

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Anna Eremina

STUDIUM POVRCHOVÝCH ÚPRAV BOREM DOPOVANÉ
DIAMANTOVÉ ELEKTRODY PRO VOLTAMETRII
DOPAMINU A SEROTONINU

Study of surface modifications of boron doped diamond
electrode for voltammetric detection of dopamine and
serotonin

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Karolina Schwarzová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Simona Baluchová

Praha 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 9.06.2021

Tato práce byla finančně podpořena granty Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt GAUK 390119) a Grantové agentury České republiky (projekt GAČR 20-03187S).

Poděkování

Chtěla bych poděkovat doc. RNDr. Karolině Schwarzové, Ph.D. za odborné vedení a užitečné rady při vypracování mé diplomové práce. Mé další poděkování patří Mgr. Simoně Baluchové za ochotu, trpělivost a čas, který mi obětovala v průběhu vypracování mé diplomové práce.

Ráda bych také poděkovala celé své rodině za jejich podporu během celého mého studia.

Klíčová slova

borem dopovaný diamant

dopamin

kultivační média

serotonin

terminace povrchu

voltametrie

Key words

boron doped diamond

dopamine

neural cell culture media

serotonin

surface termination

voltammetry

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá studiem elektrochemického chování a detekce dvou strukturně odlišných neurotransmiterů, dopaminu (DA) a serotoninu (5-HT), v roztocích běžně používaných pro kultivaci neuronů, konkrétně Neurobasalu (NB), NB s fenolovou červení a ve fosfátovém pufru (PB) o pH blízkém fyziologickému. Ke studiu byla využita elektroda na bázi borem dopovaného diamantu, přičemž byly prozkoumány dva typy povrchů: po anodické oxidaci (O-BDD) a mechanickém leštění (p-BDD) a dvě voltametrické techniky, cyklická a diferenční pulzní voltmetrie. Při studiu bylo odhaleno, že oxidace DA je děj kvazireverzibilní, kdežto 5-HT se na O-BDD a p-BDD oxiduje ireverzibilně. V případě obou neurotransmiterů je jejich oxidace na obou BDD površích řízena difuzí. V důsledku pasivace elektrodového povrchu byla nejprve vyzkoušena anodická reaktivace ($E_{akt} = +2400$ mV, $t = 30$ s) k regeneraci O-BDD povrchu během měření s DA a 5-HT. Na O-BDD u DA už nedocházelo ke kontinuálnímu poklesu proudu píků a měřené signály se vyznačovaly vysokou opakovatelností ve všech studovaných médiích ($s_r(I_p)$ 1,1 % v PB o pH 7,0, 1,7 % v NB o pH 7,34, 0,9 % v NB s fenolovou červení o pH 7,48). V případě 5-HT se anodická reaktivace byla účinná pouze v prostředí PB o pH 7,0 ($s_r(I_p)$ 0,18 %), zatímco v obou NB se nepodařilo dosáhnout opakovatelných signálů ($s_r(I_p)$ 19 – 22%). Následně byla provedena změna terminace povrchu z O-BDD na p-BDD mechanickým leštěním povrchu na částicích aluminu, což vedlo k nárůstu velikostí proudů píků obou neurotransmiterů ve všech zkoumaných médiích, ale zároveň došlo i k mírnému zhoršení opakovatelnosti měřených signálů. Byla také ověřena možnost současné detekce DA a 5-HT ve směsi pomocí p-BDD a O-BDD elektrody, avšak nepodařilo se odlišit oxidační píky jednotlivých neurotransmiterů kvůli značné blízkosti jejich oxidačních potenciálů. Kalibrační závislosti byly naměřeny v prostředí PB o pH 7,0 metodou DPV. Bylo zjištěno, že pro detekci DA a 5-HT jsou vhodné jak O-BDD tak i p-BDD elektroda, avšak p-BDD poskytuje lepší analytické parametry: nižší šum a tedy i nižší limit detekce i kvantifikace, širší lineární dynamický rozsah a vyšší citlivost. Taktéž bylo potvrzeno, že potenciálová okna obou NB médií jsou v anodické oblasti zkrácené v důsledku oxidace jejich elektroaktivních složek.

Abstract

This diploma thesis deals with the study of electrochemical behavior and detection of two structurally different neurotransmitters, dopamine (DA) and serotonin (5-HT), in solutions commonly used for neuron cultivation, namely Neurobasal (NB), NB with phenol red and in phosphate buffer (PB) of a pH close to the physiological value. An electrode based on boron-doped diamond was used for the study, examining two types of surfaces obtained after oxidation (O-BDD) and mechanical polishing (p-BDD). The results were obtained by two voltametric techniques, namely cyclic and differential pulse voltammetry. The study revealed that DA oxidation is a quasi-reversible process, whereas 5-HT oxidizes irreversibly on O-BDD and p-BDD. Nevertheless, for both neurotransmitters their anodic oxidation on both BDD surfaces is controlled by diffusion. Due to the passivation of the electrode surface by the oxidation products, anodic reactivation ($E_{\text{act}} = +2400 \text{ mV}$, $t = 30 \text{ s}$) was first tested to regenerate the O-BDD surface during DA and 5-HT measurements. There was no continuous decrease in DA peak currents on O-BDD and the measured signals were characterized by high repeatability in all studied media ($s_r(I_p)$ 1.1% in PB of pH 7.0, 1.7% in NB of pH 7.34, 0.9% in NB with phenol red of pH 7.48). In the case of 5-HT, the anodic reactivation was successfully applied only in the PB medium of pH 7.0 ($s_r(I_p)$ 0.18%), while in both Neurobasal media it was impossible to reach repeatable signals ($s_r(I_p)$ 19 – 22%). Subsequently, the surface termination was changed from O-BDD to p-BDD by mechanical polishing of the surface on alumina particles, which led to an increase in the peak currents of both neurotransmitters in all examined media, but also to a slight deterioration in repeatability of measured signals. The possibility of simultaneous detection of DA and 5-HT in a mixture using a p-BDD and O-BDD electrode was also verified, but the oxidation peaks of individual neurotransmitters could not be distinguished due to the considerable proximity of their oxidation potentials. Calibration dependences were measured in PB of pH 7.0 by the DPV method. It has been revealed that both O-BDD and p-BDD electrodes are suitable for the detection of DA and 5-HT, but p-BDD provides better analytical parameters: lower noise and lower limit of detection and quantification, wider linear dynamic range, and higher sensitivity. It was also confirmed that the potential windows of both NB media are shortened in the anodic region due to oxidation of their electroactive components.

Obsah

1.	Teoretická část.....	11
1.2	Cíl práce.....	11
1.3	Studované látky.....	11
1.3.1	Dopamin.....	12
1.3.2	Serotonin.....	14
1.4	Metody stanovení DA a 5-HT.....	16
1.4.1	Elektrochemické metody.....	16
1.5	Borem dopovaná diamantová filmová elektroda.....	21
1.5.1	Kultivace nervových buněk na BDD elektrodě.....	23
1.6	Prostředí pro kultivaci nervových buněk.....	24
2.	Experimentální část.....	26
2.1	Chemikálie.....	26
2.2	Přístrojové vybavení.....	26
2.3	Příprava roztoků.....	27
2.3.1	Příprava zásobních roztoků dopaminu a serotoninu.....	27
2.3.2	Příprava zásobního roztoku KCl.....	27
2.3.3	Příprava fosfátového pufru o pH 7,0.....	27
2.3.4	Příprava roztoku kyseliny sírové pro anodickou oxidaci BDD elektrody ...	27
2.4	Pracovní postupy.....	27
2.4.1	Předúprava povrchu BDD elektrody.....	27
2.4.2	Postup voltametrických měření na BDD elektrodě.....	28
2.4.3	Způsoby vyhodnocení voltametrických křivek.....	28
2.4.4	Statistické vyhodnocení naměřených dat.....	29
2.4.5	Mez detekce a mez kvantifikace.....	30
3.	Výsledky a diskuze.....	31

3.1	Elektrochemická charakterizace BDD elektrody	31
3.1.1	Cyklická voltametrie redoxního markeru.....	31
3.1.2	Potenciálová okna	34
3.2	Cyklická voltametrie DA a 5-HT.....	37
3.3	Vliv aktivace BDD elektrody na voltametrické chování DA a 5-HT.....	44
3.3.1	Pasivace povrchu a vliv anodické aktivace	44
3.3.2	Vliv leštění povrchu BDD elektrody na voltametrické chování DA a 5-HT při DP voltametrii.....	49
3.4	Voltametrická detekce 5-HT a DA ve směsi	55
3.5	Kalibrační závislosti, výpočet LOD a LOQ.....	56
4.	Závěr	63
5.	Seznam použité literatury	65

Seznam použitých zkratek a symbolů

5- HT	5-hydroxytryptamin (serotonin)
AA	kyselina askorbová (<i>ascorbic acid</i>)
ABDD	aminem terminovaná borem dopovaná diamantová elektroda
c	molární koncentrace
CAS	Chemical Abstracts Service
CV	cyklická voltametrie
CVD	chemická depozice par (<i>chemical vapor deposition</i>)
DA	dopamin
DC	dopaminochrom
DPV	diferenční pulzní voltametrie
E_{akt}	aktivační potenciál
ECE	elektrochemický-chemický-elektrochemický proces
$E_{lim,A}$	potenciálový limit elektrody v anodické oblasti
$E_{lim,K}$	potenciálový limit elektrody v katodické oblasti
E_p	potenciál píku
E_{pa}	potenciál anodického píku
E_{pk}	potenciál katodického píku
FIA	průtoková injekční analýza (<i>flow injection analysis</i>)
GIT	gastrointestinální trakt
H-BDD	katodicky aktivovaná BDD elektroda
HBS	fyzilogický roztok pufovaný HEPES (<i>HEPES buffered saline</i>)
HEPES	kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethansulfonová
HF-CVD	chemická depozice par aktivovaná žhaveným vláknem (<i>hot filament chemical vapor deposition</i>)
ChA	chronoampérometrie
I_A	anodický proud
I_K	katodický proud
I_p	proud píku
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti

LA	lineární anténa
LDC	leukodopaminochrom
L-DOPA	3,4-dihydroxyfenylalanin
LDR	lineární dynamický rozsah
LOD	limit detekce (<i>limit of detection</i>)
LOQ	limit kvantifikace (<i>limit of quantification</i>)
M_r	relativní molekulová hmotnost
MW-PE-CVD	chemická depozice par za aktivace mikrovlnným zářením (<i>microwave plasma-enhanced chemical vapor deposition</i>)
n	počet měření
NB	Neurobasal
NE	norepinefrin
O-BDD	anodicky oxidovaná BDD elektroda
<i>o</i> -DQ	dopamin- <i>o</i> -chinon
PA	paracetamol
PB	fosfátový pufr (<i>phosphate buffer</i>)
p-BDD	leštěná (<i>polished</i>) BDD elektroda
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDA	polydopamin
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových kationtů
pK_a	záporný dekadický logaritmus kyselé disociační konstanty
R	korelační koeficient
SD	směrodatná odchylka (<i>standard deviation</i>)
s_r	relativní směrodatná odchylka
SWV	voltmetrie se superponovaným pravoúhlým napětím („ <i>square-wave</i> “ <i>voltametry</i>)
t	čas
UA	kyselina močová (<i>uric acid</i>)
v	rychlost polarizace elektrody

1. Teoretická část

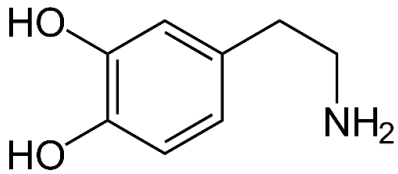
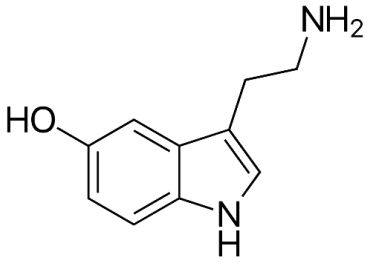
1.2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je studium elektrochemického chování dvou strukturně odlišných neurotransmiterů, dopaminu (DA) a serotoninu (5-hydroxytryptamin, 5-HT), v roztocích běžně používaných pro kultivaci neuronů, konkrétně Neurobasalu (NB), NB s fenolovou červení, a ve fosfátovém pufru (PB, *phosphate buffer*) o pH blízkém fyziologickému. K elektroanalýze byla využita borem dopovaná diamantová elektroda (BDD), která díky svým vynikajícím vlastnostem může být použita nejen k detekci neurotransmiterů, ale i jako substrát pro samotný růst neuronů. V rámci této práce byl taktéž sledován vliv terminace povrchu BDD elektrody na elektrochemické chování a parametry detekce DA a 5-HT, konkrétně byl studován anodicky oxidovaný (O-BDD) a mechanicky leštěný (p-BDD) BDD elektrodový povrch.

1.3 Studované látky

Neurotransmitery jsou nízkomolekulární látky, které přirozeně vznikají v nervové soustavě savců a slouží k přenosu nervového vzruchu. Tato diplomová práce je zaměřená na studium elektrochemického chování a detekci dvou důležitých strukturně odlišných neurotransmiterů, DA a 5-HT, fyzikálně-chemické vlastností kterých jsou uvedené v **Tab. 1**.

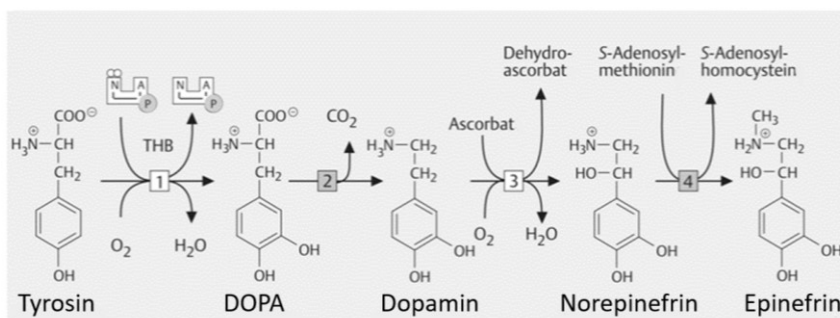
Tab. 1 Přehled fyzikálně-chemických vlastností DA a 5-HT¹⁻⁴.

	DA	5-HT
Systematický název	4-(2-aminoethyl)benzen-1,2-diol	3-(2-aminoethyl)-1H-indol-5-ol
CAS číslo	51-61-6	50-67-9
Strukturní vzorec		
Sumární vzorec	C ₈ H ₁₁ NO ₂	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O
Teplota tání (°C)	128,0	167,5
M _r	153,18	176,21
Rozpustnost ve vodě (mg ml ⁻¹)	7,43	2,50
<i>pK_a</i>	<i>pK</i> ₁ (-OH na C ₁) = 8,89 <i>pK</i> ₂ (-NH ₃ ⁺) = 10,41 <i>pK</i> ₃ (-OH na C ₂) = 13,10	<i>pK</i> ₁ (-OH) = 9,97 <i>pK</i> ₂ (-NH ₃ ⁺) = 10,73

1.3.1 Dopamin

DA byl poprvé objeven v roce 1910 jako prekurzor biosyntézy látek ze skupiny katecholaminů, norepinefrinu (noradrenalinu) a epinefrinu (adrenalinu)⁵. DA přirozeně vzniká v dopaminergních neuronech v mozku obratlovců, a také v nervové soustavě většiny bezobratlovců. Biosyntéza vychází z aminokyseliny tyrosinu. Hydroxylací aromatického jádra vzniká 3,4 - dihydroxyfenylalanin (L-DOPA), jehož dekarboxylací se tvoří DA⁶ (**Obr. 1**).

- 1 Tyrosin 3-monooxygenáza [Fe²⁺,THB] 1.14.16.2 3 Dopamin β-monooxygenáza [Cu] 1.14.17.1
 2 DOPA dekarboxyláza [PLP] 4.1.1.28 4 Fenylethanolamin N-methyltransferáza 2.1.1.28

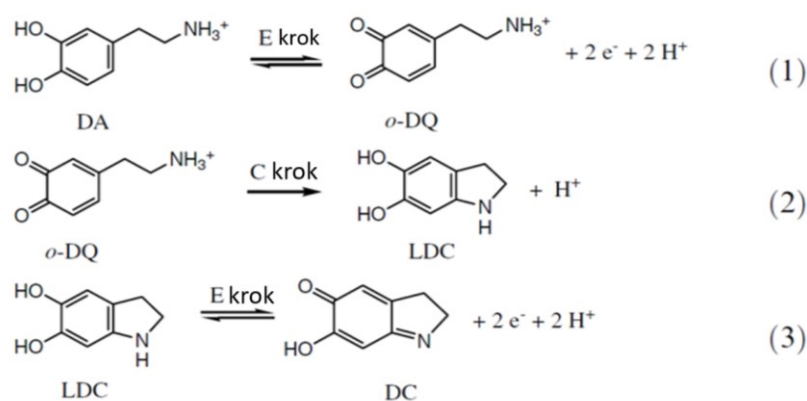


Obr. 1 Schéma biosyntézy DA. Obrázek upravený podle Koolman *et al.*⁷.

DA může být v lidském těle dále degradován enzymem monoaminoxidázou nebo katechol-*O*-methyltransferázou a konečným metabolitem je kyselina homovanilová⁶.

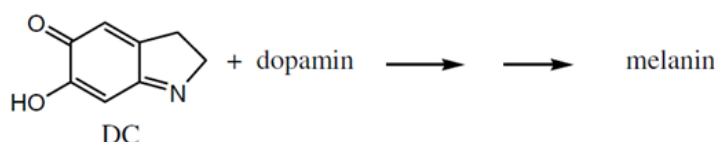
Vzhledem k rozsáhlé lokalizaci dopaminových receptorů hraje DA důležitou roli v regulaci lidského metabolismu, kardiovaskulárního, renálního a hormonálního systému, a také odpovídá za regulaci kognitivních funkcí (jako stres, chování, pozornost, apod.)⁸. Dysfunkce dopaminergního systému je spojovaná s vývojem schizofrenie, Parkinsonovy choroby, Tourettova syndromu, obsedantně-kompulzivních poruch, Alzheimerovy choroby a dalších patologických stavů⁹. Fyziologická koncentrace DA v séru zdravého jedince se pohybuje kolem $0-2,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol l}^{-1}$ a v mozku kolem 50 mmol g^{-1} (cit. ^{10,11}).

Mechanismus elektrochemické oxidace DA je hodně závislý na pH prostředí¹². Při fyziologickém pH (pH ~ 7) je DA v roztoku přítomen ve formě kationtů, protože dochází k protonizaci aminoskupiny^{12,13}. V prvním kroku (**Obr. 2**) oxidace z DA vzniká dopamin-*o*-chinon (*o*-DQ), který je doprovázen ztrátou dvou elektronů a dvou protonů (1, E krok). Následně spontánně dochází k deprotonaci aminoskupiny, což umožňuje snadnou cyklizaci molekuly prostřednictvím 1,4-Michaelovy adice na leukodopaminochrom (LDC) (2, C krok). LDC je mnohem reaktivnější než mateřská molekula, a snadno dále podléhá dvouelektronové oxidaci na dopaminochrom (DC) (3, E krok). Celkově může být elektrochemická oxidace DA v neutrálním pH prostředí popsána jako „ECE“ (elektrochemický-chemický-elektrochemický) proces^{12,14-17}.



Obr. 2 Elektrochemická oxidace DA. Obrázek upravený podle Jin *et al.*¹⁶.

DC může být dál atakován nezreagovanými molekulami DA z roztoku, což vede k polymerizaci (**Obr. 3**) a tvorbě takzvaného „dopamin-melaninového“ filmu (neboli také v některé literatuře označovaného polydopaminu (PDA)), který se adsorbuje na povrch elektrody a tím způsobuje její pasivaci. Tento film je téměř nerozpustný, rozpustí se výhradně v prostředí velmi bazických rozpouštědel^{13,16,17,18}. Fyziologické prostředí jako například Neurobasal, který byl použit i v této práci, může ovlivnit tvorbu PDA, kvůli obsahu všech proteinogenních aminokyselin, které mohou buď zvyšovat, nebo snižovat míru adsorpce PDA a teda i znečištění elektrodového povrchu. Například bylo zjištěno, že proteinogenní aminokyselina cystein omezuje pasivaci elektrodového povrchu při oxidaci dopaminu¹⁹.



Obr. 3 Schematické znázornění procesu polymerizace DA. Obrázek upravený podle Jin *et al.*¹⁶.

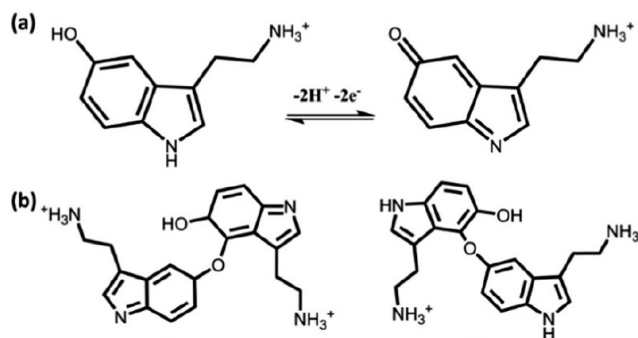
1.3.2 Serotonin

5-HT byl poprvé objeven na začátku 50. let 20. století kvůli jeho podobným vlastnostem s diethylamidem kyseliny D-lysergové, ale trvalo dalších deset let, než byl 5-HT oficiálně identifikován jako nervový přenašeč. 5-HT se řadí do skupiny indolaminových neurotransmiterů⁶.

Prekurzorem biosyntézy 5-HT je esenciální aminokyselina L-tryptofan. První reakce je hydroxylace aromatického jádra za tvorby 5-hydroxytryptofanu, jehož dekarboxylací následně vzniká 5-HT. 5-HT může být podobně jako DA enzymaticky degradován monoaminoxidázou a aldehyd dehydrogenázou na hlavní metabolit kyselinu 5-hydroxyindolovou. V šišince je 5-HT přeměňován na melatonin. 5-HT se vyskytuje v centrální nervové soustavě většiny živočichů, převážně v mozковém kmeni. Kromě toho se skoro 90 % celkového serotoninu vyskytuje v buňkách gastrointestinálního traktu (GIT)²⁰⁻²². Fyziologická koncentrace krevního 5-HT u zdravého jedince je velmi nízká a pohybuje se kolem 0,28-1,14 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (cit. ²³). 5-HT se zúčastňuje celé řady fyziologických procesů. Hraje důležitou roli v regulaci kardiovaskulárního systému a GIT, reguluje kontrakce hladkého svalstva a dále ovlivňuje spánek, náladu a reguluje tělesnou teplotu. Vzhledem k tomu jsou abnormálně nízké koncentrace serotoninu a jeho metabolitů spojovány s řadou onemocnění jako infarkt myokardu, srážení krve, migréna, úzkost, deprese, syndrom dráždivého tračníku a dalších. Na druhou stranu, vysoké koncentrace 5-HT jsou toxické a vedou k fatálním následkům jako je serotoninový syndrom^{22, 24}.

