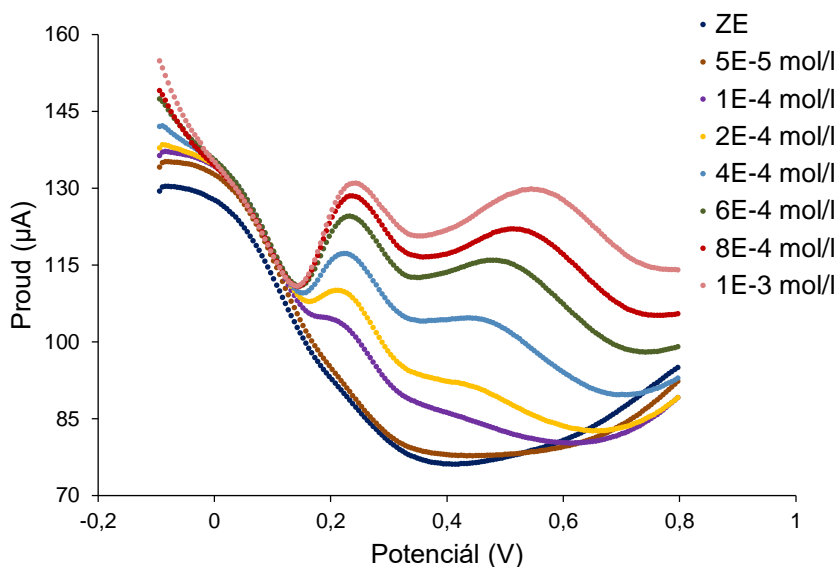
Podobné kalibrační závislosti DA byly sestrojeny již dříve z proudových signálů zaznamenaných na elektrodě ze skelného uhlíku (GCE), kdy byla mez detekce při měření SWV s čistou GCE 0,6  $\mu\text{mol/l}$  [56]. Ve srovnání s CFTE je tato hodnota přibližně dvanáctkrát větší. Při měření s GCE bylo také dosaženo většího rozdílu proudů mezi čistou a modifikovanou elektrodou. Důvodem mohla být kvalitnější modifikace GCE, kterou lze vrstvou fosfolipidů pokrýt snadněji než CFTE. Zároveň se u GCE při modifikaci vrstvou fosfolipidů prakticky nemění plocha elektrodového povrchu (disku), kdežto u elektrody z uhlíkových vláken dochází k významnému zmenšení celkové plochy povrchu elektrody v důsledku částečného slepení uhlíkových vláken fosfolipidy. Proto je relativní nárůst signálu DA na modifikované CFTE oproti nemoifikované CFTE menší než bylo pozorováno u GCE. Na druhou stranu se ale zvětšil lineární rozsah proudové odezvy DA



na pokryté CFTE proti pokryté GCE, což může vypovídat o větší akumulární kapacitě vrstvy na uhlíkových vláknech oproti vrstvě na uhlíkovém disku.

