

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Testování dlouhodobé stability tištěných senzorů při elektrochemické detekci
markerů oxidačního poškození DNA

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Svitáková**
Osobní číslo: **C21438**
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Testování dlouhodobé stability tištěných senzorů při elektrochemické detekci markerů oxidačního poškození DNA**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Z odborných publikací zpracujte literární rešerši na téma elektrochemické detekce vybraných markerů oxidačního poškození DNA (kyselina močová, xanthin, oxoguanin a další). Zaměřte na elektrochemické chování jednotlivých látek na různých elektrodových materiálech.
2. V rámci praktické části nalezněte optimální pracovní podmínky pro jejich elektrochemickou detekci zahrnující výběr elektrody, pH základního elektrolytu a parametry voltametrické techniky.
3. Při optimálních podmínkách testujte dlouhodobou stabilitu a opakovatelnost elektrochemické odezvy těchto látek na tištěných senzorech s pracovními elektrodami z grafitu modifikovaného uhlíkovými nanotrubičkami a borem dopovaného diamantu. Výsledky porovnejte s klasickou elektrodou ze skelného uhlíku a diskutujte případné rozdíly a nutnost experimentálních zásahů při dlouhodobých měřeních.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Radovan Metelka, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Sylwia Smarzewska, PhD.**
Department of Inorganic and Analytical Chemistry,
University of Lodz, Poland

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Testování dlouhodobé stability tištěných senzorů při elektrochemické detekci markerů oxidačního poškození DNA jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 25.05.2023

Bc. Martina Svitáková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Ing. Radovanu Metelkovi, Ph.D. za jeho cenné rady, čas a trpělivost při jejím zpracování. Mé poděkování také patří mým blízkým za předání rad z dob, kdy sami psali své diplomové práce a mé rodině za podporu během celého studia.

ANOTACE

V rámci této diplomové práce byly pomocí diferenční pulzní voltametrie a square wave voltametrie detekovány látky, které mohou indikovat poškození DNA (kyselina močová, guanin a adenin), na dvou typech tištěných senzorů – tištěné uhlíkové elektrodě modifikované uhlíkovými nanotrubičkami s karboxy funkčními skupinami a borem dopované diamantové elektrodě. Pro srovnání byla provedena i měření na klasické elektrodě ze skelného uhlíku. Nejprve bylo vybráno prostředí, ve kterém byly látky měřeny, poté byly optimalizovány parametry detekce jednotlivých voltametrických metod a na závěr byla testována dlouhodobá stabilita tištěných senzorů v modelové směsi a ve vzorku moči potkana po ozáření.

KLÍČOVÁ SLOVA

poškození DNA, kyselina močová, guanin, adenin, pasivace elektrod, tištěné elektrody

TITLE

Testing of long-term stability of printed sensors in electrochemical detection of markers of DNA oxidative damage

ANNOTATION

As part of this thesis, substances that can indicate DNA damage (uric acid, guanine, and adenine) were detected using differential pulse voltammetry and square wave voltammetry on two types of printed sensors – screen-printed carbon electrode modified with carboxy-functionalized multiwalled carbon nanotubes and boron-doped diamond electrode. For comparison, measurements were also performed on a glassy carbon electrode. First, the environment in which the substances were measured was selected, then the detection parameters of the individual methods were optimized, and finally, the long-term stability of the printed sensors in model sample and in a rat urine sample after irradiation were tested.

KEYWORDS

DNA damage, uric acid, guanine, adenine, electrode passivation, printed sensors

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	17
ÚVOD.....	19
1. TEORETICKÁ ČÁST	20
1.1. Poškození DNA.....	20
1.1.1. Endogenní faktory.....	20
1.1.2. Exogenní faktory.....	24
1.2. Elektrochemická detekce vybraných markerů oxidačního poškození DNA	27
1.2.1. Detekce kyseliny močové a xanthinu.....	28
1.2.2. Detekce směsi adeninu a guaninu	32
1.2.3. Detekce směsi guaninu a xanthinu.....	39
1.2.4. Detekce více látek ve směsi	40
1.3. Pasivace elektrod.....	43
1.3.1. Důsledky pasivace elektrod	43
1.3.2. Možnosti eliminace pasivace elektrod	44
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	47
2.1. Použité chemikálie	47
2.2. Použitá zařízení	47
2.3. Příprava standardů a základních elektrolytů	48
2.3.1. Příprava zásobních roztoků markerů oxidačního poškození DNA.....	48
2.3.2. Příprava pufrů	48
2.3.3. Příprava měřicích roztoků	49
2.3.4. Voltametrické techniky	49
3. Výsledky a diskuze	49
3.1. Elektrochemická oxidace vybraných metabolitů oxidačního poškození DNA na SPCE	50
3.1.1. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci kyseliny močové	50

3.1.2. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci xanthinu	51
3.1.3. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci směsi adeninu a guaninu	52
3.2. Elektrochemická oxidace vybraných metabolitů oxidačního poškození DNA na BDDE	54
3.2.1. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci kyseliny močové	54
3.2.2. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci xanthinu	55
3.2.3. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci směsi kyseliny močové a xanthinu	56
3.2.4. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci směsi guaninu a adeninu	58
3.3. Elektrochemická oxidace vybraných metabolitů oxidačního poškození DNA na GCE... ..	59
3.3.1. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci kyseliny močové	60
3.3.2. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci xanthinu	61
3.3.3. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci směsi kyseliny močové a xanthinu	61
3.3.4. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci směsi guaninu a adeninu	63
3.4. Srovnání výsledků SPCE, BDDE a GCE.....	64
3.5. Vliv složení základního elektrolytu na elektrochemickou oxidaci metabolitů	65
3.5.1. Přídavek chloridů do Brittonova-Robinsonova pufru	65
3.5.2. Octanový pufr jako základní elektrolyt.....	71
3.6. Optimalizace parametrů simultánní elektrochemické detekce kyseliny močové, guaninu a adeninu	75
3.6.1. DPV.....	75
3.6.2. SWV.....	76
3.7. Analytické parametry elektrochemické detekce směsi kyseliny močové, guaninu a adeninu.....	78
3.7.1. SPCE	78
3.7.2. BDDE.....	82
3.7.3. GCE.....	85

3.8. Dlouhodobá stabilita elektrod při měření směsi kyseliny močové, guaninu a adeninu	88
3.8.1. Menší koncentrace kyseliny močové, guaninu a adeninu.....	88
3.8.2. Větší koncentrace kyseliny močové, guaninu a adeninu	91
3.8.3. Opakovaná měření směsi kyseliny močové, guaninu a adeninu v delším časovém úseku	93
3.9. Stabilita elektrod při opakovaném měření vzorků moči potkana	95
3.9.1. Negativní kontrola 1.....	95
3.9.2. Negativní kontrola 2.....	96
3.9.3. Vzorek po ozáření	98
ZÁVĚR	99
POUŽITÁ LITERATURA.....	100

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Báze DNA.	21
Obrázek 2: Oxidované báze DNA.	21
Obrázek 3: Tvorba ROS.	21
Obrázek 4: Schéma reakce thyminu s hydroxylovým radikálem.	22
Obrázek 5: Schéma methylační reakce	23
Obrázek 6: Methylované báze DNA.....	23
Obrázek 7: Deaminované báze DNA.....	24
Obrázek 8: Oxidace guaninu.....	24
Obrázek 9: Fotosenzibilace s využitím riboflavinu.	25
Obrázek 10: Cyklická voltametrie UA s různě modifikovanými SPCE, PBS, pH 2 (vlevo). Amperometrická křivka pro přídavky UA na SPCE/GCN v 0,2 M PBS o pH 7,2 (vpravo)....	28
Obrázek 11: Square wave voltametrie UA a X na GNP/rGO-CNT/GCE.	29
Obrázek 12: Cyklická voltametrie UA a X na poly L-cys/AuNPs/N,B-RGO/GCE, PBS o pH 7	29
Obrázek 13: (A) DPV kyseliny močové, xanthinu a kofeinu na MWCNT-AuNP-CCE v 0,1 M PBS (pH 6) a (B) příslušné kalibrační závislosti.	31
Obrázek 14: Elektrochemická detekce G a A na Cu-Ni@N,B-rGO/GCE pomocí DPV	33
Obrázek 15: (A) SWV odezvy oxidace guaninu a adeninu v různých koncentracích a odpovídající kalibrační křivky pro (B) G a (C) A na Au ₅₀ Pt ₅₀ NCs-rGO/GCE	33
Obrázek 16: (a) Lineární voltametrie G a A na Fe ₃ O ₄ NPs/MWCNT/GCE v PBS, pH 7 a (b) kalibrační křivky obou látek.	34
Obrázek 17: SWV 0,2 μmol·l ⁻¹ G, A a T na (A) GCE, (B) poly(L-arg)/GCE, (C) ERGO/GCE a (D) poly(L-arg)-ERGO/GCE v 0,1 M NaOH.	34
Obrázek 18: DPV pro A, G a T v PBS, pH 7,4, (A) MWCNTs-PNF/GCE a (B) MWCNTs/GCE.	35
Obrázek 19: DPV pro simultánní stanovení adeninu a guaninu (0,08–200 μmol·l ⁻¹)	36
Obrázek 20: CV (A) a DPV (B) G a A na MoS ₂ -PGE (a) a PGE (b) v PBS, pH 7,4.....	36
Obrázek 21: DPV denaturovaného rybího spermatu, BRB pH 6 na BDDE spolu s kalibrací G a A.....	37
Obrázek 22: Lineární voltametrie A (vlevo) a G (vpravo) spolu s kalibračními závislostmi, NaOH s 0,4 mg·l ⁻¹ Cu(II).....	38

Obrázek 23: (A) CV pro roztoky purinů při různých poměrech X a G. CV skeny pro různé koncentrace X (B) a G (C) spolu s kalibračními závislostmi.	39
Obrázek 24: DPV G, A, T a C na nano-ZSM-5/MIM–GCE spolu s příslušnými kalibracemi (vlevo). DPV analýza vzorku telecího brzlíku v PBS, pH 7,4 (vpravo).	40
Obrázek 25: DPV směsi AA, EP, UA NO ₂ ⁻ a XA v PBS, pH 2, (a) GCE/CH, (b) GCE/G-CH, (c) GCE/BB-CH, (d) GCE/GP-CH a (e) GCE/MWCNTs/CH.....	41
Obrázek 26: Simultánní detekce AA, DA, UA, G a A pomocí DPV na Plmox-GO/GCE, PBS pH 3.....	42
Obrázek 27: Elektrochemická odezva směsi 5 μmol·l ⁻¹ UA, 10 μmol·l ⁻¹ G, 10 μmol·l ⁻¹ X, 20 μmol·l ⁻¹ A a 20 μmol·l ⁻¹ HX na (a) SPCE, (b) SPCE*, (c) MWCNTs/SPCE*, (d) GOQDs/SPCE* a (e) GOQDs/MWCNTs/SPCE*	42
Obrázek 28: SPCE (nahore), BDDE (dole)	48
Obrázek 29: Závislost výšky píku (vlevo) a potenciálu maxima píku (vpravo) UA na pH na jedné SPCE (modrá) a s novou SPCE při každém měření (zelená). DPV, BRB.....	50
Obrázek 30: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci UA na jedné SPCE (vlevo) a s novou SPCE při každém měření (vpravo). DPV, BRB, pH 2 (červená), pH 3 (oranžová), pH 4 (žlutá), pH 5 (zelená), pH 6 (modrá), pH 7 (fialová) a pH 8 (černá).....	51
Obrázek 31: Závislost výšky píku (vlevo) a potenciálu maxima píku (vpravo) X na pH na jedné SPCE (modrá) a s novou SPCE při každém měření (zelená). DPV, BRB.....	52
Obrázek 32: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci X na jedné SPCE (vlevo) a s novou SPCE při každém měření (vpravo). DPV, BRB, pH 2 (červená), pH 3 (oranžová), pH 4 (žlutá), pH 5 (zelená), pH 6 (azurová), pH 7 (modrá), pH 8 (fialová), pH 9 (černá), pH 10 (šedá), pH 11 (růžová).....	52
Obrázek 33: Závislost výšky píku G (vlevo) a A (vpravo) na pH na SPCE. DPV, BRB.....	53
Obrázek 34: Závislost potenciálu maxima píku G (vlevo) a A (vpravo) na pH na SPCE. DPV, BRB.	53
Obrázek 35: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci G (první pík) a A (druhý pík) na SPCE. DPV, BRB, pH 3 (červená), pH 6 (zelená), pH 10 (modrá).....	54
Obrázek 36: Závislost výšky (vlevo) a potenciálu maxima (vpravo) píku UA na pH na BDDE. DPV, BRB.	55
Obrázek 37: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci UA na BDDE. DPV, BRB, pH 2 (červená), pH 3 (zelená), pH 4 (modrá), pH 5 (černá).....	55
Obrázek 38: Závislost výšky (vlevo) a potenciálu maxima (vpravo) píku X na pH na BDDE, DPV, BRB	56

Obrázek 39: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci X na BDDE. DPV, BRB, pH 6 (červená), pH 7 (zelená), pH 8 (modrá).....	56
Obrázek 40: Závislost výšky píku UA (vlevo) a X (vpravo) na pH na BDDE. DPV, BRB.	57
Obrázek 41: Závislost potenciálu maxima píku UA (vlevo) a X (vpravo) na pH na BDDE. DPV, BRB.	57
Obrázek 42: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci UA (první pík) a X (druhý pík) na BDDE. DPV, BRB, pH 2 (červená), pH 3 (oranžová), pH 4 (žlutá), pH 5 (zelená), pH 6 (modrá).	58
Obrázek 43: Závislost výšky píku G (vlevo) a A (vpravo) na pH na BDDE. DPV, BRB.	58
Obrázek 44: Závislost potenciálu maxima píku G (vlevo) a A (vpravo) na pH na BDDE. DPV, BRB.	59
Obrázek 45: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci G (první pík) a A (druhý pík) na BDDE. DPV, BRB, pH 2 (červená), pH 3 (oranžová), pH 4 (žlutá), pH 5 (zelená), pH 6 (modrá).	59
Obrázek 46: Závislost výšky (vlevo) a potenciálu maxima (vpravo) píku UA na pH na GCE. DPV, BRB.	60
Obrázek 47: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci UA na GCE (vlevo): pH 2 (červená), pH 3 (oranžová), pH 4 (žlutá), pH 5 (zelená), pH 6 (azurová), pH 7 (modrá), pH 8 (fialová), pH 9 (černá), pH 10 (šedá). Vliv leštění GCE na výšku píku UA při pH 5 (vpravo): 1. měření (červená), 2. měření (oranžová), 3. měření (žlutá), 4. měření (zelená), 5. měření (modrá), 6. měření (fialová). DPV, BRB.....	60
Obrázek 48: Závislost výšky (vlevo) a potenciálu maxima (vpravo) píku X na pH na GCE, DPV, BRB.	61
Obrázek 49: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci X na GCE (vlevo): pH 2 (červená), pH 3 (oranžová), pH 4 (žlutá), pH 5 (zelená), pH 6 (modrá), pH 7 (fialová), pH 8 (černá), pH 9 (šedá). Vliv leštění GCE na výšku píku X při pH 5 (vpravo): 1. měření (červená), 2. měření (oranžová), 3. měření (žlutá), 4. měření (zelená), 5. měření (modrá), 6. měření (fialová). DPV, BRB.	61
Obrázek 50: Závislost výšky píku UA (vlevo) a X (vpravo) na pH na GCE. DPV, BRB.	62
Obrázek 51: Závislost potenciálu maxima píku UA (vlevo) a X (vpravo) na pH na GCE. DPV, BRB.	62
Obrázek 52: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci směsi UA a X na GCE. DPV, BRB, pH 2 (červená), pH 3 (oranžová), pH 4 (žlutá), pH 5 (zelená), pH 6 (modrá).	63
Obrázek 53: Závislost výšky píku G (vlevo) a A (vpravo) na pH na GCE. DPV, BRB.	63
Obrázek 54: Závislost potenciálu maxima píku G (vlevo) a A (vpravo) na pH na GCE. DPV, BRB.	64

Obrázek 55: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci směsi G a A na GCE. DPV, BRB, pH 2 (červená), pH 3 (zelená), pH 4 (modrá), pH 5 (černá).....	64
Obrázek 56: Posuny maxim píků opakovaných měření G bez chloridů (vlevo) a s chloridy (vpravo) na SPCE. DPV, BRB.	66
Obrázek 57: Posuny maxim píků opakovaných měření A bez chloridů (vlevo) a s chloridy (vpravo) na SPCE. DPV, BRB.	66
Obrázek 58: Vliv přidavku chloridů na posun píků G (první pík) a A (druhý pík) na SPCE. DPV, BRB, pH 4, bez chloridů (modrá), s chloridy (červená).....	66
Obrázek 59: Posuny maxim píků opakovaných měření G bez chloridů (vlevo) a s chloridy (vpravo) na BDDE. DPV, BRB.	67
Obrázek 60: Posuny maxim píků opakovaných měření A bez chloridů (vlevo) a s chloridy (vpravo) na BDDE. DPV, BRB.	67
Obrázek 61: Vliv přidavku chloridů na posun píků G (první pík) a A (druhý pík) na BDDE. DPV, BRB, pH 4, bez chloridů (modrá), s chloridy (červená).....	68
Obrázek 62: Závislost výšky píku UA (vlevo nahoře), G (vpravo nahoře) a A (dole) na pH na SPCE bez chloridů (modrá) a s chloridy (červená). DPV, BRB.	69
Obrázek 63: Vliv přidavku chloridů na signál UA (první pík), G (druhý pík) a A (třetí pík) na SPCE. DPV, BRB, pH 5, bez chloridů (modrá) a s chloridy (červená).	69
Obrázek 64: Závislost výšky píku UA (vlevo nahoře), G (vpravo nahoře) a A (dole) na pH na BDDE bez chloridů (modrá) a s chloridy (červená). DPV, BRB.	70
Obrázek 65: Vliv přidavku chloridů na UA (první pík), G (druhý pík) a A (třetí pík) na BDDE. DPV, BRB, pH 5, bez chloridů (modrá) a s chloridy (červená).	71
Obrázek 66: Vliv složení pufru na výšku píku UA na SPCE bez chloridů (vlevo, modrá) a s chloridy (vpravo, červená). DPV, BRB pH 4, 5 a 6, AP pH 4,7 a 5,5.	71
Obrázek 67: Vliv složení pufru na výšku píku UA na BDDE bez chloridů (vlevo, modrá) a s chloridy (vpravo, červená). DPV, BRB pH 4, 5 a 6, AP pH 4,7 a 5,5.	72
Obrázek 68: Vliv složení pufru na výšku píku G na SPCE bez chloridů (vlevo, modrá) a s chloridy (vpravo, červená). DPV, BRB pH 4, 5 a 6, AP pH 4,7 a 5,5.	72
Obrázek 69: Vliv složení pufru na výšku píku G na BDDE bez chloridů (vlevo, modrá) a s chloridy (vpravo, červená). DPV, BRB pH 4, 5 a 6, AP pH 4,7 a 5,5.	73
Obrázek 70: Vliv složení pufru na výšku píku A na SPCE bez chloridů (vlevo, modrá) a s chloridy (vpravo, červená). DPV, BRB pH 4, 5 a 6, AP pH 4,7 a 5,5.	73
Obrázek 71: Vliv složení pufru na výšku píku A na BDDE bez chloridů (vlevo, modrá) a s chloridy (vpravo, červená). DPV, BRB pH 4, 5 a 6, AP pH 4,7 a 5,5.	74

Obrázek 72: Vliv přidavku chloridů na UA (první pík), G (druhý pík) a A (třetí pík) na SPCE. DPV, AP, pH 4,7, bez chloridů (modrá) a s chloridy (červená).	74
Obrázek 73: Vliv přidavku chloridů na UA (první pík), G (druhý pík) a A (třetí pík) na BDDE. DPV, AP, pH 4,7, bez chloridů (modrá) a s chloridy (červená).	75
Obrázek 74: Optimalizace parametrů DPV, zvolená amplituda 50 mV a čas pulzu 25 ms (červená), AP, pH 4,7.	76
Obrázek 75: Optimalizace DPV, závislost intenzity signálů na amplitudě (vlevo) a čase pulzu (vpravo), UA (modrá), G (zelená), A (červená), AP pH 4,7.	76
Obrázek 76: Optimalizace parametrů SWV, zvolená amplituda 75 mV a čas pulzu 25 Hz (červená), AP pH 4,7.	77
Obrázek 77: Optimalizace SWV, závislost intenzity signálů na frekvenci (vlevo) a na amplitudě (vpravo) pro UA (modrá), G (zelená), A (červená), AP pH 4,7.	77
Obrázek 78: Kalibrace směsi UA, G a A na jedné SPCE (vlevo) a vždy s novou SPCE pro každé měření (vpravo). DPV, AP pH 4,7.	78
Obrázek 79: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku UA na její koncentraci na jedné SPCE (vlevo) a s novými SPCE pro každé měření (vpravo). DPV, AP pH 4,7.	79
Obrázek 80: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku G na jeho koncentraci na jedné SPCE (vlevo) a s novými SPCE pro každé měření (vpravo). DPV, AP pH 4,7.	79
Obrázek 81: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku A na jeho koncentraci na jedné SPCE (vlevo) a s novými SPCE pro každé měření (vpravo). DPV, AP pH 4,7.	80
Obrázek 82: Kalibrace směsi UA, G a A na jedné SPCE (vlevo) a s novými SPCE pro každé měření (vpravo). SWV, AP pH 4,7.	80
Obrázek 83: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku UA na její koncentraci na jedné SPCE (vlevo) a s novými SPCE pro každé měření (vpravo). SWV, AP pH 4,7.	81
Obrázek 84: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku G na jeho koncentraci na jedné SPCE (vlevo) a s novými SPCE pro každé měření (vpravo). SWV, AP pH 4,7.	81
Obrázek 85: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku A na jeho koncentraci na jedné SPCE (vlevo) a s novými SPCE pro každé měření (vpravo). SWV, AP pH 4,7.	82
Obrázek 86: Kalibrace směsi UA, G a A na BDDE. DPV, AP pH 4,7.	82
Obrázek 87: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku UA na její koncentraci na BDDE. DPV, AP pH 4,7.	83
Obrázek 88: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku G na jeho koncentraci na BDDE. DPV, AP pH 4,7.	83
Obrázek 89: Kalibrace směsi UA, G a A na BDDE. SWV, AP pH 4,7.	84

Obrázek 90: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku UA na její koncentraci na BDDE. SWV, AP pH 4,7.....	84
Obrázek 91: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku G na jeho koncentraci na BDDE. SWV, AP pH 4,7.....	85
Obrázek 92: Kalibrace bez leštění (vlevo) a s leštěním GCE (vpravo). DPV, AP pH 4,7.	85
Obrázek 93: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku UA na její koncentraci bez leštění GCE (vlevo) a s leštěním GCE (vpravo). DPV, AP pH 4,7.....	86
Obrázek 94: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku G na jeho koncentraci bez leštění GCE (vlevo) a s leštěním GCE (vpravo). DPV, AP pH 4,7.....	86
Obrázek 95: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku A na jeho koncentraci bez leštění GCE (vlevo) a s leštěním GCE (vpravo). DPV, AP pH 4,7.....	86
Obrázek 96: Kalibrace bez leštění (vlevo) a s leštěním GCE (vpravo). SWV, AP pH 4,7.	87
Obrázek 97: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku UA na její koncentraci bez leštění GCE (vlevo) a s leštěním GCE (vpravo). SWV, AP pH 4,7.....	88
Obrázek 98: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku G na jeho koncentraci bez leštění GCE (vlevo) a s leštěním GCE (vpravo). SWV, AP pH 4,7.....	88
Obrázek 99: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku A na jeho koncentraci bez leštění GCE (vlevo) a s leštěním GCE (vpravo). SWV, AP pH 4,7.....	88
Obrázek 100: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na SPCE při koncentraci látek $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.	89
Obrázek 101: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na BDDE při koncentraci látek $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.	90
Obrázek 102: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na GCE při koncentraci látek $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.	90
Obrázek 103: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na SPCE při koncentraci látek $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.	91
Obrázek 104: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na BDDE při koncentraci látek $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.	92
Obrázek 105: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na GCE při koncentraci látek $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.	92
Obrázek 106: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na SPCE při koncentraci látek $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů s přestávkou 18 min, AP pH 4,7.	93
Obrázek 107: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na SPCE při koncentraci látek $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů s přestávkou 18 min, AP pH 4,7.	94

Obrázek 108: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na SPCE při koncentraci látek $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů s přestávkou 18 min, AP pH 4,7.	94
Obrázek 109: Vzorek NK 1 měřený na SPCE. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7. ...	95
Obrázek 110: Vzorek NK 1 měřený na BDDE. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7. ...	96
Obrázek 111: Vzorek NK 2 měřený na SPCE. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7. ...	97
Obrázek 112: Vzorek NK 2 měřený na BDDE. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7. ...	97
Obrázek 113: Vzorek po ozáření měřený na SPCE. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.	98
Obrázek 114: Vzorek po ozáření měřený na BDDE. SWV. 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.	98
Tabulka 1: Příklady detekce směsi kyseliny močové a xanthinu.	32
Tabulka 2: Příklady simultánní detekce adeninu a guaninu.	38
Tabulka 3: Příklady detekce adeninu, guaninu, kyseliny močové a xanthinu.	43

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

A	adenin
AA	kyselina askorbová
ATP	adenosintrifosfát
BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda
BRB	Brittonův-Robinsonův pufr
C	cytosin
CA	kofein
CCE	keramická uhlíková elektroda
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CPE	uhlíková pastová elektroda
CV	cyklická voltametrie
DCV	lineární voltametrie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPV	diferenční pulzní voltametrie
G	guanin
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
GNP	zlaté nanočástice
GTP	guanosintrifosfát
HGCE	vyhřívaná elektroda z grafitového válce
HX	hypoxanthin
IL	iontová kapalina
IR	ionizující záření
LSV	lineární voltametrie
MWNT	vícestěnné uhlíkové nanotrubičky
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
PAH	polycyklický aromatický uhlovodík
PBS	fosfátový pufr
PGE	tužková grafitová elektroda
PIGE	voskem impregnovaná grafitová elektroda
PNF	poly(new fuchsin)
POCF	<i>o</i> -krezoftalein komplexonový film
ROS	reaktivní formy kyslíku

SPCE	tištěná uhlíková elektroda modifikovaná uhlíkovými trubičkami
SWV	square wave voltametrie
T	thymin
UA	kyselina močová
UV záření	ultrafialové záření
X	xanthin

ÚVOD

DNA může být poškozena různými faktory – ať už endogenními, či exogenními. Mezi látky, které mohou indikovat poškození DNA, patří např. kyselina močová a xanthin (což jsou konečné látky metabolismu purinů), adenin, nebo guanin. Pokud není poškozená DNA opravena, dochází k různým mutacím, onemocněním, jako je například rakovina nebo ateroskleróza, ale také ke vzniku genetické diverzity.

Tyto látky byly a jsou stále detekovány na různých a různě modifikovaných elektrodoých materiálech. Nejčastěji jsou připravovány modifikované elektrody ze skelného uhlíku (GCE), přičemž lze látky stanovit až v nanomolárních koncentracích.

Cílem práce bylo detekovat markery poškození DNA na uhlíkové tištěné elektrodě modifikované uhlíkovými nanotrubičkami s karboxy funkčními skupinami (SPCE), borem dopované diamantové elektrodě (BDDE) a GCE za optimálních podmínek pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV) a square wave voltametrie (SWV) a zároveň testovat dlouhodobou stabilitu tištěných senzorů. U nich může docházet k adsorpci produktů či meziproductů elektrochemických reakcí na povrch elektrod a tím ke znečištění elektrody a zkomplikování nebo znemožnění stanovení analytu. Pasivaci lze eliminovat např. povrchovými úpravami elektrod, které zabraňují pasivaci, využitím elektrodoých materiálů odolnějších vůči pasivaci (např. BDDE) nebo využitím jednorázových senzorů.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Poškození DNA

Poškození deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je neustálou hrozbou, protože nukleové kyseliny jsou ve fyziologickém prostředí nestabilní a jsou náchylné na poškození endogenními a exogenními faktory. Nejčastějším poškozením DNA je hydrolytické štěpení glykosidické vazby mezi bází DNA a cukrfosfátovou částí nebo hydrolytická deaminace bází. Produkty normálního buněčného metabolismu mohou způsobit oxidaci, nitrosylaci a alkylaci bází DNA. Aby se tomu zabránilo, mají organismy mechanismy pro detekci a opravu poškození DNA [1, 2].

1.1.1. Endogenní faktory

Většina endogenního poškození DNA vzniká z chemicky aktivní DNA, což je DNA, která obsahuje funkční skupiny nebo molekuly, které umožňují chemické reakce v buňce. V přítomnosti vody a reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou nevyhnutelnou součástí buněčného metabolismu, mohou tyto funkční skupiny reagovat a vytvářet poškození DNA.

Endogenní poškození DNA mohou vést k různým typům poškození DNA, jako jsou například oxidace bází, alkylace, deaminace nebo tvorba jednovláknových zlomů. Tato poškození mohou vést k chybám v replikaci DNA, což může vést k mutacím a genetickým onemocněním, jako je například rakovina [1, 2].

1.1.1.1. Chyby v replikaci DNA, neshody bází

Samotná replikace DNA je klíčový proces, během kterého se vytváří její přesná kopie. DNA polymeráza, která se podílí na tomto procesu, umožňuje připojování deoxynukleotidů na základě komplementarity k templátu, což zajišťuje přesnost replikace. Nicméně, pokud se během replikace vyskytne chyba, může to vést k neshodám bází a mutacím v DNA.

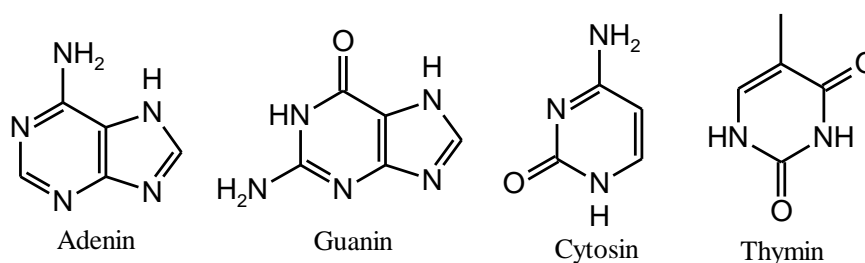
Mezi možné mutace patří substituce bází, inserce nebo delece, a ty se mohou hromadit s frekvencí 10^{-6} až 10^{-8} na buňku na generaci. Takové mutace mohou být způsobeny nesprávným spárováním nebo začleněním nukleotidů, a během další replikace se stávají trvalými mutacemi, což vede k spontánní mutagenезi.

Dalším způsobem, jak může dojít k poškození DNA, je činnost topoizomeráz. Tyto enzymy umožňují měnit terciální strukturu DNA, což je nezbytné pro řadu biologických procesů, jako je například oddělení dvou spiralizovaných molekul DNA během replikace nebo transkripce.

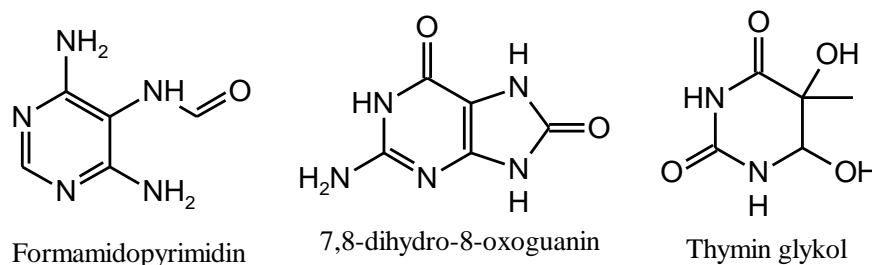
Nicméně, pokud jsou topoizomerázy nesprávně regulovány nebo jsou poškozeny, mohou způsobit zlomy v molekulách DNA, což může vést k dalším mutacím nebo dokonce k buněčné smrti [2].

1.1.1.2. Oxidační poškození DNA

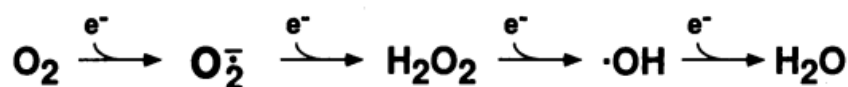
Při oxidačním poškození DNA dochází ke změnám nukleotidových bází (Obrázek 1) v důsledku interakce DNA s reaktivními formami kyslíku (ROS) jako jsou peroxidy, superoxidové radikály a hydroxylové radikály. ROS jsou produkty normálního buněčného metabolismu (Obrázek 3). Pro živé organismy mohou být prospěšné i škodlivé, navíc exogenní faktory mohou množství ROS zvyšovat a přispívat tak k oxidačnímu poškození DNA (Obrázek 2) [2].



Obrázek 1: Báze DNA [2].



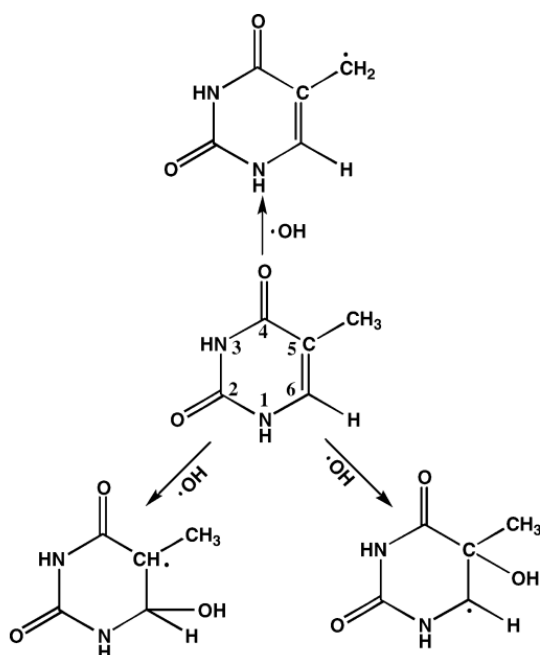
Obrázek 2: Oxidované báze DNA [2].



Obrázek 3: Tvorba ROS [3].

Hydroxylový radikál je nejreaktivnější, aduje se na dvojné vazby DNA bází, odebírá vodík z methylové skupiny thyminu (T) (Obrázek 4) a z každé C-H vazby 2-deoxyribózy. Tento radikál indukuje otevření imidazolového kruhu v guaninu a adeninu za vzniku fragmentové purinové struktury formamidopyrimidinu. Hydroxylací C-8 zbytku guaninu vzniká hlavní oxidativní báze 7,8-dihydro-8-oxoguanin. Ten se nesprávně páruje s adeninem místo

cytosinu, čímž může vznikat více mutací, jelikož může být díky nízkému oxidačnímu potenciálu dále oxidován [2, 4].

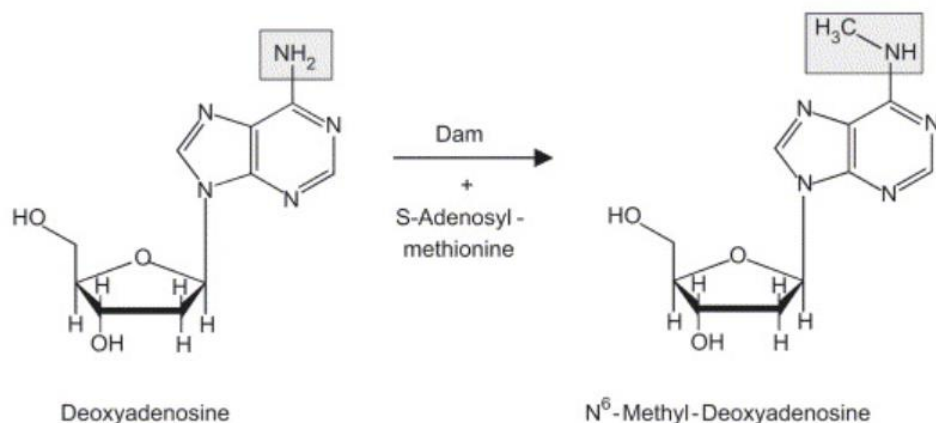


Obrázek 4: Schéma reakce thyminu s hydroxylovým radikálem [5].

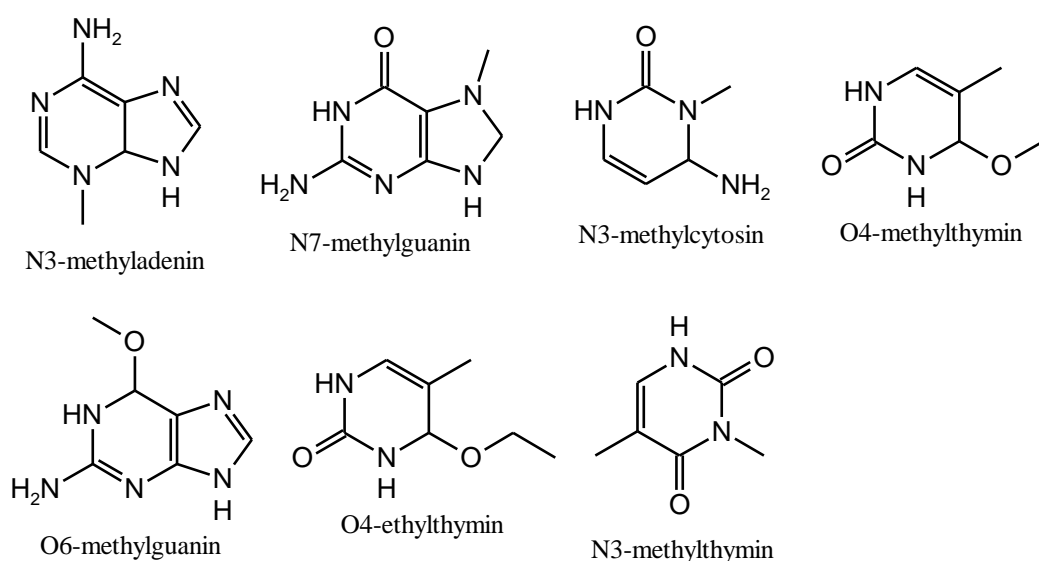
Peroxidací a oxidací lipidů hydroxylovými radikály vznikají epoxidy lipidů, hydroperoxydy lipidů a aldehydové produkty, jako je malondialdehyd nebo 4-hydroxy-2-nonenal, které mohou reagovat s adeninem, guaninem a cytosinem za vzniku mutagenních aduktů [2, 4, 6].

1.1.1.3. *Methylace DNA*

Methylace DNA je proces, během kterého se do nukleotidů DNA přidávají methylskupiny. Mezi methylační činidla můžeme řadit například nitrosované žlučové soli, betain, cholin, různé environmentální činitele nebo S-adenosylmethionin. Během methylačních reakcí vznikají N7-methylguaninové, N3-methyladeninové, N6-methyladeninové (Obrázek 5), O6-methylguaninové, O4-methylthyminové a další minoritní zbytky (Obrázek 6). Methylace DNA může vést k různým onemocněním včetně rakoviny a aterosklerózy. Methylované báze v DNA lze odstranit dvěma hlavními způsoby: přímou opravou poškození DNA O6-methylguanin-DNA-methyltransferázou nebo oxidací pomocí enzymu AlkB homologu, nebo iniciací procesu BER, kdy jsou methylované báze odstraněny pomocí DNA glykosyláz. Pokud jsou methylované báze ponechány bez opravy, mohou způsobit významné poškození DNA [2, 7].



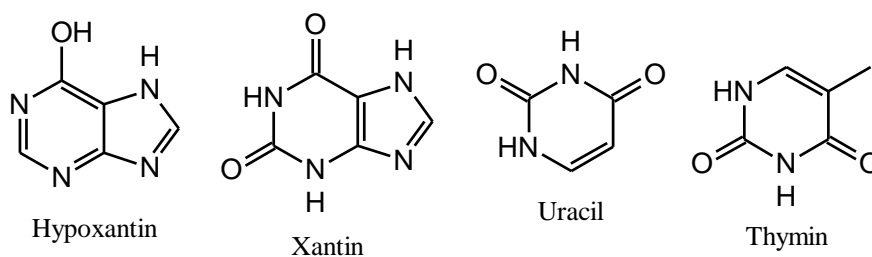
Obrázek 5: Schéma methylační reakce [8]



Obrázek 6: Methylované báze DNA [2].

1.1.1.4. Deaminace

K deaminaci dochází spontánní mutagenézí v lidských buňkách. Cytosin (C), adenin (A), guanin (G) a 5-methylcytosin v DNA ztrácí svůj exocyklický amin a z cytosinu se stává uracil, z adeninu hypoxantin (HX), z guaninu X a z 5-methylcytosinu thymin (Obrázek 7). Deaminace cytosinu a 5-methylcytosinu se nejčastěji vyskytuje v jednovláknové DNA, a to v době aktivní replikace, transkripce a rekombinace. Pokud dojde k deaminaci cytosinu, může to vést k mutaci CG → TA. Deaminace 5-methylcytosinu je třikrát až čtyřikrát častější než deaminace cytosinu. Deaminovaný cytosin se rychle odstraňuje z DNA, ale deaminace 5-methylcytosinu vytváří pár G:T, který je pomaleji opravován. Deaminace cytosinu může sloužit jako zdroj genetické diverzity [2, 9, 10].



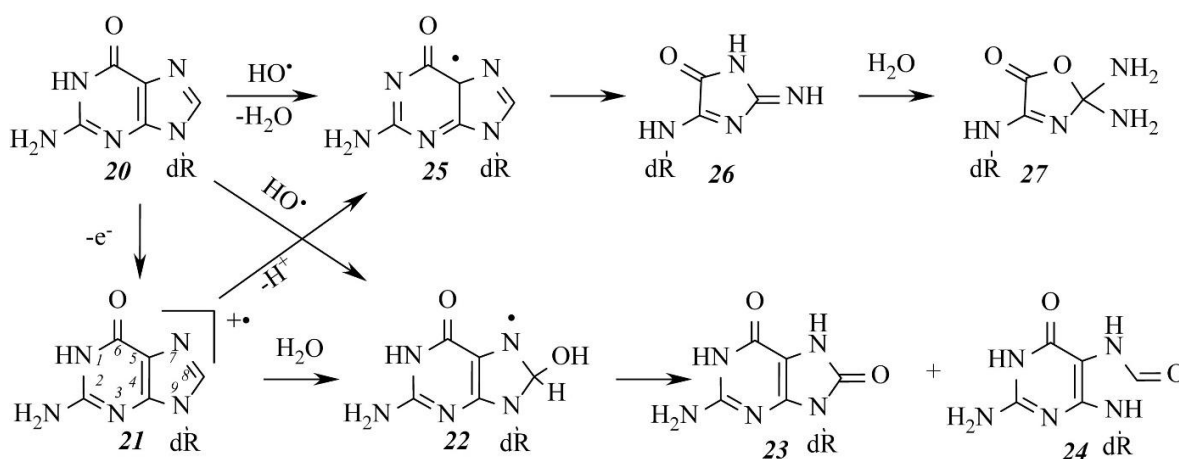
Obrázek 7: Deaminované báze DNA [2].

