

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Marta Blašková

Využití jednoduchého elektrochemického DNA biosenzoru při stanovení environmentálních polutantů a vyšetřování jejich interakce s DNA

The Use of a Simple Electrochemical DNA Biosensor for the Determination of Environmental Pollutants and Investigation of Their Interaction with DNA

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2014

Tato diplomová práce vznikla na základě výzkumu vedeného v rámci Univerzitního výzkumného centra „Supramolekulární chemie“ (projekt UNCE 204018/304018/2012). Tento výzkum byl finančně podpořen Grantovou agenturou České republiky (projekt GP13-23337P) a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze (projekt GAUK 430214/2014/B-CH/PřF).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou 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 v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, dne 14. května 2014

Poděkování

Na úvod bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za odborné vedení a milou spolupráci. Dále děkuji rodičům, kteří mi studium na vysoké škole umožnili.

Abstrakt

Pomocí elektrochemického DNA biosenzoru na bázi elektrody ze skelného uhlíku (GCE) a nízkomolekulární DNA z lososích spermií (DNA/GCE) byla vyšetřována interakce DNA se třemi zástupci environmentálních polutantů – naftalenu, anthracenu a 2-aminoanthracenu. Interakce s DNA byly sledovány pomocí square wave voltametrie (SWV) a elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS). U naftalenu nebyla pozorována interakce poškozující DNA, v případě anthracenu byl pozorován vznik interkalačního komplexu [DNA–anthracen], jehož tvorba však nezpůsobuje vznik zlomů vláken DNA. Vznik podobného interkalačního komplexu byl pozorován i u 2-aminoanthracenu [DNA–2-aminoanthracen], u kterého se na základě získaných výsledků předpokládá, že interkalace 2-aminoanthracenu do dvoušroubovice DNA vyvolává pnutí a následný vznik jednořetězcových zlomů, které způsobují, že fragmenty DNA odpadávají z povrchu elektrody.

Interkalační interakce DNA s anthracenem a 2-aminoanthracenem byla využita pro vývoj elektrochemických metod pro stanovení těchto látek na GCE a DNA/GCE. Při vývoji metod byly použity DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV). Pro stanovení anthracenu byla vyvinuta DPV metoda využívající prostředí ethanol/Brittonův-Robinsonův (BR) pufr o pH 5,0 (1:1). Mez stanovitelnosti metody (L_Q) na GCE byla 2,2 $\mu\text{mol/L}$. Pomocí DNA/GCE se podařilo zvýšit citlivost metody a snížit L_Q na 0,15 $\mu\text{mol/L}$. Optimální prostředí pro stanovení 2-aminoanthracenu bylo ethanol/BR pufr o pH 7,0 (1:9). L_Q pro DPV stanovení 2-aminoanthracenu činily 0,30 $\mu\text{mol/L}$ na GCE a 0,28 $\mu\text{mol/L}$ GCE/DNA. Aplikovatelnost nově vyvinutých metod pro stanovení anthracenu a 2-aminoanthracenu na DNA/GCE byly úspěšně ověřeny na modelových vzorcích šterku a písku.

Klíčová slova

Elektrochemický DNA biosenzor
Elektroda ze skelného uhlíku
Nízkomolekulární DNA
Detekce poškození DNA
Stanovení environmentálních polutantů
Polycyklické aromatické uhlovodíky
Voltametrie
Elektrochemická impedanční spektroskopie

Abstract

The interaction between three selected representatives of environmental pollutants – naphthalene, anthracene, and 2-aminoanthracene – and DNA was investigated using an electrochemical DNA biosensor based on a glassy carbon electrode (GCE) and low molecular weight DNA from salmon sperm (DNA/GCE). The interactions with DNA were monitored using square wave voltammetry (SWV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). For naphthalene, there was no DNA damaging interaction observed. In the case of anthracene, the formation of an intercalation complex [DNA–anthracene] was observed. However, its formation does not cause DNA strand breaks. The formation of similar intercalation complex was observed for 2-aminoanthracene [DNA–2-aminoanthracene], where we suppose on the basis of the results obtained that the intercalation of 2-aminoanthracene into the DNA double helix induces a tension and subsequent formation of single-strand breaks, which cause that the fragments of DNA fall away from the electrode surface.