#### 4.2.2 Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová

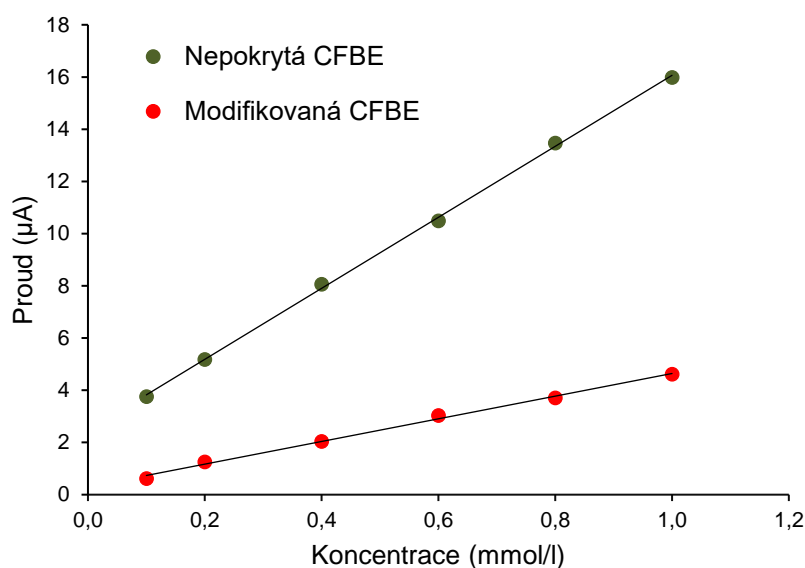
Kalibrační závislost DOPAC byla měřena metodami DPV a SWV pro koncentrace v rozmezí  $5 \cdot 10^{-5}$  až  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l. Na obr. 25 je ukázka DPV křivek zaznamenaných s nepokrytou elektrodou pro jednotlivé koncentrace DOPAC. V grafu lze vidět jeden pík při potenciálu 0,23 V a druhý pík v rozmezí potenciálů 0,45–0,55 V, viditelný až od koncentrace 0,2 mmol/l. Oba píky pravděpodobně přísluší DOPAC v různých formách. Oxidace, při níž vzniká produkt, který se adsorbuje na povrchu elektrody, vyžaduje menší energii než stejný elektrodový proces, při kterém vznikají volné částice [60]. Pík při potenciálu 0,23 V je tedy tzv. adsorpční předvlna, která vzniká v důsledku oxidace DOPAC za vzniku příslušného chinonu jako produktu, který je adsorbovaný na povrchu elektrody. Druhý pík (0,45–0,55 V) přísluší oxidaci DOPAC za vzniku stejného produktu, ale ve volné formě. Proto je druhý pík zřetelný až při vyšších koncentracích DOPAC, kdy již došlo k nasycení povrchu elektrody adsorbovaným produktem.



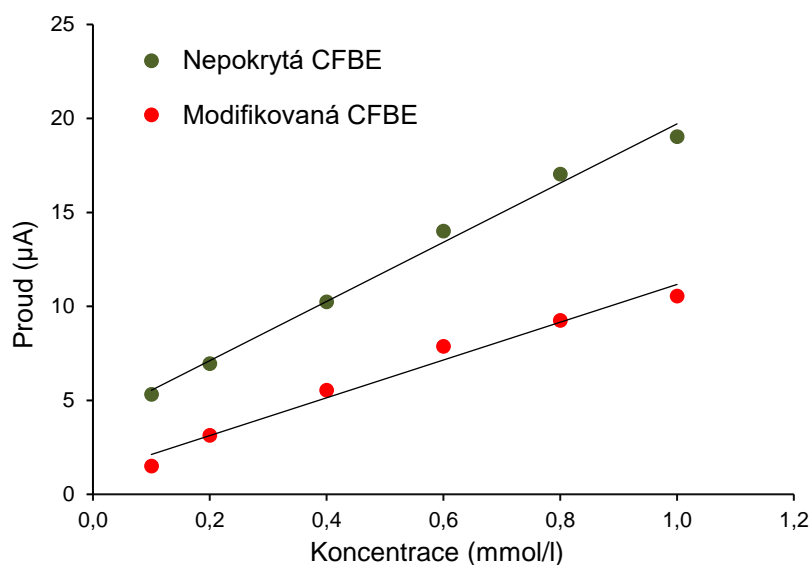
**Obr. 25.** Měření DPV s nepokrytou CFBE pro narůstající koncentrace DOPAC. Jako ZE byl použit fosfátový pufr (pH 6,5).

Pro sestavení kalibračních závislostí byl použit pík při potenciálu 0,23 V. Z důvodu nízkého proudového signálu nebylo možné vyhodnotit píky pro nejnižší koncentrace, proto nejsou v grafu uvedeny. Proudová odezva při měření DPV (obr. 26) s modifikovanou

CFBE byla mnohem nižší než s nepokrytou CFBE. Tento pokles je zapříčiněn tím, že v roztoku o pH 6,5 dochází k disociaci DOPAC a vzniku karboxylátového aniontu ( $pK_a = 3,21$  [61]), který je odpuzován záporně nabitou fosfátovou skupinou hlavičky fosfolipidu. Dochází tak k opačnému efektu než u dopaminu, který se ve vrstvě fosfolipidů akumuloval. Podobný pokles je možné vidět i při měření SWV (obr. 27), kde sice není rozdíl proudů tak výrazný, i přesto je však proudová odezva modifikované CFBE přibližně dvakrát menší než u čisté CFBE.



