

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Využití elektroanalytických metod při studiu interakcí  
fyziologicky aktivních látek s fosfolipidovými  
membránami**

Diplomová práce

Autor:

Bc. Jana Štěpánková

Studijní obor:

Analytická chemie

Forma studia:

Prezenční

Vedoucí práce:

RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

O l o m o u c 2 0 1 7

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora:	Jana Štěpánková
Název práce:	Využití elektroanalytických metod při studiu interakcí fyziologicky aktivních látek s fosfolipidovými membránami
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2017
Anotace:	Diplomová práce se zabývá studiem elektrochemických vlastností dopaminu a jeho metabolitu, kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové (DOPAC). Testována je také interakce studovaných látek s fosfolipidovou membránou prostřednictvím modifikované elektrody ze skelného uhlíku. Metody používané při experimentech jsou cyklická voltametrie, square wave voltametrie a elektrochemická impedanční spektroskopie. Výsledky experimentů poukazují na mnohem vyšší afinitu dopaminu k fosfolipidové membráně ve zvoleném prostředí o pH 6,5 ve srovnání s DOPAC, která pravděpodobně zůstává pouze na povrchu membrány.
Klíčová slova:	dopamin, DOPAC, fosfolipidy, modifikovaná GC elektroda
Počet stran:	75
Jazyk:	Čeština

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname: Jana Štěpánková

Title: Application of Electroanalytical Methods for the Study of Interactions of Physiologically Active Compounds with Phospholipid Membranes

Type of thesis: Master's

Department: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

Supervisor: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

The year of presentation: 2017

Annotation: Master's thesis deals with study of electrochemical properties of dopamine and its metabolite, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC). Interactions of tested substances with phospholipid membrane are studied using modified glassy carbon electrode. Cyclic voltammetry, square wave voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy were used for the purpose. The results of experiments indicate higher affinity of dopamine to phospholipid membrane at pH 6,5 than DOPAC. 3,4-dihydroxyphenylacetic acid probably remains on the surface of the phospholipid membrane.

Keywords: dopamine, DOPAC, phospholipids, modified GC electrode

Number of pages: 75

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod odborným vedením RNDr. Jany Skopalové, Ph.D. Veškeré použité literární prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, aby byla má diplomová práce zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

Podpis .....

Předně bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady a připomínky a za její věčný optimismus, který mi vždy dodal chuť do práce. Další poděkování patří Mgr. Haně Tomkové za pořízení snímků pomocí AFM a doc. RNDr. Petru Bartákovi za zkonstruování elektrochemické cely pro měření s membránovým filtrem.

# Obsah

Seznam použitých zkratk	8
Seznam obrázků	9
1. Úvod	14
2. Teoretická část	15
2.1. Biologické membrány	15
2.2. Modelové fosfolipidové membrány	17
2.2.1. Planární fosfolipidové dvojvrstvy	18
2.2.2. Stabilizované fosfolipidové dvojvrstvy	20
2.2.3. Ukotvené fosfolipidové dvojvrstvy	21
2.2.4. Liposomy	21
2.3. Studované látky – katecholaminy	23
2.3.1. Dopamin	24
2.3.2. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina	27
2.4. Použité elektrochemické metody	28
2.4.1. Cyklická voltametrie	28
2.4.2. Square wave voltametrie	29
2.4.3. Elektrochemická impedanční spektroskopie	30
3. Experimentální část	32
3.1. Přístrojové vybavení	32
3.2. Chemikálie	32
3.3. Metodická část	33
3.3.1. Čištění nepokryté elektrody	33
3.3.2. Modifikace GCE fosfolipidovou membránou	33
3.3.3. Testování kompaktnosti fosfolipidové membrány	33
3.3.4. Čištění elektrody od fosfolipidů	34
3.3.5. Pokrývání PC membránového filtru fosfolipidy	34
3.3.6. Cyklická voltametrie	34
3.3.7. Akumulace	35
3.3.8. Kalibrační závislosti	36
3.3.9. Elektrochemická impedanční spektroskopie	37
3.3.10. Sledování difúze dopaminu přes PC filtr	39
3.3.11. Skenování povrchu PC filtru pomocí AFM	40

3.4. Výsledky .....	40
3.4.1. Dopamin.....	40
3.4.1.1. Cyklická voltametrie.....	40
3.4.1.2. Akumulace .....	41
3.4.1.3. Kalibrační závislosti .....	46
3.4.1.4. Elektrochemická impedanční spektroskopie .....	47
3.4.1.5. EIS měření s PC membránovým filtrem.....	51
3.4.1.6. Sledování difúze přes PC filtr .....	56
3.4.1.7. Skenování povrchu PC filtru pomocí AFM.....	58
3.4.2. 3,4-dihydroxyfenylactová kyselina .....	61
3.4.2.1. Cyklická voltametrie.....	61
3.4.2.2. Akumulace .....	62
3.4.2.3. Kalibrační závislosti .....	65
3.4.2.4. Elektrochemická impedanční spektroskopie .....	67
4. Závěr .....	70
Použité zdroje .....	72

## Seznam použitých zkratek

3-MT	3-methoxytyramin
ADHD	porucha chování s hyperaktivitou
AFM	mikroskop atomárních sil
BLM	černá lipidová membrána
CE	pomocná elektroda
CNS	centrální nervová soustava
COMT	katechol- <i>O</i> -methyltransferasa
CV	cyklická voltametrie
DA	dopamin
dopa	3,4-dihydroxyfenylalanin
DOPAC	3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina
DOPC	1,2-diolooyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HVA	homovanilová kyselina
MAO	monoaminoxidasa
MUV	multilamelární vezikuly (liposomy)
NMR	nukleární magnetická rezonance
OCP	potenciál nezátíženého obvodu
PBS	fosfátový pufr
PC	polykarbonát
PLBs	modelové fosfolipidové membrány
p-PLB	planární fosfolipidová dvojvrstva
RE	referentní elektroda
SCE	nasyčená kalomelová elektroda
s-PLB	stabilizovaná fosfolipidová dvojvrstva
SUV	unilamelární vezikuly (liposomy)
SWV	square wave voltametrie
t-BLM	ukotvené fosfolipidové membrány
WE	pracovní elektroda
ZE	základní elektrolyt



## Seznam obrázků

Obr. 1. Biologické membrány v eukaryotní buňce [1].	15
Obr. 2. a) schéma typického membránového lipidu, b) samouspořádání dvojné vrstvy ve vodném prostředí [1].	16
Obr. 3. Tvorba BLM metodou podle Muellera [2].	19
Obr. 4. Technika podle Langmuira a Blodgettové pro přípravu BLM [2].	19
Obr. 5. Schéma stabilizované fosfolipidové dvojvrstvy [2].	20
Obr. 6. Schéma přípravy ukotvené fosfolipidové dvojvrstvy [2].	21
Obr. 7. Ilustrativní model liposomu a micely [2].	23
Obr. 8. Schéma biosyntézy katecholaminů [28].	23
Obr. 9. Metabolismus dopaminu. DA - dopamin, DOPAC - 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina, 3-MT - 3-methoxythyramin, HVA - homovanilová kyselina (podle [30]).	24
Obr. 10. Schéma oxidace dopaminu (podle [31] a [32]).	25
Obr. 11. Schéma oxidace 3,4-dihydrofenyloctové kyseliny (podle [46]).	27
Obr. 12. Cyklické voltamogramy DOPAC ( $c = 0,2 \text{ mmol/l}$ ) naměřené pomocí Au elektrody v $0,1 \text{ mol/l}$ fosfátovém pufru. Voltamogramy 1-6 odpovídají měřením při různých hodnotách pH: 5,1; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 a 10,0 [47].	28
Obr. 13. a) trojúhelníkový průběh potenciálu při CV, b) cyklický voltamogram – pík a odpovídá oxidaci elektroaktivní látky, pík b odpovídá redukci vzniklého produktu. $E_1$ – počáteční potenciál, $E_2$ – koncový potenciál, $E_{p,a}$ – potenciál anodického píku, $E_{p,k}$ – potenciál katodického píku, $I_{p,a}$ – proud anodického píku, $I_{p,k}$ – proud katodického píku [48].	29
Obr. 14. Potenciálový program vkládaný na pracovní elektrodu při square wave voltametrii [48].	29
Obr. 15. Randlesův obvod. $R_s$ je odpor roztoku, $R_{ct}$ je odpor proti přenosu náboje a $C_{dl}$ je kapacita elektrické dvojvrstvy [13].	30
Obr. 16. Nyquistův graf pro Randlesův obvod [13].	31
Obr. 17. Dvoukomorová elektrochemická cela pro měření EIS v čtyřelektrodovém zapojení. Jako elektrody byly použity čtyři platinové drátky s průměrem 0,5 mm.	38

- Obr. 18. Cyklické voltamogramy dopaminu ( $c = 5 \cdot 10^{-5}$  mol/l) naměřené pomocí čisté a modifikované uhlíkové elektrody. Základním elektrolytem byl fosfátový pufr (pH = 6,5).....41
- Obr. 19. Square wave voltamogramy z měření akumulace dopaminu na čisté GCE. Koncentrace dopaminu v roztoku byla  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l a jako základní elektrolyt byl použit fosfátový pufr (pH = 6,5). Voltamogramy byly změřeny v následujících časových intervalech: 0, 30, 60, 90 a 120 min. ....42
- Obr. 20. Square wave voltamogramy z měření akumulace dopaminu na modifikované GCE. Koncentrace dopaminu byla  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l a jako základní elektrolyt byl použit PBS o pH 6,5. Voltamogramy byly změřeny v následujících časových intervalech: 0, 30, 60, 90 a 120 min. ....42
- Obr. 21. Cyklické voltamogramy dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l). Základním elektrolytem byl fosfátový pufr o dvou různých hodnotách pH (pH = 3,5 a 6,5). K měření CV byla použita čistá GCE.....43
- Obr. 22. Square wave voltamogramy dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na čisté GCE. Jako základní elektrolyt byl použit fosfátový pufr (pH = 3,5). SWV měření bylo provedeno dvakrát za sebou za stejných parametrů a GCE nebyla mezi měřeními čištěna. ....44
- Obr. 23. Cyklické voltamogramy dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l). Jako základní elektrolyt byl použit PBS o dvou různých hodnotách pH (pH = 6,5 a 9,5). K měření CV byla použita čistá GCE. ....45
- Obr. 24. Square wave voltamogramy dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) naměřené čistou GCE. Jako základní elektrolyt byl použit fosfátový pufr (pH = 9,5). SWV měření bylo provedeno dvakrát za sebou se stejnými parametry a pracovní uhlíková elektroda nebyla mezi měřeními čištěna. ....45
- Obr. 25. Souhrnný graf popisující akumulaci dopaminu na povrchu čisté GCE a ve fosfolipidové vrstvě. Měření bylo provedeno v roztoku dopaminu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l a základním elektrolytem byl fosfátový pufr (pH = 6,5). Použitou voltametrickou technikou byla SWV. ....46
- Obr. 26. Kalibrační závislost dopaminu měřená na čisté a modifikované GCE metodou SWV. Základním elektrolytem byl fosfátový pufr o pH 6,5.....47
- Obr. 27. Nyquistův diagram získaný EIS měřením s čistou GCE. Měření bylo provedeno v roztoku ferrokyanidu draselného ( $c = 1$  mmol/l) a základním elektrolytem byl roztok KCl ( $c = 0,1$  mol/l). ....48
- Obr. 28. Nyquistův diagram získaný EIS měřením s pokrytou GCE v roztoku ferrokyanidu draselného ( $c = 1$  mmol/l). Jako základní elektrolyt byl použit roztok KCl ( $c = 0,1$  mol/l). ..48

- Obr. 29. Závislost kapacity na čase. Data byla získána EIS měřením s uhlíkovou elektrodou, která byla definovanou dobu ponořena do roztoku dopaminu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l v prostředí PBS (pH = 6,5). Vlastní EIS měření bylo provedeno v roztoku ferrokyanidu draselného ( $c = 1$  mmol/l) a základním elektrolytem byl roztok KCl ( $c = 0,1$  mol/l)..... 49
- Obr. 30. Závislost polarizační rezistance na čase. Data byla naměřena metodou EIS pomocí GCE, která byla definovanou dobu ponořena do roztoku dopaminu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l v prostředí PBS (pH = 6,5). Vlastní EIS měření bylo provedeno v roztoku ferrokyanidu draselného ( $c = 1$  mmol/l) a základním elektrolytem byl roztok KCl ( $c = 0,1$  mol/l)..... 50
- Obr. 31. Závislost výšky voltametrického píku na čase. K měření byla použita uhlíková elektroda, která byla před měřením ponořena na definovanou dobu do roztoku dopaminu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l v prostředí PBS (pH = 6,5). Vlastní CV měření bylo provedeno v čistém elektrolytu (PBS o pH 6,5)..... 51
- Obr. 32. Změna kapacity čistého PC membránového filtru v čase. Oba prostory elektrochemické cely byly naplněny fosfátovým pufr (pH = 6,5)..... 52
- Obr. 33. Změna polarizační rezistance čistého PC membránového filtru v čase. V obou prostorech měrné cely byl umístěn fosfátový pufr (pH = 6,5). ..... 53
- Obr. 34. Změna kapacity pokrytého PC filtru v čase. Oba prostory elektrochemické cely byly naplněny PBS o pH 6,5. .... 54
- Obr. 35. Změna polarizační rezistance pokrytého PC membránového v čase. Oba prostory měrné cely byly naplněny fosfátovým pufr (pH = 6,5). ..... 54
- Obr. 36. Změna kapacity pokrytého PC membránového filtru v čase. Jedna strana filtru byla vystavena fosfátovému pufru (pH = 6,5), druhá strana roztoku dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) v PBS o pH 6,5. Před měřením byl filtr ponechán 120 min v prostředí fosfátového pufru (pH = 6,5)..... 55
- Obr. 37. Změna polarizační rezistance pokrytého PC membránového filtru v čase. Jedna strana filtru byla vystavena fosfátovému pufru (pH = 6,5), druhá strana roztoku dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l). Před měřením byl filtr ponechán 120 min v prostředí fosfátového pufru (pH = 6,5). ..... 56
- Obr. 38. Square wave voltamogramy roztoků odebraných z obou vialek měrné cely – z prostoru se základním elektrolytem (modrá křivka) a z prostoru s roztokem dopaminu (červená křivka). Měření bylo provedeno po 20 hod difúzi dopaminu přes PC membránový filtr ..... 57
- Obr. 39. Difúze dopaminu přes čistý a pokrytý PC membránový filtr. Data byla získána SWV měřením roztoků z obou nádobek měrné cely – v jedné nádobce byl ZE (fosfátový pufr o pH 6,5) a ve druhé roztok dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) v PBS o pH 6,5. Byla vyhodnocena výška

oxidačního píku dopaminu. Jednotlivé body odpovídají měřením po 1; 2; 3; 4,5 a 20 hod. ....	58
Obr. 40. AFM snímek povrchu lesklé strany PC membránového filtru. Výškový profil v řezu vyznačeném bílou čarou je na obr. 43. ....	59
Obr. 41. AFM snímek matné strany PC membránového filtru. ....	59
Obr. 42. AFM snímek povrchu lesklé strany PC membránového filtru pokryté vrstvou fosfolipidů. Výškový profil v řezu vyznačeném bílou čarou je na obr. 43. ....	60
Obr. 43. Výškový profil odpovídající lesklé straně čistého a pokrytého PC membránového filtru. Skenování povrchu filtru bylo provedeno pomocí AFM. ....	60
Obr. 44. Cyklické voltamogramy 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny naměřené s čistou a modifikovanou GCE. Měření bylo provedeno v roztoku DOPAC o koncentraci 1 mmol/l a základním elektrolytem byl fosfátový pufr o pH 6,5.....	61
Obr. 45. Square wave voltamogramy z měření akumulace DOPAC na čisté uhlíkové elektrodě. Byl použit roztok 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l a základním elektrolytem byl fosfátový pufr o pH 6,5. Jednotlivé voltamogramy odpovídají 0, 30, 60, 90 a 120 minutové akumulaci DOPAC na elektrodovém povrchu. ....	62
Obr. 46. Square wave voltamogramy charakterizující akumulaci DOPAC ve fosfolipidové vrstvě, kterou byla modifikována uhlíková elektroda. K měření byl použit roztok DOPAC o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Základním elektrolytem byl PBS (pH = 6,5). Voltamogramy byly naměřeny v následujících časových intervalech po ponoření GCE do roztoku 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny: 0, 30, 60, 90 a 120 min. ....	63
Obr. 47. Square wave voltamogram pro adsorbovaný oxidační produkt DOPAC naměřený s čistou GCE. Na elektrodu byl po dobu 5 min vkládán potenciál +500 mV v roztoku DOPAC ( $c = 5 \cdot 10^{-4}$ mol/l) se základním elektrolytem PBS o pH 6,5. Po oxidaci byla elektroda ponořena do čistého elektrolytu a bylo provedeno SWV měření.....	64
Obr. 48. Graf shrnující výsledky akumulačních měření s čistou a modifikovanou GCE. Měření bylo provedeno technikou SWV. Koncentrace roztoku DOPAC byla $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l a jako základní elektrolyt byl použit fosfátový pufr o pH 6,5.....	65
Obr. 49. Kalibrační závislosti pro DOPAC naměřené s čistou a modifikovanou GCE metodou SWV. Základním elektrolytem byl PBS o pH 6,5.....	66
Obr. 50. Kalibrační závislosti pro DOPAC naměřené metodou SWV pomocí modifikované GCE. Jako základní elektrolyt byl použit fosfátový pufr o pH 6,5. Křivky odpovídají třem opakováním měření stejné kalibrační řady (vždy s nově pokrytou uhlíkovou elektrodou). ....	66
Obr. 51. Závislost polarizační rezistance na čase. Hodnoty byly získány EIS měřením s uhlíkovou elektrodou, která byla definovanou dobu ponořena do roztoku DOPAC o	

koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l v prostředí PBS o pH 6,5. Samotné EIS měření probíhalo v roztoku ferrokyanidu draselného ( $c = 1$  mmol/l) a základním elektrolytem byl roztok KCl ( $c = 0,1$  mol/l). .....67

Obr. 52. Cyklické voltamogramy DOPAC. Měření bylo provedeno s čistou GCE, která byla definovanou dobu ponořena do roztoku DOPAC o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l v prostředí PBS o pH 6,5. Samotné měření CV probíhalo v roztoku ferrokyanidu draselného ( $c = 1$  mmol/l) a základním elektrolytem byl roztok KCl ( $c = 0,1$  mol/l). ..... 68

Obr. 53. Závislost výšky píku z cyklického voltamogramu na čase. Čistá a modifikovaná GCE byly před měřením ponořeny na definovanou dobu do roztoku DOPAC o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l v prostředí fosfátového pufru (pH = 6,5). Vlastní CV měření bylo provedeno v PBS. ....69

# 1. Úvod

Katecholaminy jsou látky působící v organismu jako neurotransmitery a hormony. V této práci je konkrétně věnována pozornost dopaminu a jeho metabolitu, kyselině 3,4-dihydroxyfenyloctové. Jestliže je hladina dopaminu v organismu vychýlena z rovnovážné hodnoty, dochází k rozvoji řady chorobných stavů. Jedná se především o neurodegenerativní onemocnění, např. Parkinsonovu chorobu, ADHD (hyperaktivita), schizofrenii, Touretteův syndrom a řadu dalších. Z toho vyplývá důležitost vhodné metodiky pro citlivé a selektivní stanovení dopaminu v krvi nebo mozkomíšním moku následované diagnostikou onemocnění.

Strukturní základ katecholaminů tvoří dihydroxyfenylové jádro, které je snadno oxidovatelné na *o*-chinon. Nabízí se aplikace elektrochemických metod. Problémem jsou interferenty obsažené v biologické matici, které snižují selektivitu a citlivost stanovení. V praxi je proto využívána elektrochemická detekce po předchozí separaci vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

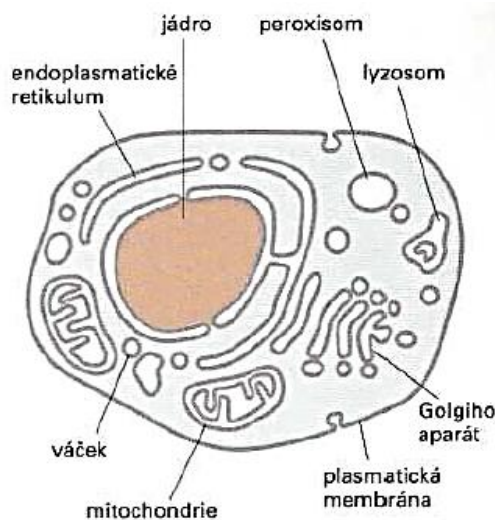
Selektivitu a citlivost stanovení dopaminu pomocí elektrochemických metod zvyšuje použití modifikovaných elektrod. V této práci je testována modifikace elektrody ze skelného uhlíku (GCE) fosfolipidovou dvojvrstvou. Dvojná vrstva lipidů na povrchu elektrody simuluje biologickou membránu. Veškeré experimenty byly prováděny s čistou GCE a modifikovanou GCE. Elektrochemické metody použité v této studii jsou cyklická voltametrie, square wave voltametrie a elektrochemická impedanční spektroskopie. Cílem práce je popsat elektrochemické chování dopaminu a 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny a sledovat jejich interakce s fosfolipidovou membránou.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Biologické membrány

Biologické membrány patří mezi základní stavební prvky každé buňky. Vnější obal buňky označujeme jako plazmatickou membránu. Jedná se o velice tenkou vrstvu tuků o tloušťce přibližně 5 nm. Plazmatická membrána má řadu důležitých funkcí – slouží jako ochranná bariéra buňky, zajišťuje transport živin a odpadních látek do buňky, respektive ven z buňky, obsahuje zakotvené receptory, které reagují na změny chemického složení v okolí buňky.

U jednoduchých bakterií je plazmatická membrána jedinou biologickou membránou. Komplexní eukaryotní buňky na rozdíl od bakterií obsahují i vnitřní membrány, které oddělují jednotlivé buněčné organely – Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, mitochondrie, jádro a další (obr. 1). Díky vnitřním membránám je udržováno rozdílné chemické složení v jednotlivých oddílech a jsou tedy zajištěny specifické funkce daných organel. Vnitřní membrány neslouží pouze jako selektivní přepážky, ale také hrají klíčovou roli v celé řadě procesů, např. při oxidativní fosforylaci, která probíhá na vnitřní mitochondriální membráně [1].

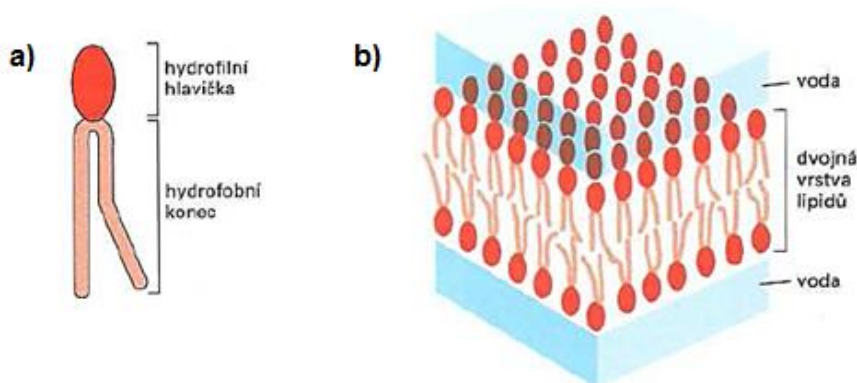


**Obr. 1.** Biologické membrány v eukaryotní buňce [1].

Biologické membrány jsou tvořeny proteiny (55 %), fosfolipidy (25 %), cholesterolem (13 %), ostatními lipidy (4 %) a sacharidy (3 %). Proteiny jsou v membráně obsaženy ve velkém množství a přispívají k utváření její celkové struktury (transmembránové proteinové komplexy sloužící k transportu látek – póry, kanály). Nejhojněji zastoupenými lipidy v biologických membránách jsou fosfolipidy (především fosfatidylcholin, dále

fosfatidylethanolamin, fosfatidylinositol a fosfatidylserin). Molekuly fosfolipidů jsou tzv. amfipatické – mají hydrofilní a hydrofobní část. Tato vlastnost je zásadní při uspořádání fosfolipidů do dvojných vrstev, kdy hlavní hnací silou jsou hydrofobní interakce (obr. 2). Hydrofilní hlavičky obsahují záporně nabitou fosfátovou skupinu, případně další polární skupiny (např. ethanolamin, cholin), a ochotně interagují s molekulami vody. Hydrofobní konce fosfolipidů se skládají z uhlovodíkových řetězců mastných kyselin, které obvykle obsahují sudý počet atomů uhlíku, často kyselina palmitová s 16 uhlíky nebo kyselina stearová s 18 uhlíky. Energeticky nejvýhodnější uspořádání amfipatických molekul je takové, kdy hydrofilní části směřují do vodného roztoku, zatímco hydrofobní konce směřují do vnitřního prostoru membrány [1, 2].

Fosfolipidová dvojvrstva má dvě základní funkce. Za prvé, je nepropustná pro hydrofilní molekuly. Některé polární látky a ionty mohou být přes membránu přeneseny



**Obr. 2.** a) schéma typického membránového lipidu, b) samouspořádání dvojně vrstvy ve vodném prostředí [1].

specifickými transportními proteiny, které jsou ve dvojvrstvě zakotveny. Druhou důležitou vlastností membrán je jejich neobyčejná stabilita. Uspořádání do dvojně vrstvy je udržováno hydrofobními a van der Waalsovými interakcemi mezi lipidovými řetězci. Díky tomu dokáže membrána dobře odolávat změnám iontové síly nebo pH vnějšího prostředí a zachovat svou strukturu [3].

Jak uvnitř buňky, tak v jejím okolí je vodné prostředí, což zabraňuje lipidům opustit dvojnou vrstvu. V membráně však může docházet k tomu, že si molekuly lipidů navzájem vyměňují svá místa a dochází tak k pohybu v rámci dvojvrstvy. Lze říci, že membrány mají polotekutý charakter. Stupeň tekutosti závisí na konkrétním složení dané biologické membrány. Fluidita je dána především vlastnostmi uhlovodíkových řetězců – jejich délkou a



stupněm nasycení. Pravidelnější a těsnější uspořádání řetězců znamená vyšší viskozitu, a tedy nižší tekutost vrstvy. Čím je stupeň tekutosti vyšší, tím je pohyb uvnitř membrány jednodušší. Fluidita je snižována přítomností cholesterolu, který se vyskytuje v živočišných buňkách. V membráně vyplňuje cholesterol mezery mezi nepravidelnými molekulami fosfolipidů. Důsledkem je zpevnění membrány, snížení její tekutosti, a tedy nižší permeabilita. Fluidita membrány může být zásadním faktorem při některých procesech. Například pro buněčnou signalizaci je velice důležitá rychlá difúze proteinů v dvojvrstvě, aby mohlo dojít k jejich vzájemné interakci [1].

## 2.2. Modelové fosfolipidové membrány

Modelové fosfolipidové membrány (PLBs) simulují reálné biologické membrány a napomáhají pochopit jejich vlastnosti a funkce *in vitro* podmínkách. V nejjednodušším případě je dvojvrstva tvořena pouze jedním typem fosfolipidu nebo se může jednat o jejich směsi. Příkladem směsi přírodních fosfolipidů je asolectin, který se získává ze sójových bobů a obsahuje jako hlavní složky fosfatidylcholin (~25 %), fosfatidylethanolamin a fosfatidylinositol. Jednoduché modelové membrány na rozdíl od buněčných membrán neobsahují iontové kanály, transportní proteiny a mnoho dalších důležitých komponent. Nicméně existují studie, které popisují přípravu lipidových membrán s inkorporovanými proteiny, a dokonce i iontovými kanály. Rozdílnými způsoby přípravy je možné získat různé typy modelových membrán – planární fosfolipidové dvojvrstvy (p-PLB), stabilizované fosfolipidové dvojvrstvy (s-PLB) a ukotvené lipidové dvojvrstvy (t-BLM) [2, 4].