The intercalative interaction of DNA with anthracene a 2-aminoanthracene was used in the development of electrochemical methods for determination of these compounds at the GCE and DNA/GCE. At the development of the methods, DC voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV) were used. For the determination of anthracene, the DPV method was developed in a medium of ethanol/Britton-Robinson (BR) buffer of pH 5.0 (1:1). The limit of quantification (L_Q) at the GCE was 2.2 $\mu\text{mol/L}$. Using the DNA/GCE, the sensitivity of this method was increased and its L_Q was decreased to 0.15 $\mu\text{mol/L}$. The optimal medium for the determination of 2-aminoanthracene was ethanol/BR buffer of pH 7.0 (1:9). The L_Q s for the DPV determination of 2-aminoanthracene were 0.30 and 0.28 $\mu\text{mol/L}$ at the GCE and GCE/DNA, respectively. The applicability of the newly developed methods for the determination of anthracene and 2-aminoanthracene at the DNA/GCE was successfully verified on model samples of gravel and sand.

Key Words

Electrochemical DNA biosensor

Glassy carbon electrode

Low molecular weight DNA

DNA damage detection

Determination of environmental pollutants

Polycyclic aromatic hydrocarbons

Voltammetry

Electrochemical impedance spectroscopy

Seznam použitých zkratk a symbolů

2-AA	2-aminoanthracen
APAH	aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků
c	molární koncentrace (mol/L)
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
DCV	DC voltametrie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA/GCE	deoxyribonukleovou kyselinou modifikovaná elektroda ze skelného uhlíku
DPV	diferenční pulzní voltametrie
E	elektrický potenciál (V)
E_p	elektrický potenciál píku, poloha píku (V)
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
I	elektrický proud (A)
$I_{p,A}$	elektrický proud píku, výška píku adenosinu (A)
$I_{p,G}$	elektrický proud píku, výška píku guanosinu (A)
L_Q	mez stanovitelnosti (mol/L)
n	počet měření
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PBS	fosfátový pufr
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontu
R_{CT}	odpor přenosu náboje (Ω)
R	korelační koeficient
SWV	square-wave voltametrie
Z'	reálná složka impedance (Ω)
Z''	imaginární složka impedance (Ω)

Obsah

1. Úvod.....	8
1.1. Cíle práce.....	8
1.2. Polycyklické aromatické uhlovodíky a jejich deriváty.....	8
1.3. DNA a biosenzory.....	9
1.4. Použité elektrochemické techniky.....	11
2. Experimentální část.....	14
2.1. Reagencie.....	14
2.2. Aparatura.....	15
2.3. Pracovní postupy.....	15
2.4. Práce s DNA.....	16
2.5. Modelové vzorky.....	17
3. Výsledky a diskuze.....	18
3.1. Vyšetřování interakce s DNA.....	18
3.2. Stanovení anthracenu.....	26
3.2.1. Zjištění optimálního pH.....	26
3.2.2. Opakovatelnost měření.....	30
3.2.3. Kalibrační závislosti.....	33
3.2.4. Modelové vzorky.....	38
3.3. Stanovení 2-aminoanthracenu.....	39
3.3.1. Zjištění optimálního pH.....	39
3.3.2. Opakovatelnost měření.....	43
3.3.3. Kalibrační závislosti.....	44
3.3.4. Modelové vzorky.....	48
4. Závěr.....	49
5. Literatura.....	51

1. Úvod

1.1 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo využít jednoduchý biosenzor na bázi elektrody ze skelného uhlíku a nízkomolekulární DNA z lososích spermií při vyšetřování interakce vybraných environmentálních polutantů (naftalenu, anthracenu a 2-aminoanthracenu) s DNA. Tento biosenzor představuje rychlou a levnou cestu jak získat informace o poškození DNA, případně o interakci DNA s nejrůznějšími látkami zatěžujícími životní prostředí.