1.1.2. Exogenní faktory

K exogennímu poškození DNA dochází v důsledku působení environmentálních a fyzikálních faktorů, či chemických látek. Jedná se například o ultrafialové (UV) záření, ionizující záření, alkylační činidla, nebo síťovací činidla. Celkově jsou tyto faktory z vnějšího prostředí schopny poškodit DNA, což může vést k mutacím a v extrémních případech k rozvoji rakoviny nebo jiných nemocí [1, 2].

1.1.2.1. Ionizující záření

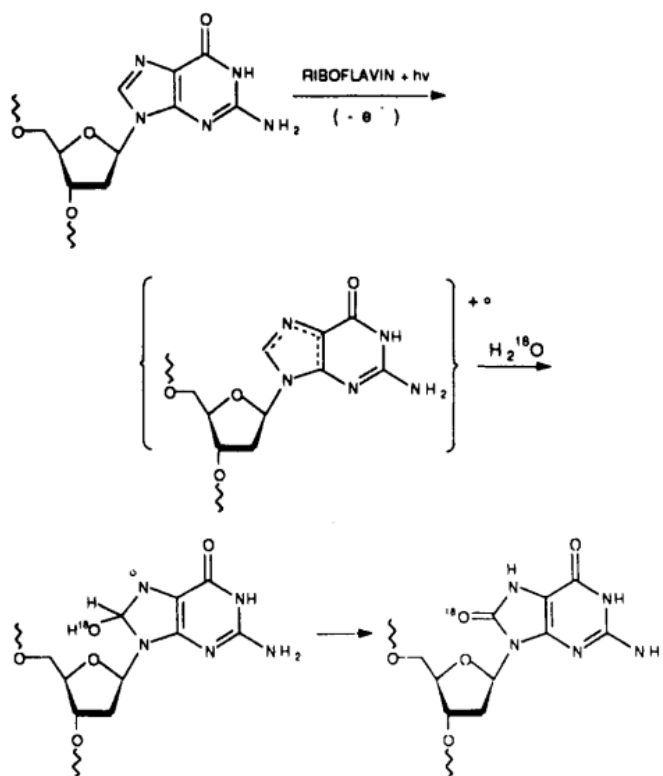
Ionizující záření (IR) – alfa, beta, gama, rentgenové a neutronové záření pochází z různých zdrojů, například z lékařských přístrojů, hornin nebo z kosmu. DNA může poškodit buď přímo (dojde k vytržení elektronu) nebo častěji nepřímo (přítomnost kyslíku, hydroxylových radikálů, např. radiolýza okolní vody vytváří shluk vysoce reaktivních hydroxylových radikálů, a dalších reaktivních látek). Kvůli ionizujícímu záření dochází při poškození DNA hlavně ke vzniku 8-oxoguaninu, jelikož guanin vykazuje nejnižší ionizační potenciál mezi složkami DNA (Obrázek 8). I když tedy dochází k ionizaci jiné báze, například thyminu, produkuje se kationtový radikál thyminu, který je rychle opraven pomocí přenosu elektronu od guaninu, a tím se produkuje kationtový radikál guaninu, který je příčinou vzniku 8-oxoguaninu. Dále dochází ke vzniku thyminglykolu a formamidopyrimidinů [2, 11].



Obrázek 8: Oxidace guaninu [11].

1.1.2.2. UV záření

UV záření, jehož přirozeným zdrojem je Slunce, se dělí na UV-A (320–400 nm), UV-B (290–320 nm) a UV-C (190–290 nm). Sluneční světlo se skládá z 5,1 % z UV-A, z 0,3 % z UV-B, 62,7 % z viditelného světla a z 31,9 % z infračerveného světla. DNA absorbuje maximum UV záření při 260 nm, ovšem UV-C záření bývá z větší části odfiltrováno ozonovou vrstvou. UV záření poškozuje DNA dvěma způsoby: pokud dochází k absorpci fotonů, molekuly jsou excitovány a dochází k fotochemické změně nebo pokud UV záření není absorbováno přímo, ovlivňuje DNA přenos energie z fotosenzibilátorů, což jsou molekuly, které absorbují UV záření a absorbovanou energii předávají dalším molekulám [2, 11]. Mezi fotosenzibilátory patří např. antrachinon, benzofenon, 1,4-dimethyl-2-naftochinon a riboflavin (Obrázek 9) [12].



Obrázek 9: Fotosenzibilace s využitím riboflavinu [13].

1.1.2.3. Alkylační a síťovací činidla

Mezi alkylační činidla patří např. methylsulfonylmethan nebo ethylmethansulfonát. Jsou to látky pocházející z tabákového kouře vznikající spalováním biomasy nebo průmyslovým zpracováním. Tato činidla reagují s dusíky v základních kruzích nukleových bází, především N7 guaninu a N3 adeninu, o něco méně s kyslíky za vzniku mutagenních a karcinogenních lézí.

Mezi síťovací činidla patří např. psoralen nebo cisplatina, která je schválena k léčbě rakoviny. Má schopnost zesíťovat se s purinovými bázemi DNA a zasahovat do opravných mechanismů DNA, což způsobuje poškození DNA a apoptózu v rakovinných buňkách [2, 14].

1.1.2.4. Aromatické aminy

Zdrojem aromatických aminů je např. cigaretový kouř, pesticidy, látky vznikající při spalování uhlí či vaření potravin při vysokých teplotách. Tyto látky mohou být přeměněny na karcinogenní alkylační činidla útočící na pozici C8 guaninu a tím způsobovat mutace v DNA. Mezi nejvíce studované příklady aromatických aminů patří 2-aminofluoren a jeho acetylovaný derivát *N*-acetyl-2-aminofluoren, které byly původně používány jako insekticidy. Tyto látky však byly kvůli svým karcinogenním vlastnostem stáhnuty z trhu. 2-aminofluoren spolu s 2-aminofenantrenem a *trans*-4-aminostilbenem způsobují rakovinu u zvířat, u lidí je to hlavně 2-naftylamin, 4-aminobifenyl a benzidin. C8-guaninové léze způsobené aminofluoreny jsou známy pro svou schopnost vyvolávat mutace v DNA [2, 15].

1.1.2.5. Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHy)

Zdrojem PAHů jsou výfukové plyny, spálené potraviny, tabákový kouř, nebo např. nedokonalé spalování organických látek a fosilních paliv. Mezi nejznámější PAHy patří naftalen, antracen, pyren, nebo benzo(a)pyren, který je nejvíce karcinogenním PAHem [2]. Karcinogenita se projevuje více, pokud je jedinec vystavován těmto látkám prenatálně či časně postnatálně. Nádory se tvoří především v plicích, játrech, lymfatických uzlinách a nervovém systému [16]. Novorozenci, u kterých byly zjištěny vyšší hladiny aduktů DNA v pupeční krvi, prokazatelně vykazovali menší délku, nižší porodní hmotnost a menší obvod hlavy ve srovnání s novorozenci, u kterých byly zjištěny nižší hladiny aduktů DNA v pupeční krvi. Tato zjištění naznačují, že v určitých regionech jsou PAHy hlavním zdrojem genotoxických a embryotoxických aktivit organických směsí spojených s ovzduším [17].

1.1.2.6. Další exogenní faktory

Mezi další exogenní faktory se řadí např. různé toxiny (např. aflatoxiny), environmentální stresy (extrémní teplo, chlad, oxidační stres), konzervační látky v potravinách (benzoan sodný – může poškozovat strukturu DNA a tím potencionálně přispívat k výskytu některých dědičných chorob, jako je například Parkinsonova choroba, benzoan draselný – benzoan sodný s benzoanem draselným a kyselinou askorbovou mohou tvořit benzen, který je známý jako karcinogen) nebo potravinářská aditiva (brilantní modř – výzkumy provedené na krysách ukázaly, že jeho podání injekčně nebo perorálně může vést k výskytu nádorů, žlut SY – může

obsahovat stopy látky Sudan I, od které je odvozena a která je prokazatelným karcinogenem) [2, 18, 19, 20].

1.2. Elektrochemická detekce vybraných markerů oxidačního poškození DNA

Následující kapitoly se budou věnovat možnostem detekce vybraných oxidačních markerů poškození DNA – adeninu, cytosinu, guanin, kyselině močové, thyminu a xanthinu na různých a různě modifikovaných elektrodových materiálech. Látky lze detekovat samostatně či simultánně, pozornost bude zaměřena hlavně na simultánní stanovení markerů, podobně jako byly detekovány v rámci experimentální části: UA + X (Tabulka 1), A + G (Tabulka 2), A + G + X + UA (Tabulka 3).

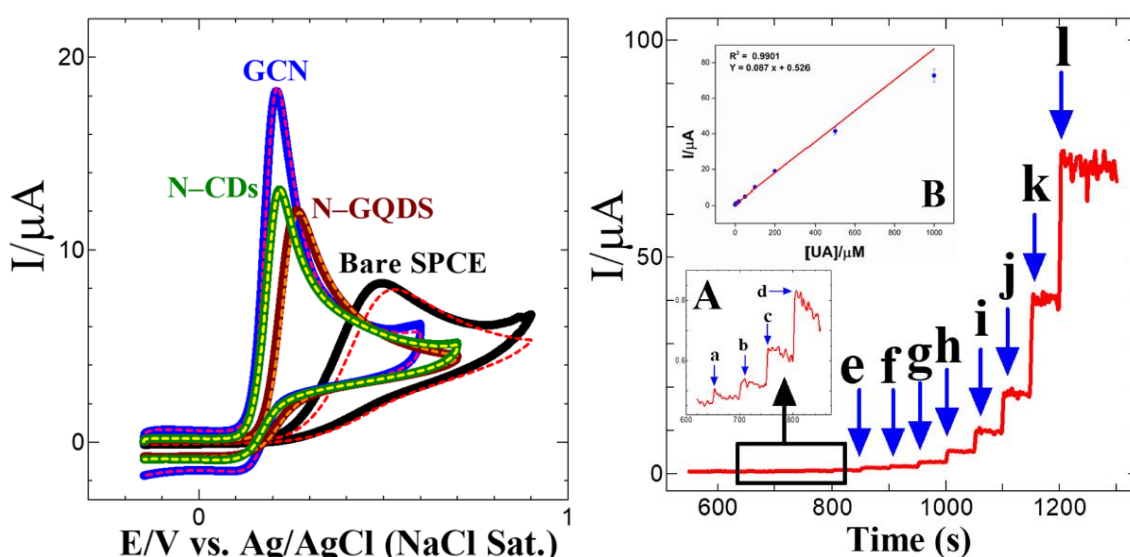
Adenin a guanin se řadí mezi purinové báze, které jsou součástí nukleových kyselin. Molekulární vzorec adeninu je $C_5H_5N_5$, guaninu $C_5H_5N_5O$. V DNA tvoří adenin pár s thyminem, guanin s cytosinem. Adenin je nositelem genetické informace, může sloužit jako prekurzor pro různé biologicky aktivní látky, jako je například ATP (adenosintrifosfát) a NAD (nikotinamidadenin dinukleotid). Guanin se podílí na regulaci genové exprese a na řízení buněčného cyklu. V buňce může být modifikován různými způsoby (např. methylován, fosforylován), což ovlivňuje jeho schopnost vázat se na jiné molekuly a interagovat s nimi. Detekce adeninu je důležitá pro diagnózu různých onemocnění a výzkum nukleových kyselin, guanin je důležitým prekurzorem pro různé biologicky aktivní látky, jako jsou například GTP (guanosintrifosfát) a cGMP (cyklický guanosinmonofosfát).

Xanthin i kyselina močová patří také mezi puriny. Molekulární vzorec X je $C_5H_4N_4O_2$ a UA $C_5H_4N_4O_3$. Obě látky vznikají v těle při metabolismu purinů, především uvolňováním z buněčných jader guaninu a adeninu, které jsou následně přeměněny na xanthin oxidací. Ten může být dále metabolizován na kyselinu močovou pomocí xanthinoxidázy. Xanthin se používá k diagnostice některých metabolických poruch, jako je například nedostatek hypoxanthin-guanin-fosforibosyltransferázy, který způsobuje vysoké hladiny xanthinu v moči a kameny v ledvinách. V laboratorním výzkumu se často používá jako modelová sloučenina pro studium metabolismu purinů v těle. Kyselina močová se ve vysokých koncentracích může hromadit v těle a způsobovat zdravotní problémy, jako je dna, nebo může přispívat ke vzniku ledvinových kamenů.

1.2.1. Detekce kyseliny močové a xanthinu

1.2.1.1. Tištěná uhlíková elektroda

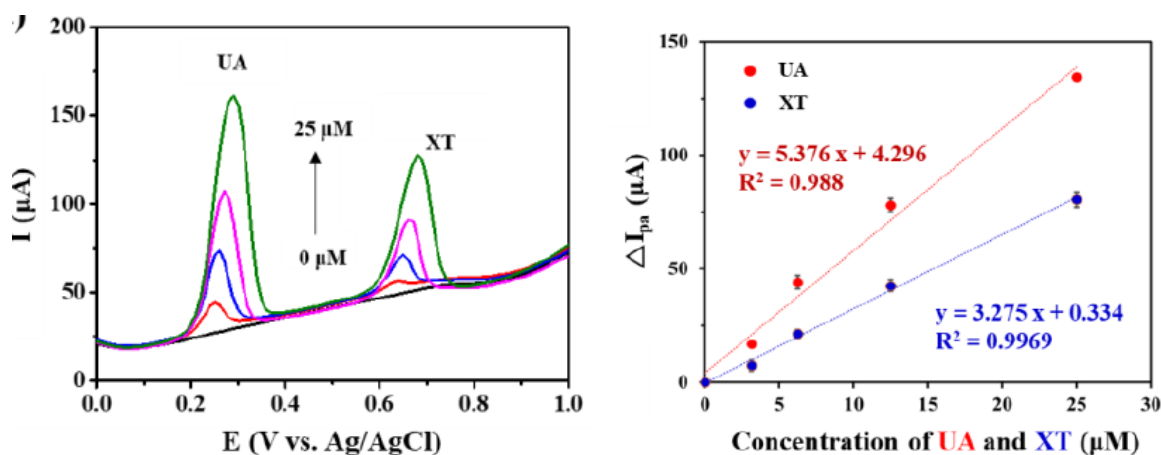
UA a X byly detekovány pomocí uhlíkových nanomateriálů bohatých na dusík, jako je N-dopovaný uhlík (N-CDs), N-dopované grafenové kvantové tečky (N-GQDs) a nitrid grafitu (GCN) nanesených na SPCE (Obrázek 10 vlevo). Materiály byly testovány pouze na UA, pro směr UA a X byl poté zvolen nejlepší z nich – SPCE/GCN. Měření bylo prováděno ve fosfátovém pufru (PBS) o pH 7,2 pomocí DPV, CV a amperometrie. Amperometrickou metodou byla provedena kvantifikace UA v širokém lineárním rozsahu od $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ do $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a dosaženo detekčního limitu $24 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obrázek 10 vpravo) [21].



Obrázek 10: Cyklická voltametrie UA s různě modifikovanými SPCE, PBS, pH 2 (vlevo). Amperometrická křivka pro přidávky UA na SPCE/GCN v 0,2 M PBS o pH 7,2 (vpravo) [21].

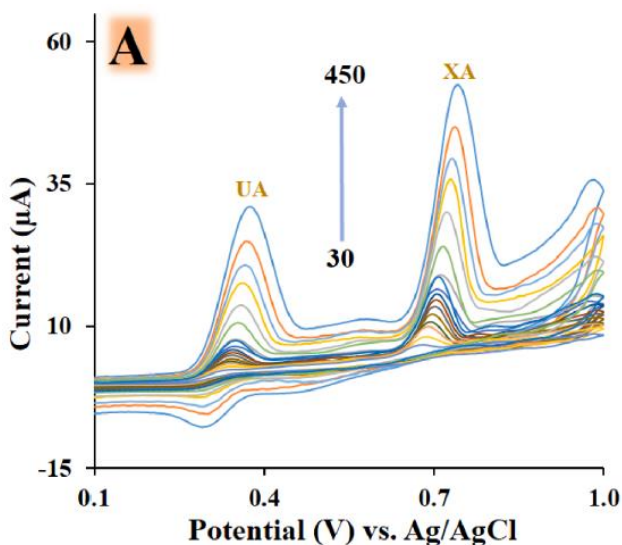
1.2.1.2. Elektroda ze skelného uhlíku

UA a X byly detekovány na GNP/rGO-CNT/GCE – 3D makroporézní GCE modifikovanou zlatými nanočásticemi s uhlíkovými nanotrubičkami v redukováném oxidu grafenu. Charakterizace elektrody probíhala pomocí CV v 0,1 M KCl s $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Měření UA a X bylo provedeno pomocí SWV v prostředí PBS o pH 7,4. Reálným vzorkem byl vzorek slin a lidského séra. Lineární rozsah UA byl $1,56\text{--}25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ X $3,13\text{--}25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, mez detekce UA byla $0,910 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a X $2,573 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obrázek 11) [22].



Obrázek 11: Square wave voltametrie UA a X na GNP/rGO-CNT/GCE [22].

UA a X byly detekovány na poly L-cys/AuNPs/N,B-RGO/GCE – GCE modifikované nanokompozity z L-cysteinu (poly L-cys), zlatých nanočástic (AuNPs) a dusíkem a borem dopovaného redukováného oxidu grafenu (N,B-RGO). Jako reálný vzorek bylo použito lidské sérum. Měření probíhalo v PBS o pH 7 pomocí CV (Obrázek 12) a DPV. Lineární rozsah pro UA i X byl $3,0 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ až $3,0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, limity detekce pro obě látky byly $0,9 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ [23].



Obrázek 12: Cyklická voltametrie UA a X na poly L-cys/AuNPs/N,B-RGO/GCE, PBS o pH 7 [23].

UA, X a HX byly detekovány na GCE modifikované poly-L-methioninem pomocí CV a DPV. Jako reálný vzorek bylo použito krevní sérum. Měření bylo prováděno v PBS o pH 7,2. Reakce by se měl účastnit stejný počet protonů a elektronů dle směrnice přímky. Elektroda, na kterou byla nanosená polymerní vrstva L-methioninu, vykazovala vysokou citlivost, látky se oxidovaly při nižších potenciálech než v případě nemodifikované GCE. Lineární rozsah elektrochemické detekce všech látek byl mezi $0,02$ a $0,1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, mez

detekce UA $0,0074 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, X $0,004 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a HX $0,008 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Metoda má dobrou opakovatelnost, přesnost i dlouhodobou stabilitu [24].

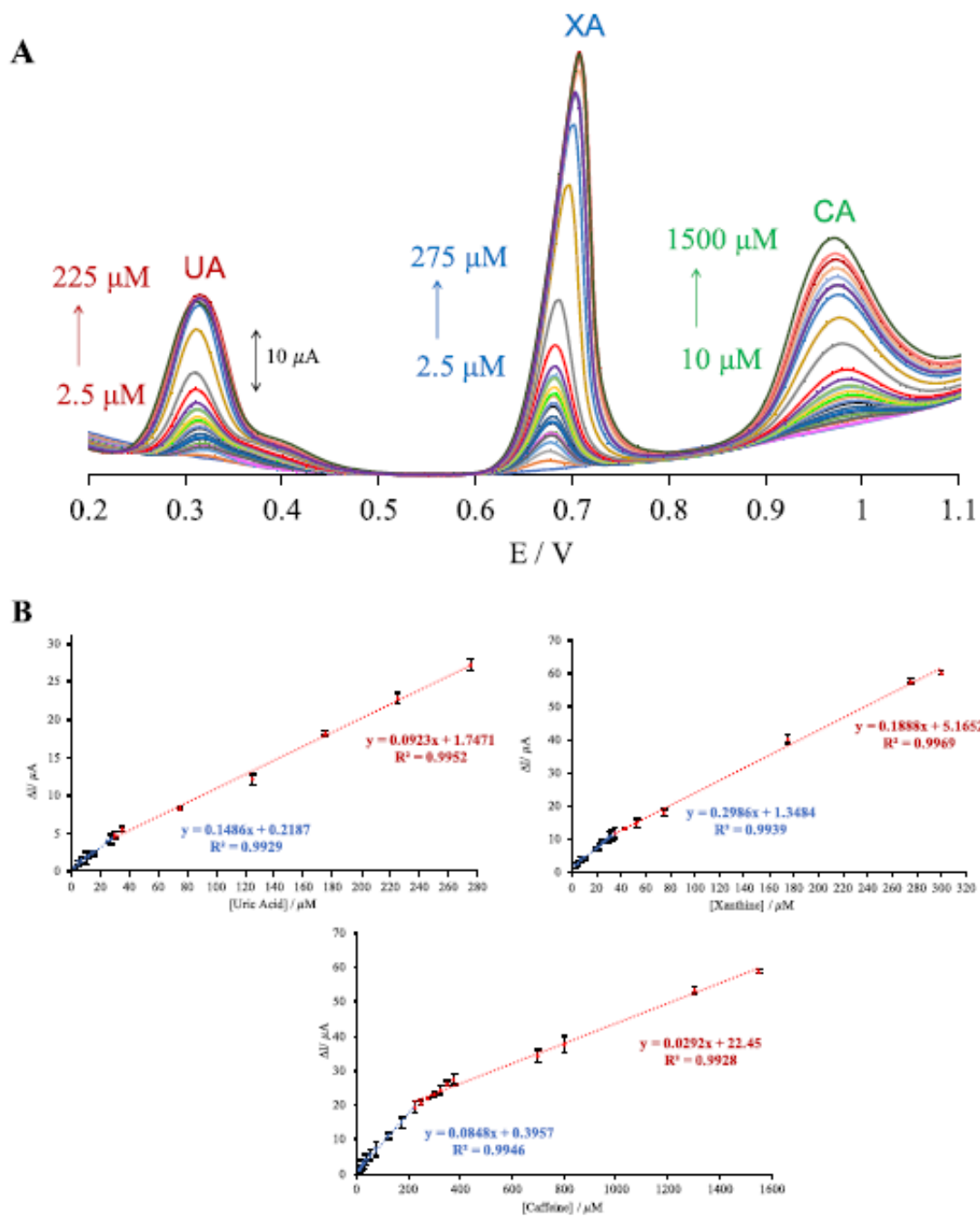
1.2.1.3. *Uhlíková pastová elektroda*

UA byla detekována spolu s X a HX na SWCNTs/IUTCPE – ultratenké uhlíkové pastové elektrodě modifikované jednotlivými uhlíkovými nanotrubičkami. Detekce probíhala v BRB o pH 5,72. Jako reálný vzorek byl použit vzorek lidské moči. Lineární rozsahy stanovení pro UA byl $0,1\text{--}8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $8\text{--}100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pro X $0,2\text{--}100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pro HX $0,8\text{--}20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $20\text{--}100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Detekční limit stanovení UA byl $80 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pro X $146 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pro HX $562 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ [25].

UA, X a kyselina askorbová (AA) byly detekovány pomocí senzoru, který byl vyroben modifikací uhlíkové elektrody mezopórním SiO_2 . Výsledkem byl elektrochemický senzor s materiálem MCM-41. Během elektrochemických testů bylo zjištěno, že testované látky poskytují tři dobře definované oxidační píky s maximy při hodnotách 0,00 V, 0,25 V a 0,63 V. Tyto látky byly na senzoru oxidovány nezávisle na sobě a jejich vzájemné ovlivňování nenastalo. Měření probíhalo v PBS o pH 7 pomocí DPV a CV. Pro AA byl lineární rozsah stanovení od 0,04 do $4,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a limit detekce $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pro UA lineární rozsah od 0,5 do $75 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a limit detekce byl $0,24 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pro X lineární rozsah od 4,5 do $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a limit detekce $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako reálný vzorek byl analyzován vzorek moči a krevního séra [26].

1.2.1.4. *Keramická uhlíková elektroda*

UA, X a kofein (CA) byly detekovány na MWCNT-AuNP-CCE – thiofunkcionalizované keramické elektrodě na bázi sol-gelu, která byla modifikována nanočástičkami zlata a vícečetnými uhlíkovými nanotrubičkami. Takto modifikovaná elektroda dosahovala vyšší citlivosti než jiné modifikace CCE, zároveň je senzor cenově výhodný a jednoduše se připravuje. Látky byly detekovány pomocí CV a DPV v PBS o pH 6, byly taktéž detekovány v lidském séru a lidské moči. Limit detekce UA byl 50, X 63 a CA $354 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Lineární rozsahy se pohybovaly mezi 2,5 a $275 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ u UA, 2,5 a $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ u X a 10 a $1500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ u CA (Obrázek 13) [27].



Obrázek 13: (A) DPV kyseliny močové, xanthinu a kofeinu na MWCNT-AuNP-CCE v 0,1 M PBS (pH 6) a (B) příslušné kalibrační závislosti [27].

Tabulka 1: Příklady detekce směsi kyseliny močové a xanthinu.

Detekované látky	Vzorek	Materiál elektrody	Měřicí technika	Pufř	Lineární rozsah [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Limit detekce [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Ref.
UA a X	-	SPCE	DPV, CV, amperometrie	PBS pH 7,2	UA: 0,2–1000 X: -	UA: 0,024 X: -	[21]
UA a X	Sliny, lidské sérum	GCE	SWV, CV	PBS pH 7,4	UA: 1,5–25 X: 3,13–25	UA: 0,91 X: 2,573	[22]
UA a X	Lidské sérum	GCE	DPV, CV	PBS pH 7	UA: 0,003–3 X: 0,003–3	UA: 0,0009 X: 0,0009	[23]
UA, X a HX	Krevní sérum	GCE	DPV, CV	PBS pH 7,2	UA: 0,02–0,1 X: 0,02–0,1	UA: 0,0074 X: 0,004	[24]
UA, X a HX	Lidská moč	CPE	DPV, CV	BRB pH 5,72	UA: 0,1–8, 8–100 X: 0,2–100	UA: 0,08 X: 0,146	[25]
UA, X a AA	Moč, krevní sérum	CPE	DPV, CV	PBS pH 7	UA: 0,5–75 X: 4,5–100	UA: 0,24 X: 2	[26]
UA, X a CA	Lidské sérum a moč	CCE	DPV, CV	PBS pH 6	UA: 2,5–275 X: 2,5–300	UA: 0,05 X: 0,063	[27]

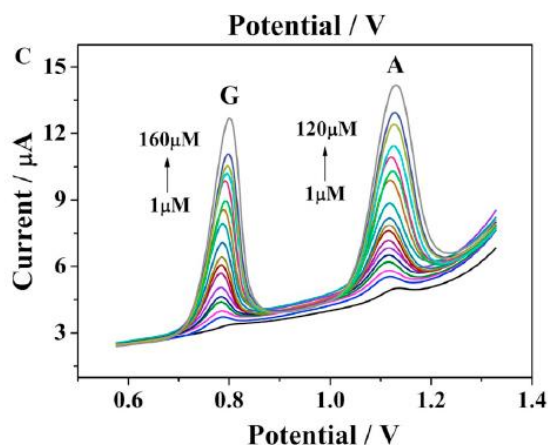
1.2.2. Detekce směsi adeninu a guaninu

1.2.2.1. Elektroda ze skelného uhlíku

Směs A a G byla detekována na OMIMPF₆-MWCNTs-GNP/GCE – elektrodě ze skelného uhlíku potažené kompozitním filmem z hydrofobní iontové kapaliny (IL), vícestěnných uhlíkových nanotrubiček (MWCNTs) a zlatých nanočástic (GNP). Látky byly měřeny v PBS o pH 7,4 pomocí LSV (lineární voltametrie) a CV (cyklické voltametrie). Byly analyzovány tři reálné vzorky – sušené mléko, plazma a moč. Byly testovány různé kombinace modifikací, nejlepší odezvu poskytovala modifikace OMIMPF₆-MWCNTs-GNP/GCE. Koncentrační rozsah detekce A i G byl 0,008–2,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, limit detekce 0,005 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [28].

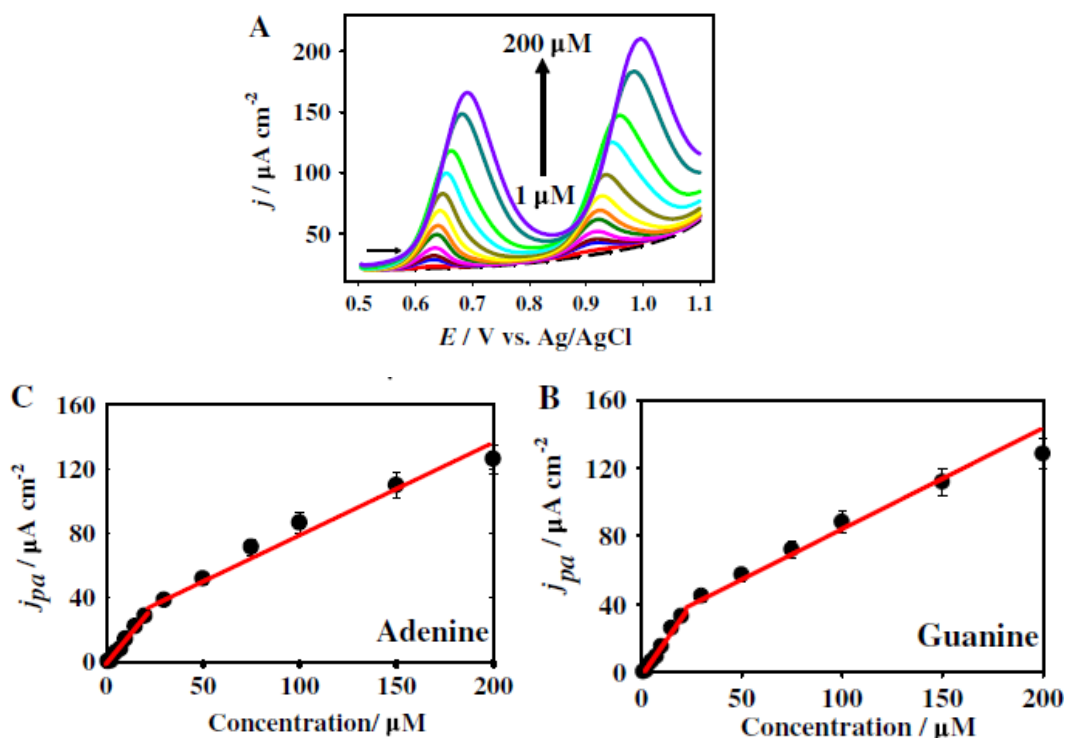
Směs A a G byla detekována na elektrodě Cu-Ni@N,B-rGO/GCE s nanokompozity, která obsahuje nanokuličky mědi a niklu na povrchu dusíkem a borem dopovaného redukováného oxidu grafenu. Látky byly detekovány v PBS o pH 3 pomocí DPV (Obrázek 14) a CV. Jako

reálný vzorek byla zvolena DNA z telecího brzlíku. Lineární rozsah stanovení G byl 1,0 až 160,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a detekční limit 0,118 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, u A byl lineární rozsah 1,0–120,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a limit detekce 0,134 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [29].



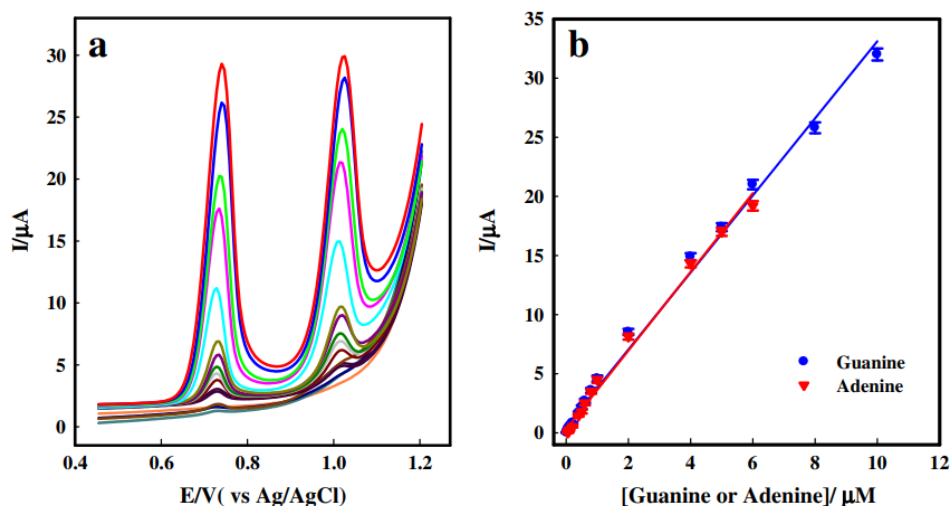
Obrázek 14: Elektrochemická detekce G a A na Cu-Ni@N,B-rGO/GCE pomocí DPV [29].

A a G byly detekovány na elektrodě AuPtNCs-rGO/GCE, která je složena z bimetalických nanoklastrů zlata a platiny, které jsou rozptýleny na povrchu redukovaného oxidu grafenu. Jako reálný vzorek bylo analyzováno sperma lososa, detekce probíhala v PBS o pH 7,2 pomocí SWV. Pro A i G byl získán široký lineární rozsah od 1,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ do 0,20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, limit detekce A byl 100 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a G 60 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obrázek 15) [30].



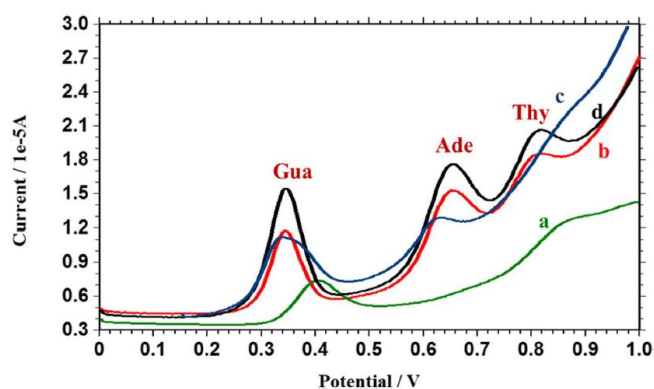
Obrázek 15: (A) SWV odezvy oxidace guaninu a adeninu v různých koncentracích a odpovídající kalibrační křivky pro (B) G a (C) A na Au₅₀Pt₅₀NCs-rGO/GCE [30].

A s G byly detekovány na GCE modifikované kompozitem složeným z vícestěnných uhlíkových nanotrubiček (MWCNT) a nanočástic Fe_3O_4 pomocí CV a LSV (Obrázek 16). Detekce probíhala v PBS o pH 7. Jako reálný vzorek bylo použito rybí sperma. Lineární rozsah A byl $0,01\text{--}10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a G $0,05\text{--}8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s limitem detekce pro A $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro G [31].



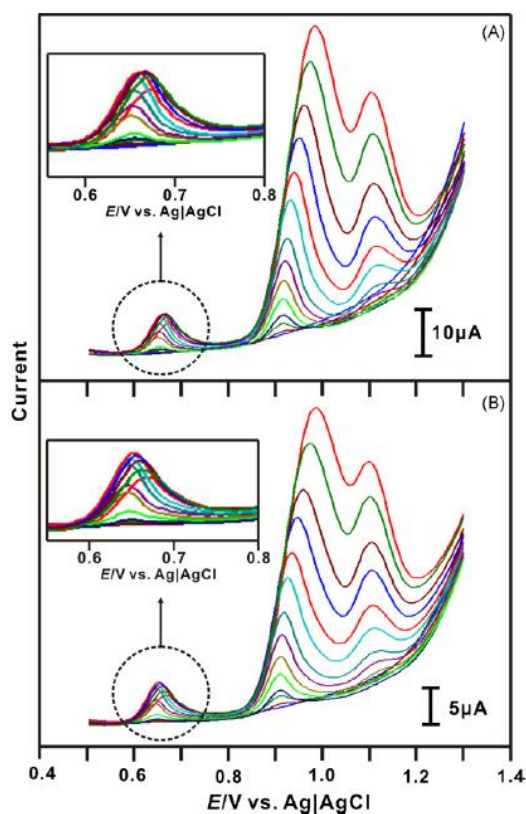
Obrázek 16: (a) Lineární voltametrie G a A na $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs/MWCNT/GCE}$ v PBS, pH 7 a (b) kalibrační křivky obou látek [31].

Směs A, G a T byla detekována na poly(L-arg)-ERGO/GCE elektrodě – GCE modifikované kompozitním filmem z poly(L-argininu) a elektrochemicky redukováným oxidem grafenu (Obrázek 17). Použitelnost senzoru byla prokázána stanovením koncentrace G, A a T v uměle kontaminovaných vzorcích moči a krevního séra s uspokojivými výsledky. Měření probíhalo v prostředí $0,1 \text{ M NaOH}$, případně v PBS o pH 6 pomocí SWV a CV. Lineární rozsah G i A na poly(L-arg)-ERGO/GCE byl $0,1$ až $3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, T $0,1$ až $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Limit detekce G byl $0,932 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, A $0,650 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a T $0,245 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [32].



Obrázek 17: SWV $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ G, A a T na (A) GCE, (B) poly(L-arg)/GCE, (C) ERGO/GCE a (D) poly(L-arg)-ERGO/GCE v $0,1 \text{ M NaOH}$ [32].

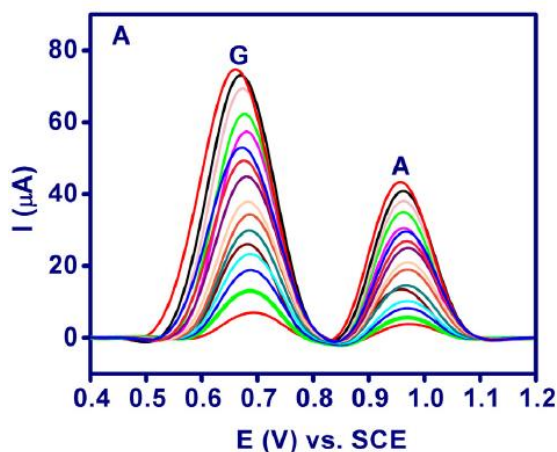
Detekce A, G a T probíhala na elektrodě s kompozitním filmem uhlíkových nanotrubiček a poly(new fuchsinu) (MWCNTs–PNF). Tento film byl syntetizován na elektrodách ze skelného uhlíku, zlata a cínem dopovaného oxidu inditého (ITO). Látky byly měřeny pomocí CV a DPV v PBS o pH 7,4 (Obrázek 18), hydrogenftalanu draselném o pH 4 a KOH o pH 13. V případě MWCNTs–PNF na GCE u DPV byl koncentrační rozsah pro G 0,1 až 8,5 mmol·l⁻¹, pro A 0,01 až 3,9 mmol·l⁻¹ a pro T 0,02 až 7,7 mmol·l⁻¹. Detekční limit G byl 95,76, A 7,4 a T 16,2 μmol·l⁻¹ [33].



Obrázek 18: DPV pro A, G a T v PBS, pH 7,4, (A) MWCNTs–PNF/GCE a (B) MWCNTs/GCE [33].

1.2.2.2. Voskem impregnovaná grafitová elektroda

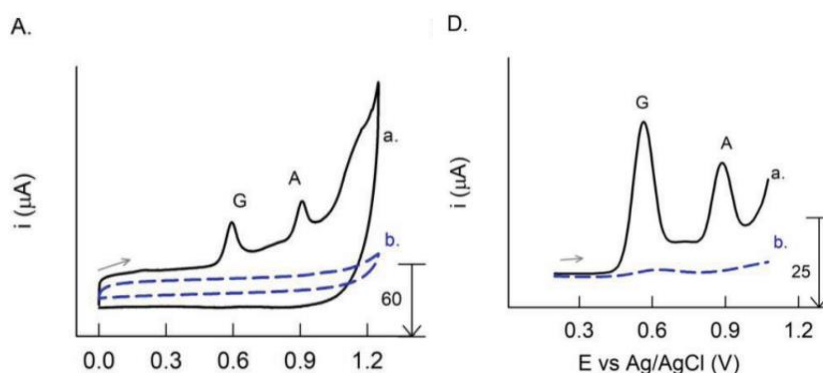
Adenin byl detekován spolu s guaninem na elektrodě modifikované poly *o*-krezoftalein komplexonovým filmem (POCF). Ve srovnání s grafitovou elektrodou impregnovanou parafínovým voskem (PIGE) ukázala elektroda s POCF modifikací výrazný nárůst proudů oxidace adeninu a guaninu. Měření probíhala v PBS o pH 7 pomocí DPV (Obrázek 19) a CV. Jako vzorek byla využita DNA z telecího brzlíku a DNA mola. Lineární rozsah detekce u A i G se pohyboval mezi 0,08 a 200 μmol·l⁻¹, limit detekce A i G byl 0,02 μmol·l⁻¹ [34].



Obrázek 19: DPV pro simultánní stanovení adeninu a guaninu ($0,08\text{--}200\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) [34].

1.2.2.3. Tužková grafitová elektroda

A s G byly detekovány pomocí DPV a CV na tužkové grafitové elektrodě (PGE) pokryté MoS_2 . Měření probíhalo v PBS o pH 7,4 (Obrázek 20). Byl použit vzorek DNA telecího brzlíku. Píky A a G byly ostré, dobře oddělené. Elektrodu lze použít pro opakovaná měření bez dalších úprav, jako je leštění nebo čištění. Lineární rozsah pro G i A byl $15\text{--}120\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, mez detekce G $0,76\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a A $2,38\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [35].



Obrázek 20: CV (A) a DPV (B) G a A na MoS_2 -PGE (a) a PGE (b) v PBS, pH 7,4 [35].