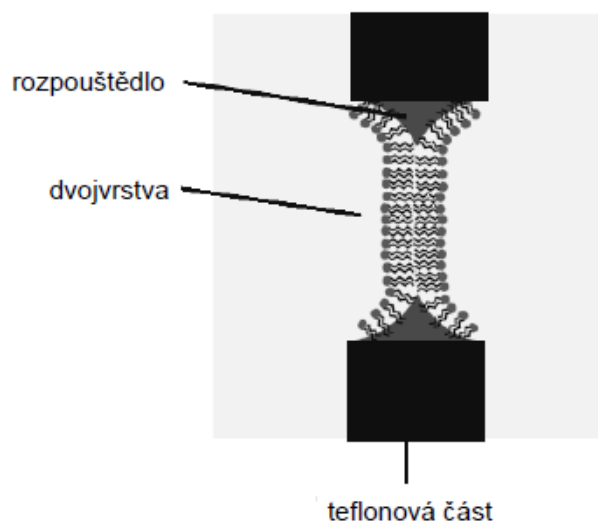
Modelové membrány jsou hojně využívány k experimentálním účelům. Testují se např. struktura membrán, transport molekul a iontů přes membrány, interakce membránových lipidů s integrovanými proteiny, elektrochemické vlastnosti membrán a zajímavé je využití lipidových membrán ke konstrukci biosenzorů. Příkladem takového zařízení pro selektivní a citlivou detekci analytu jsou biosenzory na bázi liposomů. Do kavity liposomu se uzavře signální molekula, např. barvivo nebo enzym. Tato molekula specificky interaguje s analytem, který pronikne přes lipidovou vrstvu do nitra liposomu. Většinou je podstatou liposomových biosenzorů imunochemická reakce. Nízkých limitů detekce bylo dosaženo pro analyty zahrnující hormony, viry, bakterie, fragmenty DNA a RNA, pesticidy, nádorové markery, proteiny, protilátky a některá léčiva. Velkou nevýhodou je malá stabilita membrán [5].

K účelům testování modelových membrán se používají různé metody. Povrch membrány, defekty, případně tloušťku vrstvy je možné sledovat pomocí mikroskopu atomárních sil (AFM). Tato metoda se často používá pouze jako technika doplňková, např. v kombinaci s fluorescenční mikroskopií, protože AFM není schopna charakterizovat strukturu membrány, ani interakce uvnitř membrány – s membránovými proteiny apod. [6, 7]. Pro popis struktury se používá rentgenová difrakce. U této metody je vyžadován vzorek v krystalické formě [8]. Je známo i použití nukleární magnetické rezonance (NMR) a to v různých variantách, např.  $^{13}\text{C}$ -NMR,  $^{31}\text{P}$ -NMR [9] a  $^2\text{H}$ -NMR [10]. Dále jsou využívány elektrochemické metody, např. voltametrie a elektrochemická impedanční spektroskopie [11-13].

### **2.2.1. Planární fosfolipidové dvojvrstvy**

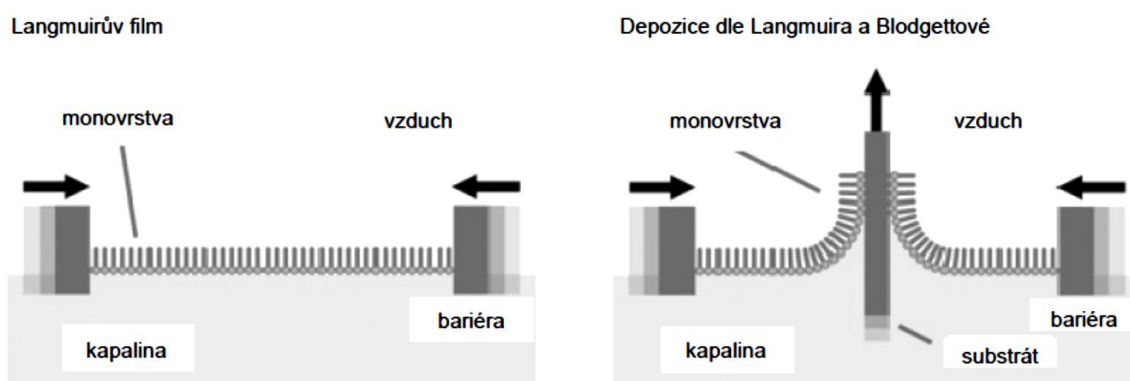
Planární fosfolipidové dvojvrstvy (p-PLB) bývají také někdy označovány jako černé lipidové membrány (BLM = black lipid membrane). Důvodem tohoto označení je skutečnost, že se planární fosfolipidové membrány jeví tmavě v odraženém světle procházejícím mikroskopem. Jedná se o nejjednodušší typ modelové membrány, jejíž tloušťka dosahuje řádově několika nanometrů. Hlavní uplatnění mají při charakterizaci iontových kanálů a proteinových pórů, které zajišťují transport látek přes membránu.

K vytvoření BLM se dnes využívají hlavně dvě metody. První metoda se objevila již v 60. letech 20. století a zavedl ji Mueller [14]. Principem je spojení dvou monovrstev ve dvojvrstvu. Postup je následující. Destička vyrobená z hydrofobního materiálu (např. z teflonu) se pomalu zasouvá skrze hladinu, na které je nanesena fosfolipidová monovrstva. Tato se zachycuje na stěnách destičky a ve středu destičky, kde je otvor o průměru několika desítek až stovek mikrometrů, dochází ke spojení monovrstev a vzniku dvojvrstvy. Příprava membrány podle Muellera je schematicky znázorněna na obr. 3. Nevýhodou Muellerovy metody může být přítomnost kontaminantů v rozpouštědlech a velké napětí dvojnásobné vrstvy na okrajích otvoru destičky. Naopak výhodou je, že lze roztok na obou stranách membrány jednoduše vyměnit.



**Obr. 3.** Tvorba BLM metodou podle Muellera [2].

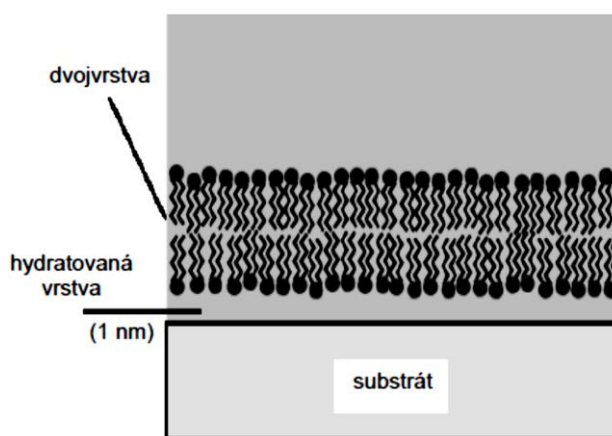
Druhá metoda, která se používá k tvorbě BLM, je metoda Langmuira a Blodgettové [15]. V prvním kroku se na vodní hladinu, přesněji řečeno na rozhraní fází voda/vzduch, nanese fosfolipid. V důsledku interakce hydrofilních hlaviček fosfolipidů s vodou vznikne tzv. Langmuirova monovrstva. Tato monovrstva je následně stlačována pomocí pohyblivých přepážek, které jsou umístěny na krajích nádoby. Tímto způsobem vzniká těsnější uspořádání fosfolipidů (zanikají mezery mezi jednotlivými molekulami). Mezi rozhraní voda/vzduch se zasune substrát, na kterém se zachytí monovrstva [2]. Obr. 4 zobrazuje postup při přípravě dvojné vrstvy podle Langmuira a Blodgettové.



**Obr. 4.** Technika podle Langmuira a Blodgettové pro přípravu BLM [2].

## 2.2.2. Stabilizované fosfolipidové dvojvrstvy

Stabilizované fosfolipidové membrány (s-PLB) jsou běžně používaným typem modelových membrán. Jejich přípravu poprvé popsal McConnell [16]. Membrána je v tomto případě nanášena na pevném nosiči (např.  $\text{SiO}_2$ ), přičemž mezi nosičem a membránou je nepatrná vrstvička vody. Druhá strana dvojvrstvy je vystavena vodnému roztoku. Uspořádání s-PLB je znázorněno na obr. 5. Tento typ modelových membrán našel široké uplatnění. Používá se např. pro studium fyzikálně-chemických vlastností membrán, pro vývoj biosenzorů, pro studium různých interakcí membrán *in vitro* nebo jako modelový systém pro přenos léčiv. Velkou výhodou těchto membrán je jejich stabilita [2].

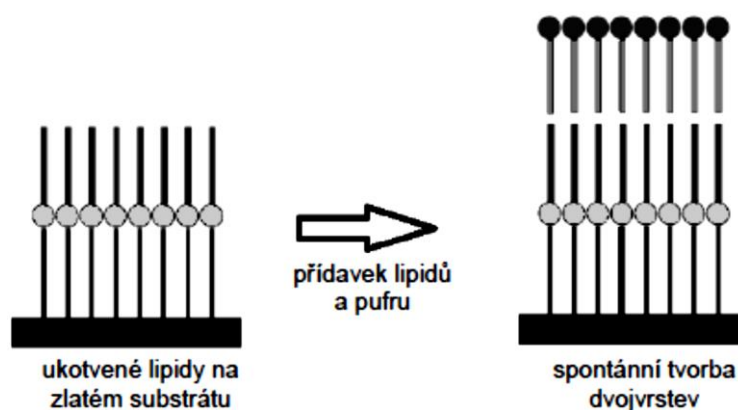


**Obr. 5.** Schéma stabilizované fosfolipidové dvojvrstvy [2].

Pro přípravu s-PLB se používá několik metod. Nejčastější jsou technika splynutí váčků, tzv. „self-spreading“ technika [17], a spojení metod Langmuir-Blodgett a Langmuir-Schaefer. V první fázi se metodou Langmuira a Blodgettové nanese fosfolipidová monovrstva na pevný nosič a následně se technikou Langmuir-Schaefer připojí druhá vrstva fosfolipidů za vzniku dvojvrstvy. Metoda Langmuir-Schaefer spočívá v tom, že se pevný nosič s monovrstvou v horizontální poloze vystaví celou plochou rozhraní fázi voda/vzduch, kde se nachází druhá fosfolipidová monovrstva. Spojením obou monovrstev – na pevném nosiči a na rozhraní fázi voda/vzduch – vznikne fosfolipidová dvojvrstva [18].

### 2.2.3. Ukotvené fosfolipidové dvojvrstvy

Ukotvené fosfolipidové membrány (t-BLM) byly navrženy Langem a jeho spolupracovníky [19]. Tento typ modelových membrán představuje dvojvrstvy, které jsou imobilizovány na pevném nosiči. Kovalentní vazbu fosfolipidové dvojvrstvy na nosič zprostředkovává tzv. spacer skupina (většinou krátký oligomer a kotevní lipid). Zpočátku se pro přípravu těchto vrstev používala technika dle Langmuira a Blodgettové. Dnes se využívají převážně metody založené na samouspořádání dvojvrstvy (obr. 6). Mezi fosfolipidovou vrstvou a pevným nosičem vzniká malý volný prostor, který umožňuje zabudování membránových proteinů pro transport různých látek přes membránu [2].



*Obr. 6. Schéma přípravy ukotvené fosfolipidové dvojvrstvy [2].*

Ukotvené fosfolipidové membrány byly použity jako model biologické membrány pro řadu biofyzikálních experimentů. Příkladem aplikací t-BLM mohou být následující studie: interakce oligomeru s membránou [20], interakce proteinu s membránou [21], průchod látek lipidovou vrstvou [22], transport iontů přes membránu [23], charakterizace transmembránových oxidoreduktas [24], studium receptorů zakotvených v membránách [25], interakce antigenu s protilátkou na povrchu membrány [26].

### 2.2.4. Liposomy

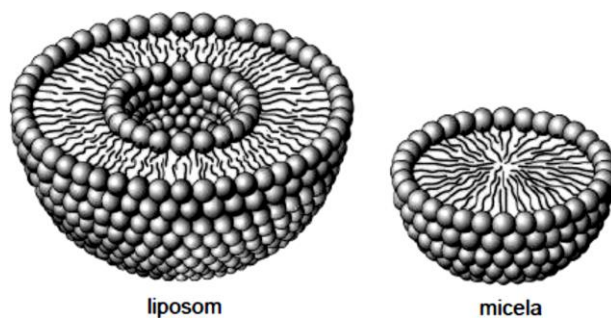
Liposomy jsou váčky složené z lipidové dvojvrstvy (často fosfolipidové). Ve vodném roztoku vytvářejí amfifilní molekuly fosfolipidů koloidní vezikuly, v nichž je zapouzdřeno malé množství vodného roztoku. Klasická příprava liposomů spočívá v odpaření organického rozpouštědla z roztoku fosfolipidu, kdy se na stěně nádoby utvoří tenký fosfolipidový film. Následuje odstranění zbytku rozpouštědla pomocí vakua a přidání vody do nádoby s fosfolipidovou vrstvou. Dojde k samovolnému utvoření multilamelárních liposomů (MUV),

kteře obsahují 5 až 20 fosfolipidových dvojvrstev. Jiný způsob přípravy MUV spočívá v přidavku vodného pufru do roztoku fosfolipidu v organickém rozpouštědle. Rozpouštědlo se odpaří a přidá se vodná fáze, čímž dojde ke vzniku micel. Postupnou přeměnou micel dochází k utváření dvojné vrstvy a vznikají liposomy. Multilamelární vezikuly lze opakovaným chlazením v kapalném dusíku a zahříváním převést na malé unilamelární vezikuly (SUV) s jedinou fosfolipidovou dvojvrstvou. SUV lze připravit také injekční technikou, kdy se pomocí injekční stříkačky dávkuje velmi pomalu alkoholický roztok fosfolipidu do míchané vodné fáze [2].

Další metoda, která byla vyvinuta pro přípravu liposomů, je metoda spontánní revezikulace. Při přípravě liposomů klasickou metodou mohou liposomy obsahovat stopy organických rozpouštědel, což je nežádoucí při jejich využití v analytické chemii. Metoda spontánní revezikulace tento nežádoucí efekt eliminuje. Spontánní revezikulace je založena na postupných přidávcích koncentrovaného vodného roztoku fosfolipidu do čisté vody nebo vodného roztoku pufru. Velikost liposomů závisí na celkové koncentraci fosfolipidu v roztoku [27].

Standardizace metody pro přípravu liposomů je nezbytná a odvíjí se od zamýšleného použití liposomů. Důležitými vlastnostmi liposomů jsou jejich velikost, počet fosfolipidových dvojvrstev, typ fosfolipidů a jejich koncentrace, povrchový náboj, stabilita liposomů, propustnost a další. Významnou charakteristikou je povrchový náboj vezikulů, jelikož ovlivňuje interakci liposomů navzájem a interakce liposomů s jinými molekulami. Povrchový náboj je daný strukturou hydrofilní hlavičky fosfolipidu a složením vodné fáze (pH, iontová síla).

Liposomy jsou schopné transportovat pouze hydrofilní látky. Naproti tomu, micely, které jsou tvořeny pouze monovrstvou fosfolipidů, transportují látky hydrofobní povahy. Z obr. 7 jsou patrné rozdíly mezi liposomem a micelou. Využití liposomů je široké. Používají se jak v oblasti výzkumu, tak pro terapeutické účely jako nosiče léčiv (kancerostatika, hormony, enzymy a jiné). Další využití mají např. jako nosiče barviv v textilním průmyslu, nosiče pesticidů nebo enzymů [2]. V poslední době roste využití liposomů pro konstruování biosenzorů a další bioanalytické aplikace, které využívají možnosti zapouzdření polárních látek [5].

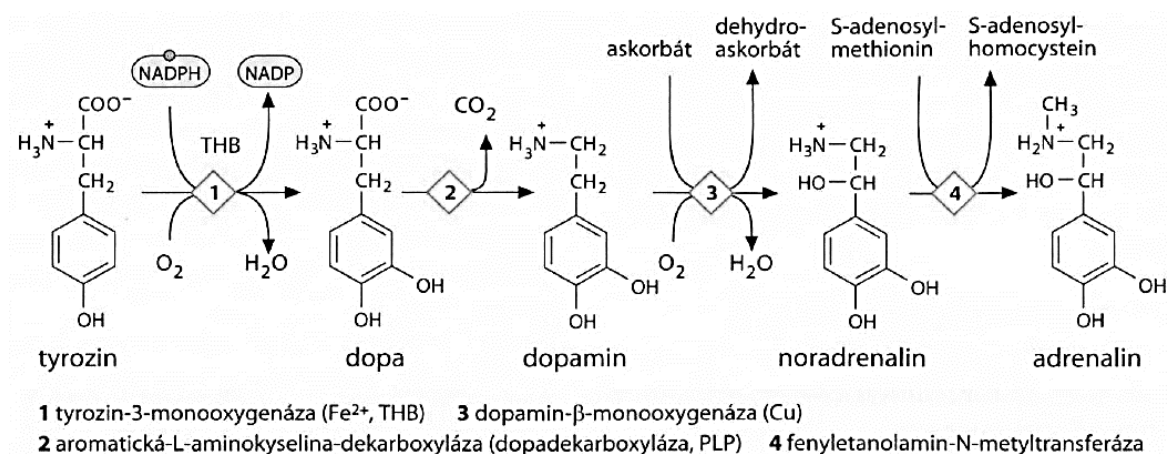


Obr. 7. Ilustrativní model liposomu a micely [2].

## 2.3. Studované látky – katecholaminy

Katecholaminy označují skupinu biogenních aminů, které v lidském organismu plní funkci neurotransmiterů a hormonů. Jedná se o aminy, které mají společný strukturní základ, všechny obsahují dihydroxyfenylový skelet.

Biosyntéza katecholaminů probíhá v dřeni nadledvin a v nervových buňkách centrální a periferní nervové soustavy. Syntéza vychází z aminokyseliny tyrosinu. Hydroxylovací aromatického jádra vzniká 3,4-dihydroxyfenylalanin (DOPA) a jeho dekarboxylací vzniká dopamin. V dopaminergních neuronech je dopamin konečným produktem biosyntézy. V nadledvinách a (nor)adrenergních neuronech běží syntéza dále až na noradrenalin a adrenalin. Syntéza katecholaminů je schematicky znázorněna na obr. 8. Dopamin působí v CNS jako neurotransmitter a je nezbytný pro regulaci a řízení řady procesů. Adrenalin a noradrenalin mají funkci jak neurotransmiterů, tak hormonů [28].



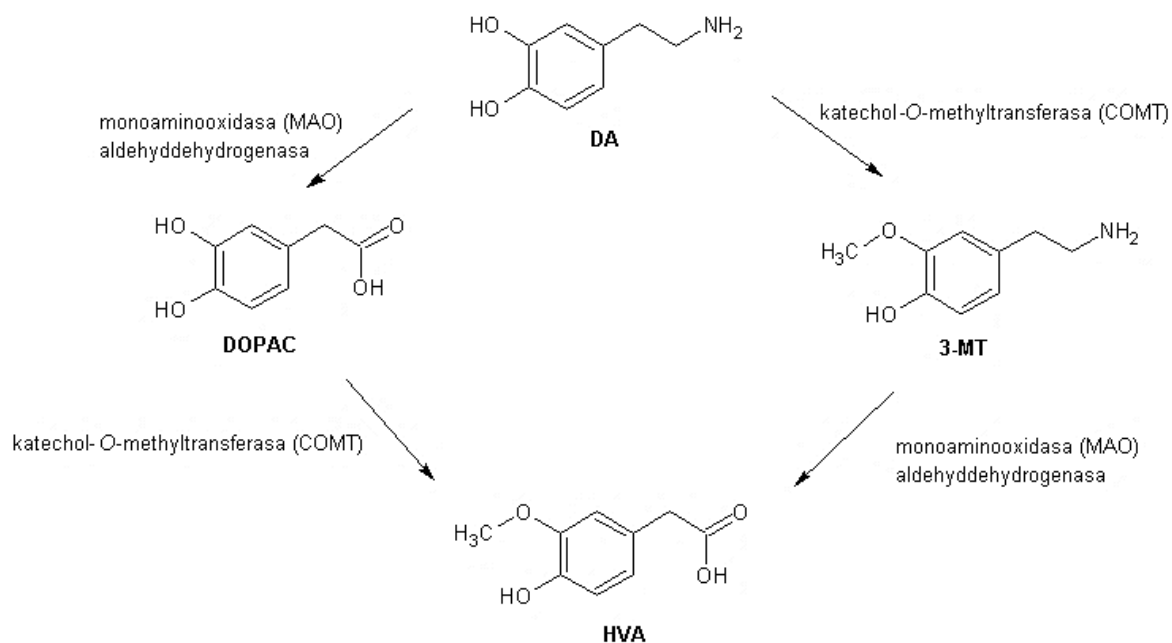
Obr. 8. Schéma biosyntézy katecholaminů [28].

### 2.3.1. Dopamin

Dopamin (DA) hraje důležitou úlohu v centrální nervové soustavě savců. Řídí řadu důležitých procesů, např. lokomoční aktivitu, emoční citění, příjem potravy a reguluje endokrinní systém. Dopamin se vyskytuje rovněž mimo CNS, kde ovlivňuje činnost kardiiovaskulárního systému, uvolňování katecholaminů, sekreci hormonů, svalový tonus, funkci ledvin a gastrointestinálního traktu.

Narušení rovnováhy v dopaminergních drahách je spojováno s řadou patologických stavů, např. s Parkinsonovou chorobou, schizofrenií, Touretteovým syndromem a hyperprolaktinemií. Antagonisté dopaminu jsou základem léků, které se podávají pacientům trpícím schizofrenií k potlačení halucinací. Naproti tomu agonisté dopaminu se aplikují u pacientů s Parkinsonovou chorobou ke zmírnění typické pohybové chudosti [29].

Metabolickou degradaci dopaminu v lidském těle katalyzují dva enzymy – monoaminoxidasa (MAO) a katechol-*O*-methyltransferasa (COMT). Konečným produktem degrační dráhy dopaminu v organismu je kyselina homovanilová [30]. Schéma metabolismu DA znázorňuje obr. 9.

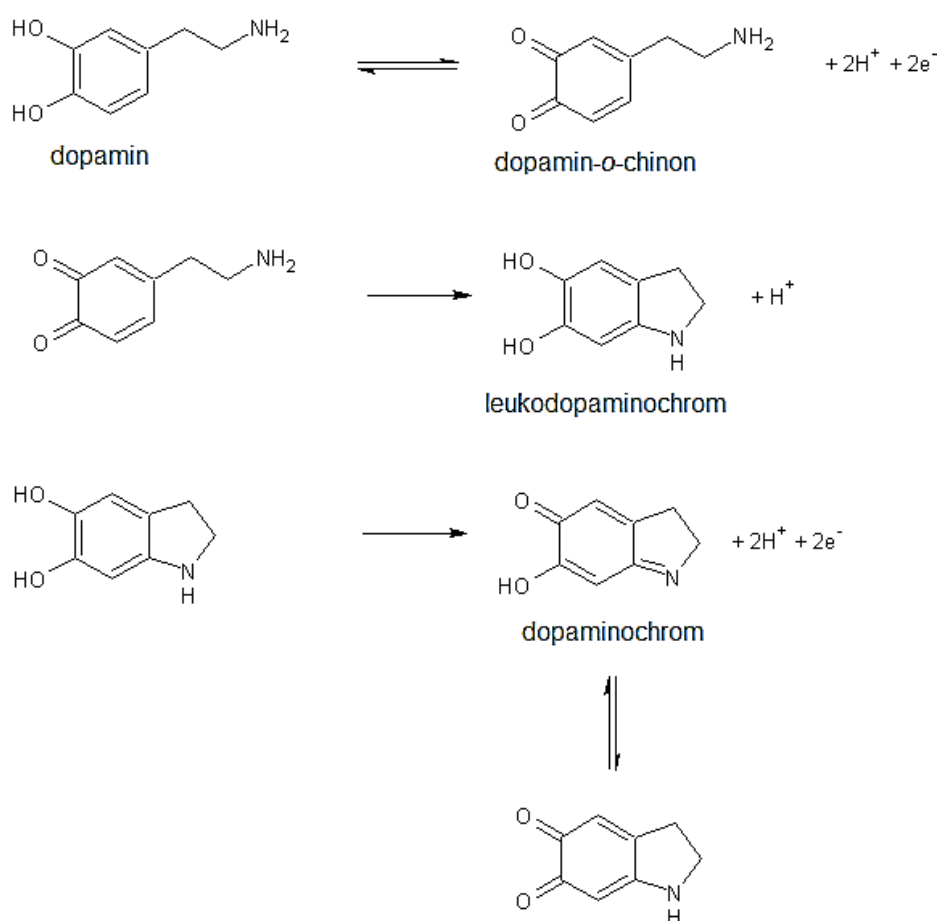


**Obr. 9.** Metabolismus dopaminu.

DA - dopamin, DOPAC - 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina, 3-MT - 3-methoxytyramin, HVA - homovanilová kyselina (podle [30]).



U dopaminu a obecně u všech katecholaminů se nabízí elektrochemická detekce, protože dihydroxyfenylový skelet je snadno oxidovatelný na příslušný *o*-chinon. Problémem může být složitá matrice biologických vzorků, a proto se v praxi pro stanovení katecholaminů používá separace pomocí HPLC s následnou elektrochemickou detekcí. Oxidací dopaminu v prvním kroku vzniká dopamin-*o*-chinon. V závislosti na pH může dojít k 1,4-adici za vzniku cyklického produktu – leukodopaminochromu. Cyklizace probíhá při pH > 5, kdy je dostatek aminoskupin v neprotonizované formě. Naopak při nízkém pH k cyklizaci nedochází, protože většina aminoskupin je protonizovaná. Schéma oxidace dopaminu je na obr. 10 [31], [32]. Na cyklickém voltamogramu dopaminu v závislosti na pH pozorujeme jeden nebo dva píky odpovídající oxidačním produktům dopamin-*o*-chinonu a leukodopaminochromu.



**Obr. 10.** Schéma oxidace dopaminu (podle [31] a [32]).

Pro selektivní stanovení dopaminu byla mimo jiné publikována studie, která se zabývá sestavením biosenzoru s lipidovou membránou. Hlavní nevýhoda spočívá v tom, že lipidové

membrány nejsou příliš stabilní, z čehož vyplývá jejich omezená „doba životnosti“ a nutnost uchovávání senzoru s membránou v roztoku elektrolytu. Zmiňovaná studie navrhuje způsob, jak zvýšit stabilitu lipidové vrstvy. Konkrétně jde o zabudování resorcin[4]arenového receptoru do membrány. Takováto modifikovaná lipidová dvojvrstva zůstává stabilní až po dobu jednoho měsíce a není nezbytné její skladování v roztoku elektrolytu, protože na vzduchu nedochází k degradaci membrány [33, 34].

K popisu interakce dopaminu s lipidovou membránou byla využita např. nukleární magnetická rezonance ( $^1\text{H-NMR}$ ). Konkrétně se jednalo o studium afinity dopaminu k různým typům fosfolipidů. Bylo zjištěno, že interakce dopaminu s různými lipidy se liší. A z toho lze usoudit, že množství dopaminu uvolňovaného v mozku do jisté míry souvisí právě se zastoupením jednotlivých lipidů v buněčných membránách neuronů [35].

Z dalších metod lze zmínit např. izotermickou titrační kalorimetrii a diferenční skenovací kalorimetrii. Tyto metody byly využity k popisu interakce kladně nabitého dopaminu (při fyziologickém pH je většina molekul dopaminu protonizovaná) a záporně nabitého fosfolipidu. Aktivním místem lipidů, které interaguje s dopaminem, je hydrofilní hlavička. Celková interakce lipidové membrány s dopaminem je dána strukturou a nábojem hydrofilní hlavičky lipidů. Z experimentů vyplývá, že dopamin neproniká do dvojvrstvy, nýbrž interakce lipidové membrány s dopaminem je pouze povrchová a je realizována elektrostatickými silami [36].