Dalším cílem této práce bylo vyvinout citlivé elektroanalytické metody pro stanovení anthracenu a 2-aminoanthracenu jako alternativní možnosti stanovení těchto látek k rutinně používaným separačním metodám. Při vývoji těchto metod bylo využito akumulace stanovovaných látek do struktury DNA ke zvýšení citlivosti jejich stanovení. Praktická použitelnost vyvinutých metod pak byla ověřena na modelových vzorcích s reálnou matricí.

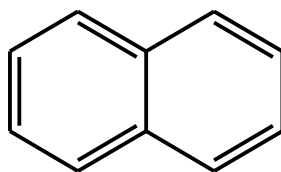
1.2 Polycyklické aromatické uhlovodíky a jejich deriváty

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) jsou látky charakteristické přítomností nejméně dvou kondenzovaných benzenových jader. Na množství benzenových jader závisí jejich fyzikální a chemické vlastnosti. S rostoucím počtem jader, tedy s rostoucí molekulovou hmotností, klesá rozpustnost ve vodě a roste jejich lipofilita. Mnoho látek ze skupiny PAHů je podezřelých z karcinogenity, genotoxicity a teratogenity.⁽¹⁻⁷⁾

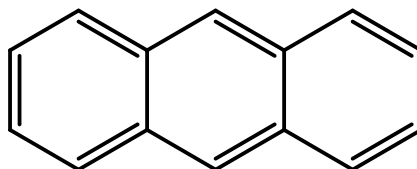
V současné době jsou PAHy a jejich deriváty běžnou součástí ovzduší, jsou produkovány převážně při spalování organických materiálů. K expozici člověka může dojít jak vdechováním, požitím, tak i lokální absorpcí. V lidském těle jsou potom tyto látky metabolizovány a vytvořené metabolity mohou interagovat s biomolekulami, např. s DNA. Tímto způsobem mohou v lidském těle vyvolat mutagenní bujení.⁽¹⁻⁷⁾

V dnešní době je snaha o regulaci množství těchto karcinogenů v životním prostředí a v potravinách. Nejpoužívanější techniky pro stanovení PAHů a jejich identifikaci jsou plynová chromatografie (GC)^(3,8-10) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV-VIS a fluorescenční detekcí.⁽¹¹⁻¹³⁾

V této práci bylo pracováno se dvěma zástupci polycyklických aromatických uhlovodíků – naftalenem a anthracenem – a s aminoderivátem anthracenu – 2-aminoanthracenem. Naftalen (obr. 1) i anthracen (obr. 2) jsou bílé krystalické látky, velmi málo rozpustné ve vodě. Naftalen se používá při výrobě plastických hmot, pryskyřic, pohonných hmot a barviv. V minulosti se používal také jako insekticid.⁽¹⁴⁾

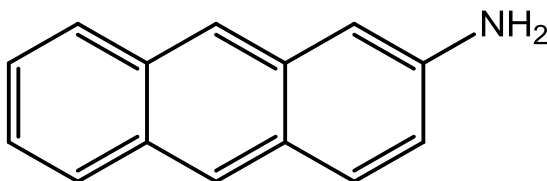


Obr. 1. Strukturální vzorec naftalenu



Obr. 2. Strukturální vzorec anthracenu

2-Aminoanthracen (obr. 3) patří mezi aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků (APAH). Jedná se o žlutý prášek, málo rozpustný ve vodě. Vzniká metabolizací nitroanthracenu v ovzduší nebo v živých organismech.⁽¹⁵⁾