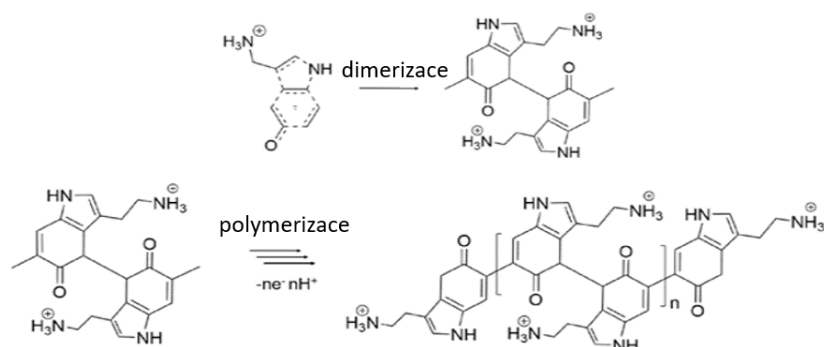
Proces elektrochemické oxidace 5-HT byl studován na nemodifikovaných uhlíkových elektrodách ve slabě pufovaných roztocích o pH kolem 7,0²⁶. Bylo zjištěno, že za těchto podmínek 5-HT podléhá dvouelektronové oxidaci na *p*-chinon-*o*-imin (**Obr. 4, a**)²⁵.

V roztoku vznikají různé elektrochemicky aktivní dimery a meziprodukty, které vytváří polymerní film a které se ireverzibilně adsorbují na povrch elektrody, čímž dochází k jeho pasivaci (**Obr. 4, b**)^{26, 27}.



Obr. 4 (a) Mechanismus dvouelektronové oxidace 5-HT. (b) Příklad dvou hlavních dimerů 5-HT. Obrázek upravený podle Patel *et al.*²⁷.

V práci²⁸ byl popsán mechanismus dimerizace a polymerizace 5-HT: dimerizace probíhá na alfa uhlících umístěných vedle karbonylové skupiny a následně tento fragment polymeruje s dalšími reaktivními molekulami 5-HT v roztoku (**Obr. 5**).



Obr. 5 Proces dimerizace a polymerizace 5-HT. Obrázek upravený podle Dunham *et al.*²⁸.

1.4 Metody stanovení DA a 5-HT

Pro stanovení různých strukturálně odlišných neurotransmiterů včetně DA a 5-HT bylo vyvinuto hodně klasických analytických metod za využití technik jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie^{29,30,31}, plynová chromatografie^{32,33}, hmotnostní spektroskopie^{31,33}, kapilární elektroforéza³⁴, imunometody^{35,36}, chemiluminescence³⁷, průtoková injekční analýza (FIA)³⁸ a fluorimetrie³⁹. Tyto metody jsou robustní a citlivé, ale na druhou stranu vyžadují sofistikované technické vybavení, jsou časově náročné a ve většině případů zahrnují předúpravu vzorků před samotnou analýzou, což omezuje jejich použití pro každodenní analýzu.

1.4.1 Elektrochemické metody

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, abnormální koncentrace těchto neurotransmiterů jsou často spojovány s mnoha nemocemi, a z tohoto důvodu je potřebné vyvinout jednoduchou a rychlou metodu pro jejich detekci a stanovení. DA a 5-HT jsou elektroaktivní látky, a proto je pro jejich stanovení vhodné použití elektrochemických analytických metod. Oproti klasickým analytickým metodám jsou elektrochemické techniky jednoduché, levné, rychlé, dostatečně selektivní a citlivé. Na druhou stranu elektrochemické metody používané ke stanovení neurotransmiterů naráží na řadu dalších

problémů:

1. Interference dalších elektroaktivních látek jako kyselina askorbová (AA), kyselina močová (UA), glukosa a některých léčiv (například paracetamol (PA)), které jsou v biologických matricích (např. séru, slinách, moči) v nadbytku oproti DA a 5-HT a zároveň mohou poskytovat elektrochemický signál při podobných potenciálových hodnotách^{16, 26, 40, 41, 42}. DA a 5-HT se také interferují navzájem⁴³.
2. Nízké fyziologické koncentrace analytů v reálných vzorcích (krev, mozková tkáň, sliny, atd.)^{10, 11, 23}.
3. Pasivace elektrodového povrchu v procese analýzy. DA, 5-HT a jejich oxidační produkty a meziprodukty se můžou ireverzibilně adsorbovat na povrch elektrody.

Byly vyvinuté mnohé elektrochemické metody využívající mikro- a makro-elektrody na bázi uhlíku, často modifikované vhodným vodivým materiálem ke zvýšení jejich citlivosti a selektivity. Jako modifikátory povrchu se často využívají různé polymery, chemické komponenty, nanokompozity, nanomateriály, kovové nanočástice, uhlíkové nanotrubičky atd.^{25, 44}. Avšak modifikace povrchu je časově a finančně náročná a není vhodná pro veškeré typy elektrod. Konkrétně BDD elektroda může ztratit některé ze svých vynikajících vlastností (viz kapitola 1.4) v důsledku modifikace jejího povrchu, o čemž již svědčí několik studií^{45, 46}. Na druhou stranu modifikovaná BDD elektroda umožňuje dosáhnout lepší selektivity při stanovení neurotransmiterů v přítomnosti dalších interferujících elektroaktivních látek ve vzorku. Takže byly hledané i další způsoby zlepšení selektivity elektrochemické analýzy. Anodická nebo katodická elektrochemická polarizace nebo mechanická aktivace v podobě leštění na částicích aluminu umožňují udržovat povrch BDD elektrody déle čistým, ale ne vždy jsou schopné úplně odstranit naadsorbované produkty oxidace z elektrodového povrchu^{16, 47}. V **Tab. 2** a **Tab. 3** jsou shrnuté a porovnané různé studie využívající BDD elektrody pro analýzu neurotransmiterů, konkrétně DA a 5-HT.

Tab. 2 Přehled elektroanalytických metod vyvinutých s použitím BDD elektrody pro stanovení DA, spolu s typem prostředí, lineárním dynamickým rozsahem (LDR) a limitem detekce (LOD).

Pracovní elektroda/ modifikace	Prostředí/ typ vzorku	Metoda	Testování interference	LDR ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Cit.
planární H-BDD (B/C 4000ppm)	0,1 mol l^{-1} PB o pH 7,4	SWV	-	1,0-10,0	0,35	48
O-BDD (B/C 10 000ppm)	0,07 mol l^{-1} PBS o pH 7,0	CV	-	5-200	1,4	49
porézní BDD (B/C 4000ppm)	0,1 mol l^{-1} PB o pH 7,4	SWV	-	0,5-10,0	0,22	48
BDD-NEA/anodický oxidovaná	0,1 mol l^{-1} PB o pH 7,4	DPV	AA	0,1-20	0,076	50
porézní H-BDD	0,1 mol l^{-1} PBS o pH 7,0, sérum	DPV	pyridoxin	0,4-510	0,06	51
BDD	1 mol l^{-1} amonný pufr o pH 8,3	DPV	PA	1-200	0,233	41
dlouhé bSi jehly pokryté BDD (B/C 2000 ppm)	0,2 mol l^{-1} PB o pH 7,0	DPV	UA	0,0-5,0	0,27	52
ABDD s imobilizovanou tyrozinázou	0,1 mol l^{-1} PBS o pH 6,5	amperometrie	AA	5-120	-	45
O-BDD (B/C 8000 ppm)	0,1 mol l^{-1} HClO_4	SWV	AA	0,5-5,4	0,283	53
(Au/PAH) ₄ /(PSS/PAH) ₄ /PS-ABDD	0,07 mol l^{-1} PBS o pH 7,2	CV	AA	5-100	0,8	46
O-BDD (B/C 10 000 ppm)	0,07 mol l^{-1} PBS o pH 7,0	amperometrie	-	0-120	1,5	54

BDD-NEA	0,07 mol l ⁻¹ PBS o pH 7,0	amperometrie	-	0-120	0,8	54
H-BDD _{LA}	0,01 mol l ⁻¹ PB o pH 7,4	SWV	-	1,0-7,5	0,23	55
H-BDD _{conv} (B/C 4000 ppm)	0,01 mol l ⁻¹ PB o pH 7,4	SWV	-	2,5-40,0	0,16	55
porézní H-BDD (B/C 4000 ppm)	0,01 mol l ⁻¹ PB o pH 7,4	SWV	-	1,0-30,0	0,08	55
H-BDD _{conv} (B/C 4000 ppm)	0,02 mol l ⁻¹ HBS o pH 7,4	SWV	-	2,0-40,0	0,13	55
H-BDD _{LA}	0,02 mol l ⁻¹ HBS o pH 7,4	SWV	-	1,0-7,5	0,25	55
				7,5-75,0		
porézní H-BDD (B/C 4000 ppm)	0,02 mol l ⁻¹ HBS o pH 7,4	SWV	-	1,0-30,0	0,06	55

Použité zkratky: BDD-NEA - „*nanograss array*“ borem-dopovaný diamant; bSi - „*black silicon*“; ABDD - aminem terminována BDD; PAH - (poly(allyamín hydrochlorid)); PS - polystyren; LA - lineární anténa; BDD_{conv} - konvenční planární BDD film; PB - fosfátový pufr; PBS - fyziologický roztok pufovaný fosfátem; HBS - HEPESem pufovaný fyziologický roztok; SWV - „*square-wave*“ voltametrie; CV - cyklická voltametrie; DPV - diferenční pulzní voltametrie.

Tab. 3 Přehled elektroanalytických metod vyvinutých s použitím BDD elektrody pro stanovení 5-HT, spolu s typem prostředí, lineárním dynamickým rozsahem (LDR) a limitem detekce (LOD).

Pracovní elektroda/ modifikace	Prostředí/ typ vzorku	Metoda	Testování interference	LDR ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Cit.
p-BDD	0,1 mol l^{-1} NaCl s přidavkem 5 mmol l^{-1} HEPES	CV	-	0,05-1,0	0,5	56
O-BDD	PB o pH 7,2	amperometrie v FIA	-	0,01-50,0	0,02	57
BDDPE/ERGO	0,1 mol l^{-1} PBS pH 8,0	DPV	NE	0,5-7,5	0,5	58
BDD μE	150 mmol l^{-1} NaCl, 5 mmol l^{-1} KCl, 1,2 mmol l^{-1} MgCl ₂ , 5 mmol l^{-1} glukosa, 10 mmol l^{-1} HEPES a 2 mmol l^{-1} CaCl ₂ o pH 7,4	ChA	-	0,5-10	0,013	59

Použité zkratky: PB - fosfátový pufr; PBS - fyziologický roztok pufovaný fosfátem; HBS - fyziologický roztok pufovaný HEPES; CV - cyklická voltametrie; DPV - diferenční pulzní voltametrie; BDDPE/ERGO - pastová BDD elektroda modifikovaná elektrochemicky redukováným grafenem; FIA - průtoková injekční analýza; ChA - chronoampérometrie; BDD μE - BDD mikroelektroda; NE - norepinefrin.

1.5 Borem dopovaná diamantová filmová elektroda

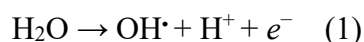
Diamant je materiál, který oplývá množstvím vynikajících vlastností, jako extrémní tvrdost, obrovská tepelná vodivost, chemická inertnost v silně kyselém nebo bazickém prostředí. Co se týká struktury diamantu, každý atom uhlíku je propojen σ tetragonálními vazbami s dalšími třemi sp^3 hybridizovanými uhlíky. Sám o sobě je diamant vynikající přírodní izolant. Nízkého elektrického odporu se dosahuje dopováním různými atomy, nejčastěji atomy boru. Mohou se také používat jiné typy dopantů jako například dusík, fosfor nebo síra⁶⁰.

BDD filmové elektrody se běžně připravují metodou chemické depozice par (*chemical vapor deposition*, CVD) na zvolený substrát, nejčastěji křemík (BDD/Si), pomocí žhaveného vlákna (*hot-filament*, HF-CVD) nebo mikrovlnné plazmy (*microwave plasma enhanced*, MW-PE-CVD)^{61, 62}. Nicméně z důvodu značné křehkosti křemíku se v současné době stále hledá nový vhodnější substrát. Již byly vyzkoušeny niob, tantal, wolfram, molybden a titan, které jsou vhodné pro přípravu velkoplošných elektrod, používaných pro úplnou elektrochemickou oxidaci organických polutantů nacházejících se v odpadních vodách⁶⁰. Další popsané substráty pro depozici BDD filmů jsou grafit, uhlík a uhlíková vlákna. Zatím se žádný z těchto substrátů v elektroanalytické chemii příliš neuplatnil^{60, 62}. K depozici diamantového filmu se většinou používá směs par, která se skládá z vodíku, methanu a diboranu (B_2H_2) jako zdroje boru^{60, 63}. Také se může používat směs vodíku, acetonu a trimethoxyboranu ($B(OCH_3)_3$)⁶⁴. Výsledná koncentrace atomů boru je obvykle v rozmezí $1 \cdot 10^{18}$ - $1 \cdot 10^{21}$ atomů na cm^{-3} diamantového filmu (koncentrace boru $1 \cdot 10^{20}$ atomů na cm^{-3} odpovídá cca 1 atomu boru na 1000 atomů uhlíku)^{47, 63}.

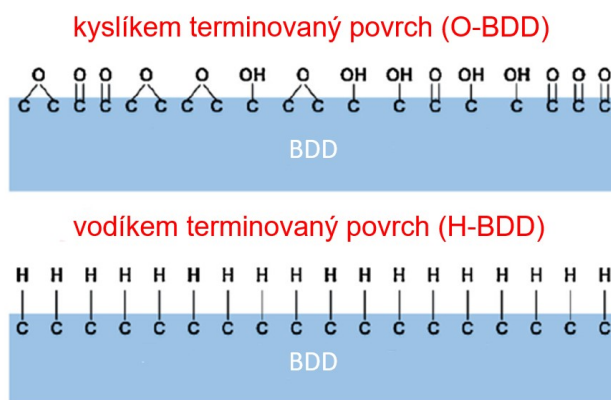
Tímto způsobem je získán elektrodový materiál, který má oproti ostatním typům elektrod: i) široké potenciálové okno ve vodných i nevodných elektrolytech, které dosahuje hodnoty kolem 3,5 V v závislosti na kvalitě připraveného filmu, ii) nízký proud pozadí, iii) malou náchylnost k pasivaci, což umožňuje citlivé stanovení široké škály organických a anorganických látek bez předchozí předúpravy, iv) stabilitu vůči korozi ve velmi agresivních prostředí, a v) biokompatibilitu umožňující konstrukci (bio)-sensorů^{62, 65, 66}.

Elektrochemické vlastností BDD elektrod však významně závisí na terminaci jejich povrchu^{67, 68}. BDD elektroda, která byla připravena metodou CVD ze směsi par

obsahujících vodík, bude mít povrch terminovaný vodíkem (H-BDD). Výsledkem H-terminace je hydrofobní, nepolární povrch s vysokou povrchovou vodivostí a negativní elektronovou afinitou^{62, 66, 69}. Hydrogenovaný BDD povrch je na vzduchu stabilní několik měsíců, ale časem začne spontánně oxidovat a přemění se na kyslíkem terminovaný povrch (O-BDD)⁷⁰. O-BDD má polární hydrofilní charakter, nižší povrchovou vodivost a pozitivní elektronovou afinitu⁶⁹. K vývoji vodíku i kyslíku dochází na oxidovaném povrchu při vyšších hodnotách potenciálu, tím pádem potenciálové okno O-BDD elektrod je větší oproti H-BDD elektrodám. V praxi lze oxidaci povrchu dosáhnout elektrochemickou anodickou polarizací vložení vysokého kladného aktivačního potenciálu E_{akt} v silně kyselém prostředí⁶⁸. Při rozkladu vody vzniká hydroxylový radikál (rovnice 1), který oxiduje povrch elektrody, čímž na BDD povrch zavádí různé kyslíkové funkční skupiny jako ketonová, alkoholová, etherová, hydroxylová, karboxylová (**Obr. 6**)^{47, 71}. Pomocí anodické aktivace lze také odstranit nečistoty z elektrodového povrchu a zvýšit reprodukovatelnost odezvy elektrod.



Na druhou stranu, pokud je pro práci potřebná H-BDD elektroda, lze její povrch regenerovat vložení dostatečně záporného potenciálu v kyselém prostředí. Dojde k rehydrogenaci povrchu a opětovnému navázání vodíku. Tímto způsobem, v podobě katodické polarizace elektrody, lze dosáhnout vysoké opakovatelnosti odezvy a udržet povrch elektrody neustále čistým⁷².



Obr. 6 Schematické znázornění O-BDD a H-BDD povrchů. Obrázek upravený podle Dincer *et al.*⁵⁰.

Další variantou aktivace BDD povrchu je mechanické leštění BDD elektrod na částicích aluminy, které se používá jako čisticí krok před elektrochemickým měřením. Na leštěném BDD povrchu převládají C-C vazby původně přítomné v diamantu, dál se v menším počtu oproti O-BDD povrchu vyskytují kyslíkové skupiny (etherová, hydroxylová, karbonylová), avšak bez přítomnosti karboxylové skupiny. Některé studie ověřily, že mechanické čištění usnadňuje přenos náboje odstraněním nežádoucích nečistot. Mechanickým leštěním BDD povrchu lze zajistit dobře reprodukovatelné výsledky⁷³.

Různé redoxní markery, jako například $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$, $[\text{IrCl}_6]^{2-/3-}$, $\text{Fe}^{3+/2+}$, kyselina askorbová, či dopamin, slouží k vyhodnocení kvality povrchu BDD elektrod^{72,74}. Zvláště $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ je vysoce citlivý na přítomnost kyslíkatých skupin na povrchu elektrody a v závislosti na jeho kvalitě může být pozorován reverzibilní nebo quasi-reverzibilní přenos elektronů. Pro reverzibilní elektrochemický děj vyměňující jeden elektron platí, že rozdíl potenciálů anodického a katodického píků ΔE_p odpovídá hodnotě 59 mV a poměr jejich výšek I_A/I_K je roven 1, což lze málokdy splnit při práci s pevnou elektrodou, jako je i BDD elektroda. V praxi jsou za blízce reverzibilní považovány redoxní systémy, u kterých ΔE_p nepřesahuje hodnotu 70 mV. Větší hodnoty ΔE_p odpovídají ireverzibilním, či quasi-reverzibilním redoxním systémům.

1.5.1 Kultivace nervových buněk na BDD elektrodě

Díky výše zmíněným vynikajícím vlastnostem, hlavně biokompatibilitě a inertnosti, jsou BDD elektrody široce využívány pro kultivaci různých typů buněk včetně neuronů⁷⁵. V roce 2004 se objevila první práce o úspěšném růstu neuronů na monokrystalické diamantové elektrodě⁷⁶. V dalších studiích byl sledován vliv různých vlastností diamantu, jako typ terminace jeho povrchu, koncentrace boru, typ diamantu atd., na růst neuronů⁷⁷. Bylo zjištěno, že přítomnost boru žádným způsobem neovlivňuje růst neuronů na elektrodě, což např. umožňuje i jeho použití jako „*brain-computer interface*“ pro sledování mozkové aktivity. Naopak, terminace BDD povrchu má výrazný vliv na životaschopnost buněk. Bylo zjištěno, že O-terminovaná BDD elektroda je vynikajícím substrátem, který umožňuje růst a podporuje životaschopnost nervových buněk, zatímco na H-BDD elektrodě byla pozorovaná vyšší smrtelnost buněk, přibližně o

70 %⁷⁷. Hydrofilní O-terminované BDD povrchy lze považovat za víc biokompatibilní, než hydrofobní H-terminované povrchy⁷⁵. Nicméně bylo také objeveno, že na monokrystalickém O-terminovaném diamantu mají neurony o cca 20-30 % vyšší míru přežití než na polykrystalickém diamantu. Toto může souviset s tím, že hladký povrch umožňuje lepší pokrytí kyslíkem a také lepší povrch pro pokrytí dalšími pomocnými substráty jako je například poly-D-lysin. Tato téma ještě zatím není kompletně prostudováno^{77, 78}.

1.6 Prostředí pro kultivaci nervových buněk

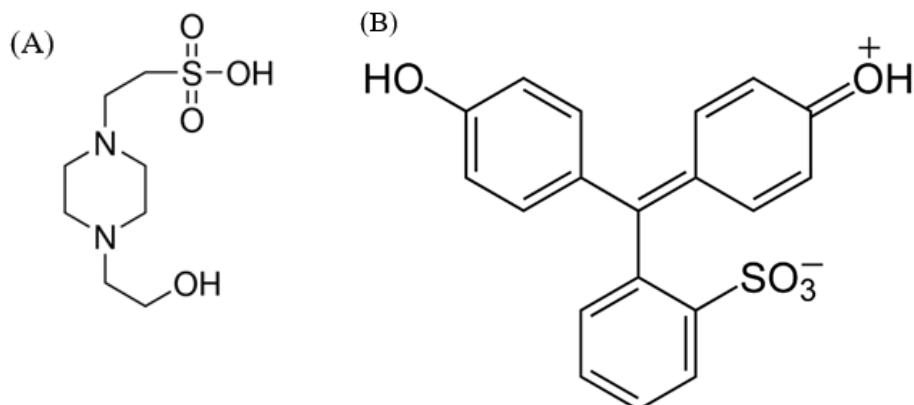
V biologických studiích je potřebné zajistit pH odpovídající fyziologickým podmínkám (7,35 – 7,45). K tomu se běžně využívají pufrы o různém složení, kde je jako pufrovací složka využit anorganický aniont (fosfátový pufr) či strukturně víc komplikovaná organická molekula, např. HEPES (HBS, *HEPES buffered saline*)⁵⁵.

Fosfátový pufr se připravuje smícháním jeho kyselé složky, dihydrogenfosforečnanu sodného (NaH_2PO_4) a příslušné báze, hydrogen fosforečnanu disodného (Na_2HPO_4) ve vhodném poměru pro dosažení požadované pH hodnoty. Fosfátový pufr má však několik nevýhod při použití v systémech mimikující fyziologické prostředí, protože fosfáty inhibují hodně důležitých enzymů (karboxypeptidázu, fumarázu, ureázu, různé kinázy a dehydrogenázy) a také inhibují biochemické reakce závislé na iontech kovů, protože s těmito kationty vytváří komplexy. Naproti, HEPES (4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina podle IUPAC) je *N*-substituovanou aminosulfonovou kyselinou (**Obr. 7, A**), která má charakter tzv. obojakého iontu („zwitterionu“). Pufrы obsahující HEPES vykazují lepší výsledky oproti klasickým pufrům, protože jejich schopnost komplexovat s kovy je výrazně omezená⁷⁹.

HEPES je hlavní pufrovací složkou i mnohem komplexnějších médiích, které jsou vyžadovány pro kultivaci nervových buněk, jako je například Neurobasal (NB), který byl použit a studován i v této práci.

NB se skládá ze všech 17 proteinogenních aminokyselin, vitaminů skupiny B (B12, niacinamid (B3), thiamin (B1), kyselina listová (B9), cholin (B4), kyselina D-pantothenová (B5), pyridoxal (B6), riboflavin (B2)), inositolu, anorganických chloridů (CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl , KCl), dalších anorganických solí ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), D-glukosy, pyruvátu sodného a již zmíněného HEPESu.

NB je možné zakoupit i s přidavkem fenolové červeni (**Obr. 7, B**), která je typickým acidobazickým indikátorem a je citlivá na změny pH v oblasti blízké fyziologickému prostředí⁸⁰.