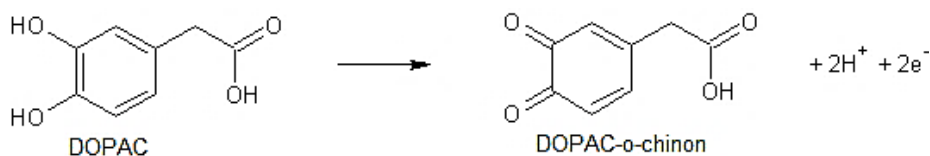
Zajímavé jsou výpočetní studie, které se zabývají simulací modelů vystihujících interakci různých látek s buněčnými membránami. Příkladem je práce, která se zabývá molekulárně dynamickou simulací interakcí třinácti nepeptidických neurotransmiterů se třemi typy fosfolipidových membrán. Autoři poukazují na to, že neurotransmitery neprocházejí lipidovou dvojvrstvou, ale dochází pouze k jejich reverzibilnímu začlenění do dvojvrstvy. V této studii jsou rozlišeny dvě skupiny neurotransmiterů na základě toho, jestli reverzibilně pronikají do membrány anebo zůstávají ve vodném roztoku vně membrány. První skupinu tvoří neurotransmitery, které se vážou na membránu, jelikož jejich receptory jsou zanořeny v membráně. Do této skupiny je řazen mimo jiné dopamin, jehož vazba na membránu je velmi silná. Naproti tomu druhou skupinu tvoří neurotransmitery, jejichž receptory vyčnívají vně membrány, a proto zůstávají ve vodném roztoku obklopujícím buňku. Sem patří nabitě molekuly, např. histamin [37]. Jiná práce se zabývá simulacemi modelových membrán tvořených DOPC (fosfatidylcholin) a jejich interakcemi s nízkomolekulárními látkami. Autor

zmiňuje význam membránového dipólového potenciálu. Membránový dipólový potenciál vzniká jako důsledek toho, že se na povrchu membrány střídají do sebe pronikající vrstvy záporných a kladných nábojů a dipólů. Hodnota dipólového potenciálu pro lipidové membrány se pohybuje v rozmezí +200 až +500 mV a závisí na složení membrány, např. na přítomnosti cholesterolu. Jelikož je hodnota membránového dipólového potenciálu kladná, budou membránou lépe procházet záporně nabitě látky [38].

### 2.3.2. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina

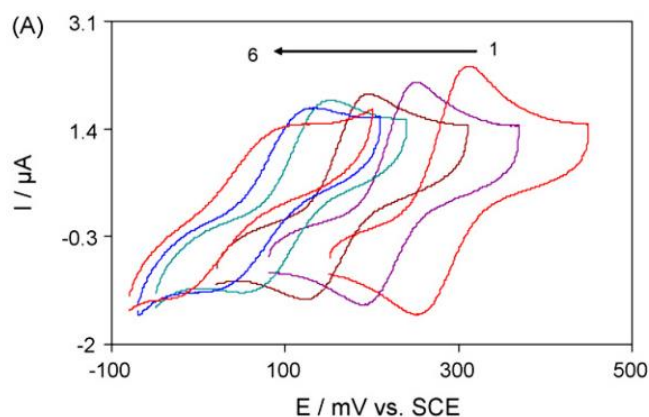
Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (DOPAC) je jedním z metabolitů dopaminu. Deaminaci dopaminu katalyzuje enzym aldehyddehydrogenasa. Vzniká aldehyd, který je oxidován za přítomnosti monoaminoxidasy na DOPAC. Koncentrace kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové v plazmě nebo mozkomíšním moku napomáhá diagnostikovat některé choroby [39]. Například u pacientů trpících Parkinsonovou chorobou je hladina 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny v mozkomíšním moku významně nižší oproti normální hodnotě [40]. Hladina DOPAC v krvi souvisí s příjmem potravy. Je známo, že po jídle je koncentrace 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny v krvi několikanásobně vyšší [41]. Jako normální koncentrace DOPAC v plazmě se uvádí 8,9 nmol/l [39].

Koncentrace 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny v krvi bývá velice nízká, proto byla studována řada metod pro citlivé stanovení této látky. Často se jednalo o separaci pomocí HPLC ve spojení s různými detektory, např. s fluorimetrickým [42] nebo coulometrickým detektorem [43]. Elektrochemické metody byly rovněž testovány. Nevýhodou však je, že v biologické matrici je přítomna řada interferentů, konkrétně kyselina askorbová a močová, které se oxidují při obdobném potenciálu jako DOPAC a jejich koncentrace v matrici je mnohonásobně vyšší než koncentrace analytu [44]. Řešením je použití modifikovaných elektrod, které zvýší selektivitu a citlivost stanovení – např. modifikace GCE tenkým polymerním filmem 5-amino-1,3,4-thiazol-2-thiolu [45].



**Obr. 11.** Schéma oxidace 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny (podle [46]).

Na cyklickém voltamogramu 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny je patrný pouze jeden anodický pík, který odpovídá oxidaci na příslušný *o*-chinon (obr. 11). Proud katodického píku bývá nižší než proud anodického píku, což poukazuje na to, že oxidační produkty DOPAC nejsou stabilní [46]. Proces oxidace a reverzibilita děje silně závisí na pH roztoku. V silně alkalickém prostředí ( $\text{pH} > 10$ ) je reakce prakticky ireverzibilní. Na obr. 12 jsou zobrazeny cyklické voltamogramy naměřené při různých hodnotách pH [47].



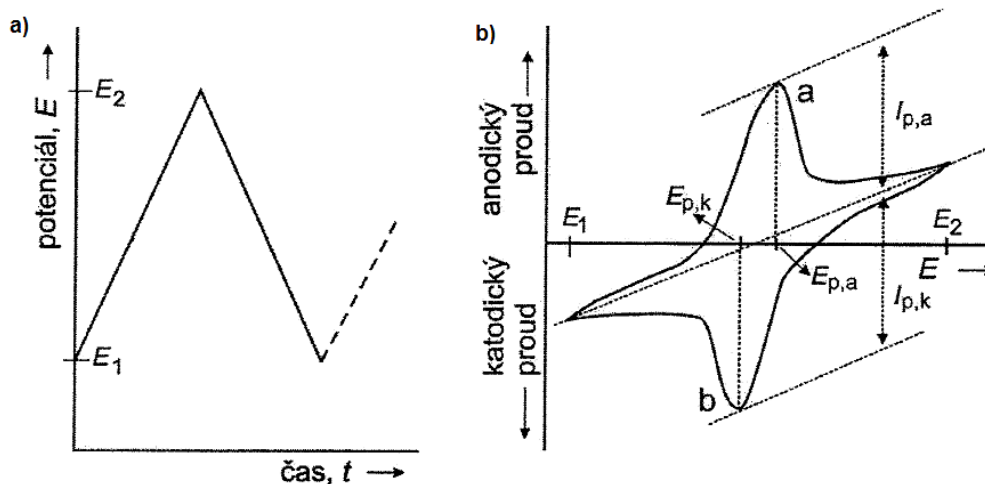
**Obr. 12.** Cyklické voltamogramy DOPAC ( $c = 0,2 \text{ mmol/l}$ ) naměřené pomocí Au elektrody v  $0,1 \text{ mol/l}$  fosfátovém pufru. Voltamogramy 1-6 odpovídají měřením při různých hodnotách pH: 5,1; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 a 10,0 [47].

## 2.4. Použité elektrochemické metody

### 2.4.1. Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (CV) je široce používanou elektrochemickou metodou. Často se volí jako první experiment v elektroanalytických studiích, jelikož dokáže rychle poskytnout informaci o redoxních potenciálech elektroaktivních látek a z průběhu polarizačních křivek lze posoudit mechanismus elektrodové reakce (např. reverzibilitu reakce).

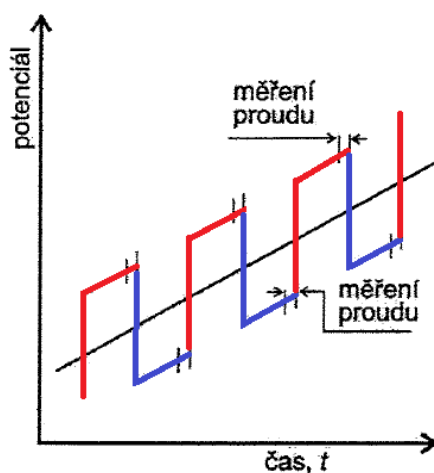
Na stacionární pracovní elektrodu v nemíchaném roztoku se vkládá potenciál, který má triangulární průběh (obr. 13a). Měření se může provést v jednom nebo více cyklech. Výsledný voltamogram zaznamenává změnu proudu v závislosti na vloženém potenciálu. Charakteristické píky na voltamogramu (obr. 13b) odpovídají oxidaci sledované látky a zpětné redukci vzniklých oxidačních produktů. Velikost proudu píků závisí mimo jiné na rychlosti polarizace elektrody a rychlosti difúze elektroaktivních látek. Difúze je poměrně pomalý transportní děj. Pokud je rychlost polarizace dostatečně vysoká, produkty elektrodové reakce nestačí oddifundovat od elektrodového povrchu a při vkládání potenciálu v opačném směru je možné tyto produkty detegovat [48, 49].



**Obr. 13.** a) trojúhelníkový průběh potenciálu při CV, b) cyklický voltamogram – pík a odpovídá oxidaci elektroaktivní látky, pík b odpovídá redukci vzniklého produktu.  $E_1$  – počáteční potenciál,  $E_2$  – koncový potenciál,  $E_{p,a}$  – potenciál anodického píku,  $E_{p,k}$  – potenciál katodického píku,  $I_{p,a}$  – proud anodického píku,  $I_{p,k}$  – proud katodického píku [48].

## 2.4.2. Square wave voltametrie

Při square wave voltametrii (SWV) se na pracovní elektrodu vkládá potenciál lineárně se měnící s časem, který je navíc modulován střídavým napětím pravoúhlého tvaru o malé amplitudě (přibližně 10 mV) a frekvenci cca 100 Hz (obr. 14). Proud je měřený vždy na konci pravoúhlého napěťového pulzu. Výhodou SWV je velká rychlost analýzy a vyšší citlivost oproti cyklické voltametrii jako důsledek potlačení vlivu nežádoucího nabíjecího proudu při pravoúhlých napěťových pulzech.



**Obr. 14.** Potenciálový program vkládaný na pracovní elektrodu při square wave voltametrii [48].

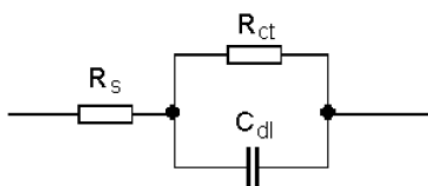
Výsledkem měření je square wave voltamogram. V tomto záznamu jsou vyhodnocovány píky, které jsou symetrické podle půlvlnného potenciálu a proud píku je úměrný koncentraci elektroaktivní látky v roztoku [48, 49].

### 2.4.3. Elektrochemická impedanční spektroskopie

Elektrochemickou impedanční spektroskopií (EIS) lze aplikovat ve dvou variantách. Klasické je měření pomocí potenciostatické EIS, galvanostatická varianta je využívána méně. Při potenciostatické EIS se na pracovní elektrodu vkládá konstantní potenciál se superponovaným střídavým napětím o malé amplitudě (obvykle 5–10 mV) a měří se střídavá složka proudové odezvy. Hodnotu vkládaného potenciálu lze libovolně nastavit anebo se používá měření při potenciálu nezatíženého obvodu (OCP – open circuit potential), který odpovídá potenciálu nezatížené (nezapojené) elektrody. Během měření se s časem mění frekvence střídavého napětí, a to od vyšších frekvencí k nižším. Toto uspořádání je výhodné především pro systémy s omezenou stabilitou, protože při vysokých frekvencích probíhá měření poměrně rychle. Rozsah frekvencí se obvykle pohybuje v rozmezí 1 MHz – 0,1 mHz. Vkládání frekvencí lze provést buď „single-sine“ technikou, kdy jsou frekvence vkládány postupně, nebo „multi-sine“ technikou, která spočívá v superpozici několika frekvencí.

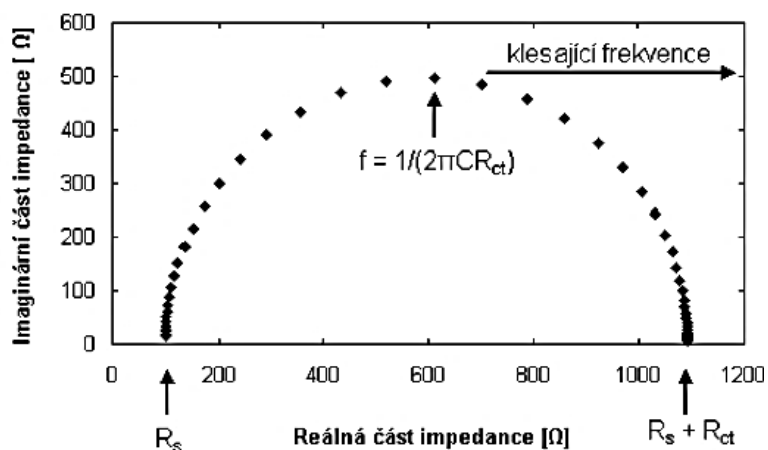
Při galvanostatické elektroimpedanční spektroskopií je na pracovní elektrodu vkládán konstantní stejnosměrný proud se superponovaným střídavým proudem a měří se střídavá složka napětí vybuzeného průchodem proudu.

Elektrochemická impedanční spektroskopie komplexně charakterizuje zkoumaný systém z hlediska jeho elektrochemických vlastností. Problémy mohou být s interpretací naměřených dat, která spočívá v sestavení tzv. ekvivalentního obvodu. Veškeré prvky tohoto obvodu musí mít fyzikální opodstatnění. Ekvivalentní obvod vzniká kombinací sériově a paralelně zapojených prvků, z nichž některé jsou převzaty z běžné elektrotechnické praxe (např. rezistor vyjadřující odpor  $R$ , kondenzátor pro kapacitu elektrické dvojvrstvy  $C$ ), jiné jsou typické pouze pro elektrochemii (např. Warburgova impedance). Ekvivalentní obvod je modelem měřeného systému a naměřená data jsou proložena křivkou popsanou rovnicí, která odpovídá danému obvodu. Nejjednodušší příklad ekvivalentního obvodu je Randlesův obvod (obr. 15).



**Obr. 15.** Randlesův obvod.  $R_s$  je odpor roztoku,  $R_{ct}$  je odpor proti přenosu náboje a  $C_{dl}$  je kapacita elektrické dvojvrstvy [13].

Výsledkem měření je proudová odezva a z Ohmova zákona vyplývá, že jde o měření odporu soustavy. V metodě elektroimpedanční spektroskopie se pracuje se střídavým napětím, proto se odpor soustavy označuje jako impedance. Impedance závisí na frekvenci a vyjadřuje se komplexními čísly – má dvě složky, reálnou a imaginární. Graficky znázorňuje závislost frekvence, fázového posunu a impedance několik typů grafů, avšak nejpoužívanější jsou grafy Nyquistův a Bodeho. V Nyquistově grafu je vynesena závislost imaginární složky impedance na reálné složce impedance (obr. 16). Bodeho graf zobrazuje závislost absolutní hodnoty impedance na frekvenci, případně závislost fázového posunu na frekvenci [13].



**Obr. 16.** Nyquistův graf pro Randlesův obvod [13].

## 3. Experimentální část

### 3.1. Přístrojové vybavení

Veškerá elektrochemická měření byla prováděna pomocí přístroje Autolab PGSTAT128N (Metrohm Autolab, Utrecht, Nizozemsko) a pro většinu měření bylo použito tříelektrodové zapojení. Jako pracovní elektroda byla používána elektroda ze skelného uhlíku (GCE), referentní elektrodou byla argentchloridová elektroda a pomocnou elektrodou byl platinový plíšek. Nastavení parametrů metody a následné vyhodnocování výsledků bylo prováděno prostřednictvím softwaru NOVA 1.10 (Metrohm Autolab, Utrecht, Nizozemsko). Jiné typy elektrod byly použity při měření square wave voltametrie v malých objemech. Jako pracovní elektroda zůstala zachována GCE, referentní elektrodou byla nasycená kalomelová elektroda (SCE) a pomocnou elektrodou byl platinový drátek o průměru 0,3 mm. Měření elektrochemické impedanční spektroskopie ve speciální dvoukomorové elektrochemické cele bylo prováděno v čtyřelektrodovém zapojení (čtyři platinové drátky s průměrem 0,5 mm).

Pro skenování povrchu polykarbonátových membránových filtrů před a po nanesení fosfolipidů byl použit mikroskop atomárních sil Dimension Icon (Bruker, USA). Pro měření byl použit hrot z nitridu křemíku (ScanAsyst-Air). Získané snímky byly zpracovány a upraveny pomocí softwaru Nano Scope Analysis 1.5 (Bruker, USA).

Při čištění GCE byla využívána ultrazvuková lázeň Sonorex Digitec (Bandelin, Berlín, Německo). Pro měření pH při přípravě fosfátového pufru se uplatnil pH metr InoLab 720 (WTW, Weilheim, Německo) s kombinovanou skleněnou elektrodou SenTix 41-3 (WTW, Weilheim, Německo).

### 3.2. Chemikálie

Asolectin (fosfatidylcholin ~25 %) použitý pro tvorbu modelové fosfolipidové membrány byl získán od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko). Standardy dopaminu hydrochloridu a 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny (DOPAC) byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). Zmíněné tři látky – asolectin, dopamin i DOPAC – byly skladovány v temnu při teplotě 4 °C, DOPAC navíc v atmosféře dusíku.

Další použité chemikálie: ferrokyanid draselný trihydrát (Lachema, Brno, Česká republika), KCl (Úředně autorisovaný výzkumný a zkušební ústav Spolku pro chemickou a



hutní výrobu, národní podnik Pardubice – Rybitví), NaCl (Lachema, Brno, Česká republika), n-hexan (Park Scientific Limited, Northampton, Velká Británie), ortho-fosforečná kyselina 85 % (Fluka, Buchs, Švýcarsko), methylalkohol (Penta, Chrudim, Česká republika), NaOH (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika). Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a.

### **3.3. Metodická část**

#### **3.3.1. Čištění nepokryté elektrody**

Před každým měřením, při kterém byla použita nemodifikovaná elektroda ze skelného uhlíku, byla elektroda přečištěna následujícím postupem. Elektroda byla opláchnuta destilovanou vodou a mechanicky vyleštěna pomocí leštící tkaniny (Buehler, Lake Bluff, USA), na kterou bylo pipetou nanášeno malé množství suspenze aluminu ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , <50 nm, Sigma-Aldrich, Vídeň, Rakousko) v destilované vodě. Po leštění byla elektroda opláchnuta destilovanou vodou a sonifikována v destilované vodě po dobu 1 minuty. Takto vyčištěná elektroda byla použita pro elektroanalytická měření.

#### **3.3.2. Modifikace GCE fosfolipidovou membránou**

Elektroda ze skelného uhlíku (GCE) byla nejprve vyleštěna na leštící tkanině s aluminou. Následovala elektrochemická úprava povrchu elektrody. Do měrné cely byl umístěn roztok NaCl (9 g/l) a na pracovní elektrodu (GCE) byl vkládán potenciál 1,5 V po dobu 3 minut. Elektroda byla opláchnuta destilovanou vodou a vysušena v proudu dusíku. Po vysušení bylo na terčík ze skelného uhlíku nanášeno 5  $\mu\text{l}$  roztoku asolectinu v hexanu (3 mg/ml) a elektroda byla ihned vložena do zkumavky s vodným roztokem NaCl (9 g/l). Elektroda byla v tomto roztoku ponechána po dobu 30 minut, během které došlo k samouspořádání dvojné vrstvy fosfolipidů na povrchu elektrody [50]. S modifikovanou elektrodou bylo nutné zacházet opatrně, aby nedošlo k narušení fosfolipidové dvojvrstvy. Elektroda nebyla oplachována stříčkou, ale pouze ponořením do destilované vody v kádince.

#### **3.3.3. Testování kompaktnosti fosfolipidové membrány**

Před použitím modifikované GCE pro elektroanalytická měření byla vždy testována kvalita pokrytí elektrodového povrchu fosfolipidy. Konkrétně se jednalo o měření cyklické voltametrie v roztoku ferrokyanidu draselného ( $c = 1 \text{ mmol/l}$ ), základním elektrolytem byl

roztok KCl ( $c = 0,1 \text{ mol/l}$ ). Jestliže nebyl na voltamogramu patrný žádný pík, byla dvojvrstva považována za dostatečně kompaktní a modifikovaná elektroda byla použita pro elektroanalytická měření. Parametry metody pro měření CV ferrokyanidu:

- počáteční potenciál: 0 V
- rozsah potenciálů: -400 mV až +700mV
- rychlost skenu: 50 mV/s

### **3.3.4. Čištění elektrody od fosfolipidů**

V prvním kroku byly odstraněny fosfolipidy mechanicky na leštící tkanině s aluminou. Elektroda byla opláchnuta destilovanou vodou a sonifikována v destilované vodě po dobu 1 minuty. Elektroda byla vysušena v proudu dusíku. Následně byla elektroda sonifikována ve třech různých rozpouštědlech s rostoucí polaritou – v hexanu, methanolu a v destilované vodě. V každém rozpouštědle byla elektroda sonifikována po dobu 15 minut.

### **3.3.5. Pokrývání PC membránového filtru fosfolipidy**

Pro experimenty byl použit polykarbonátový membránový filtr Nuclepore, Track-Etched Membrane (Whatman, New Jersey, USA) s velikostí pórů  $0,05 \text{ }\mu\text{m}$ . K pokrývání polykarbonátového filtru byl použit roztok asolectinu v hexanu o koncentraci  $10 \text{ mg/ml}$ . Obě strany PC filtru nejsou totožné. Jedna strana filtru je lesklá a výrobce doporučuje používat při aplikaci filtru právě tuto stranu. Objem  $25 \text{ }\mu\text{l}$  roztoku asolectinu byl nanášen na lesklou stranu filtru pomocí automatické pipety. Po chvilce (přibližně 30 s), kdy se část hexanu odpařila, byl filtr s nanesenými fosfolipidy ponořen do roztoku NaCl ( $9 \text{ g/l}$ ) na dobu 30 min, během které došlo k samouspořádání dvojné vrstvy fosfolipidů v pórech filtru. Filtr byl opláchnut ponořením do destilované vody v kádince a umístěn mezi dvě nádoby měrné cely tak, že lesklá strana filtru směřovala do roztoku dopaminu. S filtrem bylo manipulováno pouze pomocí pinzety a vždy byl filtr uchycen jen za okraj, aby nedošlo k jeho poškození, respektive k narušení fosfolipidové dvojvrstvy.

### **3.3.6. Cyklická voltametrie**

Veškerá měření byla prováděna v tříelektrodovém systému. Pracovní elektrodou byla elektroda ze skelného uhlíku (GCE), referentní elektrodou byla argentschloridová elektroda

(Ag/AgCl) a jako pomocná elektroda byl používán platinový plíšek. Základním elektrolytem pro všechna měření s dopaminem a kyselinou 3,4-dihydroxyfenyloctovou byl fosfátový pufr o pH 6,5 ( $c = 0,1 \text{ mol/l}$ ). Před měřením bylo nutné roztok v měrné cele 5 min probublávat dusíkem.

Cyklická voltametrie dopaminu s čistou a modifikovanou elektrodou byla měřena v roztoku o koncentraci  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ . Pro měření CV dopaminu byly nastaveny tyto parametry:

- počáteční potenciál: 0 V
- rozsah potenciálů: -400 mV až +700 mV
- rychlost skenu: 50 mV/s

Pro 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinu byly změřeny cyklické voltamogramy v roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$  s čistou i modifikovanou GCE. Metoda cyklické voltametrie 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny měla tyto parametry:

- počáteční potenciál: 0 V
- rozsah potenciálů: -500 mV až +1 V
- rychlost skenu: 50 mV/s

### 3.3.7. Akumulace

Akumulace analytu na povrchu elektrody, respektive ve fosfolipidové membráně, byla měřena metodou square wave voltametrie. Měření bylo prováděno v tříelektrodovém zapojení (WE – GCE, RE – Ag/AgCl, CE – Pt plíšek). Metoda byla nastavena tak, že square wave voltamogram byl zaznamenán ihned po ponoření pracovní elektrody do roztoku, aby byla adsorpce analytu na povrchu elektrody, respektive ve fosfolipidové dvojvrstvě, minimální. Následovalo pětiminutové míchání, během něhož zůstala pracovní elektroda ponořená v roztoku analytu, a po skončení míchání byl znovu zaznamenán square wave voltamogram. Celková doba měření akumulace byla 120 min, přičemž každých 5 min byl zaznamenán square wave voltamogram. Celkem metoda zahrnovala 25 voltametrických měření. U dopaminu byla akumulace na čisté a modifikované elektrodě měřena v roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ . Základním elektrolytem byl fosfátový pufr (pH = 6,5). Parametry SWV měření byly nastaveny následovně:

- rozsah potenciálů: -400 mV až +700 mV
- potenciálový krok: 2 mV

- amplituda: 40 mV
- frekvence: 10 Hz
- rychlost skenu: 20 mV/s

Měření akumulace dopaminu bylo doplněno o další experimenty, které pomohly identifikovat píky na square wave voltamogramech. Konkrétně se jednalo o měření CV a SWV v prostředí fosfátového pufru o pH 3,5 a 9,5. Pro měření byla použita jako pracovní elektroda čistá GCE. Parametry cyklické voltametrie pro měření v roztoku o pH 3,5 byly zmíněny dříve v kapitole Cyklická voltametrie, měření CV v prostředí o pH 9,5 se lišilo pouze rozsahem potenciálů vkládaných na pracovní elektrodu (-600 mV až +1 V). SWV měření předcházelo pětiminutové míchání, během kterého se dopamin naakumuloval na povrchu elektrody. SWV měření bylo zopakováno dvakrát po sobě bez čištění elektrody se stejnými parametry, které byly nastaveny následovně:

- rozsah potenciálů: -400 mV až +700 mV
- potenciálový krok: 2 mV
- amplituda: 40 mV
- frekvence: 10 Hz
- rychlost skenu: 20 mV/s

Pro 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinu bylo měření akumulace na čisté a modifikované GCE prováděno v roztoku o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Jako základní elektrolyt byl použit PBS (pH = 6,5). Parametry metody byly nastaveny takto:

- rozsah potenciálů: 0 V až +800 mV
- potenciálový krok: 2 mV
- amplituda: 40 mV
- frekvence: 10 Hz
- rychlost skenu: 20 mV/s

### **3.3.8. Kalibrační závislosti**

Kalibrační závislosti byly měřeny metodou square wave voltametrie v tříelektrodovém zapojení (WE – GCE, RE – Ag/AgCl, CE – Pt plíšek). K roztoku v měrné cele byly postupně přidávány malé objemy roztoku analytu. Po každém přidavku byl roztok míchán po dobu 30 s a následovalo SWV měření. Jako základní elektrolyt byl použit PBS (pH = 6,5). Každá kalibrační řada byla měřena ve třech sériích. U dopaminu byla proměřena kalibrační řada o

koncentracích:  $5 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Zmíněná kalibrační řada byla měřena pomocí čisté i modifikované GCE. Parametry square wave voltametrie pro dopamin byly následující:

- rozsah potenciálů: -100 mV až +500 mV
- potenciálový krok: 2 mV
- amplituda: 40 mV
- frekvence: 10 Hz
- rychlost skenu: 20 mV/s

Pomocí čisté GCE byla změřena kalibrační řada kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové v koncentračním rozsahu  $5 \cdot 10^{-6}$  až  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Modifikovaná GCE byla použita k měření kalibrační řady v rozmezí koncentrací  $1 \cdot 10^{-5}$  až  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l. Parametry SWV pro měření kalibrační závislosti 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny byly nastaveny takto:

- rozsah potenciálů: 0 V až +800 mV
- potenciálový krok: 2 mV
- amplituda: 40 mV
- frekvence: 10 Hz
- rychlost skenu: 20 mV/s

### 3.3.9. Elektrochemická impedanční spektroskopie

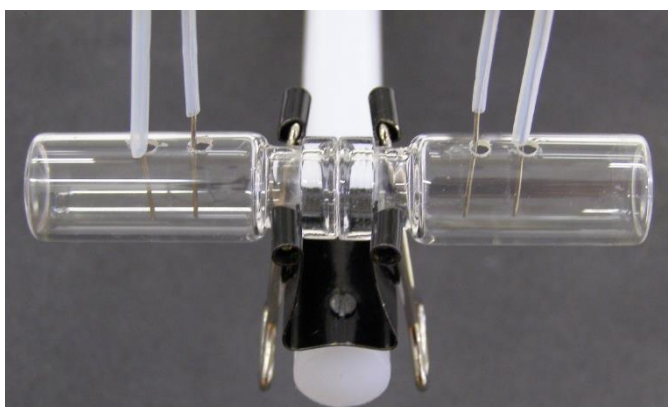
K měření elektrochemické impedanční spektroskopie byla používána potenciostatická varianta. Měření bylo realizováno v tříelektrodeovém systému (WE – GCE, RE – Ag/AgCl, CE – Pt plíšek). Pracovní elektroda byla před měřením ponořena na definovanou dobu do zkumavky s roztokem analytu. Impedanční měření odpovídají 1, 2, 3, 5, 10, 30 a 60 min kontaktu GCE s analytem. Jak u dopaminu, tak u kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové byly proměřeny dvě koncentrace, konkrétně  $1 \cdot 10^{-5}$  a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Pro každou koncentraci bylo měření zopakováno dvakrát, a to jak s čistou, tak s modifikovanou GCE. Vlastní měření probíhalo v roztoku obsahujícím jako redoxní značku ferrokyanid draselný ( $c = 1$  mmol/l), základním elektrolytem byl roztok KCl ( $c = 0,1$  mol/l). Nastavení parametrů EIS měření pro dopamin a 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinu:

- potenciál: +220 mV
- rozsah frekvencí (měření na čisté elektrodě): 50 000 až 0,1 Hz
- rozsah frekvencí (měření na modifikované elektrodě): 100 000 až 0,1 Hz
- amplituda: 10 mV

- technika „single-sine“

Data získaná EIS měřením byla doplněna o měření cyklické voltametrie ve stejných časových intervalech. Před měřením byla elektroda ponořena do roztoku analytu na definovanou dobu a měření CV odpovídá interakci elektrody s analytem po dobu 1, 2, 3, 5, 10, 30 a 60 min. Samotné voltametrické měření probíhalo v základním elektrolytu, kterým byl fosfátový pufr (pH = 6,5). Pro dopamin byly proměřeny koncentrace  $1 \cdot 10^{-5}$  a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l. U kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové bylo provedeno měření pouze pro vyšší koncentraci, měření s nižší koncentrací nebylo vyhodnotitelné z důvodu nízké proudové odezvy. Parametry CV měření pro dopamin i DOPAC byly zmíněny dříve v podkapitole Cyklická voltametrie.