Obr. 3. Strukturální vzorec 2-aminoanthracenu

1.3 DNA a biosenzory

Hlavní role DNA v buňkách je udržet a správně vyjádřit genetickou informaci. Poškození DNA v buňce vlivem působení řady chemických, ale i fyzikálních vlivů má často za následek mutace ve struktuře molekuly DNA, které mohou následně vést k rozvoji rakovinného bujení. Je proto důležité, aby analytické metody byly schopné rychlé a citlivé detekce jak poškození DNA, tak i látek, které interakcí s DNA toto poškození způsobují. V minulosti byla interakce DNA s nejrůznějšími typy látek studována pomocí mnoha metod, jako je gelová elektroforéza⁽¹⁶⁻¹⁸⁾, fluorescence, NMR^(19,20), UV-VIS spektroskopie a v neposlední řadě elektrochemie⁽²¹⁻²⁶⁾. Elektrochemické metody nabízí velmi dobrou alternativu ke všem uvedeným technikám díky vysoké citlivosti, nízkým pořizovacím

nákladům a jednoduchosti. V oblasti elektrochemických metod našly své uplatnění také DNA biosenzory.⁽²⁷⁻²⁹⁾

Biosenzor obecně je analytický nástroj, sestávající se z bioreceptoru a fyzikálně-chemického převodníku. Přítomnost analytu vyvolává měřitelný signál. Výška tohoto signálu je úměrná koncentraci analytu. Jako bioreceptor mohou být použity nejrůznější enzymy, buňky, tkáně nebo protilátky a nukleové kyseliny. Fyzikálně-chemický převodník bývá nejčastěji elektrochemický systém, použité ale mohou být i optické systémy. Elektrochemické převodníky mají výhody v konstrukční jednoduchosti, dobré citlivosti a nízkých finančních nákladech na pořízení.^(29,30)

Pro konstrukci DNA biosenzorů se používá nejrůznějších elektrodových materiálů, které umožňují pozorování jak redukci, tak i oxidaci bází v molekule DNA. Pro pozorování redukčních dějů se používají hlavně rtuťové elektrody. Za použití rtuťové elektrody také došlo k vlastnímu objevu elektrochemické aktivity DNA Emilem Palečkem. Oxidační odezvy nukleových kyselin se pozorují převážně na pevných elektrodách, mohou se používat ušlechtilé kovy jako zlato a platina⁽³¹⁾, nebo kovové (či uhlíkové) sítotiskové elektrody (SPE)^(29,32,33). Velmi často se užívají také uhlíkové materiály, ať už uhlíková pastová elektroda (CPE), elektroda ze skelného uhlíku (GCE) nebo grafitová tužková elektroda (PGE). Výhoda uhlíkových materiálů spočívá v širokém potenciálovém okně a snadno obnovitelném povrchu.^(34,35)

Povrch uhlíkových elektrod se také ve spojitosti s biosenzory často modifikuje nejrůznějšími způsoby, např. za účelem urychlení elektrodového děje či usnadnění přístupu látky k povrchu elektrody, a tím zvýšení citlivosti stanovení.⁽²⁹⁾ K tomuto účelu se užívá polymerních filmů⁽³⁶⁾ nebo nejrůznějších druhů nanomateriálů,⁽³⁷⁾ např. uhlíkových nanotrubiček⁽³⁸⁻⁴⁰⁾ nebo zlatých nanočástic.⁽⁴¹⁾

Od objevu elektrochemické aktivity nukleových kyselin Emilem Palečkem na konci roku 1950 bylo v oboru DNA biosenzorů dosaženo obrovských pokroků. Vyhodnocením interakcí nejrůznějších látek s DNA pomocí biosenzorů můžeme odhalit zdravotní rizika těchto chemických látek a získat informace o mechanismu interakce s molekulou DNA. Takto mohou biosenzory na bázi DNA posloužit k predikci poškození DNA a následně k vyšetřování vzniku nežádoucích toxických, karcinogenních a mutagenních účinků způsobených látkami z řad polutantů životního prostředí. Jednou z hlavních možných aplikací elektrochemických DNA biosenzorů je tedy testování vody, potravin, půdy a rostlinných vzorků.^(27,28)