Obr. 7 (A) Strukturní vzorec HEPESu, (B) strukturní vzorec fenolové červeni⁸¹.

NB je vhodný pro studium v oblastech jako jsou neurotoxikologie, farmakologie, elektrofyzologie, genové exprese a pro studium účinků růstových faktorů a hormonů. Výborné prostředí pro růst a kultivaci primárních neuronů a celých buněčných neurálních linií tvoří NB s přidavkem další složky, B27. NB/B27 zvyšuje rezistence buněk k oxidativnímu stresu, protože B27 dodává do složení NB další pomocné látky jako vitamin E, glutation, katalasu, supeoxid dismutasu a transferin. Pro účely této diplomové práce bylo použité samotné NB medium (bez a s fenolovou červení) avšak bez přidavku dalších pomocných látek⁸².

2. Experimentální část

2.1 Chemikálie

Všechny chemikálie byly kvality p.a. a byly použité bez jakéhokoliv dalšího čištění:

- Dopamin hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Německo)
- Serotonin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Neurobasal™ Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)⁸³
- Neurobasal™ Medium s fenolovou červení (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)⁸⁴
- Chlorid draselný (Lachema, ČR)
- Kyselina sírová (96 %, Lach-Ner, ČR)
- Trihydrát hexakynoželeznatanu draselného (Lachema, ČR)
- Kyselina trihydrogenfosforečná (85 %) (Lach-Ner, ČR)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného (Lach-Ner, ČR)

K přípravě veškerých vodných roztoků byla používána deionizovaná voda (Millipore Mili plus Q System, USA), s rezistivitou menší než 18,2 MΩ cm.

2.2 Přístrojové vybavení

Veškerá elektrochemická měření byla prováděna pomocí přístroje Eco-Tribo Polarograf (Eco-Trend plus, Praha, ČR) v tříelektrodovém uspořádání s referenční argentchloridovou elektrodou (Ag | AgCl | 3 mol l⁻¹ KCl), pomocnou platinovou elektrodou (obě Elektrochemické detektory, ČR) a jako pracovní elektroda byla použita komerčně dostupná BDD elektroda o průměru 3 mm, ploše 7,1 mm², s úrovní dopování borem přibližně v rozmezí 500-1000 ppm (BioLogic Science Instruments, Francie). Přístroj byl ovládán programem MultiElChem v. 3.2.0 (Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR, ČR), který byl také použit ke sběru dat a vyhodnocování voltamogramů. Ke zpracování dat a sestavení grafů byly použity programy OriginPro 2015 (Northampton, MA, USA) a Microsoft Excel 2016 (Microsoft Co., USA).

Měření pH byly prováděny na digitálním pH-metru s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, Essen, UK).

2.3 Příprava roztoků

2.3.1 Příprava zásobních roztoků dopaminu a serotoninu

Zásobní roztoky DA a 5-HT o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ byly připraveny navážením vypočítaného množství na analytických vahách (Nimbus, ADAM EQUIPMENT, P-LAB, ČR) a kvantitativně převedeny do 10 ml odměrných baněk, které byly následně doplněny deionizovanou vodou po rysku. Roztoky DA a 5-HT jsou při laboratorních podmínkách nestabilní. Jejich degradaci způsobují kyslík, denní světlo a teplota. Uchovávaly se proto v temnu v ledničce při teplotě 4 - 8°C.

2.3.2 Příprava zásobního roztoku KCl

Jako základní elektrolyt pro elektrochemickou charakterizaci BDD elektrody byl použit 1 mol l^{-1} KCl, který byl připraven do 500 ml lahví ředěním 3 mol l^{-1} roztoku KCl příslušným objemem deionizované vody. Tento zásobní roztok byl použit i jako rozpouštědlo při přípravě $1 \text{ mmol l}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

2.3.3 Příprava fosfátového pufru o pH 7,0

$0,1 \text{ mol l}^{-1}$ fosfátový pufr o pH 7,0 byl připraven do 250 ml lahví přesným odvážením $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, který byl rozpuštěn v deionizované vodě. Pomocí předem nakalibrovaného pH-metru a přidáním kyseliny fosforečné bylo pH upraveno na požadovanou hodnotu pH 7,0.

2.3.4 Příprava roztoku kyseliny sírové pro anodickou oxidaci BDD elektrody

Elektrochemická anodická aktivace BDD elektrody byla prováděna v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny sírové, která byla připravena do 250 ml odměrné banky odměřením vypočítaného objemu 96 % H_2SO_4 a doplněná deionizovanou vodou po rysku.

2.4 Pracovní postupy

2.4.1 Předúprava povrchu BDD elektrody

(A) Anodická aktivace BDD elektrody (O-BDD): Povrch BDD elektrody byl anodicky aktivován vkládáním vysokého kladného potenciálu $E_{\text{akt}} = +2400 \text{ mV}$

v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ po dobu $t = 5 \text{ min}$. Anodická aktivace byla také použita jako reaktivační krok mezi jednotlivými skeny při měření DA a 5-HT: povrch BDD elektrody byl anodicky aktivován vkládáním vysokého kladného potenciálu $E_{\text{akt}} = +2400 \text{ mV}$ po dobu $t = 30 \text{ s}$ v míchaném měřeném roztoku.

(B) Mechanické leštění BDD elektrody (p-BDD): Povrch BDD elektrody byl mechanicky leštěn na částicích aluminy (velikost částic $1,1 \mu\text{m}$) po dobu přibližně $t = 60 \text{ s}$. Před každým skenem byla elektroda vyndána z roztoku a ručně leštěna na částicích aluminy po dobu $t = 60 \text{ s}$.

2.4.2 Postup voltametrických měření na BDD elektrodě

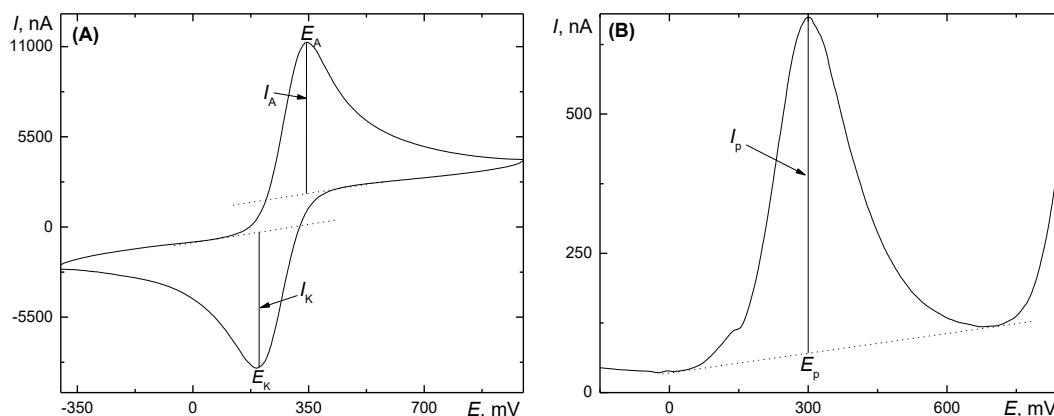
Na začátku každé sérii měření byl metodou cyklické voltametrie (CV) proměřen reverzibilní redoxní systém $1 \text{ mmol l}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ v $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$, aby se na základě ΔE_p hodnoty ověřil stav povrchu BDD elektrody. Následně byly změřeny roztoky základních elektrolytů do ustálení voltametrické křivky a byly proměřeny roztoky 5-HT a DA v každém ze základních elektrolytů za stanovených podmínek. Všechny cyklické voltamogramy byly měřeny v potenciálovém rozsahu od -400 mV do $+1000 \text{ mV}$, pokud není uvedeno jinak. Byly vždycky zaznamenány 4 konsekutivní cykly rychlostí skenu 100 mV s^{-1} .

U metody diferenční pulzní voltametrie (DPV) byla ve všech případech použita rychlost skenu 20 mV s^{-1} , přičemž výška vkládaného pulzu byla $+50 \text{ mV}$ a šířka pulzu byla 80 ms .

Všechna měření byla provedena za laboratorní teploty ($23 \pm 2^\circ\text{C}$).

2.4.3 Způsoby vyhodnocení voltametrických křivek

Způsoby vyhodnocení voltamogramů naměřených metodami CV a DPV jsou znázorněny na obrázku (**Obr. 8**). V případě metody CV byla proložena základní linie a následně odečteny výšky proudů pro anodický a katodický pík, hodnoty jejich potenciálů, a dopočítán jejich rozdíl (ΔE_p). U píku naměřeného technikou DPV byla spojena minima na jeho obou stranách a odečtena výška proudu a hodnota potenciálu v jeho maximu.



Obr. 8 Způsob vyhodnocení voltamogramů naměřených metodami (A) CV a (B) DPV.

2.4.4 Statistické vyhodnocení naměřených dat

Střední hodnota souboru výsledků ($n \leq 20$) byla určena pomocí mediánu, \tilde{x} . Následně bylo vypočítáno rozpětí souboru, R (rovnice 2):

$$R = x_{\max} - x_{\min} \quad (2)$$

Odhad směrodatné odchylky (SD) souboru nalezených výsledků byl vypočítán vynásobením rozpětí příslušným tabelovaným koeficientem, k_n (n -počet měření) (rovnice 3):

$$SD = k_n \cdot R \quad (3)$$

Relativní směrodatná odchylka (s_r) je vypočítána jako podíl odhadu směrodatné odchylky a mediánu (rovnice 4):

$$s_r = \frac{SD}{\tilde{x}} \cdot 100 (\%) \quad (4)$$

Interval spolehlivosti $L_{1,2}$ se vypočítá podle rovnice 5 a udává, že skutečná hodnota leží s pravděpodobností 95 % uvnitř tohoto intervalu. K_n je tabelovaný koeficient pro daný počet měření.

$$L_{1,2} = K_n \cdot R \quad (5)$$

Nejistoty všech měření jsou vyjádřeny jako intervaly spolehlivosti na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

2.4.5 Mez detekce a mez kvantifikace

Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ) byly vypočítány dvěma postupy A i B podle následujících vztahů (rovnice 6 a 7):

$$LOD = \frac{3 \cdot SD}{b} \quad (6)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot SD}{b} \quad (7)$$

V případě postupu A představuje SD směrodatnou odchylku proudu píků ($n = 10$) pro nejnižší naměřenou koncentraci, b je směrnice příslušné kalibrační závislosti, a v případě postupu B je SD směrodatná odchylka úseku příslušné kalibrační závislosti, b je její směrnice.

3. Výsledky a diskuze

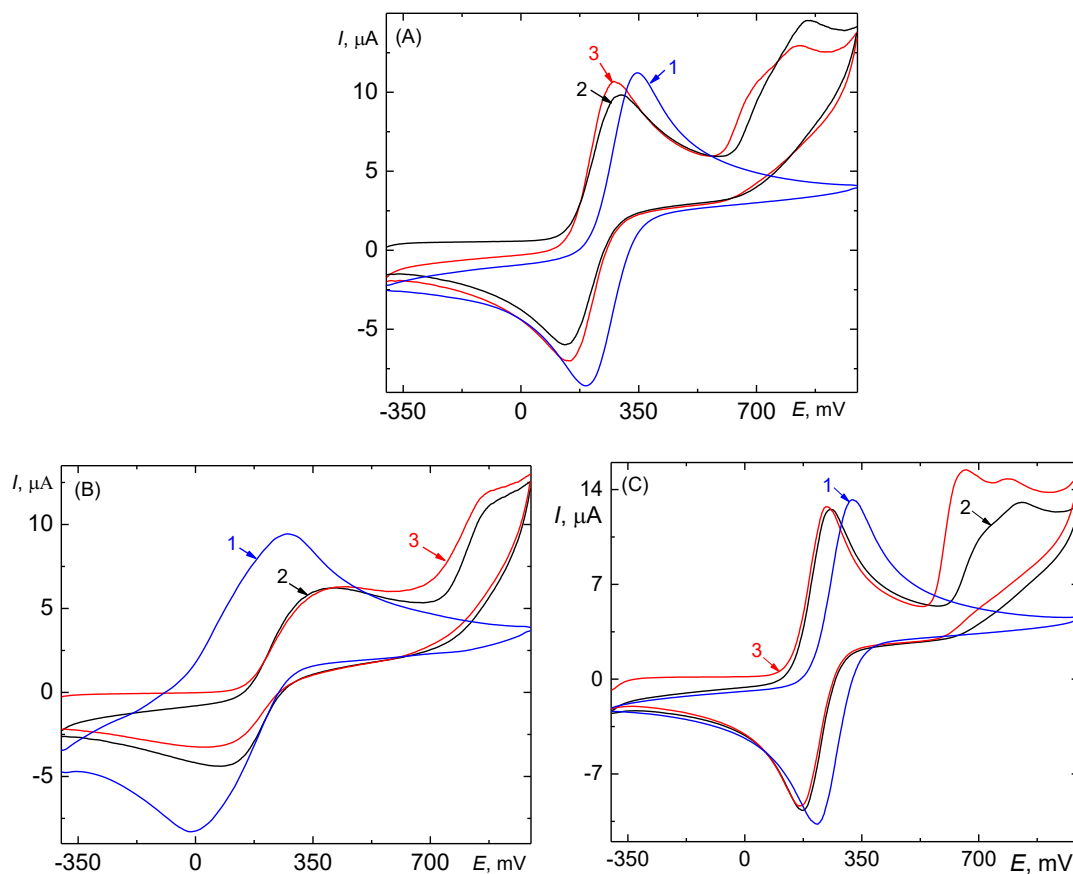
3.1 Elektrochemická charakterizace BDD elektrody

3.1.1 Cyklická voltametrie redoxního markeru

K elektrochemické charakterizaci BDD elektrody byla využita metoda CV v přítomnosti modelového redoxního systému $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, který je vysoce citlivý ke stavu povrchu elektrody. Tento redoxní systém již byl popsán v kapitole 1.4. Nejdřív byly naměřeny cyklické voltamogramy 1 mmol l^{-1} $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ na nové, ještě žádným způsobem neaktivované BDD elektrodě (**Obr. 9, A**) a anodicky aktivované O-BDD elektrodě (**Obr. 9, B**) ve třech různých prostředích: $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0, NB o pH 7,34 a NB s fenolovou červení o pH 7,48. Rozdíl potenciálů anodického a katodického píku ΔE_p a poměr jejich výšek I_A/I_K , je uveden v tabulce (**Tab. 4**). Aktivace BDD elektrody byla provedena vložením kladného potenciálu $E_{\text{akt}} = +2400 \text{ mV}$ po dobu $t = 5 \text{ min}$ v roztoku $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$.

Z **Tab. 4** je vidět, že po aktivaci hodnoty jsou ΔE_p ve všech zkoumaných prostředích výrazně vyšší než hodnota 59 mV , která platí pro ideálně reverzibilní děje při přenosu 1 elektronu. Nárůst ΔE_p indikuje pomalejší přenos elektronu a daná reakce je tím pádem kvazireverzibilní. V případě PB o pH 7,0 se poměr I_A/I_K vzdálil od 1, kdežto v případě NB o pH 7,34 a NB s fenolovou červení o pH 7,48 se poměr I_A/I_K pohybuje kolem 1 jako před aktivací. Jak již bylo popsáno v kapitole 1.4, při anodické aktivaci probíhá rozklad vody a vzniká hydroxylový radikál HO^\bullet (rovnice 1), který oxiduje povrch elektrody, a na BDD povrch zavádí různé kyslíkové funkční skupiny (ketonová, alkoholová, etherová, hydroxylová a karboxylová), které nesou částečně záporný náboj⁷¹. Díky tomu se povrch O-BDD elektrody stává částečně záporně nabitým, což způsobuje elektrostatickou repulzi aniontu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a ve výsledku vede ke zhoršení výše zmíněných parametrů (rozdíl potenciálů anodického a katodického píků ΔE_p a poměr jejich výšek I_A/I_K).

Na **Obr. 9** je také vidět další pík kolem potenciálu $+900 \text{ mV}$, který patří pravděpodobně oxidaci elektroaktivních složek NB (HEPES, aminokyseliny tryptofan, tyrosin, cystein, histidin, methionin a vitaminy B6 a B12 a fenolová červeň^{47, 85}).



Obr. 9 Cyklické voltamogramy $1 \text{ mmol l}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ v (1) $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0, (2) NB o pH 7,34, (3) NB s fenolovou červení o pH 7,48 (A) před aktivaci, (B) po aktivaci v $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ($E_{\text{akt}} = +2400 \text{ mV}$, $t = 5 \text{ min}$) a (C) po leštění na částicích aluminu po dobu $t = 60 \text{ s}$ při rychlosti polarizace 100 mV s^{-1} .

Tab. 4 Rozdíl potenciálů anodického a katodického píků ΔE_p a poměr jejich výšek I_A/I_K pro $1 \text{ mmol l}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ v (i) $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0, (ii) NB o pH 7,34 a (iii) NB s fenolovou červení o pH 7,48 měřená metodou CV rychlostí skanu 100 mV s^{-1} na neaktivované BDD elektrodě, po její anodické aktivaci ($0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, $E_{\text{akt}} = +2400 \text{ mV}$, $t = 5 \text{ min}$) a leštění po dobu $t = 60 \text{ s}$.

Základní elektrolyt	Před aktivaci		Po anodické aktivaci		Leštění ($t = 60 \text{ s}$)	
	ΔE_p (mV)	$ I_A/I_K $	ΔE_p (mV)	$ I_A/I_K $	ΔE_p (mV)	$ I_A/I_K $
0,1 mol l ⁻¹ PB o pH 7,0	156	1,10	291	1,90	105	1,04
NB o pH 7,34	156	0,93	252	1,02	60	0,93
NB s fenolovou červení o pH 7,48	123	0,98	246	0,97	86	0,96

Elektrochemické vlastností BDD elektrody byly dále studovány po mechanické aktivaci v podobě leštění povrchu elektrody na částicích aluminu po dobu 60 sekund. Po každém leštění byl metodou CV s rychlostí polarizace 100 mV s^{-1} proměřen roztok $1 \text{ mmol l}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ v (i) $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0, (ii) NB o pH 7,34 a (iii) NB s fenolovou červení o pH 7,48 (**Obr. 9, C**). Byla pozorována změna stavu povrchu p-BDD elektrody (**Tab. 4**): výrazně se zmenšil rozdíl potenciálů anodického a katodického píků ΔE_p , poměr jejich výšek I_A/I_K se víc přiblížil jedné i v případě PB o pH 7,0.

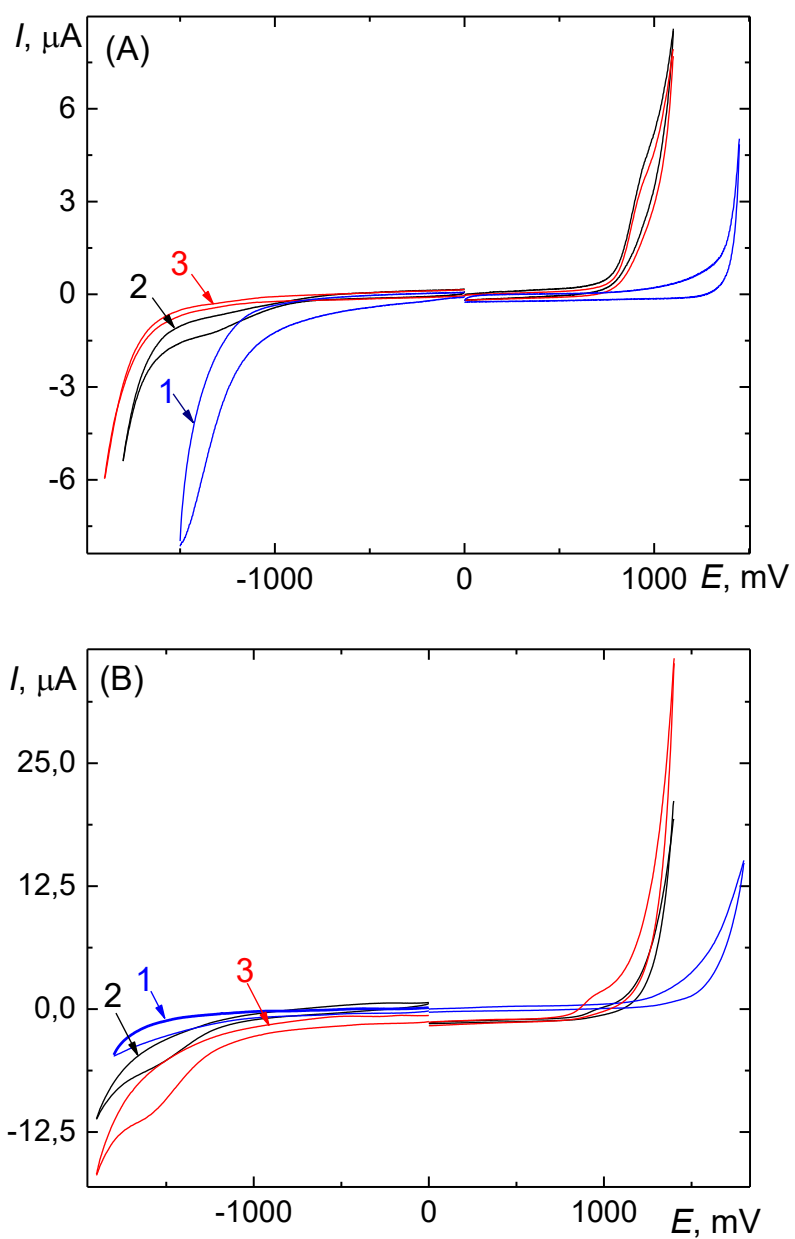
Je známo, že leštěním BDD povrchu dochází k částečné eliminaci kyslíkových skupin, navíc karboxylová skupina úplně mizí. Na leštěném p-BDD povrchu převládají C-C vazby původně přítomné v diamantu. Rozdíl potenciálů anodického a katodického píků ΔE_p a poměru jejich výšek I_A/I_K pro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ se proto blíží parametrům pro reverzibilní děj⁷³.

3.1.2 Potenciálová okna

Potenciálové okno je významnou charakteristikou, která poskytuje důležitou informaci o stavu povrchu použité BDD elektrody. Jak již bylo zmíněno v Teoretické části (viz kapitola 1.5), BDD elektroda má široké potenciálové okno ve vodných i nevodných elektrolytech. Tato její vlastnost souvisí s posunem potenciálu reakce vývoje vodíku (*hydrogen evolution reaction*) v katodické oblasti k negativnějším hodnotám a potenciálu reakce vývoje kyslíku v anodické oblasti k pozitivnějším hodnotám (*oxygen evolution reaction*), přičemž tyto reakce limitují rozsah potenciálového okna⁵⁵.

V této práci byla potenciálová okna změřena metodou CV v třech různých prostředích: (i) 0,1 mol l⁻¹ PB o pH 7,0, (ii) NB o pH 7,34 a (iii) NB s fenolovou červení o pH 7,48 na p-BDD a O-BDD elektrodě. Změny šířky potenciálových rozsahů jsou vidět na **Obr. 10**, kde jsou zaznamenány cyklické voltamogramy studovaných základních elektrolytů (**Obr. 10, A**) na p-BDD elektrodě a (**Obr. 10, B**) O-BDD po pětiminutové aktivaci v 0,1 mol l⁻¹ H₂SO₄ při vloženém potenciálu $E_{akt} = +2400$ mV. Tabulka **Tab. 5** shrnuje hodnoty krajních potenciálů potenciálových oken ($E_{lim,A}$ a $E_{lim,K}$) pro výše uvedené základní elektrolyty na p-BDD a O-BDD elektrodě. Těto hodnoty byly vyhodnoceny jako průsečíky tečen v oblastí úniku potenciálového okna.