Metoda elektrochemické impedanční spektroskopie byla použita i pro měření se speciálně zkonstruovanou dvoukomorovou celou. Tato cela se skládá ze dvou oddělitelných skleněných nádobek (vialek), mezi které lze umístit polykarbonátový membránový filtr a v každé nádobce může být jiný roztok, např. v jedné nádobce základní elektrolyt a ve druhé roztok analytu. V každé nádobce jsou dva otvory pro vložení elektrod. Měření EIS bylo realizováno online přímo v nádobkách v čtyřelektrodovém zapojení (čtyři platinové drátky o průměru 0,5 mm). Měrná cela je zachycena na obr. 17.



*Obr. 17. Dvoukomorová elektrochemická cela pro měření EIS v čtyřelektrodovém zapojení. Jako elektrody byly použity čtyři platinové drátky s průměrem 0,5 mm.*

EIS měření bylo provedeno pro případ, kdy byl v obou nádobkách základní elektrolyt (PBS o pH 6,5) a byla sledována změna kapacity a polarizační rezistance v čase. Měření bylo realizováno s čistým PC filtrem a s PC filtrem pokrytým vrstvou fosfolipidů. Obdobná měření byla provedena v systému, kde v jedné z nádobek byl roztok dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) v prostředí PBS o pH 6,5 a ve druhé nádobce byl čistý elektrolyt (PBS o pH 6,5). Pro

experimenty s elektrochemickou celou byl použit pouze dopamin, tato měření nebyla provedena s DOPAC. Parametry měření byly následující:

- potenciál: -100 mV
- rozsah frekvencí: 50 000 až 0,1 Hz
- amplituda: 10 mV
- technika „single-sine“

Potenciál -100 mV byl zvolen z toho důvodu, že tato hodnota přibližně odpovídá membránovému potenciálu v reálných biologických systémech [51].

### 3.3.10. Sledování difúze dopaminu přes PC filtr

Mezi nádobky elektrochemické cely byl umístěn polykarbonátový membránový filtr. Metodou square wave voltametrie v tříelektrodovém zapojení (WE – GCE, RE – SCE, CE – Pt drátek s průměrem 0,3 mm) byla sledována difúze dopaminu přes čistý PC filtr a přes PC filtr pokrytý vrstvou fosfolipidů. Nejprve byly obě nádobky naplněny fosfátovým puforem o pH 6,5 z důvodu hydratace filtru a ustálení podmínek na filtru. Po dvou hodinách byl PBS z jedné nádobky odebrán stříkačkou a nahrazen roztokem dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) v prostředí PBS o pH 6,5. SWV měření bylo prováděno offline – roztoky z obou částí cely byly odebrány stříkačkou a vlastní měření probíhalo v nádobce s vycorovou fritou pro měření v malých objemech. Měření technikou SWV bylo provedeno v těchto časových intervalech: 1; 2; 3; 4,5 a 20 hod. Square wave voltamogramy byly zaznamenány pro roztoky z obou vialek a sledovala se změna koncentrace dopaminu v obou prostorech. SWV měření bylo u každého vzorku zopakováno dvakrát, přičemž pracovní elektroda ze skelného uhlíku byla mezi jednotlivými měřeními mechanicky vyčištěna na leštící tkanině s aluminou. Parametry SWV měření byly nastaveny takto:

- rozsah potenciálů: -100 mV až +800 mV
- potenciálový krok: 3 mV
- amplituda: 80 mV
- frekvence: 40 Hz
- rychlost skenu: 120 mV/s

### 3.3.11. Skenování povrchu PC filtru pomocí AFM

Pomocí mikroskopu atomárních sil (AFM) bylo provedeno skenování povrchu polykarbonátového membránového filtru. PC filtr byl uchycen na laboratorním sklíčku a bylo provedeno měření z lesklé i matné strany. Cílem bylo porovnat čistý PC filtr a PC filtr po nanesení vrstvy fosfolipidů, především šlo o zaznamenání změn v oblasti pórů. Pokrytý PC filtr byl připraven postupem popsáním v kapitole Pokrývání PC membránového filtru fosfolipidy. Po procesu samouspořádání dvojné vrstvy fosfolipidů v roztoku NaCl (9 g/l) byl pokrytý PC filtr opláchnut ponořením do destilované vody a vysušen v atmosféře dusíku (doba sušení byla zhruba 24 hodin). Pro všechna měření byl použit hrot z nitridu křemíku (ScanAsyst-Air) s nominální hodnotou rezonanční frekvence 70 kHz a nominální silovou konstantou  $0,4 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ . Všechny snímky byly měřeny v PeakForce Tapping modu s rychlostí záznamu 0,3 nebo 0,5 Hz a zaznamenány s rozlišením 512 pixelů. Případný náklon vzorku byl softwarově vyrovnán.

## 3.4. Výsledky

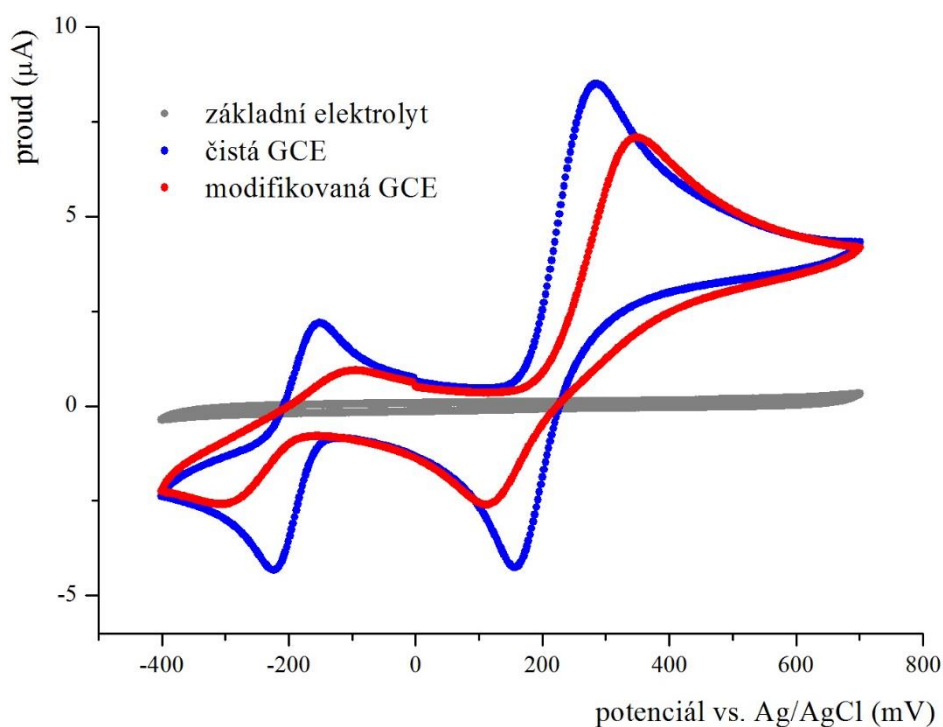
### 3.4.1. Dopamin

#### 3.4.1.1. Cyklická voltametrie

Na cyklickém voltamogramu dopaminu v prostředí fosfátového pufru o pH 6,5 (obr. 18) jsou patrné dva páry redoxních píků. Cyklický voltamogram pro měření s čistou GCE ukazuje anodický pík s maximem při 280 mV, který odpovídá dvouelektronové oxidaci dopaminu na příslušný *o*-chinon, katodický pík při 160 mV pak odpovídá redukci *o*-chinonu na dopamin. Rozdíl potenciálů katodického a anodického píku je přibližně 120 mV a je větší než teoretická hodnota 29,5 mV pro dvouelektronový děj při 25 °C, což znamená, že oxidace dopaminu na *o*-chinon není plně reverzibilní děj. Skutečnost, že oxidace dopaminu je kvazi-reverzibilní děj, potvrzuje i hodnota podílu výšek katodického a anodického píku, která je menší než jedna. Další katodický pík při negativním potenciálu -220 mV náleží redukci cyklického dopaminochromu na leukodopaminochrom. Cyklický chinon (dopaminochrom) vznikl z *o*-chinonu po oxidaci dopaminu. Cyklizace *o*-chinonu probíhá při pH > 5. Anodický pík s maximem -150 mV odpovídá oxidaci leukodopaminochromu na dopaminochrom (oxidační schéma dopaminu je uvedeno na obr. 10). Na cyklickém voltamogramu dopaminu měřeném pomocí modifikované GCE je patrný malý posun píků ve srovnání s cyklickým



voltamogramem naměřeným pomocí čisté GCE. Tuto skutečnost lze vysvětlit tak, že vrstva fosfolipidů na povrchu elektrody působí jako bariéra pro dopamin, který není schopen difundovat k elektrodovému povrchu tak rychle jako v případě, kdy byla k měření použita čistá uhlíková elektroda. Další důsledek zpomalení transportu dopaminu k elektrodovému povrchu přes fosfolipidovou membránu je patrný z nižší proudové odezvy naměřené pomocí modifikované elektrody ve srovnání s čistou GCE.

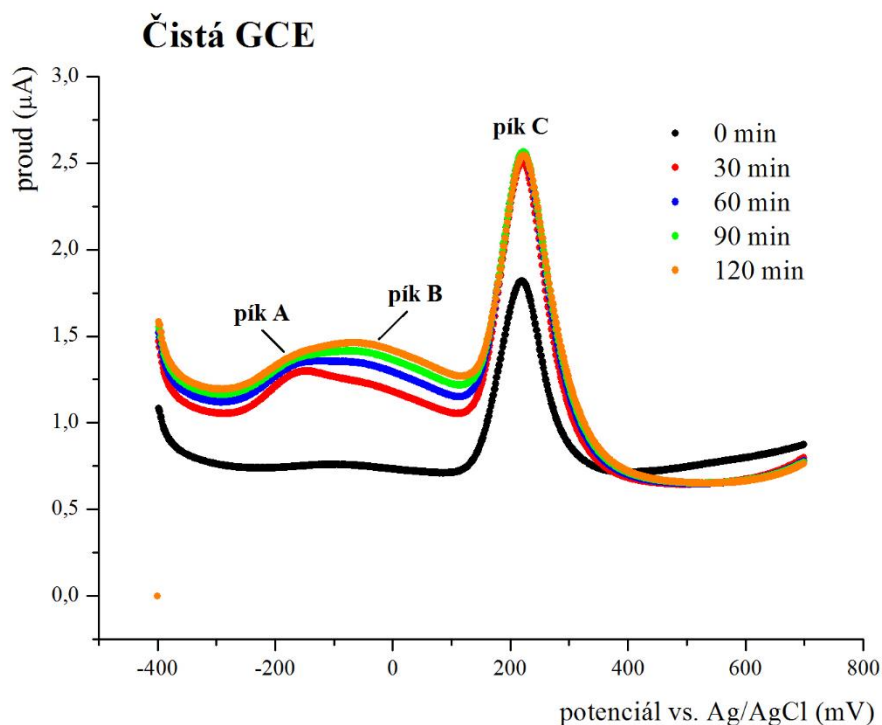


**Obr. 18.** Cyklické voltamogramy dopaminu ( $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ ) naměřené pomocí čisté a modifikované uhlíkové elektrody. Základním elektrolytem byl fosfátový pufr ( $\text{pH} = 6,5$ )

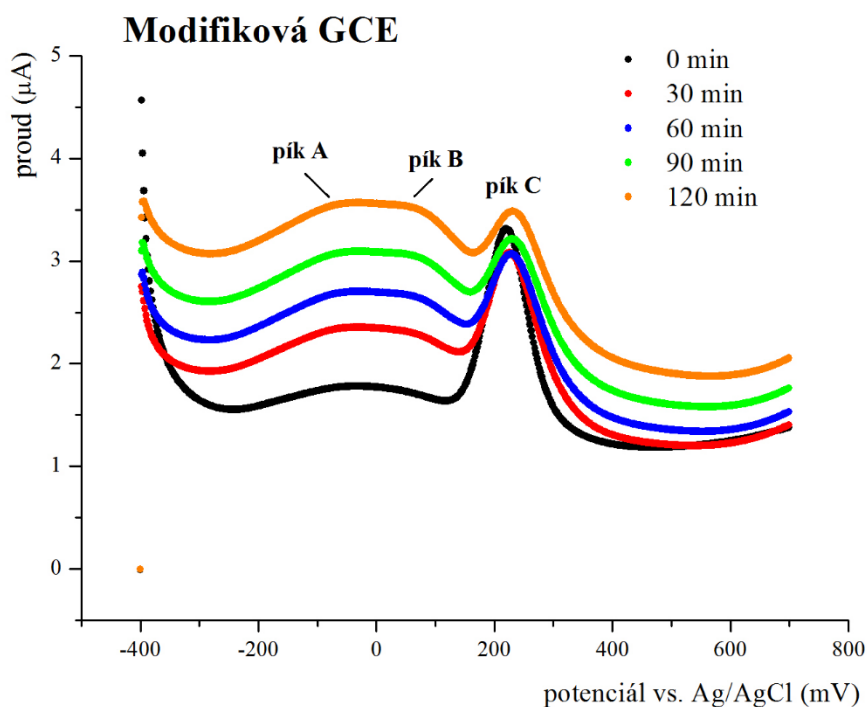
### 3.4.1.2. Akumulace

Cílem měření bylo zjistit, zda se dopamin zadržuje na povrchu elektrody, případně ve fosfolipidové vrstvě. Na obr. 19 a 20 jsou zobrazeny square wave voltamogramy naměřené za použití čisté a modifikované GCE v různých časových intervalech, během nichž probíhala akumulace dopaminu. Na voltamogramech jsou patrné dva až tři píky. Hlavní pík (pík C) náleží oxidaci dopaminu na *o*-chinon. Přiřazení tohoto píku bylo provedeno na základě srovnání potenciálu píku na square wave voltamogramu s potenciálem píku na cyklickém voltamogramu. Píky A a B by mohly odpovídat oxidaci cyklického leukodopaminochromu na dopaminochrom a oxidaci adsorbované formy DOPAC. Aby bylo možné píky A a B

jednoznačně identifikovat, byly provedeny doplňující experimenty. Konkrétně byly změřeny CV a SWV dopaminu v prostředí fosfátového pufru o pH 3,5 a 9,5.

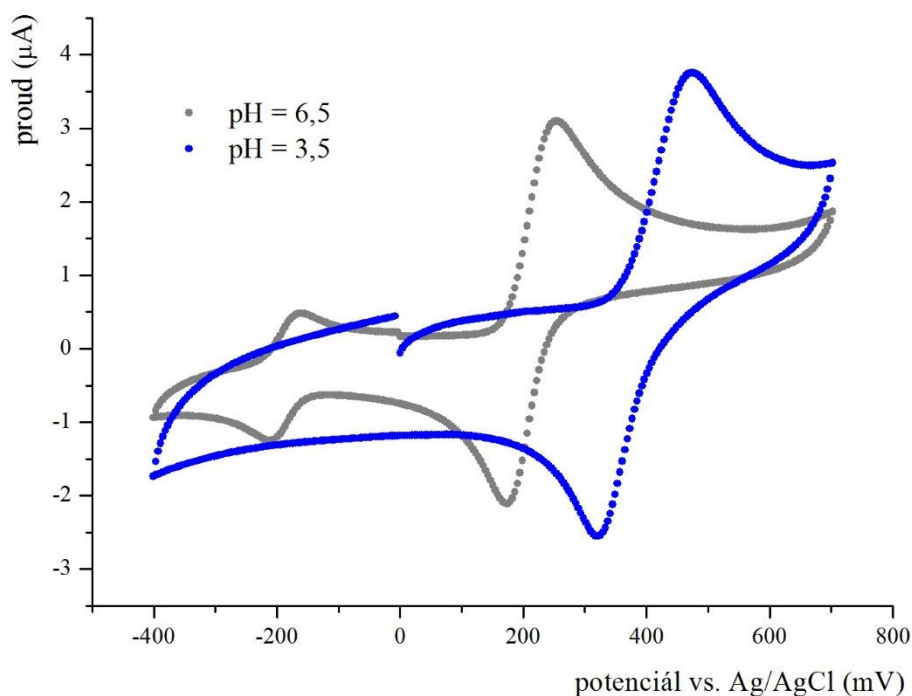


**Obr. 19.** Square wave voltamogramy z měření akumulace dopaminu na čisté GCE. Koncentrace dopaminu v roztoku byla  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l a jako základní elektrolyt byl použit fosfátový pufr (pH = 6,5). Voltamogramy byly změřeny v následujících časových intervalech: 0, 30, 60, 90 a 120 min.



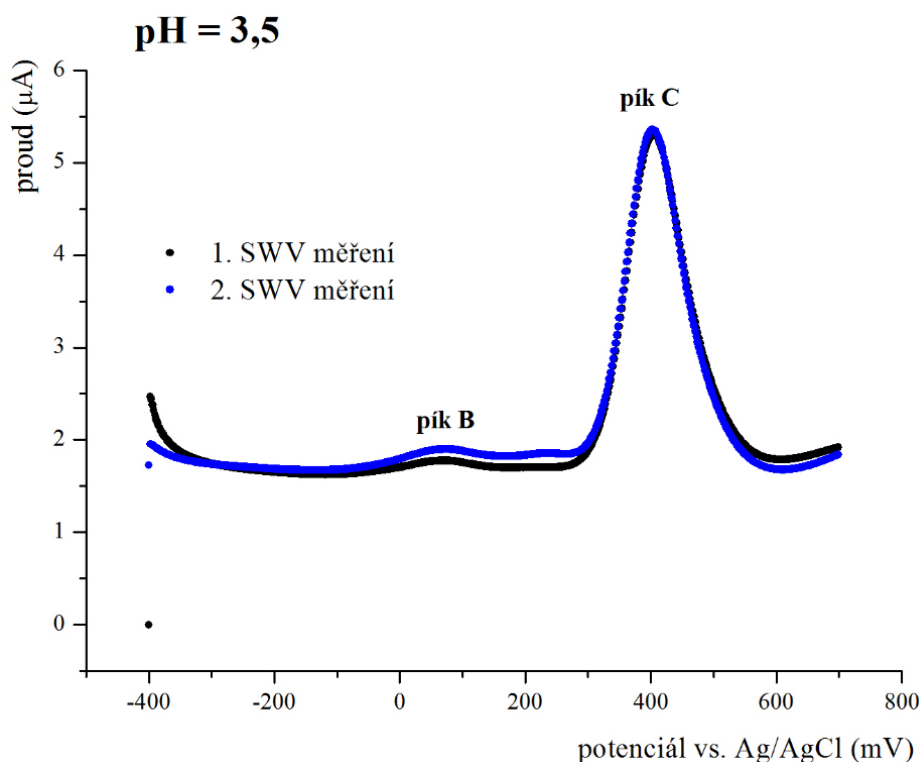
**Obr. 20.** Square wave voltamogramy z měření akumulace dopaminu na modifikované GCE. Koncentrace dopaminu byla  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l a jako základní elektrolyt byl použit PBS o pH 6,5. Voltamogramy byly změřeny v následujících časových intervalech: 0, 30, 60, 90 a 120 min.

V prostředí o pH 3,5 byla potlačena cyklizace *o*-chinonu, o čemž svědčí absence dvojice redoxních píků na cyklickém voltamogramu na obr. 21. Na cyklickém voltamogramu naměřeném při pH 3,5 je zřejmý posun redox potenciálu vůči měření při pH 6,5 o +175 mV, který přibližně odpovídá teoretickému posunu o 59 mV/pH pro dvouelektronovou reakci s výměnou dvou protonů.



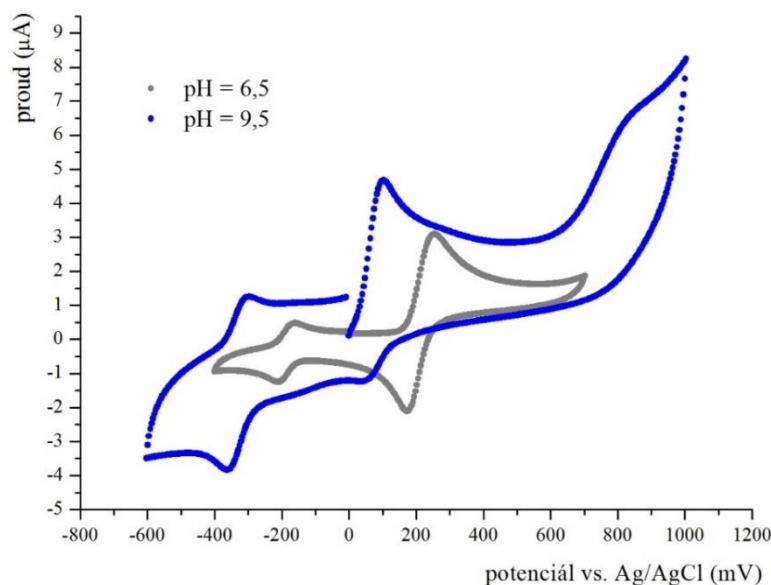
**Obr. 21.** Cyklické voltamogramy dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ ). Základním elektrolytem byl fosfátový pufr o dvou různých hodnotách pH (pH = 3,5 a 6,5). K měření CV byla použita čistá GCE.

Při měření SWV v prostředí o pH 3,5 byl výrazný pík C odpovídající oxidaci dopaminu na *o*-chinon. Dále byl na voltamogramu pozorovatelný málo výrazný pík B a pík A zcela chybí (obr. 22). Přiřazení jednotlivých píků jsem provedla na základě srovnání se „základním“ square wave voltamogramem naměřeným při pH 6,5. Posun všech píků na voltamogramu změřeném v roztoku o pH 3,5 je cca +150 mV oproti píkům na voltamogramu z měření v prostředí o pH 6,5. Je známo, že v prostředí o pH < 5 nedochází k cyklizaci *o*-chinonu [32]. Z uvedeného lze předpokládat, že pík A náleží oxidaci leukodopaminochromu na dopaminochrom.



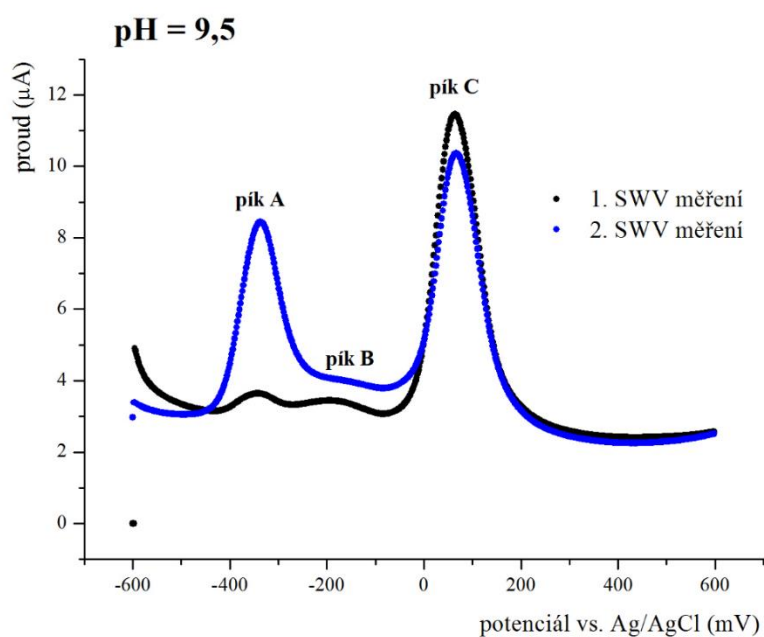
**Obr. 22.** Square wave voltamogramy dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) na čisté GCE. Jako základní elektrolyt byl použit fosfátový pufr (pH = 3,5). SWV měření bylo provedeno dvakrát za sebou za stejných parametrů a GCE nebyla mezi měřeními čištěna.

V prostředí o pH 9,5 je velká část molekul dopaminu neprotonizovaná ( $pK_{a1} = 8,9$  pro aminoskupinu,  $pK_{a2} = 10,6$  pro fenolovou skupinu [52]) a ochotně probíhá cyklizace *o*-chinonu na leukodopaminochrom. Na cyklickém voltamogramu naměřeném při pH 9,5 jsou patrné dvě dvojice píků, z nichž jedna dvojice odpovídá redoxní reakci dopamin – *o*-chinon a druhá dvojice charakterizuje redoxní děj leukodopaminochrom – dopaminochrom. Z obr. 23 je patrný posun redox potenciálu vůči cyklickému voltamogramu získanému v prostředí o pH 6,5. Rozdíl činí přibližně -145 mV, což se blíží teoretickému posunu redox potenciálů o 59 mV/pH pro reakci, kdy dochází k výměně dvou elektronů a dvou protonů.