Poškození DNA je v elektrochemii pozorováno díky změně výšky dnes už převážně oxidačních píků nukleotidů purinových bází DNA – guanosinu a adenosinu. Na uhlíkové elektrodě můžeme tyto signály pozorovat při potenciálu (vůči argentchloridové elektrodě, 3 mol/L KCl) kolem 1,0 V pro guanosin a kolem potenciálu 1,2 V pro adenosin. Poškození DNA se může projevit například přerušením cukr-fosfátové kostry hydrolýzou *N*-glykosidické vazby v důsledku oxidačních reakcí. Poškození DNA způsobuje také oxidativní stres vyvolaný působením reaktivních forem kyslíku na organismus. Tak může docházet k oxidaci bází DNA, převážně k oxidaci guaninu za vzniku 8-oxoguaninu. Tento metabolický produkt je zodpovědný za špatné párování bází při replikaci, a tím může vyvolat vznik rakoviny.⁽⁴²⁻⁴⁵⁾ Lidské tělo by se mělo těmto reaktivním formám kyslíku umět bránit za pomoci působení antioxidantů. Najdeme mnoho elektrochemických prací zabývajících se vyšetřováním schopnosti různých antioxidantů ochránit molekulu DNA, a tím zabránit rozvoji nemocí.⁽⁴⁶⁻⁴⁹⁾

Dalším typem poškození DNA je interkalace cizorodé látky do dvoušroubovice DNA. Tam může způsobit pnutí vláken, které vede k rozštípnutí dvoušroubovice a vzniku jedno- nebo dvouřetězcových zlomů. Látka také může vytvořit komplex s DNA, a tím ovlivnit expresi genů.⁽⁴²⁻⁴⁵⁾

1.4 Použité elektrochemické techniky

Diferenční pulzní voltametrie (DPV)

Pulzní techniky patří v dnešní době mezi velmi populární. K jejich širokému rozšíření přispívá především schopnost eliminovat nabíjecí proud, a tím snížit limity detekce analytů oproti běžným voltametrickým a polarografickým technikám. Těmito technikami můžeme měřit i koncentrace v řádu 10^{-7} mol/L, a proto nacházejí uplatnění také v oblasti ochrany životního prostředí, díky možnosti stanovení různých organických sloučenin.

Při DPV je na pracovní elektrodu vkládán lineárně rostoucí potenciál s periodicky opakujícími se napěťovými pulzy o stejné amplitudě. Zaznamenává se rozdíl proudů měřených těsně před vložením a před koncem napěťového pulzu, kdy je příspěvek nabíjecího proudu prakticky už nulový. Výsledný voltamogram, tedy závislost proudu procházejícího pracovní elektrodou na vloženém potenciálu, se zobrazí jako voltametrický pík. Poloha tohoto píku nám dává informaci o kvalitě analytu, výška píku nám dává informaci o kvantitě analytu, kdy koncentrace analytu je přímo úměrná výšce píku.^(50,52)

DC voltametrie (DCV)

DCV je technika, při níž je na pracovní elektrodu vkládán potenciál lineárně se měnící s časem. Rychlost změny potenciálu je malá ve srovnání s ustavením rovnováhy v okolí elektrody, proto je tato technika považována za stacionární. Závislost proudu procházejícího pracovní elektrodou na vloženém potenciálu se opět zobrazí jako voltametrický pík, neboli v tomto případě lépe řečeno voltametrická vlna. Výška vlny je opět přímo úměrná koncentraci analytu a poloha píku vypovídá o identitě analytu.⁽⁵¹⁾