Z tabulky (**Tab. 5**) a obrázku (**Obr. 10**) je zřejmé, že na O-BDD se šířka potenciálových oken ve všech třech médiích zvětšila v porovnání s p-BDD elektrodou. Tento jev je spojen s odstraněním sp² nečistot z povrchu BDD elektrody a současnou změnou povrchu v důsledku zavedení kyslíkových funkčních skupin, které zpomalují přenos elektronů^{87, 88}. Potenciálová okna obou NB médií v anodické oblasti jsou výrazně užší o přibližně 250 mV na p-BDD a 450 mV na O-BDD, v porovnání s PB, vzhledem k pravděpodobné oxidaci elektroaktivních složek v NB: především HEPESu (v NB se vyskytuje ve vysoké koncentraci 20 mmol l⁻¹), a také i aminokyselin tryptofanu, tyrosinu, cysteinu, histidinu, methioninu a vitaminů B6 a B12^{47, 85}. Přítomnost fenolové červeni nemá vliv na šířku potenciálového okna příslušného pufru.



Obr. 10 Cyklické voltamogramy základních elektrolytů na (A) p-BDD a (B) O-BDD: (1) 0,1 mol l⁻¹ PB o pH 7,0, (2) NB o pH 7,34, (3) NB s fenolovou červení o pH 7,48. Rychlost skanu 100 mV s⁻¹.

Tab. 5 Hodnoty krajních potenciálů potenciálových oken ($E_{lim,A}$ a $E_{lim,K}$) pro 0,1 mol l⁻¹ PB o pH 7,0, NB o pH 7,34 a NB s fenolovou červení o pH 7,48 naměřené na p-BDD a O-BDD elektrodě.

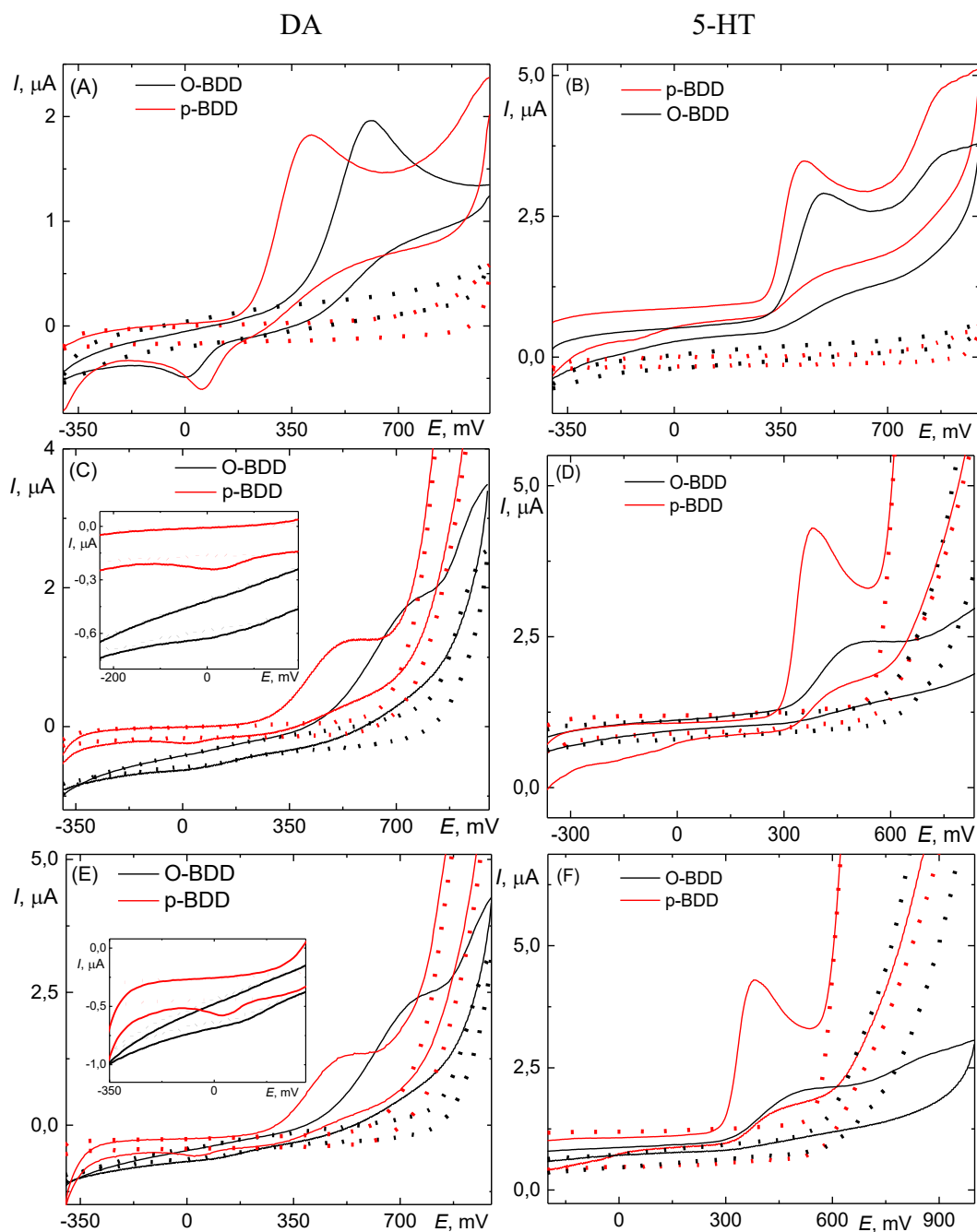
Elektroda	0,1 mol l ⁻¹ PB o pH 7,0			NB o pH 7,34			NB s fenolovou červení o pH 7,48		
	$E_{lim,A}$ (mV)	$E_{lim,K}$ (mV)	Potenciálové okno (mV)	$E_{lim,A}$ (mV)	$E_{lim,K}$ (mV)	Potenciálové okno (mV)	$E_{lim,A}$ (mV)	$E_{lim,K}$ (mV)	Potenciálové okno (mV)
p-BDD	+1050	-1160	2210	+800	-1570	2370	+800	-1500	2300
O-BDD	+1620	-1580	3200	+1200	-1730	2930	+1140	-1550	2690

3.2 Cyklická voltametrie DA a 5-HT

Elektrochemické chování DA a 5-HT na O-BDD a p-BDD elektrodách bylo studováno metodou CV v rozsahu potenciálů od -400 mV do $+1000$ mV, přičemž tento rozsah byl zvolen proto, aby nedocházelo k dalším reakcím produktů oxidace, které vedou k tvorbě polymerních filmů znečišťujících povrch elektrod, jak bylo popsáno v Teoretické části (viz kapitola 1.2.1 a 1.2.2).

Roztoky DA a 5-HT (oba o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) byly proměřeny metodou CV v prostředí i) $0,1$ mol l^{-1} PB o pH 7,0, ii) NB o pH 7,34 a iii) NB s fenolovou červení o pH 7,48. V mediích, jejichž pH je blízko fyziologickému, se DA a 5-HT vyskytují ve formě kationtů. Z **Obr. 11 (A, C, E)** je vidět, že oxidace DA je kvazireverzibilní proces, a proto DA poskytuje jeden anodický pík a při reverzním skenu jeden katodický pík na p-BDD a O-BDD elektrodě (**Tab. 6**). 5-HT poskytuje jenom jeden anodický pík a žádný pík při reverzním skenu na obou výše zmíněných površích, což indikuje ireverzibilní oxidaci 5-HT (**Obr. 11, B, D, F**).

Podle hodnot uvedených v **Tab. 6** je vidět, že DA ve všech třech prostředích poskytuje na O-BDD vyšší hodnoty potenciálů anodického E_{pa} a katodického E_{pk} píků a ve výsledku i vyšší hodnoty ΔE_p , než na p-BDD elektrodě. Toto souvisí se zvýšenou heterogenitou O-BDD povrchu v důsledku zavedení kyslíkových funkčních skupin, což vede ke zpomalení přenosu elektronů^{71, 88}. Pro obě elektrody, O-BDD a p-BDD, ještě navíc platí, že v prostředí obou NB je oxidační potenciál DA vyšší v porovnání s jeho oxidačním potenciálem v prostředí $0,1$ mol l^{-1} PB o pH 7,0. Lze předpokládat, že složky přítomny v NB ovlivňují stav povrchu elektrody a tím zpomalují přenos elektronů. Co se dále týče 5-HT, ten se na O-BDD elektrodě oxiduje při vyšších potenciálech (v porovnání s p-BDD) ve všech zkoumaných prostředích (viz **Tab. 7**). Také je z voltamogramů (**Obr. 11**) vidět, že pro DA je velikost anodického píku přibližně stejná na obou typech elektrodového povrchu, ale v případě 5-HT je výška anodického píku výrazně větší na p-BDD oproti O-BDD elektrodě.



Obr. 11 Cyklické voltamogramy (vlevo) DA a (vpravo) 5-HT ($c = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v prostředí (A, B) $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0, (C, D) NB o pH 7,34 a (E, F) NB s fenolovou červení o pH 7,48 naměřené na O-BDD (—) a p-BDD (—). Tečkovaně jsou znázorněné základní elektrolyty.

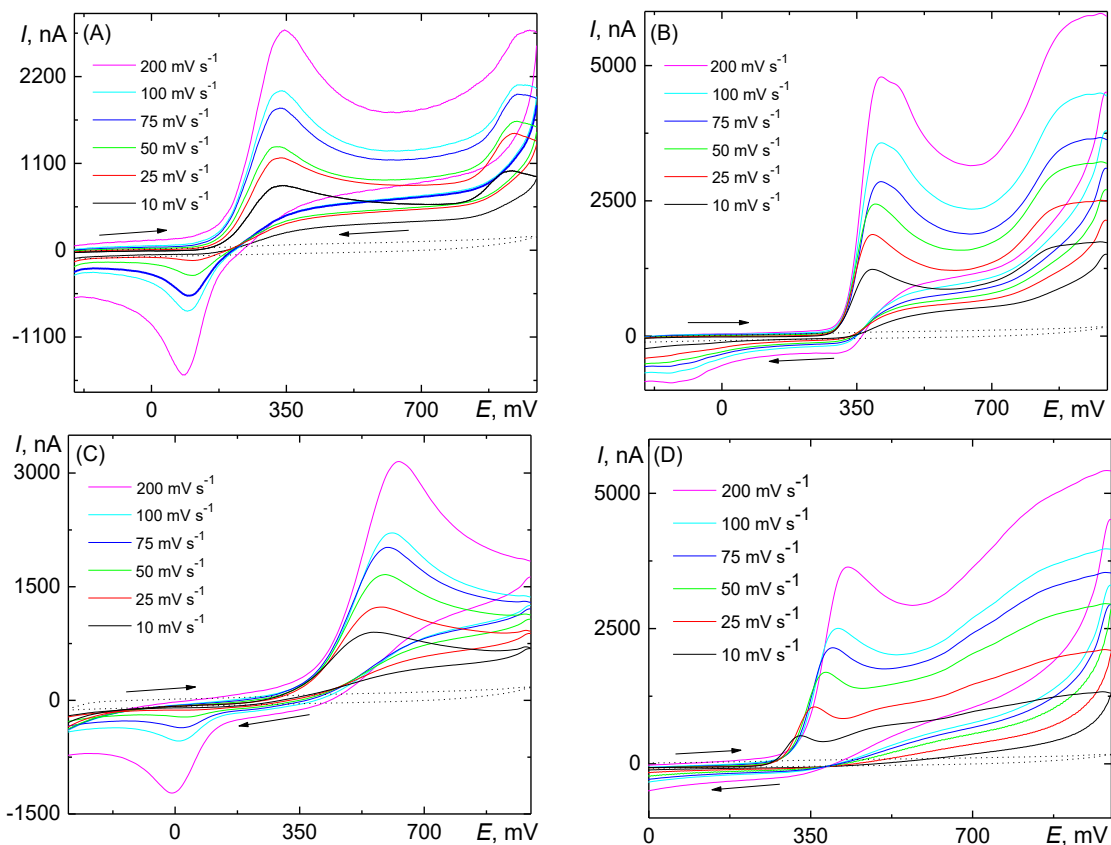
Tab. 6 Hodnoty potenciálu anodického E_{pa} a katodického píku E_{pk} a jejich rozdílu ΔE_p pro DA ($c = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) ve studovaných médiích na O-BDD a p-BDD.

	PB o pH 7,0			NB o pH 7,34			NB s fenolovou červení o pH 7,48		
	E_{pa} (mV)	E_{pk} (mV)	ΔE_p (mV)	E_{pa} (mV)	E_{pk} (mV)	ΔE_p (mV)	E_{pa} (mV)	E_{pk} (mV)	ΔE_p (mV)
O-BDD	+597	+12	585	+729	+48	681	+715	+117	598
p-BDD	+336	+96	240	+550	+18	532	+521	+18	509

Tab. 7 Hodnoty potenciálu anodického píku E_{pa} pro 5-HT ($c = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) ve studovaných prostředích na O-BDD a p-BDD.

	PB o pH 7,0	NB o pH 7,34	NB s fenolovou červení o pH 7,48
	E_{pa} (mV)	E_{pa} (mV)	E_{pa} (mV)
O-BDD	+488	+498	+522
p-BDD	+415	+373	+371

Následně byly změřeny cyklické voltamogramy DA a 5-HT při rychlostech polarizace BDD elektrody v rozsahu $10\text{-}200\text{ mV s}^{-1}$, každá rychlost třikrát, a na grafech je vždy znázorněn druhý cyklus (**Obr. 12**). V případě obou neurotransmitterů na obou typech elektrod bylo pozorováno s narůstající rychlostí skenu zvyšování signálů a také mírný posun anodických oxidačních potenciálů ke kladnějším hodnotám.

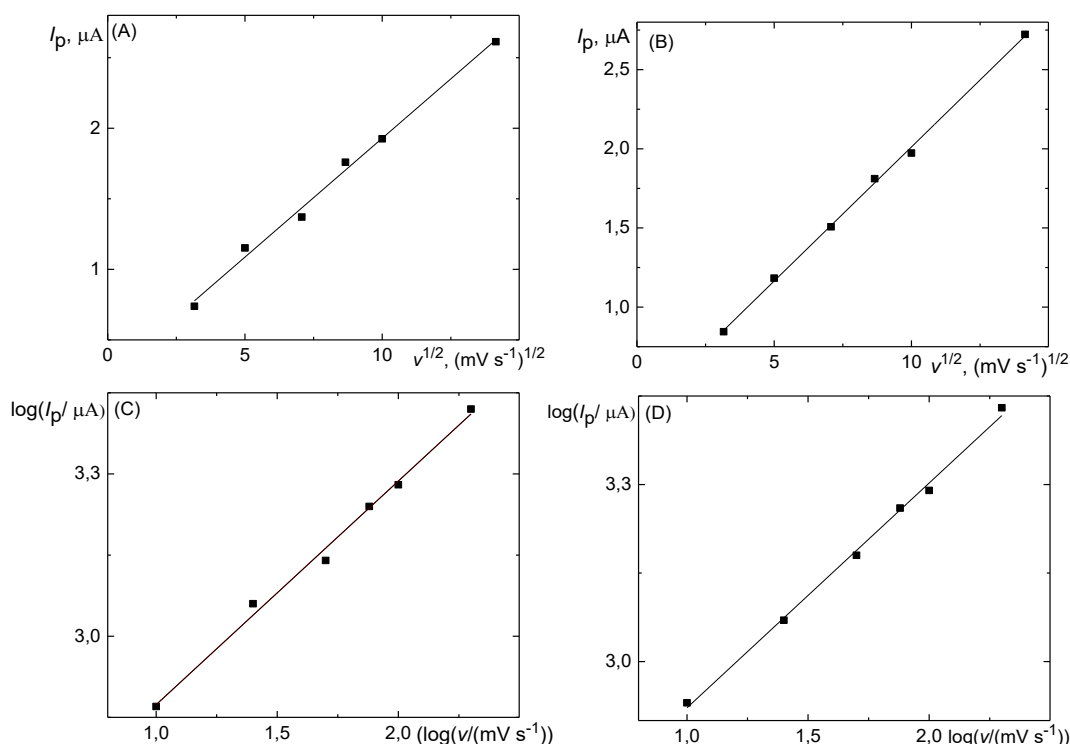


Obr. 12 Cyklické voltamogramy (A, C) DA a (B, D) 5-HT ($c = 1,0 \cdot 10^{-4}\text{ mol l}^{-1}$) naměřené na (A, B) p-BDD a (C, D) O-BDD elektrodě v $0,1\text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0 při rychlosti polarizace $10\text{-}200\text{ mV s}^{-1}$. Tečkovaně je znázorněn základní elektrolyt.

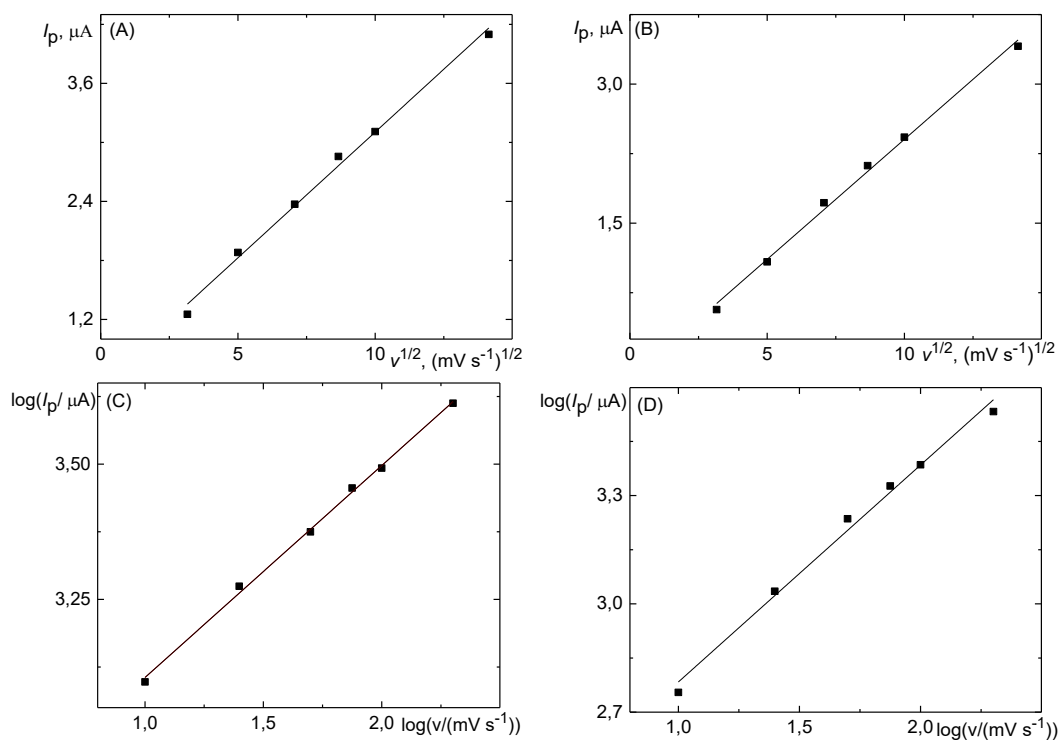
Následně na základě výše uvedených měření byla sestrojena závislost $\log I_p$ na $\log v$ ke sledování způsobu řízení anodické oxidace DA a 5-HT na p-BDD a O-BDD elektrodě v PB o pH 7,0. Směrnice této závislosti udává, že jde o děj řízený adsorpcí, když se její hodnota blíží 1, v případě hodnot kolem 0,5 se jedná o děj řízený difúzí. Navíc byly ověřeny i další závislosti: linearita závislosti proudu píků I_p na rychlosti polarizace v potvrzuje, že se jedná o děj kontrolovaný adsorpcí, linearita závislosti proudu píků I_p na

druhé odmocnině rychlosti polarizace $v^{1/2}$ potvrzuje děj kontrolován difúzí. Níže jsou uvedeny grafy těchto závislostí pro DA (**Obr. 13**) a 5-HT (**Obr. 14**) a jejich parametry jsou shrnuty v tabulkách, zvláště pro DA (**Tab. 8**) a pro 5-HT (**Tab. 9**).

V případě obou neurotransmiterů jde o difúzně řízený oxidační proces, o čemž svědčí hodnoty směrnice závislosti $\log I_p$ na $\log v$ pro DA a 5-HT na obou zkoumaných površích, které se pohybují v rozmezí od 0,38 až 0,60. Anodickou oxidaci kontrolovanou především difúzí potvrzuje i linearita závislosti I_p na $v^{1/2}$ pro oba analyty na p-BDD i O-BDD.



Obr. 13 Závislosti (A, B) proudu píku I_p na druhé odmocnině z rychlosti polarizace $v^{1/2}$, (C, D) logaritmu proudu píku I_p na logaritmu rychlostí polarizace v pro $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ DA v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0 na (A, C) p-BDD a (B, D) na O-BDD elektrodě.



Obr. 14 Závislosti (A, B) proudu píku I_p na druhé odmocnině z rychlosti polarizace $v^{1/2}$, (C, D) logaritmu proudu píku I_p na logaritmu rychlostí polarizace v pro $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ 5-HT v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0 na (A, C) p-BDD a (B, D) na O-BDD elektrodě.

Tab. 8 Parametry lineárních závislostí pro $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ DA v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0 naměřené na p-BDD a O-BDD elektrodě. Rozsah rychlosti polarizace ν : 10-200 mV s^{-1} .

Elektroda	Závislost	Úsek	Směrnice	<i>R</i>
p-BDD	$\log I_p$ na $\log \nu$	$2,46 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,02$	0,992
	I_p na $\nu^{1/2}$	$244,59 \pm 58,07 \text{ nA}$	$168,44 \pm 6,63 \text{ nA s}^{1/2} \text{ mV}^{-1/2}$	0,992
O-BDD	$\log I_p$ na $\log \nu$	$2,54 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,01$	0,998
	I_p na $\nu^{1/2}$	$318,32 \pm 26,42 \text{ nA}$	$169,33 \pm 3,02 \text{ nA s}^{1/2} \text{ mV}^{-1/2}$	0,999

Tab. 9 Parametry lineárních závislostí pro $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ 5-HT v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0 naměřené na p-BDD a O-BDD elektrodě. Rozsah rychlosti polarizace ν : 10-200 mV s^{-1} .