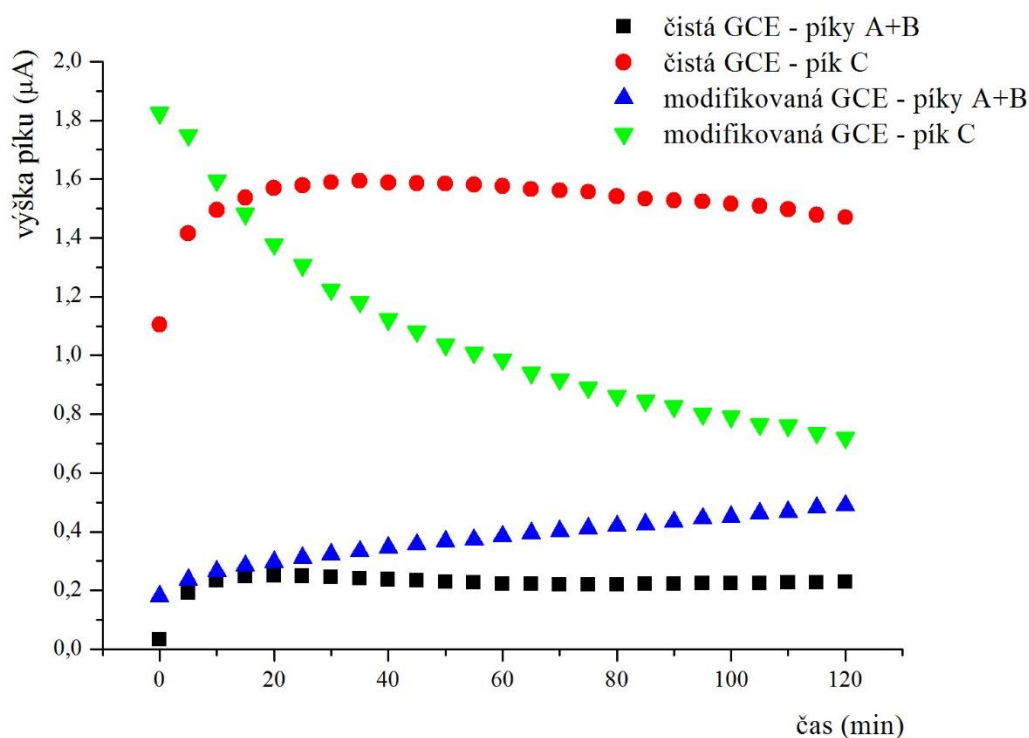
**Obr. 23.** Cyklické voltamogramy dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ ). Jako základní elektrolyt byl použit PBS o dvou různých hodnotách pH (pH = 6,5 a 9,5). K měření CV byla použita čistá GCE.

Square wave voltamogram naměřený při pH 9,5 (obr. 24) potvrzuje, že pík A odpovídá oxidaci leukodopaminochromu na dopaminochrom, protože v zásaditém prostředí je podpořena cyklizace *o*-chinonu. Pík B pravděpodobně náleží kapacitnímu proudu. Ten vzniká v důsledku adsorpce oxidačního produktu na povrchu elektrody a odpovídá oxidaci adsorbované formy. To, že na povrchu elektrody vzniká adsorbovaná vrstva, potvrzuje i fakt, že pík C při druhém SWV měření je nižší oproti prvnímu měření. Důvodem je, že adsorbovaná vrstva ztěžuje difúzi molekul dopaminu z roztoku k elektrodovému povrchu.



**Obr. 24.** Square wave voltamogramy dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ ) naměřené čistou GCE. Jako základní elektrolyt byl použit fosfátový pufr (pH = 9,5). SWV měření bylo provedeno dvakrát se sebou se stejnými parametry a pracovní uhlíková elektroda nebyla mezi měřeními čištěna.

Na obr. 25 je zobrazen souhrnný graf, který charakterizuje adsorpci dopaminu na povrchu čisté GCE a ve fosfolipidové vrstvě. U čisté elektrody všechny tři píky s časem narůstaly. Nasycení povrchu elektrody molekulami dopaminu proběhlo poměrně rychle, zhruba po 25 minutách už nedocházelo k výrazným změnám. U modifikované elektrody píky A a B s časem narůstaly, naopak pík C se zmenšoval. Nasvědčuje to tomu, že ve fosfolipidové vrstvě se hromadil oxidační produkt (*o*-chinon a jeho cyklický produkt) a difúze dalších molekul dopaminu z roztoku byla ztížena.

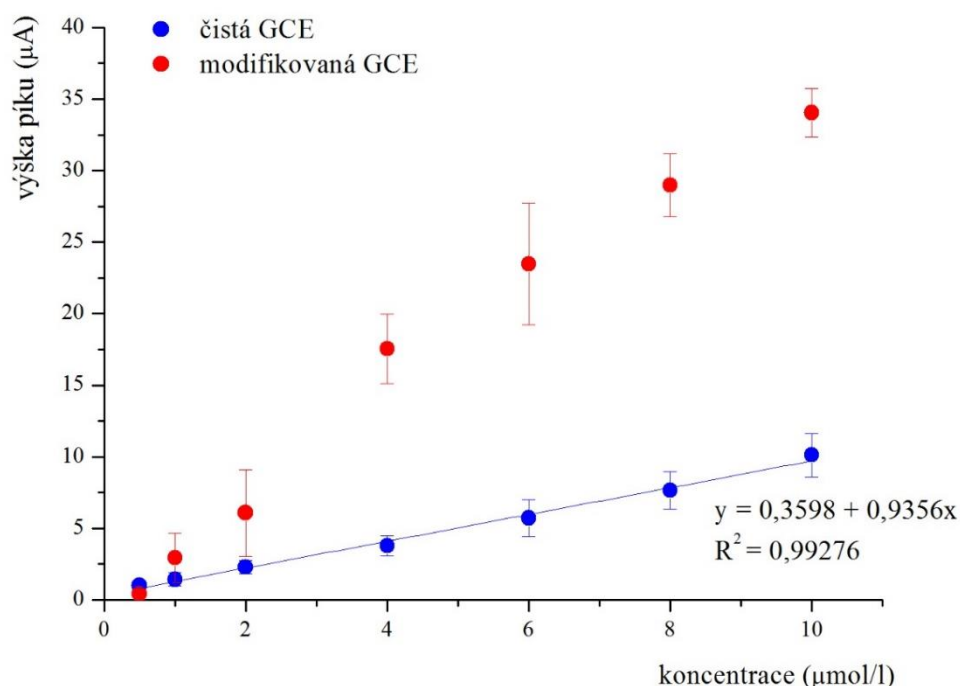


**Obr. 25.** Souhrnný graf popisující akumulaci dopaminu na povrchu čisté GCE a ve fosfolipidové vrstvě. Měření bylo provedeno v roztoku dopaminu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l a základním elektrolytem byl fosfátový pufr (pH = 6,5). Použitou voltametrickou technikou byla SWV.

### 3.4.1.3. Kalibrační závislosti

Z výsledků měření cyklické voltametrie bylo patrné, že modifikovaná GCE dává nižší odezvu pro dopamin než čistá GCE (obr. 18). Z kalibračního grafu (obr. 26) je však zřejmá vyšší odezva při měření pomocí modifikované elektrody než při měření s čistou elektrodou. Důvod je ten, že se uplatnila akumulace dopaminu ve fosfolipidové vrstvě během 30 s míchání, které předcházelo SWV měření. Kalibrace naměřená čistou GCE je lineární v celém rozsahu měřených koncentrací ( $5 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l). Kalibrační závislost byla proměřena celkem třikrát a z parametrů regresní přímky byla dopočítána mez detekce, jejíž hodnota činí 0,6  $\mu$ mol/l. Nicméně signál pro dopamin byl měřitelný už při koncentraci

0,5  $\mu\text{mol/l}$ . Kalibrační závislost naměřená s modifikovanou GCE je nelineární a má esovitý charakter.

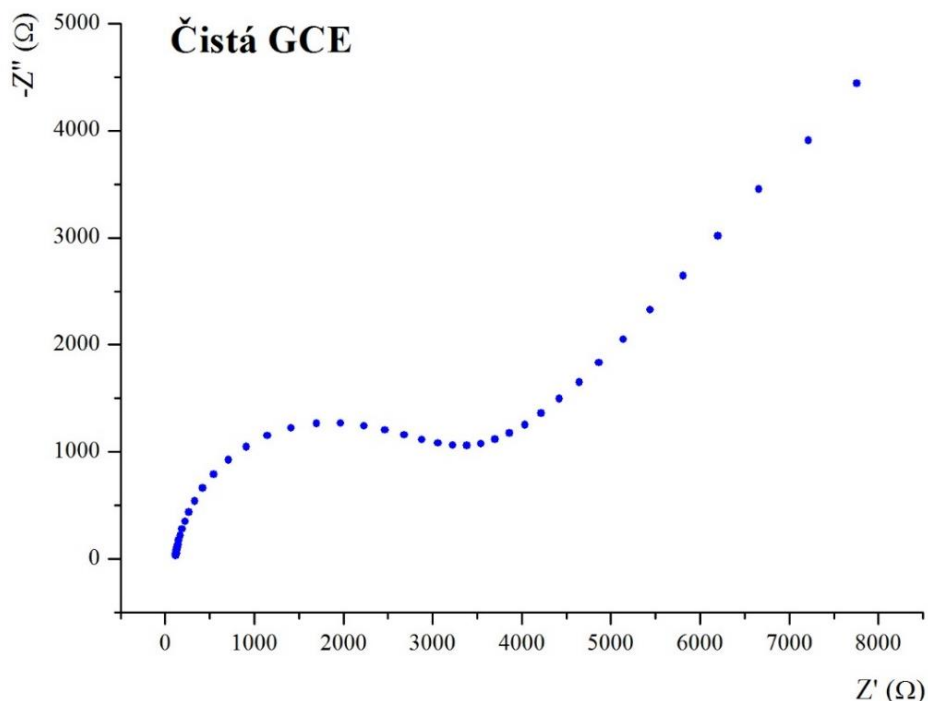


*Obr. 26. Kalibrační závislost dopaminu měřená na čisté a modifikované GCE metodou SWV. Základním elektrolytem byl fosfátový pufr o pH 6,5.*

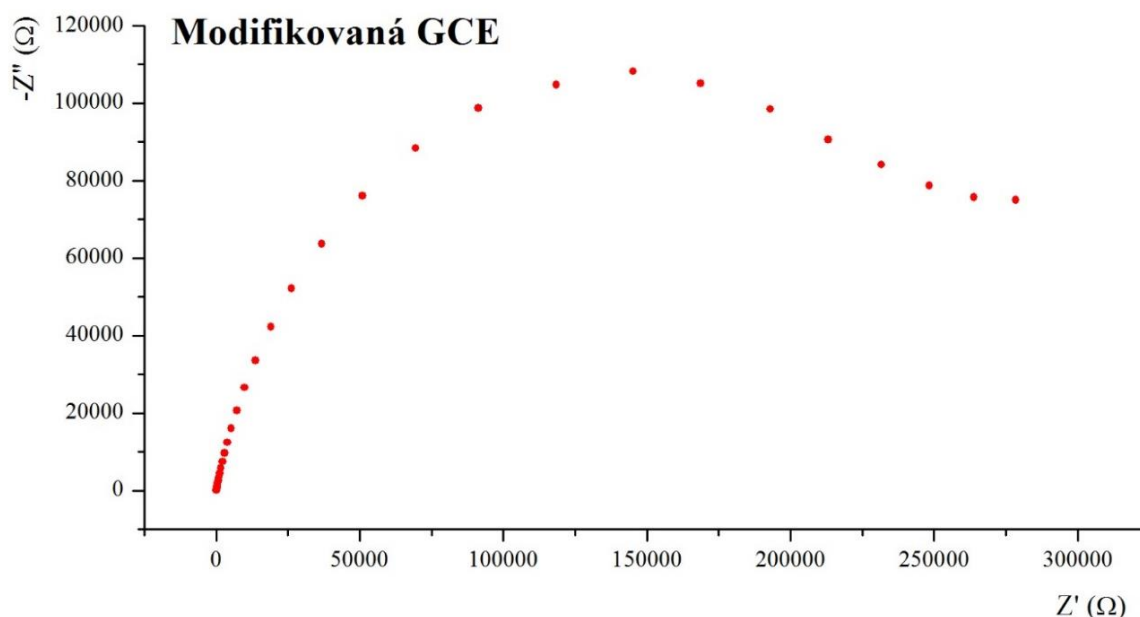
### 3.4.1.4. Elektrochemická impedanční spektroskopie

K vyhodnocování dat naměřených elektrochemickou impedanční spektroskopií byl jako ekvivalentní obvod zvolen Randlesův obvod (obr. 15), který kombinuje dva rezistory a jeden kondenzátor. U čisté elektrody představují rezistory odpor roztoku a polarizační odpor uhlíkové elektrody, kondenzátor odpovídá kapacitě vrstvy na povrchu elektrody, která vzniká v důsledku pasivace elektrodového povrchu. U modifikované elektrody se představa liší tím, že kondenzátor představuje kapacitu fosfolipidové vrstvy na povrchu elektrody. Všechna měření byla prováděna v roztoku ferrokyanidu draselného ( $c = 1 \text{ mmol/l}$ ) v 0,1 mol/l KCl, proto se odpor roztoku u jednotlivých EIS měření výrazněji neliší. Na obr. 27 a 28 jsou uvedeny Nyquistovy diagramy získané EIS měření s čistou a modifikovanou elektrodou. U čisté GCE se hodnoty impedance na ose y (imaginární složka impedance) pohybují mírně nad 1 k $\Omega$ , kdežto u modifikované elektrody jsou hodnoty imaginární složky impedance přibližně stokrát vyšší a dosahují hodnot více než 100 k $\Omega$ . Stejně tak lze porovnat hodnoty reálné složky impedance na ose x, které u čisté GCE dosahují hodnoty přibližně 3 k $\Omega$ , naproti tomu u modifikované GCE je tato hodnota vyšší než 20 k $\Omega$ .





**Obr. 27.** Nyquistův diagram získaný EIS měřením s čistou GCE. Měření bylo provedeno v roztoku ferrokyanidu draselného ( $c = 1 \text{ mmol/l}$ ) a základním elektrolytem byl roztok KCl ( $c = 0,1 \text{ mol/l}$ ).



**Obr. 28.** Nyquistův diagram získaný EIS měřením s pokrytou GCE v roztoku ferrokyanidu draselného ( $c = 1 \text{ mmol/l}$ ). Jako základní elektrolyt byl použit roztok KCl ( $c = 0,1 \text{ mol/l}$ ).

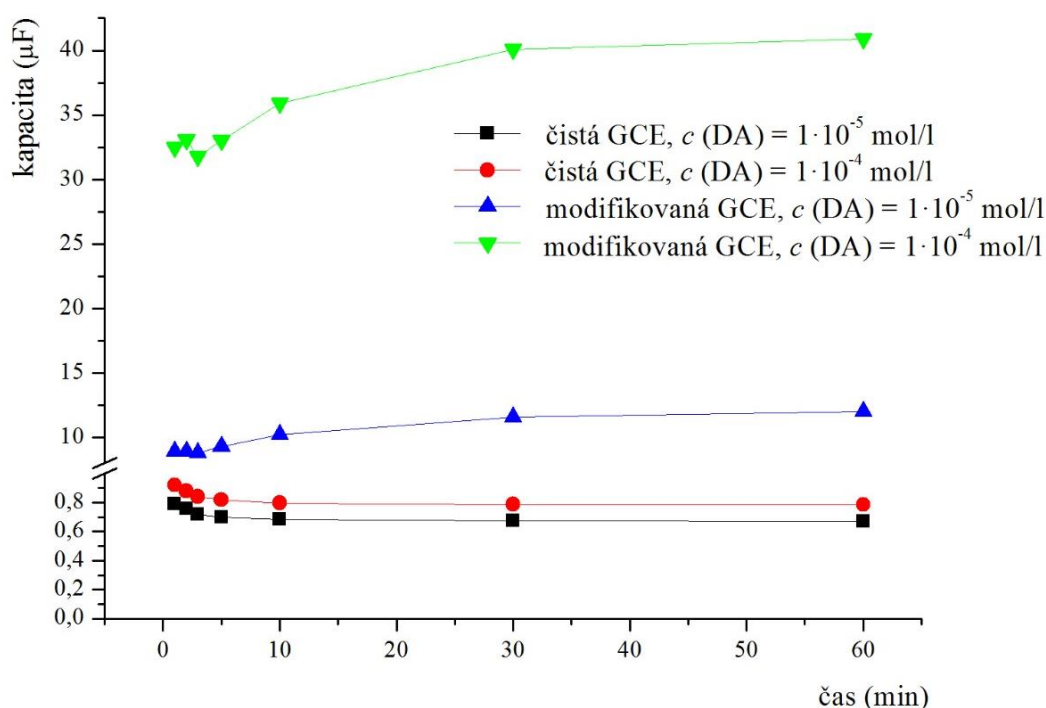
Z naměřených frekvenčních charakteristik (Nyquistových diagramů) vyhodnocených pomocí Randlesova obvodu byly vypočítány hodnoty kapacitní složky a obou odporových složek. Pro popis chování systémů s čistou elektrodou a elektrodou pokrytou fosfolipidovou vrstvou byly použity vypočtené hodnoty kapacitní složky a hodnoty polarizační rezistance.



Ze vztahu pro kapacitu deskového kondenzátoru (rovnice 1) vyplývá přímá úměrnost mezi kapacitou  $C$  a relativní permitivitou dielektrika  $\varepsilon_r$  a nepřímá úměrnost mezi kapacitou  $C$  a tloušťkou vrstvy na povrchu elektrody  $d$ .

$$C = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{S}{d}, \quad (1)$$

kde  $C$  je kapacita kondenzátoru,  $\varepsilon_0$  je permitivita vakua,  $\varepsilon_r$  je relativní permitivita dielektrika mezi deskami kondenzátoru,  $S$  je plocha desek kondenzátoru a  $d$  je vzdálenost desek kondenzátoru.

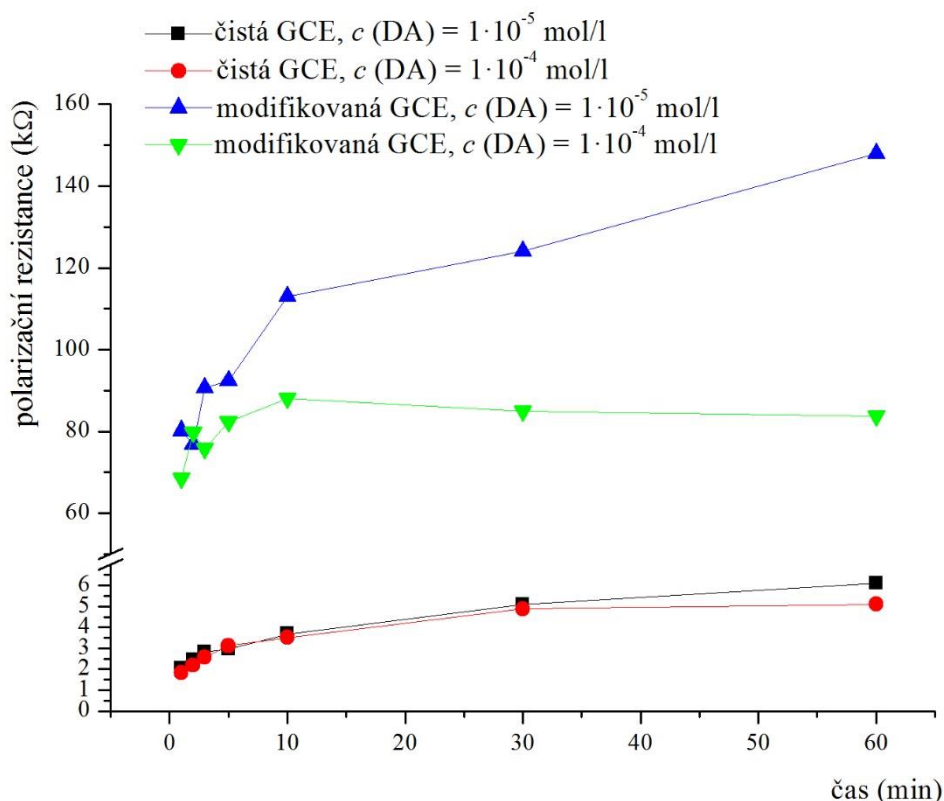


**Obr. 29.** Závislost kapacity na čase. Data byla získána EIS měřením s uhlíkovou elektrodou, která byla definovanou dobu ponořena do roztoku dopaminu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  a  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$  v prostředí PBS ( $\text{pH} = 6,5$ ). Vlastní EIS měření bylo provedeno v roztoku ferrokyanidu draselného ( $c = 1 \text{ mmol/l}$ ) a základním elektrolytem byl roztok KCl ( $c = 0,1 \text{ mol/l}$ ).

Na obr. 29 je graficky vyjádřena změna kapacity v čase, po který byla elektroda vystavena roztoku dopaminu. U čisté elektrody kapacita v prvních deseti minutách klesala. Pokles kapacity může být způsoben nárůstem tloušťky vrstvy na povrchu elektrody, což lze u čisté elektrody vysvětlit adsorpcí látky z roztoku na elektrodovém povrchu. Po deseti minutách byl elektrodový povrch nasycen molekulami analytu a kapacita se výrazně neměnila. U modifikované elektrody je trend opačný. Ze začátku kapacita narůstala a po deseti až třiceti minutách se její hodnota ustálila. To znamená, že u modifikované GCE docházelo ke změnám ve složení, případně i tloušťce fosfolipidové vrstvy. Kladně nabitý dopamin se akumuloval ve vrstvě, pravděpodobně v důsledku elektrostatických interakcí protonizované aminoskupiny s fosfátovou skupinou v molekule fosfolipidů. Zvýšená

koncentrace polarizovatelných částic ve vrstvě způsobila nárůst relativní permitivity a tím i kapacity dvojvrstvy pozorovaný v impedančních spektrech. Coulombické síly působící mezi nabitými částicemi ve vrstvě mohly rovněž přispět ke stlačení a tím k zúžení a zkompaktnění fosfolipidové vrstvy, což se mohlo také projevit nárůstem kapacity v impedančních spektrech.

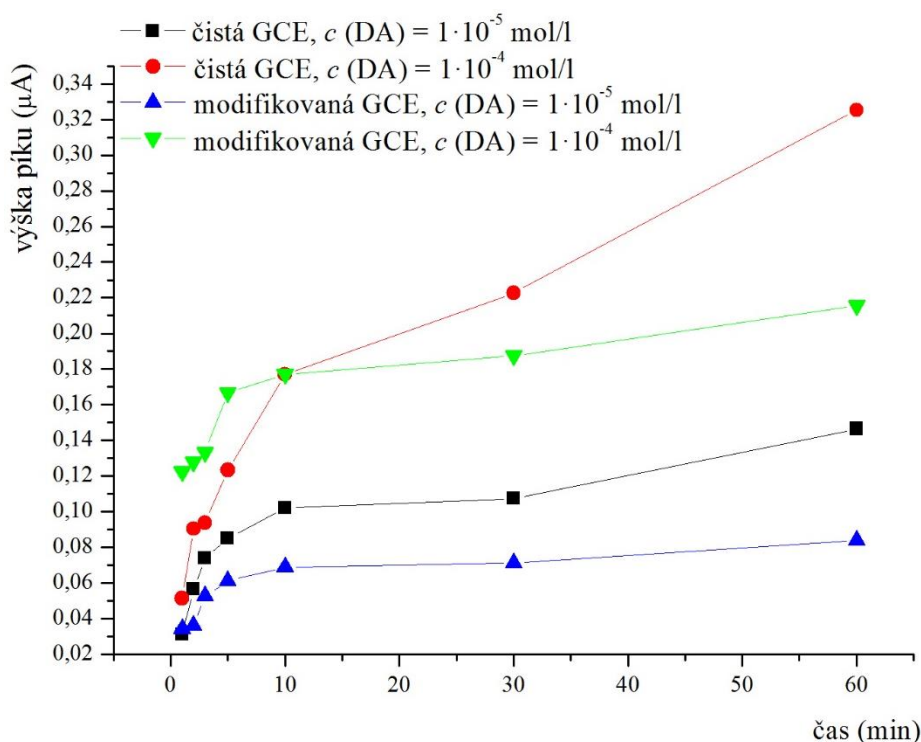
Další parametr, který charakterizuje změny na elektrodě, je polarizační rezistance. Její závislost na čase je znázorněna na obr. 30. Trend závislosti je pro čistou i modifikovanou elektrodu stejný – rezistance s časem narůstala. U čisté elektrody hodnota rezistance rostla cca do třiceti minut, poté se již výrazně neměnila. Nárůst odporu naznačuje nárůst adsorbované vrstvy dopaminu na povrchu, která brání přenosu náboje mezi roztokem a povrchem elektrody. V případě modifikované elektrody nárůst odporu svědčí o zkompaktnění fosfolipidové vrstvy v důsledku akumulace dopaminu.



**Obr. 30.** Závislost polarizační rezistance na čase. Data byla naměřena metodou EIS pomocí GCE, která byla definovaná dobu ponořena do roztoku dopaminu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  a  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$  v prostředí PBS ( $\text{pH} = 6,5$ ). Vlastní EIS měření bylo provedeno v roztoku ferrokyanidu draselného ( $c = 1 \text{ mmol/l}$ ) a základním elektrolytem byl roztok KCl ( $c = 0,1 \text{ mol/l}$ ).

Pro doplnění dat získaných EIS měřením bylo provedeno měření cyklické voltametrie ve stejných časových intervalech jako EIS. Na obr. 31 je graf, který charakterizuje výsledky CV měření. Byla vyhodnocována výška píku odpovídajícího oxidaci dopaminu na *o*-chinon. Křivky popisují adsorpci dopaminu na povrchu elektrody, případně jeho akumulaci ve

fosfolipidové vrstvě. Data plně korelují s výsledky z EIS měření. Množství dopaminu adsorbovaného na povrchu čisté elektrody s časem rostlo. To odpovídá poklesu kapacity (tedy zvětšení tloušťky vrstvy) a nárůstu rezistance. U pokryté elektrody má křivka rovněž vzestupný charakter. Nárůst výšky píku je však pomalejší než u čisté elektrody. To souhlasí s představou, že ačkoliv celková koncentrace dopaminu ve vrstvě s časem narůstá, jeho množství, které se dostane k elektrodovému povrchu a zoxiduje se je menší než u nepokryté elektrody. Může to být způsobeno tím, že akumulace dopaminu způsobuje zkompaktnění vrstvy a tím zhoršení její propustnosti pro dopamin, který tak zůstává vázán v povrchové vrstvě fosfolipidové membrány. Jiným vysvětlením by mohlo být, že produkty oxidace dopaminu zůstávají u elektrodového povrchu, blokují ho a brání tak v přístupu a v oxidaci dalším molekulám dopaminu.

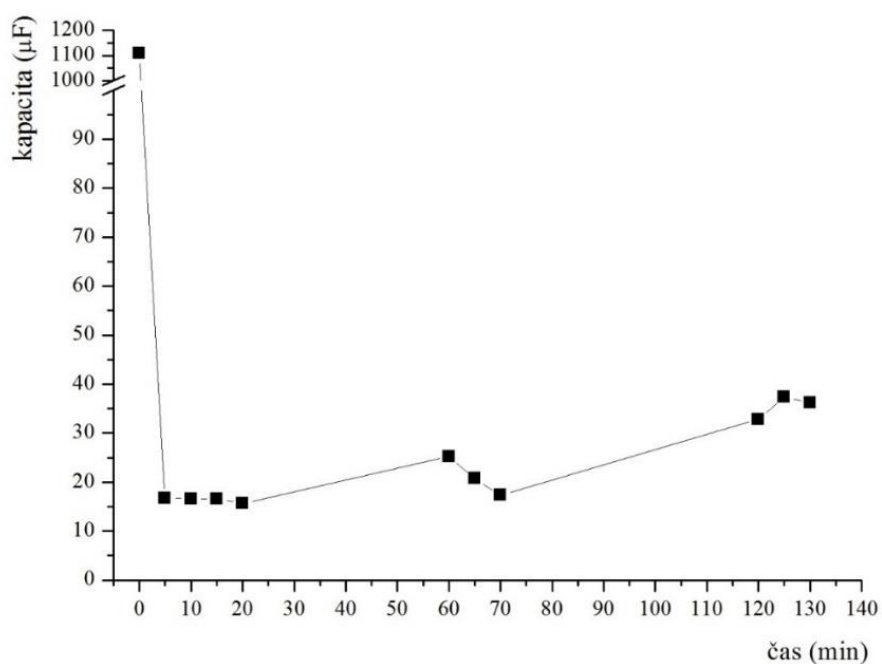


**Obr. 31.** Závislost výšky voltametričkého píku na čase. K měření byla použita uhlíková elektroda, která byla před měřením ponořena na definovanou dobu do roztoku dopaminu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  a  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$  v prostředí PBS ( $\text{pH} = 6,5$ ). Vlastní CV měření bylo provedeno v čistém elektrolytu (PBS o  $\text{pH} 6,5$ ).