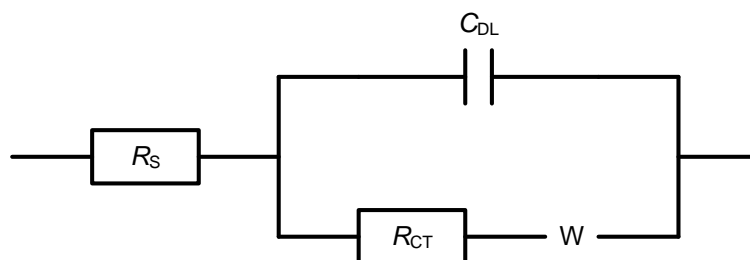
Square-wave voltametrie (SWV)

SWV patří podobně jako DPV mezi elektroanalytické techniky, které eliminují nabíjecí proud a díky tomu vykazují vyšší citlivost stanovení nejrůznějších analytů. Na pracovní elektrodu je vkládán lineárně rostoucí potenciál, který je modulovaný pravoúhlými pulsy o amplitudě 1 – 50 mV. Proudová odezva se měří vždy těsně před další změnou potenciálu. SWV má oproti DPV výhodu v možnosti pracovat při vysokých skenovacích rychlostech. Skenovací rychlost SWV může být až tisíckrát vyšší.

SWV je elektrochemická technika v dnešní chemii často používaná při zkoumání poškození DNA imobilizované na povrchu elektrody. Využívá se oxidačních píků guanosinu ($I_{p,G}$) a adenosinu ($I_{p,A}$). Pokles odezvy těchto píků svědčí o degradaci DNA. Ta může být způsobena rozevřením dvoušroubovice DNA v důsledku interkalace cizorodé látky mezi vlákna DNA, což může vést ke vzniku zlomů vláken DNA.^(50,52)

Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS)

Tato technika je užívána pro charakterizaci povrchu elektrody a jeho změn způsobených hybridizací nebo poškozením DNA. Impedanční spektra umožňují pozorovat vazbu nízkomolekulárních látek s vysokou afinitou k DNA. EIS umožňuje studovat kinetiku dějů na povrchu elektrody. Při měření EIS se nejčastěji jako simulace používá Randlesův obvod (obr. 4).



Obr. 4. Randlesův obvod; R_s – odpor roztoku elektrolytu, C_{DL} – kapacita elektrické dvojvrstvy, R_{CT} – odpor přenosu náboje, W – Warburgova impedance.

Výsledná data získáváme jako závislost Z'' (imaginární složka impedance závislá na frekvenci) a Z' (reálná složka impedance nezávislá na frekvenci). Tato závislost se nazývá Nyquistův graf. Má charakteristický půlkruhový tvar, kde oblast vysokých frekvencí půlkruhu charakterizuje faradaický transport elektronů k elektrodě a lineární oblast charakterizuje transport elektronů řízený difúzí.

Existují dva přístupy měření EIS. První možností je měření bez přítomnosti redoxního indikátoru, tento přístup je nazýván nefaradaický. Druhou možností je měření pomocí redoxního indikátoru, např. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, tedy faradaický. Měření se provádí při formálním potenciálu redoxního páru, například pro pár $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ je tento potenciál roven 0,2 V (vůči argentchloridové elektrodě, 3 mol/L KCl). Tento potenciál zajišťuje dosažení rovnováhy systému.

Přítomnost DNA na elektrodě se projeví zvětšením odporu přenosu náboje (R_{CT}) v důsledku elektrostatické repulze negativně nabitého $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ a negativně nabitě cukr-fosfátové kostry DNA. Molekula DNA pokryje povrch elektrody, a tím brání přístupu elektronů k povrchu elektrody. Naopak poškození DNA odpor přenosu náboje snižují. Při poškození DNA může dojít k rozevření dvoušroubovice a vzniku jednořetězcových zlomů, které z elektrody odpadávají, a tím znovu umožní snadnější přístup iontů k elektrodě.⁽⁵³⁻⁵⁵⁾

2. Experimentální část

2.1 Reagencie

Zásobní roztoky naftalenu (99 %), anthracenu (99 %) a 2-aminoanthracenu (96 %) (vše Sigma-Aldrich, ČR) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L byly připraveny rozpuštěním dané čisté látky ve 100 mL ethanolu (99 %, čistota p.a., Lach-Ner, ČR). Zásobní roztoky byly uchovávány při laboratorní teplotě ve tmě.