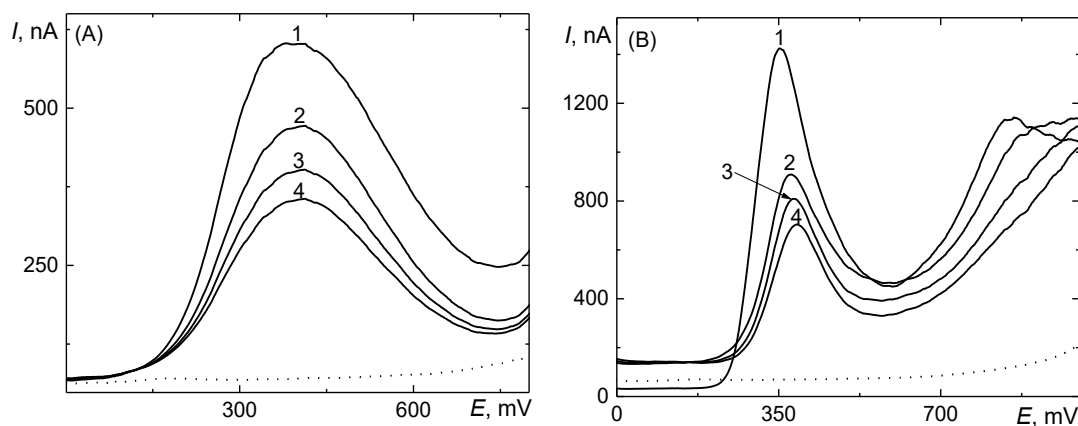
Elektroda	Závislost	Úsek	Směrnice	<i>R</i>
p-BDD	$\log I_p$ na $\log \nu$	$2,71 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,01$	0,997
	I_p na $\nu^{1/2}$	$547,97 \pm 83,09 \text{ nA}$	$255,70 \pm 9,49 \text{ nA s}^{1/2} \text{ mV}^{-1/2}$	0,993
O-BDD	$\log I_p$ na $\log \nu$	$2,18 \pm 0,05$	$0,601 \pm 0,03$	0,989
	I_p na $\nu^{1/2}$	$-184,06 \pm 70,65 \text{ nA}$	$258,86 \pm 8,07 \text{ nA s}^{1/2} \text{ mV}^{-1/2}$	0,995

3.3 Vliv aktivace BDD elektrody na voltametrické chování DA a 5-HT

Předběžné výsledky ukázaly, že při opakování voltametrických skenů dochází k poklesu jejich výšky v důsledku pasivace elektrodového povrchu meziprodukty a produkty probíhajícími redoxními, popřípadě návaznými chemickými procesy. Proto byl dále studován rozsah této pasivace a možnosti anodické a mechanické aktivace povrchu při opakování čtyř voltametrických skenů. V **Tab. 10** jsou uvedeny hodnoty poměru výšek píku I_{p4}/I_{p1} pro posledního čtvrtý a první voltametrický skena rozdílu potenciálů čtvrtého a prvního píků $E_{p4}-E_{p1}$ pro DA a 5-HT (vždy o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) naměřené nejdříve na BDD elektrodě bez aktivace, zatím na anodické aktivované O-BDD elektrodě a po následujícím leštění po dobu $t = 60 \text{ s}$ ve třech zkoumaných prostředích: $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0, NB o pH 7,34 a NB s přidavkem fenolové červeni o pH 7,48.

3.3.1 Pasivace povrchu a vliv anodické aktivace

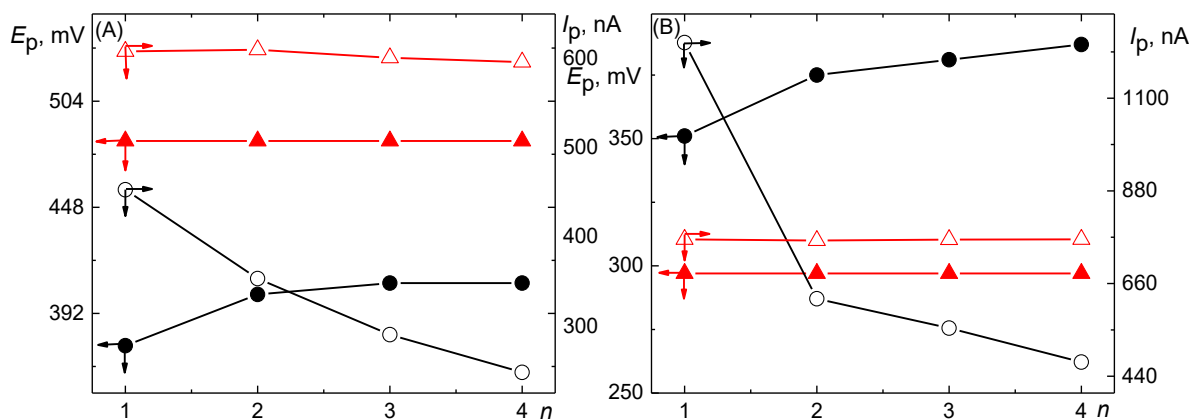
Metodou DPV byly proměřeny roztoky DA a 5-HT (oba o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0 čtyřikrát za sebou na BDD elektrodě, přičemž mezi jednotlivými skeny nebyla elektroda žádným způsobem aktivovaná, a proto docházelo ke kontinuálnímu poklesu výšek naměřených signálů (**Obr. 15**).



Obr. 15 DP voltamogramy (A) DA a (B) 5-HT (oba o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) naměřené v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0 na BDD elektrodě. Křivky jsou označené v pořadí, ve kterém byly naměřené (1)-(4), bez aktivace mezi jednotlivými skeny. Tečkovaně je znázorněn základní elektrolyt.

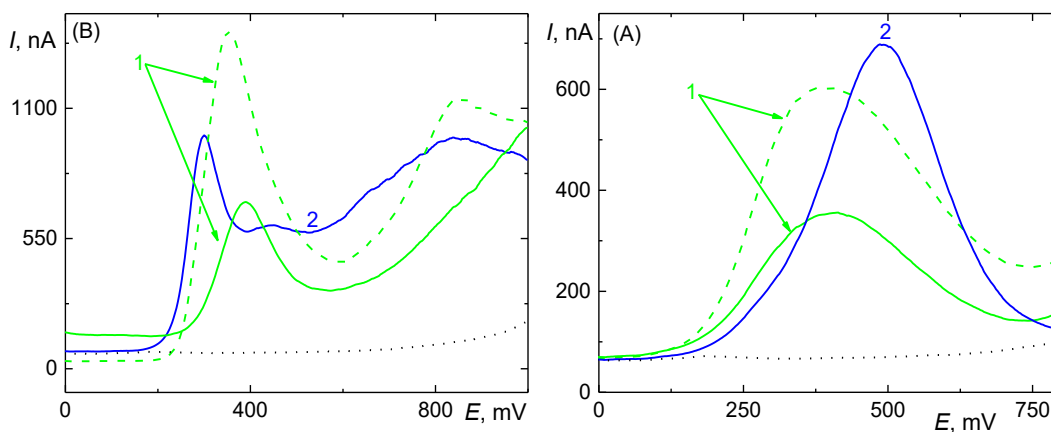
Poměr výšky posledního čtvrtého píku ku výšce prvního píku se rovná 0,55 v případě DA a 0,38 pro 5-HT. Lze dospět k závěru, že v průběhu měření docházelo k nežádoucí pasivaci elektrodového povrchu. Oxidační produkty obou neurotransmiterů, 5-HT a DA, mají tendenci adsorbovat se na elektrodový povrch, jak již bylo popsáno v Teoretické části (viz kapitoly 1.3.1 a 1.3.2). Kontinuální poklesy výšek píků I_p a změna potenciálů E_p v průběhu čtyř následujících skenů jsou znázorněny na **Obr. 16**.

Na základě těchto zjištění byl hledán vhodný způsob zlepšení opakovatelnosti odezvy signálů a omezení či úplné odstranění nežádoucí pasivace povrchu elektrody v průběhu měření. Nejdřív byla vyzkoušena aktivace elektrodového povrchu anodickou oxidací. Na povrch BDD elektrody byl nejprve vložen vysoký kladný potenciál $E_{akt} = +2400$ mV po dobu 5 min v roztoku $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$. Následně byla anodická reaktivace použita i k regeneraci O-BDD povrchu během měření s DA a 5-HT, když mezi jednotlivými skeny byl vložen $E_{akt} = +2400$ mV po dobu $t = 30$ s za současného míchání roztoku. Na O-BDD už nedocházelo ke kontinuálnímu poklesu proudu píků I_p a měřené signály se vyznačovaly vysokou opakovatelností (**Obr. 16**), o čem také svědčí vypočítané hodnoty relativních směrodatných odchylek s_r (I_p) pro 4 měření, uvedené v **Tab. 10**.



Obr.16 Změna potenciálů E_p a výšek píků I_p pro (A) DA a (B) 5-HT ($c = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0 změřené čtyřikrát (n – počet měření) za sebou metodou DPV (\bullet E_p , \circ I_p bez aktivace BDD mezi jednotlivými skeny, \blacktriangle E_p , \triangle I_p s anodickou elektrochemickou aktivací BDD elektrody mezi jednotlivými skeny).

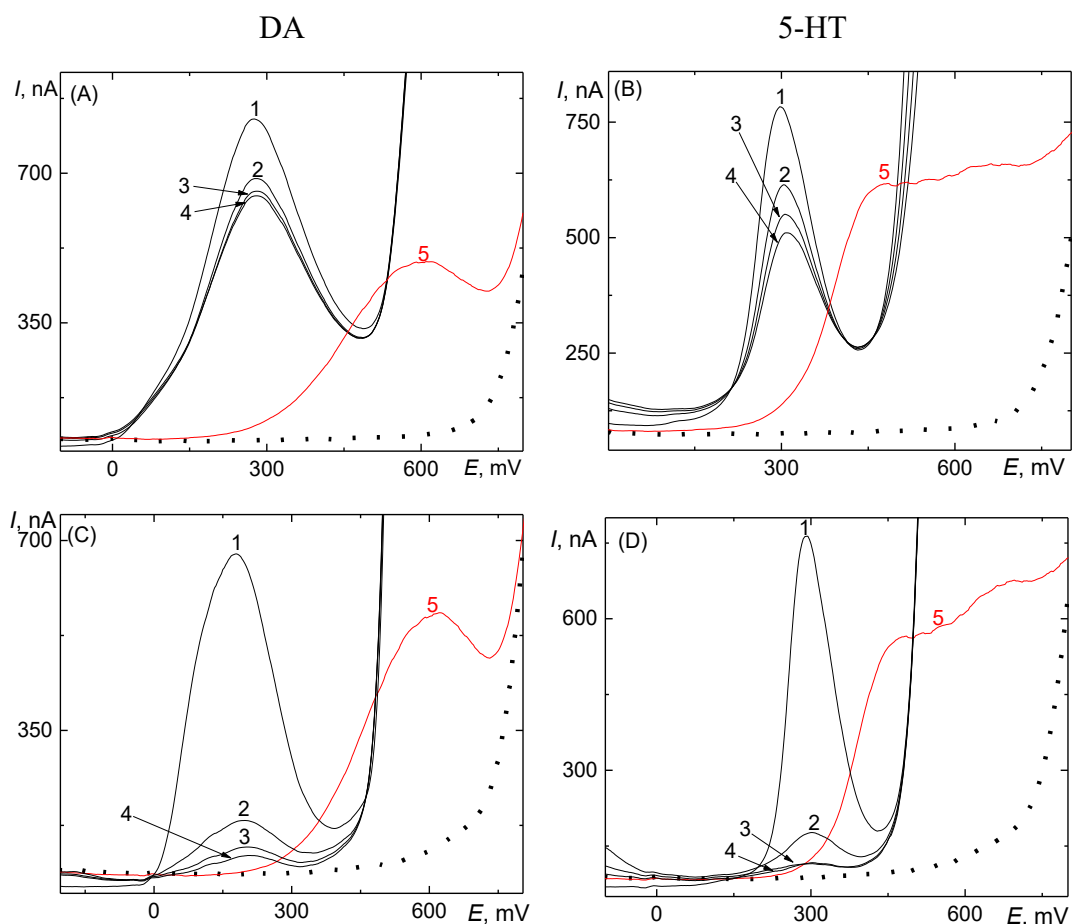
Na **Obr. 16** jsou přehledně znázorněny DP voltamogramy dokumentující změny E_p a výšek píků I_p po anodické aktivaci a porovnány s hodnotami dosaženými před aktivací. Na O-BDD elektrodě se oxidační potenciál DA posouvá k vyšším hodnotám, 5-HT naopak vykazuje jinou tendenci: jeho oxidační potenciál se mírně snížil (**Obr. 16, Tab. 10**). Zvoleným typem aktivace byl také silně ovlivněn i tvar píku: po anodické aktivaci se tvar píku DA zúžil (**Obr. 17, A**). 5-HT zase vykazuje opačnou tendenci a tvar jeho píku se výrazně zhoršil a proud zmenšil (**Obr. 17, B**). Je zřejmé, že změna parametrů píků byla způsobená změnou stavu povrchu elektrody po aktivaci, při které dochází k zavedení kyslíkových funkčních skupin (ketonová, alkoholová, etherová, hydroxylová, karboxylová atd)⁷¹.



Obr. 17 DP voltamogramy (A) DA a (B) 5-HT ($c = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0 (1) bez aktivace mezi jednotlivými skeny: čárkovaně je znázorněn první sken, plnou čarou - čtvrtý sken a (2) s anodickou aktivací mezi skeny ($E_{\text{akt}} = +2400 \text{ mV}$, $t = 30 \text{ s}$, v míchaném roztoku). Tečkovaně je znázorněn základní elektrolyt.

Roztoky DA a 5-HT (oba o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) byly proměřeny v prostředí NB o pH 7,34 a NB s fenolovou červení o pH 7,48 metodou DPV čtyřikrát za sebou na BDD elektrodě, přičemž mezi jednotlivými skeny nebyla elektroda žádným způsobem aktivovaná (**Obr. 18**). Stejně jako před tím v roztoku $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0, docházelo ke kontinuálnímu poklesu výšek naměřených signálů DA a 5-HT v roztocích obou NB. Z vypočítaných hodnot poměru I_{p4}/I_{p1} (**Tab. 10**) je vidět, že v prostředí NB bez fenolové červení jsou menší hodnoty poklesy výšek píků I_p pro DA i 5-HT, než byl

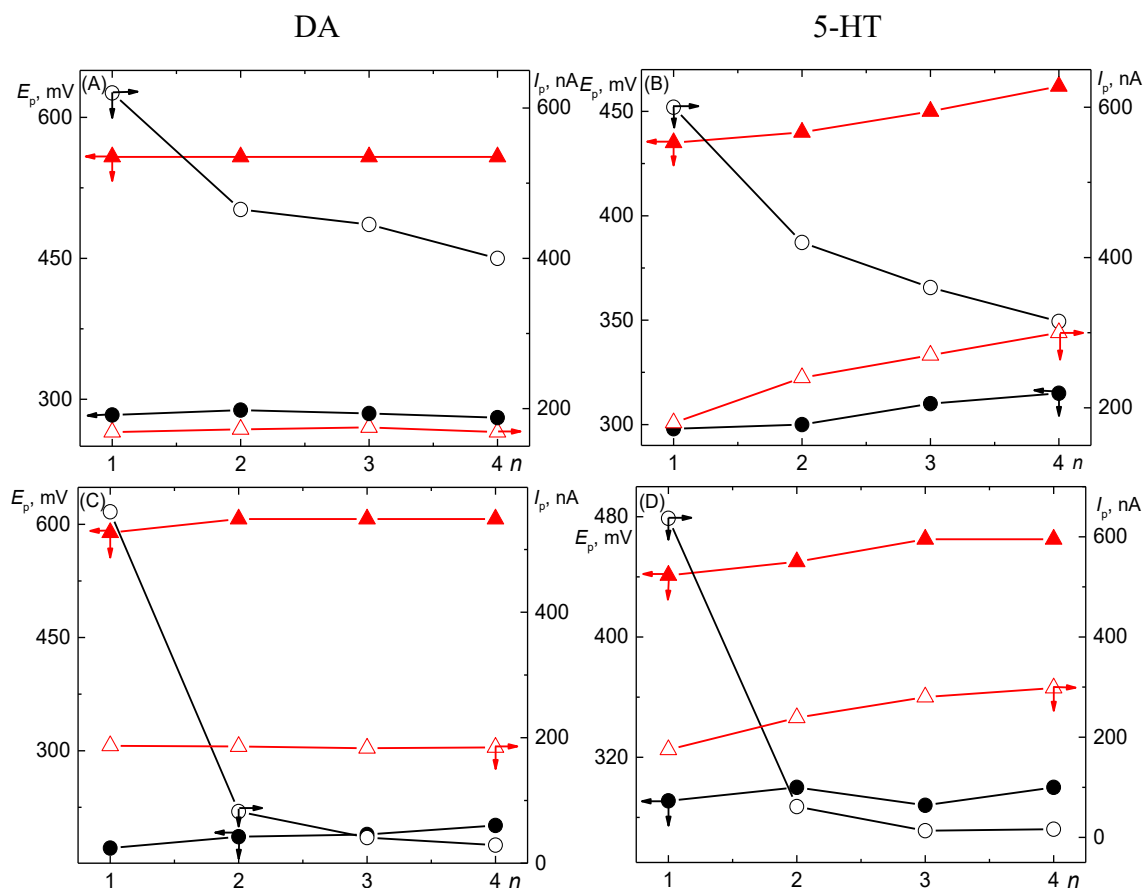
pozorován v prostředí v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0. Lze předpokládat, že v NB je adsorpce produktů oxidace mírně omezená složkami přítomnými v tomto roztoku. Na druhou stranu v prostředí NB s fenolovou červení byla pozorována velmi rychlá pasivace, tj. výrazný rozdíl ve výšce prvního a čtvrtého píku (**Tab.10**). Je to zřejmě způsobeno přítomností fenolové červení, jelikož oxidační produkty fenolů jsou radikálové povahy a jejich vzájemné reakce vedou ke tvorbě polymerních produktu pasivujících elektrodový povrch.



Obr. 18 DP voltamogramy (A, C) DA a (B, D) 5-HT (o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) naměřené v (A, B) NB o pH 7,34 a (C, D) NB s fenolovou červení o pH 7,48. Křivky jsou označené v pořadí, podle kterého byly naměřené (1)-(4), bez aktivace mezi jednotlivými skeny a (5) po anodické oxidaci ($E_{\text{akt}} = +2400 \text{ mV}$, $t = 30 \text{ s}$, v míchaném roztoku). Tečkovaně je znázorněn základní elektrolyt.

Pro zlepšení opakovatelnosti odezvy signálů a omezení nežádoucí pasivace v průběhu měření byla znovu vyzkoušena aktivace elektrodového povrchu v podobě anodické oxidace mezi jednotlivými skeny za stejných podmínek jako v předchozích měřeních ($E_{akt} = +2400$ mV po dobu $t = 30$ s za současného míchání roztoku) (**Obr. 18, křivka číslo 5**). Po anodické aktivaci u DA už nedocházelo ke kontinuálnímu poklesu proudu píků I_p , o čemž také svědčí vypočítané hodnoty poměru I_{p4}/I_{p1} a hodnoty příslušných relativních směrodatných odchylek $s_r(I_p)$ uvedené v tabulce (**Tab. 10**). Pro 5-HT byl však pozorován nárůst výšky píků v obou mediích, o čemž svědčí vypočítaný poměr I_{p4}/I_{p1} (**Tab. 10**). 5-HT vykazuje vysokou tendenci ke tvorbě reaktivních meziproduktů (různé typy dimerů) v kultivačních mediích, tvar píků se výrazně zhoršil a oxidační pik 5-HT je těžce rozlišitelný. Je zřejmé, že v případě 5-HT v prostředí NB anodická aktivace není vhodným způsobem pro stabilizaci elektrodového povrchu.

Z **obr. 19** lze také porovnat změny potenciálů E_p a výšek píků a I_p pro oba neurotransmitery způsobené anodickou aktivací v porovnání s neaktivovanou elektrodou. DA vykazuje stejnou tendenci jako před tím v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0: na O-BDD elektrodě se oxidační potenciál E_p posouvá k vyšším hodnotám. Stejnou tendenci nyní vykazuje na O-BDD elektrodě i 5-HT v prostředí kultivačních médií.



Obr. 19 Změna potenciálů E_p a výšek píků I_p pro (A, C) DA a (B, D) 5-HT ($c = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v (A, B) NB o pH 7,34 a (C, D) v NB s fenolovou červení o pH 7, 48 změřené čtyřikrát za sebou metodou DPV (● E_p , ○ I_p bez aktivace BDD mezi jednotlivými skeny, ▲ E_p , △ I_p po anodické elektrochemické aktivaci BDD elektrody mezi jednotlivými skeny).

3.3.2 Vliv leštění povrchu BDD elektrody na voltametrické chování DA a 5-HT při DP voltametii

Další metodou aktivace je mechanická aktivace BDD povrchu v podobě leštění na částicích aluminu po určitou dobu, která byla taky vyzkoušena v rámci této diplomové práce jako další způsob omezení nežádoucí pasivace. Byl sledován vliv doby leštění t na voltametrickou odezvu, potenciály E_p a proudy píků I_p obou analytů DA a 5-HT po předchozí anodické aktivaci. Roztoky DA a 5-HT o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ byly proměřeny v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0 metodou DPV. Byly testovány konkrétní časy leštění t (s): 5, 10, 30, 60, 90 a 120. Výsledky mechanické aktivace byly porovnány

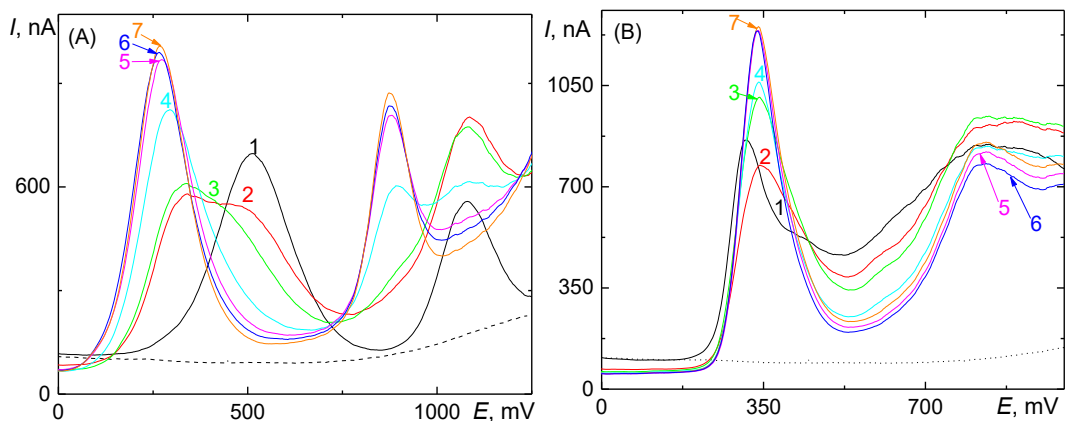
s O-BDD elektrodou ($E_{akt} = +2400$ mV, 30 s, v míchaném roztoku). Jako optimální doba leštění byl zvolen čas $t = 60$ s.

S rostoucí dobou leštění docházelo k výraznému posunu hodnot potenciálů píků E_p pro DA k méně kladným hodnotám, na p-BDD po 120 s leštění se první oxidační pík (odpovídající oxidaci DA na o-DQ) objevuje při potenciálu +264 mV, což je o 264 mV nižší hodnota v porovnání s potenciálem oxidace DA na O-BDD (+513 mV).