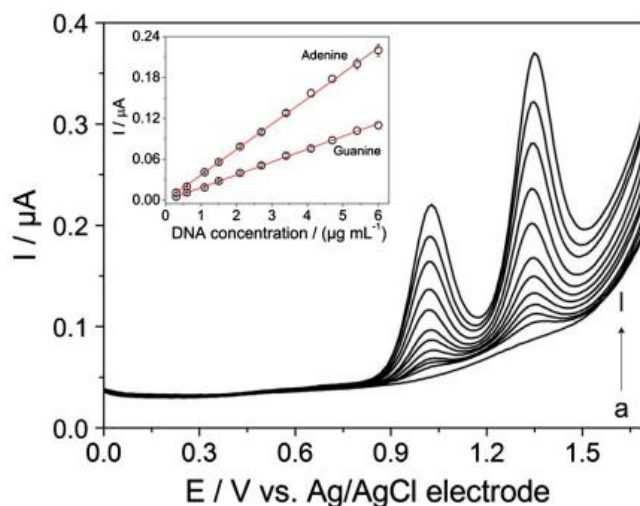
1.2.2.4. Uhlíková pastová elektroda

Adenin byl detekován ve směsi s guaninem na uhlíkové pastové elektrodě modifikované iontovou kapalinou s grafenem (IL-grafen/CPE), CILE a grafitové elektrodě modifikované β -cyklodextrinem a uhlíkovými nanotrubičkami pomocí CV a DPV v Brittonově-Robinsonově pufru (BRB) o pH 7. IL-grafene/CPE vykazovala lepší kinetiku elektronového přenosu než ostatní typy testovaných elektrod. Lineární rozsah A i G byl $0,2\text{--}1\ \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, limit detekce G byl $65\ \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a A $32\ \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ [36].

Směs A, G a T byla detekována na $\text{TiO}_2\text{NPs-MgY/ZMCPE} - \text{CPE}$ modifikované TiO_2 a zeolitem natrolit, který byl dopovaný hořečnatými ionty, pomocí CV a DPV v PBS o pH 7,2. Byl analyzován vzorek DNA myši. Elektrodu lze využít k detekci purinových a pyrimidinových bází i jako biosenzor v reálných vzorcích. Lineární rozsah G a A byl $0,1\text{--}10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, T $8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} - 1 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, mez detekce G $0,013 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, A $0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a T $0,878 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [37].

1.2.2.5. Borem dopovaná diamantová elektroda

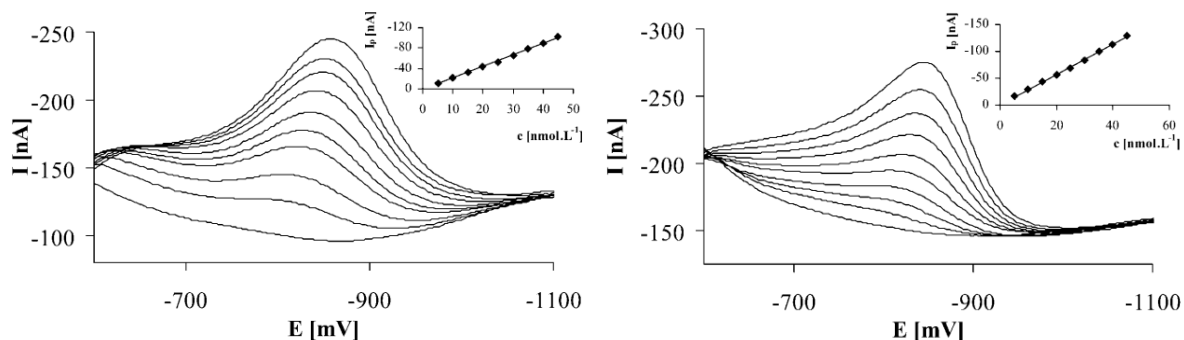
A a G byly měřeny ve směsi v biologických vzorcích (lidské moči a placentě a rybím spermatu) pomocí CV a DPV. Měření probíhalo v BRB při pH 6. Mez detekce pro A byla $0,067 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pro G $0,158 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, lineární rozsah pro obě látky $0,3 - 19 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v jejich směsi, v případě individuálního měření byla mez detekce pro A $0,019 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pro G $0,037 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, lineární rozsah G $0,21\text{--}23 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a A $0,12\text{--}25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Měření byla opakovatelná, citlivá a přesná [38].



Obrázek 21: DPV denaturovaného ryбіho spermatu, BRB pH 6 na BDDE spolu s kalibrací G a A [38].

1.2.2.6. Stříbrná amalgámová elektroda

A a G byly detekovány pomocí p-AgSAE, což je leštěná stříbrná pevná amalgámová elektroda. Detekce probíhala v $0,005 \text{M NaOH}$ s přidavkem $0,4 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{Cu(II)}$ iontů pomocí lineární voltametrie (Obrázek 22) a DPV. Jako reálný vzorek byl využit vzorek telecího brzlíku a plazmidová DNA. Limit detekce A byl $0,95 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a G $1,85 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a lineární rozsah A i G $5\text{--}45 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ [39].



Obrázek 22: Lineární voltametrie A (vlevo) a G (vpravo) spolu s kalibračními závislostmi, NaOH s $0,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Cu(II) [39].

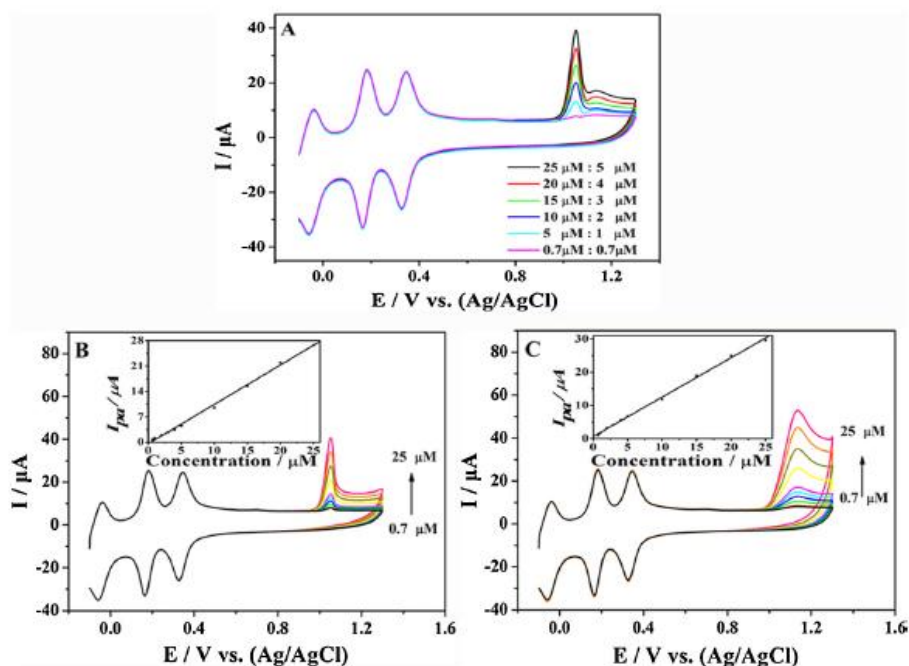
Tabulka 2: Příklady simultánní detekce adeninu a guaninu.

Detekované látky	Vzorek	Materiál elektrody	Měřicí technika	Pufr	Lineární rozsah [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Limit detekce [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Ref.
A a G	Sušené mléko, plazma, moč	GCE	LSV, CV	PBS pH 7,4	A: 0,008–2 G: 0,008–2	A: 0,005 G: 0,005	[28]
A a G	DNA z telecího brzlíku	GCE	DPV, CV	PBS pH 3	A: 1–120 G: 1–160	A: 0,134 G: 0,118	[29]
A a G	Sperma lososa	GCE	SWV	PBS pH 7,2	A: 1–200 G: 1–200	A: 0,1 G: 0,06	[30]
A a G	Rybí sperma	GCE	LSV, CV	PBS pH 7	A: 0,01–10 G: 0,05–8	A: 0,001 G: 0,005	[31]
A a G	DNA z telecího brzlíku, DNA mola	PIGE	DPV, CV	PBS pH 7	A: 0,08–200 G: 0,08–200	A: 0,02 G: 0,02	[34]
A a G	-	PGE	DPV, CV	PBS pH 7,4	A: 15–120 G: 15–120	A: 2,38 G: 2,38	[35]
A a G	-	CPE	DPV, CV	BRB pH 7	A: 0,2–1 G: 0,2–1	A: 0,032 G: 0,065	[36]
A a G	Rybí sperma, lidská moč a placenta	BDDE	DPV, CV	BRB pH 6	A: 0,3–19 G: 0,3–19	A: 0,067 G: 0,158	[38]
A a G	DNA z telecího brzlíku, plazmid	AgSAE	DCV, DPV	NaOH	A: 0,005–0,045 G: 0,005–0,045	A: 0,00095 G: 0,00185	[39]

Detekované látky	Vzorek	Materiál elektrody	Měřicí technika	Pufř	Lineární rozsah [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Limit detekce [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Ref.
A, G a T	Moč a krevní sérum	GCE	SWV, CV	PBS pH 6	A: 0,1–3 G: 0,1–3	A: 0,65 G: 0,932	[32]
A, G a T	-	GCE	DPV a CV	PBS pH 7,4	A: 10–3900 G: 100–8500	A: 7,4 G: 95,76	[33]
A, G a T	DNA myši	CPE	DPV, CV	PBS pH 7,2	A: 0,1–10 G: 0,1–10	A: 0,02 G: 0,013	[37]

1.2.3. Detekce směsi guaninu a xanthinu

G byl detekován s X na polyoxometalátem modifikované 3D grafenové pění. Díky tomu bylo možné pozorovat odděleně signály G a X při 1,05 V a 1,13 V (Obrázek 23). To dříve na 1D uhlíkových nanotrubičkách nebo 2D grafenem modifikované GCE možné nebylo. Látky byly detekovány v prostředí PBS o pH 2 pomocí CV. Jako vzorek byl využit lyzát buněk MCF-7. Lineární rozsah pro G i X byl 0,7–25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Detekční limit G byl 7,5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a X 8 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ [40].

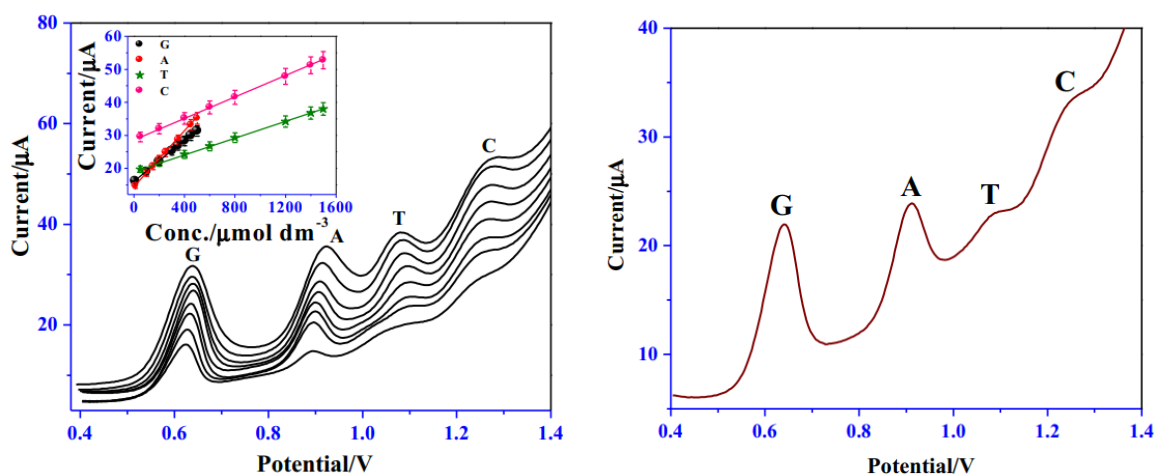


Obrázek 23: (A) CV pro roztoky purinů při různých poměrech X a G. CV skeny pro různé koncentrace X (B) a G (C) spolu s kalibračními závislostmi [40].

1.2.4. Detekce více látek ve směsi

1.2.4.1. Elektroda ze skelného uhlíku

A, G, T a C byly detekovány na GCE modifikované zeolitem pomocí CV a DPV. Zeolit byl dále modifikován iontovou kapalinou a díky tomu docházelo k posunu oxidačních signálů k negativnějším potenciálům, zvýšení intenzity signálů a lepšímu oddělení signálů analytů než v případě nemodifikované GCE. Nejlépe z pěti připravených elektrod reagovala elektroda nano-ZSM-5/MIM – GCE elektroda modifikovaná zeolitem a dopovaná iontovou kapalinou methylimidazolium chloridem. Měření probíhalo v PBS o pH 7,4. Jako reálný vzorek byl použit vzorek DNA telecího brzlíku (Obrázek 24 vpravo). Lineární rozsah G byl 10–500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, A 5–500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, T 50–1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a C 50–1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obrázek 24 vlevo). Limit detekce G dosahoval 4,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, A 7,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, T 9,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a C 5,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [41].

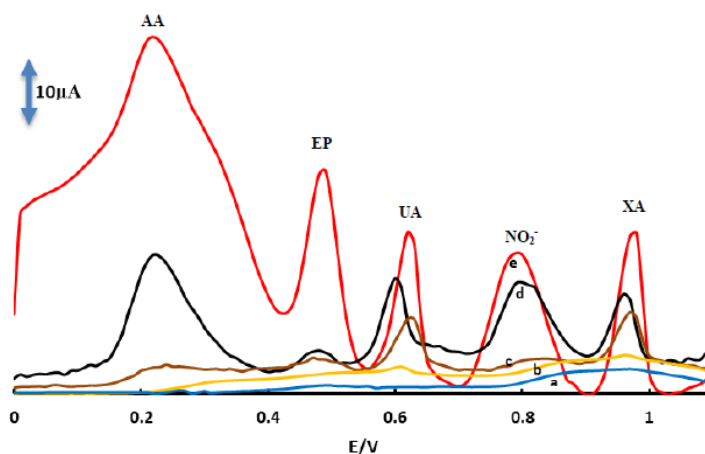


Obrázek 24: DPV G, A, T a C na nano-ZSM-5/MIM–GCE spolu s příslušnými kalibracemi (vlevo). DPV analýza vzorku telecího brzlíku v PBS, pH 7,4 (vpravo) [41].

A, G, UA a dopamin (DA) byly detekovány na GCE modifikované nanozlatem a safraninem T. Jednotlivé modifikační látky byly na sebe postupně vrstveny, přičemž nejvyšší citlivost a nízké detekční limity v porovnání s ostatními modifikacemi poskytovala konfigurace nano-Au/DNA/nano-Au/poly(SFR)/GCE. Měření probíhalo v PBS o pH 7,0 pomocí CV a DPV. Byly použity vzorky lidského séra, moči a DNA z telecího brzlíku. Lineární rozsah stanovení UA byl 90 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ – 12 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, G 9 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ – 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, A 60 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ – 0,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a DA 8 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ – 1,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Limit detekce UA byl 8 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, G 0,5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, A 4 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a DA 0,2 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ [42].

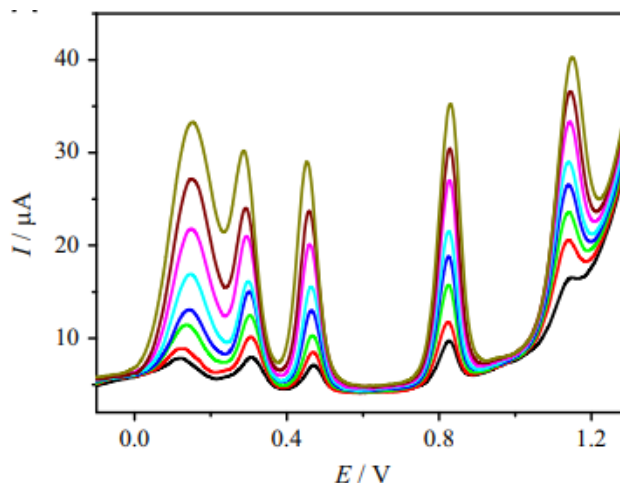
Pro simultánní stanovení AA, adrenalinu (EP), UA, dusitanů a X byly porovnávány GCE s modifikacemi různými formami uhlíku – vícestěnné uhlíkové nanotrubičky (MWCNT),

grafen (GP), bucky ball (BB) a grafit (G). Chitosan (CH) byl využit jako pojivo. GCE/MWCNTs-CH vykazoval největší plochu povrchu, nejlepší separaci signálů, zvýšené proudy oxidačních píků, a také vynikající selektivitu pro simultánní stanovení (Obrázek 25). Měření probíhalo v PBS o pH 2–7 pomocí DPV a CV. Jako reálné vzorky byly využity tablety vitamínu C, lidské sérum a moč. Lineární rozsah AA byl $53,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} - 2,32 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $2,32 - 6,61 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, EP $22,5 - 547 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, UA $2,66 - 50,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, NO_2^- $39,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} - 1,15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $1,15 - 3,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a X $1,33 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} - 52,4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Limity detekce byly $16,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro AA, $3,92 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro EP, $0,37 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro UA, $29,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro NO_2^- a $0,13 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro X [43].



Obrázek 25: DPV směsi AA, EP, UA NO_2^- a XA v PBS, pH 2, (a) GCE/CH, (b) GCE/G-CH, (c) GCE/BB-CH, (d) GCE/GP-CH a (e) GCE/MWCNTs/CH [43].

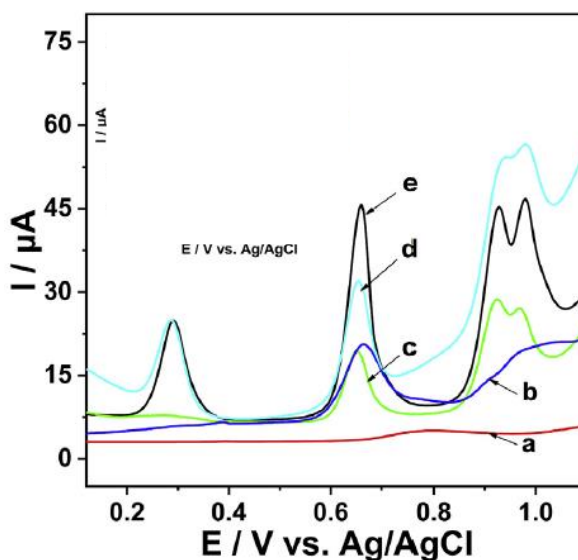
Směs AA, DA, UA, G a A byla analyzována pomocí GCE modifikované PLmox-GO, což je přeoxidovaný polyimidazol a oxid grafenu, díky ní bylo možné detekovat všechny látky najednou (Obrázek 26). Detekce probíhala v PBS o pH 3 pomocí CV a DPV. Lineární rozsah stanovení AA byl $75 - 2275 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, DA $12 - 278 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, UA $3,6 - 249,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, G $3,3 - 103,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a A $9,6 - 215 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Limit detekce AA byl $18 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, DA $0,63 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, UA $0,59 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, G $0,48 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a A $1,28 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [44].



Obrázek 26: Simultánní detekce AA, DA, UA, G a A pomocí DPV na Plmox-GO/GCE, PBS pH 3 [44].

1.2.4.2. Tištěná uhlíková elektroda

Směs A, G, X, HX a UA byla detekována pomocí sítotiskové uhlíkové elektrody modifikované vícečetnými uhlíkovými nanotrubičkami a kvantovými tečkami z oxidu grafenu (GOQDs/MWCNTs/SPCE). Látky byly měřeny v PBS o pH 7,4 pomocí DPV. Byly srovnávány různé povrchy SPCE, z nichž nejlepší byl zmiňovaný GOQDs/MWCNTs/SPCE (Obrázek 27). Signál při 0,29 V je připisován UA, při 0,66 V G + X, při 0,93 V A a při 0,98 V HX. Lineární rozsah UA se pohyboval od 0,5 do 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, G od 0,5 do 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, X od 0,5 do 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, A od 0,95 do 45 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a HX od 0,95 do 45 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Limit detekce UA byl 0,15 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, G a X 0,13 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a A a HX 0,22 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [45].



Obrázek 27: Elektrochemická odezva směsi 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ UA, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ G, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ X, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ A a 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HX na (a) SPCE, (b) SPCE*, (c) MWCNTs/SPCE*, (d) GOQDs/SPCE* a (e) GOQDs/MWCNTs/SPCE*. [45]

Tabulka 3: Příklady detekce adeninu, guaninu, kyseliny močové a xanthinu.

Detekované látky	Vzorek	Materiál elektrody	Měřicí technika	Pufr	Lineární rozsah [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Limit detekce [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Ref.
A, G, T a C	DNA z telecího brzlíku	GCE	DPV, CV	PBS pH 7,4	A: 5–500 G: 10–500	A: 7,0 G: 4,2	[41]
A, G, UA a DA	Lidské sérum, moč, DNA z telecího brzlíku	GCE	CV, DPV	PBS pH 7,0	A: 0,06–0,8 G: 0,009–5 UA: 0,09–12	A: 0,004 G: 0,008 UA: 0,0005	[42]
UA, X, AA, EP, NO^{2-}	Lidské sérum a moč, tablety vitamínu C	GCE	DPV, CV	PBS pH 7	UA: 2,66–50,6 X: 1,33–52,4	UA: 0,37 X: 0,13	[43]
AA, DA, UA, G, A	-	GCE	DPV, CV	PBS pH 3	UA: 3,6–249,6 G: 3,3–103,3 A: 9,6–215	UA: 0,59 G: 0,48 A: 1,28	[44]
A, G, UA, X a HX	-	SPCE	DPV	PBS pH 7,4	A: 0,95–45 G: 0,5–30 UA: 0,5–40 X: 0,5–30	A: 0,22 G: 0,13 UA: 0,15 X: 0,13	[45]

1.3. Pasivace elektrod

Produkty či meziproducty elektrochemických reakcí se mohou adsorbovat s různou afinitou na povrch elektrod, vytvářet polymerní filmy nebo se i přímo vázat a tím elektrodu znečistit a zkomplikovat nebo znemožnit stanovení analytu v opakovaných měřeních [46].

1.3.1. Důsledky pasivace elektrod

Důsledkem pasivace elektrod je snížení rychlosti reakce vedoucí k posunu potenciálu, a to buď k zápornějším hodnotám v případě katodické reakce nebo k pozitivnějším v případě anodické reakce a zároveň dochází k poklesu proudu píku. Například anodická pasivace uhlíkových elektrod probíhá při potenciálech +1,7 V vs. NHE a snižuje rychlost elektrooxidace na tomto materiálu. U voltametrických technik je pokles signálu při opakovaném měření nejčastějším příznakem pasivace elektrody, u amperometrických technik až s časem [46, 47].

1.3.2. Možnosti eliminace pasivace elektrod

Pasivaci elektrod lze potlačit různými způsoby, musí se ovšem dbát na typ senzoru, elektrodový materiál, použitou elektroanalytickou metodu, typ matrice i mechanismus pasivace dané elektrody [46].

1.3.2.1. Obnovení povrchu pracovní elektrody

První možností, jak eliminovat pasivaci, je obnovovat povrch pracovní elektrody po každém měření. Příkladem je kapající rtuťová elektroda, jejíž povrch se periodicky obnovuje. Problémem je však toxicita rtuti. Další možností je nepříliš používaná kapající elektroda na bázi galia, kapalné Cd-Ga a In-Ga elektrody. Dále lze využít uhlíkové pastové elektrody či amalgamové elektrody. Povrch elektrod se dá po každém měření čistit mechanicky, elektrochemicky nebo chemicky [46].

Elektrochemická předúprava uhlíkových elektrod je důležitá pro zlepšení odezvy elektrod. Byl zkoumán vliv parametrů jako oxidační a redukční potenciály, složení elektrolytického roztoku a doba trvání oxidace a redukce. Výsledky studie naznačují, že procesy předúpravy jsou ovlivněny potenciálem, pH a složením roztoku [48].

Např. studie zabývající se účinky předúpravy GCE pomocí katodického ošetření na aktivitu adsorpce a redukce molybdenanu(VI) zjistila, že katodicky předupravená GCE vykazuje výraznou aktivitu vůči adsorpci a redukci tohoto iontu. Analýza rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií ukázala vznik povrchových skupin >C–O během katodizace. Silná interakce mezi ionty Mo(VI) a těmito skupinami >C–O a tvorba Mo(V) je zodpovědná za aktivaci povrchu katodicky předupravené GCE [49].

1.3.2.2. Použití jednorázových elektrod

Další možností, jak eliminovat pasivaci elektrod, je využití jednorázových senzorů. Vliv znečištění by neměl být tak velký, aby nebylo možné provést alespoň několik měření na jedné elektrodě. Tyto elektrody se využívají hlavně ve zdravotnictví kvůli možné křížové kontaminaci vzorků. Vznik odpadu a vyšší cena však toto použití nedovolují ve velkém měřítku. Levnější alternativou jsou elektrody na bázi hliníkových fólií, elektrody s uhlíkovým filmem nebo například uhlíkové tyčinky z použitých baterií [46].

1.3.2.3. Povrchové úpravy zabraňující pasivaci

Zájem o povrchové úpravy k zabránění pasivace elektrod stále roste. Problémem však zůstává omezená robustnost a skladovatelnost modifikovaných elektrod. Elektrody se dají modifikovat různými způsoby, jako je využití membrán, nanočástic oxidů kovů, uhlíkových nanotrubiček, nebo např. hydrogelem. [46, 50]

1.3.2.4. Měření v tekoucích roztocích

Tento způsob redukce pasivace elektrod je vhodný v případě, že jsou produkty nebo meziprodukty elektrochemické reakce zodpovědné za pasivaci. Tím, že se smyjí z povrchu elektrody, se minimalizuje jejich usazování na pracovní elektrodě. Pro monitorování se často používá amperometrická detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii, průtokové injekční analýze a vsádkové injekční analýze [46].

Další možností je zvolit rotující diskovou elektrodu. Díky ní byl například detekován riboflavin na rotující diskové elektrodě s hematitovým filmem, nebo tetracyklin pomocí rotační diskové elektrody z uhlíkových nanotrubiček [46, 51, 52].

1.3.2.5. Použití nových separačních metod

Tyto metody, jako je například membránová separace, by měly zabránit přístupu pasivujících složek na povrch elektrody. Často se používají v analýze biologických kapalin, méně často pak v analýze potravin a životního prostředí [46].

1.3.2.6. Použití materiálů odolnějších vůči pasivaci

Tento způsob zabránění pasivace je nejoblíbenější a nejpříjemnější v praxi. Nejznámějším elektrodovým materiálem odolným vůči pasivaci je borem dopovaný diamant. Mezi další takovéto elektrody patří např. elektrody s uhlíkovým filmem, tužkové grafitové elektrody, papírové senzory nebo nově vyvinuté elektrody z tetraedrického amorfního uhlíku dopovaného dusíkem. Pasivace ovšem závisí i na dalších podmínkách [46].

Borem dopované diamantové elektrody (BDDE) se zkoumají od 80. let a jsou v elektroanalytické chemii velmi oblíbené pro své fyzikální i chemické vlastnosti, mají široké potenciálové okno ve vodném i nevodném prostředí, nízký šum a proud pozadí, jsou mechanicky stabilní, biokompatibilní, a hlavně jsou odolné vůči pasivaci. Vliv na elektroanalytické vlastnosti BDDE má i poměr boru a uhlíku, poměr sp^3 a sp^2 uhlíků a terminace povrchu. Tím vznikají vodivé diamantové elektrody, jelikož bor má nízkou aktivační energii nosiče náboje 0,37 eV. Dalším dopantem může být například fosfor, dusík či síra za přítomnosti boru. BDDE se často dále modifikují, nejčastěji jde o modifikace pomocí

adsorpce elektroaktivní látky, biomolekul vázaných kovalentní vazbou či nanášením kovových nanočástic na povrch BDDE [53, 54].

1.3.2.7. Použití vyhřívaných elektrod

Použitím vyhřívaných uhlíkových nebo kovových elektrod můžeme odstranit látky usazené na povrchu elektrody. Použití je experimentálně náročnější a nepříliš rozšířené, můžeme ale díky němu dosáhnout lepšího poměru signál/šum, transportu hmoty a lepší reakční kinetiky [46].

Byla vyrobena vyhřívaná elektroda z grafitového válce (HGCE), která je podobná ohřívanému kovovému drátu. HGCE mají průměr od 95 do 300 μm a jsou vyrobeny z broušené grafitové tužky. Tyto elektrody se rychle zahřívají a mají vysokou tepelnou stabilitu. Teplotní nárůst na povrchu elektrody závisí na ohřevovém proudu, průměru válce a teplotním koeficientu grafitových válců. HGCE vykazují změnu voltamogramů s rostoucí teplotou. Tyto elektrody jsou kompatibilní s biologickými látkami, což usnadňuje studie jejich elektrochemického chování [55].

1.3.2.8. Přidání silně adsorbovatelných organických sloučenin

Přidáním těchto sloučenin se minimalizuje další zanešení elektrody produkty či meziprodukty elektrochemické reakce. Sice se signál analytu sníží, ale odezva se zároveň stabilizuje a je možné opakovat voltametrické skeny [46].

Jedná se například o nanesení oligo(ethylenglykolového) filmu na zlatou elektrodu. Tato vrstva má výhodu v prevenci nespecifické adsorpce biomakromolekul na povrch, avšak často dochází ke snížení rychlosti heterogenního elektronového přenosu, což je nežádoucí pro biosenzory [56].

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Použité chemikálie

Látka	Výrobce
Adenin	Sigma-Aldrich s.r.o.
Cytosin ($\geq 99\%$)	Sigma-Aldrich s.r.o.
Guanin (98%)	Sigma-Aldrich s.r.o.
Hydroxid sodný	J.T.Baker
Chlorid draselný	Metrohm
Kyselina boritá	CHEMAPOL GROUP, a.s.
Kyselina fosforečná (85% p.a.)	PENTA s.r.o.
Kyselina močová ($>99\%$)	Fisher Scientific, spol. s r.o.
Kyselina octová (99% p.a.)	Lach-Ner s.r.o.
Octan sodný	Sigma-Aldrich s.r.o.
Thymin	Sigma-Aldrich s.r.o.
Xanthin ($>99\%$)	Sigma-Aldrich s.r.o.

2.2. Použitá zařízení

Přístroje	Výrobce
Elektrochemický analyzátor AUTOLAB PGSTAT30, AUT71586	EcoChemie
pH metr InoLab pH 720	WTW
Elektrody	Výrobce
pH elektroda SenTix 81, A103114034	WTW
Ag/AgCl referentní elektroda, 6.0726.100	Metrohm
Elektroda ze skelného uhlíku, 6.1204.300 GC s držákem 6.1241.060	Metrohm
Platinová elektroda OP-600	Radelkis
Uhlíková tištěná elektroda modifikovaná MWCNTs-COOH DRP-110CNT, číslo šarže 190219 a 200624, průměr 4 mm (Obrázek 28 nahoře)	Metrohm
Tištěný senzor s borem dopovanou diamantovou elektrodou, číslo šarže SC220318 a SC220321, průměr 3 mm (Obrázek 28 dole)	Slovenská technická univerzita v Bratislavě



Obrázek 28: SPCE (nahore), BDDE (dole)

2.3. Příprava standardů a základních elektrolytů

2.3.1. Příprava zásobních roztoků markerů oxidačního poškození DNA

Zásobní roztok adeninu byl připraven rozpuštěním 0,0337 g adeninu ve 100 ml 0,1 mol·l⁻¹ roztoku NaOH, který byl připraven rozpuštěním 4 g NaOH v 1 l redestilované vody. Stejným způsobem byly připraveny i ostatní zásobní roztoky. Pro roztok guaninu bylo naváženo 0,0377 g guaninu, pro roztok cytosinu 0,0277 g cytosinu, pro roztok thyminu 0,0315 g thyminu, pro roztok kyseliny močové 0,042 g kyseliny močové a pro roztok xanthinu 0,038 g xanthinu. Zásobní roztoky byly připraveny o koncentraci 0,0025 mol·l⁻¹.

2.3.2. Příprava pufrů

BRB byl připraven o koncentraci jednotlivých kyselých složek 0,04 mol·l⁻¹. Bylo naváženo 2,48 g H₃BO₃, odměřeno 2,73 ml H₃PO₄ a 2,27 ml CH₃COOH. Tyto složky byly rozpuštěny v redestilované vodě, která byla do 1 l doplněna v odměrné baňce po rysku. Úprava pH na požadovanou hodnotu (2 – 11) byla provedena přidáním 0,2 mol·l⁻¹ roztoku NaOH, který byl připraven rozpuštěním 2 g NaOH v 250 ml redestilované vody, a přesná hodnota pH byla zjištěna pomocí nakalibrované pH měrné elektrody.

Octanový pufr (AP) byl připraven o stejné koncentraci složek jako BRB. Na jeho přípravu bylo v redestilované vodě rozpuštěno 0,23 ml CH₃COOH a 0,328 g CH₃COONa a doplněno do 100ml odměrné baňky po rysku. V případě AP o pH 5,5 bylo místo 0,328 g CH₃COONa naváženo 1,8 g CH₃COONa.

2.3.3. Příprava měřicích roztoků

Měřicí roztoky o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ jednotlivých markerů oxidačního poškození DNA byly připraveny ze zásobních roztoků těchto látek a pufrů. Pipetované objemy jednotlivých látek byly uzpůsobeny výslednému objemu roztoku. Později byl do roztoku přidáván 3M roztok KCl v takovém množství, aby výsledná koncentrace chloridů byla $0,09 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

2.3.4. Voltametrické techniky

Před optimalizací amplitudy a času pulzu u diferenční pulzní voltametrie byla všechna měření prováděna za následujících podmínek: počáteční potenciál +0 V, konečný potenciál +1,7 V (dle detekované látky, většinou do +1,3 V), skenovací rychlost +25 mV/s, doba trvání pulzu +50 ms a amplituda 50 mV.

U square wave voltametrie byly podmínky měření před optimalizací frekvence a amplitudy následující: počáteční potenciál +0 mV, konečný potenciál +1,3 V (dle detekované látky), skenovací rychlost 125 mV/s, amplituda +20 mV a frekvence 25 Hz.

3. Výsledky a diskuze

Cílem diplomové práce bylo studium elektrochemických vlastností jednorázových planárních senzorů a jejich stability při opakovaném nebo dlouhodobějším měření látek, které mohou indikovat poškození DNA. K experimentům byly využity tři typy elektrod: tištěná uhlíková elektroda modifikovaná uhlíkovými nanotrubičkami s karboxy skupinami (SPCE), borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE), připravená chemickou depozicí z par, a elektroda ze skelného uhlíku (GCE), která sloužila k porovnání. Senzor s tištěnou uhlíkovou elektrodou měl dále pomocnou elektrodu z uhlíku a pseudoreferentní elektrodu ze stříbra. Senzor s BDDE měl pomocnou elektrodu také z BDDE a referentní část byla ze stříbrné vrstvy elektrolyticky potažené AgCl.

V rámci diplomové práce byly sledovány pouze oxidační procesy jednotlivých látek, protože při redukci by bylo nutné odstranit z měřených roztoků kyslík, který by rušil stanovení. Jednorázové senzory by měly sloužit k rychlé detekci míry poškození DNA bez zdlouhavé přípravy měření. K detekci látek byla využita diferenční pulzní voltametrie (DPV) a square wave voltametrie (SWV). Opakovaná měření látek jsou v grafech barevně odlišena, nejsytější barva je vždy první měření, nejsvětlejší pak třetí měření.

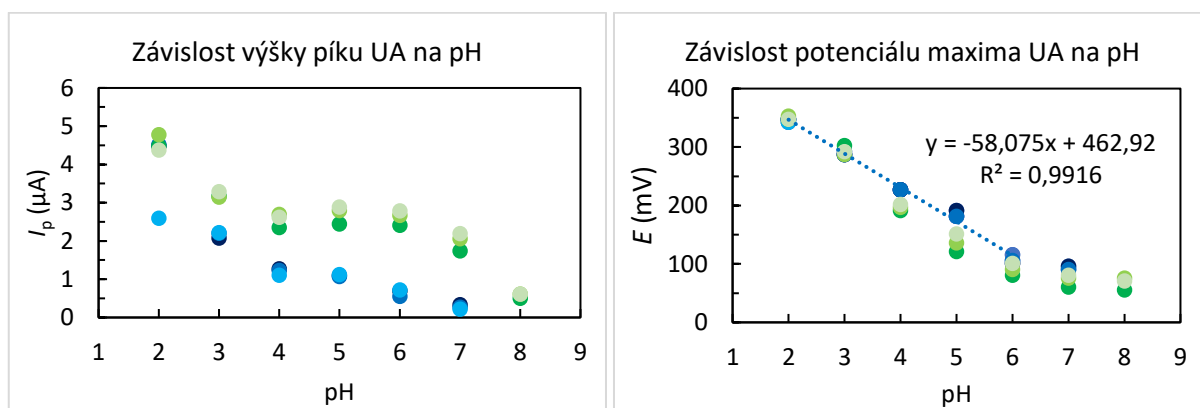
3.1. Elektrochemická oxidace vybraných metabolitů oxidačního poškození DNA na SPCE

Po předběžných testech byly pro měření vybrány následující látky: kyselina močová (UA), xanthin (X), guanin (G) a adenin (A). Cytosin (C) ani thymin (T) nakonec nebyly dále testovány, neboť C se oxiduje až při příliš vysokých potenciálech a citlivost detekce T nedosahuje úrovně jako ostatní zvolené látky.

Vybrané markery oxidačního poškození DNA byly proměřeny od pH 2 v BRB na SPCE pomocí DPV. Každý bod pH byl proměřen 3x na jedné elektrodě, či 3x s využitím nových elektrod pro každý bod pH.

3.1.1. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci kyseliny močové

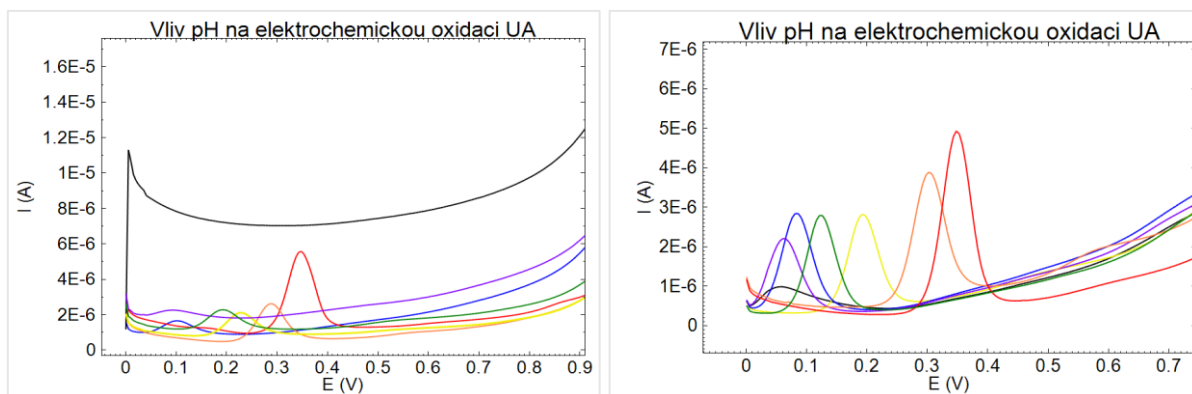
Roztok UA byl proměřen od pH 2 do pH 8. Při použití jedné elektrody pro všechny hodnoty pH (Obrázek 29 modrá, Obrázek 30 vlevo) byl průběh výšek píku UA odlišný než při měření pokaždé s novou elektrodou (Obrázek 29 zelená, Obrázek 30 vpravo). Výška signálů UA měřená jednou elektrodou se po dalších měřeních postupně snižovala, na rozdíl od použití vždy nové SPCE pro každý roztok, kdy se výška zvyšovala. Lze usuzovat na pasivaci elektrody z předchozích měření při nižším pH, která může zkreslovat následující dalšího roztoku. Nejintenzivnější proudové signály UA byly zjištěny při pH 2, se zvyšujícím se pH odezva klesá a signály jsou širší.



Obrázek 29: Závislost výšky píku (vlevo) a potenciálu maxima píku (vpravo) UA na pH na jedné SPCE (modrá) a s novou SPCE při každém měření (zelená). DPV, BRB.

Při nízkém pH je potenciál maxima píku UA kolem 350 mV a se zvyšujícím se pH se oxidační signál posouvá směrem k negativnějším potenciálům (Obrázek 29 vpravo a Obrázek 30). Směrnice lineární části této závislosti se blíží teoretické Nernstově odezvě, což indikuje, že při oxidaci UA je potřebný stejný počet elektronů a protonů. Posun maxima signálu

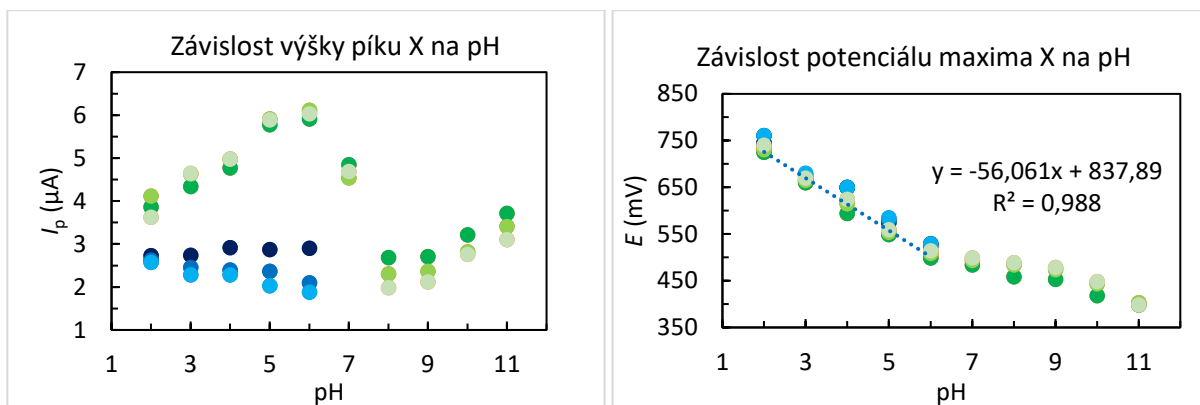
v závislosti na pH je stejný při měření jak na jedné elektrodě, tak i při měření pokaždé s novou elektrodou.



Obrázek 30: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci UA na jedné SPCE (vlevo) a s novou SPCE při každém měření (vpravo). DPV, BRB, pH 2 (červená), pH 3 (oranžová), pH 4 (žlutá), pH 5 (zelená), pH 6 (modrá), pH 7 (fialová) a pH 8 (černá).