Roztok DNA (kat. č. 31149, Sigma-Aldrich, ČR) o koncentraci 1 mg/mL byl připraven rozpuštěním 1,0 g nízkomolekulární DNA v 10 ml fosfátového pufru o pH 7,0.

Fosfátový pufr o koncentraci 0,1 mol/L a pH 7,0 byl připraven rozpuštěním 35,8 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (čistota p.a., Lach-Ner, ČR) a 13,8 g monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného (čistota p.a., Lach-Ner, ČR) v deionizované vodě. Celkový objem roztoku byl 1,0 L.

Ekvimolární směs hexakynoželezitanu draselného (čistota p.a., Lach-Ner, ČR) a hexakynoželeznatanu draselného (čistota p.a., Lach-Ner, ČR) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L byl připraven ve 250 mL odměrné baňce rozpuštěním 0,0823 g $K_3[Fe(CN)_6]$ a 0,1062 g $K_4[Fe(CN)_6]$ ve fosfátovém pufru o pH 7,0.

Pro proměření pH závislostí byl připraven Brittonův-Robinsonův (BR) pufr. Pro přípravu kyselé složky bylo naváženo 2,74 g kyseliny trihydrogenborité (čistota p.a., Lach-Ner, ČR) a odměřeno 2,7 mL kyseliny trihydrogenfosforečné (85 %, čistota p.a., Lach-Ner, ČR) a 2,3 mL kyseliny octové (99 %, čistota p.a., Lach-Ner, ČR). Tyto chemikálie byly doplněny deionizovanou vodou do objemu 1,0 L. Výsledné pH kyselé složky bylo 1,7. Pro přípravu zásadité složky BR pufr bylo naváženo 8,0 g hydroxidu sodného (čistota p.a., Lach-Ner, ČR), který byl opět doplněn deionizovanou vodou na celkový objem 1,0 L. Výsledné pH zásadité složky BR pufru bylo 13,7.

2.2 Aparatura

Diferenční pulzní voltametrie (DPV), DC voltametrie (DCV), které byly použity pro zjištění pH závislosti a proměření kalibračních přímek analytu, square-wave voltametrie (SWV) a elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS), které sloužily k detekci poškození DNA, byly měřeny na přístroji Micro Autolab III/FRA 2 (Metrohm Autolab, Nizozemsko) se softwarem GPES (General Purpose Electrochemical System) a FRA (Frequency Response Analysis), oba verze 4.9. Systém GPES byl využíván pro měření technik DPV, DCV a SWV. Při měření EIS byl použit software FRA. Micro Autolab III/FRA 2 byl řízen stolním počítačem s operačním systémem Microsoft Windows XP Professional. Měření probíhala v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla elektroda ze skelného uhlíku (GCE), (Metrohm Autolab, Nizozemsko) s průměrem uhlíkového disku 3,0 mm. Argentschloridová elektroda (3 mol/L KCl, Monokrystaly, ČR) byla použita jako referentní a platinová elektroda (Monokrystaly, ČR) jako pomocná. Pro akumulaci DNA na povrch pracovní elektrody bylo užíváno přístroje Eco-Tribo Polarograph (Polaro-Sensors, ČR) se softwarem Polar Pro, verze 5.1. Výsledky byly zpracovány programem Microsoft Excel 2007.