V případě 5-HT došlo na p-BDD leštěné 120 s naopak k mírnému nárůstu hodnoty oxidačního potenciálu o 27 mV v porovnání s O-BDD elektrodou. U obou studovaných neurotransmiterů však došlo k nárůstu velikostí proudů píků I_p při změně terminace povrchu z O-BDD na p-BDD, konkrétně proudy narostly o 51 % pro 5-HT a o 49 % pro DA (po 120 s leštění). V teoretické části již bylo popsáno, že po mechanické aktivaci se na elektrodovém povrchu vyskytuje výrazně menší počet kyslíkových skupin, přičemž karboxylová úplně abstinuje⁷³. Leštěním BDD povrchu lze tedy odstranit některé skupiny z elektrodového povrchu a tím usnadnit přenos náboje. Tento způsob aktivace umožňuje zajistit dobře opakovatelné výsledky, ačkoliv při použití mechanické aktivace v podobě leštění na alumině byl pozorován větší rozdíl ve velikostech proudů píků I_p a docházelo i k mírným změnám hodnot potenciálu E_p , o čemž svědčí vypočítané hodnoty relativních směrodatných odchylek s_r uvedené v **Tab. 10** pro DA a 5-HT (pro 4 měření). Další nevýhodou mechanické aktivace elektrodového povrchu leštěním je, že před každým skenem je potřebné elektrodu vyndat z roztoku a ručně leštit, kdežto v případě regenerace O-BDD povrchu byla elektroda aktivována *in-situ* přímo v měřeném roztoku.

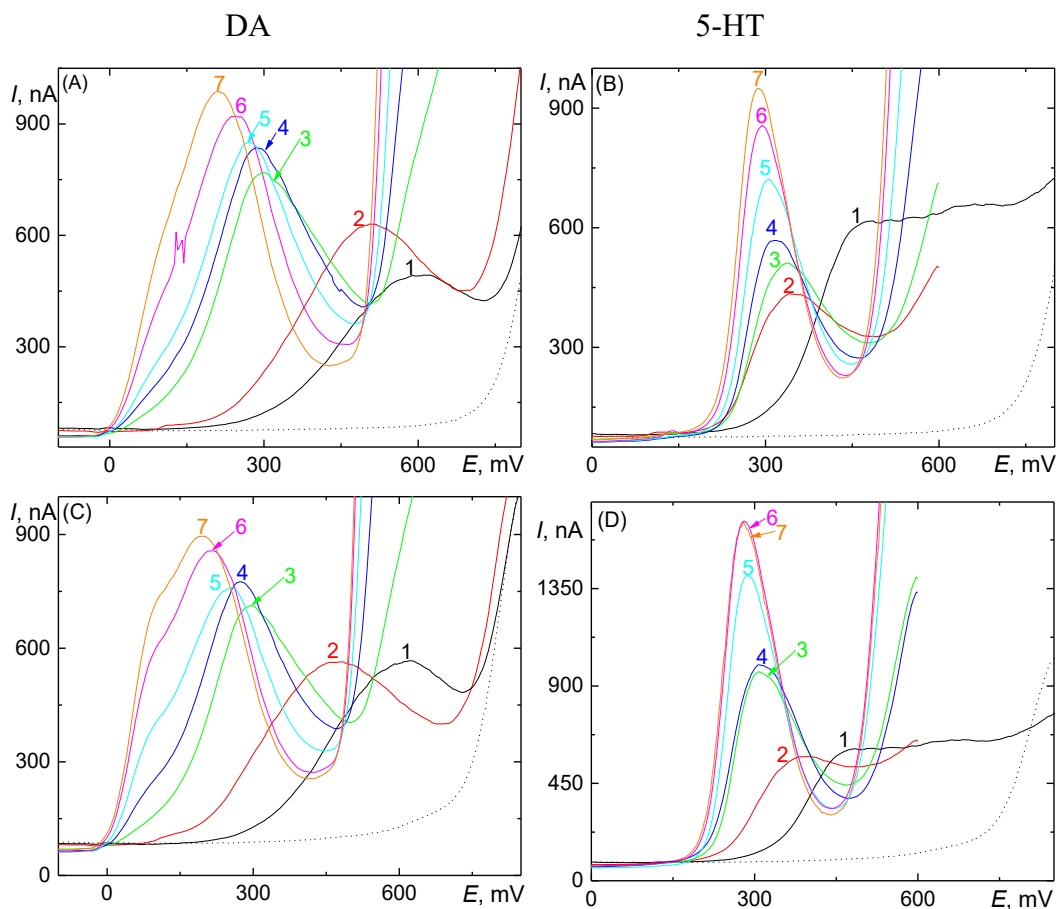
Na DP voltamogramu DA (**Obr. 20, A**) se objevuje další pík při potenciálu +1077 mV na O-BDD a postupně se se vzrůstající dobou leštění posouvá k hodnotě potenciálu E_p přibližně +880 mV. Tento pík odpovídá dvouelektronové oxidaci LDC na DC¹⁵ (viz kapitola 1.2.1).

DP voltamogram 5-HT (**Obr. 20, B**) také vykazuje další píky při vyšších hodnotách potenciálu (přibližně +850 mV), přičemž tyto píky pravděpodobně odpovídají oxidaci různých dimerů a polymerů 5-HT v roztoku (viz kapitola 1.2.2). První pík (+309 mV na O-BDD a s rostoucí dobou leštění se posouvá k E_p přibližně +340 mV) odpovídá dvouelektronové oxidaci 5-HT na *p*-chinon-*o*-imin²⁵.



Obr. 20 DP voltamogramy (A) DA a (B) 5-HT, ($c = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$), v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB pufru o pH 7,0 naměřené na (1) O-BDD po elektrochemické anodické aktivaci ($E_{\text{akt}} = +2400 \text{ mV}$, 30 s, v míchaném roztoku) a následně na p-BDD povrchu získaném leštěním na alumině po dobu t (s): (2) 5, (3) 10, (4) 30, (5) 60, (6) 90 a (7) 120. Tečkovaně je zobrazen základní elektrolyt.

Obdobně byl sledován vliv doby leštění povrchu BDD elektrody na alumině v prostředí NB o pH 7,34 a NB s fenolovou červení o pH 7,48 na voltametričnou odezvu, potenciály E_p a proudy píků I_p DA a 5-HT (oba o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) po předchozí anodické aktivaci. Opět byly testovány konkrétní časy leštění t (s): 5, 10, 30, 60, 90 a 120. Výsledky mechanické aktivace byly porovnány s O-BDD elektrodou ($E_{\text{akt}} = +2400 \text{ mV}$, 30 s, v míchaném roztoku).

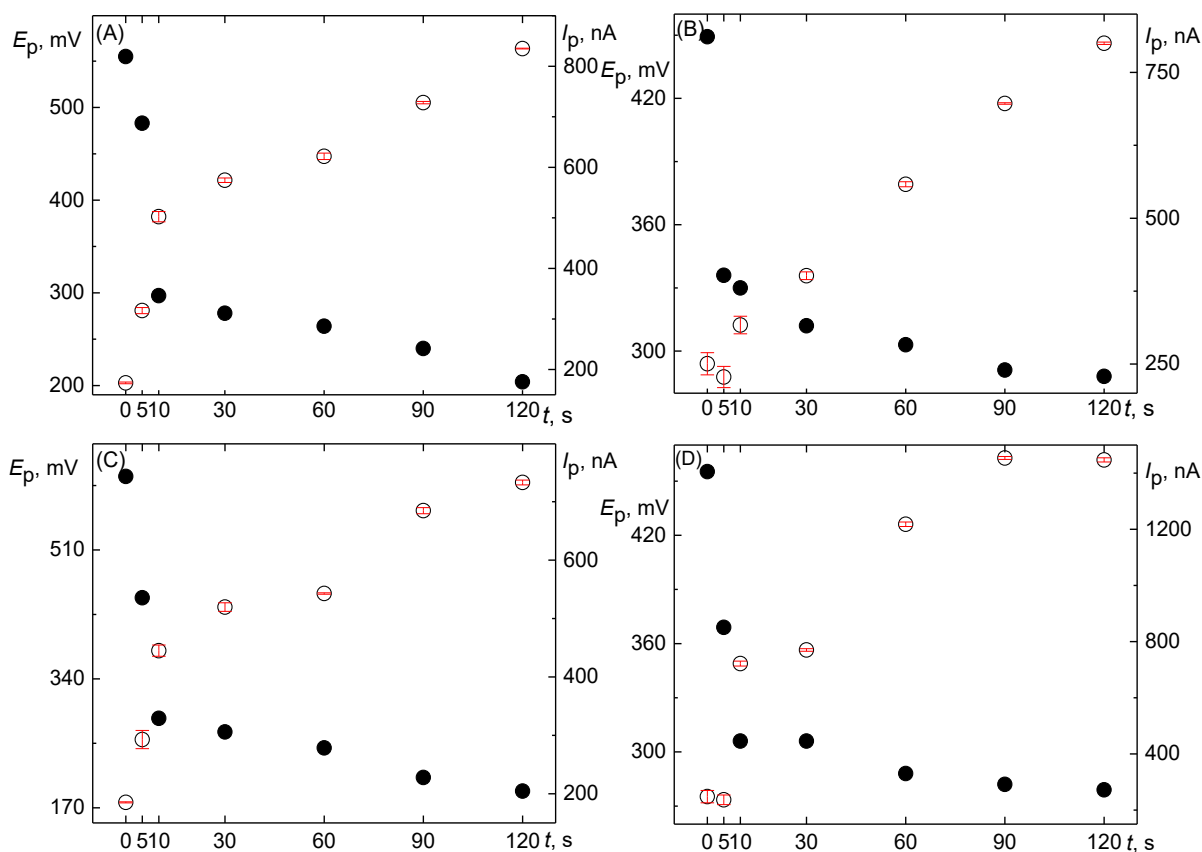


Obr. 21 DP voltamogramy (A, C) DA a (B, D) 5-HT ($c = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v prostředí (A, B) NB o pH 7,34 a (C, D) NB s fenolovou červení o pH 7,48 naměřené po (1) elektrochemické anodické aktivace ($E_{\text{akt}} = +2400 \text{ mV}$, 30 s, v míchaném roztoku) a následném leštění BDD povrchu na alumině po dobu t (s): (2) 5, (3) 10, (4) 30, (5) 60, (6) 90 a (7) 120. Tečkovaně je zobrazen základní elektrolyt.

S rostoucí dobou leštění dochází k výraznému snižování hodnot potenciálů píků E_p a nárůstu výšek píků I_p pro DA a 5-HT v prostředí NB o pH 7,34 (**Obr. 22, A, B**), přičemž se neobjevují další píky (to souvisí s omezením šířky potenciálového okna v důsledku přítomnosti HEPES). Na p-BDD po 120 s leštění se oxidační pík DA objevuje při potenciálu přibližně +200 mV, což je o 350 mV nižší hodnota v porovnání s potenciálem oxidace DA na O-BDD (+555 mV). Pro 5-HT po 120 s leštění se oxidační pík objevuje při potenciálu +288 mV, což je o 160 mV nižší hodnota v porovnání s potenciálem oxidace 5-HT na O-BDD (cca +450 mV). Stejnou tendenci jako v prostředí

NB o pH 7,34 vykazují DA a 5-HT v prostředí NB s fenolovou červení o pH 7,48: s rostoucí dobou leštění dochází k výraznému snižování hodnot potenciálů píků E_p a nárůstu výšek píků I_p pro DA a 5-HT (**Obr. 22, C, D**). Pro dobu leštění $t = 60$ s, která byla vybrána jako optimální, byla opět vyhodnocována opakovatelnost I_p a E_p . Získaná data jsou zpracována v **Tab. 10**.

Z **Tab. 10** je vidět, že leštění není vhodnou metodou omezení pasivace elektrodového povrchu v případě DA v prostředí 0,1 mol l⁻¹ PB o pH 7,0. Naproti pro 5-HT leštěním byly získány mnohem lepší výsledky ve všech třech zkoumaných prostředích v porovnání s anodickou oxidací: nedoházelo ke kontinuálnímu nárůstu výšek píků I_p a naměřené výsledky vykazují vysokou opakovatelnost.



Obr. 22 Změna potenciálů E_p (●) a výšek píků I_p (○) pro (A, C) DA a (B, D) 5-HT ($c = 1,0 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹) v prostředí (A, B) NB o pH 7,34 a (C, D) NB s fenolovou červení o pH 7,48 změřené na p-BDD po dobu t (s): (2) 5, (3) 10, (4) 30, (5) 60, (6) 90 a (7) 120. Chybové úsečky jsou směrodatné odchylky ze 4 měření. Chybové úsečky (červená barva) jsou směrodatné odchylky ze 4 měření.

Tab. 10 Hodnoty poměru I_{p4}/I_{p1} a rozdílu $E_{p4}-E_{p1}$ pro DA a 5-HT v prostředí 0,1 mol l⁻¹ PB o pH 7,0, NB o pH 7,34 a NB s fenolovou červení o pH 7,48 naměřené na BDD elektrodě bez aktivace, po anodické aktivaci (O-BDD) a na leštěné BDD elektrodě (p-BDD).

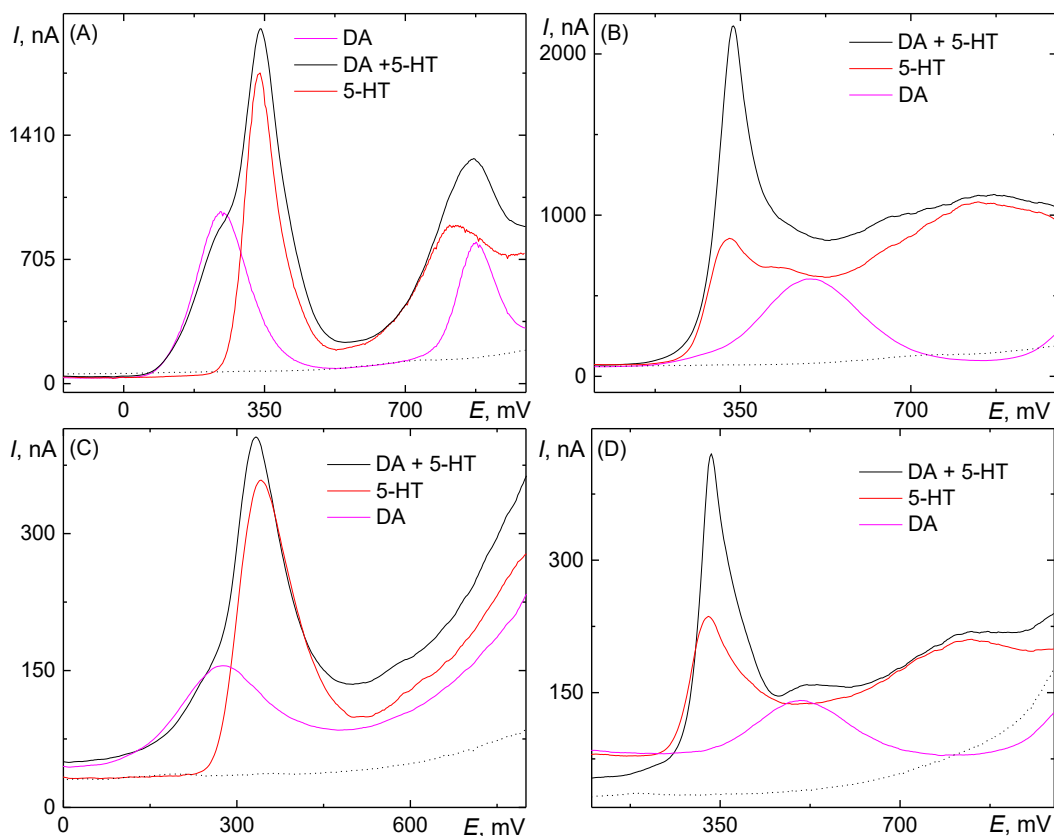
Způsob aktivace	Prostředí	DA		5-HT			$E_{p4}-E_{p1}$ (mV)
		I_{p4}/I_{p1} (%)	s_r (%)	$E_{p4}-E_{p1}$ (mV)	I_{p4}/I_{p1} (%)	s_r (%)	
Bez aktivace	0,1 mol l ⁻¹ PB o pH 7,0	54,8	a	33,0	38,4	a	36,0
	NB o pH 7,34	70,5	a	12,0	51,7	a	9,0
	NB s fenolovou červení o pH 7,48	5,13	a	30,0	2,6	a	9,0
Anodická aktivace	0,1 mol l ⁻¹ PB o pH 7,0	101,0	0,9	0	100	0,2	0
	NB o pH 7,34	102,0	1,7	0	160,7	b	18
	NB s fenolovou červení o pH 7,48	98,7	0,9	0	170,4	b	24
Leštění ($t = 60$ s)	0,1 mol l ⁻¹ PB o pH 7,0	64,7	a	36,0	93,7	3,2	6,0
	NB o pH 7,34	97,8	1,1	54,0	96,8	1,5	26,3
	NB s fenolovou červení o pH 7,48	100,2	0,6	56,0	98,4	0,8	30,5

^a pozorován kontinuální pokles výšky signálu, který je definován poměrem I_{p4}/I_{p1} , s_r nebyla vyhodnocována

^b pozorován kontinuální nárůst výšky signálu, který je definován poměrem I_{p4}/I_{p1} , s_r nebyla vyhodnocována

3.4 Voltametrická detekce 5-HT a DA ve směsi

Vzhledem k tomu, že DA a 5-HT se vyskytují společně ve fyziologických vzorcích (jako krev, mozková tkáň, sliny, atd.) a mohou se navzájem interferovat, byla ověřena možnost současné detekce těchto neurotransmiterů ve směsi pomocí p-BDD a O-BDD elektrody. Byly připraveny dvě směsi DA a 5-HT o vyšší, $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, a nižší koncentraci, $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0, které byly proměřeny metodou DPV. Příslušné DP voltamogramy jsou znázorněny na **Obr. 23**. Z nich je jasné vidět, že odlišit oxidační píky DA a 5-HT, kterých hodnoty potenciálů jsou značně blízké, se skoro na žádném ze studovaných elektrodových povrchů při obou zkoumaných koncentracích nepodařilo. Na p-BDD elektrodě při vyšší koncentraci DA a 5-HT ve směsi ($1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) nacházíme pouze náznaky odlišených signálů jednotlivých neurotransmiterů (**Obr. 23, A**), stejně jako na O-BDD elektrodě pro nižší koncentrace DA a 5-HT ve směsi ($1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) (**Obr. 23, D**). V ostatních případech došlo prakticky k úplnému překrytí signálů DA a 5-HT.



Obr. 23 DP voltamogramy DA, 5-HT a jejich směsi o koncentraci (A, B) $c = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (C, D) $c = 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ v prostředí PB o pH 7,0 změřené na (A, C) p-BDD a (B, D) O-BDD elektrodě. Tečkovaně je zobrazen základní elektrolyt.

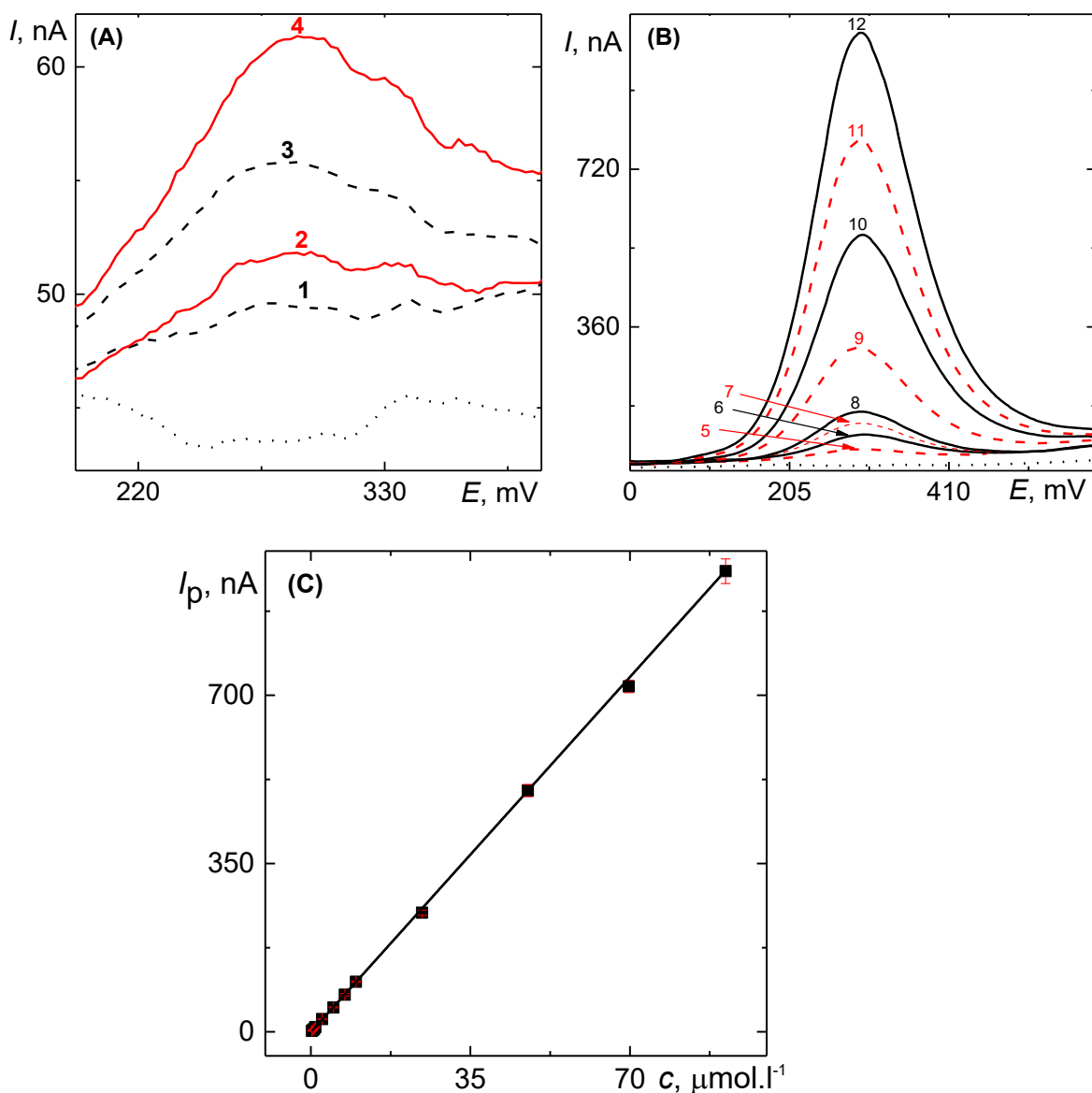
3.5 Kalibrační závislosti, výpočet LOD a LOQ

Koncentrační závislosti DA a 5-HT byly proměřeny v prostředí 0,1 mol l⁻¹ PB o pH 7,0 metodou DPV v rozsahu koncentrací 2,5 · 10⁻⁷ - 10⁻⁴ mol l⁻¹ na p-BDD a O-BDD. Odpovídající DP voltamogramy a kalibrační závislosti pro DA a 5-HT jsou znázorněny na obrázcích (**Obr. 24-27**). Parametry těchto závislostí jsou shrnuté v tabulce (**Tab. 11**) pro DA a v tabulce (**Tab. 11**) pro 5-HT, příslušné meze detekce a kvantifikace jsou shrnuty v tabulce (**Tab. 12**). Kalibrační závislosti byly naměřeny postupným přidáváním roztoků DA a 5-HT (koncentrace zásobních roztoků byla $c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹) k 10ml základního elektrolytu k dosažení požadované koncentrace analytů v rozsahu od 2,5 · 10⁻⁷ do 10⁻⁴ mol l⁻¹.