**Obr. 26.** Kalibrační závislosti DOPAC získané měřením DPV pomocí CFBE. Jako ZE byl použit fosfátový pufr (pH 6,5).



**Obr. 27.** Kalibrační závislosti DOPAC získané měřením SWV pomocí CFBE. Jako ZE byl použit fosfátový pufr (pH 6,5).

V tabulce II jsou uvedeny parametry regresních přímek pro všechna měření DOPAC, ze kterých byly vypočítány limity detekce. Mez detekce pro DPV měření s nepokrytou elektrodou byla 0,03 mmol/l, avšak pík DOPAC byl rozlišitelný od šumu až při koncentraci 0,1 mmol/l. S pokrytou elektrodou byla mez detekce 0,08 mmol/l. Pro měření SWV byla hodnota meze detekce pro nepokrytou elektrodu 0,11 mmol/l, což koresponduje s měřením. S pokrytou CFBE byla její hodnota 0,2 mmol/l, i když slabý signál DOPAC bylo možné zaznamenat už při koncentraci 0,1 mmol/l.

**Tab. II.** Regresní parametry kalibračních přímek  $y = ax + b$  pro DOPAC (počet kalibračních bodů  $n = 7$ ).

| Metoda                | $a \pm s_a$<br>( $\mu\text{A}\cdot\text{l}/\text{mmol}$ ) | $b \pm s_b$<br>( $\mu\text{A}$ ) | $R^2$  | LOD<br>(mmol/l) |
|-----------------------|---|----------------------------------|--------|-----------------|
| DPV<br>nepokrytá CFBE | $13,602 \pm 0,084$  | $2,463 \pm 0,149$                | 0,9994 | 0,03            |
| DPV<br>pokrytá CFBE   | $4,342 \pm 0,064$   | $0,300 \pm 0,114$                | 0,9964 | 0,08            |
| SWV<br>nepokrytá CFBE | $15,750 \pm 0,336$  | $3,961 \pm 0,597$                | 0,9925 | 0,11            |
| SWV<br>pokrytá CFBE   | $10,053 \pm 0,382$  | $1,115 \pm 0,680$                | 0,9767 | 0,20            |

Pozorované zvýšení proudové odezvy DA a snížení odezvy DOPAC na modifikované elektrodě oproti elektrodě nemodifikované je v souladu s výsledky získanými na GCE [56].

## 5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vyvinout vhodnou metodu pro modifikaci uhlíkových vláknových elektrod fosfolipidovou vrstvou a modifikované elektrody následně aplikovat při stanovení dopaminu a kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové. Testování pokrytí elektrody bylo provedeno pomocí cyklické voltametrie, kdy se jako nejvhodnější jevil postup A. Ten spočíval v ponoření elektrody do roztoku asolectinu v hexanu o koncentraci 20 mg/ml na 1 minutu. Následně byla elektroda vložena do roztoku NaCl o koncentraci 9 g/l kvůli zformování a stabilizaci fosfolipidové vrstvy.

Pomocí elektrochemické impedanční spektroskopie byl studován rozdíl v odporu nepokryté a pokryté elektrody. Bylo zjištěno, že při měření s nepokrytou elektrodou byl odpor přibližně 200  $\Omega$ , zatímco odpor pokryté elektrody byl asi třicetkrát větší a jeho hodnota dosahovala 6000  $\Omega$ . Vysoká hodnota impedance dokazuje přítomnost dielektrika – elektricky nevodivé fosfolipidové vrstvy na povrchu elektrody.

S čistou i modifikovanou elektrodou byly proměřeny kalibrační závislosti dopaminu a kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové v rozmezí koncentrací  $5 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l pro DA a  $5 \cdot 10^{-5}$  až  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l pro DOPAC. Použitými metodami byly diferenční pulzní voltametrie a square-wave voltametrie. Při měření DA byla naměřena vyšší proudová odezva s pokrytou elektrodou než s elektrodou nepokrytou. Důvodem byla akumulace dopaminu ve fosfolipidové vrstvě. Opačný jev bylo možné pozorovat u DOPAC, kdy byly vyšší proudy naměřeny u elektrody nepokryté, a to v důsledku odpuzování záporně nabitých skupin hlavičky fosfolipidu s aniontem DOPAC, což zabránilo akumulaci DOPAC ve fosfolipidové vrstvě a jejímu transportu na povrch elektrody. Byly vypočteny meze detekce DA a DOPAC pro měření s nepokrytou i pokrytou elektrodou. Pro DA byla mez detekce při měření DPV 0,15  $\mu\text{mol/l}$  pro nepokrytou elektrodu a 0,04  $\mu\text{mol/l}$  pro pokrytou elektrodu. Při SWV byla její hodnota 0,05  $\mu\text{mol/l}$  při měření s nepokrytou elektrodou a 0,09  $\mu\text{mol/l}$  s pokrytou elektrodou. V případě DOPAC byla hodnota meze detekce 0,03 mmol/l pro DPV měření s nepokrytou elektrodou a 0,08 mmol/l s pokrytou elektrodou. Pro měření SWV byla mez detekce DOPAC s nepokrytou CFBE 0,11 mmol/l a 0,2 mmol/l s pokrytou elektrodou.