### 3.4.1.5. EIS měření s PC membránovým filtrem

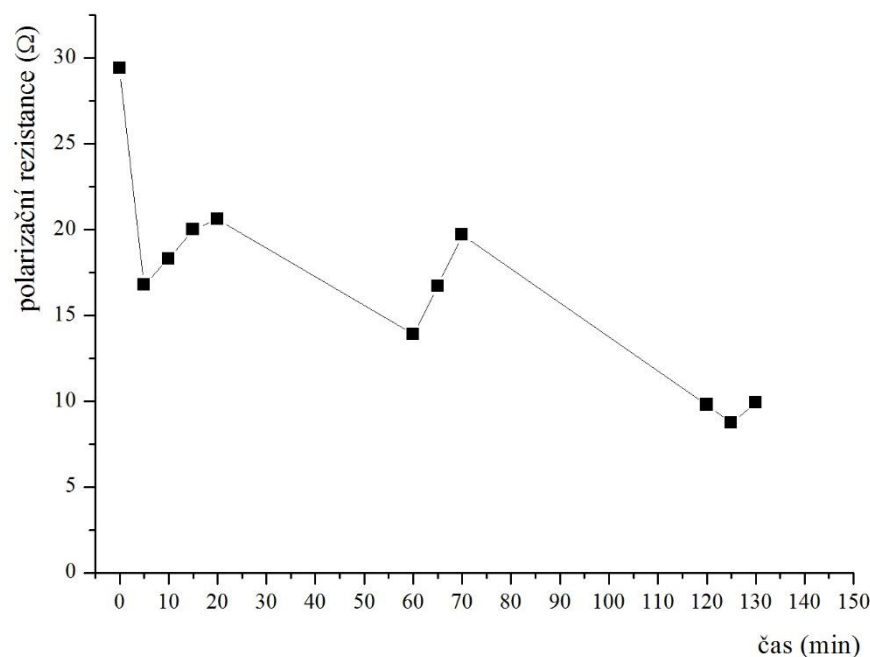
První experiment s elektrochemickou celou, kdy byl mezi vialky umístěn čistý polykarbonátový membránový filtr, bylo měření elektrochemické impedanční spektroskopie a sledování změn kapacity a rezistance PC filtru s časem. Pro případ měření s čistým PC filtrem

byl použit k vyhodnocení naměřených dat jako ekvivalentní obvod Randlesův obvod (obr. 15). Na obr. 32 je znázorněn graf, který vyjadřuje změnu kapacity PC filtru v čase. Jednotlivé body v grafu odpovídají měření v časech 0, 5, 10, 15, 20, 60, 65, 70, 120, 125 a 130 min. Při prvním měření v čase 0 min byla zjištěna kapacita vyšší než 1 000  $\mu\text{F}$ . Už po 5 min došlo k výraznému snížení kapacity na hodnotu kolem 10  $\mu\text{F}$ . Snížení kapacity PC filtru během prvních pěti minut je způsobeno nasáknutím roztoku elektrolytu (fosfátového pufru o pH 6,5) do pórů filtru a zvětšením jeho tloušťky bobtnáním. Mírný nárůst kapacity během dvou hodin může souviset s polarizací PC filtru během měření. Po 120 min již nebyly změny kapacity příliš výrazné.



**Obr. 32.** Změna kapacity čistého PC membránového filtru v čase. Oba prostory elektrochemické cely byly naplněny fosfátovým pufrům (pH = 6,5).

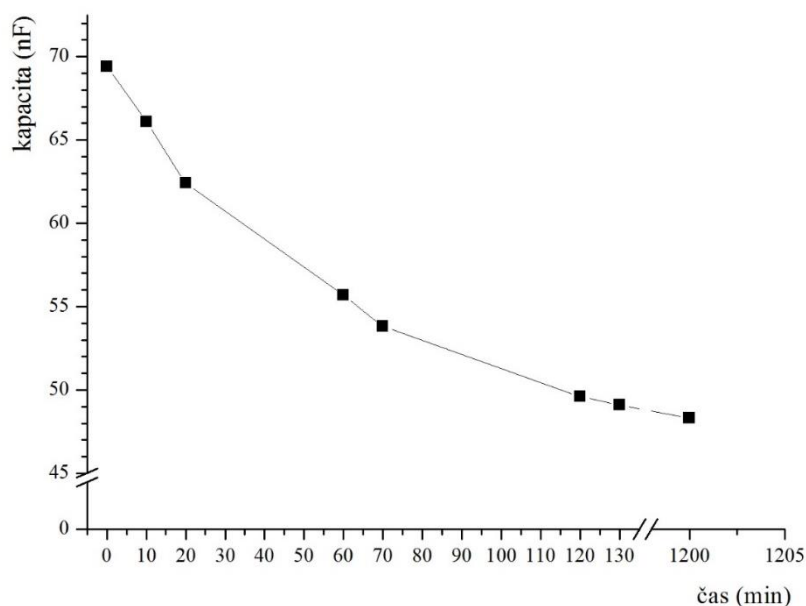
Na obr. 33 je znázorněna změna rezistance PC membránového filtru v čase. Odpor filtru po 5 min výrazně klesl, ale při měřeních opakovaných bezprostředně po sobě mírně narůstal. Po 120 min se hodnota rezistance ustálila a dále už se výrazně neměnila. Z důvodu toho, že se hodnoty kapacity a rezistance po stovdacetiminutovém intervalu ustálily, byla tato doba zvolena jako doba potřebná pro bobtnání PC membránového filtru a ustálení podmínek na filtru v prostředí fosfátového pufru (pH = 6,5) před naplněním jedné cely roztokem analytu.



**Obr. 33.** Změna polarizační rezistance čistého PC membránového filtru v čase. V obou prostorech měrné cely byl umístěn fosfátový pufr (pH = 6,5).

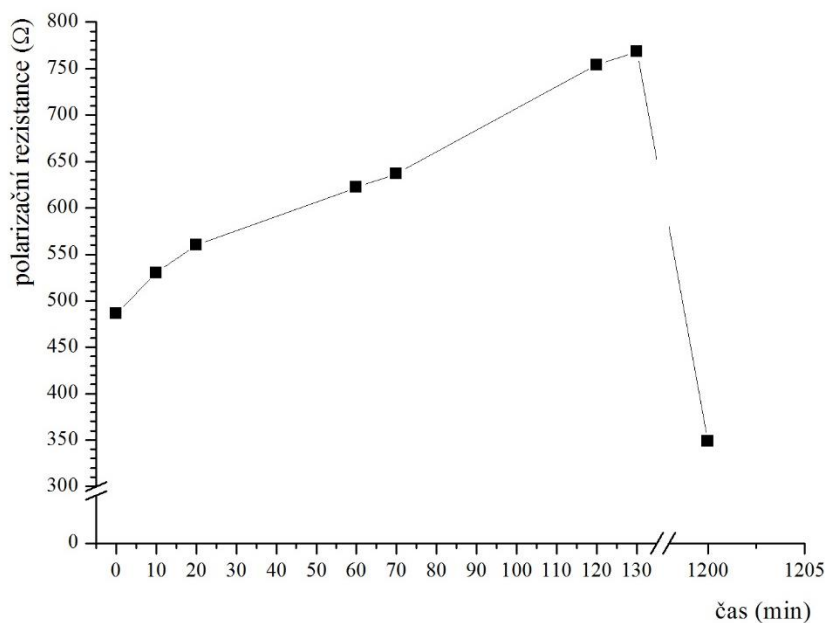
Další postup spočíval ve sledování změn kapacity a rezistance PC membránového filtru pokrytého vrstvou fosfolipidů, který byl vložen mezi dvě komory elektrochemické cely. K vyhodnocování naměřených dat byl využit Randlesův ekvivalentní obvod (obr. 15). Póry filtru tvoří pouze zlomek z celkové plochy filtru a většina interakcí fosfolipidů s dopaminem se odehrává mimo póry. Z tohoto důvodu byl při vyhodnocování zanedbán příspěvek pórů a získané hodnoty kapacity a rezistance charakterizují filtr pokrytý vrstvou fosfolipidů.

Na obr. 34 je znázorněna změna kapacity pokrytého PC filtru v čase. EIS měření byla provedena v časových intervalech 0, 10, 20, 60, 70, 120, 130 a 1 200 min. Hodnoty kapacity se u pokrytého PC filtru pohybují v řádu nF, kdežto u čistého PC filtru byly hodnoty v řádu  $\mu\text{F}$ . Výrazně nižší kapacita u pokrytého PC filtru poukazuje na to, že došlo k významné změně dielektrika – vodný roztok iontů byl nahrazen mnohem méně vodivou vrstvou fosfolipidů. Nárůst tloušťky filtru v důsledku nanesení fosfolipidů se také promítne do snížení kapacity u pokrytého filtru, tento vliv je však oproti změně dielektrika zanedbatelný. Z grafu je patrný pokles kapacity pokrytého filtru v čase, což pravděpodobně souvisí s interakcí nabitých částic ve fosfolipidové membráně s volnými ionty ve fosfátovém pufru (pH = 6,5) a s tvorbou mezifází u povrchu membrány. Největší změny kapacity se odehrály během prvních 120 minut.



**Obr. 34.** Změna kapacity pokrytého PC filtru v čase. Oba prostory elektrochemické cely byly naplněny PBS o pH 6,5.

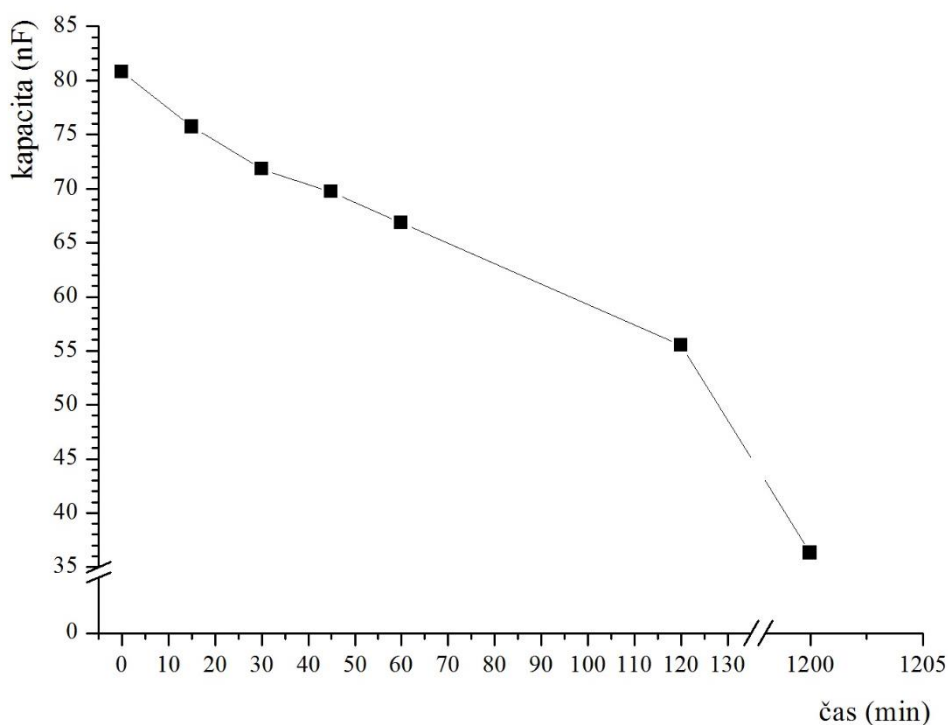
Změna rezistance pokrytého PC filtru v čase je graficky znázorněna na obr. 35. Hodnoty odporu pokrytého PC filtru jsou ve srovnání s hodnotami rezistance pro čistý filtr mnohem vyšší. U pokrytého PC filtru odpor s časem narůstal a po 20 hod (1 200 min) byl zaznamenán jeho pokles. Ten může souviset s narušením fosfolipidové vrstvy na povrchu filtru, protože fosfolipidová membrána má omezenou stabilitu a „dobu životnosti“. Po 20 hod kontaktu pokryté membrány s PBS (pH = 6,5) lze uvažovat, že fosfolipidová membrána již nebyla dostatečně stabilní a mohlo dojít k vymývání fosfolipidů a k částečnému narušení dvojvrstvy.



**Obr. 35.** Změna polarizační rezistance pokrytého PC membránového v čase. Oba prostory měrné cely byly naplněny fosfátovým pufrům (pH = 6,5).

Po úvodních experimentech, kdy byla elektrochemická cela naplněna fosfátovým pufrem (pH = 6,5), následovala EIS měření, při kterých byl PBS v jedné z vialek vyměněn za roztok dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) v prostředí PBS o pH 6,5. Elektrochemická cela byla naplněna fosfátovým pufrem o pH 6,5 po dobu 120 min. Tato doba byla na základě výsledků zjištěných předchozími měřeními stanovena jako optimální doba pro bobtnání a ustálení podmínek na PC filtru. Po uplynutí 120 min byl PBS v jedné vialce vyměněn za roztok obsahující dopamin. Koncentrace dopaminu byla 1000x nižší než koncentrace fosfátového pufru ( $c = 0,1$  mol/l). Změny impedančních charakteristik byly v porovnání s čistým elektrolytem nepatrné.

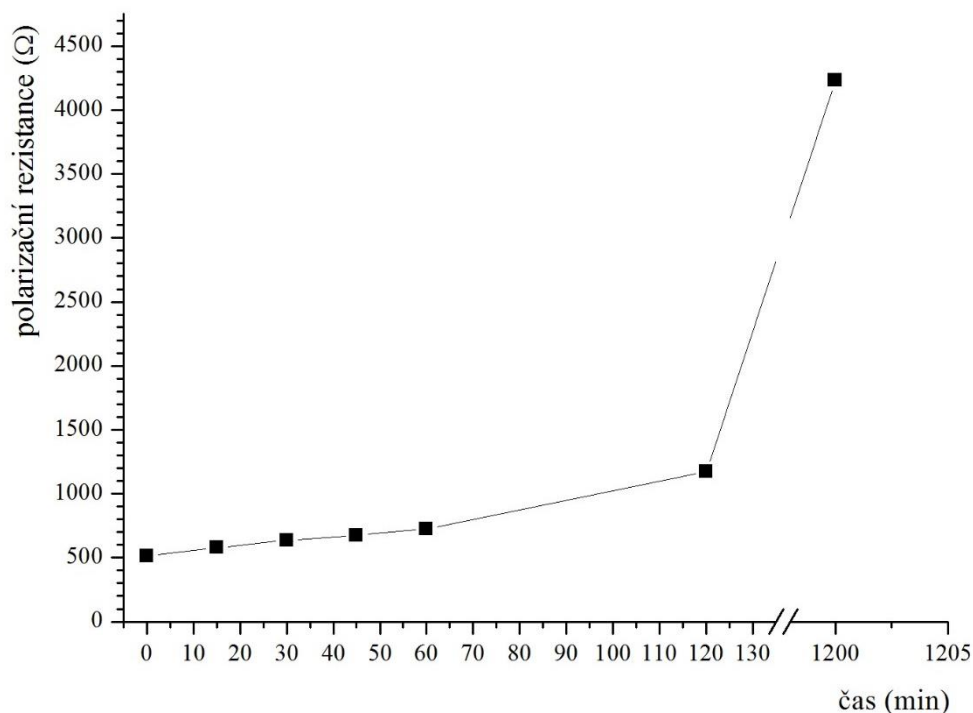
Na obr. 36 je graf znázorňující změnu kapacity v čase u PC membránového filtru pokrytého vrstvou fosfolipidů. EIS měření byla provedena v následujících časových intervalech: 0, 15, 30, 45, 60, 120 a 1 200 min. Trend je stejný jako u měření, kdy byl v obou vialkách cely fosfátový pufr o pH 6,5 (obr. 34). Koncentrace dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) byla 1000x nižší než koncentrace PBS ( $c = 0,1$  mol/l) a vliv dopaminu na kapacitu pokrytého filtru je zanedbatelný. Rozdíl se projevil až po 20 hod (1 200 min), kdy kapacita dále klesla, což mohlo být důsledkem inkorporace dopaminu do fosfolipidové membrány.



**Obr. 36.** Změna kapacity pokrytého PC membránového filtru v čase. Jedna strana filtru byla vystavena fosfátovému pufru (pH = 6,5), druhá strana roztoku dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) v PBS o pH 6,5. Před měřením byl filtr ponechán 120 min v prostředí fosfátového pufru (pH = 6,5).



Na obr. 37 je znázorněna změna odporu pokrytého PC membránového filtru v čase. Rezistance s časem narůstala. Prvních 120 min nebyl nárůst příliš výrazný, ale po 20 hod (1 200 min) rezistance narostla o téměř 4 k $\Omega$ . Nárůst odporu s velkou pravděpodobností souvisí se začleněním dopaminu do fosfolipidové membrány a se změnami v kompaktnosti vrstvy vyvolanými jeho inkorporací.



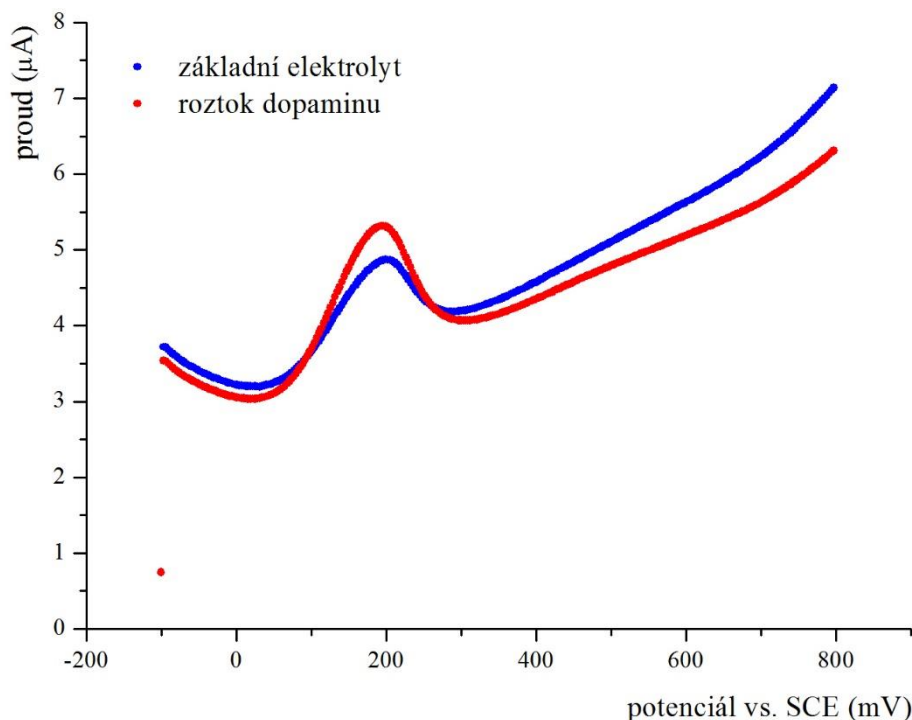
**Obr. 37.** Změna polarizační rezistance pokrytého PC membránového filtru v čase. Jedna strana filtru byla vystavena fosfátovému pufru (pH = 6,5), druhá strana roztoku dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l). Před měřením byl filtr ponechán 120 min v prostředí fosfátového pufru (pH = 6,5).

### 3.4.1.6. Sledování difúze přes PC filtr

Difúze dopaminu přes PC membránový filtr byla sledována tak, že po určitých časových intervalech byly odebrány roztoky z obou nádobek – z prostoru základního elektrolytu a z prostoru s roztokem dopaminu – a bylo provedeno SWV měření. Na voltamogramech byl sledován pík odpovídající oxidaci dopaminu na *o*-chinon. Nejprve byla sledována difúze dopaminu do prostoru základního elektrolytu (PBS o pH 6,5) přes nepokrytý PC filtr, kdy koncentrace roztoku dopaminu v jedné z vialek byla  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l. V prostoru základního elektrolytu nebyl po 1; 2; 3 ani 4,5 hodinách patrný pík dopaminu. Roztoky byly v cele ponechány přes noc a po 20 hod bylo provedeno SWV měření. Koncentrace dopaminu v prostoru s roztokem dopaminu a v prostoru se základním elektrolytem se téměř vyrovnaly (obr. 38). Difúze ale byla příliš pomalá, proto byl proveden stejný experiment s roztokem

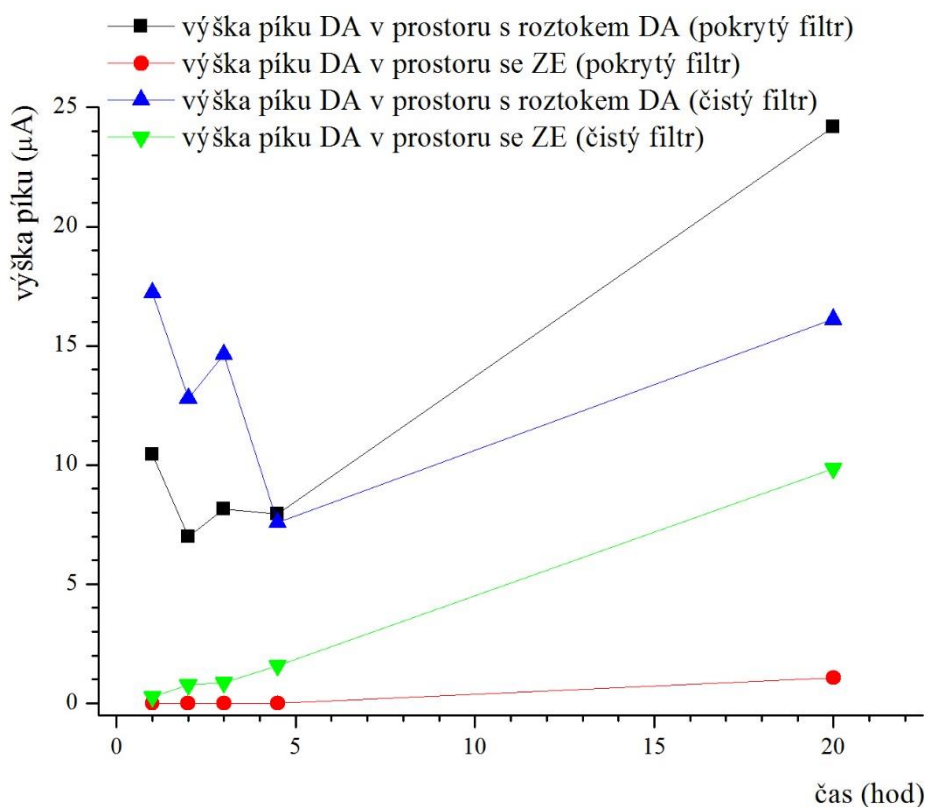


dopaminu o vyšší koncentraci ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l), aby bylo dosaženo většího koncentračního gradientu, který by měl urychlit difúzi dopaminu přes PC membránový filtr.



**Obr. 38.** Square wave voltamogramy roztoků odebraných z obou vialek měrné cely – z prostoru se základním elektrolytem (modrá křivka) a z prostoru s roztokem dopaminu (červená křivka). Měření bylo provedeno po 20 hod difúzi dopaminu přes PC membránový filtr

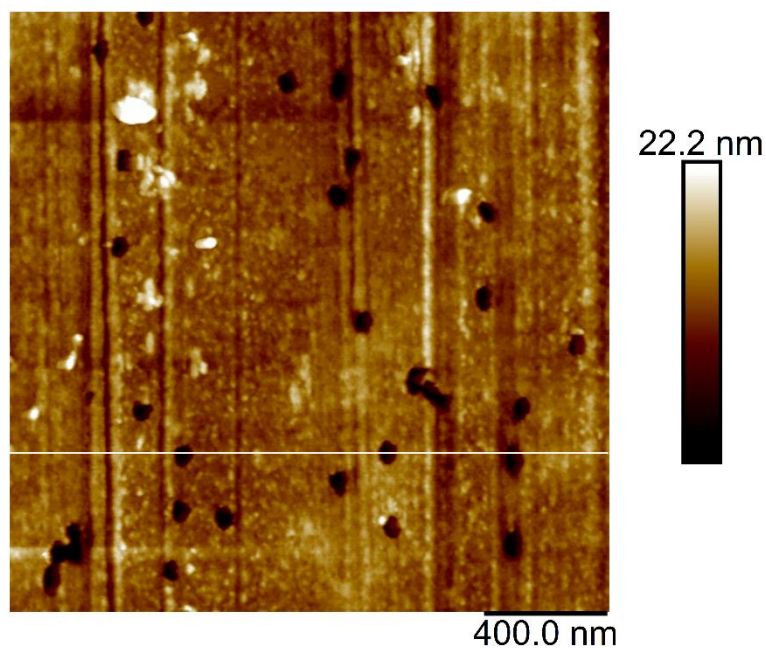
Difúze byla v případě použití roztoku dopaminu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l skutečně rychlejší. Již po jedné hodině byl v roztoku odebraném z prostoru se základním elektrolytem patrný pík dopaminu. Na obr. 39 je znázorněno, jak se v čase měnila odezva dopaminu v prostoru se základním elektrolytem a v prostoru s roztokem dopaminu. Graf znázorňuje difúzi dopaminu přes čistý a pokrytý PC membránový filtr. V případě čistého filtru byl signál dopaminu v prostoru základního elektrolytu měřitelný již po 1 hod a dále s časem narůstal. Pík DA v prostoru s roztokem dopaminu nejprve klesal, ale po 20 hod je patrný nárůst výšky píku. V případě, kdy byl mezi vialky měrné cely vložen pokrytý PC filtr, nebyl pík DA v prostoru ZE patrný ani po 4,5 hod. Naproti tomu výška píku DA v prostoru s roztokem dopaminu ze začátku klesala. Tyto informace svědčí o tom, že se dopamin zadržel na PC filtru pokrytém fosfolipidy. Po 20 hodinách byl v prostoru ZE měřitelný pík dopaminu a pík v prostoru s DA se zvětšil. Mohlo dojít k nasycení fosfolipidové membrány dopaminem a k jeho průchodu přes membránu. Další možnost, která by připadala v úvahu je, že došlo k narušení fosfolipidové membrány. Toto vysvětlení je v rozporu s informacemi získanými EIS. Kdyby došlo k narušení membrány, rezistance by klesla, nebyl by pozorován její nárůst (obr. 37).



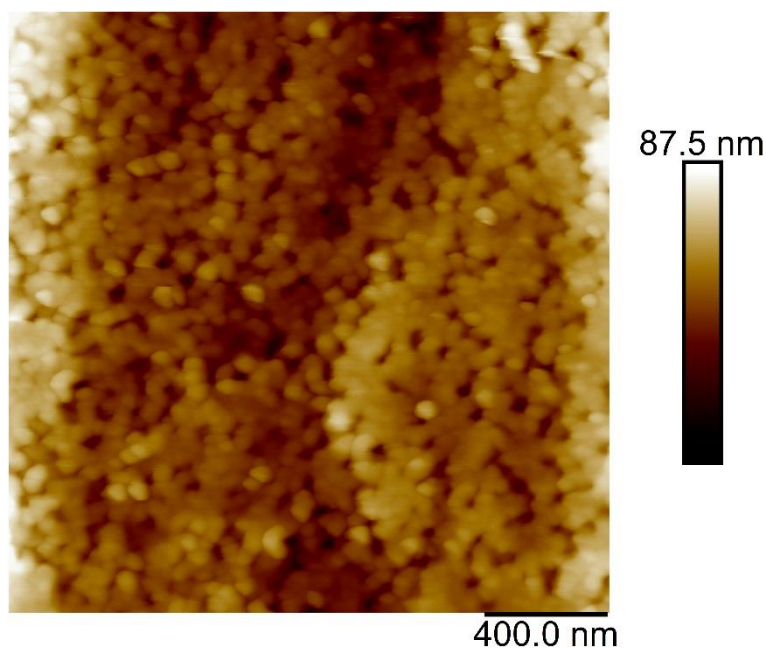
**Obr. 39.** Difúze dopaminu přes čistý a pokrytý PC membránový filtr. Data byla získána SWV měřením roztoků z obou nádobek měrné cely – v jedné nádobce byl ZE (fosfátový pufr o pH 6,5) a ve druhé roztok dopaminu ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol/l) v PBS o pH 6,5. Byla vyhodnocena výška oxidačního píku dopaminu. Jednotlivé body odpovídají měřením po 1; 2; 3; 4,5 a 20 hod.