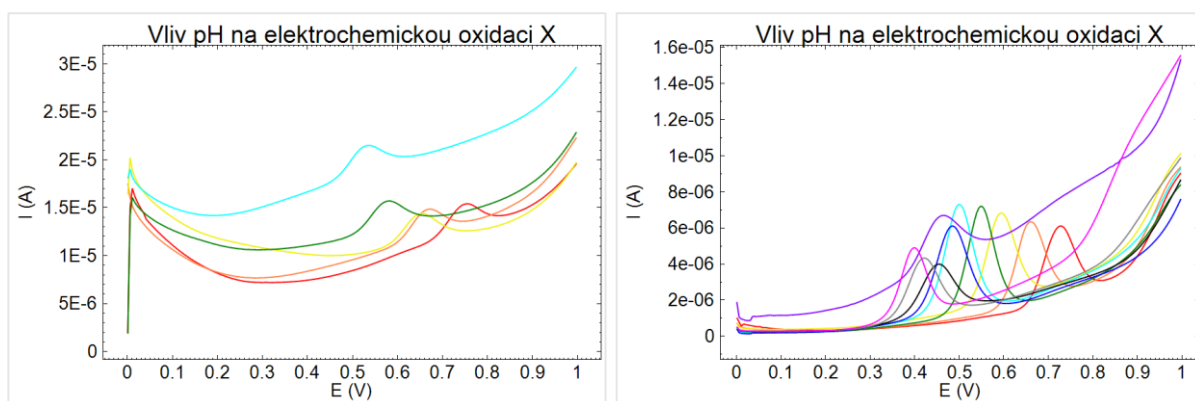
3.1.2. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci xanthinu

Roztok xanthinu byl proměřen od pH 2 do pH 11 (na jedné elektrodě do pH 6), každý pufr o daném pH byl proměřen 3x. Při použití jedné elektrody (Obrázek 31 modrá a Obrázek 32 vlevo) je průběh výšky signálu oxidace X opět odlišný než u měření každého pH s novou elektrodou (Obrázek 31 zelená a Obrázek 32 vpravo). Opět lze usuzovat na pasivaci elektrody z předchozích měření, podobně jako v případě UA. Intenzita signálu při měření na jedné elektrodě (Obrázek 31 modrá a Obrázek 32 vlevo) je při pH 2–6 přibližně stejná, s opakovaným měřením se snižuje, navíc se zvyšují i proudy pozadí. Při použití nové elektrody pro každé měření (Obrázek 31 zelená a Obrázek 32 vpravo) intenzita signálů až do pH 6 značně narůstá, pak prudce klesá, a nakonec mírně narůstá. Nejnižší signály jsou při pH 8 a 9. Od těchto hodnot pH také dochází k výraznějšímu poklesu výšky píku po opakovaném měření, který nebyl pozorován při nižších hodnotách pH.



Obrázek 31: Závislost výšky píku (vlevo) a potenciálu maxima píku (vpravo) X na pH na jedné SPCE (modrá) a s novou SPCE při každém měření (zelená). DPV, BRB

Při nízkém pH je potenciál maxima píku X kolem 750 mV, se zvyšujícím se pH se oxidační signál posouvá směrem k negativnějším potenciálům (Obrázek 31 vpravo, Obrázek 32). Směrnice přímky do pH 6 se stejně jako u UA blíží teoretické Nernstově odezvě, což naznačuje, že dochází k výměně stejného množství protonů a elektronů. Charakter závislosti maxima píku na pH je stejný při měření na jedné elektrodě i při měření na jednotlivých elektrodách.



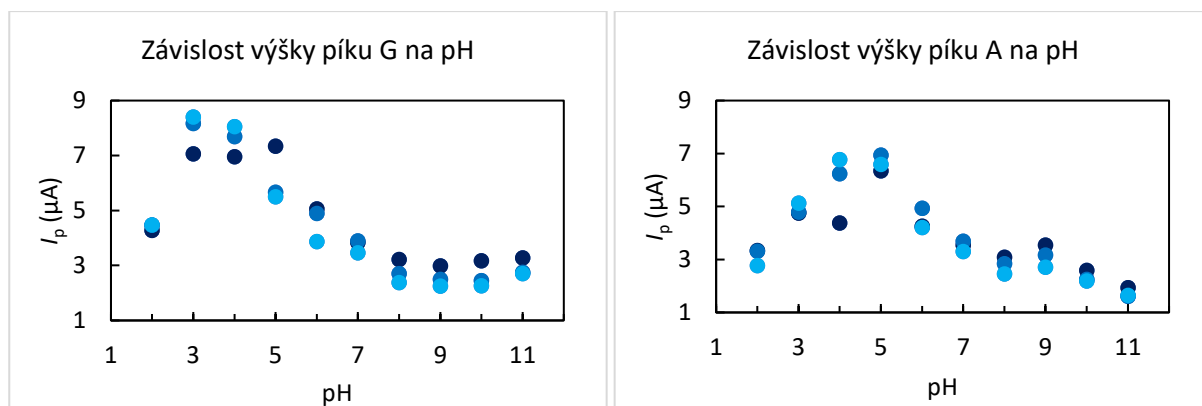
Obrázek 32: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci X na jedné SPCE (vlevo) a s novou SPCE při každém měření (vpravo). DPV, BRB, pH 2 (červená), pH 3 (oranžová), pH 4 (žlutá), pH 5 (zelená), pH 6 (azurová), pH 7 (modrá), pH 8 (fialová), pH 9 (černá), pH 10 (šedá), pH 11 (růžová).

3.1.3. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci směsi adeninu a guaninu

Adenin a guanin byly měřeny ve směsi, jejich signály jsou vzájemně dostatečně oddělené (Obrázek 35). Vzhledem k předchozím výsledkům a pravděpodobné pasivaci elektrod byla pro každé měření použita nová SPCE elektroda.

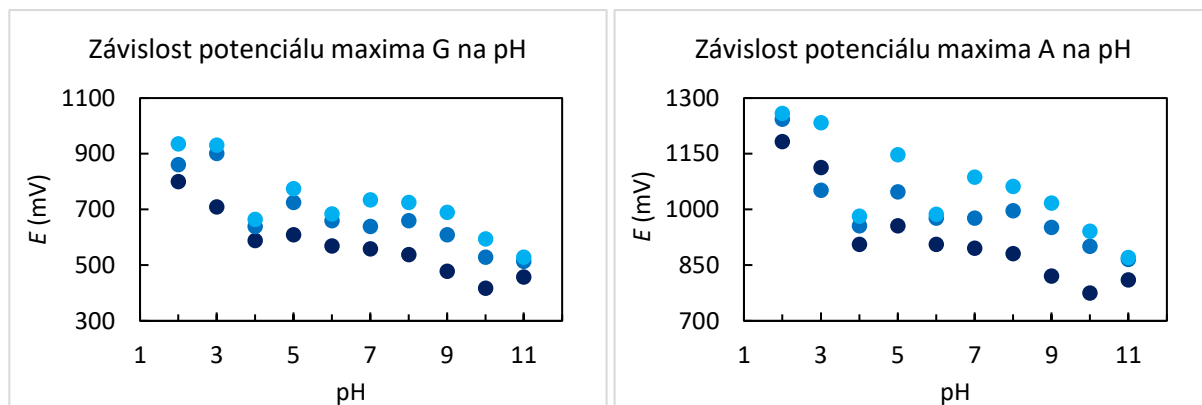
Největší intenzita proudové odezvy pro oxidaci G je v rozmezí pH 3–5 (Obrázek 33 vlevo), mimo tento interval výška klesá až do pH 8, kdy už je pak téměř stejná. U pH 3 a 4 dochází

k nárůstu signálu s opakovaným měřením. Elektrochemická oxidace A poskytuje nejintenzivnější signál při pH 5 (Obrázek 33 vpravo), při vyšších pH signál klesá. S opakovaným měřením výšky píků kolísají.

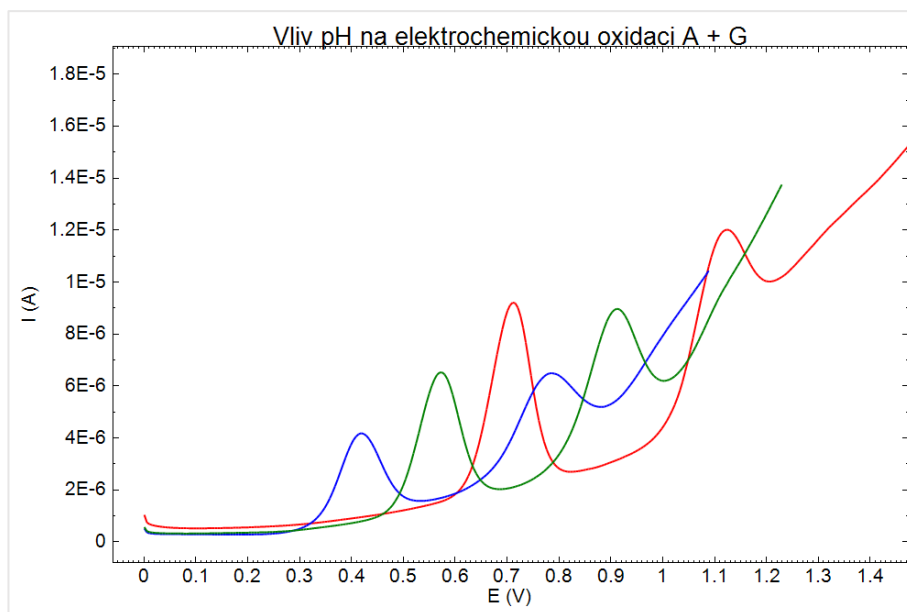


Obrázek 33: Závislost výšky píku G (vlevo) a A (vpravo) na pH na SPCE. DPV, BRB.

V kyselějších pufrů (pH 2–4) se maxima signálů posouvají k negativnějším potenciálům jak u G, tak i u A (Obrázek 34). Od pH 4 do pH 11 se píky posouvají s menším trendem než v kyselější oblasti a od pH 11 se vrací zpět k pozitivnějším potenciálům, což indikuje složitější elektrochemický děj při oxidaci G a A. Potenciály maxim píků obou látek se značně posouvají s opakovaným měřením k pozitivnějším potenciálům (Obrázek 34). Na voltamogramu (Obrázek 35) je dokumentován posun signálů G a A při různém pH.



Obrázek 34: Závislost potenciálu maxima píku G (vlevo) a A (vpravo) na pH na SPCE. DPV, BRB.



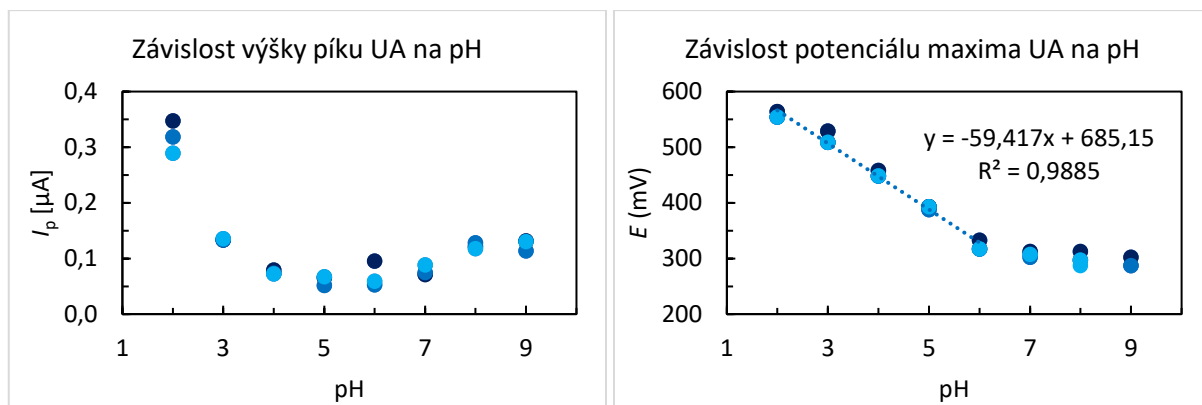
Obrázek 35: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci G (první pík) a A (druhý pík) na SPCE. DPV, BRB, pH 3 (červená), pH 6 (zelená), pH 10 (modrá).

3.2. Elektrochemická oxidace vybraných metabolitů oxidačního poškození DNA na BDDE

Roztoky vybraných markerů poškození DNA byly proměřeny na BDDE v BRB od pH 2 pomocí DPV. Každé měření daného pH bylo provedeno 3x na jedné elektrodě u všech látek a směsí, použití nové elektrody pro každý bod pH bylo praktikováno pouze u směsí látek z důvodu vyšší ceny elektrod a jejich omezeného počtu, který byl pro měření v rámci diplomové práce k dispozici.

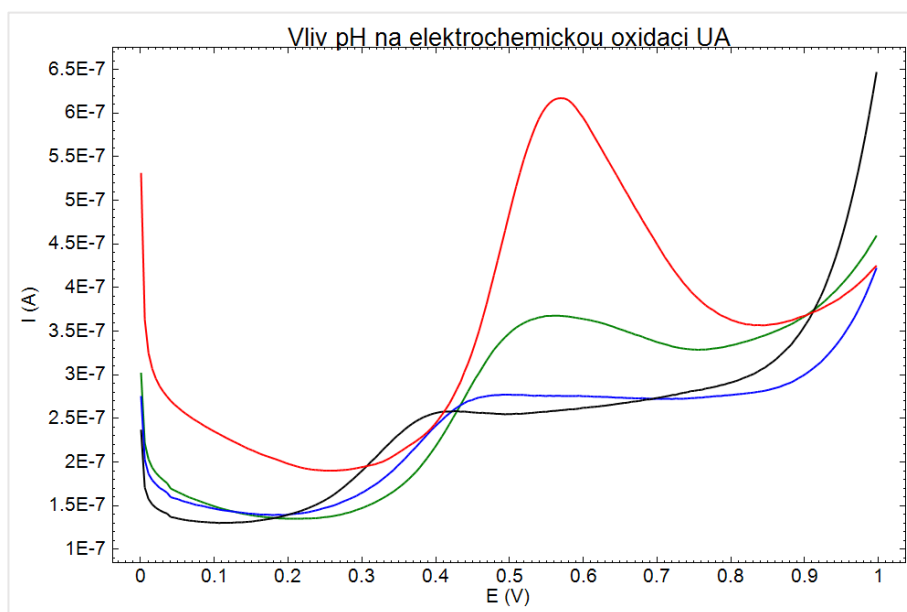
3.2.1. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci kyseliny močové

Roztok UA byl měřen na jedné elektrodě při pH 2–9. Nejintenzivnější signál vykazuje UA v pufru o pH 2 (Obrázek 36 vlevo), ale signály při opakovaném měření klesají. Se zvyšujícími se hodnotami pH signál oxidace UA klesá, v zásaditém pH dochází k mírnému nárůstu. Píky UA jsou na rozdíl od SPCE na BDDE poměrně široké (Obrázek 37).



Obrázek 36: Závislost výšky (vlevo) a potenciálu maxima (vpravo) píku UA na pH na BDDE. DPV, BRB.

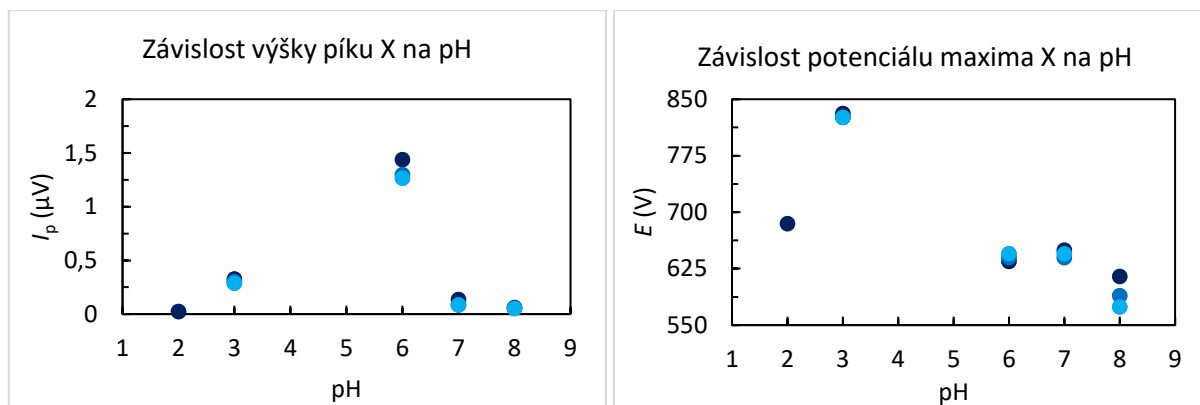
Posun vrcholů píků od pH 2 do pH 6 klesá s Nernstovskou směrnici, při vyšších hodnotách pH se již potenciály maxim dále téměř nemění (Obrázek 36 vpravo). Celková závislost na pH je podobná jako u SPCE.



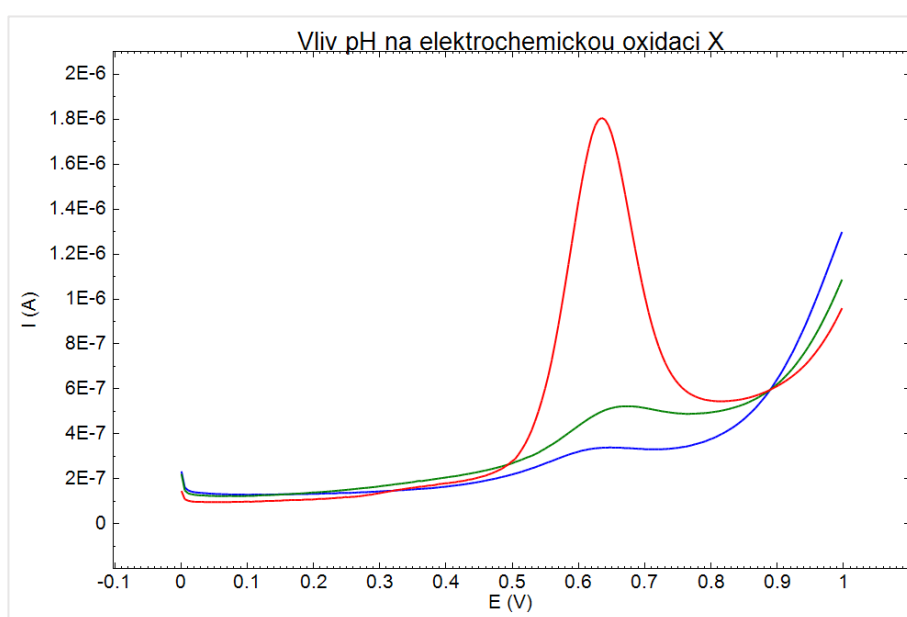
Obrázek 37: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci UA na BDDE. DPV, BRB, pH 2 (červená), pH 3 (zelená), pH 4 (modrá), pH 5 (černá).

3.2.2. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci xanthinu

Pro měření X byla použita stejná elektroda jako pro UA. Signál při pH 2 a 3 je velice nízký (Obrázek 38 vlevo), od pH 4 již nebyl pozorován žádný. Proto byla od pH 6 použita nová elektroda, díky které byl xanthin detekován při pH 6, 7 a 8 (Obrázek 39). V zásaditém prostředí se signál (Obrázek 38 vpravo) posouvá k negativnějším potenciálům, v kyselém k pozitivnějším.



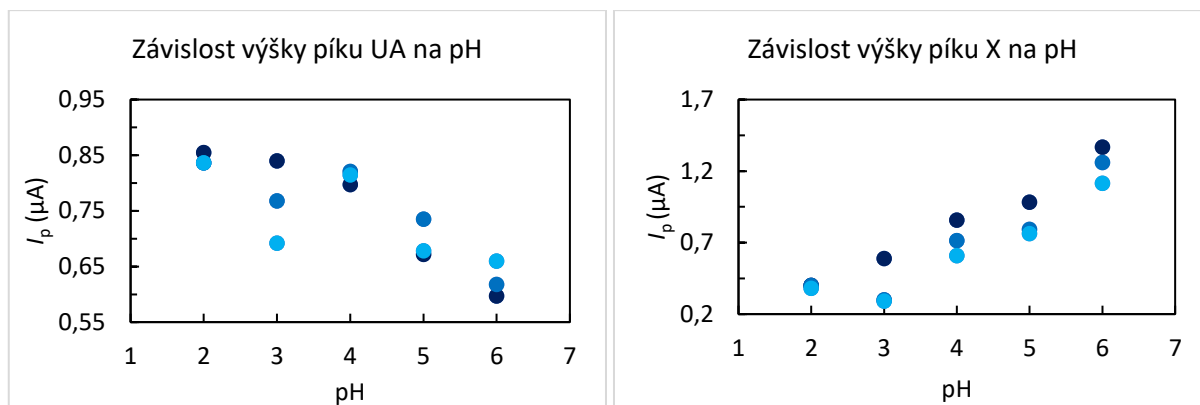
Obrázek 38: Závislost výšky (vlevo) a potenciálu maxima (vpravo) píku X na pH na BDDE, DPV, BRB



Obrázek 39: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci X na BDDE. DPV, BRB, pH 6 (červená), pH 7 (zelená), pH 8 (modrá).

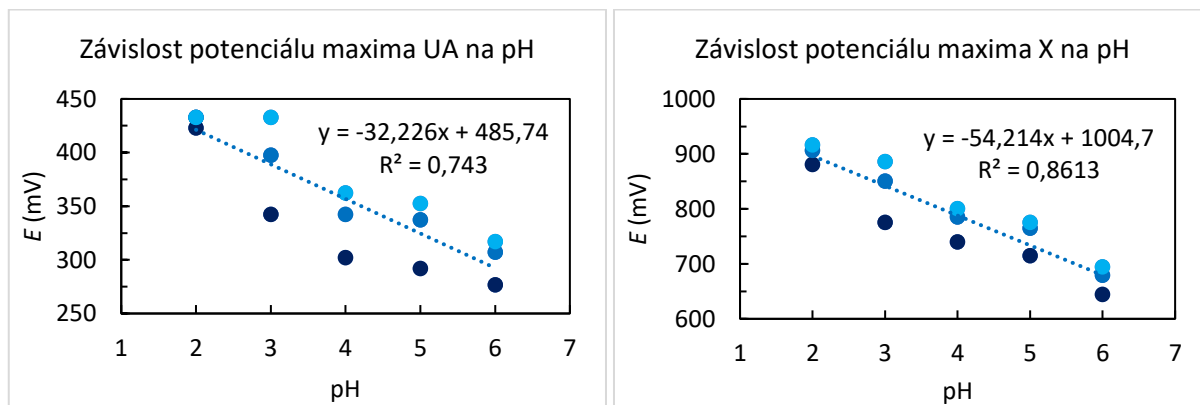
3.2.3. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci směsi kyseliny močové a xanthinu

V případě směsi UA a X byla pro každé měření použita nová elektroda, aby byly výsledky odpovídající. Směs byla proměřena pouze v kyselých a neutrálním pH, protože předchozí výsledky prozrazovaly, že intenzivnější signály obou látek budou právě v kyselém prostředí. UA poskytuje největší signál při pH 2 (Obrázek 40 vlevo) stejně jako na SPCE, s vzrůstajícím pH píky klesají. X poskytuje nejvyšší oxidační signál při pH 6 (Obrázek 40 vpravo), se snižujícím se pH proudy píků klesají.

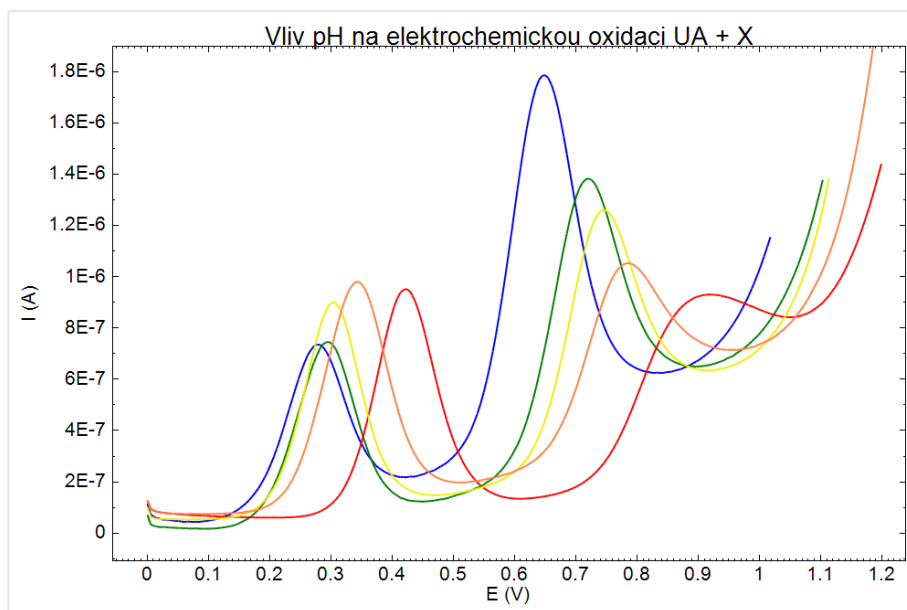


Obrázek 40: Závislost výšky píku UA (vlevo) a X (vpravo) na pH na BDDE. DPV, BRB.

Potenciály vrcholů píků UA i X (Obrázek 41) se posouvají směrem k negativnějším potenciálům se vzrůstajícím pH základního elektrolytu (Obrázek 42). Při oxidaci X je směrnice výsledné závislosti přibližně Nernstovská, dochází k výměně stejného počtu elektronů a protonů, což odpovídá i předchozím experimentům na SPCE. Při oxidaci UA ve směsi směrnice závislosti vychází po regresi všech bodů měření okolo 32 mV, nicméně směrnice je strmější při vyhodnocení pouze z prvních měření na nových elektrodách. Při pH 3 dochází s opakovaným měřením ke značnému posunu signálů ve směsi, což bylo zřejmě způsobeno přítomností X, který mohl reagovat s referentní elektrodou.



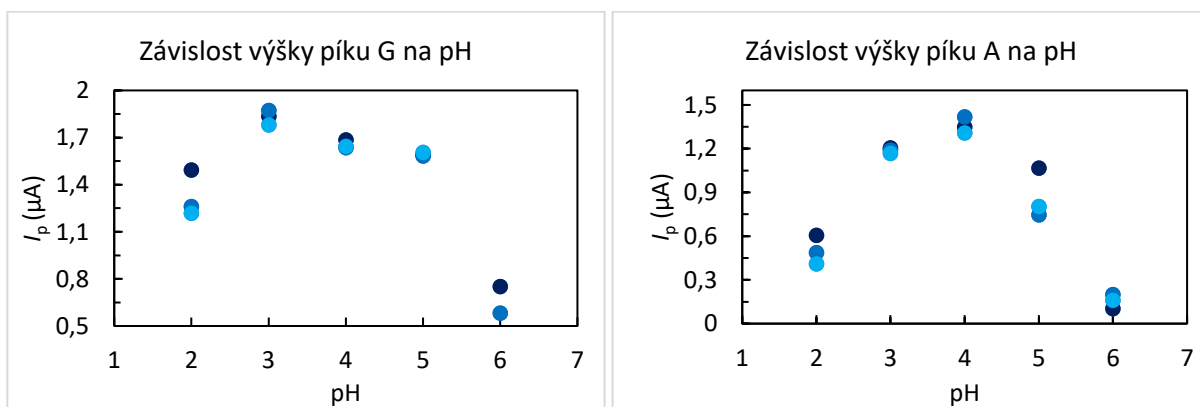
Obrázek 41: Závislost potenciálu maxima píku UA (vlevo) a X (vpravo) na pH na BDDE. DPV, BRB.



Obrázek 42: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci UA (první pík) a X (druhý pík) na BDDE. DPV, BRB, pH 2 (červená), pH 3 (oranžová), pH 4 (žlutá), pH 5 (zelená), pH 6 (modrá).

3.2.4. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci směsi guaninu a adeninu

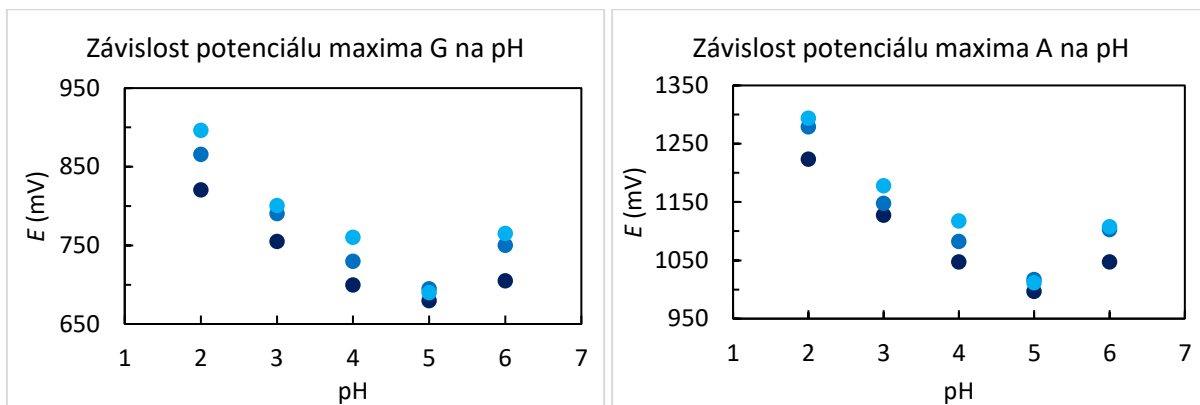
Směs G a A byla stejně jako v případě UA a X měřena s využitím nových elektrod pro každý pufr o daném pH, opět od pH 2 do pH 6, jelikož podobně jako u SPCE nejsou jejich signály v zásaditém prostředí tak intenzivní jako v prostředí kyselém. Stejně tak jsou nejintenzivnější signály G i A na BDDE v rozmezí pH 3–5 (Obrázek 43). Při pH 6 klesá proud píku přibližně o dvě třetiny oproti nejintenzivnějším hodnotám, dochází ale také k rozšíření proudového signálu (Obrázek 45).



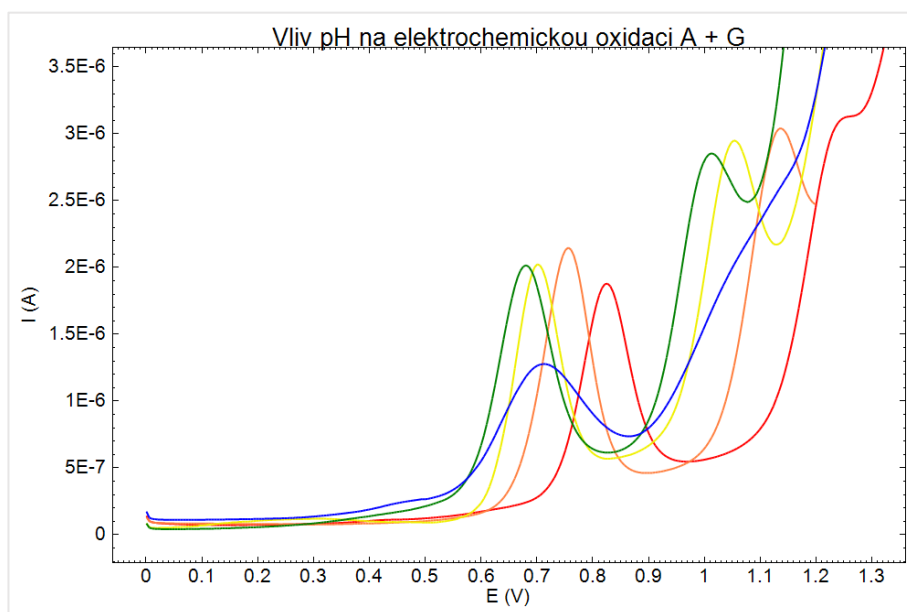
Obrázek 43: Závislost výšky píku G (vlevo) a A (vpravo) na pH na BDDE. DPV, BRB.

Při pH 2 se A oxiduje na BDDE při vysokých potenciálech (cca 1220 mV). Při zvyšujícím se pH se oxidační potenciály G (Obrázek 44) i A snižují až do pH 6, kdy opět dochází k nárůstu oxidačního potenciálu, který je srovnatelný s oxidačním potenciálem A i G při pH 4. Posun

maxim píků klesá víc u A než u G. Opakovaná měření v jednom roztoku také ukazují velký posun maxim píků do pozitivnějších potenciálů, který je ale menší než u SPCE, kde k tomuto jevu také dochází. Je to pravděpodobně způsobeno změnami na referentní části senzoru, kdy se G nebo A mohou na tuto vrstvu vázat a ovlivňovat tak její potenciál.



Obrázek 44: Závislost potenciálu maxima píku G (vlevo) a A (vpravo) na pH na BDDE. DPV, BRB.



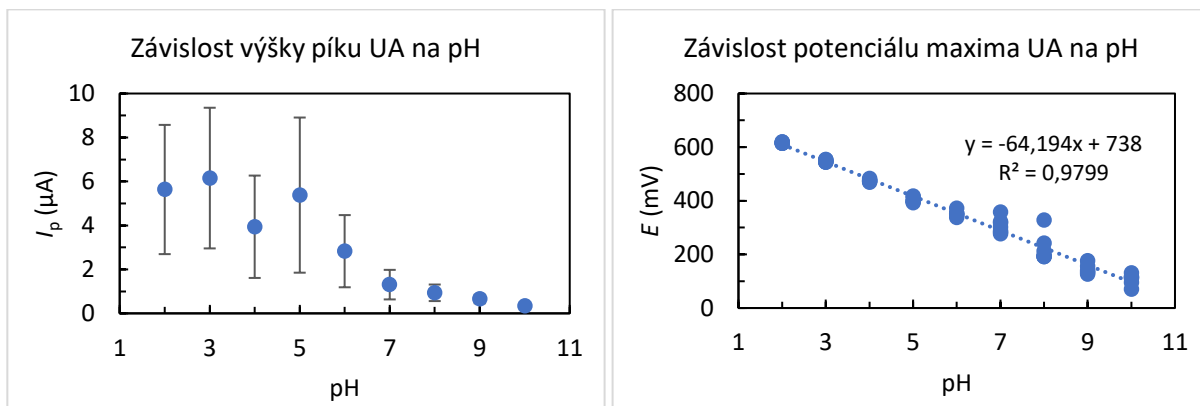
Obrázek 45: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci G (první pík) a A (druhý pík) na BDDE. DPV, BRB, pH 2 (červená), pH 3 (oranžová), pH 4 (žlutá), pH 5 (zelená), pH 6 (modrá).

3.3. Elektrochemická oxidace vybraných metabolitů oxidačního poškození DNA na GCE

Roztoky vybraných markerů poškození DNA byly proměřeny od pH 2 v BRB na GCE pomocí DPV. GCE byla leštěna na lešticí tkanině s brusným práškem z Al_2O_3 mezi každým měřením, aby se zjistil vliv leštění na velikosti odezvy, případně poté mezi měřeními každého pufru o daném pH.

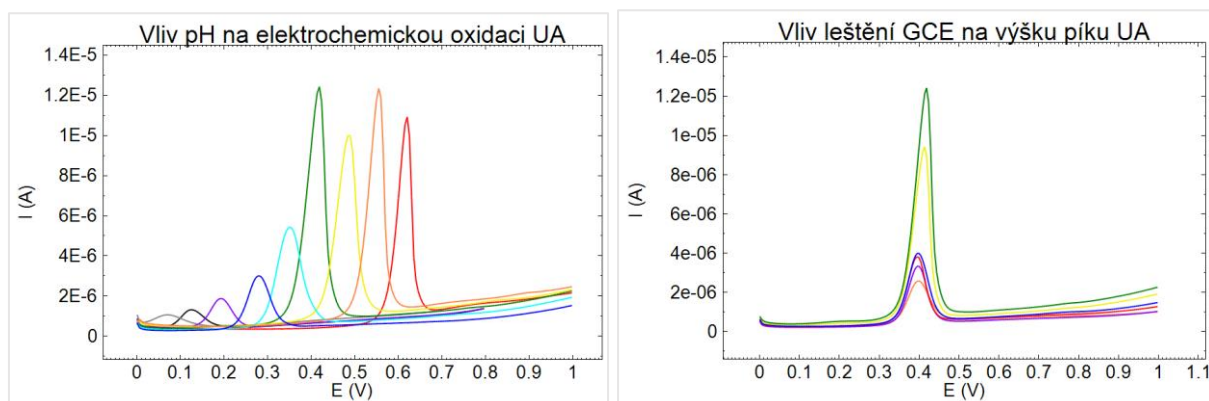
3.3.1. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci kyseliny močové

UA byla proměřena při pH 2–10, každé měření bylo provedeno 6x a mezi každým měřením byla elektroda přešetřena. V kyselém prostředí lze pozorovat vysoký rozptyl hodnot, intenzita signálu tedy značně závisí na kvalitě leštění (Obrázek 47 vpravo). Proudové píkы UA jsou stejně jako při měření na SPCE a BDDE vyšší v kyselém prostředí (Obrázek 46 vlevo).



Obrázek 46: Závislost výšky (vlevo) a potenciálu maxima (vpravo) píku UA na pH na GCE. DPV, BRB.

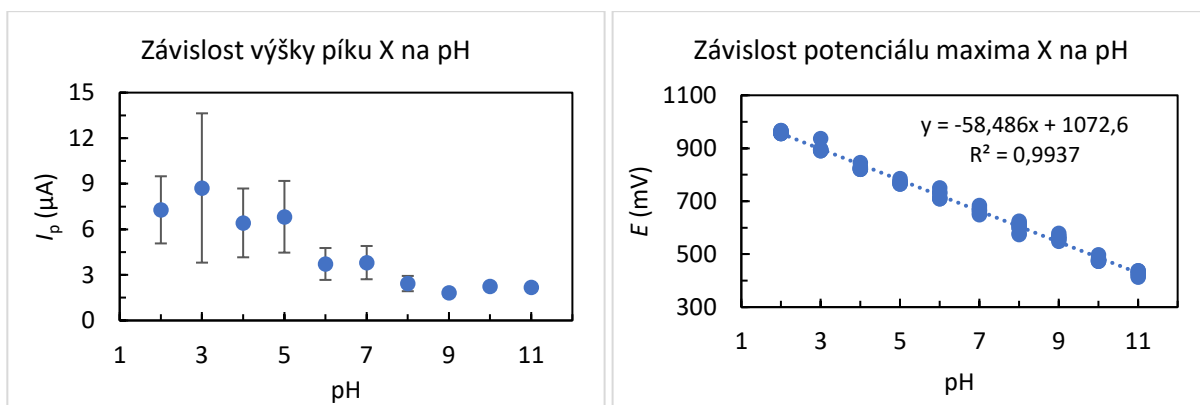
Posun maxim signálů (Obrázek 46 vpravo) odpovídá přibližně Nernstově teoretické odezvě 59,2 mV, čímž se potvrzuje fakt, že při oxidaci UA dochází k výměně stejného počtu elektronů a protonů, jak se předpokládalo u SPCE i BDDE. Posun píků je v celé škále pH přibližně stejný, v kyselejší oblasti dochází k jejich rozšiřování (Obrázek 47 vlevo, vybrány vždy nejvyšší signály měření daného pH).



Obrázek 47: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci UA na GCE (vlevo): pH 2 (červená), pH 3 (oranžová), pH 4 (žlutá), pH 5 (zelená), pH 6 (azurová), pH 7 (modrá), pH 8 (fialová), pH 9 (černá), pH 10 (šedá). Vliv leštění GCE na výšku píku UA při pH 5 (vpravo): 1. měření (červená), 2. měření (oranžová), 3. měření (žlutá), 4. měření (zelená), 5. měření (modrá), 6. měření (fialová). DPV, BRB.

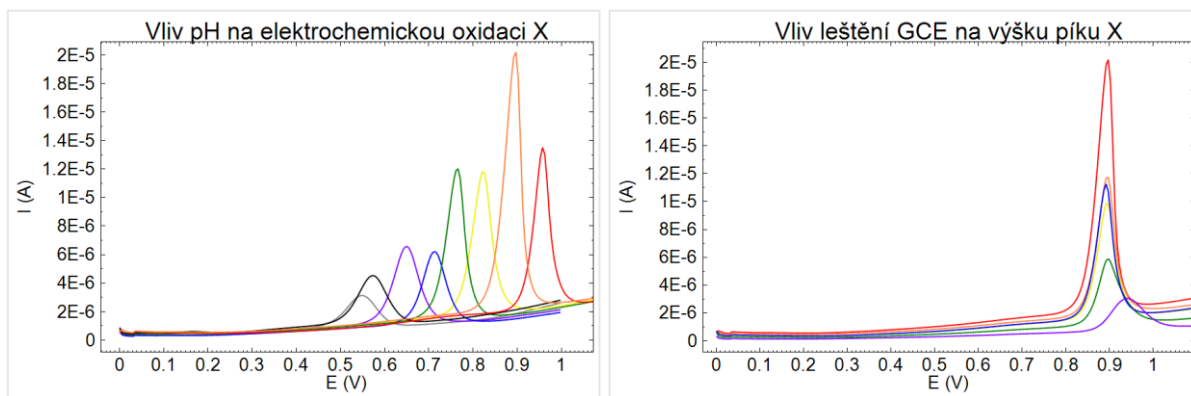
3.3.2. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci xanthinu

Roztok X byl proměřen při pH 2–10. Nejvyšší signály poskytují analýzy v kyselém prostředí (Obrázek 48), jak již ukázalo měření na SPCE i na BDDE. K největšímu rozptylu hodnot proudů píků došlo při pH 3, velikost jejich hodnot velmi závisí na míře vyleštění elektrody (Obrázek 49 vpravo).



Obrázek 48: Závislost výšky (vlevo) a potenciálu maxima (vpravo) píku X na pH na GCE, DPV, BRB

Posuny potenciálů maxima píků (Obrázek 48 vpravo) opět dosahují teoretické Nernstovy odezvy, stejně jako u UA je tedy potvrzeno, že při oxidaci X dochází k výměně stejného počtu elektronů a protonů. V kyselější oblasti pH opět dochází k rozšiřování píků (Obrázek 49 vlevo, vybrány vždy nejvyšší signály měření daného pH).