## 6 SUMMARY

The aim of this thesis was to develop suitable method for modification of carbon fibre electrodes by phospholipid layer and subsequently to apply the modified electrodes to the determination of dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid. Testing of the electrode coverage was performed by cyclic voltammetry, which showed that procedure A was the most suitable. The procedure consisted of immersing the electrode in a solution of asolectin in hexane (20 mg/ml) for 1 minute. Subsequently, the electrode was placed in a 9 g/l NaCl solution to form and stabilize the phospholipid layer.

The difference in resistance of uncoated and coated electrode was studied using the electrochemical impedance spectroscopy. It was found that when measured with an uncoated electrode, the resistance was approximately 200  $\Omega$ , while the resistance of the modified electrode was about 30 times higher and its value reached 6000  $\Omega$ . The high impedance value indicates the presence of dielectrics – electrically non-conducting phospholipid layer on the surface of the electrode.

Calibration dependencies were measured using DPV and SWV with both the clean and modified electrode in a concentration range of  $5 \cdot 10^{-7}$  to  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l for DA and  $5 \cdot 10^{-5}$  to  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l for DOPAC. In case of DA higher current response with the modified electrode than with the clean electrode was obtained due to the accumulation of dopamine in the phospholipid layer. The opposite phenomenon was observed with DOPAC, where the higher currents were obtained with the unmodified electrode due to the repulsion of negatively charged phospholipid head groups with DOPAC anion preventing accumulation of DOPAC in the phospholipid layer and its transport to the electrode surface. The detection limits of DA and DOPAC for both modified and unmodified electrode were calculated. The detection limit was 0,15  $\mu\text{mol/l}$  for DA in DPV measurement with unmodified electrode and 0,04  $\mu\text{mol/l}$  with modified electrode. In SWV measurement the limit of detection was 0,05  $\mu\text{mol/l}$  with unmodified electrode and 0,09  $\mu\text{mol/l}$  with modified electrode. In case of DOPAC the detection limit was 0,03 mmol/l for DPV measurement with unmodified electrode and 0,08 mmol/l with modified electrode. The limit of detection was 0,11 mmol/l in SWV measurement with unmodified electrode and 0,2 mmol/l with modified electrode.

## SEZNAM ZKRATEK

|       |  |
|-------|--|
| AFM   | mikroskopie atomárních sil               |
| ALDH2 | aldehyddehydrogenasa                     |
| BLM   | černá lipidová membrána                  |
| CFBE  | uhlíková vláknová štětičková elektroda   |
| CFE   | uhlíková vláknová elektroda              |
| CFTE  | uhlíková vláknová špičková elektroda     |
| CV    | cyklická voltametrie                     |
| DA    | dopamin                                  |
| DOPAC | 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina        |
| DOPAL | 3,4-dihydroxyfenylacetaldehyd            |
| DPV   | diferenční pulzní voltametrie            |
| EIS   | elektrochemická impedanční spektroskopie |
| FM    | fluorescenční mikroskopie                |
| GCE   | elektroda ze skelného uhlíku             |
| GUV   | obří unilamelární vezikuly               |
| HPLC  | vysokoúčinná kapalinová chromatografie   |
| LB    | Langmuirova-Blodgettové metoda           |
| LB/LS | kombinace metod LB a LS                  |
| LS    | Langmuirova-Schaeferova metoda           |
| LUV   | velké unilamelární vezikuly              |
| MAO   | monoaminoxidasa                          |
| MLV   | multilamelární vezikuly                  |
| MVV   | multivezikulární vezikuly                |
| NMR   | nukleární magnetická rezonance           |

|        |  |
|--------|--|
| OUV    | oligolamelární vezikuly                          |
| p-PLB  | planární fosfolipidové dvojvrstvy                |
| s-PLB  | stabilizované fosfolipidové dvojvrstvy           |
| SUV    | malé unilamelární vezikuly                       |
| SWV    | square wave voltametrie                          |
| t-PLB  | ukotvené fosfolipidové dvojvrstvy                |
| UV/VIS | spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti |
| ZE     | základní elektrolyt                              |