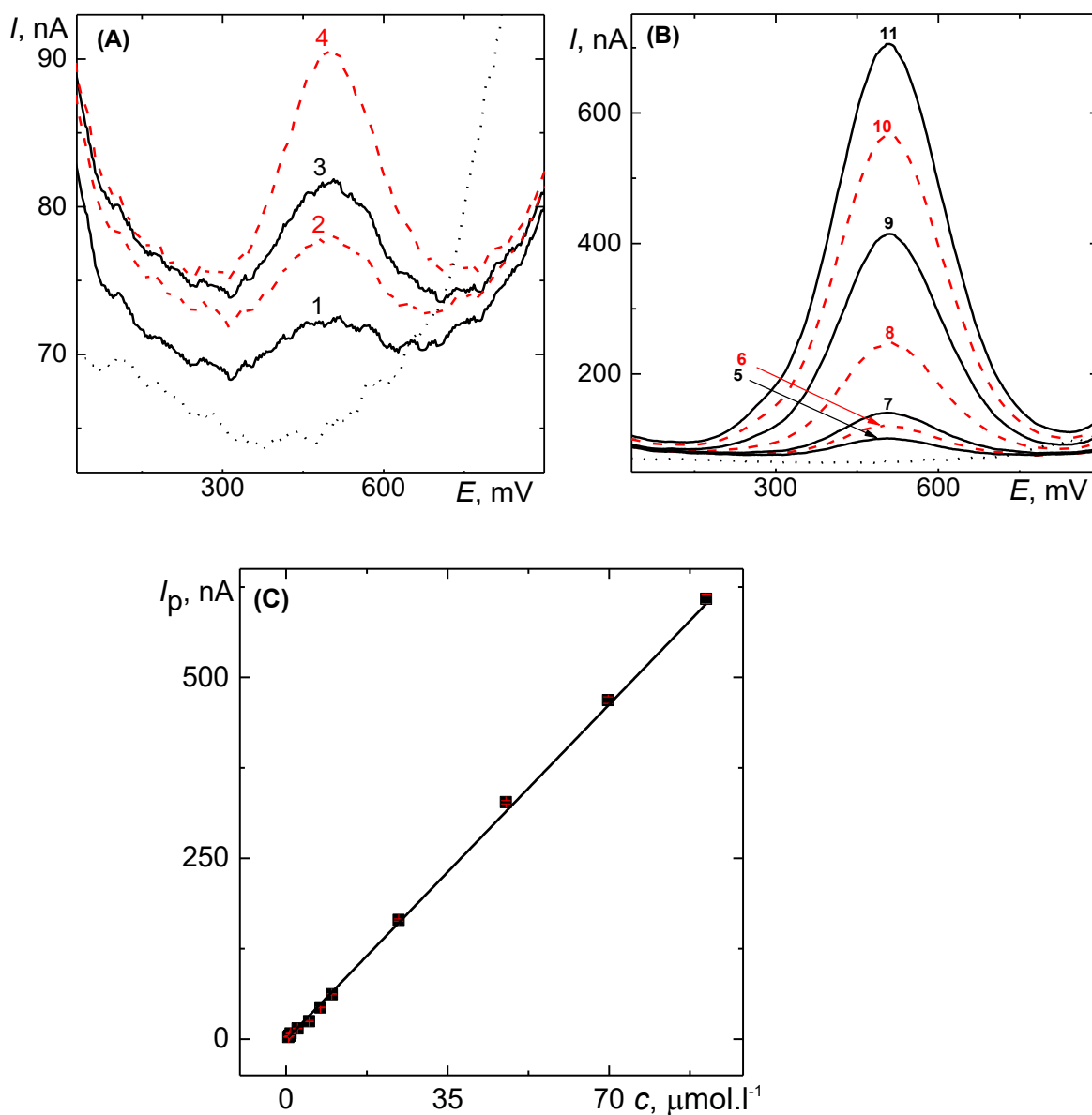
Z **Tab. 11** je patrné, že O-BDD poskytuje horší analytické parametry koncentrační závislosti DA v porovnání s p-BDD. Lineární dynamický rozsah (LDR) je na O-BDD mírně kratší, kvůli vyššímu šumu, který bránil spolehlivě naměřit nižší koncentrace DA. Taktéž citlivost, vyjádřená směrnici kalibrační závislosti, je menší na O-BDD než na p-BDD. Každopádně, obě naměřené kalibrační závislosti lze považovat za lineární v celém koncentračním rozsahu (0,50 až 100 μmol l⁻¹ pro O-BDD a 0,25 až 100 μmol l⁻¹ pro p-BDD) s dostatečně vysokými hodnotami korelačních koeficientů jak pro O-BDD (0,995), tak i pro p-BDD (0,999).

Tab. 11 Parametry kalibračních závislostí DA naměřených metodou DPV v prostředí 0,1 mol l⁻¹ PB o pH 7,0.

Elektroda	LDR (μmol l ⁻¹)	Úsek (nA)	Směrnice (nA μmol ⁻¹ l)	R
p-BDD	0,25 - 100	- 0,78 ± 0,22	10,55 ± 0,12	0,999
O-BDD	0,50 - 100	- 0,69 ± 0,70	6,62 ± 0,14	0,995



Obr. 24 (A) DP voltamogramy naměřené pro koncentrace DA ($\mu\text{mol l}^{-1}$): (1) 0,25, (2) 0,5, (3) 0,75, (4) 1,0. (B) DP voltamogramy naměřené pro koncentrace DA (mol l^{-1}): (5) 2,5, (6) 5,0, (7) 7,5, (8) 10, (9) 25, (10) 50, (11) 75, (12) 100. Tečkovaně je znázorněn základní elektrolyt. (C) Kalibrační závislost pro DA, naměřené na p-BDD elektrodě v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0. Chybové úsečky (červená barva) jsou směrodatné odchylky ze 4 měření.

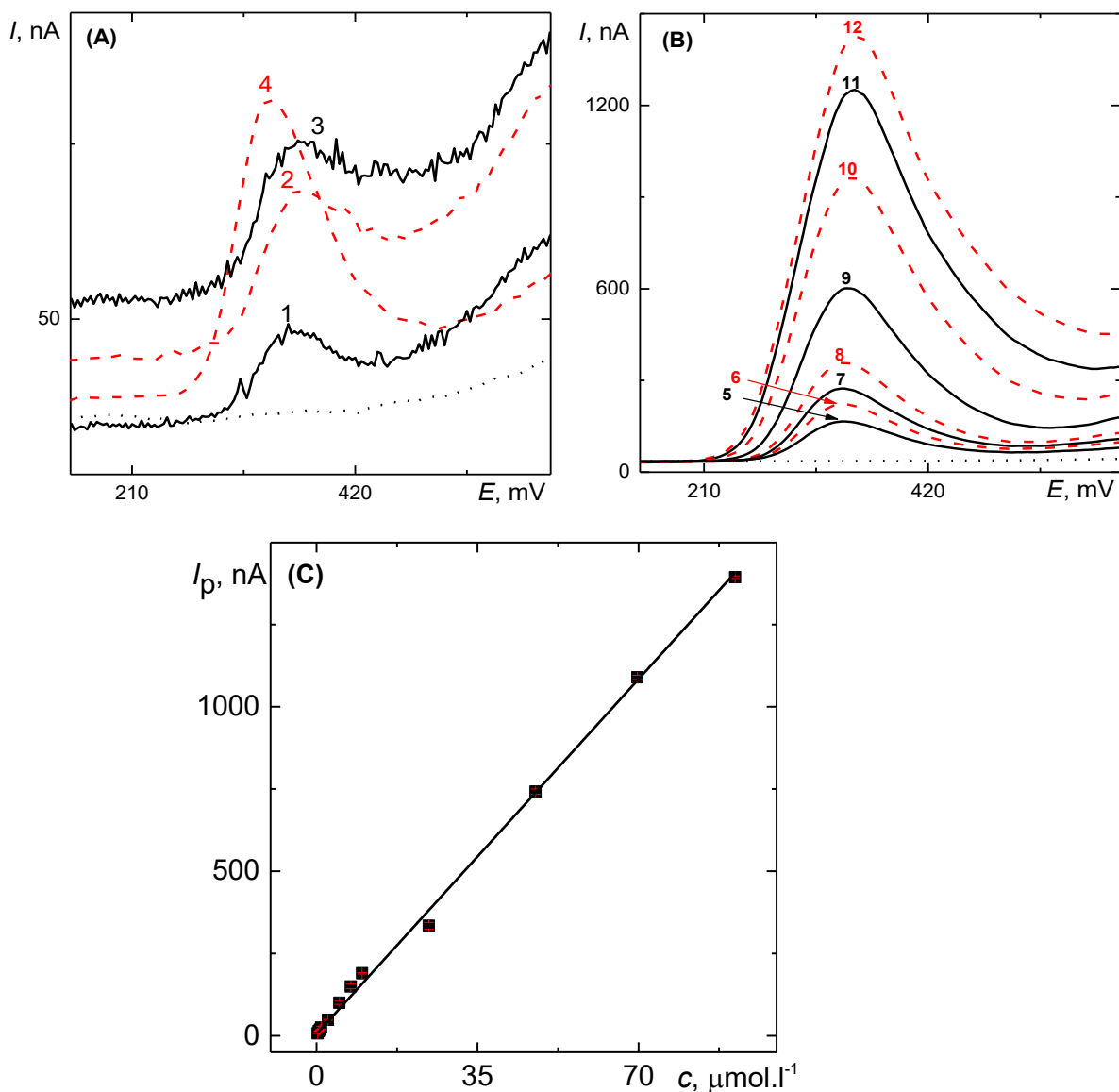


Obr. 25 (A) DP voltamogramy naměřené pro koncentrace DA ($\mu\text{mol l}^{-1}$): (1) 0,5, (2) 0,75, (3) 1,0, (4) 2,5. (B) DP voltamogramy naměřené pro koncentrace DA ($\mu\text{mol l}^{-1}$): (5) 5,0, (6) 7,5, (7) 10, (8) 25, (9) 50, (10) 75, (11) 100. Tečkovaně je znázorněn základní elektrolyt. (C) Kalibrační závislost pro DA, naměřené na O-BDD elektrodě v prostředí 0,1 mol l⁻¹ PB o pH 7,0. Chybové úsečky (červená barva) jsou směrodatné odchylky ze 4 měření.

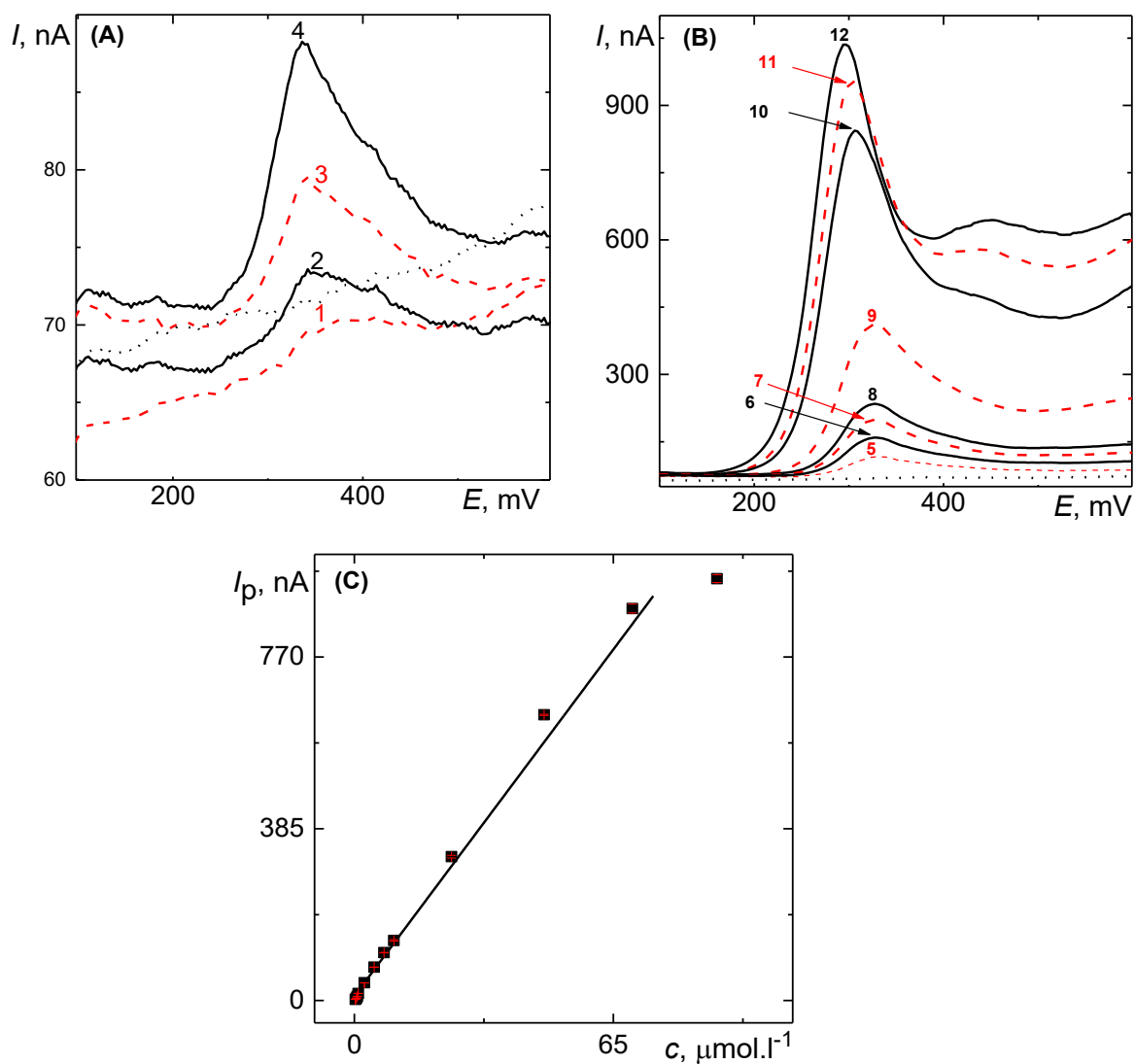
Kalibrační závislost 5-HT naměřená na O-BDD má oproti p-BDD kratší LDR (viz **Tab. 12**), protože při měření vyšších koncentrací 5-HT již došlo k saturaci elektrodového povrchu. Opět, citlivost detekcí 5-HT je vyšší na p-BDD elektrodě než na O-BDD, jako je tomu i u DA. Naměřené kalibrační závislosti lze považovat za lineární v koncentračním rozsahu 0,25 až 75 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro O-BDD a 0,25 až 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro p-BDD, přičemž korelační koeficient obou závislostí je roven 0,998.

Tab. 12 Parametry kalibračních závislostí 5-HT naměřených metodou DPV v prostředí 0,1 mol l^{-1} PB o pH 7,0.

Elektroda	LDR ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Úsek (nA)	Směrnice (nA μmol^{-1} l)	R
p-BDD	0,25 - 100	5,42 ± 1,43	15,41 ± 0,21	0,998
O-BDD	0,25 - 75	6,20 ± 4,37	12,80 ± 0,16	0,998



Obr. 26 (A) DP voltamogramy naměřené pro koncentrace 5-HT ($\mu\text{mol l}^{-1}$): (1) 0,25, (2) 0,50, (3) 0,75, (4) 1,0. (B) DP voltamogramy naměřené pro koncentrace 5-HT ($\mu\text{mol l}^{-1}$): (5) 2,5, (6) 5,0, (7) 7,5, (8) 10, (9) 25, (10) 50, (11) 75, (12) 100. Tečkovaně je znázorněn základní elektrolyt. (C) Kalibrační závislost pro 5-HT, naměřené na p-BDD elektrodě v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0. Chybové úsečky (červená barva) jsou směrodatné odchylky ze 4 měření.



Obr. 27 (A) DP voltamogramy naměřené pro koncentrace 5-HT ($\mu\text{mol l}^{-1}$): (1) 0,25, (2) 0,50, (3) 0,75, (4) 1,0. (B) DP voltamogramy naměřené pro koncentrace 5-HT ($\mu\text{mol l}^{-1}$): (5) 2,5, (6) 5,0, (7) 7,5, (8) 10, (9) 25, (10) 50, (11) 75, (12) 100. Tečkovaně je znázorněn základní elektrolyt. (C) Kalibrační závislost pro 5-HT, naměřené na O-BDD v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ PB o pH 7,0. Chybové úsečky jsou směrodatné odchylky ze 4 měření.

Tab. 13 Vypočítané hodnoty LOD a LOQ pro DA a 5-HT.

Analyt	Elektroda	Nejnižší naměřená <i>c</i> ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Postup A		Postup B	
			LOD ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
DA	p-BDD	0,25	0,05	0,16	0,06	0,21
	O-BDD	0,50	0,08	0,25	0,32	1,05
5-HT	p-BDD	0,25	0,07	0,22	0,28	0,93
	O-BDD	0,25	0,03	0,09	1,02	3,41

LOD a LOQ byly vypočítány dvěma způsoby, a to ze směrodatné odchylky (SD) desetinasobného měření nejnižší koncentrace (postup A) a z SD úseku příslušné kalibrační závislosti (postup B) (viz Experimentální část, kapitola 2.3.5). V případě postupu A byly vypočítány nereálně nízké LOD a LOQ, díky vysoké opakovatelnosti výšky píku pro nejnižší prakticky měřitelnou koncentrací (**Tab. 13**). Postup B více odpovídá realitě, hodnoty LOQ vypočítané tímto postupem jsou lehce vyšší než nejnižší naměřená koncentrace. V postupu B hodnota SD úseku je ovlivněná opakovatelností všech naměřených bodů, která se mírně zhoršuje při měření vyšších koncentrací.

Hodnoty LOD a LOQ pro DA a 5-HT vypočítané v této diplomové práci a shrnuté v **Tab. 13** jsou srovnatelné a v některých případech i menší než hodnoty uvedené v jiných studiích (**Tab. 2**, **Tab. 3**). Z tohoto plyne, že pro detekce DA a 5-HT jsou vhodné obě použité BDD elektrody, jak O-BDD tak i p-BDD, avšak p-BDD poskytuje lepší analytické parametry (nižší šum a tedy i nižší LOD a LOQ, širší LDR, vyšší citlivost).

4. Závěr

Tato práce se zabývala studiem elektrochemického chování dvou neurotransmiterů, DA a 5-HT, na BDD elektrodě s různou terminací povrchu v komplexních růstových mediích, konkrétně NB a NB s fenolovou červení, a v 0,1 mol l⁻¹ PB o pH 7,0 s využitím voltametrických technik.

Při studiu šířky potenciálových oken fyziologických médií na O-BDD a p-BDD bylo zjištěno, že v případě PB je šířka okna v anodické oblasti limitována rozkladem vody při vysokém kladném potenciálu, +1700 mV na O-BDD a +1500 mV na p-BDD. U NB jsou pracovní okna v anodické oblasti užší, vzhledem k pravděpodobné elektrochemické oxidaci elektroaktivních složek NB (především HEPES, ale zřejmě i aminokyselin tryptofanu, tyrosinu, cysteinu, histidinu, methioninu a vitaminů B6 a B12). Na O-BDD jsou potenciálová okna ve všech třech médiích širší v porovnání s p-BDD elektrodou. Oba Neurobasaly se chovají obdobně, přítomnost fenolové červení nemá vliv na šířku jejich potenciálových oken v anodické oblasti.

Elektrochemické chování DA a 5-HT ve všech třech médiích bylo zkoumáno pomocí cyklické voltametrie. Bylo zjištěno, že dopamin se na O-BDD a p-BDD elektrodě oxiduje kvazireverzibilně, protože DA poskytuje jeden anodický pík a při reverzním skenu jeden katodický pík ve zkoumaném rozsahu potenciálů. Serotonin poskytuje jenom jeden anodický pík a žádný pík při reverzním skenu na obou výše zmíněných površích, což indikuje ireverzibilní proces oxidace. Pro obě elektrody, O-BDD a p-BDD platí, že v prostředí obou NB je oxidační potenciál DA vyšší v porovnání s jejich oxidačním potenciálem v prostředí 0,1 mol l⁻¹ PB o pH 7,0. V případě 5-HT nebyly takové rozdíly pro jednotlivá média zaznamenány. Pouze na p-BDD elektrodě v prostředí 0,1 mol l⁻¹ PB o pH 7,0 byl zjištěn mírně pozitivnější potenciál. Přenos elektronů při oxidaci serotoninu je tedy méně ovlivňován stavem povrchu BDD i interakcí se složkami NB.

Po proměření roztoků DA a 5-HT při různých rychlostech polarizace povrchu elektrody a zpracování příslušných závislostí bylo zjištěno, že v případě obou neurotransmiterů je jejich anodická oxidace na povrchu O-BDD a p-BDD elektrody řízena difuzí.

Při opakovaných měřeních s každým dalším skenem docházelo ke kontinuálnímu poklesu výšek naměřených signálů DA a 5-HT v důsledku tvorby oxidačních meziproduktů, které se adsorbují na elektrodový povrch. V případě DA jsou opakovatelné

výšky DPV signálů v prostředí PB o pH 7,0 a obou NB dosažitelné při použití anodické aktivace mezi jednotlivými skeny ($E_{akt} +2400$ mV, $t = 30$ s, míchání). Bylo zjištěno, že v případě 5-HT v prostředí obou NB anodická aktivace není vhodným způsobem pro omezení pasivace elektrodového povrchu, ačkoli je snadno použitelná v prostředí PB. Při změně terminace povrchu z O-BDD na p-BDD, byl pozorován nárůst velikostí proudů píků obou neurotransmiterů ve všech zkoumaných médiích, ale zároveň došlo i k mírnému zhoršení opakovatelnosti měřených signálů.

Taktéž byla ověřena možnost současné detekce DA a 5-HT ve směsi pomocí p-BDD a O-BDD elektrody. Hodnoty potenciálů DA a 5-HT jsou značně blízké a spolehlivě odlišit oxidační píky DA a 5-HT se tak na žádném ze zkoumaných elektrodových povrchů při obou testovaných koncentracích ($c = 1,0 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹ a $c = 1,0 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹) nepodařilo.

Oba neurotransmitery vykazují lineární kalibrační závislost v rozsahu koncentrací $2,5 \cdot 10^{-7}$ - 10^{-4} mol l⁻¹ na p-BDD a O-BDD. Metodou DPV byly zjištěny hodnoty mezí detekce a mezí stanovitelnosti pro DA a 5-HT a bylo odhaleno, že pro stanovení DA a 5-HT jsou vhodné obě použité BDD elektrody, jak O-BDD tak i p-BDD, avšak p-BDD poskytuje lepší analytické parametry: nižší šum a tedy i nižší LOD a LOQ, širší LDR, a vyšší citlivost.

Závěrem lze shrnout, že elektrochemické chování obou zkoumaných neurotransmiterů výrazně závisí jak od typu povrchu BDD elektrody, tak i od složení prostředí, ve kterém se nachází, což by mělo být pečlivě zváženo při konstrukci senzorů či různých aplikacích v neurovědách.