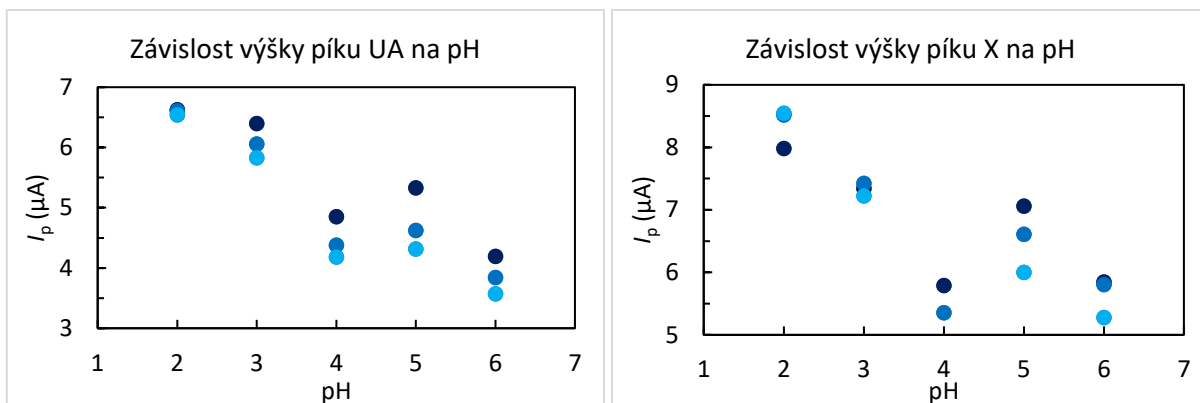


Obrázek 49: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci X na GCE (vlevo): pH 2 (červená), pH 3 (oranžová), pH 4 (žlutá), pH 5 (zelená), pH 6 (modrá), pH 7 (fialová), pH 8 (černá), pH 9 (šedá). Vliv leštění GCE na výšku píku X při pH 5 (vpravo): 1. měření (červená), 2. měření (oranžová), 3. měření (žlutá), 4. měření (zelená), 5. měření (modrá), 6. měření (fialová). DPV, BRB.

3.3.3. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci směsi kyseliny močové a xanthinu

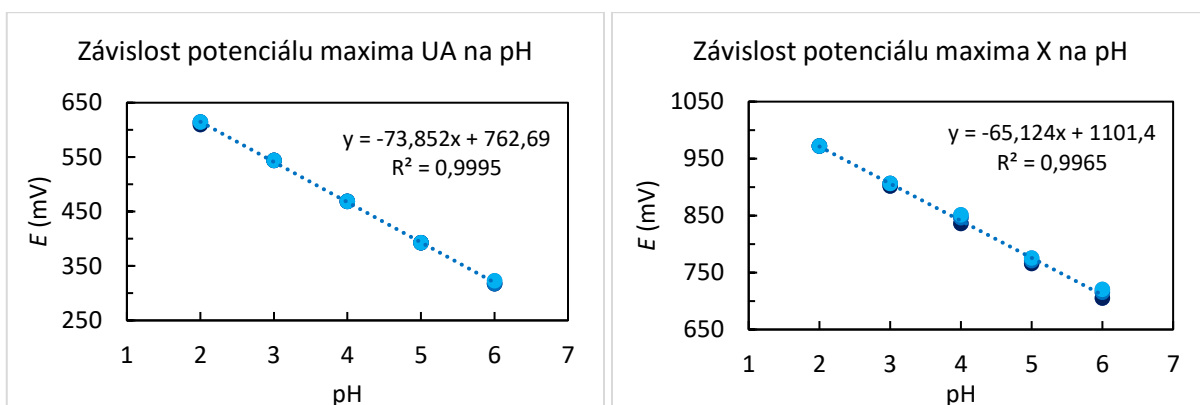
Směs UA a X byla proměřena na GCE pouze v kyselé oblasti (Obrázek 52), ve které jsou signály intenzivnější. Měření bylo opakováno pouze 3x a mezi opakováním měření již

elektroda nebyla znovu leštěna. Velikosti signálů dosahují průměru předchozích měření jak u UA, tak i u X (Obrázek 50).

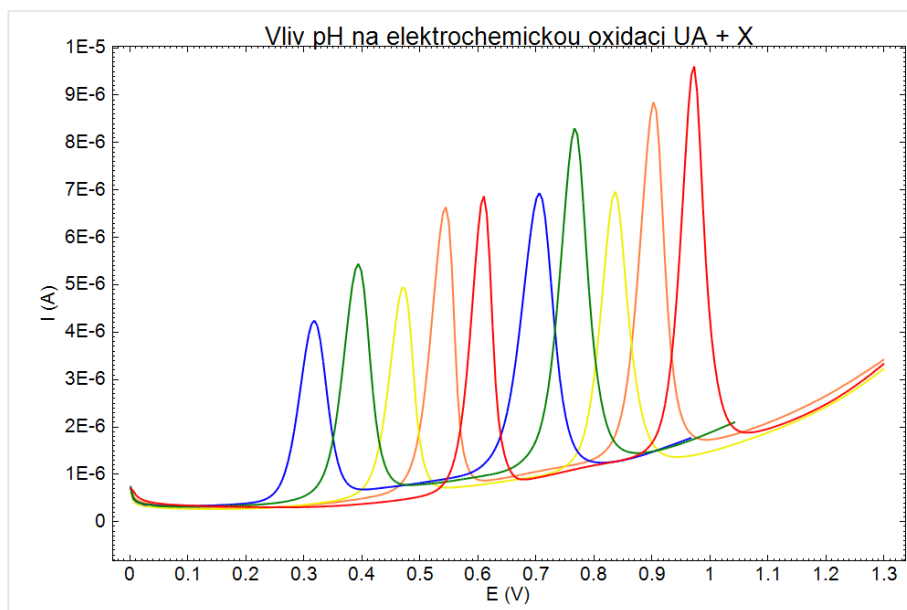


Obrázek 50: Závislost výšky píku UA (vlevo) a X (vpravo) na pH na GCE. DPV, BRB.

Posuny maxim signálů jsou o něco větší než u těchto látek měřených samostatně. Směrnice závislosti potenciálu maxima na pH u A byla $73,8 \text{ mV pH}^{-1}$ (Obrázek 51 vlevo), posuny píků pro X se blíží Nernstově směrnicí $59,2 \text{ mV pH}^{-1}$ (Obrázek 51 vpravo).



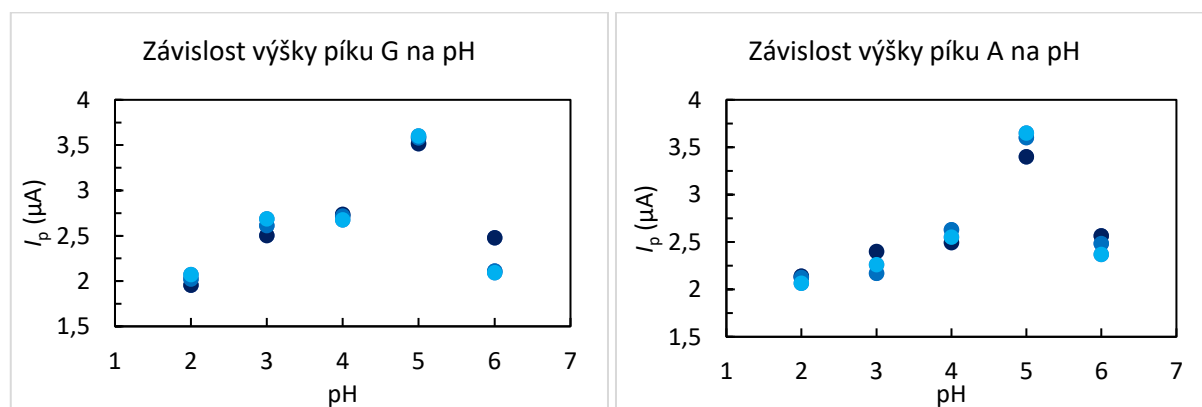
Obrázek 51: Závislost potenciálu maxima píku UA (vlevo) a X (vpravo) na pH na GCE. DPV, BRB.



Obrázek 52: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci směsi UA a X na GCE. DPV, BRB, pH 2 (červená), pH 3 (oranžová), pH 4 (žlutá), pH 5 (zelená), pH 6 (modrá).

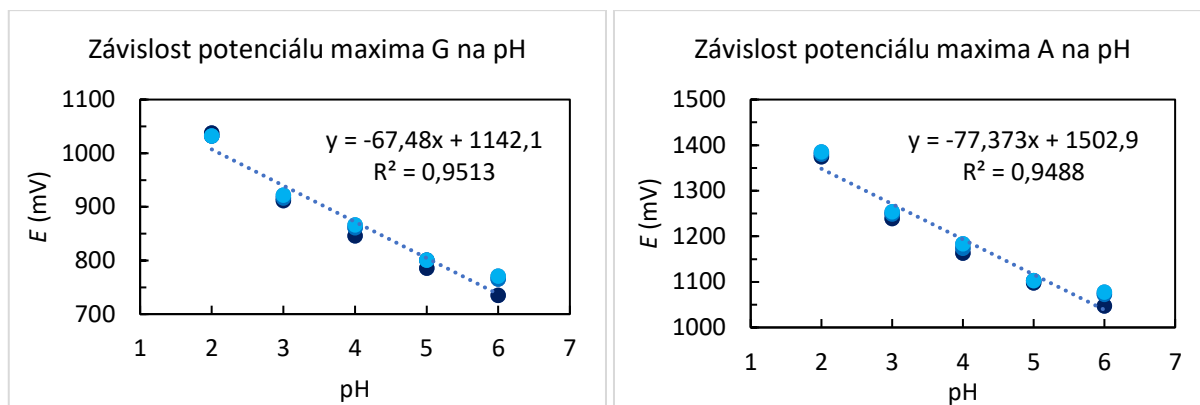
3.3.4. Vliv pH na elektrochemickou oxidaci směsi guaninu a adeninu

Směs G a A byla proměřena pouze v kyselé oblasti (Obrázek 55), ve které jsou signály intenzivnější. Experimenty byly opakovány pouze 3x, mezi opakováním jednotlivých měření již elektroda nebyla znovu leštěna stejně jako u měření směsi UA a X. Nejvyšší signály poskytují Ga A při pH 5 (Obrázek 53), u tištěných senzorů byly píky nejvyšší v rozmezí pH 3–5, což může být způsobeno nedostatečným naleštěním elektrody.

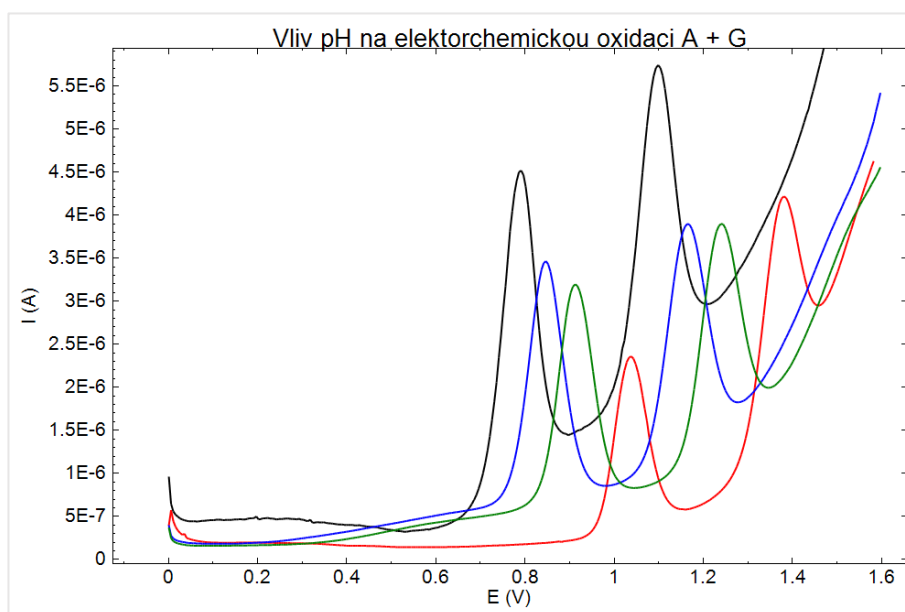


Obrázek 53: Závislost výšky píku G (vlevo) a A (vpravo) na pH na GCE. DPV, BRB.

Potenciály maxima píků G i A se zvyšujícím se pH klesají k negativnějším potenciálům (Obrázek 54). Posuny jsou větší než na SPCE, u A je pokles obdobný jako na BDDE.



Obrázek 54: Závislost potenciálu maxima píku G (vlevo) a A (vpravo) na pH na GCE. DPV, BRB.



Obrázek 55: Vliv pH na elektrochemickou oxidaci směsi G a A na GCE. DPV, BRB, pH 2 (červená), pH 3 (zelená), pH 4 (modrá), pH 5 (černá).

3.4. Srovnání výsledků SPCE, BDDE a GCE

Intenzita signálů elektrochemické oxidace UA na SPCE v BRB dosahuje nejvyšších hodnot při pH 2, stejně jako na BDDE. V případě GCE jsou nejvyšší signály při pH 2, 3 a 5, což je pravděpodobně způsobeno kvalitou naleštění elektrody. V kyselém prostředí dochází při oxidaci k výměně stejného počtu elektronů a protonů dle měření na SPCE a BDDE, na GCE byla UA měřena ve směsi, ovšem směrnice přímky ve směsi odpovídá i směrnici při měření ve směsi na BDDE. K oxidaci na SPCE dochází za nejnižšího potenciálu. Na BDDE jsou píky UA širší než při měření na GCE a SPCE.

Na SPCE i BDDE poskytuje X nejintenzivnější signál při pH 6, což ovšem nepotvrzuje měření na GCE. Opět to může být způsobeno kvalitou leštění GCE. Obecně lze říct, že

signály jsou v kyselém prostředí intenzivnější než v zásaditém. Při oxidaci X dochází k výměně stejného počtu elektronů a protonů, což potvrzují měření ze všech tří typů elektrod.

Signály A a G byly na všech třech elektrodách nejvyšší v rozmezí pH 3–5. Při oxidaci těchto dvou látek pravděpodobně nedochází k výměně stejného počtu elektronů. K oxidaci G dochází při přibližně stejně velkých potenciálech jako při oxidaci X. Adenin se oxiduje při nejvyšších potenciálech z těchto vybraných látek.

3.5. Vliv složení základního elektrolytu na elektrochemickou oxidaci metabolitů

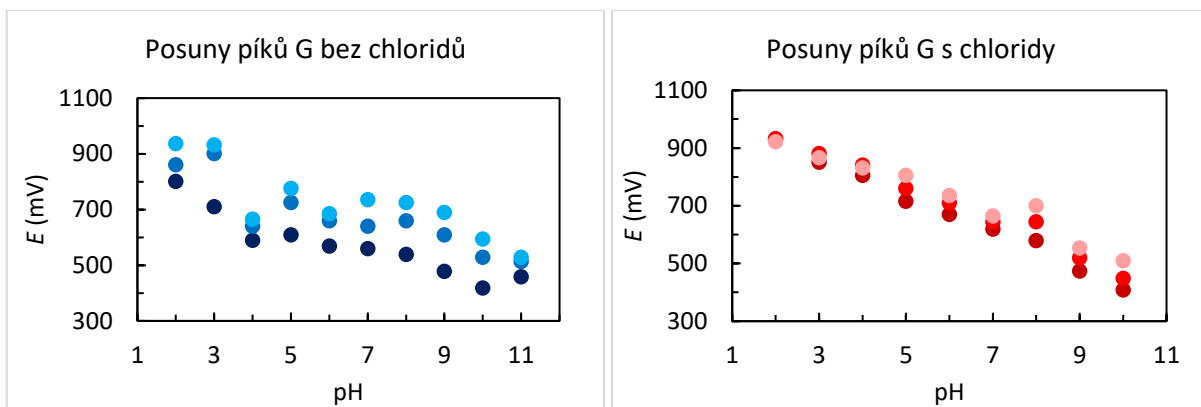
Bylo zjištěno, že během předchozích experimentů se píky látek analyzovaných ve směsích s opakovaným měřením posouvaly k pozitivnějším potenciálům. Pro stabilizaci posunů oxidačních signálů byl testován přídavek chloridů do základního elektrolytu, které ovlivňují potenciál pseudoreferentních elektrod u tištěných senzorů. Pro analýzu byl testován místo BRB také octanový pufr (AP). V grafech i voltamogramech jsou modrou barvou uvedena měření pufru bez chloridů, červenou barvou měření s přídavkem chloridů. Opět platí, že nejtmavší měření je první měření, nejsvětější poslední opakování.

V další části diplomové práce byla testována pouze směs A, G a UA, jelikož jejich signály jsou dostatečně oddělené od sebe. V případě, že by byl do směsi přidán X, jeho signál by se překrýval s G, a proto nebyl dále testován.

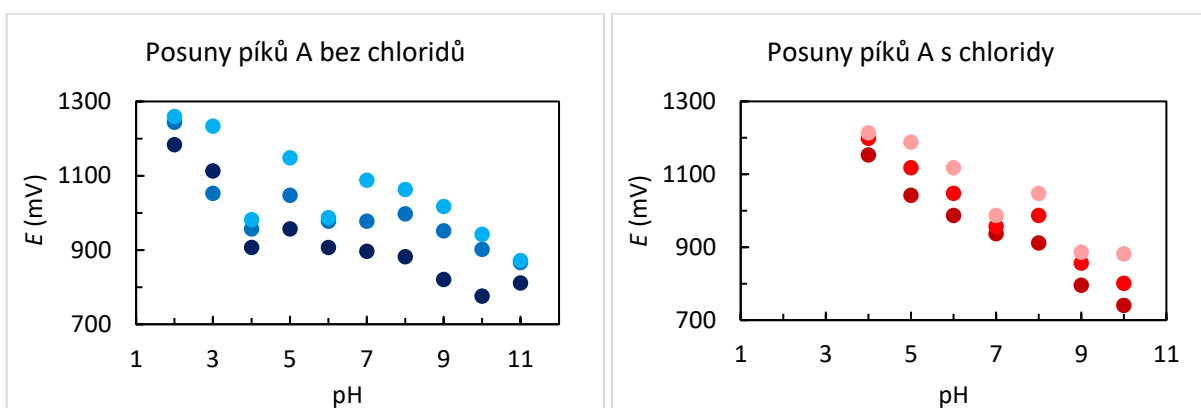
3.5.1. Přídavek chloridů do Brittonova-Robinsonova pufru

3.5.1.1. Vliv přídavku chloridů na posun píků G a A na SPCE

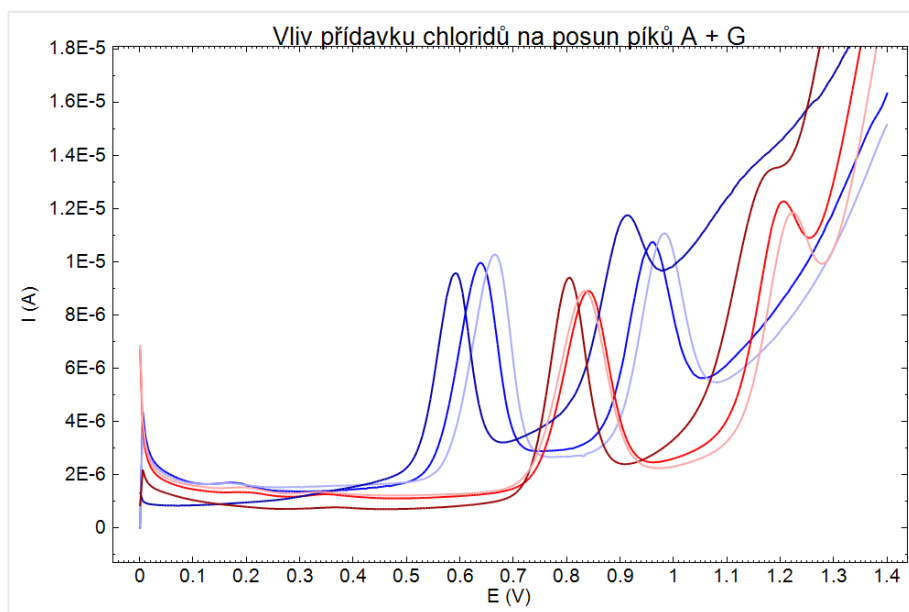
Po přídavku chloridů o koncentraci $0,09 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ke směsi G a A došlo ke stabilizaci posunu píku G s opakovaným měřením v kyselém prostředí. Jeho signál se jen mírně posouvá od pH 5 a výše (Obrázek 56). U adeninu je posun píku výraznější, ale vždy menší než bez přítomnosti chloridů v základním elektrolytu (Obrázek 57). Po přidání chloridů se oxidační signály obou látek posouvají k vyšším potenciálům. Rozdíl proti potenciálu maxima bez chloridů je větší v kyselejším prostředí, v zásaditéjším se vyrovnává. Pík A se v přítomnosti chloridů dostává až na narůstající křivku základního elektrolytu, čímž dochází k poklesu signálu A (Obrázek 58).



Obrázek 56: Posuny maxim píků opakovaných měření G bez chloridů (vlevo) a s chloridy (vpravo) na SPCE. DPV, BRB.



Obrázek 57: Posuny maxim píků opakovaných měření A bez chloridů (vlevo) a s chloridy (vpravo) na SPCE. DPV, BRB.

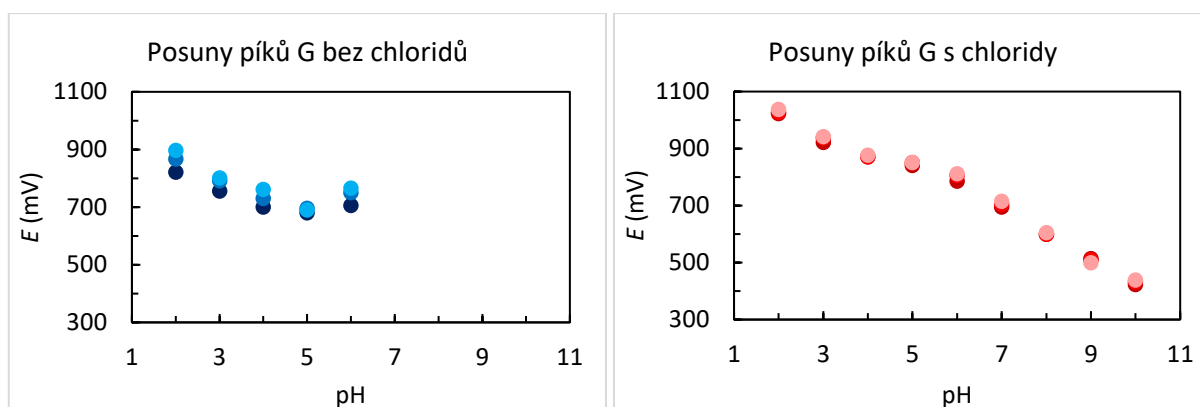


Obrázek 58: Vliv přidavku chloridů na posun píků G (první pík) a A (druhý pík) na SPCE. DPV, BRB, pH 4, bez chloridů (modrá), s chloridy (červená).

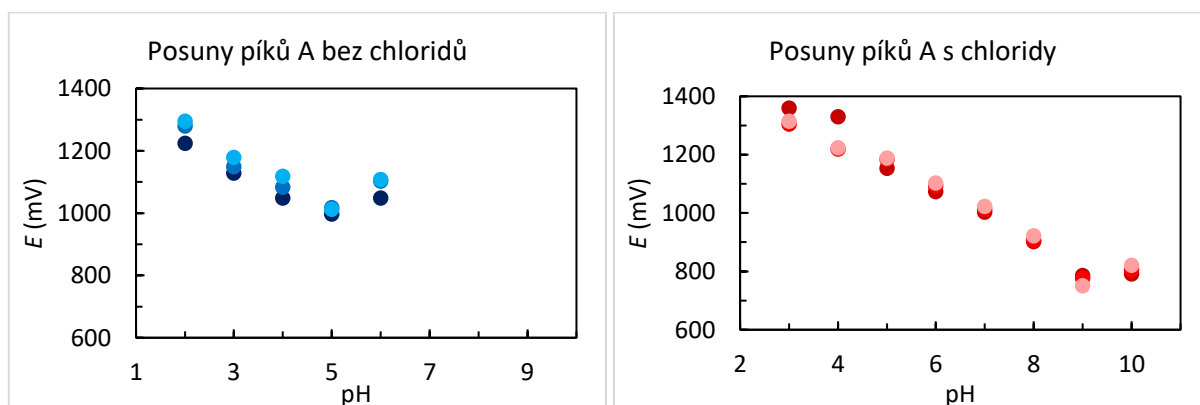
3.5.1.2. Vliv přidavku chloridů na posun píků G a A na BDDE

V případě měření směsi G a A na BDDE došlo po přidavku chloridů o koncentraci $0,09 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ke zlepšení stability opakovaných měření u obou těchto látek (

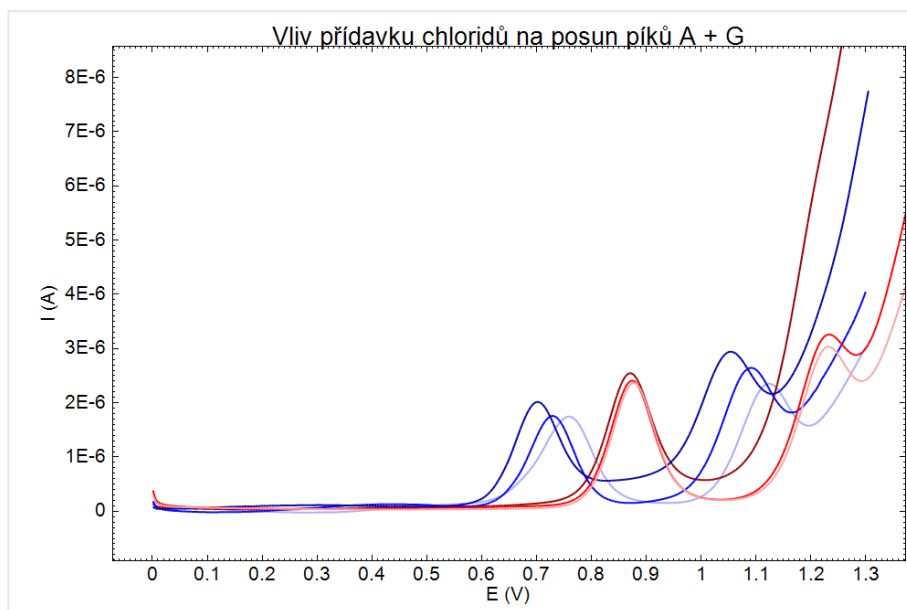
Obrázek 59, Obrázek 60). Zároveň došlo k mírnému zvýšení intenzity signálu G a kvůli posunu signálů k pozitivnějším potenciálům ke snížení signálu A (Obrázek 61). U BDDE senzoru je u referentní části vrstva stříbra elektrolyticky potažena AgCl a tato konfigurace je stabilnější při opakovaných analýzách než u SPCE, kde je pouze samotná vrstva Ag.



Obrázek 59: Posuny maxim píků opakovaných měření G bez chloridů (vlevo) a s chloridy (vpravo) na BDDE. DPV, BRB.



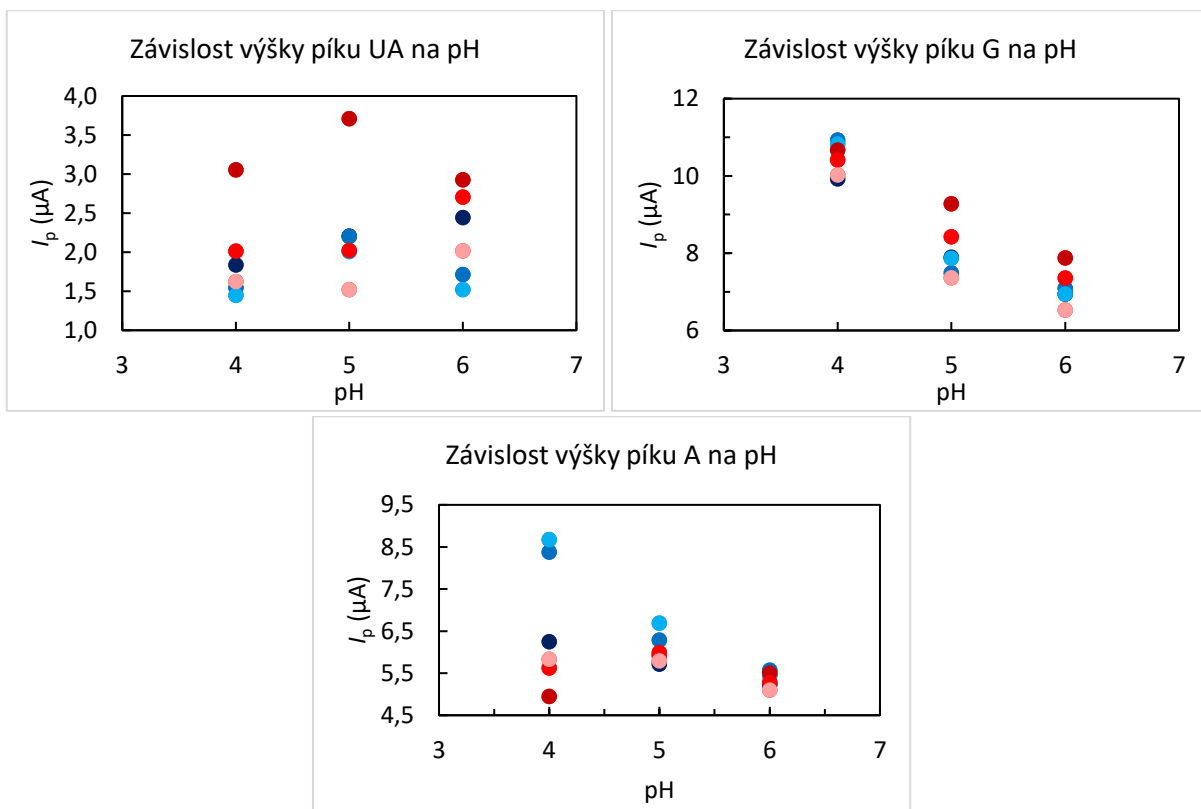
Obrázek 60: Posuny maxim píků opakovaných měření A bez chloridů (vlevo) a s chloridy (vpravo) na BDDE. DPV, BRB.



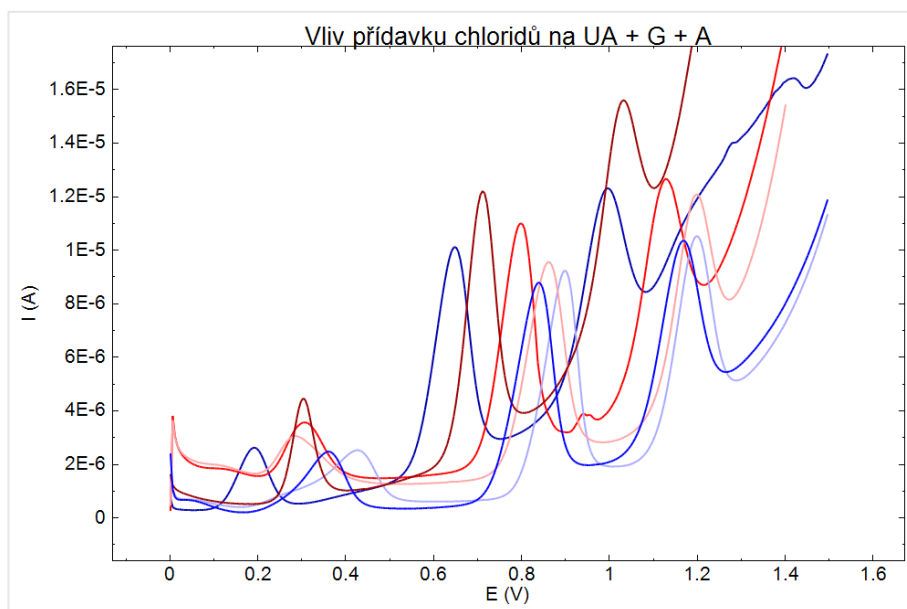
Obrázek 61: Vliv přidavku chloridů na posun píků G (první pík) a A (druhý pík) na BDDE. DPV, BRB, pH 4, bez chloridů (modrá), s chloridy (červená).

3.5.1.3. Vliv přidavku chloridů na výšku píků kyseliny močové, guaninu a adeninu ve směsi na SPCE

V grafech jsou zaznamenány výšky píků UA (Obrázek 62 vlevo nahoře), G (Obrázek 62 vpravo nahoře) a A (Obrázek 62 dole) bez a s přidavkem chloridů do analyzovaného roztoku. Směs byla měřena už pouze při pH 4, 5 a 6, při kterých sice UA neposkytovala nejvyšší signál, ale A i G poskytovali intenzivní signály, což je výhodné pro jejich současnou detekci nebo stanovení. Zároveň oxidační signál A s přidavkem chloridů byl málo zřetelný při pH nižším než 4 a bylo tedy potřeba použít pufr s vyšší hodnotou pH. Intenzivnější signály s chloridy jsou v případě měření UA a G, u A jsou píky vyšší bez přidavku chloridů, jelikož se v jejich přítomnosti signály posouvají k pozitivnějším potenciálům, načež nestačí potenciálové okno elektrody. Vlivem přidavku chloridů se při opakovaných měření signály látek stabilizují (Obrázek 63). V případě UA dochází k rozšíření signálu po opakování, ovšem nedochází k posunu potenciálu maxima k pozitivnějším potenciálům. U G i A se posun stabilizuje, přičemž rozdíl mezi prvním a druhým měřením není tak velký.



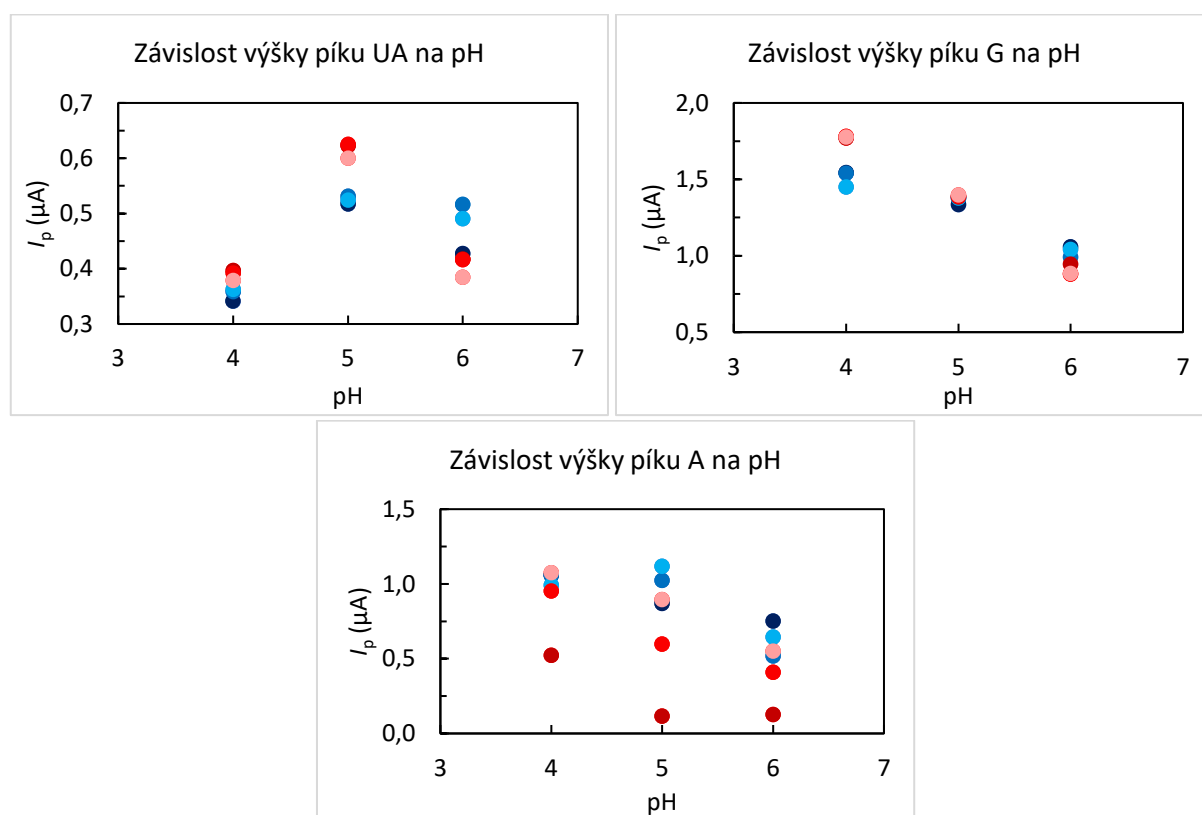
Obrázek 62: Závislost výšky píku UA (vlevo nahoře), G (vpravo nahoře) a A (dole) na pH na SPCE bez chloridů (modrá) a s chloridy (červená). DPV, BRB.



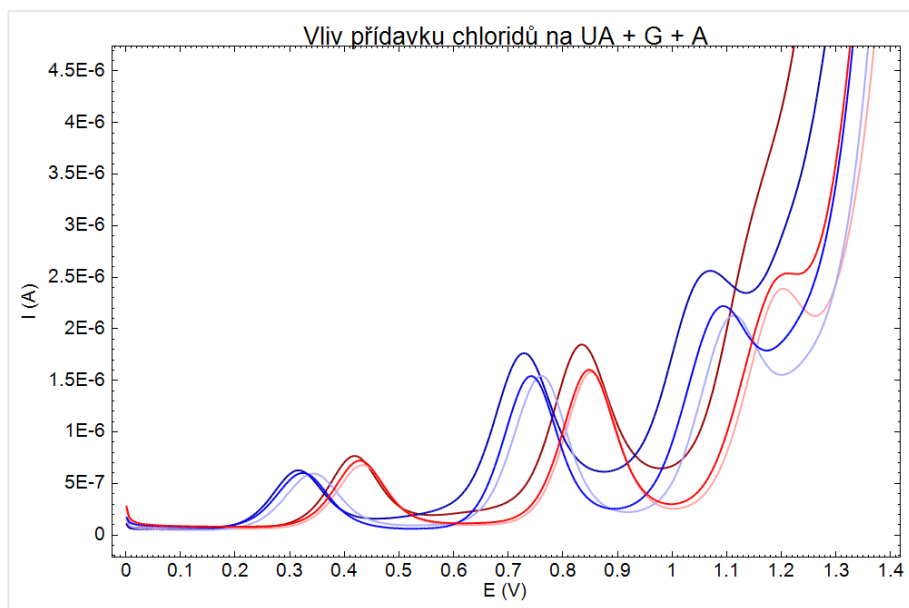
Obrázek 63: Vliv přidavku chloridů na signál UA (první pík), G (druhý pík) a A (třetí pík) na SPCE. DPV, BRB, pH 5, bez chloridů (modrá) a s chloridy (červená).

3.5.1.4. Vliv přídavku chloridů na výšku píků kyseliny močové, guaninu a adeninu ve směsi na BDDE

Stejně měření jako na SPCE bylo provedeno i na BDDE. U UA (Obrázek 64 vlevo nahoře) jsou píky intenzivnější s přídavkem chloridů při pH 4 a 5, při pH 6 jsou intenzivnější při měření bez chloridů. U G (Obrázek 64 vpravo nahoře) je intenzita s chloridy vyšší u pH 4, jinak srovnatelná s měřením bez chloridů. V případě A (Obrázek 64 dole) je lepší měření bez chloridů (intenzita signálů je bez chloridů opakovatelná), při přídavku chloridů dochází k posunu píků k vyšším potenciálům a tím pádem i k překryvu s křivkou základního elektrolytu (Obrázek 65).



Obrázek 64: Závislost výšky píku UA (vlevo nahoře), G (vpravo nahoře) a A (dole) na pH na BDDE bez chloridů (modrá) a s chloridy (červená). DPV, BRB.



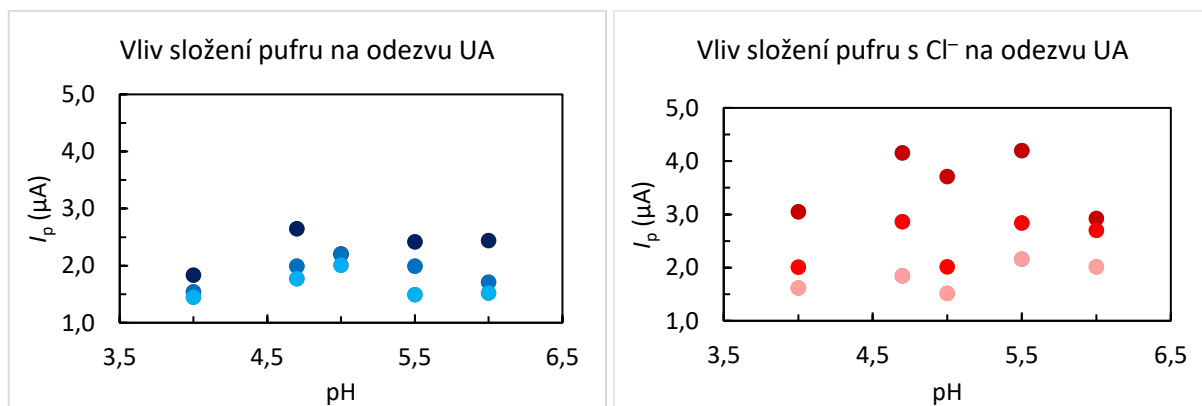
Obrázek 65: Vliv přidavku chloridů na UA (první pík), G (druhý pík) a A (třetí pík) na BDDE. DPV, BRB, pH 5, bez chloridů (modrá) a s chloridy (červená).

3.5.2. Octanový pufr jako základní elektrolyt

Směs kyseliny močové, guaninu a adeninu byla proměřena v octanovém pufru o pH 4,7 a 5,5 a BRB o pH 4, 5 a 6. Následující podkapitoly shrnují rozdíly ve výškách píků jednotlivých látek vyhodnocených z voltamogramu směsi v AP a BRB s přidavkem chloridů i bez nich. Příklad DPV analýzy směsi UA, G a A v AP o pH 4,7 na SPCE (Obrázek 72) a BDDE (Obrázek 73) jsou uvedeny na konci kapitoly.

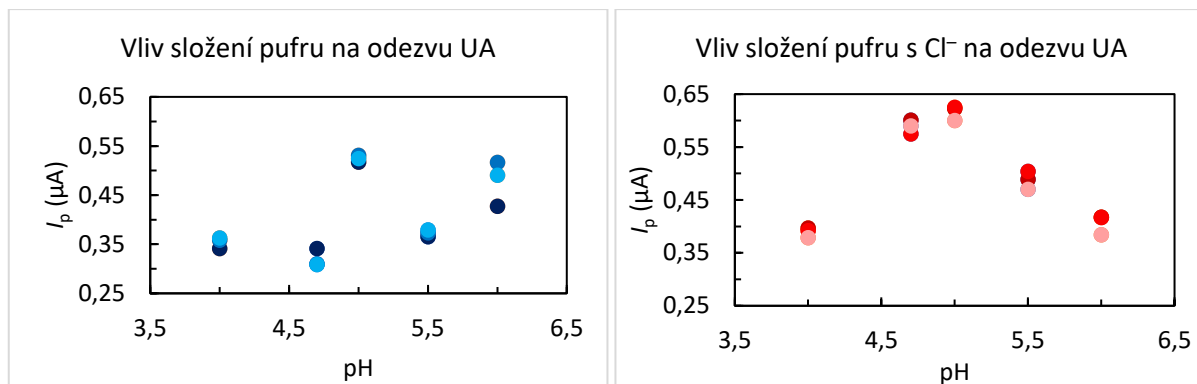
3.5.2.1. Vliv octanového pufru na detekci kyseliny močové

Na SPCE bez chloridů (Obrázek 66 vlevo) poskytuje UA vyšší odezvy v AP. Při měření s chloridy (Obrázek 66 vpravo) jsou píky vyšší než při měření bez chloridů a AP opět poskytuje vyšší odezvy. Měření bez chloridů jsou opakovatelnější než měření s chloridy.