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Hassan, M. M., Schiermeister, L., Staiger, M. P.: Sustainable Production of Carbon Fiber: Effect of Cross-Linking in Wool Fiber on Carbon Yields and Morphologies of Derived Carbon Fiber. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 3 (2015) 2660-2668.
- [2] Grégr, J. *Povrchové vlastnosti uhlíkových vláken*, Zpráva pro Výzkumné centrum „Textil“ LN00B090, katedra chemie FP, TU v Liberci, 2004. <http://docplayer.cz/10797731-Povrchove-vlastnosti-uhlikovych-vlaken.html>, staženo 16. 11. 2017
- [3] Riman, D.: Studium elektrochemických metod úprav povrchu uhlíkových vláken. Bakalářská práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2011.
- [4] Huang, X.: Fabrication and properties of carbon fibers. *Materials* 2 (2009) 2369-2403.
- [5] Buckley, J. D., Edie, D. D.: *Carbon-carbon materials and composites*, Noyes Publications, New Jersey 1993, pp 4-5.
- [6] Chung, D. L.: *Carbon fiber composites*, Butterworth-Heinemann, Newton, MA 1994.
- [7] Bartosova, Z., Riman, D., Jakubec, P., Halouzka, V., Hrbac, J., Jirovsky, D.: Electrochemically pretreated carbon microfiber electrodes as sensitive HPLC-EC detectors. *The Scientific World Journal* 2012 (2012), ID 295802; doi:10.1100/2012/295802.
- [8] de Carvalho, R. M., Mello, C., Kubota, L. T.: Simultaneous determination of phenol isomers in binary mixtures by differential pulse voltammetry using carbon fibre electrode and neural network with pruning as a multivariate calibration tool. *Analytica Chimica Acta* 420 (2000) 109-121.
- [9] Ju, H., Sun, H., Chen, H.: Properties of poly- $\beta$ -aminoanthraquinone modified carbon fiber electrode as a basis for hemoglobin biosensors. *Analytica Chimica Acta* 327 (1996) 125-132.
- [10] Zhang, Y., Xiao, J., Sun, Y., Wang, L., Dong, X., Ren, J., He, W., Xiao, F.: Flexible nanohybrid microelectrode based on carbon fiber wrapped by gold nanoparticles decorated nitrogen doped carbon nanotube arrays: In situ electrochemical detection in live cancer cells. *Biosensors and Bioelectronics* 100 (2018) 453-461.



- [11] Feng, Y., Yang, Q., Wang, X., Logan, B. E.: Treatment of carbon fiber brush anodes for improving power generation in air–cathode microbial fuel cells. *Journal of Power Sources* 195 (2010) 1841-1844.
- [12] Jamal, M., Sarac, A. S., Magner, E.: Conductive copolymer-modified carbon fibre microelectrodes: electrode characterisation and electrochemical detection of p-aminophenol. *Sensors and Actuators B: Chemical* 97 (2004) 59-66.
- [13] Xiang-Qin, L., Guang-Feng, K., Ying, C.: A nafion and choline bi-layer modified carbon fiber electrode for in-vivo detection of dopamine in mouse cerebrum. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 36 (2008) 157-161.
- [14] Yang, B., Wang, H., Du, J., Fu, Y., Yang, P., Du, Y.: Direct electrodeposition of reduced graphene oxide on carbon fiber electrode for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 456 (2014) 146-152.
- [15] Salazar, P., Martín, M., O’Neill, R. D., González-Mora, J. L.: Glutamate microbiosensors based on Prussian Blue modified carbon fiber electrodes for neuroscience applications: In-vitro characterization. *Sensors and Actuators B: Chemical* 235 (2016) 117-125.
- [16] Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A.: *Molecular Cell Biology*, 7. ed., W.H. Freeman & Co., New York 2013, pp 443-446.
- [17] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, A., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*, 2. ed., Espero Publishing, Ústí nad Labem 1998, pp 348-354.
- [18] Wang, T., Ingram, C., Weisshaar, J. C.: Model lipid bilayer with facile diffusion of lipids and integral membrane proteins. *Langmuir* 26 (2010) 11157-11164.
- [19] Janshoff, A., Steinem, C.: Mechanics of lipid bilayers: What do we learn from pore-spanning membranes? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1853 (2015) 2977-2983.
- [20] Rosetti, C. M., Mangiarotti, A., Wilke, N.: Sizes of lipid domains: What do we know from artificial lipid membranes? What are the possible shared features with membrane rafts in cells?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1859 (2017) 789-802.