### 3.4.1.7. Skenování povrchu PC filtru pomocí AFM

Pomocí mikroskopu atomárních sil byl skenován povrch polykarbonátového membránového filtru. Jak bylo zmíněno dříve, lesklá a matná strana PC filtru se liší. Na obr. 40 je snímek lesklé strany PC filtru. Tmavší místa na snímku odpovídají oblastem s větší hloubkou. Povrch filtru je poměrně hladký. Tmavé póry jsou velmi dobře patrné, mají na filtru nepravidelné rozmístění a dobře definovaný průměr. Nejsvětlejší místa na snímku jsou místa s největší výškou a odpovídají nečistotám na povrchu filtru. Na obr. 41 je AFM snímek matné strany PC membránového filtru. Povrch z matné strany není zdaleka tak hladký jako na lesklé straně a nejsou zde ani patrné póry. Z tohoto důvodu byla zvolena pro pokrývání fosfolipidy lesklá strana filtru.



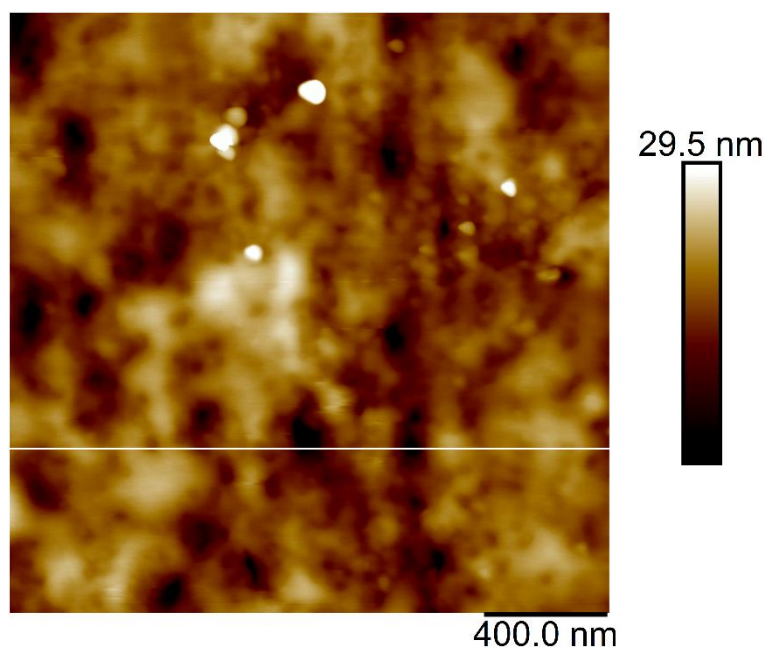
**Obr. 40.** AFM snímek povrchu lesklé strany PC membránového filtru. Výškový profil v řezu vyznačeném bílou čarou je na obr. 43.



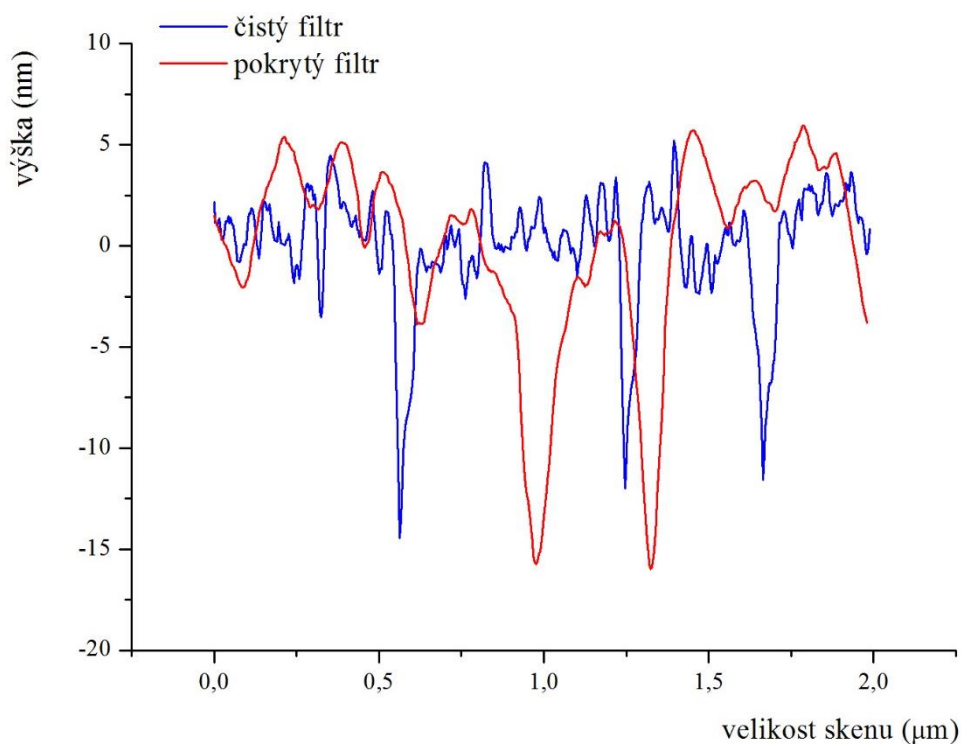
**Obr. 41.** AFM snímek matné strany PC membránového filtru.

Na obr. 42 je snímek lesklé strany PC membránového filtru, která byla pokryta vrstvou fosfolipidů. Je patrný výrazný rozdíl mezi lesklou stranou čistého a pokrytého filtru. Póry jsou na snímku jen těžko identifikovatelné a celý povrch má jiný charakter než povrch čistého filtru. Rozdíly mezi lesklou stranou čistého a pokrytého filtru jsou dobře patrné i z výškového profilu na obr. 43. Profilový řez je vyznačen na odpovídajících snímcích (obr. 40 a 42) bílou čarou v jejich dolní části. Křivku výškového profilu čistého filtru charakterizují ostré nerovnosti na povrchu filtru, kdežto u pokrytého filtru jsou tyto nerovnosti „vyhlazeny“

nanesenou vrstvou fosfolipidů. Oblasti křivek, které zasahují do negativních hodnot výšky kolem -10 až -15 nm odpovídají pórům filtru.



**Obr. 42.** AFM snímek povrchu lesklé strany PC membránového filtru pokryté vrstvou fosfolipidů. Výškový profil v řezu vyznačeném bílou čarou je na obr. 43.

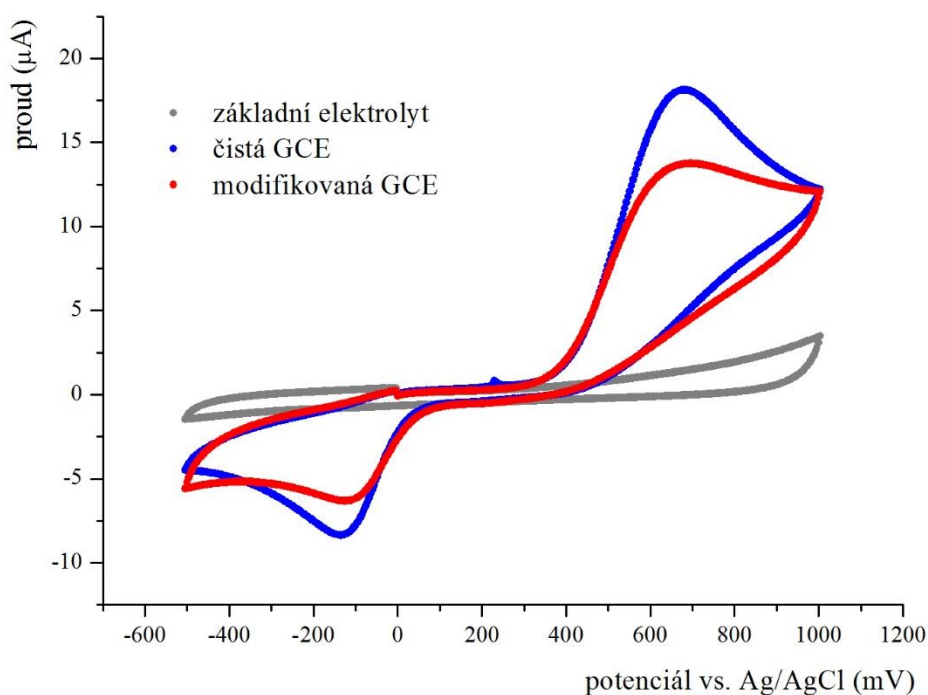


**Obr. 43.** Výškový profil odpovídající lesklé straně čistého a pokrytého PC membránového filtru. Skenování povrchu filtru bylo provedeno pomocí AFM.

## 3.4.2. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina

### 3.4.2.1. Cyklická voltametrie

Na cyklickém voltamogramu 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny (obr. 44) je patrný pouze jeden pár redoxních píků. Anodický pík s maximem při potenciálu +650 mV odpovídá oxidaci 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny na *o*-chinon. Katodický pík s maximem při potenciálu -120 mV náleží zpětné redukci *o*-chinonu na DOPAC. Na první pohled je zřejmé, že katodické píky nejsou stejně velké jako píky anodické a vzdálenost potenciálů píků je větší než teoretická hodnota 29,5 mV (pro dvouelektronový děj při 25 °C). To znamená, že redoxní děj není reverzibilní. Na cyklickém voltamogramu naměřeném pomocí modifikované uhlíkové elektrody je zřejmá nižší odezva v porovnání s cyklickým voltamogramem naměřeným s čistou GCE.

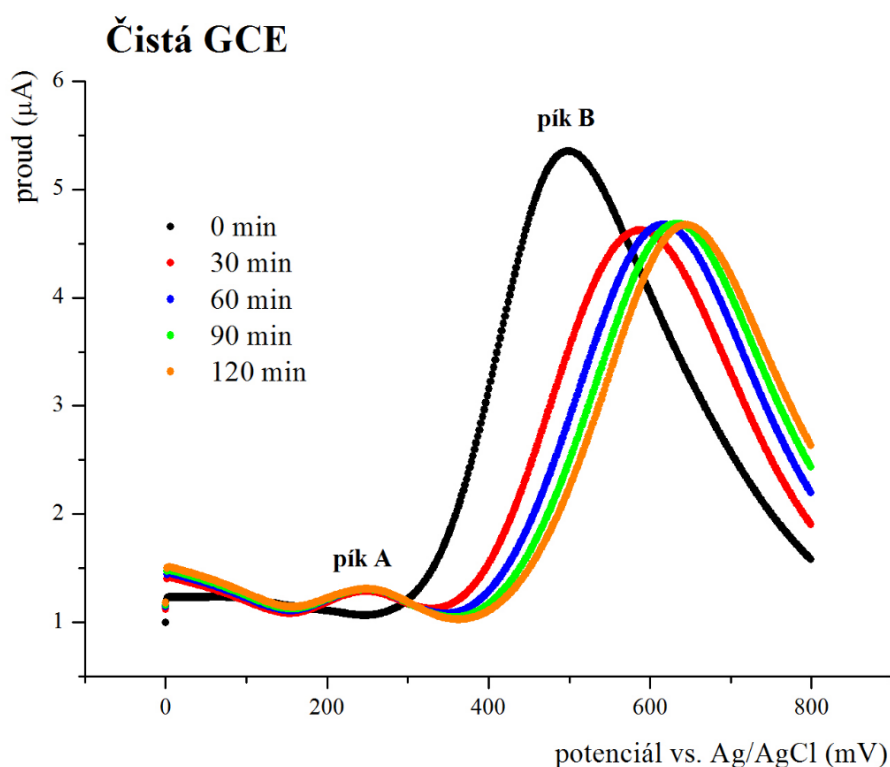


**Obr. 44.** Cyklické voltamogramy 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny naměřené s čistou a modifikovanou GCE. Měření bylo provedeno v roztoku DOPAC o koncentraci 1 mmol/l a základním elektrolytem byl fosfátový pufr o pH 6,5.

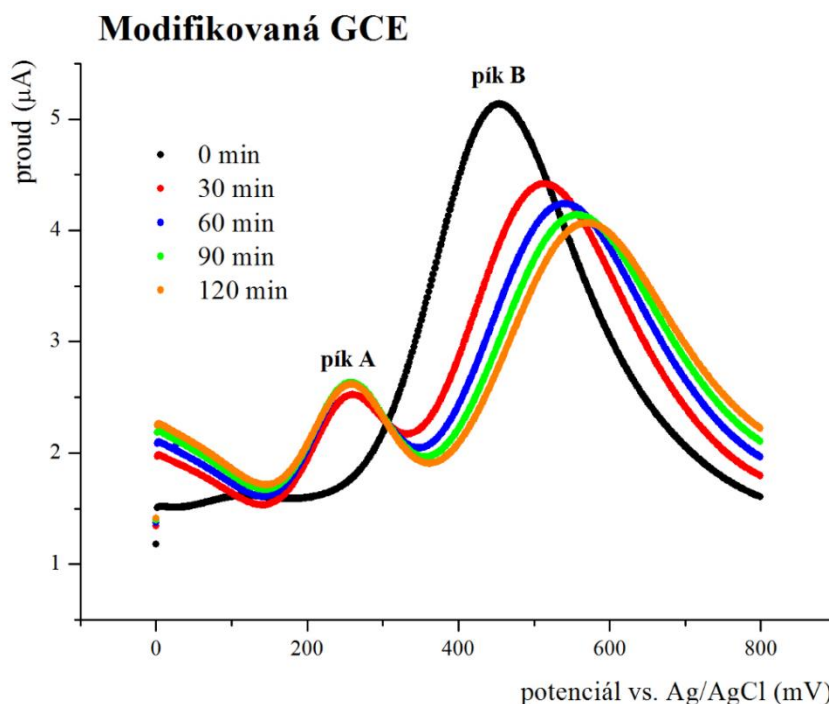


### 3.4.2.2. Akumulace

Na square wave voltamogramech 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny naměřených s čistou a modifikovanou GCE (obr. 45 a 46) v různých časech stání elektrody v měřeném roztoku bez obnovy jejího povrchu jsou patrné dva píky. Výjimkou jsou voltamogramy naměřené v čase 0 min, tedy ihned po ponoření elektrody do roztoku obsahujícího analyt, na kterých pík A chybí. Z toho lze usuzovat, že pík A při potenciálu +250 mV odpovídá adsorbovanému oxidačnímu produktu vytvořenému při prvním SWV skenu. Hlavní pík (pík B), který má maximum mezi +500 až +650 mV, pak odpovídá oxidaci volné DOPAC z roztoku. Posun potenciálu píku B je způsoben pasivací elektrody. Na povrchu elektrody docházelo k utváření vrstvy v důsledku adsorpce oxidačního produktu, a proto byla ztížena difúze další 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny z roztoku k elektrodovému povrchu. Stejný trend jako u akumulčních měření s čistou uhlíkovou elektrodou je patrný i na square wave voltamogramech naměřených s modifikovanou GCE (obr. 46). Zde je zřetelná vyšší intenzita píku A v důsledku zadržení oxidačního produktu u elektrodového povrchu lipidovou vrstvou.

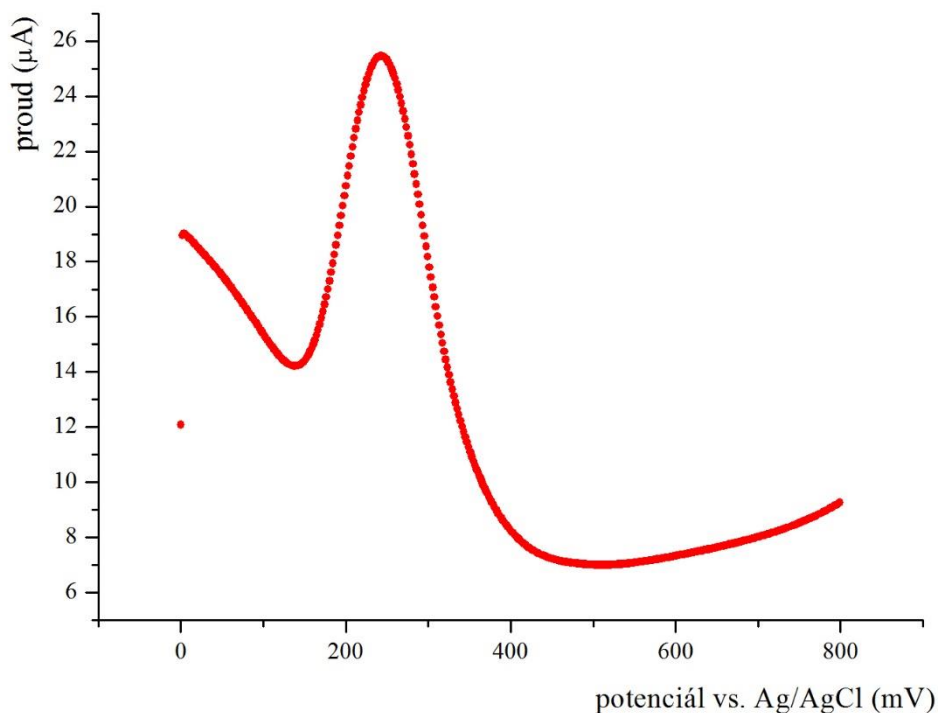


**Obr. 45.** Square wave voltamogramy z měření akumulace DOPAC na čisté uhlíkové elektrodě. Byl použit roztok 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l a základním elektrolytem byl fosfátový pufr o pH 6,5. Jednotlivé voltamogramy odpovídají 0, 30, 60, 90 a 120 minutové akumulaci DOPAC na elektrodovém povrchu.



**Obr. 46.** Square wave voltamogramy charakterizující akumulaci DOPAC ve fosfolipidové vrstvě, kterou byla modifikována uhlíková elektroda. K měření byl použit roztok DOPAC o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Základním elektrolytem byl PBS (pH = 6,5). Voltamogramy byly naměřeny v následujících časových intervalech po ponoření GCE do roztoku 3,4-dihydroxyfenylactové kyseliny: 0, 30, 60, 90 a 120 min.

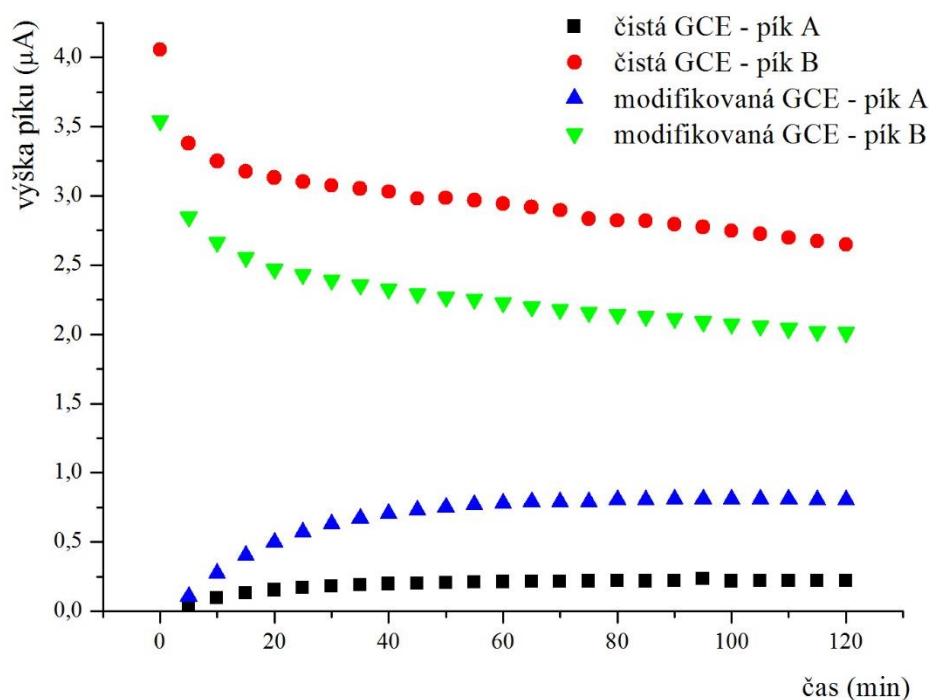
Z důvodu prokázání toho, že pík A při potenciálu +250 mV náleží skutečně oxidačnímu produktu 3,4-dihydroxyfenylactové kyseliny, byl proveden doplňující experiment. Na čistou elektrodu ponořenou v roztoku DOPAC ( $c = 5 \cdot 10^{-4}$  mol/l) byl po dobu pěti minut vkládán konstantní potenciál +500 mV. Během této doby probíhala oxidace DOPAC na *o*-chinon a jeho akumulace na elektrodovém povrchu. Následně byl roztok v měrné cele vyměněn za čistý elektrolyt (PBS o pH 6,5) a byl změřen SWV. Potenciál píku na square wave voltamogramu získaného po oxidaci (obr. 47) odpovídá potenciálu píku oxidačního produktu, který se adsorboval na elektrodovém povrchu, jak je patrné z porovnání s voltamogramem na obr. 45.



**Obr. 47.** Square wave voltamogram pro adsorbovaný oxidační produkt DOPAC naměřený s čistou GCE. Na elektrodu byl po dobu 5 min vkládán potenciál +500 mV v roztoku DOPAC ( $c = 5 \cdot 10^{-4}$  mol/l) se základním elektrolytem PBS o pH 6,5. Po oxidaci byla elektroda ponořena do čistého elektrolytu a bylo provedeno SWV měření.

Na obr. 48 je graf shrnující výsledky měření akumulace DOPAC na čisté i modifikované elektrodě ze skelného uhlíku. Trendy jsou u obou typů elektrod obdobné. Velikost píku A, který odpovídá adsorbovanému oxidačnímu produktu, ze začátku s časem narůstá, ale po 30 až 50 minutách se jeho výška již výrazně nemění. To znamená, že elektrodový povrch, respektive fosfolipidová dvojvrstva, jsou poměrně rychle nasyceny molekulami *o*-chinonu. Pík B, který odpovídá oxidaci DOPAC z roztoku, s časem klesá. Největší změny se odehrály během prvních 30 minut. Z průběhu křivek v grafu je patrné, že s časem se na elektrodovém povrchu, případně fosfolipidové membráně, vytvořila vrstva adsorbovaného oxidačního produktu, která bránila difúzi molekul DOPAC z roztoku k elektrodě.



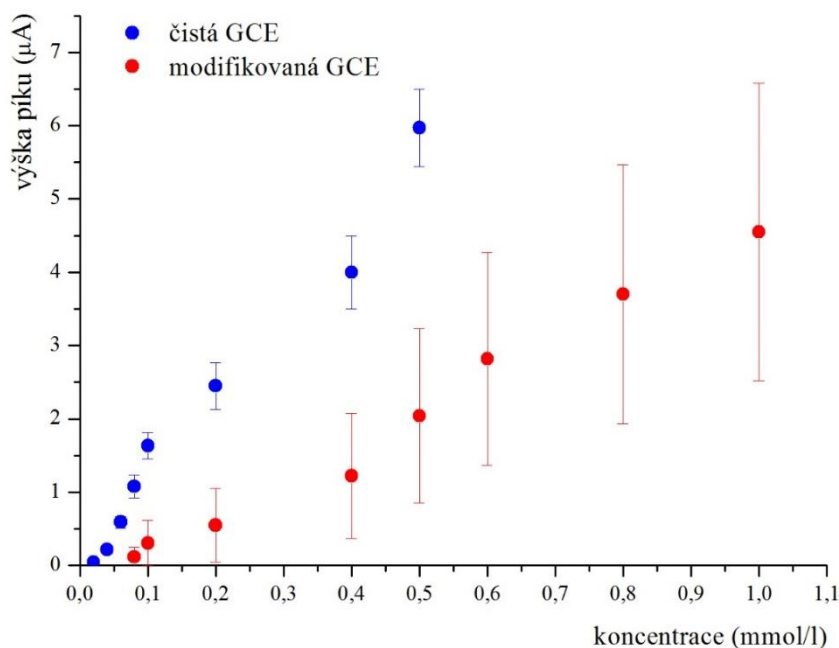


**Obr. 48.** Graf shrnující výsledky akumulčních měření s čistou a modifikovanou GCE. Měření bylo provedeno technikou SWV. Koncentrace roztoku DOPAC byla  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l a jako základní elektrolyt byl použit fosfátový pufř o pH 6,5.

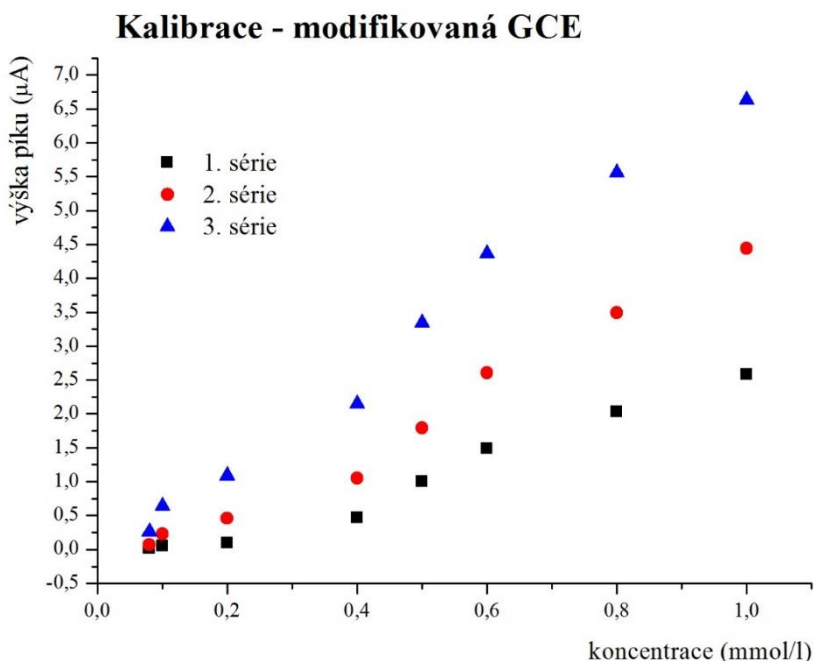
### 3.4.2.3. Kalibrační závislosti

Metodou SWV byly měřeny kalibrační roztoky 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny o koncentracích  $5 \cdot 10^{-6}$  až  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l (s čistou GCE) a  $1 \cdot 10^{-5}$  až  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l (s modifikovanou GCE). U kalibračních roztoků s nejnižšími koncentracemi nebyly na square wave voltamogramech patrné píky, takže pro měření s čistou GCE byly vyhodnocovány píky až od koncentrace  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l a pro měření s modifikovanou GCE byly píky patrné až v roztoku s trojnásobnou koncentrací, tedy  $6 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Kalibrační závislosti jsou nelineární v celém svém rozsahu (obr. 49). Průměrné hodnoty získané ze tří opakovaných měření kalibrační závislosti s modifikovanou GCE mají vysokou směrodatnou odchylku. Je to z toho důvodu, že fosfolipidová vrstva nanosená na povrch elektrody je pokaždé jedinečná. Variabilní je např. její tloušťka a složení, protože asolectin je směsí fosfolipidů a dalších látek. Tato směs je sice směsí homogenní, ale nelze zaručit, že bude tato homogenita dodržena v modelové membráně na povrchu elektrody. Nicméně trendy kalibračních závislostí byly ve všech sériích měření stejné, jak je vidět na obr. 50. Esovitý průběh kalibračních křivek lze vysvětlit na základě Frumkinovy izotermie [53]. Podstatou je, že při nízkých koncentracích je v roztoku malé množství částic analytu, které neinteragují s elektrodou, respektive s fosfolipidy. S rostoucí

koncentrací se zvyšuje míra interakce a dochází k adsorpci částic analytu na elektrodovém povrchu, respektive na fosfolipidové dvojvrstvě. V oblasti nejvyšších koncentrací probíhá adsorpce do další vrstvy. Tyto tři procesy charakterizují jednotlivé oblasti esovitých křivek.