Obrázek 66: Vliv složení pufru na výšku píku UA na SPCE bez chloridů (vlevo, modrá) a s chloridy (vpravo, červená). DPV, BRB pH 4, 5 a 6, AP pH 4,7 a 5,5.

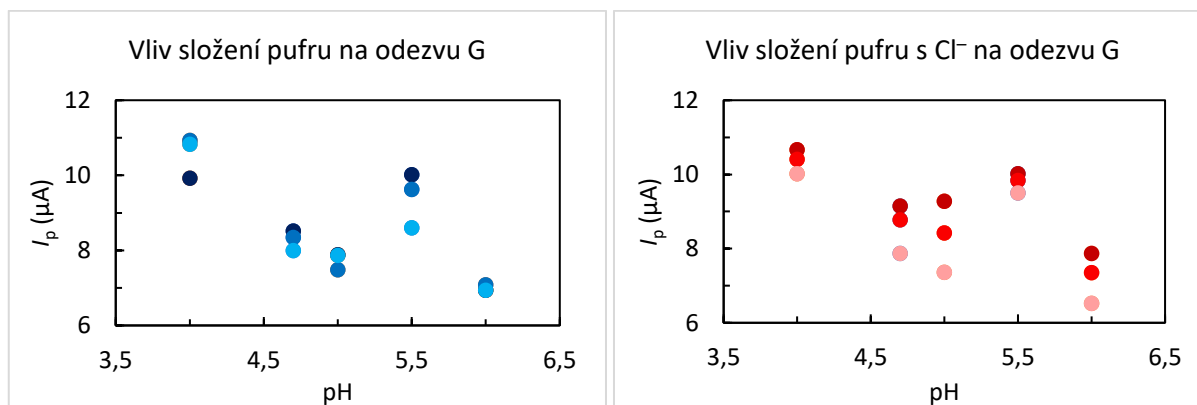
Na BDDE jsou naopak signály měřené v AP nižší než při měření v BRB, velký rozdíl je u měření bez chloridů (Obrázek 67 vlevo). Při měření s chloridy v AP o pH 4,7 je naopak signál UA skoro stejně intenzivní jako v BRB o pH 5 (Obrázek 67 vpravo).



Obrázek 67: Vliv složení pufru na výšku píku UA na BDDE bez chloridů (vlevo, modrá) a s chloridy (vpravo, červená). DPV, BRB pH 4, 5 a 6, AP pH 4,7 a 5,5.

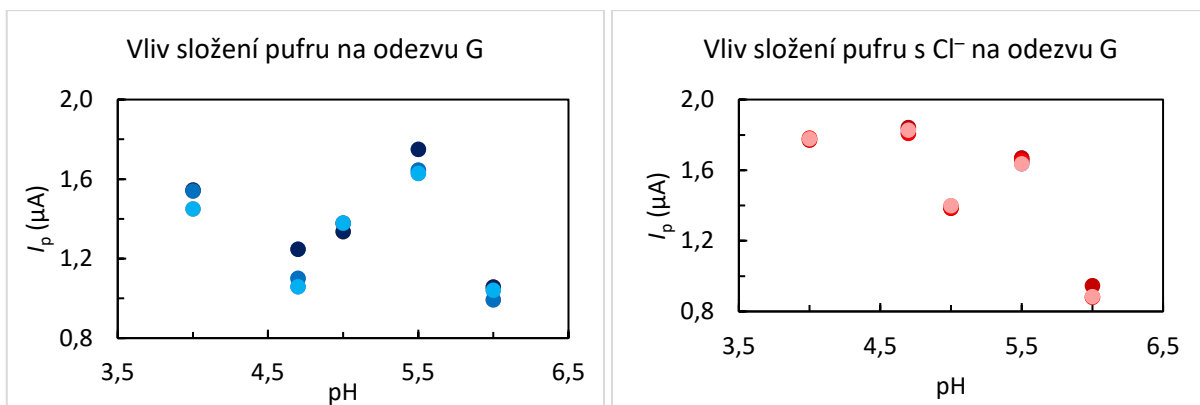
3.5.2.2. Vliv octanového pufru na detekci guaninu

Na SPCE je výška odezvy G bez přidavku chloridů nejvyšší pro BRB pH 4, která je srovnatelná s AP pH 5,5 (Obrázek 68 vlevo). S přidavkem chloridů jsou signály přibližně stejně vysoké jako bez chloridů, ale v BRB je horší jejich opakovatelnost (Obrázek 68 vpravo).



Obrázek 68: Vliv složení pufru na výšku píku G na SPCE bez chloridů (vlevo, modrá) a s chloridy (vpravo, červená). DPV, BRB pH 4, 5 a 6, AP pH 4,7 a 5,5.

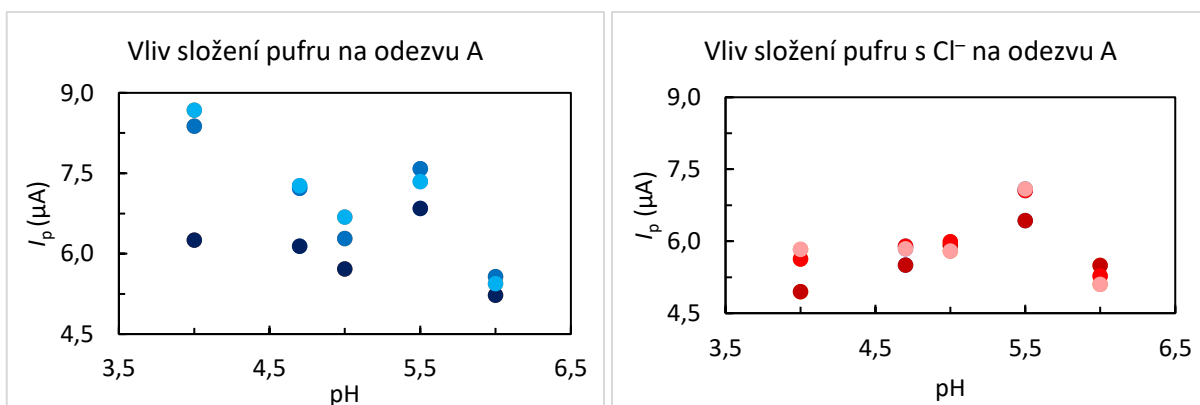
Na BDDE bez přidavku chloridů poskytuje nejintenzivnější signály G v AP při pH 5,5 (Obrázek 69 vlevo). S přidavkem chloridů je to opět AP, ale při pH 4,7 (Obrázek 69 vpravo). Ve všech případech byly nejnižší odezvy G naměřeny v BRB při pH 6.



Obrázek 69: Vliv složení pufru na výšku píku G na BDDE bez chloridů (vlevo, modrá) a s chloridy (vpravo, červená). DPV, BRB pH 4, 5 a 6, AP pH 4,7 a 5,5.

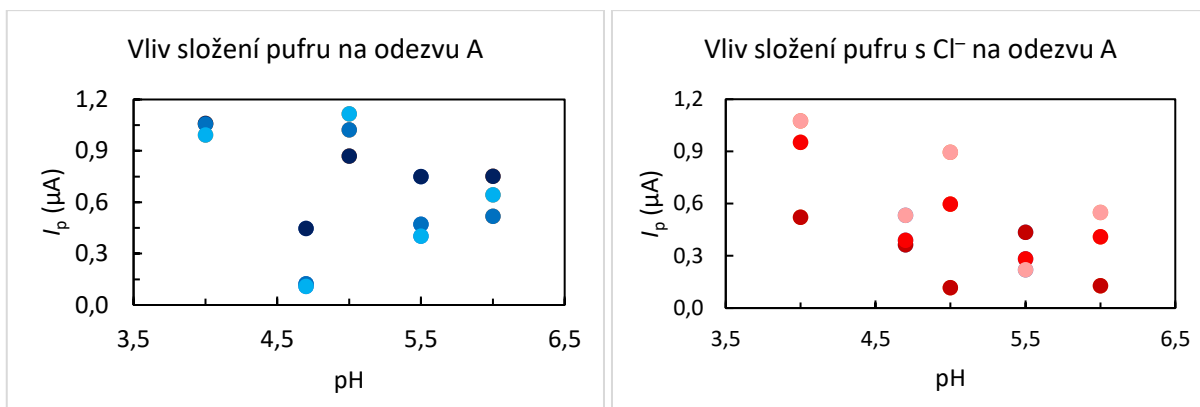
3.5.2.3. Vliv octanového pufru na detekci adeninu

Na SPCE poskytuje adenin vyšší signály bez přítomnosti chloridů (Obrázek 70 vlevo). Nejvyšší odezva, která ale není příliš opakovatelná, je v BRB při pH 4. V případě přidavku chloridů A poskytuje nejvyšší odezvu v AP při pH 5,5, jinak jsou výšky signálů téměř stejné a měření jsou opakovatelnější než v BRB (Obrázek 70 vpravo).

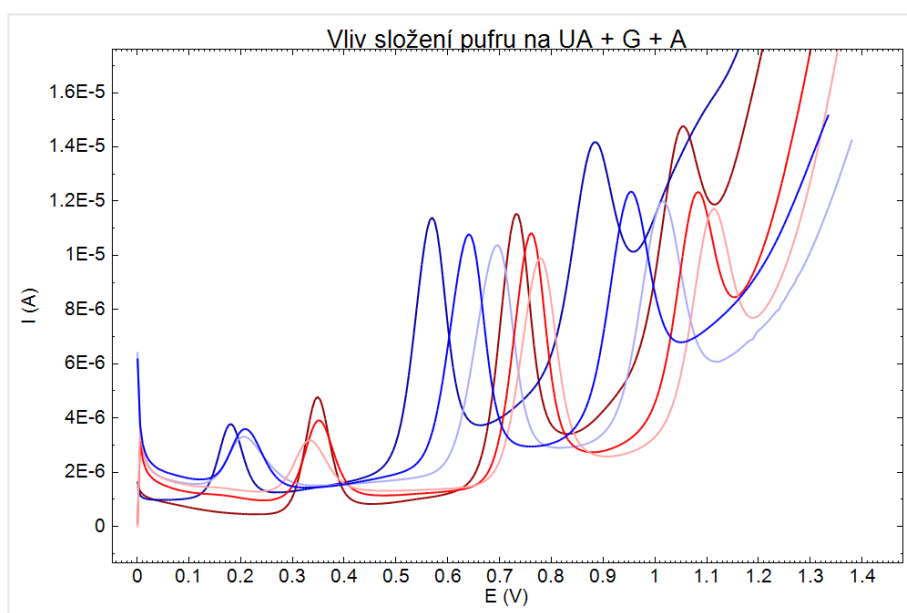


Obrázek 70: Vliv složení pufru na výšku píku A na SPCE bez chloridů (vlevo, modrá) a s chloridy (vpravo, červená). DPV, BRB pH 4, 5 a 6, AP pH 4,7 a 5,5.

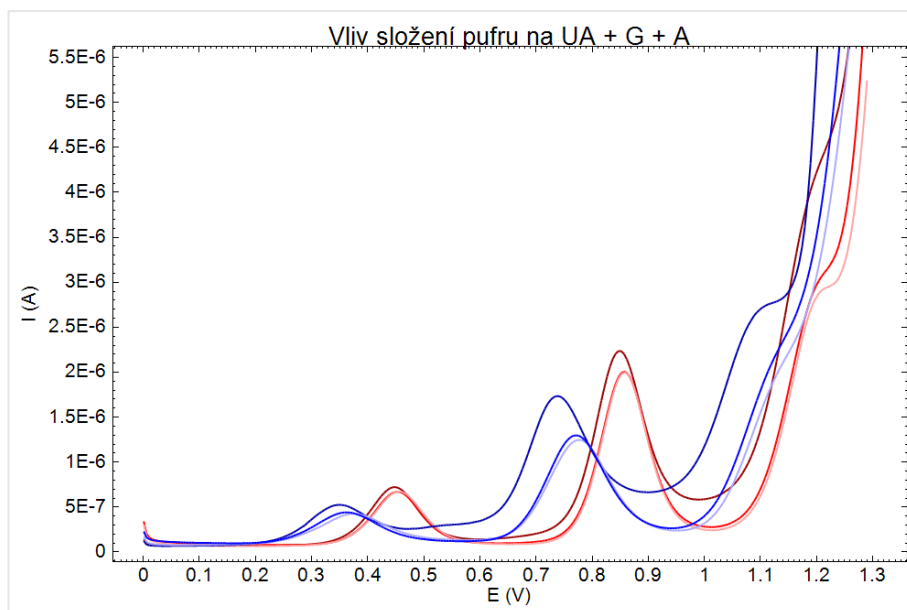
Na BDDE výrazně intenzivnější odezvy poskytují měření v BRB. Při měření bez chloridů je nejvyšší odezva při pH 4 (Obrázek 71 vlevo), při měření s chloridy rovněž (Obrázek 71 vpravo), ovšem v AP jsou jednotlivé analýzy opakovatelnější.



Obrázek 71: Vliv složení pufru na výšku píku A na BDDE bez chloridů (vlevo, **modrá**) a s chloridy (vpravo, **červená**). DPV, BRB pH 4, 5 a 6, AP pH 4,7 a 5,5.



Obrázek 72: Vliv přidavku chloridů na UA (první pík), G (druhý pík) a A (třetí pík) na SPCE. DPV, AP, pH 4,7, bez chloridů (**modrá**) a s chloridy (**červená**).



Obrázek 73: Vliv přidavku chloridů na UA (první pík), G (druhý pík) a A (třetí pík) na BDDE. DPV, AP, pH 4,7, bez chloridů (modrá) a s chloridy (červená).

3.6. Optimalizace parametrů simultánní elektrochemické detekce kyseliny močové, guaninu a adeninu

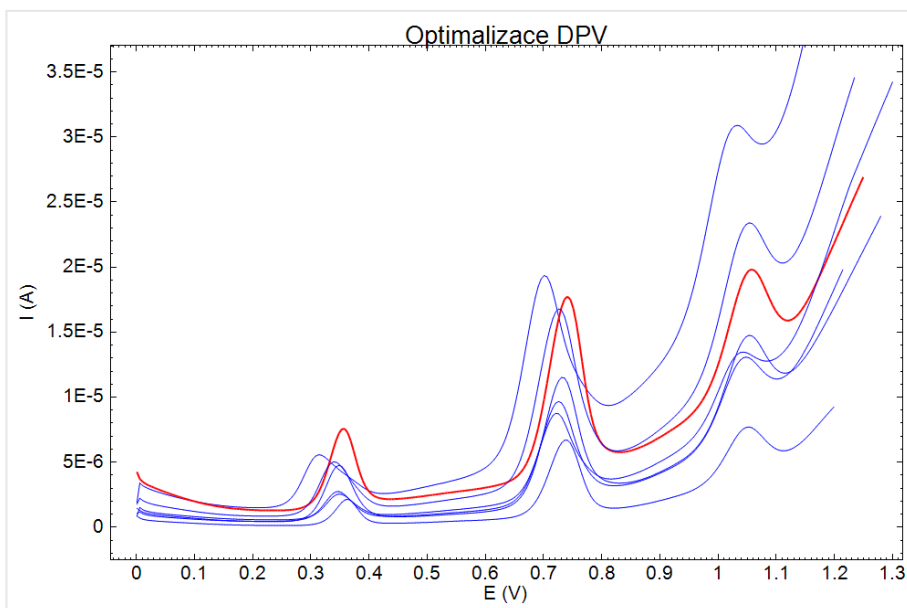
Z předchozích měření vyplynulo, že měření s chloridy poskytuje stabilnější odezvy. Byl zvolen kompromis mezi velikostí signálu a případnými změnami na referentní části, jelikož fosforečnany v BRB mohou reagovat se stříbrem pseudoreferentní elektrody, což by měření mohlo ovlivnit víc než samotná pasivace pracovní elektrody. Proto byl pro další měření zvolen octanový pufr o pH 4,7.

Následující kapitola se zabývá optimalizací amplitudy a času pulzu v DPV a amplitudy a frekvence ve SWV. Parametry byly optimalizovány na SPCE na směsi UA, G a A.

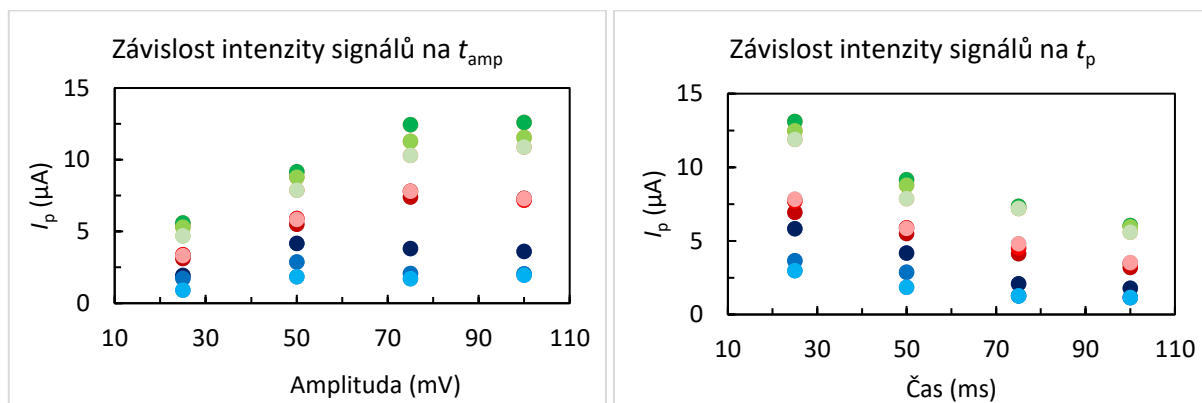
3.6.1. DPV

U DPV byla optimalizována amplituda a čas pulzu. S rostoucími hodnotami obou parametrů se velmi rychle zvyšují také proudy pozadí. Pro optimální parametry bylo nejlepší vybrat takovou kombinaci amplitudy a času pulzu, kdy intenzita signálů byla vysoká, ale proudové pozadí bylo co nejmenší. Nejprve byla nastavována amplituda pulzu za konstantní doby pulzu 25 ms (Obrázek 74). Proudové píky všech látek rostly až do amplitudy 50 mV, dále se pak zvyšovaly pouze pro G a A, ale při vyšším pozadí. Pro UA píky dále klesaly, jako optimální byla proto zvolena amplituda 50 mV (Obrázek 75 vlevo). Nejintenzivnější signály všech látek

byly při času pulzu 25 ms, vyšší doby pulzu píky snižovaly (Obrázek 75 vpravo). Optimální parametry pro měření pomocí DPV byly proto amplituda pulzu 50 mV a čas pulzu 25 ms.



Obrázek 74: Optimalizace parametrů DPV, zvolená amplituda 50 mV a čas pulzu 25 ms (červená), AP, pH 4,7.

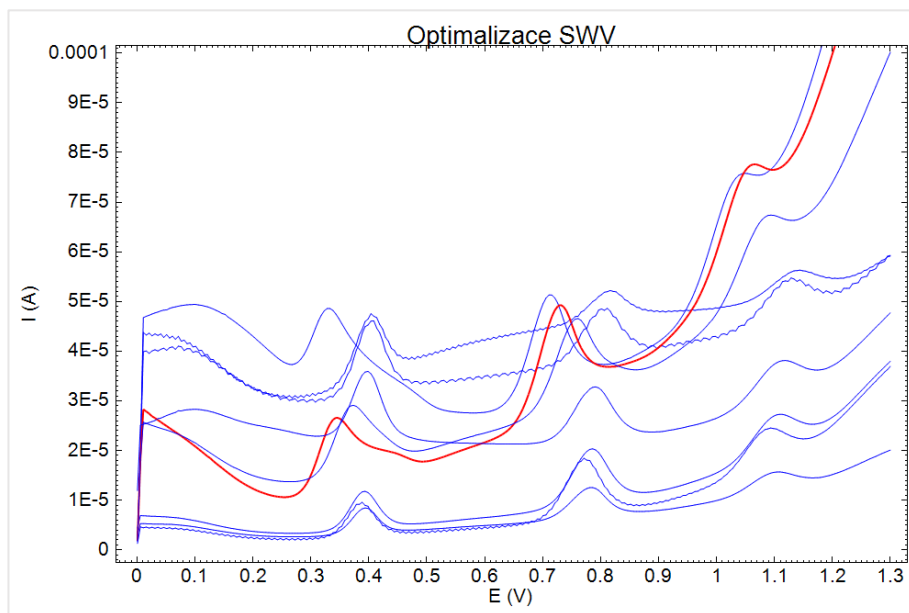


Obrázek 75: Optimalizace DPV, závislost intenzity signálů na amplitudě (vlevo) a čase pulzu (vpravo), UA (modrá), G (zelená), A (červená), AP pH 4,7.

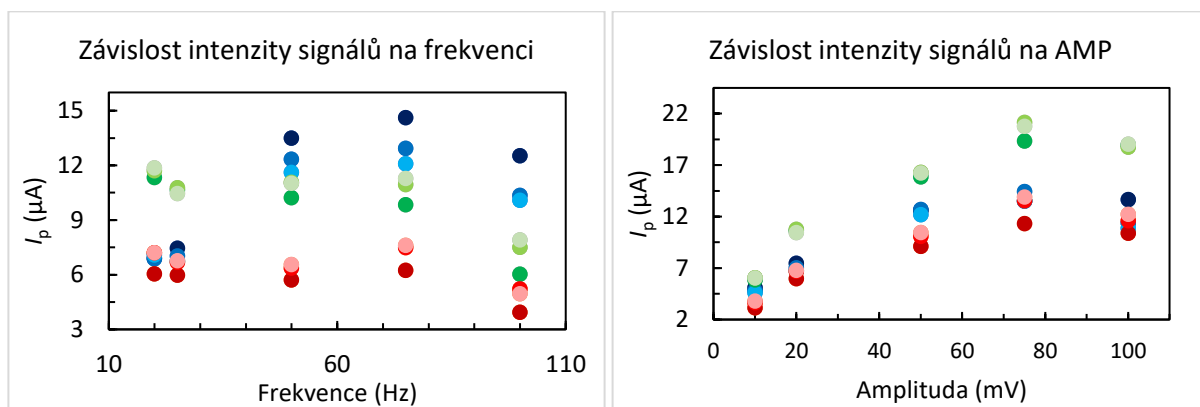
3.6.2. SWV

U SWV byla optimalizována frekvence a amplituda. Se zvětšováním obou parametrů opět velmi rychle rostou proudy pozadí. Pro optimální parametry bylo nejlepší vybrat kombinaci parametrů, kdy intenzita signálů byla vysoká, ale proudové pozadí bylo co nejmenší (Obrázek 76). U měření při 20 Hz byl výsledný signál vlnkovaný, při zvýšení na 50 Hz došlo k vysokému nárůstu proudů pozadí, výška signálů se již nemění (Obrázek 77 vlevo). V dalším optimalizačním kroku byla zvolena frekvence 25 Hz, aby se předešlo dalšímu zvyšování

pozadí. Při malé amplitudě byly signály menší, nízké byly ale i proudy pozadí. Nejvyšší signály byly při amplitudě 75 mV (Obrázek 77 vpravo), proto byla zvolena frekvence 25 Hz a amplituda 75 mV. Vyšší amplituda sice ovlivňuje pozadí SPCE, ale pozadí BDDE ovlivněno není, zároveň jsou signály vyšší.



Obrázek 76: Optimalizace parametrů SWV, zvolená amplituda 75 mV a čas pulzu 25 Hz (červená), AP pH 4,7.



Obrázek 77: Optimalizace SWV, závislost intenzity signálů na frekvenci (vlevo) a na amplitudě (vpravo) pro UA (modrá), G (zelená), A (červená), AP pH 4,7.

3.7. Analytické parametry elektrochemické detekce směsi kyseliny močové, guaninu a adeninu

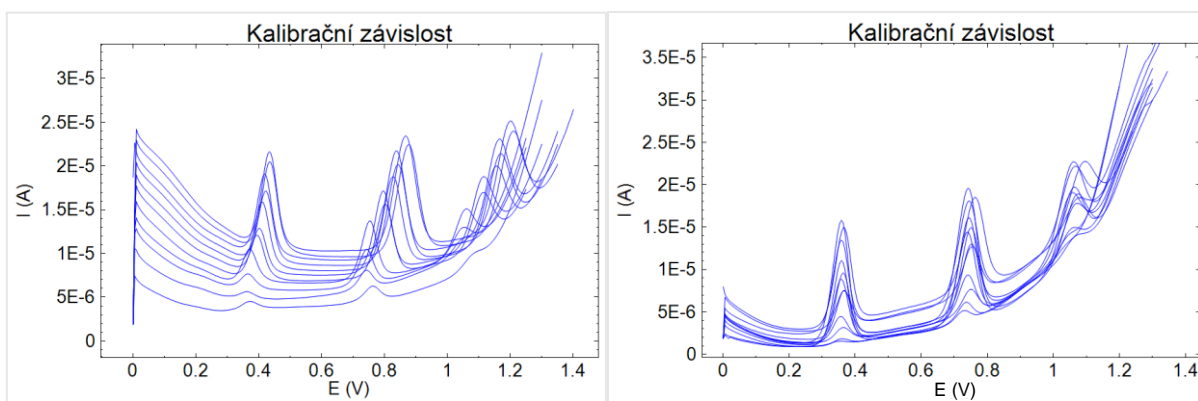
Kalibrační závislost směsi látek byla proměřena od koncentrace $1,25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ do $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pomocí DPV a SWV. Směs byla měřena v AP při pH 4,7 na SPCE, BDDE i GCE. V následujících podkapitolách jsou uvedeny kalibrační závislosti, červeně je uvedena plocha píků, modře jejich výška.

3.7.1. SPCE

Na SPCE byla směs proměřena 2x. Poprvé s využitím jedné elektrody, podruhé s využitím nové elektrody pro každou koncentraci. Každá koncentrace byla změřena třikrát, v grafech jsou uvedeny pouze první měření. Při opakovaném měření signály klesají.

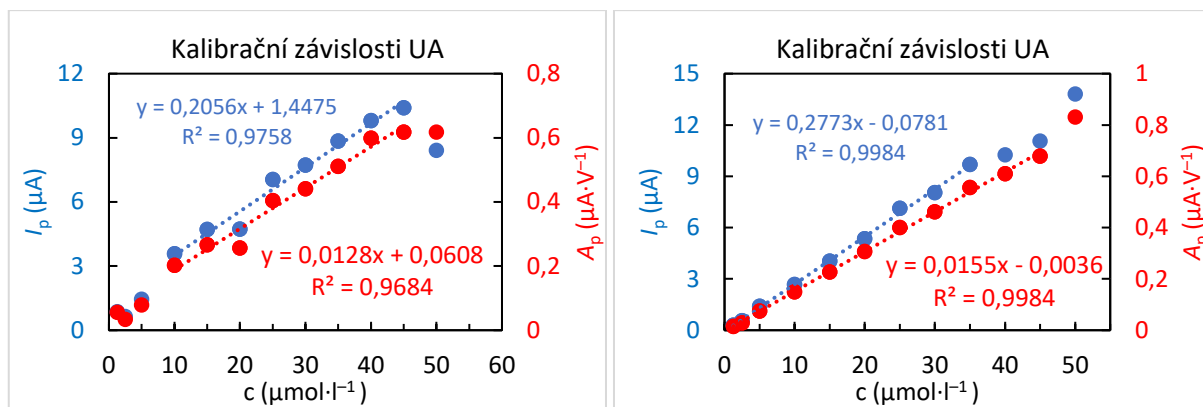
3.7.1.1. DPV

Signály látek při kalibraci měřené všechny na jedné elektrodě (Obrázek 78 vlevo) se posouvaly s počtem měření a vyššími koncentracemi k pozitivnějším potenciálům, jak už bylo ukázáno dříve, zároveň mírně klesaly proudy pozadí s opakovanými analýzami. V případě využití vždy nové elektrody pro každé měření nedocházelo k posunům potenciálů maxim píků, proudy pozadí každé elektrody se mírně liší (Obrázek 78 vpravo).



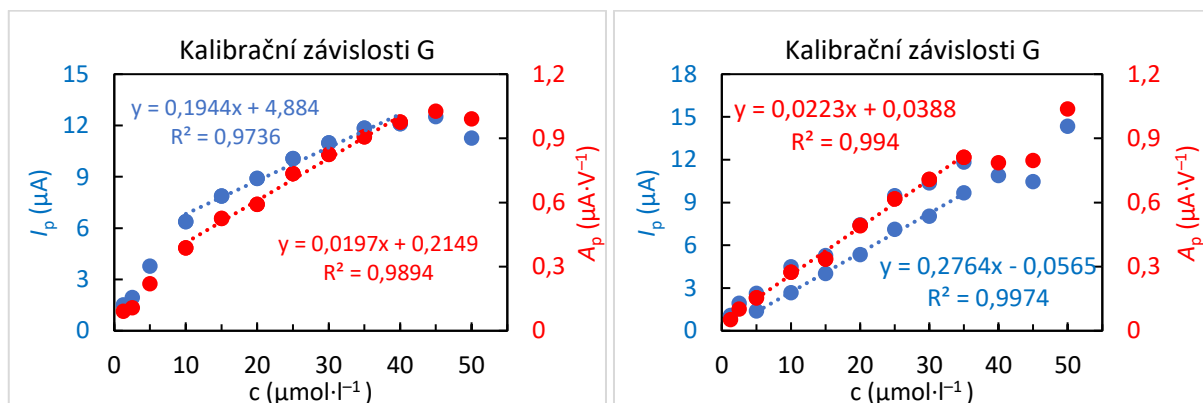
Obrázek 78: Kalibrace směsi UA, G a A na jedné SPCE (vlevo) a vždy s novou SPCE pro každé měření (vpravo). DPV, AP pH 4,7.

Lineární rozsah signálů UA při měření na jedné elektrodě (Obrázek 79 vlevo) je menší a horší než lineární rozsah s využitím nových elektrod (Obrázek 79 vpravo), linearita závisující na výšce píku i ploše píku je obdobná. Analýzy s novými elektrodami poskytují vyšší signály.



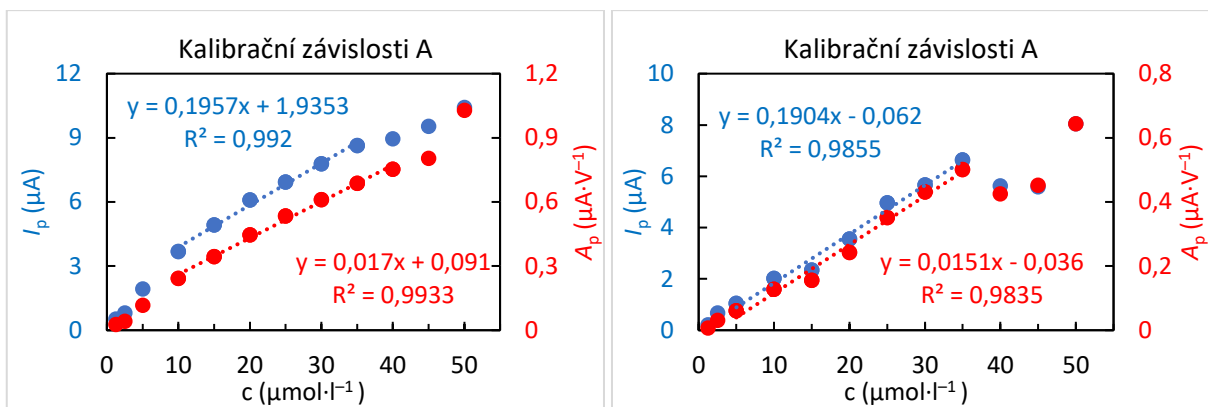
Obrázek 79: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku UA na její koncentraci na jedné SPCE (vlevo) a s novými SPCE pro každé měření (vpravo). DPV, AP pH 4,7.

U G je lineární rozsah obdobný jako u UA, s využitím nových elektrod (Obrázek 80 vpravo) je lepší než při měření na jedné elektrodě, kde zjištěné závislosti nejsou příliš lineární (Obrázek 80 vlevo). Výšky píků jsou obdobné, ovšem při měření na jedné elektrodě jsou píky širší.



Obrázek 80: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku G na jeho koncentraci na jedné SPCE (vlevo) a s novými SPCE pro každé měření (vpravo). DPV, AP pH 4,7.

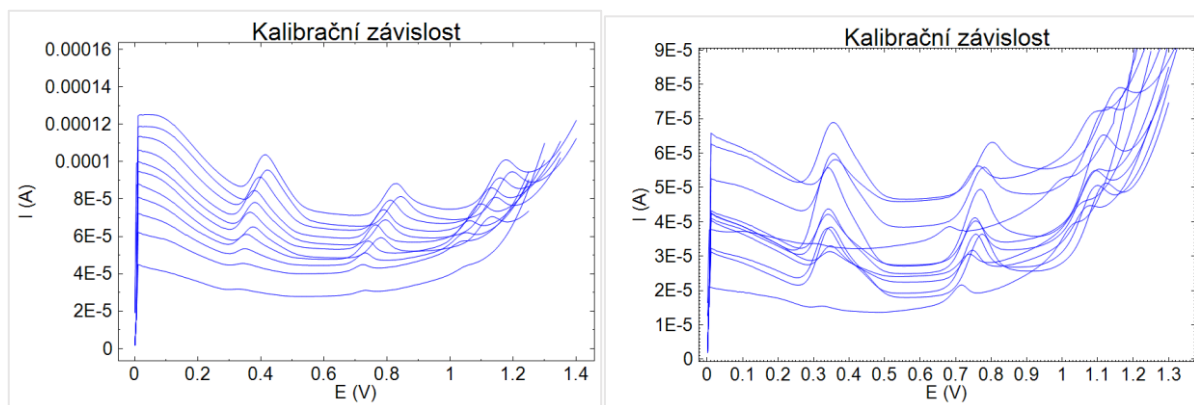
Lineární rozsah detekce A je větší při měření s využitím nových elektrod (Obrázek 81 vpravo) než při měření na jedné elektrodě (Obrázek 81 vlevo). Při měření na jedné elektrodě jsou píky širší, výška je přibližně stejná.



Obrázek 81: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku A na jeho koncentraci na jedné SPCE (vlevo) a s novými SPCE pro každé měření (vpravo). DPV, AP pH 4,7.

3.7.1.2. SWV

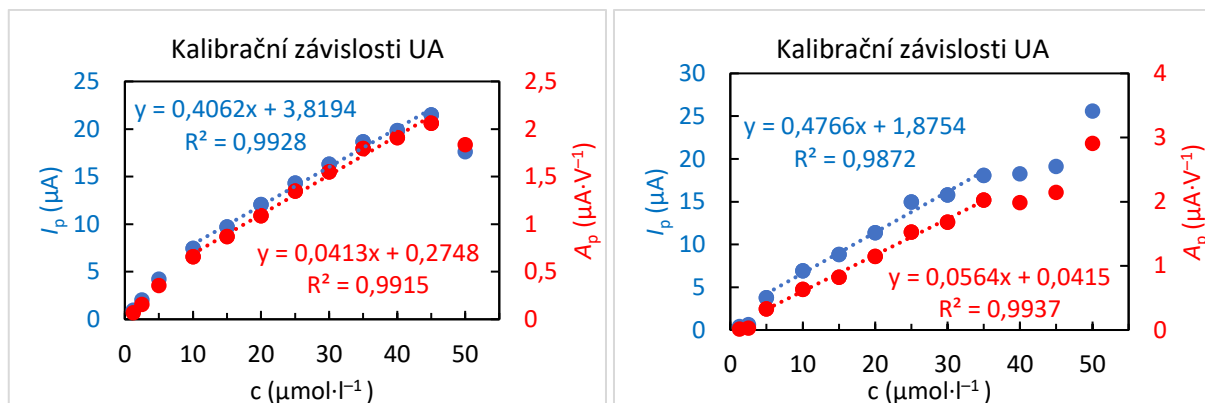
Z důvodu omezeného množství tištěných senzorů byla analýza pomocí SWV vždy prováděna jako druhá: na jedné elektrodě byl nejprve proměřen jeden bod kalibrace pomocí DPV, poté SWV a tento postup byl aplikován i pro proměření ostatních bodů. Při použití nových SPCE k jednotlivým měřením byla také nejprve změřena DPV a poté SWV. U kalibrace na jedné elektrodě (Obrázek 82 vlevo) byly proudy pozadí vyšší, ale píky rovnoměrně narůstaly se zvyšující se koncentrací. Potenciály maxim se mírně posouvaly ke kladnějším potenciálům s opakovanými DPV analýzami. V případě kalibrace na více elektrodách (Obrázek 82 vpravo) je kalibrace nepřehlednější, protože elektrody mají různý rozptyl proudů pozadí.



Obrázek 82: Kalibrace směsi UA, G a A na jedné SPCE (vlevo) a s novými SPCE pro každé měření (vpravo). SWV, AP pH 4,7.

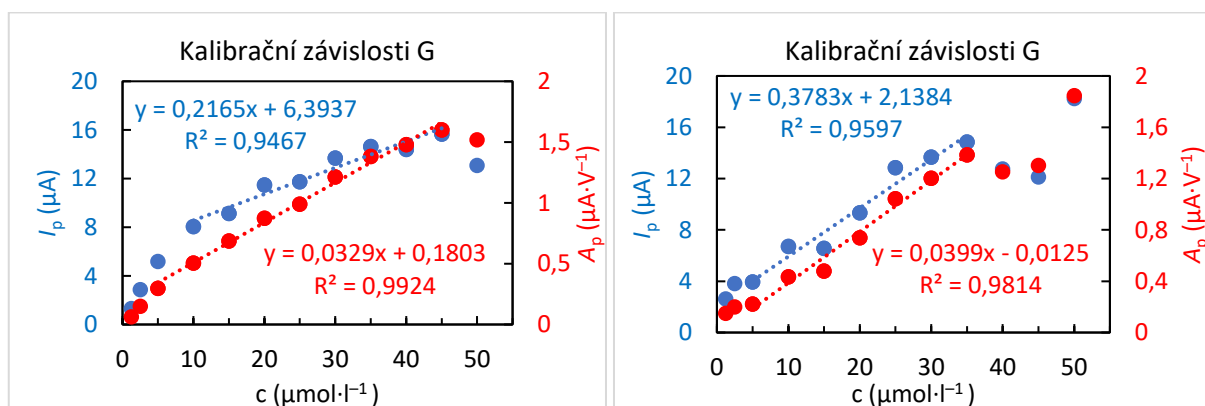
U UA je linearita kalibrace rozsáhlejší při měření na jedné elektrodě (Obrázek 83 vlevo), píky dosahují vyšších intenzit než při měření na nových elektrodách (Obrázek 83 vpravo). Na kalibrační závislosti s jednou SPCE lze ale vidět dva lineární rozsahy s vyšší směrnici při

nižších koncentracích. U nových SPCE na každé měření má kalibrace pouze jeden lineární rozsah.



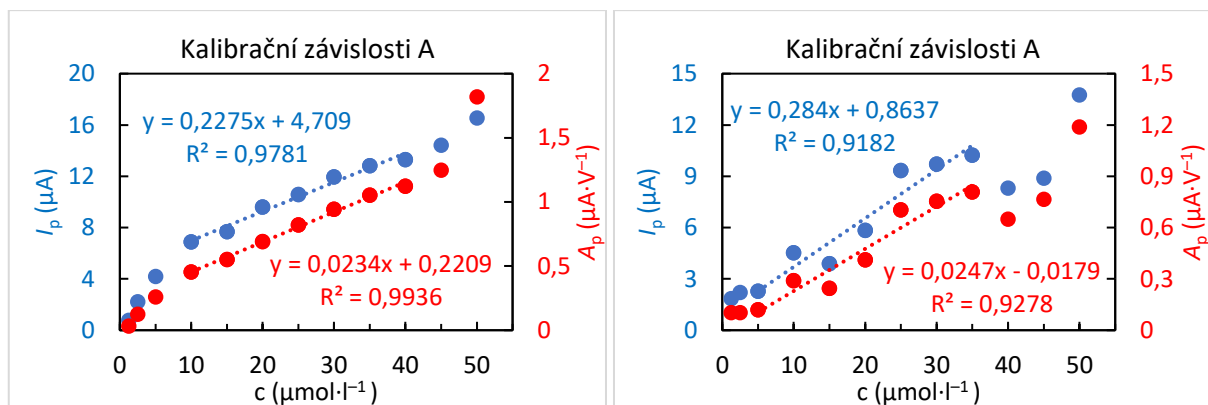
Obrázek 83: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku UA na její koncentraci na jedné SPCE (vlevo) a s novými SPCE pro každé měření (vpravo). SWV, AP pH 4,7.

Signály G dosahují přibližně stejných výšek při měření na jedné elektrodě (Obrázek 84 vlevo) i při měření na nových elektrodách (Obrázek 84 vpravo). Linearita odezvy je obdobná, z ploch píků lepší než z výšek píků. U výšek píků na jedné elektrodě je závislost nelineární, má dva lineární rozsahy.



Obrázek 84: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku G na jeho koncentraci na jedné SPCE (vlevo) a s novými SPCE pro každé měření (vpravo). SWV, AP pH 4,7.

V případě A je lepší linearita na jedné elektrodě (Obrázek 85 vlevo) než s využitím nových elektrod (Obrázek 85 vpravo). Při opakovaném měření na jedné elektrodě docházelo k lepšímu prokreslování signálu A a výsledná závislost má opět dva lineární rozsahy.