- [21] Matam, Y., Ray, B. D., Petrache, H. I.: Direct affinity of dopamine to lipid membranes investigated by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *Neuroscience letters* 618 (2016) 104-109.
- [22] Navrátil, T., Šestáková, I., Štulík, K., Mareček, V.: Electrochemical measurements on supported phospholipid bilayers: preparation, properties and ion transport using incorporated ionophores. *Electroanalysis* 22 (2010) 2043-2050.
- [23] Nikolelis, D. P., Petropoulou, S. S. E., Pergel, E., Toth, K.: Biosensors for the rapid detection of dopamine using bilayer lipid membranes (BLMs) with incorporated calix[4]resorcinarene receptor. *Electroanalysis* 14 (2002) 783.
- [24] Nikolelis, D. P., Theoharis, G.: Biosensor for dopamine based on stabilized lipid films with incorporated resorcin[4]arene receptor. *Bioelectrochemistry* 59 (2003) 107-112.
- [25] Chen, H., Zheng, Y., Jiang, J. H., Wu, H. L., Shen, G. L., Yu, R. Q.: An ultrasensitive chemiluminescence biosensor for cholera toxin based on ganglioside-functionalized supported lipid membrane and liposome. *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 684-689.
- [26] Nikolelis, D. P., Raftopoulou, G., Chatzigeorgiou, P., Nikoleli, G. P., Viras, K.: Optical portable biosensors based on stabilized lipid membrane for the rapid detection of doping materials in human urine. *Sensors and Actuators B: Chemical* 130 (2008) 577-582.
- [27] Peetla, C., Stine, A., Labhasetwar, V.: Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. *Molecular pharmaceutics* 6 (2009) 1264-1276.
- [28] Aminipour, Z., Khorshid, M., Bayoumi, M., Losada-Pérez, P., Thoelen, R., Bonakdar, S., Keshvari, H., Maglia, G., Wagner, P., Van der Bruggen, B.: Formation and electrical characterization of black lipid membranes in porous filter materials. *Physica Status Solidi (a)-Applications and Materials Science* 214 (2017).
- [29] Zagnoni, M.: Miniaturised technologies for the development of artificial lipid bilayer systems. *Lab on a Chip* 12 (2012) 1026-1039.
- [30] Montal, M., Mueller, P.: Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69 (1972) 3561-3566.

- [31] Kongsuphol, P., Fang, K. B., Ding, Z.: Lipid bilayer technologies in ion channel recordings and their potential in drug screening assay. *Sensors and Actuators B: Chemical* 185 (2013) 530-542.
- [32] Nováková, K.: Modelové biologické membrány: jejich charakterizace a využití, *Chemické listy* 109 (2015) 166-175.
- [33] Sakaguchi, N., Kimura, Y., Hirano-Iwata, A., Ogino, T.: Fabrication of Au-Nanoparticle-Embedded Lipid Bilayer Membranes Supported on Solid Substrates. *The Journal of Physical Chemistry B* 121 (2017) 4474-4481.
- [34] Castellana, E. T., Cremer, P. S.: Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surface Science Reports* 61 (2006) 429-444.
- [35] Ma, Z., Janmey, P. A., Sharp, K. A., Finkel, T. H.: Improved method of preparation of supported planar lipid bilayers as artificial membranes for antigen presentation. *Microscopy research and technique* 74 (2011) 1174-1185.
- [36] Marquês, J. T., De Almeida, R. F. M., Viana, A. S.: Lipid bilayers supported on bare and modified gold—Formation, characterization and relevance of lipid rafts. *Electrochimica Acta* 126 (2014) 139-150.
- [37] 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.
- [38] Andersson, J., Knobloch, J. J., Perkins, M. V., Holt, S. A., Köper, I.: Synthesis and Characterization of Novel Anchorlipids for Tethered Bilayer Lipid Membranes. *Langmuir* 33 (2017) 4444-4451.
- [39] Andersson, J., Köper, I.: Tethered and polymer supported bilayer lipid membranes: Structure and function. *Membranes* 6 (2016) 30.
- [40] Zieleniecki, J. L., Nagarajan, Y., Waters, S., Rongala, J., Thompson, V., Hrmova, M., Köper, I.: Cell-free synthesis of a functional membrane transporter into a tethered bilayer lipid membrane. *Langmuir* 32 (2016) 2445-2449.
- [41] Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K.: Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters* 8 (2013) 102.