5. Seznam použité literatury

1. *PubChem* [online]. [cit. 27.08.2020]. Dostupné z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dopamine>; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Serotonin>
2. Michalkiewicz, S.; Skorupa, A., Anodic oxidation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid on carbon electrodes in acetic acid solutions. *Bioelectrochemistry* 79 (2010), 57-65. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2009.11.002
3. Gh, Bagheri, A., Thermodynamic studies on complexation of dopamine with gadolinium(III) in water-ethanol system. *J. Mol. Liq.* 156 (2010), 141-145. DOI: 10.1016/j.molliq.2010.07.002
4. Pratuangdejkul, J.; Nosoongnoen, W.; Guérin, G-A.; Loric, S.; Conti, M.; Launay, J-M.; Manivet, P., Conformational dependence of serotonin theoretical pKa prediction. *Chem. Phys. Lett.* 420 (2006), 538-544. DOI: 10.1016/j.cplett.2006.01.035
5. Jackowska, K.; Krysinski, P., New trends in the electrochemical sensing of dopamine. *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013), 3753–3771. DOI: 10.1007/s00216-012-6578-2
6. Bohlen und Halbach von, O.; Rolf Dermietzel, R.: *Neurotransmitters and Neuromodulators: Handbook of Receptors and Biological Effects*, Second edition, Wiley-VCH, 2006.
7. Koolman, J.; Röhm, K.-H., *Barevný atlas biochemie*. Fourth edition, Grada Publishing: Praha, 2012.
8. Deepa, S.; Swamy, B. E. K.; Pai, V. K., Electrochemical sensing performance of citicoline sodium modified carbon paste electrode for determination of dopamine and serotonin. *Mater. Sci. Technol.* 3 (2020), 584-592. DOI: 10.1016/j.mset.2020.06.001
9. Ayano, G., Dopamine: receptors, functions, synthesis, pathways, locations and mental disorders: review of literatures. *J. Ment. Disord. Treat.* 2 (2016), 120-124. DOI: 10.4172/2471-271X.1000120
10. Rattanart, P.; Dungchai, W.; Siangproh, W.; Chailapakul O., Sodium dodecyl sulfate modified electrochemical paper-based analytical device for determination of dopamine levels in biological samples. *Anal. Chem. Acta.* 744 (2012), 1-7. DOI: 10.1016/j.aca.2012.07.003

11. Steckl, A.J.; Ray, P., Stress biomarkers in biological fluids and their point-of-use detection. *ACS Sens.* **26** (2018), 2025-2044. DOI: 10.1021/acssensors.8b00726
12. Vatrál, J.; Boča, R.; Linert, W., Oxidation properties of dopamine at and near physiological conditions. *Monatsh. Chem.* **146** (2015), 1799-1805. DOI 10.1007/s00706-015-1560-2
13. Hou, S.; Zheng, N.; Feng, H.; Li, X.; Yuan, Z., Determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using poly(3,5-dihydroxy benzoic acid) film modified electrode. *Anal. Biochem.* **381** (2008), 179-184. DOI: 10.1016/j.ab.2008.03.055
14. Yuan, D.; Yuan, X.; Zhou, S.; Zou, W.; Zhou, T., N-Doped carbon nanorods as ultrasensitive electrochemical sensors for the determination of dopamine. *RSC Adv.* **2** (2012), 8157-8163. DOI: 10.1039/C2RA21041J
15. Łuczak, T., Electrochemical oxidation of dopamine in the presence of secondary amine. An alternative way for quantitative dopamine determination at gold electrode. *Electroanalysis* **20** (2008), 1639-1646. DOI: 10.1002/elan.200804223
16. Jin, K. N.; Lu, S-S.; Cheng, S-H., A strategy for the determination of dopamine at a bare glassy carbon electrode: p-phenylenediamine as a nucleophile. *Electrochem. Commun.* **8** (2006), 1514-1520. DOI: 10.1016/j.elecom.2006.07.007
17. Bernsmann, F.; Ball, V.; Addiego, F.; Ponche, A.; Michel, M.; Joaquin de Almeida Gracio, J.; Toniazzi, V.; Ruch, D., Dopamine-melanin film deposition depends on the used oxidant and buffer solution. *Langmuir* **27** (2011), 2819-2825. DOI: 10.1021/la104981s
18. Chang H-Y.; Kim, I-D.; Park Y-C., Electrochemically degraded dopamine film for the determination of dopamine. *Electroanalysis* **16** (2006), 1578-1583. DOI: 10.1002/elan.200503536
19. Peltola, E.; Sainio, S.; Holt, B. K.; Palomaki, T.; Koskinen, J.; Laurila, T., Electrochemical fouling of dopamine and recovery of carbon electrodes. *Anal. Chem.* **90** (2018), 1408-1416. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04793
20. Jones, A. L.; Sun, W. E.; Martin, M. A.; Keating, J. D., The ever-changing roles of serotonin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **125** (2020), 105776. DOI: 10.1016/j.biocel.2020.105776
21. Brady, S.; Siegel, G.; Albers, R. W.; Price, D., *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology* (Ed.

Hensler, J. G.) Academic Press, **2012**; pp 300-322

22. Mawe, G. M.; Coates, M. D.; Moses, P.L., Review article: intestinal serotonin signalling in irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **8** (2006), 1067-1076. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2006.02858.x

23. *USFC Health* [online]. [cit 27.12.2020] Dostupné z <https://www.ucsfhealth.org/medical-tests/serotonin-blood-test>.

24. Sharma, S.; Singh, N.; Tomar, V.; Chandra, R., A review on electrochemical detection of serotonin based on surface modified electrodes. *Biosens. and Bioelectron.* **107** (2018), 76-93. DOI: 10.1016/j.bios.2018.02.013

25. Cernat, A.; Stefan, G.; Tertis, M.; Cristea, C.; Simon, I., An overview of the detection of serotonin and dopamine with graphene-based sensors, *Bioelectrochemistry* **16** (2020), 107620. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2020.107620

26. Henstridge, M. C.; Wildgoose, G. G.; Compton, G. R., Generator/collector experiments with a single electrode: introduction and application to exploring the oxidation mechanism of serotonin. *J. Phys. Chem. C.* **113** (2009), 14285-14289. DOI: 10.1021/jp904083e

27. Patel, A. N.; Unwin, P. R.; Macpherson, J. V., Investigation of film formation properties during electrochemical oxidation of serotonin (5-HT) at polycrystalline boron doped diamond. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15** (2013), 18085-18092. DOI: 10.1039/c3cp53513d

28. Dunham E. K.; Venton, B. J., Improving serotonin fast-scan cyclic voltammetry detection: new waveforms to reduce electrode fouling. *Analyst* **145** (2020), 7437-7446. DOI: 10.1039/D0AN01406K

29. Yoshitake, T.; Yoshitake, Sh.; Fujino, K.; Nohta, H.; Yamaguchi, M.; Kehr, J., High-sensitive liquid chromatographic method for determination of neuronal release of serotonin, noradrenaline and dopamine monitored by microdialysis in the rat prefrontal cortex, *J. Neurosci. Methods* **140** (2004), 163-168. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2004.04.041

30. Patel, A. B.; Arundell, M.; Parker, K. H.; Yeoman S. M.; O'Hare, D., Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. B* **818** (2005), 269-276. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.01.008

31. Yilmaz, C.; Taş, Gönçüoğlu, N.; Kocadğlı, T.; Gökmen, V., Determination of serotonin in nuts and nut containing products by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 272 (2019), 347-353. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.08.064
32. Arnold, E. L.; Ford, R., Determination of catechol-containing compounds in tissue samples by gas-liquid chromatography, *Anal. Chem.* 45 (1973), 85-89. DOI: 10.1021/ac60323a013
33. Musshoff, F.; Schmidt, P.; Dettmeyer, R.; Priemer, F.; Jachau, K.; Madea, B., Determination of dopamine and dopamine-derived (R)-/(S)-salsolinol and norsalsolinol in various human brain areas using solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 113 (2000), 359-366. DOI: 10.1016/S0379-0738(00)00225-5
34. Hu, Y.; Xu, W.; Li, J.; Li, L., Determination of 5-hydroxytryptamine in serum by electrochemiluminescence detection with the aid of capillary electrophoresis. *Luminescence* 27 (2012), 63-68. DOI: 10.1002/bio.1326
35. Kim, J.; Jeon, M.; Paeng, K-J.; Paeng, Rhee, I., Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of catecholamine, dopamine in serum. *Anal. Chim. Acta* 619, (2008), 87-93. DOI: 10.1016/j.aca.2008.02.042
36. Nichkova, M. I.; Huisman, H.; Wynveen, P. M.; Marc, D. T.; Olson, K. L.; Kellermann, G. H., Evaluation of a novel ELISA for serotonin: urinary serotonin as a potential biomarker for depression. *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012), 1593-1600. DOI: 10.1007/s00216-011-5583-1
37. Barnett, W. N.; Hindson, J. B.; Lewis, W. S., Determination of 5-hydroxytryptamine (serotonin) and related indoles by flow injection analysis with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta* 362 (1998), 131-139. DOI: 10.1016/S0003-2670(98)00058-0
38. Bezerra, S. V.; Luizde, J.; Filho, L.; Montenegro Conceicao, B. S. M.; Araújo, N., A.; Silva, V. L., Flow-injection amperometric determination of dopamine in pharmaceuticals using a polyphenol oxidase biosensor obtained from soursop pulp. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003), 1025-1031. DOI: 10.1016/S0731-7085(03)00412-6
39. Andén, N. E.; Magnusson, T., An improved method for the fluorimetric determination of 5-hydroxytryptamine in tissues. *Acta Physiol. Scand.* 69 (1967), 87-94. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1967.tb03493.x

40. Bonet San Emeterio, M.; Gonzalez Calabuig, A.; del Valle, M., Artificial neural networks for the resolution of dopamine and serotonin complex mixtures using a graphene-modified carbon electrode. *Electroanalysis* 31 (2019), 390-397. DOI: 10.1002/elan.201800525
41. Tyszczyk-Rotko, K.; Jaworska, I.; Jędruchiewicz, K., Application of unmodified boron-doped diamond electrode for determination of dopamine and paracetamol. *Microchem. J.* 146 (2019), 664-672. DOI: 10.1016/j.microc.2019.01.064
42. Sajid, M.; Nazal, M. K.; Mansha, M.; Alsharaa, A.; Jillani, S. M. S.; Basheer, C., Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid: a review. *Trends Analyt. Chem.* 76 (2016), 15-29. DOI: 10.1016/j.trac.2015.09.006
43. Khoshnevisana, K.; Honarvarfardc, E.; Torabid, F.; Malekif, H.; Baharifarg, H.; Faridbodf, F.; Larijanib, B.; Khorramizadeh, R. M., Electrochemical detection of serotonin: a new approach. *Clin. Chim. Acta* 501 (2020), 112-119. DOI: 10.1016/j.cca.2019.10.028
44. Zhang, Y.; Lei, W.; Xu, Y.; Xia, X.; Hao, Q., Simultaneous detection of dopamine and uric acid using a poly(L-lysine)/graphene oxide modified electrode. *Nanomaterials* 28 (2016), 178. DOI: 10.3390/nano6100178
45. Zhou, Y. L.; Tian, R. H.; Zhi, J. F., Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized on a boron-doped diamond electrode. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007), 822-828. DOI: 10.1016/j.bios.2006.03.001
46. Wei, M.; Guo, Sun, L.; Ying, Xie, Zh.; Fang, Zhii, J.; Fujishima, A.; Einaga, Y.; Gang, Fu, D.; Mei, Wang, X.; Ze Gu, Zh., Selective determination of dopamine on a boron-doped diamond electrode modified with gold nanoparticle/polyelectrolyte-coated polystyrene colloids. *Adv. Func. Mater.* 18 (2008), 1414-1428. DOI: 10.1002/adfm.200701099
47. Baluchová, S.; Daňhel, A.; Dejmková, H.; Ostatná, V.; Fojta, M.; Schwarzová-Pecková, K., Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules - A review. *Anal. Chim. Acta* 1077 (2019), 30-66. DOI: 10.1016/j.aca.2019.05.041
48. Baluchová, S.; Taylor, A.; Mortet, V.; Sedláková, S.; Klimša, L.; Kopeček, J.; Hák, O.; Schwarzová-Pecková, K., Porous boron doped diamond for dopamine

sensing: effect of boron doping level on morphology and electrochemical performance. *Electrochim. Acta* 327 (2019), 135025. DOI: 10.1016/j.electacta.2019.135025

49. Wei, M.; Zhuoying, X.; Sun, L.; Gu, Z-Z., Electrochemical properties of a boron-doped diamond electrode modified with gold/polyelectrolyte hollow spheres. *Electroanalysis* 21 (2009), 138-143. DOI: 10.1002/elan.200804411

50. Dincer, C.; Ktaich, R.; Laubender, E.; Hees, J. J.; Kieninger, J.; Christoph, E.; Nebel, E. Ch.; Jürgen Heinze, J.; Urban, A. G., Nanocrystalline boron-doped diamond nanoelectrode arrays for ultrasensitive dopamine detection. *Electrochim. Acta* 185 (2015), 101-106. DOI: 10.1016/j.electacta.2015.10.113

51. Li, Y.; Li, H.; Li, M.; Li, C.; Sun, D.; Yang, B., Porous boron-doped diamond electrode for detection of dopamine and pyridoxine in human serum. *Electrochim Acta* 258 (2017), 744-753. DOI: 10.1016/j.electacta.2017.11.121

52. May, P. W.; Clegg, M.; Silva, T. A.; Zanin, H.; Fatibello-Filho, O.; Celorrio, V.; Fermin, D. J.; Welch, C. C.; Fisher, L.; Nobbs, A.; Su, B., Diamond-coated 'black silicon' as a promising material for high-surface-area electrochemical electrodes and antibacterial surfaces. *J. Mater. Chem. B* 34 (2016), 5737-5746. DOI: 10.1039/C6TB01774F

53. Medeiros, R. A.; Matos, R.; Benchikh, A.; Saidani, B.; Debiemme-Chouvy, C.; Deslouis, C.; Rocha-Filho, R. C.; Fatibello-Filho, O., Amorphous carbon nitride as an alternative electrode material in electroanalysis: simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid. *Anal. Chim. Acta* 797 (2013), 30-39. DOI: 10.1016/j.aca.2013.08.018

54. Wei, M.; Terashima, C.; Lv, M.; Fujishima, A.; Gu, Z. Z., Boron-doped diamond nanograss array for electrochemical sensors. *Chem. Commun.* 24 (2009), 3624-3626. DOI: 10.1039/B903284C

55. Brycht, M.; Baluchová, S.; Taylor, A.; Mortet, V.; Sedláková, S.; Klimša, L.; Kopeček, J.; Schwarzová-Pecková, K., Comparison of electrochemical performance of various boron-doped diamond electrodes: Dopamine sensing in biomimicking media used for cell cultivation, *Bioelectrochemistry* 137 (2021), 107646. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2020.107646

56. Güell, G. A.; Meadows, K. E.; Patrick, R.; Unwin, P. R.; Macpherson, J. V., Trace voltametric detection of serotonin at carbon electrodes: comparison of glassy carbon, boron doped diamond and carbon nanotube network electrodes. *Phys. Chem.*

Chem. Phys. **12** (2010), 10108-10114. DOI: 10.1039/C0CP00675K

57. Sarada, B. V.; Tata, N. R.; Tryk, D. A.; Fujishima, A., Electrochemical oxidation of histamine and serotonin at highly boron-doped diamond electrodes. *Anal. Chem.* **72** (2000), 1632-1638. DOI: 10.1021/ac9908748

58. Nantaphol, S.; Channon, R. B.; Kondo, T.; Siangproh, W.; Orawon Chailapakul, O.; Henry, S. C., Boron doped diamond paste electrodes for microfluidic paper-based analytical devices. *Anal. Chem.* **89** (2017), 4100-4107. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b05042

59. Singh, Y. S.; Sawarynski, L. E.; Michael, H. M.; Ferrell, R. E.; Murphey-Corb, M. A.; Swain, G. M.; Patel, B. A.; Andrews, A. M., Boron-doped diamond microelectrodes reveal reduced serotonin uptake rates in lymphocytes from adult rhesus monkeys carrying the short allele of the 5-HTTLPR. *ACS Chem. Neurosci.* **1** (2010), 49-64. DOI: 10.1021/cn900012y

60. Musilová, J.; Barek, J.; Pecková, K., Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek. *Chem. List.* **103** (2009), 469-478.

61. Pecková, K.; Musilová, J.; Barek, J., Boron-doped diamond film electrodes-new tool for voltametric determination of organic substances. *Anal. Chem.* **39** (2009), 148-172. DOI: 10.1080/10408340903011812

62. Pleskov, Yu. V., Electrochemistry of diamond: a review. *Rus. J. Electrochem.* **38** (2002), 1275-1291.

63. McCreery, R. L., Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. *Chem. Rev.* **108** (2008), 2646-2687. DOI: 10.1021/cr068076m

64. Einaga, Y., Diamond electrodes for electrochemical analysis. *J. Appl. Electrochem.* **40** (2010), 1807-1816. DOI: 10.1007/s10800-010-0112-z

65. Uslu, B.; Ozkan, S. A., Electroanalytical application of carbon-based electrodes to the pharmaceuticals. *Anal. Lett.* **40** (2007), 817-853. DOI: 10.1080/00032710701242121

66. Rao, T. N.; Fujishima, A., Recent advances in electrochemistry of diamond. *Diam. Relat. Mater.* **9** (2000), 384-389. DOI: 10.1016/S0925-9635(99)00234

67. Szunerits, S.; Boukherroub, R., Different strategies for functionalization of diamond surfaces. *J. Solid State Electrochem.* **12** (2008), 1205-1218. DOI:

10.1007/s10008-007-0473-3

68. Liu, F. B.; Wang, J. D.; Liu, B.; Li, X. M.; Chen, D. R., Effect of electronic structures on electrochemical behaviors of surface-terminated boron-doped diamond film electrodes. *Diam. Relat. Mater.* **16** (2007), 454-460. DOI: 10.1016/j.diamond.2006.08.016

69. Girard, H. A.; Simon, N.; Ballutaud, D.; de La Rochefoucauld, E.; Etcheberry, A., Effects of controlled anodic treatments on electrochemical behavior of boron doped diamond. *Diam. Relat. Mater.* **16** (2007), 888-891. DOI: 10.1016/j.diamond.2006.12.002

70. Macpherson, J. V., A practical guide to using boron doped diamond in electrochemical research. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17** (2015), 2935-2949. DOI: 10.1039/C4CP04022H

71. Zavázalová, J.; Barek, J.; Pecková, K.: Boron doped diamond electrodes in voltammetry: new designs and applications (an overview). In *Sensing in Electroanalysis*, Kalcher, K.; Metelka, R.; Švancara, I.; Vytřas, K., Eds. University Press Centre, University of Pardubice: Pardubice 2013/2014, 2014; Vol. 8, pp 31-34

72. Hason, S.; Daňhel, A.; Schwarzová-Pecková, K.; Fojta, M.: Carbon Electrodes in Electrochemical Analysis of Biomolecules and Bioactive Substances: Roles of Surface Structures and Chemical Groups. In *Nanotechnology and Biosensors*. Nikolelis D. P. and Nikoleli G. P., Eds. Elsevier Science, Oxford, United Kingdom, 2018, pp. 51-111

73. Hutton, L. A.; Iacobini, J. G.; Bitziou, E.; Channon, R. B.; Newton, M. E.; Macpherson, J. V., Examination of the factors affecting the electrochemical performance of oxygen-terminated polycrystalline boron-doped diamond electrodes. *Anal Chem.* **85** (2013), 7230-7240. DOI: 10.1021/ac401042t

74. Granger, M. C.; Witek, M.; Xu, J. S.; Wang, J.; Hupert, M.; Hanks, A.; Koppang, M. D.; Butler, J. E.; Lucazeau, G.; Mermoux, M.; Strojek, J. W.; Swain, G. M., Standard electrochemical behavior of high-quality, boron-doped polycrystalline diamond thin-film electrodes. *Anal Chem.* **72** (2000), 3793-3804. DOI: 10.1021/ac0000675

75. Nistor, P. A.; May, P. W., Diamond thin films: giving biomedical applications a new shine. *J. R. Soc. Interface* **14** (2017), 20170382. DOI: 10.1098/rsif.2017.0382

76. Specht, C. G.; Williams, O. A.; Jackman, R. B.; Schoepfer, R., Ordered growth of neurons on diamond. *Biomaterials* 25 (2004), 4073-4078. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.11.006
77. May, P. W.; Regan, E. M.; Taylor, A.; Uney, J.; Dick, A. D.; McGeehan, J., Spatially controlling neuronal adhesion on CVD diamond. *Diam. Relat. Mater.* 23 (2012), 100-104. DOI: 10.1016/j.diamond.2012.01.023
78. Vaitkuvienė, A.; McDonald, M.; Vahidpour, F.; Noben, J. P.; Sanen, K.; Ameloot, M.; Ratautaite, V.; Kaseta, V.; Biziulevičienė, G.; Ramanavicienė, A.; Nesladek, M.; Ramanavicius, A., Impact of differently modified nanocrystalline diamond on the growth of neuroblastoma cells. *N. Biotechnol.* 32 (2015), 7-12. DOI: 10.1016/j.nbt.2014.06.008
79. Ferreira, C. M. H.; Pinto, I. S. S.; Soares, E. V.; Soares, H. M. V. M., (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions - a review. *RSC Adv.* 5 (2015), 30989-31003. DOI: 10.1039/C4RA15453C
80. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit 16.11.2020]. Dostupné z Sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/p3532?lang=en®ion=CZ
81. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit 16.11.2020]. Dostupné z Sigmaaldrich.com/cataog/substances/hepesbuffersaline
82. Xie, Ch.; Markesbery, W., R.; Lovell, M., A., Survival of hippocampal and cortical neurons in a mixture of MEM+ and B27-supplemented neurobasal medium. *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000), 665-672. DOI: 10.1016/S0891-5849(99)00268-3
83. *Thermo Fischer Scientific* [online]. [cit 7.12.2020]. Dostupné z <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12348017#/12348017>
84. *Thermo Fischer Scientific* [online]. [cit 7.12.2020]. Dostupné z <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21103049?SID=srch-srp-21103049#/21103049?SID=srch-srp-21103049>
85. Shah, A.; Shah, A. H.; Parveen, N.; Rehman, Z.; Khan, Sh. Z.; Rana, U., A.; Khan, S. U.; Nisar, J.; Lashin, A.; Qureshi, R., Synthesis and electrochemical investigations of piperazines. *Electrochim. Acta* 220 (2016), 705-711. DOI: 10.1016/j.electacta.2016.10.165
86. Cuculić, V.; Mlakar, M.; Branica, M., Influence of the HEPES buffer on

electrochemical reaction of the copper(II)-salicylaldoxime complex. *Electroanalysis* 10 (1998), 852-856. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4109(199809)10:12<852::AID-ELAN852>3.0.CO;2-O

87. Duo, I.; Levy-Clement, C.; Fujishima, A., Electron transfer kinetics on boron-doped diamond part I: influence of anodic treatment. *J. Appl. Electrochem.* 34 (2004), 935–943. DOI: 10.1023/B:JACH.0000040525.76264.16

88. Chaplin, B. P.; Hubler, D. K.; Farrell, J., Understanding anodic wear at boron doped diamond film electrodes. *Electrochim. Acta* 89 (2013), 122-131. DOI: 10.1016/j.electacta.2012.10.16