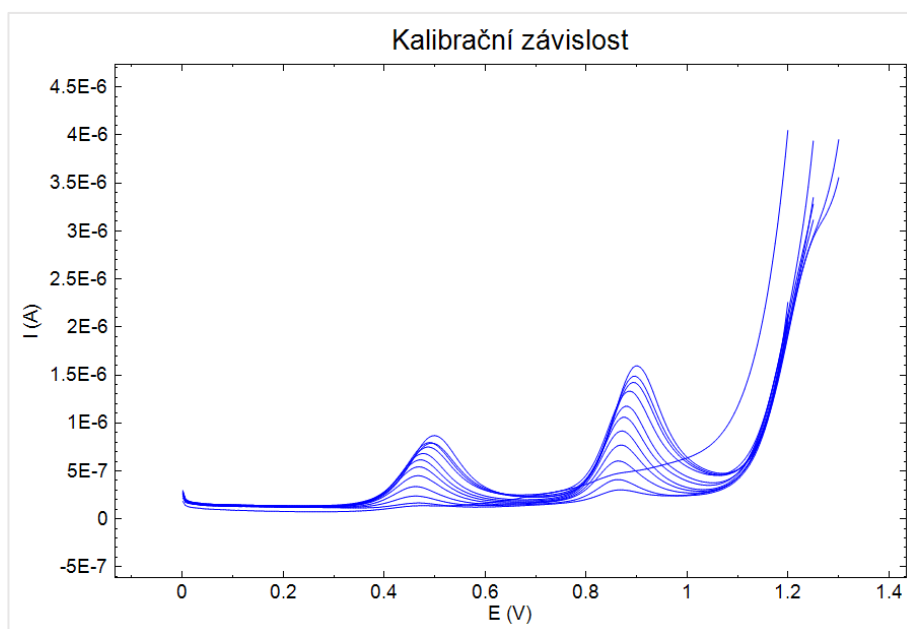
Obrázek 85: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku A na jeho koncentraci na jedné SPCE (vlevo) a s novými SPCE pro každé měření (vpravo). SWV, AP pH 4,7.

3.7.2. BDDE

Z důvodu úspory elektrod byla celá kalibrační závislost u DPV i SWV změřena pouze na jedné elektrodě.

3.7.2.1. DPV

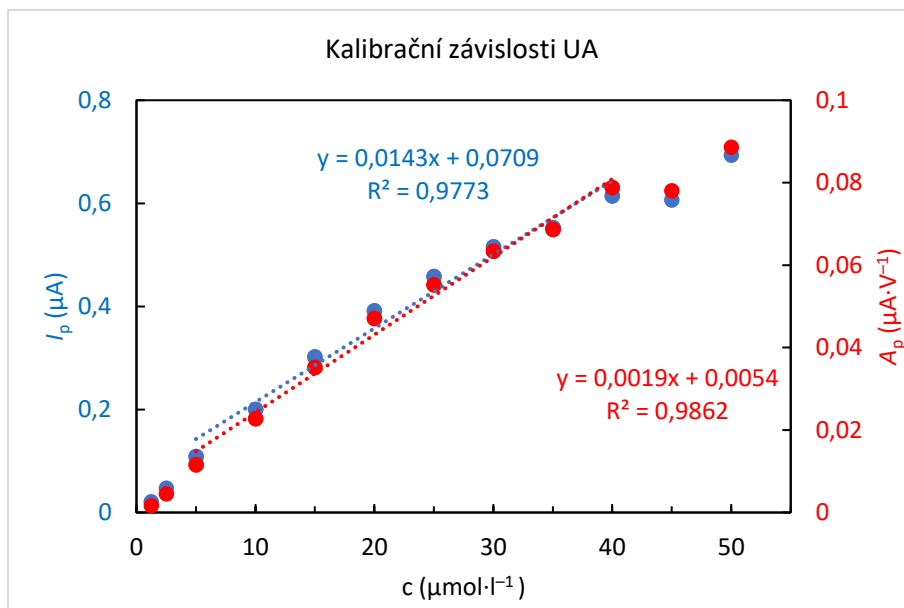
Signály látek se na rozdíl od měření na SPCE téměř neposouvaly v důsledku stabilnější referentní části BDDE senzoru. Adenin, který byl ve směsi přítomen, se ale oxidoval až při příliš vysokých potenciálech prakticky mimo potenciálové okno elektrody (Obrázek 86).



Obrázek 86: Kalibrace směsi UA, G a A na BDDE. DPV, AP pH 4,7.

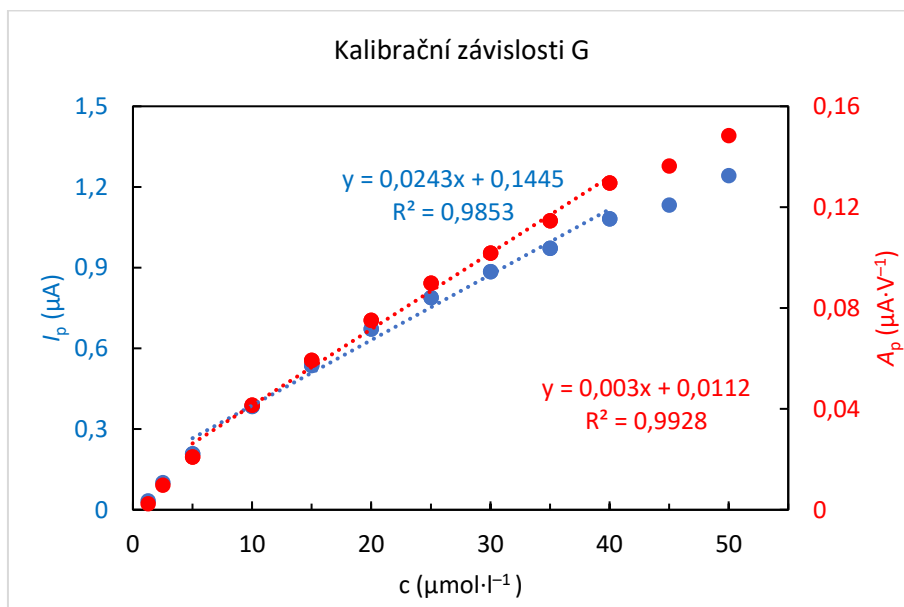
Linearita kalibrace UA (Obrázek 87) je v rozmezí 5 a 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, plochy i výšky píků úměrně narůstají se zvyšující se koncentrací UA. I když BDDE vykazuje menší proudy

pozadí a stabilní základní linii, zjištěné proudy píků jsou menší než u SPCE a stejně tak je menší i citlivost detekce.



Obrázek 87: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku UA na její koncentraci na BDDE. DPV, AP pH 4,7.

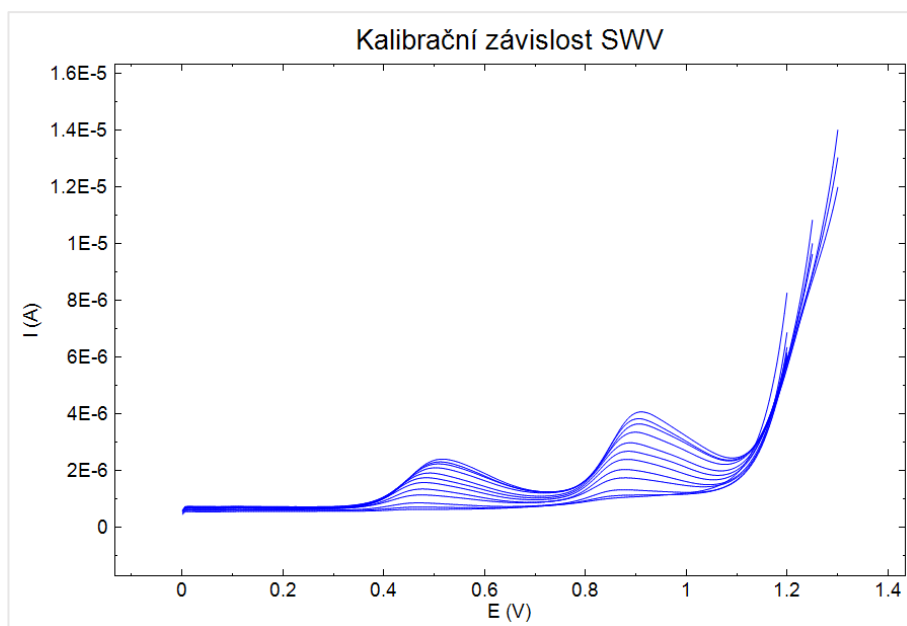
U G (Obrázek 88) je to podobné jako u UA. Lineární rozsah je velký, lze pozorovat dvě různé směrnice pro nižší a vyšší koncentrace G. Píky se posouvají minimálně a zachovávají si svou šířku po celou řadu měření.



Obrázek 88: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku G na jeho koncentraci na BDDE. DPV, AP pH 4,7.

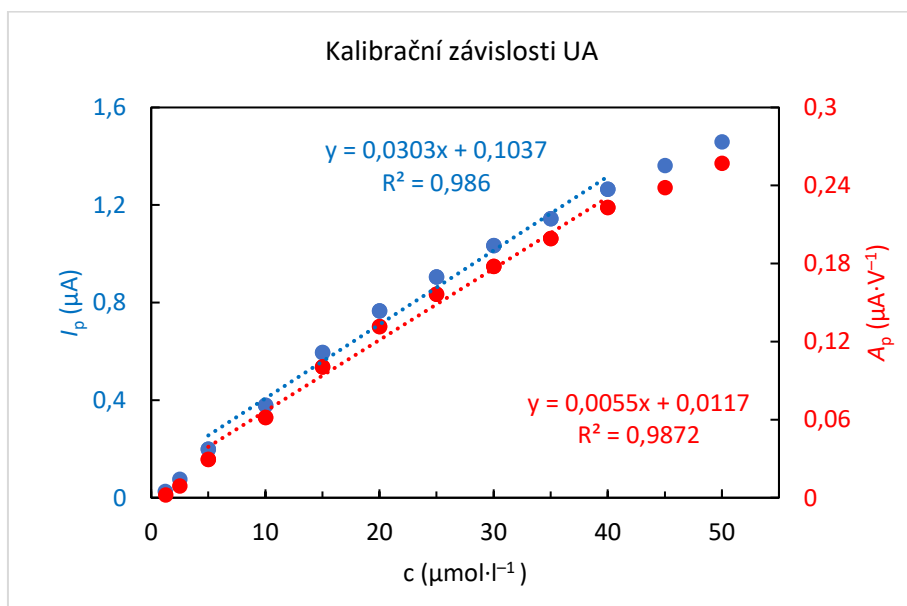
3.7.2.2. SWV

Při měření směsi UA, G a A pomocí SWV je trend podobný jako u DPV. Pík adeninu se ztrácí v proudech pozadí, píky se téměř neposouvají (Obrázek 89).

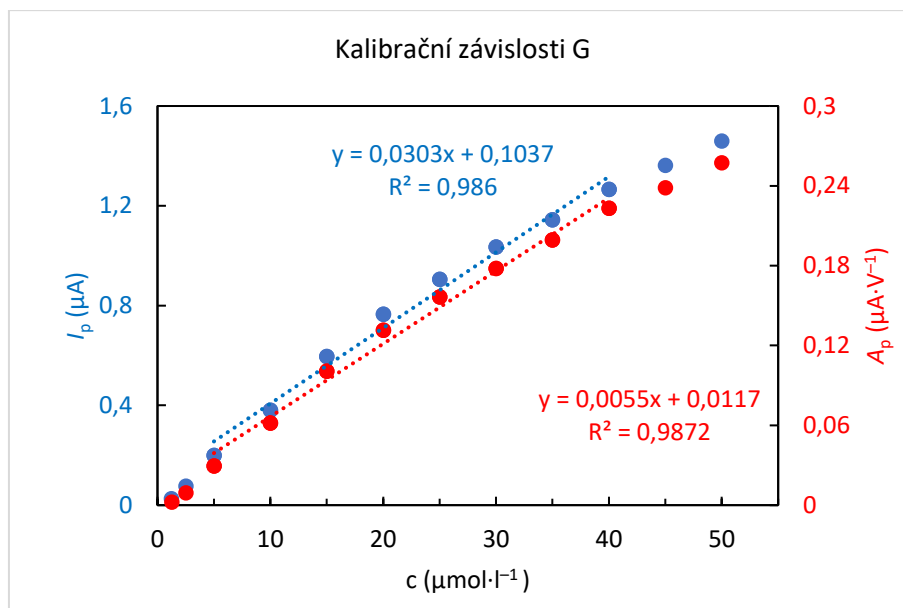


Obrázek 89: Kalibrace směsi UA, G a A na BDDE. SWV, AP pH 4,7.

V případě UA (Obrázek 90) i G (Obrázek 91) stoupá závislost výšek i ploch píků na koncentraci téměř lineárně pro obě látky.



Obrázek 90: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku UA na její koncentraci na BDDE. SWV, AP pH 4,7.

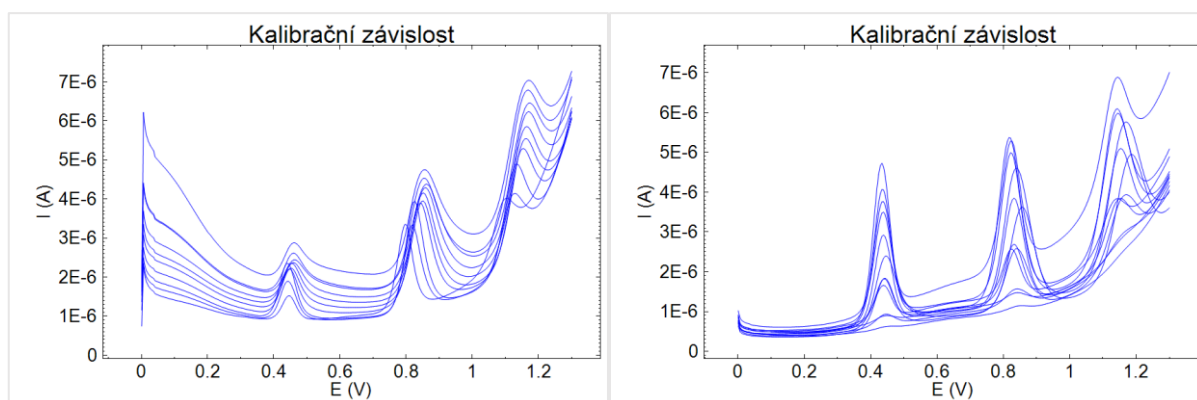


Obrázek 91: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku G na jeho koncentraci na BDDE. SWV, AP pH 4,7.

3.7.3. GCE

3.7.3.1. DPV

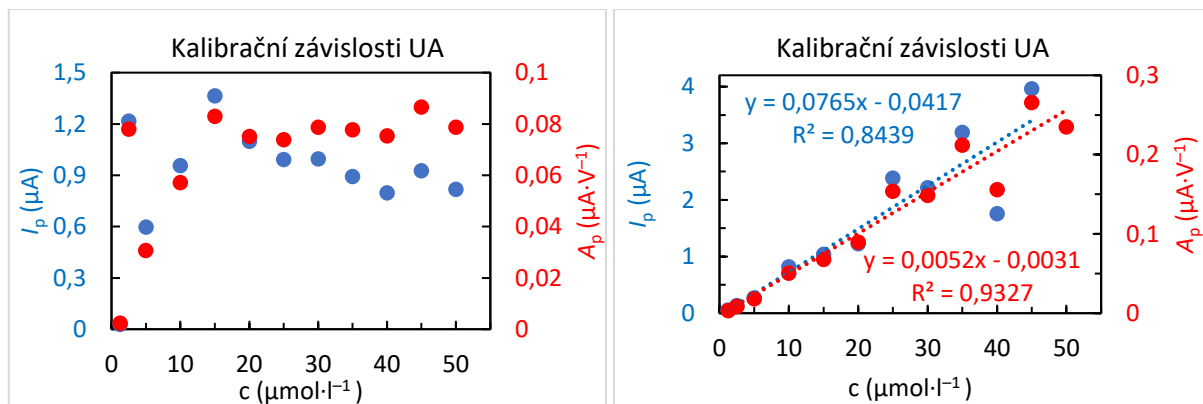
Směs UA, G a A byla měřena pomocí DPV 2x. Poprvé bez leštění elektrody před každým kalibračním bodem (Obrázek 92 vlevo), poté s leštěním elektrody před každým bodem (Obrázek 92 vpravo). V prvním případě se píky posouvaly k vyšším potenciálům se zvyšující se koncentrací a narůstaly proudy pozadí. V druhém případě výšky píků závisí na kvalitě naleštění povrchu elektrody.



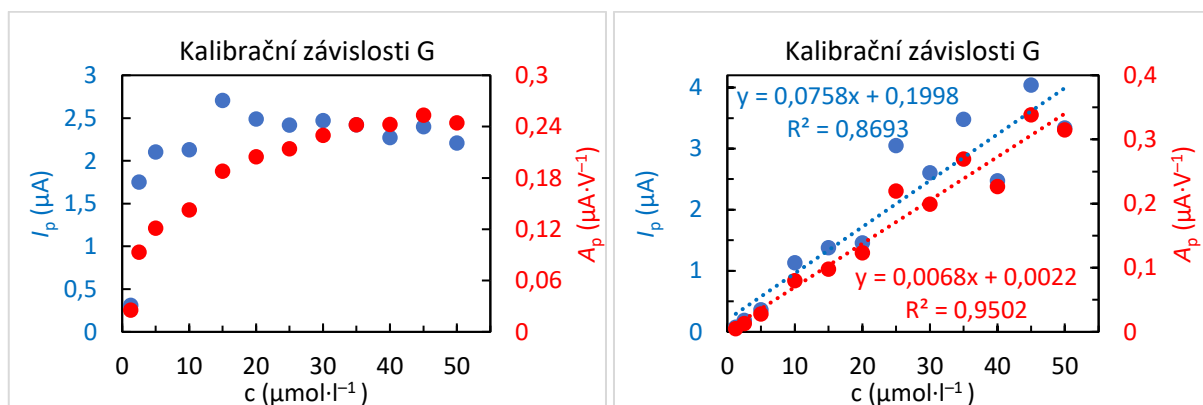
Obrázek 92: Kalibrace bez leštění (vlevo) a s leštěním GCE (vpravo). DPV, AP pH 4,7.

V případě měření bez leštění elektrody docházelo při DPV analýze UA (Obrázek 93 vlevo), G (Obrázek 94 vlevo) i A (Obrázek 95 vlevo) k rychlé pasivaci elektrody, signály stoupaly pouze v několika prvních měření, poté se již signály nezvyšovaly, a dokonce s vzrůstající

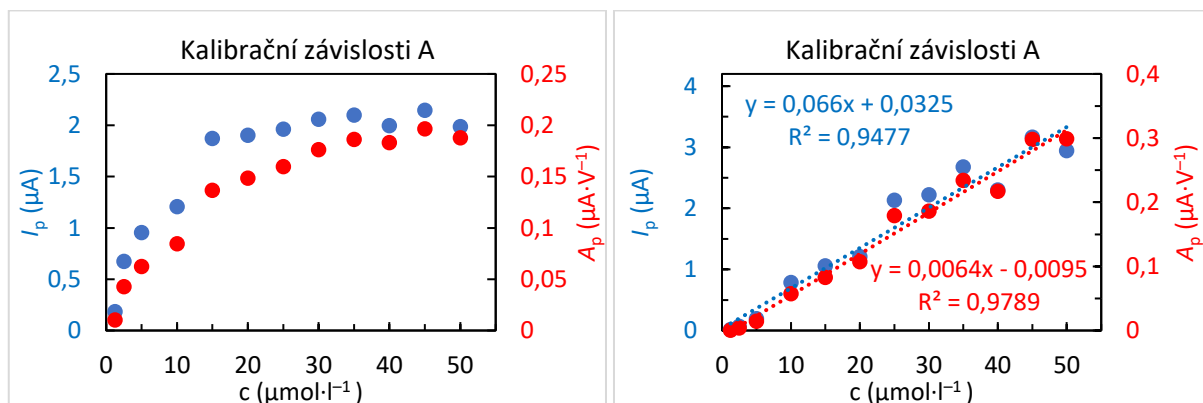
koncentrací i klesaly. V případě měření s leštěním elektrody bylo dosaženo linearit v celém rozsahu analyzovaných koncentrací u UA (Obrázek 93 vpravo), G (Obrázek 94 vpravo) i A (Obrázek 95 vpravo), ovšem s horší přesností, která závisí na kvalitě naleštění elektrody.



Obrázek 93: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku UA na její koncentraci bez leštění GCE (vlevo) a s leštěním GCE (vpravo). DPV, AP pH 4,7.



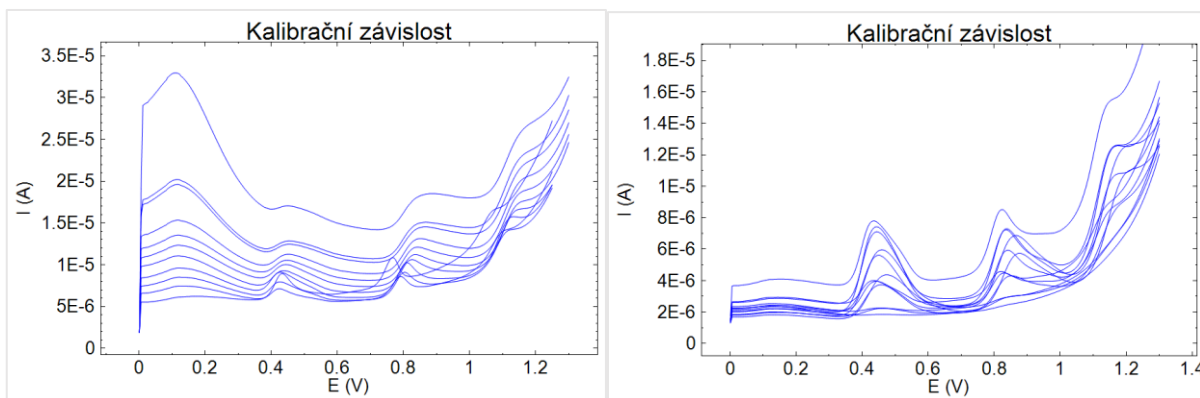
Obrázek 94: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku G na jeho koncentraci bez leštění GCE (vlevo) a s leštěním GCE (vpravo). DPV, AP pH 4,7.



Obrázek 95: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku A na jeho koncentraci bez leštění GCE (vlevo) a s leštěním GCE (vpravo). DPV, AP pH 4,7.

3.7.3.2. SWV

Směs UA, G a A byla po provedení DPV analýzy měřena také 2x pomocí SWV. Poprvé bez leštění elektrody před každým kalibračním bodem (Obrázek 96 vlevo), ale po DPV, poté s leštěním elektrody před každým bodem (Obrázek 96 vpravo), ale opět po DPV. V prvním případě se zvyšující koncentrací, stejně jako u DPV, narůstaly proudy pozadí, ale výšky píků se příliš nezvyšovaly. V druhém případě opět velikost naměřených signálů závisela na kvalitě naleštění povrchu elektrody.

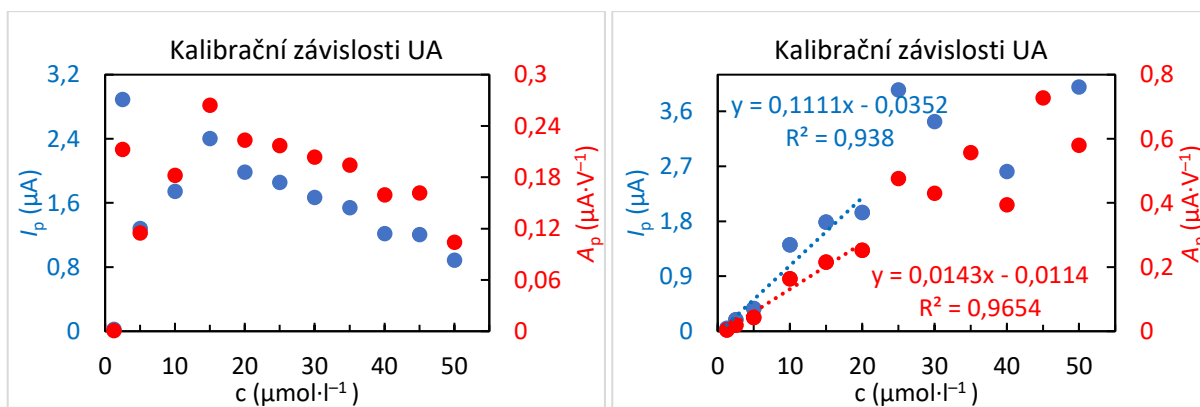


Obrázek 96: Kalibrace bez leštění (vlevo) a s leštěním GCE (vpravo). SWV, AP pH 4,7.

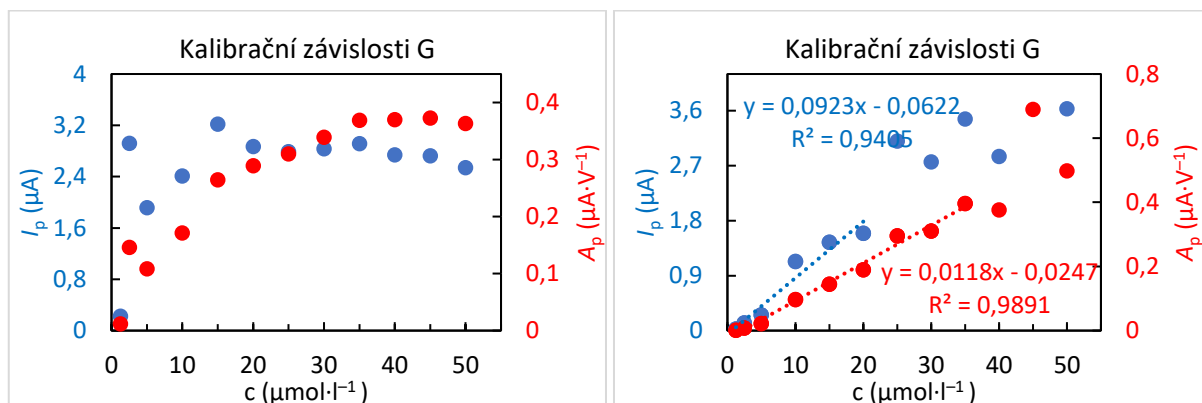
V případě měření bez leštění elektrody pro UA (

Obrázek 97 vlevo), G (Obrázek 98 vlevo) i A (Obrázek 99 vlevo) docházelo k úplně stejné situaci jako u DPV – píky UA, G i A se vzrůstající koncentrací spíše klesaly, či se jejich výška neměnila. V případě měření s leštěním elektrody opět výška i plocha signálu hodně závisela na leštění elektrody. V oblasti nižších koncentrací byla závislost lineární u UA (

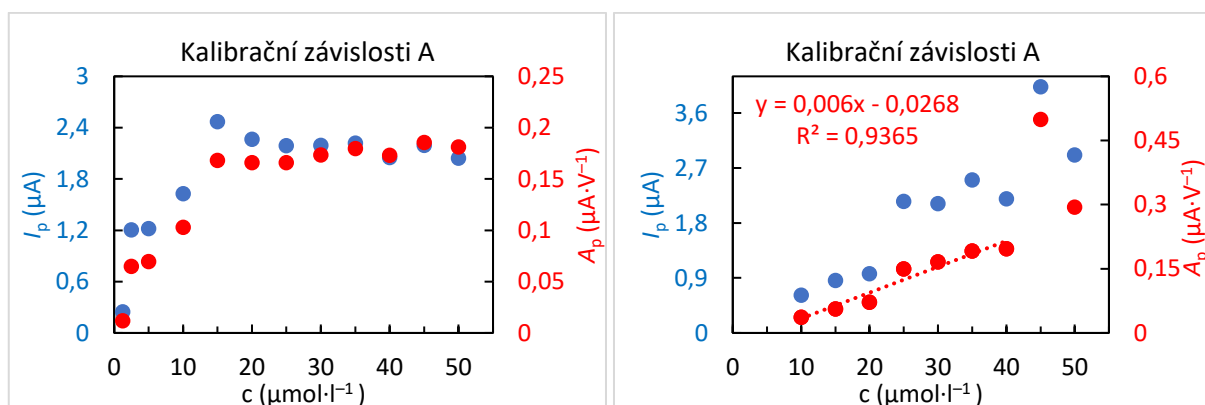
Obrázek 97 vpravo) a G (Obrázek 98 vpravo). Adenin byl skryt v pozadí elektrody, jeho signál se objevil až při vyšších koncentracích (Obrázek 99 vpravo).



Obrázek 97: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku UA na její koncentraci bez leštění GCE (vlevo) a s leštěním GCE (vpravo). SWV, AP pH 4,7.



Obrázek 98: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku G na jeho koncentraci bez leštění GCE (vlevo) a s leštěním GCE (vpravo). SWV, AP pH 4,7.



Obrázek 99: Závislost výšky (modrá) a plochy (červená) píku A na jeho koncentraci bez leštění GCE (vlevo) a s leštěním GCE (vpravo). SWV, AP pH 4,7.

3.8. Dlouhodobá stabilita elektrod při měření směsi kyseliny močové, guaninu a adeninu

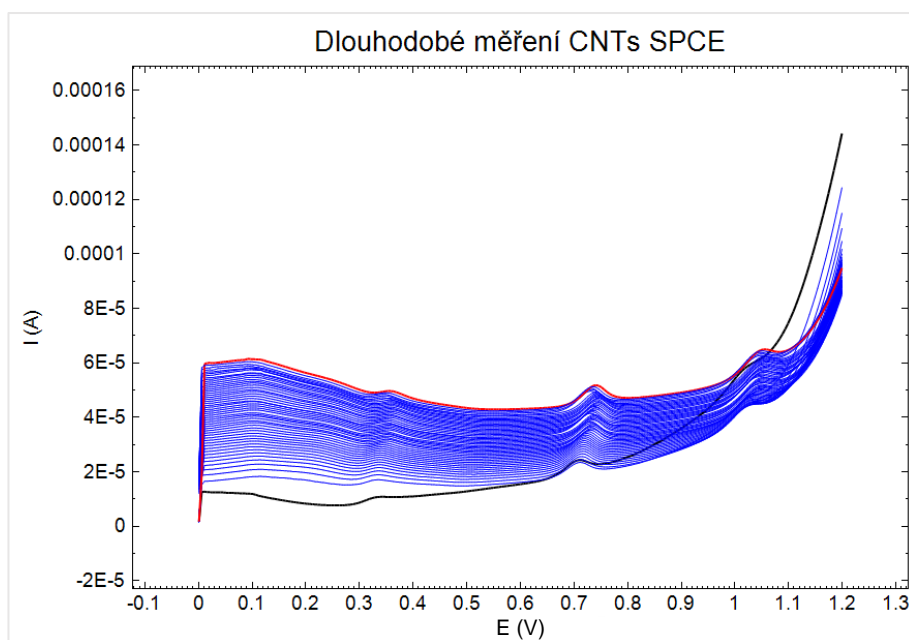
Pro sledování dlouhodobé stability senzorů byla zvolena SWV, což je náročnější pulzní technika než DPV, čímž by se elektroda měla více namáhat a případná pasivace by se měla rychleji projevit a být průkaznější. Směs byla vždy proměřena v AP při pH 4,7 50x ihned po sobě, první měření je na voltamogramech zobrazeno černě, poslední červeně.

3.8.1. Menší koncentrace kyseliny močové, guaninu a adeninu

Nejprve byla na SPCE, BDDE a GCE proměřena směs UA, G a A o koncentraci každé látky $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Byla sledována stabilita nebo případné změny v charakteru základní linie a pokles píků všech látek v závislosti na opakovaných měřeních pomocí SWV.

3.8.1.1. Měření na SPCE

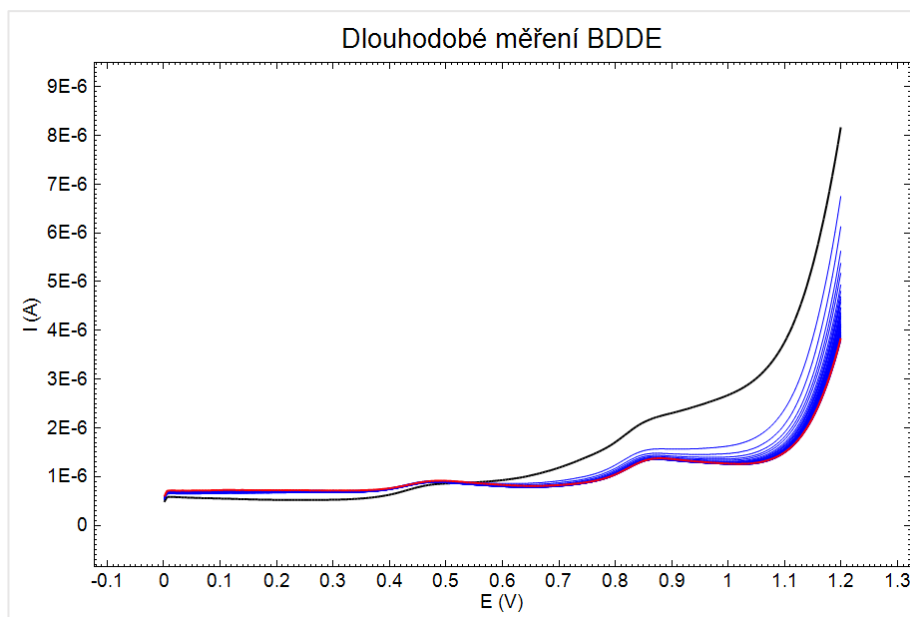
Při měření na SPCE (Obrázek 100) byly viditelné signály všech tří látek. Se zvyšujícím se potenciálem narůstaly proudy pozadí. S opakovaným měřením narůstalo pozadí v negativnějších potenciálech, v pozitivnějších potenciálech s druhým a dalším měřením pozadí mírně klesá a pak se drželo na přibližně stejné hodnotě. Výška píku UA při prvním měření byla 1,53 μA , při posledním 1,80 μA . Výška píku G při prvním měření byla 3,98 μA , při posledním 6,34 μA a výška píku A při prvním měření byla 2,29 μA a při posledním 4,92 μA .



Obrázek 100: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na SPCE při koncentraci látek 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.

3.8.1.2. Měření na BDDE

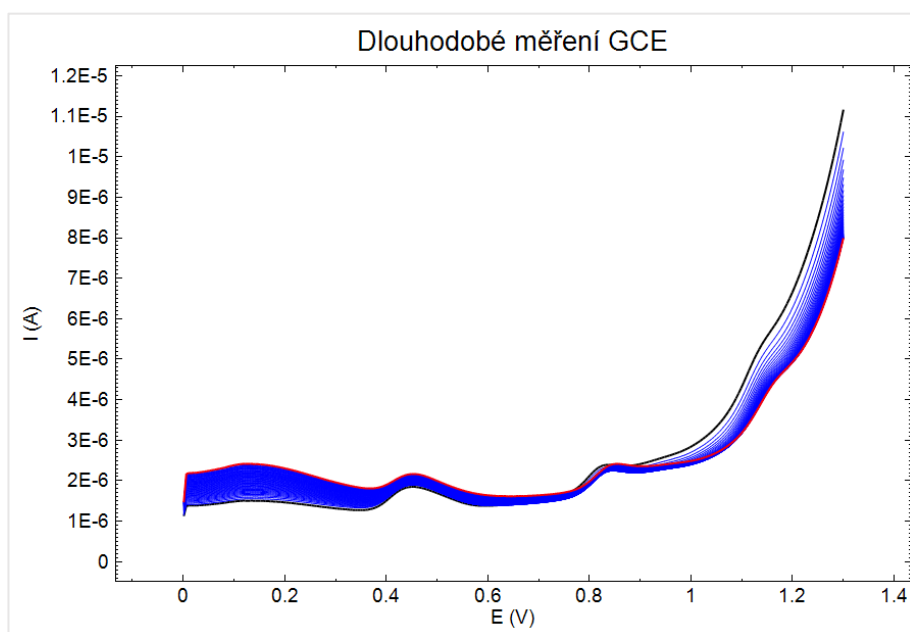
Při měření na BDDE (Obrázek 101) byly proudy pozadí u všech měření v negativnějších potenciálech přibližně stejné, u pozitivnějších potenciálů proudy pozadí mírně klesaly. Kvůli oxidaci A při vysokých potenciálech jsou vidět pouze signály UA a G. Měření jsou opakovatelná, signály stabilní. Výška píku UA při prvním měření byla 0,10 μA , při posledním 0,16 μA a výška píku G při prvním měření byla 0,20 μA , při posledním měření 0,33 μA .



Obrázek 101: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na BDDE při koncentraci látek $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.

3.8.1.3. Měření na GCE

Při měření na GCE (Obrázek 102) proudy pozadí mírně vzrůstaly, v pozitivnějších potenciálech mírně klesaly, čímž se o něco lépe vykreslil signál adeninu. Výška píku UA při prvním měření byla $0,53 \mu\text{A}$, při posledním $0,42 \mu\text{A}$, výška píku G při prvním měření byla $0,36 \mu\text{A}$ a při posledním $0,37 \mu\text{A}$ a výška píku A při prvním měření byla $0,16 \mu\text{A}$ a při posledním $0,15 \mu\text{A}$.



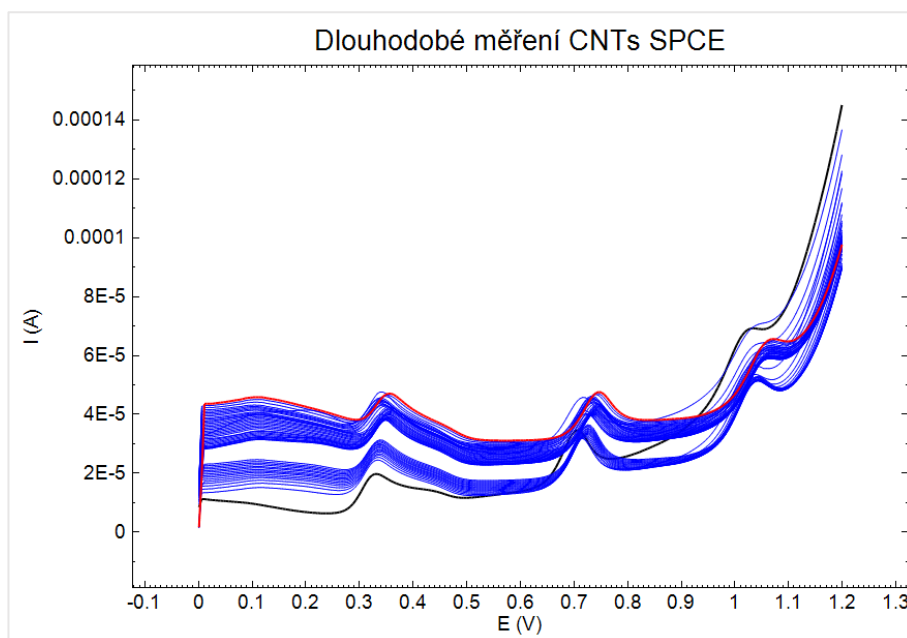
Obrázek 102: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na GCE při koncentraci látek $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.

3.8.2. Větší koncentrace kyseliny močové, guaninu a adeninu

Dále byla směs připravena o vyšší koncentraci $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ jednotlivých látek a proměřena stejným způsobem jako v předchozí kapitole opět na všech třech elektrodách.

3.8.2.1. Měření na SPCE

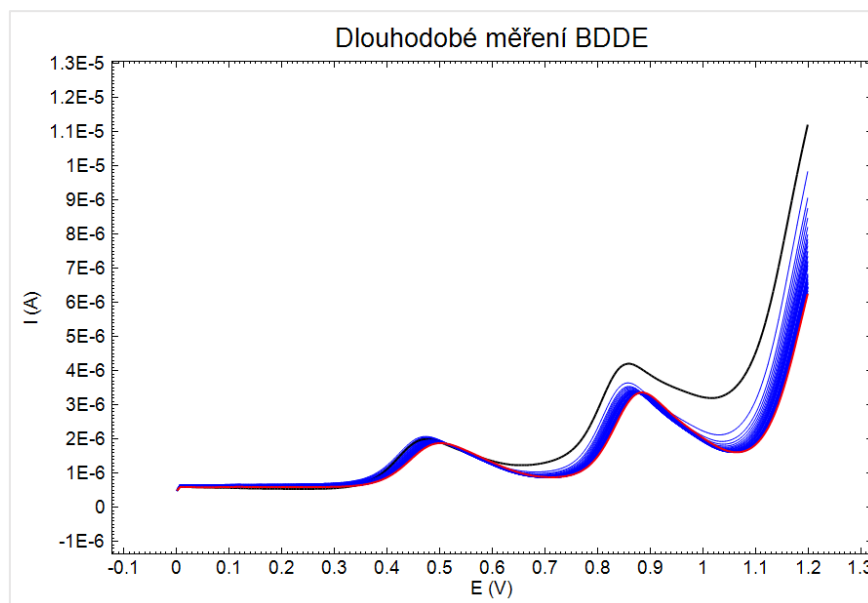
Průběh opakovaných SWV voltamogramů na SPCE s vyšší koncentrací látek (Obrázek 103) je stejný jako průběh u koncentrace nižší (Obrázek 100). Přibližně po 20. měření došlo k nárůstu proudů pozadí, který byl způsoben nechtěným pohnutím s měřicí nádobkou a elektrodou. Výška píku UA při prvním měření byla $11,70 \mu\text{A}$, při posledním $10,86 \mu\text{A}$, výška píku G při prvním měření byla $14,68 \mu\text{A}$ a při posledním $13,28 \mu\text{A}$ a výška píku A při prvním měření byla $9,48 \mu\text{A}$ a při posledním $8,48 \mu\text{A}$.



Obrázek 103: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na SPCE při koncentraci látek $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.

3.8.2.2. Měření na BDDE

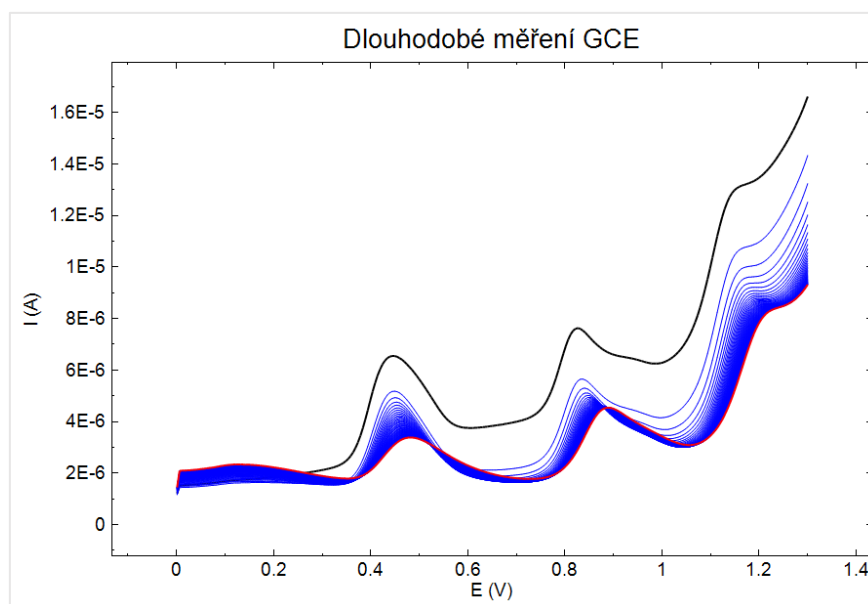
Průběh opakovaných měření směsi o vyšší koncentraci UA, G a A na BDDE (Obrázek 104) je opět srovnatelné s měřením s nižší koncentrací látek (Obrázek 101), podobně jako v případě experimentů s SPCE. Adenin není možné detekovat ani při této vyšší koncentraci. Výška píku UA při prvním měření byla $1,13 \mu\text{A}$, při posledním $1,15 \mu\text{A}$ a výška píku G při prvním měření byla $2,02 \mu\text{A}$ a při posledním $2,15 \mu\text{A}$.