- [42] Jesorka, A., Orwar, O.: Liposomes: technologies and analytical applications. *Annual Review of Analytical Chemistry* 1 (2008) 801-832.
- [43] Patil, Y. P., Jadhav, S.: Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and physics of lipids* 177 (2014) 8-18.
- [44] Szoka Jr., F., Papahadjopoulos, D.: Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annual review of biophysics and bioengineering* 9 (1980) 467-508.
- [45] Megová, M., Müller, L., Barták, P.: Spontaneous revesiculation – new method for the preparation of liposomes. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, Facultas Rerum Naturalium, Chemica* 47 (2007) 1-4.
- [46] Çağdaş, M., Sezer, A. D., Bucak, S.: *Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery, Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, InTech, 2014, pp 1-3.  
<https://www.intechopen.com/books/application-of-nanotechnology-in-drug-delivery/liposomes-as-potential-drug-carrier-systems-for-drug-delivery>, staženo 3.12.2017
- [47] Vallone, D., Picetti, R., Borrelli, E: Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience & biobehavioral reviews* 24 (2000) 125-132.
- [48] Jaber, M., Robinson, S. W., Missale, C., Caron, M. G.: Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35 (1996) 1503-1519.
- [49] Łuczak, T.: Preparation and characterization of the dopamine film electrochemically deposited on a gold template and its applications for dopamine sensing in aqueous solution. *Electrochimica Acta* 53 (2008) 5725-5731.
- [50] Marsilia, M., Susmel, S.: Free-standing Plastic electrodes: Formulation, electrochemical characterization and application to dopamine detection. *Sensors and Actuators B: Chemical* 255 (2018) 1087-1096.
- [51] Matam, Y., Ray, B. D., Petrache, H. I.: Direct affinity of dopamine to lipid membranes investigated by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *Neuroscience letters* 618 (2016) 104-109.
- [52] Florang, V. R., Rees, J. N., Brogden, N. K., Anderson, D. G., Hurley, T. D., Doorn, J. A.: Inhibition of the oxidative metabolism of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyd, a reactive

intermediate of dopamine metabolism, by 4-hydroxy-2-nonenal. *NeuroToxicology* 28 (2007) 76-82.

[53] Mabbott, G. A.: An introduction to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education* 60 (1983) 697.

[54] Barek, J., Opekar, F., Štulík, K.: *Elektroanalytická chemie*, Karolinum, Praha 2005, p 108.

[55] Tatarkovič, M., Broncová, G., Krond'ák, M.: Elektroimpedanční spektroskopie a její využití v chemické analýze. *Chemické listy* 106 (2012) 1067-1074.

[56] Štěpánková, J.: Využití elektroanalytických metod při studiu interakcí fyziologicky aktivních látek s fosfolipidovými membránami. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2017.

[57] Kizek, R.: *Bioelektrochemie a nanotechnologie*. NANOTEAM, VUT Brno, 2011.

[58] Kissinger, P. T., Heineman, W. R.: *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, 2. ed., Marcel Dekker, New York 1996.

[59] Armstrong, J., Barlow, R. B.: The Ionization of Phenolic Amines, Including Apomorphine, Dopamine and Catecholamines and an Assessment of Zwitterion Constants. *British Journal of Pharmacology* 57 (1976) 501-516.

[60] Heyrovský, J., Kůta, J.: *Základy polarografie*, Nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1962.

[61] Fazary, A. E., Ju, Y. H.: Nonaqueous Solution Studies on the Protonation Equilibria of some Phenolic Acids. *Journal of Solution Chemistry* 37 (2008) 1305-1319.