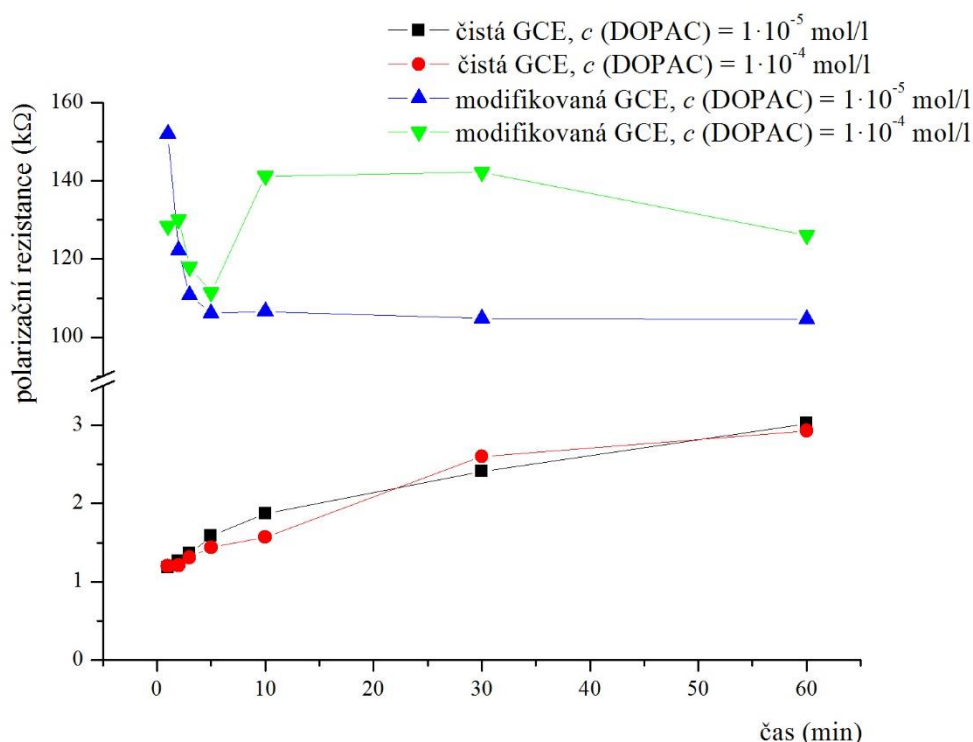
**Obr. 49.** Kalibrační závislosti pro DOPAC naměřené s čistou a modifikovanou GCE metodou SWV. Základním elektrolytem byl PBS o pH 6,5.



**Obr. 50.** Kalibrační závislosti pro DOPAC naměřené metodou SWV pomocí modifikované GCE. Jako základní elektrolyt byl použit fosfátový pufr o pH 6,5. Křivky odpovídají třem opakováním měření stejné kalibrační řady (vždy s nově pokrytou uhlíkovou elektrodou).

### 3.4.2.4. Elektrochemická impedanční spektroskopie

Způsob vyhodnocování dat naměřených elektrochemickou impedanční spektroskopií pro DOPAC byl stejný jako u měření s dopaminem. Podobně jako u dopaminu kapacita čisté elektrody klesala s časem, po který byla GCE v kontaktu s DOPAC. Pokles kapacity může být vysvětlen nárůstem tloušťky adsorbované vrstvy na povrchu elektrody. U modifikované GCE kapacita v čase narůstala. To znamená, že anion 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny podobně jako dopamin ovlivnil uspořádání fosfolipidové dvojvrstvy.

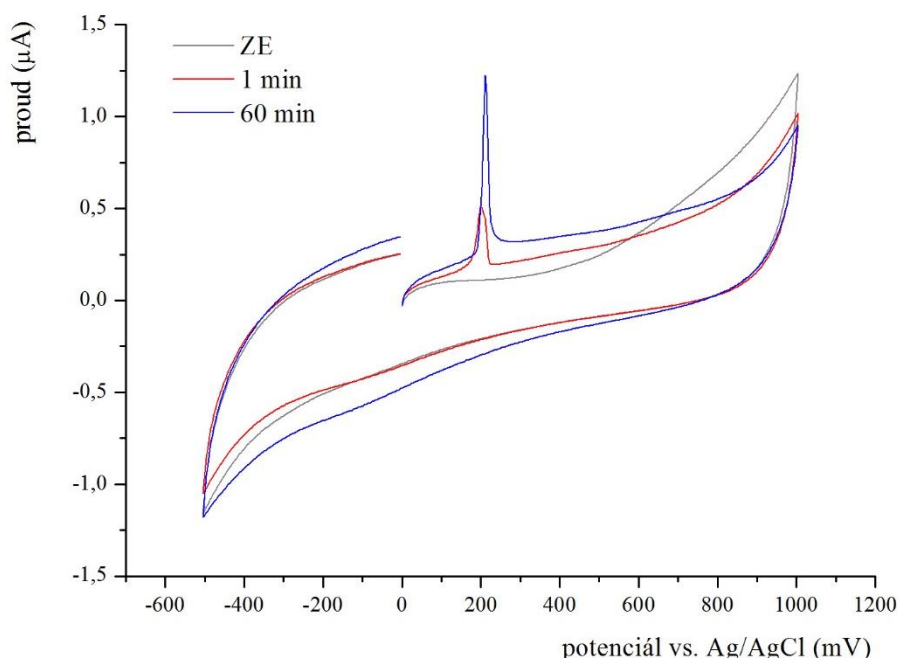


**Obr. 51.** Závislost polarizační rezistance na čase. Hodnoty byly získány EIS měřením s uhlíkovou elektrodou, která byla definovanou dobu ponořena do roztoku DOPAC o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l v prostředí PBS o pH 6,5. Samotné EIS měření probíhalo v roztoku ferrokyanidu draselného ( $c = 1 \text{ mmol/l}$ ) a základním elektrolytem byl roztok KCl ( $c = 0,1 \text{ mol/l}$ ).

Na obr. 51 jsou zobrazeny změny polarizačního odporu v čase při měření s čistou a modifikovanou uhlíkovou elektrodou. U čisté elektrody odpor s časem narůstal, což koreluje s předchozími poznatky, že se DOPAC adsorbovala na elektrodovém povrchu a blokovala ho pro přenos náboje. U měření s fosfolipidy modifikovanou elektrodou, kdy byl použit roztok DOPAC o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l, rezistance v čase klesala, což naznačuje, že působením DOPAC docházelo ke zvýšení vodivosti fosfolipidové dvojvrstvy. To by mohlo být způsobeno např. zvýšením koncentrace nabitých částic na povrchu fosfolipidové vrstvy. Anionty DOPAC, které jsou v roztoku o pH 6,5 převládající formou ( $pK_a = 4,42$  [54]), mohou interagovat s kladným nábojem některých funkčních skupin polární části fosfolipidů

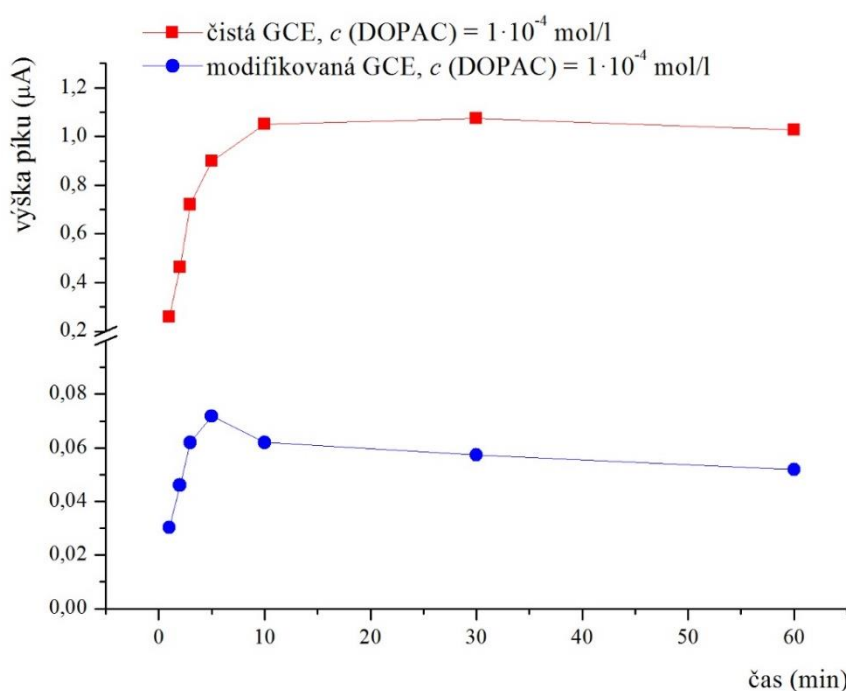
(např. cholinu). Komplikovanější průběh rezistance v čase byl pozorován při vyšší koncentraci DOPAC  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Rezistance během prvních pěti minut klesla, po 10 minutách ale narostla a dále se příliš neměnila. K nárůstu odporu mohlo dojít v důsledku zvýšení koncentrace iontů na povrchu fosfolipidové vrstvy – aniontů DOPAC a kationtů sodných kompenzujících náboj karboxylátu. Lokálně zvýšená koncentrace iontů u povrchu fosfolipidové vrstvy mohla způsobit její stlačení, čímž se zvýšila kompaktnost vrstvy, a to se projevilo nárůstem rezistance.

Výsledky získané EIS měřeními byly dále doplněny o měření cyklické voltametrie ve stejných časových intervalech. Na obr. 52 jsou znázorněny cyklické voltamogramy naměřené s čistou GCE po 1 a 60 min. Po uvedené dobu byla elektroda v kontaktu s analytem, poté byla z roztoku DOPAC vyjmuta, opláchnuta, vložena do čistého elektrolytu a byl zaznamenán cyklický voltamogram. Na voltamogramech jsou výrazné špičaté kapacitní píky, jejichž výška prvních 10 min narůstala a poté zůstala konstantní (obr. 53). Znamená to, že DOPAC se spontánně adsorbuje na povrchu elektrody, přičemž po 10 min je elektrodový povrch plně obsazen a proud kapacitního píku dál neroste. Tvar kapacitních proudových maxim by se dal vysvětlit změnou orientace spontánně adsorbovaných iontů DOPAC (otočení nebo překlopení iontu na elektrodovém povrchu), které se následně oxidují při potenciálu +400 mV.



**Obr. 52.** *Cyklické voltamogramy DOPAC. Měření bylo provedeno s čistou GCE, která byla definovanou dobu ponořena do roztoku DOPAC o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l v prostředí PBS o pH 6,5. Samotné měření CV probíhalo v roztoku ferrokyanidu draselného ( $c = 1$  mmol/l) a základním elektrolytem byl roztok KCl ( $c = 0,1$  mol/l).*

Na obr. 53 je graficky znázorněna časová závislost výšky píku měřená s čistou GCE a s fosfolipidy modifikovanou elektrodou. Na voltamogramech pořízených s modifikovanou elektrodou nebyla kapacitní maxima pozorována, neboť byla potlačena přítomností fosfolipidové vrstvy (ionty DOPAC se nemohou ve vrstvě tak snadno reorientovat). Proto jsou v grafu vyneseny mnohem nižší proudy odpovídající píku oxidace DOPAC akumulované ve vrstvě. Proud píku se v 10. minutě snížil a s dalším časem již nerostl. To je v souladu s pozorováním nárůstu rezistance a s představou, že od určité koncentrace dojde ke stlačení a zkompaktnění vrstvy, čímž se stane hůře propustnou pro přenos náboje, a to se projeví poklesem proudu oxidace adsorbované DOPAC.



**Obr. 53.** Závislost výšky píku z cyklického voltamogramu na čase. Čistá a modifikovaná GCE byly před měřením ponořeny na definovanou dobu do roztoku DOPAC o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$  v prostředí fosfátového pufru ( $\text{pH} = 6,5$ ). Vlastní CV měření bylo provedeno v PBS.

## 4. Závěr

Záměrem diplomové práce bylo sledovat elektrochemické chování dopaminu a 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny vybranými metodami. Konkrétně byla použita cyklická voltametrie, square wave voltametrie a elektrochemická impedanční spektroskopie. Měření bylo realizováno s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku, která byla použita jak v nativním stavu, tak modifikovaná vrstvou fosfolipidů. Acidita prostředí byla nastavena fosfátovým pufrům na pH 6,5. Za těchto podmínek je dopamin přítomen v roztoku jako kation a DOPAC je ve formě aniontu. Byla testována interakce zkoumaných iontů s fosfolipidy a také vliv modifikace elektrody na citlivost odezvy analytů.

Cyklickou voltametrií byla zaznamenána nižší proudová odezva dopaminu i 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny na modifikované elektrodě oproti čisté GCE. Vzhledem k tomu, že se dopamin silně akumuloval ve fosfolipidové membráně, vykazovaly kalibrační závislosti vyšší hodnotu směrnice, a tedy vyšší citlivost na modifikované elektrodě, což by mohlo být využito k analytickým účelům. Nicméně modifikace uhlíkové elektrody fosfolipidy má řadu nevýhod a omezení. Proces přípravy fosfolipidové dvojvrstvy na elektrodovém povrchu je poměrně zdoluhavý a nikdy nelze připravit úplně stejné membrány s definovanými vlastnostmi, každá nová fosfolipidová membrána je svým způsobem jedinečná. Pro každé měření je potřeba připravit novou fosfolipidovou dvojvrstvu, čemuž předchází poměrně dlouhý proces čištění elektrody od fosfolipidů. A další nevýhodou je omezená stabilita membrány, která se pohybuje v řádu několika hodin, přičemž je nutné membránu uchovávat v roztoku.

Interakce fosfolipidů s analyty byla studována také metodou elektrochemické impedanční spektroskopie. Byla sledována změna kapacity a rezistance fosfolipidové dvojvrstvy v důsledku interakce s analyty. Dopamin způsobil nárůst kapacity fosfolipidové membrány v čase, což může souviset s jeho inkorporací do povrchové části vrstvy a se snížením tloušťky membrány. Obdobný trend byl zjištěn i pro DOPAC. K nárůstu kapacity pravděpodobně došlo v důsledku vzniku těsnějšího uspořádání fosfolipidové membrány kvůli interakci s analyty. Obě látky – dopamin i DOPAC – mohly podpořit zkompaktnění fosfolipidové dvojvrstvy. U dopaminu toto tvrzení potvrzuje fakt, že rezistance s časem rostla – zvyšoval se odpor proti přenosu náboje mezi roztokem a elektrodovým povrchem. Pro kyselinu 3,4-dihydroxyfenyloctovou byl trend poněkud odlišný: v závislosti na její

koncentraci rezistance nejprve s časem klesala a pak vzrostla. Rozdílné chování je pravděpodobně způsobeno opačnými náboji částic analytů v použitém prostředí.

Pro dopamin byly dále provedeny experimenty se speciálně zkonstruovanou elektrochemickou celou, která umožnila vložit mezi dvě nádoby celý polykarbonátový membránový filtr a oddělit tak dva prostory s různými roztoky. Pro měření s celou bylo aplikováno EIS měření ve čtyřelektrodovém zapojení, pomocí kterého byla sledována změna kapacity a rezistance polykarbonátového filtru. Dále byla využita metoda square wave voltametrie pro sledování difúze dopaminu přes čistý PC filtr a přes PC filtr pokrytý vrstvou fosfolipidů. Na základě výsledků těchto experimentů se dá předpokládat, že dopamin fosfolipidovou membránou neprochází, ale zabudovává se do ní. Koncentrace dopaminu v prostoru s roztokem dopaminu s časem klesala, ale ve druhé nádobce s čistým elektrolytem koncentrace dopaminu nenarůstala, jak by se dalo očekávat.

Experimenty se speciální celou byly prvotní studií, která měla prokázat principiální funkčnost systému. Pro další měření s celou bude zcela nezbytná důkladná optimalizace zahrnující volbu materiálu a prostorového uspořádání elektrod, zajištění konstantní plochy všech elektrod, volbu koncentrace základního elektrolytu, vzdálenost elektrod od PC filtru a mnoho dalších parametrů. Experimenty s elektrochemickou celou umožňující oddělit dva roztoky PC filtrem pokrytým fosfolipidy a sledovat tak difúzi látek skrze modelovou fosfolipidovou membránu jsou zajímavým výhledem do budoucna. Jak bylo zmíněno, měření s celou popisované v této diplomové práci bylo pouze pilotním experimentem a získané výsledky jsou na úrovni hypotéz. Pro jejich potvrzení by bylo nutné důkladně optimalizovat měření s celou, což by umožnilo mimo jiné lépe interpretovat data získaná měřením elektrochemickou impedanční spektroskopií.

## Použité zdroje

- [1] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Základy buněčné biologie*, 2. ed., Espero Publishing, Ústí nad Labem, 1998.
- [2] K. Nováková, Modelové biologické membrány: jejich charakterizace a využití, *Chemické listy*, 109 (2015) 166-175.
- [3] H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C.A. Kaiser, M. Krieger, M.P. Scott, L. Zipursky, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 5. ed., Freeman and Company, New York, 2004.
- [4] H.-H. Schen, T. Lithgow, L.L. Martin, Reconstitution of Membrane Proteins into Model Membranes: Seeking Better Ways to Retain Protein Activities, *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (2013) 1589-1607.
- [5] Q.T. Liu, B.J. Boyd, Liposomes in biosensors, *Analyst*, 138 (2013) 391-409.
- [6] L.K. Tamm, Z. Shao, *Biomembrane Structures*, IOS Press, Amsterdam, 1998.
- [7] E.I. Goksu, J.M. Vanegas, C.D. Blanchette, W.-C. Lin, M.L. Longo, AFM for structure and dynamics of biomembranes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788 (2009) 254-266.
- [8] J. Stümpel, H. Eibl, A. Nicksch, X-ray analysis and calorimetry on phosphatidylcholine model membranes. The influence of length and position of acyl chains upon structure and phase behaviour, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 727 (1983) 246-254.
- [9] J. Frenzel, K. Arnold, P. Nuhn, Calorimetric,  $^{13}\text{C}$  NMR, and  $^{31}\text{P}$  NMR studies on the interaction of some phenothiazine derivatives with dipalmitoyl phosphatidylcholine model membranes, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 507 (1978) 185-197.
- [10] W. Curatolo, B. Sears, L.J. Neuringer, A calorimetry and deuterium NMR study of mixed model membranes of 1-palmitoyl-2-oleylphosphatidylcholine and saturated phosphatidylcholines, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 817 (1985) 261-270.
- [11] T. Navrátil, I. Šestáková, K. Štulík, V. Mareček, Electrochemical Measurements on Supported Phospholipid Bilayers: Preparation, Properties and Ion Transport Using Incorporated Ionophores, *Electroanalysis*, 22 (2010) 2043-2050.
- [12] G. Valincius, T. Meškauskas, F. Ivanauskas, Electrochemical Impedance Spectroscopy of Tethered Bilayer Membranes, *Langmuir*, 28 (2012) 977-990.
- [13] M. Tatkovič, G. Broncová, M. Krondřák, Elektroimpedanční spektroskopie a její využití v chemické analýze, *Chemické listy*, 106 (2012) 1067-1074.
- [14] P. Mueller, W.C. Wescott, D.O. Rudin, H.T. Tien, Methods for Formation of Single Bimolecular Lipid Membranes in Aqueous Solution, *Journal of Physical Chemistry*, 67 (1963) 534-535.
- [15] I. Langmuir, K. Blodgett, Über einige neue Methoden zur Untersuchung von monomolekularen Filmen, *Kolloid-Zeitschrift*, 73 (1935) 257-263.



- [16] A. Brian, H. McConnell, Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81 (1984) 6159-6163.
- [17] K. Furukawa, H. Hibino, Self-spreading of Supported Lipid Bilayer on SiO<sub>2</sub> Surface Bearing Graphene Oxide, *Chemistry Letters*, 41 (2012) 1259-1261.
- [18] C.W. Hollars, R.C. Dunn, Submicron structure in L- $\alpha$ -dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers and bilayers probed with confocal, atomic force, and near-field microscopy, *Biophysical Journal*, 75 (1998) 342-353.
- [19] H. Lang, C. Duschl, H. Vogel, A New Class of Thiolipids for the Attachment of Lipid Bilayers on Gold surfaces, *Langmuir*, 10 (1994) 197-210.
- [20] G. Valincius, F. Heinrich, R. Budvytyte, D.J. Vanderah, D.J. McGillivray, Y. Sokolov, J.E. Hall, M. Losche, Soluble Amyloid  $\beta$ -Oligomers Affect Dielectric Membrane Properties by Bilayer Insertion and Domain Formation: Implications for Cell Toxicity, *Biophysical Journal*, 95 (2008) 4845-4861.
- [21] A. Junghans, C. Champagne, P. Cayot, C. Loupiac, I. Koper, Probing Protein-Membrane Interactions Using Solid Supported Membranes, *Langmuir*, 27 (2011) 2709-2716.
- [22] L. Becucci, S. Martinuzzi, E. Monetti, R. Mercatelli, F. Quercioli, D. Battistel, R. Guidelli, Electrochemical impedance spectroscopy and fluorescence lifetime imaging of lipid mixtures self-assembled on mercury, *Soft Matter*, 6 (2010) 2733-2741.
- [23] D. Walz, E. Bamberg, P. Lauger, Nonlinear Electrical Effects in Lipid Bilayer Membranes I. Ion Injection, *Biophysical Journal*, 9 (1969) 1150-1159.
- [24] S.A. Weiss, R.J. Bushby, S.D. Evans, P.J.F. Henderson, L.J.C. Jeuken, Characterization of cytochrome b<sub>5</sub> activity in a native-like surface-tethered membrane, *Biochemical Journal*, 417 (2009) 555-560.
- [25] C. Danelon, S. Terrettaz, O. Guenat, M. Koudelka, H. Vogel, Probing the function of ionotropic and G protein-coupled receptors in surface-confined membranes, *Methods*, 46 (2008) 104-115.
- [26] H. Song, E.K. Sinner, W. Knoll, Peptid-tethered bilayer lipid membranes and their interaction with Amyloid  $\beta$ -peptide, *Biointerphases*, 2 (2007) 151-158.
- [27] M. Megová, L. Müller, P. Barták, Spontaneous Revesiculation - New Method for the Preparation of Liposomes, *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, Facultas Rerum Naturalium, Chemica*, 47 (2007) 1-4.
- [28] J. Koolman, K.-H. Röhm, *Barevný atlas biochemie*, 4. ed., Grada Publishing, Praha, 2012.
- [29] C. Missale, S.R. Nash, S.W. Robinson, M. Jaber, M.G. Caron, Dopamine Receptors: From Structure to Function, *Physiological Reviews*, 78 (1998) 189-225.
- [30] P. Naik, *Biochemistry*, 4. ed., Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, 2016.
- [31] T. Kuwana, *Analytical Electrochemistry: A Laboratory Manual*. 4. The Cyclic Voltammetry of Dopamine: an *ec* mechanism, *The Analytical Sciences Digital Library*

(ASDL), [http://www.asdlib.org/onlineArticles/elabware/kuwanaEC\\_lab/PDF-22-Experiment24.pdf](http://www.asdlib.org/onlineArticles/elabware/kuwanaEC_lab/PDF-22-Experiment24.pdf) (staženo 24. 1. 2017).

[32] D. Yuan, X. Yuan, S. Zhou, W. Zou, T. Zhou, *N*-Doped carbon nanorods as ultrasensitive electrochemical sensors for the determination of dopamine, *RSC Advances*, 2 (2012) 8157-8163.

[33] D.P. Nikolelis, G. Theoharis, Biosensor for dopamine based on stabilized lipid films with incorporated resorcin[4]arene receptor, *Bioelectrochemistry*, 59 (2003) 107-112.

[34] D.P. Nikolelis, S.-S.E. Petropoulou, Investigation of interactions of a resorcin[4]arene receptor with bilayer lipid membranes (BLMs) for the electrochemical biosensing of mixtures of dopamine and ephedrine, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1558 (2002) 238-245.

[35] Y. Matam, B.D. Ray, H.I. Petrache, Direct affinity of dopamine to lipid membranes investigated by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, *Neuroscience Letters*, 618 (2016) 104-109.

[36] K. Jodko-Piorecka, G. Litwinienko, First Experimental Evidence of Dopamine Interactions with Negatively Charged Model Biomembranes, *ACS Chemical Neuroscience*, 4 (2013) 1114-1122.

[37] P.A. Postila, I. Vattulainen, T. Róg, Selective effect of cell membrane on synaptic neurotransmission, *Scientific Reports*, 6 (2016) 1-10.

[38] K. Berka, Interakce nízkomolekulárních látek s membránami, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální chemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 2015.

[39] D.S. Goldstein, G. Eisenhofer, I.J. Kopin, Sources and Significance of Plasma Levels of Catechols and Their Metabolites in Humans, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305 (2003) 800-811.

[40] E. Eldrup, P. Mogensen, J. Jacobsen, H. Pakkenberg, N. Christensen, CSF and plasma concentrations of free norepinephrine, dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), and epinephrine in Parkinson's disease, *Acta neurologica Scandinavica*, 92 (1995) 116-121.

[41] D.S. Goldstein, K.J. Swoboda, J.M. Miles, S.W. Coppack, A. Aneman, C. Holmes, I. Lamensdorf, G. Eisenhofer, Sources and Physiological Significance of Plasma Dopamine Sulfate, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84 (1999) 2523-2531.

[42] G.E. De Benedetto, D. Fico, A. Pennetta, C. Malitesta, G. Nicolardi, D.D. Lofrumento, F. De Nuccio, V. La Pesa, A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 98 (2014) 266-270.

[43] J. Cummings, L. Matheson, J. Smyth, Method for the determination of  $\gamma$ -L-glutamyl-L-dihydroxyphenylalanine and its major metabolites L-dihydroxyphenylalanine, dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of chromatography*, 528 (1990) 45-53.

- [44] S. Wu, S.J. Jia, X. Dong, Study on detection methods for 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in biological samples, *International journal of current research in chemistry and pharmaceutical sciences*, 3 (2016) 26-29.
- [45] P. Kalimuthu, S.A. John, Selective determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in the presence of ascorbic and uric acids using polymer film modified electrode, *Journal of Chemical Sciences*, 123 (2011) 349-355.
- [46] S. Michalkiewicz, A. Skorupa, Anodic oxidation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid on carbon electrodes in acetic acid solutions, *Bioelectrochemistry*, 79 (2010) 57-65.
- [47] H.R. Zare, M. Namazian, M.L. Coote, Experimental and theoretical studies of electrochemical characteristics of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), *Electrochimica Acta*, 54 (2009) 5353-5357.
- [48] J. Barek, F. Opekar, K. Štulík, *Elektroanalytická chemie*, Nakladatelství Karolinum, Praha, 2005.
- [49] J. Wang, *Analytical electrochemistry*, 2. ed., John Wiley & Sons, New York, 2001.
- [50] H. Švecová, J. Součková, M. Pyszková, J. Svítková, J. Labuda, J. Skopalová, P. Barták, Phospholipids improve selectivity and sensitivity of carbon electrodes: Determination of pesticide Paraquat, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116 (2014) 1247-1255.
- [51] K. Nováková, *Studium transportu látek významných v životním prostředí přes biologické membrány a vývoj metod pro jejich stanovení*, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Pardubice, 2015.
- [52] J. Armstrong, R.B. Barlow, The Ionization of Phenolic Amines, Including Apomorphine, Dopamine and Catecholamines and an Assessment of Zwitterion Constants, *British Journal of Pharmacology*, 57 (1976) 501-516.
- [53] M.I. Volkova-Gugeshashvili, A.G. Volkov, V.S. Markin, Adsorption at liquid interfaces: The generalized Frumkin isotherm and interfacial structure, *Russian Journal of Electrochemistry*, 42 (2006) 1194-1200.
- [54] Chemical Book, 2016, [http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB7358779\\_EN.htm](http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB7358779_EN.htm) (staženo 19. 4. 2017).