Obrázek 104: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na BDDE při koncentraci látek $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.

3.8.2.3. Měření na GCE

Měření vyšší koncentrace látek na GCE (Obrázek 105) je průběhem srovnatelné s měřením nižších koncentrací (Obrázek 102). Signály jsou lépe vyhodnotitelné (hlavně A), mírně se mění signál UA, který je s opakovaným měřením menší a širší. Výška píku UA při prvním měření byla $3,76 \mu\text{A}$, při posledním $1,60 \mu\text{A}$, výška píku G při prvním měření byla $2,71 \mu\text{A}$ a při posledním $2,19 \mu\text{A}$ a výška píku A při prvním měření byla $2,29 \mu\text{A}$ a při posledním $1,48 \mu\text{A}$.



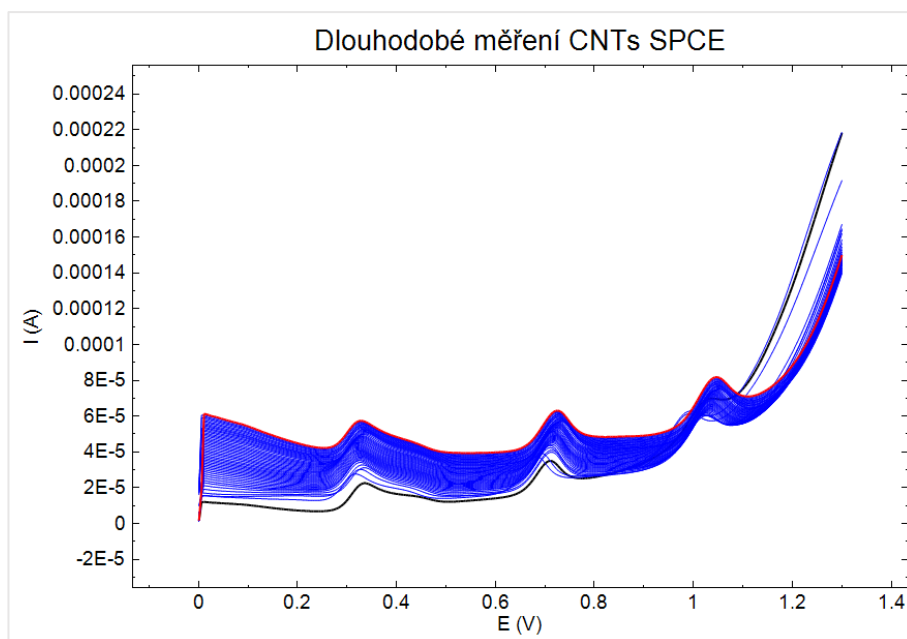
Obrázek 105: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na GCE při koncentraci látek $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.

3.8.3. Opakovaná měření směsi kyseliny močové, guaninu a adeninu v delším časovém úseku

Posledním testem dlouhodobé stability elektrod v modelové směsi UA, G a A bylo opakování SWV analýz na jedné elektrodě po 18 minutách. Měření bylo provedeno opět 50x a byla zvolena vyšší koncentrace látek $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, aby byly změny signálů dobře viditelné.

3.8.3.1. Měření na SPCE

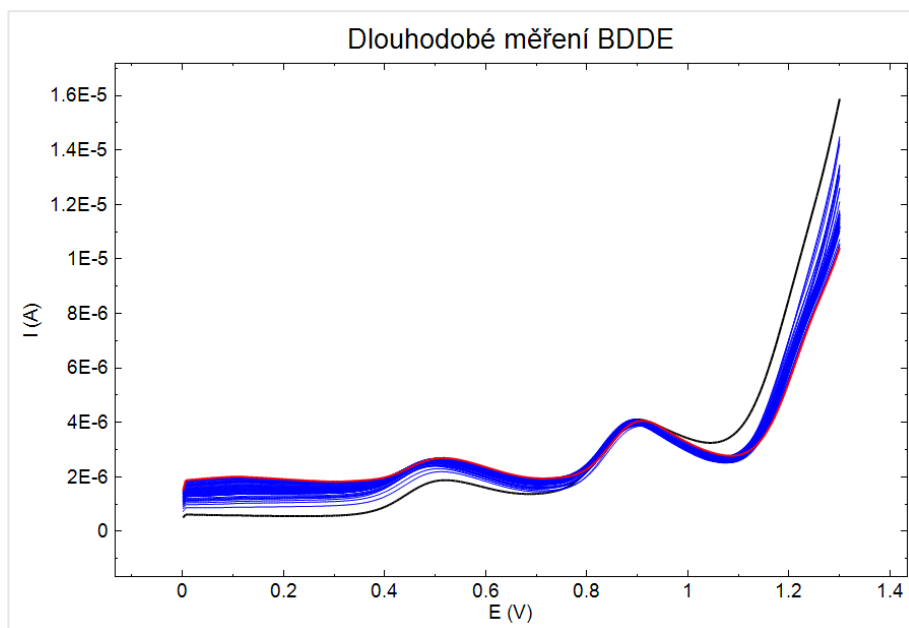
V případě opakování po čase na SPCE (Obrázek 106) je průběh měření obdobný jako při okamžitém měření, časová prodleva nemá na průběh voltamogramů vliv. Výška píku UA při prvním měření byla $13,98 \mu\text{A}$, při posledním $16,01 \mu\text{A}$, výška píku G při prvním měření byla $14,71 \mu\text{A}$ a při posledním $19,55 \mu\text{A}$ a výška píku A při prvním měření byla $10,40 \mu\text{A}$ a při posledním $19,16 \mu\text{A}$.



Obrázek 106: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na SPCE při koncentraci látek $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů s přestávkou 18 min, AP pH 4,7.

3.8.3.2. Měření na BDDE

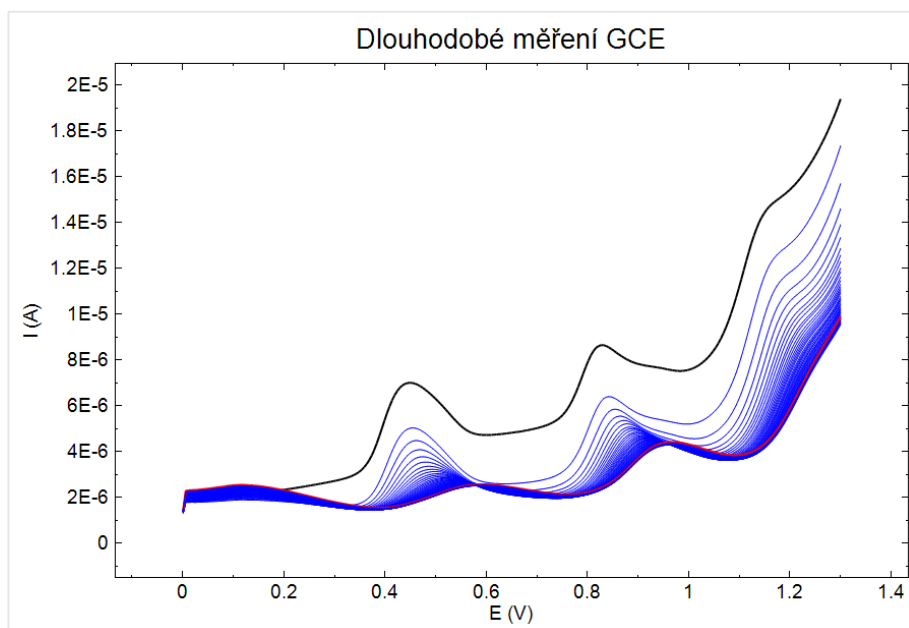
Při opakovaném měření po čase na BDDE (Obrázek 107) je průběh voltamogramů opět podobný s měřením bez časové prodlevy. V tomto případě pouze docházelo k mírnému nárůstu pozadí u nižších hodnot potenciálů, který ovlivňuje signál UA, a pokles proudů u píku G není tak výrazný. Výška píku UA při prvním měření byla $0,89 \mu\text{A}$, při posledním $0,81 \mu\text{A}$ a výška píku G při prvním měření byla $1,77 \mu\text{A}$ a při posledním $1,71 \mu\text{A}$.



Obrázek 107: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na SPCE při koncentraci látek $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů s přestávkou 18 min, AP pH 4,7.

3.8.3.3. Měření na GCE

Při měření na GCE s časovou prodlevou (Obrázek 108) se signály posouvají k pozitivnějším potenciálům, značně se snižují a rozšiřují. Adenin při posledním měření již signál neposkytuje. Výška píku UA při prvním měření byla $3,44 \mu\text{A}$, při posledním $0,73 \mu\text{A}$, výška píku G při prvním měření byla $2,57 \mu\text{A}$ a při posledním $1,35 \mu\text{A}$ a výška píku A při prvním měření byla $1,80 \mu\text{A}$.



Obrázek 108: Dlouhodobé měření směsi UA, G a A na SPCE při koncentraci látek $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. SWV, 50 skenů s přestávkou 18 min, AP pH 4,7.

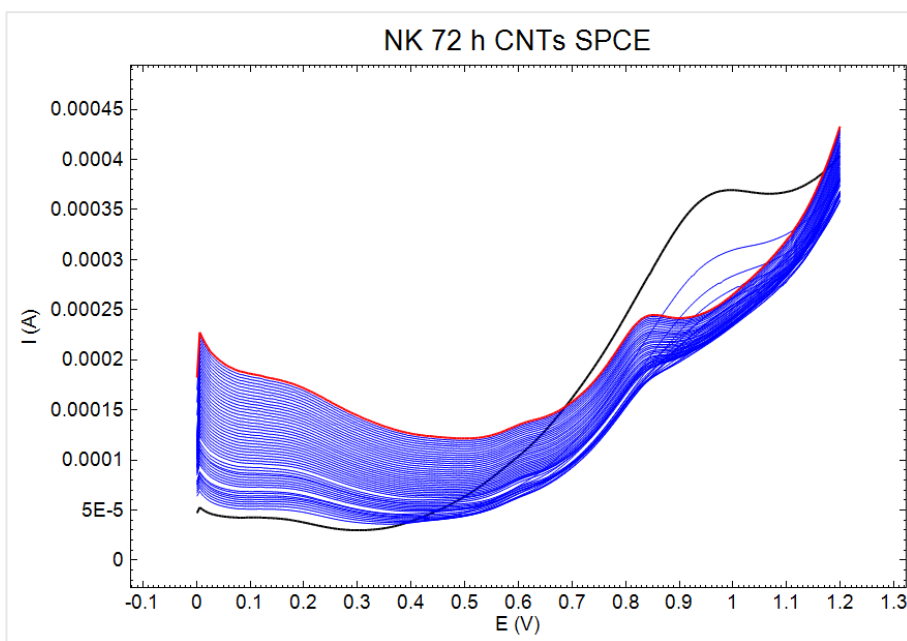
3.9. Stabilita elektrod při opakovaném měření vzorků moči potkana

Závěrečným experimentem ohledně stability elektrod bylo testování tištěných senzorů na praktických vzorcích moči potkana. Prvním vzorkem byla moč potkana bez ozáření – negativní kontrola o pH 7 odebrána po 72 hodinách (NK 1). Druhým vzorkem byla moč bez ozáření potkana – negativní kontrola o pH 8 odebrána po 48 h (NK 2). Posledním vzorkem byla moč potkana po ozáření kobaltovým zářičem dávkou 3 Gy a odebrána po 48 hodinách. Tyto vzorky zmražené v plastových mikrozkušných nádobách poskytl pracoviště Univerzity obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Katedra radiobiologie. Měření probíhalo přímo bez dalších úprav po kápnutí 50 μ l vzorku na elektrody tištěných senzorů. Vzhledem k obsahu řady dalších látek, které mohou být elektroaktivní, byla u těchto vzorků sledována pouze celková změna voltametrické odezvy po opakovaných měření. Jejich identifikace je mimo téma této diplomové práce.

3.9.1. Negativní kontrola 1

3.9.1.1. Měření na SPCE

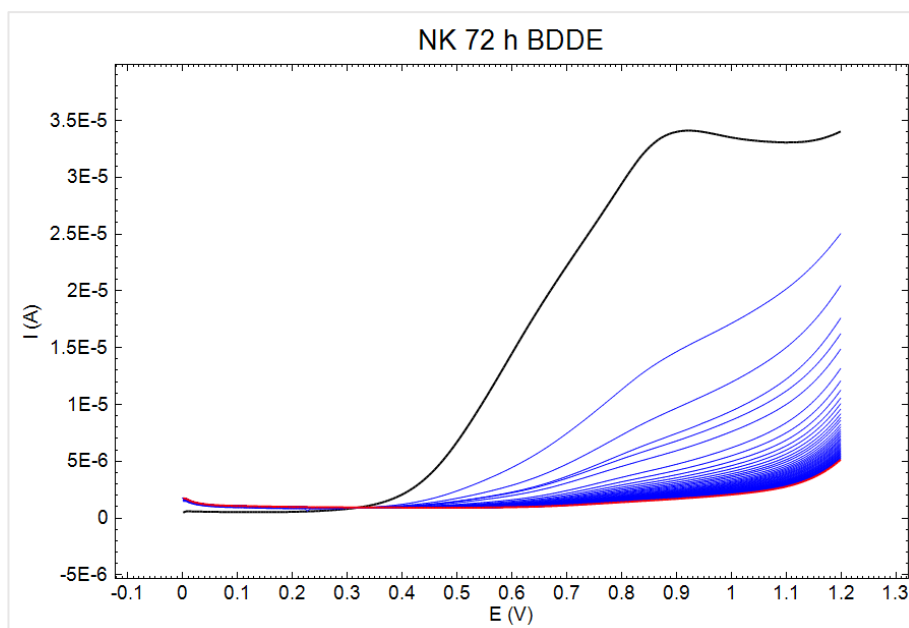
Při prvním měření vzorku pomocí SWV (Obrázek 109) se objevil náznak signálu okolo 0,15 V a pík okolo 0,95 V. Tento pík po dalších opakováních vymizel, zároveň se zvýšil pík okolo 0,85 V a i signál okolo 0,2 V. Při nízkých potenciálech došlo ke výraznému zvýšení proudu pozadí.



Obrázek 109: Vzorek NK 1 měřený na SPCE. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.

3.9.1.2. Měření na BDDE

Při prvním voltamogramu se objevil pouze jeden velký signál okolo 0,9 V, což vykazuje podobnost s měřením vzorku na SPCE (Obrázek 110). Po 50 měřeních signál zcela vymizí.

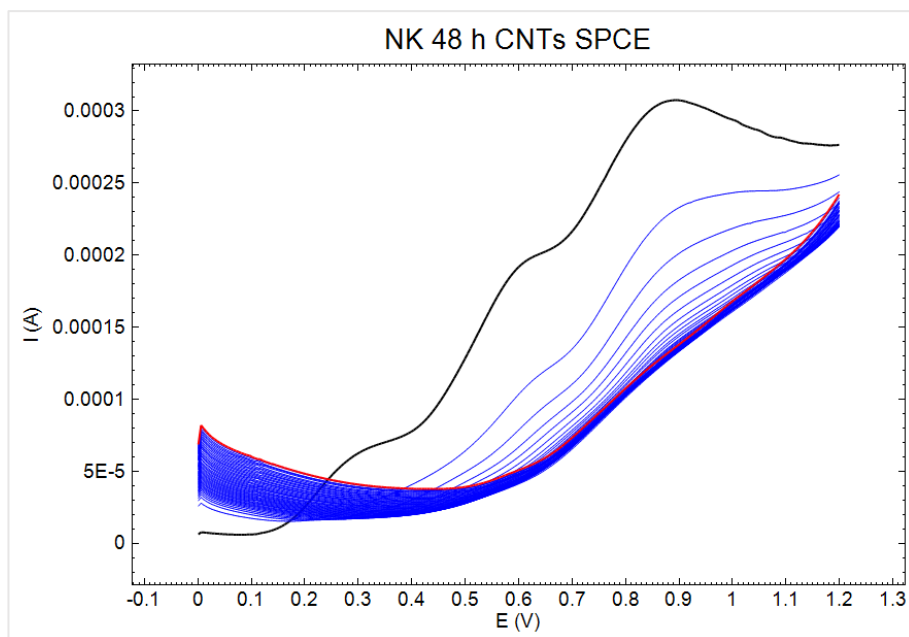


Obrázek 110: Vzorek NK 1 měřený na BDDE. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.

3.9.2. Negativní kontrola 2

3.9.2.1. Měření na SPCE

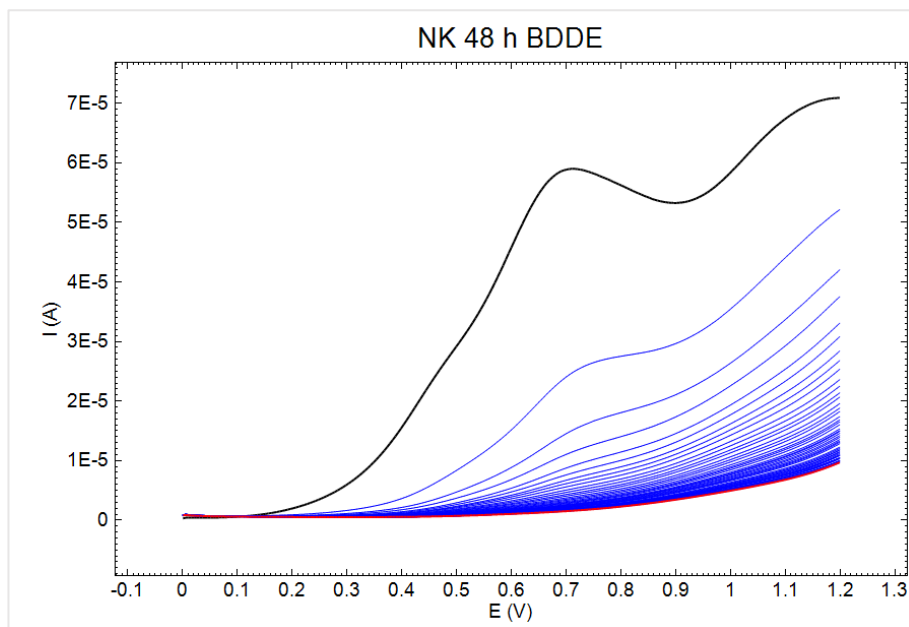
V případě druhého vzorku negativní kontroly měřeného na SPCE (Obrázek 111) byly při prvním měření vidět 3 signály – první při 0,3 V, druhý při 0,6 V a třetí při 0,9 V. Všechny tyto signály po opakování analýz klesaly, až zcela vymizely. Při nízkých potenciálech také vzrůstaly proudy pozadí.



Obrázek 111: Vzorek NK 2 měřený na SPCE. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.

3.9.2.2. Měření na BDDE

Při měření druhého vzorku na BDDE (Obrázek 112) je viditelný velký signál okolo 0,7 V, náznak signálu při 0,5 V a okolo 1,2 V třetí signál, který není viditelný celý, neboť 1,2 V byl potenciál, do kterého byl záznam proměřen. Po opakování analýz ale všechny tyto signály vymizely.

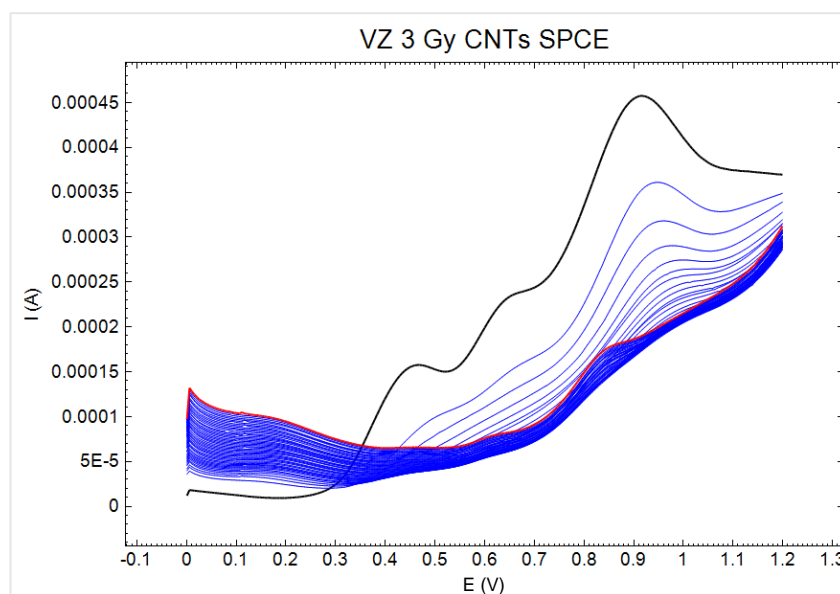


Obrázek 112: Vzorek NK 2 měřený na BDDE. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.

3.9.3. Vzorek po ozáření

3.9.3.1. Měření na SPCE

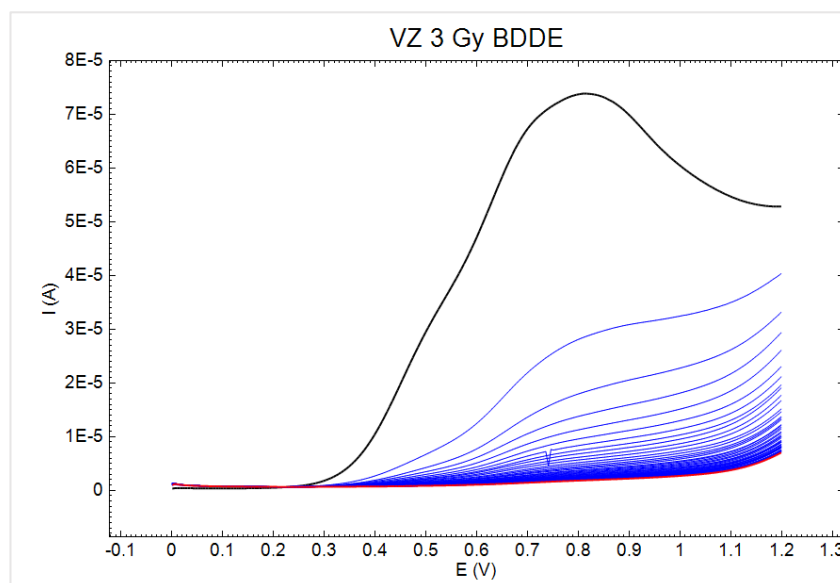
V případě vzorku po ozáření (Obrázek 113) byly při prvním měření viditelné tři signály – při 0,45 V, 0,65 V a 0,9 V. Signály opět s opakovaným měřením klesaly, při 0,85 V se objevil vyhodnotitelný signál. Tento signál je na SPCE obdobný jako u vzorku NK 1.



Obrázek 113: Vzorek po ozáření měřený na SPCE. SWV, 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.

3.9.3.2. Měření na BDDE

Při měření vzorku po ozáření se objevil jeden obrovský signál při 0,8 V (Obrázek 114), který ale po padesáti měření zcela vymizel, což je obdobné jako u vzorku NK 2.



Obrázek 114: Vzorek po ozáření měřený na BDDE. SWV. 50 skenů ihned po sobě, AP pH 4,7.

ZÁVĚR

V případě tištěných senzorů je třeba dobře zvolit pracovní prostředí. Přídavek chloridů stabilizuje referentní část, ale způsobí posun signálů do pozitivnějších potenciálů o i více než 100 mV. Opakovaná měření pak mají menší posuny píků než měření bez přídavku chloridů, ale může se stát, že některé látky již nebude možné zaznamenat, protože se jejich signály posunou do příliš vysokých potenciálů a překryje je pozadí elektrody.

BDDE umožňuje měřit opakovaná měření roztoků organických látek s relativně stabilní odezvou, ale citlivost je menší než u SPCE. V některých případech nelze analyzované látky detekovat při nízkých koncentracích kvůli nižší citlivosti v porovnání s SPCE.

Při měření kalibračních závislostí nastávaly komplikace při kalibraci u SPCE, pro lepší výsledky je potřeba použít pro každé měření novou elektrodu. Opakovaná měření jsou možná, ale je tu riziko, že odezva nebude opakovatelná, může docházet k pasivaci jak pracovní, tak i referentní části senzoru (podle prostředí).

Při opakovaných měřeních dochází většinou ke změnám proudů pozadí, kdy se zvyšují proudy v nižších potenciálech a klesají ve vyšších u SPCE. U BDDE změny nejsou tak výrazné.

Při testovacích měřeních ve složitějších vzorcích se mění průběh voltametrické odezvy s opakováním měření – signály se mohou posouvat, vzrůstat, či zcela vymizet. Dle prvních měření vzorků profil látek, které mohou indikovat poškození DNA, ve vzorcích klesá (vzorek s ozářením těchto látek obsahuje nejvíc, vzorek po 72 hodinách nejméně), protože tělo tyto látky opravuje a vylučuje. Pokud dojde k nějakému poškození, po delším čase se látky vyskytují v těle v menším množství.

POUŽITÁ LITERATURA

1. YOUSEFZADEH, M., CH. HENPITA, R. VYAS, C. SOTO-PALMA, P. ROBBINS a L. NIEDERNHOFER. DNA damage—how and why we age?. *ELife* [online]. 2021, 10 [cit. 2023-02-13]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.62852
2. CHATTERJEE, N.; G. C. WALKER. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* [online]. 2017, 58(5), 235-263 [cit. 2023-02-13]. ISSN 08936692. Dostupné z: doi:10.1002/em.22087
3. AMES, B. N., M. K. SHIGENAGA a T. M. HAGEN. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1993, 90(17), 7915 [cit. 2023-02-22]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.90.17.7915
4. COOKE, M. S., M. D. EVANS, M. DIZDAROGLU a J. LUNEC. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* [online]. 2003, 17(10), 1195-1214 [cit. 2023-02-15]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.02-0752rev
5. WU, Y., CH. J. MUNDY, M. E. COLVIN a Roberto CAR. On the Mechanisms of OH Radical Induced DNA-Base Damage: A Comparative Quantum Chemical and Car–Parrinello Molecular Dynamics Study. *The Journal of Physical Chemistry A* [online]. 2004, 108(15), 2922-2929 [cit. 2023-05-10]. ISSN 1089-5639. Dostupné z: doi:10.1021/jp0363592
6. VALKO, M., D. LEIBFRITZ, J. MONCOL, M. T. D. CRONIN, M. MAZUR a J. TELSER. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* [online]. 2007, 39.1: 44-50. [cit. 2023-02-20]. Dostupné z: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
7. DONG, CH., W. YOON a P. J. GOLDSCHMIDT-CLERMONT. DNA Methylation and Atherosclerosis. *The Journal of Nutrition* [online]. 2002, 132(8), 2406S-2409S [cit. 2023-03-03]. ISSN 00223166. Dostupné z: doi:10.1093/jn/132.8.2406S
8. HEUSIPP, G, S. FALKER a M. ALEXANDERSCHMIDT. DNA adenine methylation and bacterial pathogenesis. *International Journal of Medical Microbiology* [online]. 2007, 297(1), 1-7 [cit. 2023-05-10]. ISSN 14384221. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijmm.2006.10.002

9. YONEKURA, S.-I., N. NAKAMURA, S. YONEI a Q.-M. ZHANG-AKIYAMA. Generation, Biological Consequences and Repair Mechanisms of Cytosine Deamination in DNA. *Journal of Radiation Research* [online]. 2009, 50(1), 19-26 [cit. 2023-03-03]. ISSN 0449-3060. Dostupné z: doi:10.1269/jrr.08080
10. NEUBERGER, M. S., R. S. HARRIS, J. DI NOIA a S. K. PETERSEN-MAHRT. Immunity through DNA deamination. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2003, 28(6), 305-312 [cit. 2023-03-03]. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/S0968-0004(03)00111-7
11. RAVANAT, J.-L. a T. DOUKI. UV and ionizing radiations induced DNA damage, differences and similarities. *Radiation Physics and Chemistry* [online]. 2016, 128, 92-102 [cit. 2023-03-03]. ISSN 0969806X. Dostupné z: doi:10.1016/j.radphyschem.2016.07.007
12. CADET, J., S. MOURET, J.-L. RAVANAT a T. DOUKI. Photoinduced Damage to Cellular DNA: Direct and Photosensitized Reactions†. *Photochemistry and Photobiology* [online]. 2012, 88(5), 1048-1065 [cit. 2023-05-10]. ISSN 00318655. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-1097.2012.01200.x
13. KASAI, H., Z. YAMAIZUMI, M. BERGER a J. CADET. Photosensitized formation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in DNA by riboflavin: a nonsinglet oxygen-mediated reaction. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1992, 114(24), 9692-9694 [cit. 2023-05-10]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja00050a078
14. DASARI, S. a P. B. TCHOUNWOU. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2014, 740, 364-378 [cit. 2023-05-10]. ISSN 00142999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025
15. NEUMANN, H.-G.. The role of DNA damage in chemical carcinogenesis of aromatic amines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* [online]. 1986, 112(2), 100-106 [cit. 2023-05-10]. ISSN 0171-5216. Dostupné z: doi:10.1007/BF00404390
16. WHYATT, R. M., W. JEDRYCHOWSKI; K. HEMMINKI; R. M. SANTELLA; W.-Y. TSAI; K. YANG; F. P. PERERA. Biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA damage and cigarette smoke exposures in paired maternal and newborn blood samples as a

measure of differential susceptibility. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* [online]. 2001, 10.6: 581-588 [cit. 2023-05-10]. ISSN 1538-7755.

17. FARMER, P. B., R. SINGH, B. KAUR, et al. Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. 2003, 544(2-3), 397-402 [cit. 2023-05-10]. ISSN 13835742. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrrev.2003.09.002

18. E211 – benzoan sodný. *Fér potravina*. 2023 [cit. 2023-05-10]. Dostupné z: <https://www.ferpotravina.cz/seznam-ecek/E211>

19. E133 - Brilantní modř FCF (Cl potravinářská modř 2), *Fér potravina*. 2023 [cit. 2023-05-10]. Dostupné z: <https://www.ferpotravina.cz/seznam-ecek/E133>

20. E110 - Žlut' SY, *Fér potravina*. 2023 [cit. 2023-05-10]. Dostupné z: <https://www.ferpotravina.cz/seznam-ecek/E110>

21. AJITH, A. a S. A. JOHN. Electrochemical sensing performance of nitrogen rich zero- and two-dimensional carbon nanomaterials modified electrodes towards purines catabolism. *Electrochimica Acta* [online]. 2022, 426 [cit. 2023-05-14]. ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2022.140830

22. HAN, S.-H., K. W. MOON, Y. J. LEE a G.-J. LEE. Simultaneous Electrochemical Analysis of Uric Acid and Xanthine in Human Saliva and Serum Samples Using a 3D Reduced Graphene Oxide Nanocomposite-Modified Electrode. *Chemosensors* [online]. 2023, 11(3) [cit. 2023-05-15]. ISSN 2227-9040. Dostupné z: doi:10.3390/chemosensors11030185

23. GHANBARI, M. H., M. H. MASHHADIZADEH, Z. NOROUZI a H. SALEHZADEH. Simultaneous electrochemical detection of uric acid and xanthine based on electrodeposited B, N co-doped reduced graphene oxide, gold nanoparticles and electropolymerized poly (L-cysteine) gradually modified electrode platform. *Microchemical Journal* [online]. 2022, 175 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2022.107213

24. OJANI, R., A. ALINEZHAD a Z. ABEDI. A highly sensitive electrochemical sensor for simultaneous detection of uric acid, xanthine and hypoxanthine based on poly(l-methionine)

modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2013, 188, 621-630 [cit. 2023-03-06]. ISSN 09254005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2013.07.015

25. WANG, Z., X. DONG a J. LI. An inlaying ultra-thin carbon paste electrode modified with functional single-wall carbon nanotubes for simultaneous determination of three purine derivatives. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2008, 131(2), 411-416 [cit. 2023-03-07]. ISSN 09254005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2007.11.056

26. SUN, D., Y. ZHANG, F. WANG, K. WU, J. CHEN a Y. ZHOU. Electrochemical sensor for simultaneous detection of ascorbic acid, uric acid and xanthine based on the surface enhancement effect of mesoporous silica. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2009, 141(2), 641-645 [cit. 2023-05-14]. ISSN 09254005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2009.07.043

27. FERRAG, C., M. NOROOZIFAR a K. KERMAN. Thiol functionalized carbon ceramic electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles for simultaneous determination of purine derivatives. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2020, 110 [cit. 2023-05-15]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2019.110568

28. XIAO, F., F. ZHAO, J. LI, L. LIU a B. ZENG. Characterization of hydrophobic ionic liquid-carbon nanotubes-gold nanoparticles composite film coated electrode and the simultaneous voltammetric determination of guanine and adenine. *Electrochimica Acta* [online]. 2008, 53(26), 7781-7788 [cit. 2023-05-12]. ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2008.05.053

29. LEI, P., Y. ZHOU, R. ZHU, Y. LIU, CH. DONG a S. SHUANG. Novel strategy of electrochemical analysis of DNA bases with enhanced performance based on copper-nickel nanosphere decorated N,B-doped reduced graphene oxide. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2020, 147 [cit. 2023-05-16]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2019.111735

30. MAO, B., L. QIAN, M. GOVINDHAN, Z. LIU a A. CHEN. Simultaneous electrochemical detection of guanine and adenine using reduced graphene oxide decorated with AuPt nanoclusters. *Microchimica Acta* [online]. 2021, 188(8) [cit. 2023-05-13]. ISSN 0026-3672. Dostupné z: doi:10.1007/s00604-021-04926-7

31. SHAHROKHIAN, S., S. RASTGAR, M.K. AMINI a M. ADELI. Fabrication of a modified electrode based on Fe₃O₄NPs/MWCNT nanocomposite: Application to simultaneous determination of guanine and adenine in DNA. *Bioelectrochemistry* [online]. 2012, 86, 78-86 [cit. 2023-03-05]. ISSN 15675394. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2012.02.004
32. MATHEW, M. R., S. K. ANAND a K. G. KUMAR. Simultaneous voltammetric sensing of three DNA bases guanine, adenine and thymine at poly(L-arginine)-electrochemically reduced graphene oxide composite film modified glassy carbon electrode. *Ionics* [online]. 2022, 28(6), 3023-3036 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0947-7047. Dostupné z: doi:10.1007/s11581-022-04507-5
33. TANG, CH., U. YOGESWARAN a S.-M. CHEN. Simultaneous determination of adenine guanine and thymine at multi-walled carbon nanotubes incorporated with poly(new fuchsin) composite film. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, 636(1), 19-27 [cit. 2023-05-13]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2009.01.055
34. JAYADEVIMANORANJITHAM, J. a S. S. NARAYANAN. Fabrication of poly o-cresolphthalein complexone film modified electrode and its application to simultaneous determination of purine bases in denatured DNA. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2020, 108 [cit. 2023-05-13]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2019.110353
35. VISHNU, N. a S. BADHULIKA. Single step grown MoS₂ on pencil graphite as an electrochemical sensor for guanine and adenine: A novel and low cost electrode for DNA studies. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2019, 124-125, 122-128 [cit. 2023-03-10]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2018.08.055
36. DU, M., T. YANG, S. MA, CH. ZHAO a K. JIAO. Ionic liquid-functionalized graphene as modifier for electrochemical and electrocatalytic improvement: Comparison of different carbon electrodes. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2011, 690(2), 169-174 [cit. 2023-03-05]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2011.01.051
37. ARVAND, M., R. M. MAZHABI a A. NIAZI. Simultaneous determination of guanine, adenine and thymine using a modified carbon paste electrode by TiO₂ nanoparticles-

magnesium(II) doped natrolite zeolite. *Electrochimica Acta* [online]. 2013, 89, 669-679 [cit. 2023-03-06]. ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2012.11.014

38. ŠVORC, L. a K. KALCHER. Modification-free electrochemical approach for sensitive monitoring of purine DNA bases: Simultaneous determination of guanine and adenine in biological samples using boron-doped diamond electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2014, 194, 332-342 [cit. 2023-03-06]. ISSN 09254005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2013.12.104

39 FADRŇÁ, R., B. YOSYPCHUK, M. FOJTA, T. NAVRÁTIL a L. NOVOTNÝ. Voltammetric Determination of Adenine, Guanine, and DNA Using Liquid Mercury Free Polished Silver Solid Amalgam Electrode. *Analytical Letters* [online]. 2007, 37(3), 399-413 [cit. 2023-05-23]. ISSN 0003-2719. Dostupné z: doi:10.1081/AL-120028615

40. XU, G.-B., J.-M. CUI, H. LIU, G.-G. GAO, Y.-F. QIU, S.-M. ZHANG a D.-M. WU. Highly selective detection of cellular guanine and xanthine by polyoxometalate modified 3D graphene foam. *Electrochimica Acta* [online]. 2015, 168, 32-40 [cit. 2023-05-14]. ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2015.03.222

41. KAUR, B. a R. SRIVASTAVA. Synthesis of ionic liquids coated nanocrystalline zeolite materials and their application in the simultaneous determination of adenine, cytosine, guanine, and thymine. *Electrochimica Acta* [online]. 2014, 133, 428-439 [cit. 2023-03-04]. ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2014.04.019

42. NIU, L. M., K. Q. LIAN, H. M. SHI, Y. B. WU, W. J. KANG a S. Y. BI. Characterization of an ultrasensitive biosensor based on a nano-Au/DNA/nano-Au/poly(SFR) composite and its application in the simultaneous determination of dopamine, uric acid, guanine, and adenine. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2013, 178, 10-18 [cit. 2023-03-05]. ISSN 09254005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2012.12.015

43. TOHIDINIA, M.. Investigation of Carbon Allotropes for Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Epinephrine, Uric Acid, Nitrite and Xanthine. *International Journal of Electrochemical Science* [online]. 2018, 2310-2328 [cit. 2023-05-14]. ISSN 14523981. Dostupné z: doi:10.20964/2018.03.122

44. LIU, X., L. ZHANG, S. WEI, S. CHEN, X. OU a Q. LU. Overoxidized polyimidazole/graphene oxide copolymer modified electrode for the simultaneous

determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid, guanine and adenine. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2014, 57, 232-238 [cit. 2023-05-23]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2014.02.017

45. ZHOU, S., X. GUO, L. MENG, J. CUI, J. LI, X. YUAN a D. WU. A miniature electrochemical detection system based on GOQDs/MWCNTs /SPCE* for determination the purine in cells. *Analytical Biochemistry* [online]. 2019, 577, 67-72 [cit. 2023-05-12]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2019.04.015

46. BAREK J., How to Improve the Performance of Electrochemical Sensors via Minimization of Electrode Passivation. *Chemosensors* [online]. 2021, 9(1) [cit. 2023-04-26]. ISSN 2227-9040. Dostupné z: doi:10.3390/chemosensors9010012

47. TUR'YAN, Y. I. The anodic passivation of carbon electrodes. *Journal of Solid State Electrochemistry* [online]. 2015, 19(2), 321-323 [cit. 2023-03-13]. ISSN 1432-8488. Dostupné z: doi:10.1007/s10008-014-2584-y

48. BEILBY, A. L., T. A. SASAKI a H. M. STERN. Electrochemical Pretreatment of Carbon Electrodes as a Function of Potential, pH, and Time. *Analytical Chemistry* [online]. 1995, 67(5), 976-980 [cit. 2023-05-10]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00101a027

49. ILANGO VAN, G. a K. CH. PILLAI. Mechanism of activation of glassy carbon electrodes by cathodic pretreatment. *Journal of Solid State Electrochemistry* [online]. 1999, 3(6), 357-360 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1432-8488. Dostupné z: doi:10.1007/s100080050167

50. ALKIRE, R. C., D. M. KOLB, J. LIPKOWSKI (ed.). *Chemically modified electrodes*. John Wiley & Sons, 2009. ISBN 978-3-527-31420-1.

51. GRIBAT, L. C., J. T. BABAUTA, H. BEYENAL a N. A. WALL. New rotating disk hematite film electrode for riboflavin detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [online]. 2017, 798, 42-50 [cit. 2023-05-10]. ISSN 15726657. Dostupné z: doi:10.1016/j.jelechem.2017.05.008

52. SULTANA, A., K. SAZAWA, M. S. ISLAM, K. SUGAWARA a H. KURAMITZ. Determination of Tetracycline by Microdroplet Hydrodynamic Adsorptive Voltammetry Using a Multiwalled Carbon Nanotube Paste Rotating Disk Electrode. *Analytical*

Letters [online]. 2018, 52(7), 1153-1164 [cit. 2023-05-10]. ISSN 0003-2719. Dostupné z: doi:10.1080/00032719.2018.1523911

53. SVÍTKOVÁ, J., T. IGNAT, L. ŠVORC, J. LABUDA aj. BAREK. Chemical Modification of Boron-Doped Diamond Electrodes for Applications to Biosensors and Biosensing. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2015, 46(3), 248-256 [cit. 2023-03-12]. ISSN 1040-8347. Dostupné z: doi:10.1080/10408347.2015.1082125

54. YENCE, M., A. CETINKAYA, G. OZCELIKAY, S. I. KAYA a S. A. OZKAN. Boron-Doped Diamond Electrodes: Recent Developments and Advances in View of Electrochemical Drug Sensors. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2022, 52(5), 1122-1138 [cit. 2023-03-13]. ISSN 1040-8347. Dostupné z: doi:10.1080/10408347.2020.1863769

55. SUN, J., L. GUO, D. ZHANG, W. YIN a G. CHEN. Heated graphite cylinder electrodes. *Electrochemistry Communications* [online]. 2007, 9(2), 283-288 [cit. 2023-05-10]. ISSN 13882481. Dostupné z: doi:10.1016/j.elecom.2006.09.018

56. DONEUX, T., A. DE GHELLINCK, E. TRIFFAUX, N. BROUETTE, M. SFERRAZZA a C. BUESS-HERMAN. Electron Transfer Across an Antifouling Mercapto-hepta(ethylene glycol) Self-Assembled Monolayer. *The Journal of Physical Chemistry C* [online]. 2016, 120(29), 15915-15922 [cit. 2023-05-10]. ISSN 1932-7447. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcc.5b12260