2.3 Pracovní postupy

pH závislosti: Roztoky pro zjištění pH závislosti anthracenu a 2-aminoanthracenu byly připravovány v 10mL odměrných baňkách následujícím způsobem: do každé baňky byl automatickou pipetou napipetován 1 mL zásobního roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/L) a 4 mL ethanolu. Roztok byl po rysku doplněn BR puřrem o požadovaném pH, v rozmezí 2-13. V případě 2-aminoanthracenu byl do každé baňky odpipetován 1 mL zásobního roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/L) a doplněn BR puřrem po rysku. Roztoky byly řádně promíchány a převedeny do voltametrické nádoby. V případě anthracenu byla před měřením jednotlivých hodnot pH technikami DCV a DPV pracovní elektroda aktivována vložením potenciálu o hodnotě 1,8 V po dobu 60 s. Při měření pH závislosti 2-aminoanthracenu elektroda aktivována nebyla. Poté byly změřeny záznamy pomocí DCV a DPV. Všechna měření byla prováděna pětkrát, měření pro zjištění opakovatelnosti měření dvacetkrát. DCV i DPV byly měřeny s parametry: potenciálový krok 3 mV, scanovací rychlost 20 mV/s a modulační amplituda 50 mV.

Kalibrační závislost na GCE: Pro měření kalibrační závislosti anthracenu v koncentračním řádu 10^{-6} mol/L byla použita metoda standardních přídavek (spikování), kdy do 10 mL základního elektrolytu, složeného z 5 mL ethanolu a 5 mL BR pufru o pH 5,0 (pH zjištěno na základě předchozí optimalizace), bylo pomocí automatické pipety přidáváno odpovídající množství zásobního roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/L). Roztoky pro koncentrační řád 10^{-5} mol/L byly připraveny v 10 mL odměrných baňkách odpipetováním odpovídajícího množství zásobního roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/L), doplněním ethanolem do 5 mL a doplněním po rysku BR pufrům o pH 5,0. Všechny roztoky byly řádně promíchány a převedeny do elektrochemické cely. Před použitím obou technik a před každou měřenou koncentrací byl na elektrodu vložen aktivační potenciál o hodnotě 1,8 V po dobu 60 s. Poté byly změřeny DP a DC voltamogramy. Všechna měření byla prováděna pětkrát. DCV i DPV byly opět měřeny se stejnými parametry, tedy: potenciálový krok 3 mV, scanovací rychlost 20 mV/s a modulační amplituda 50 mV. V případě kalibrační závislosti 2-aminoanthracenu na GCE byly proměřovány řády 10^{-7} mol/L (přidavky zásobního roztoku 2-aminoanthracenu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) a 10^{-6} mol/L (přidavky zásobního roztoku 2-aminoanthracenu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L) do 10 mL základního elektrolytu složeného z 1 mL ethanolu a 9 mL BR pufru o pH 7,0 (pH zjištěno na základě předchozí optimalizace). Elektroda byla před každým měřením leštěna pomocí práškové aluminu.

2.4 Práce s DNA

Akumulace DNA: Akumulace DNA na povrch elektrody byla prováděna z 10 mL roztoku nízkomolekulární DNA ($c = 1$ mg/mL), na elektrodu byl po dobu 3 min vkládán potenciál 500 mV. Povrch elektrody byl obnovován otřením elektrody o aluminový prášek na plstěné podložce.

Square-wave voltametrie: SWV byla měřena v 10 mL fosfátového pufru na DNA modifikované elektrodě (DNA/GCE) s následujícími parametry: amplituda 40 mV, frekvence 200 Hz, polarizační rychlost 3 V/s, potenciálový krok 0,015 V.

Elektrochemická impedanční spektroskopie: EIS byla měřena v 10 mL ekvimolární směsi $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ při potenciálu odpovídajícímu formálnímu redoxnímu potenciálu tohoto indikátoru. Tento potenciál je 0,208 V. Měřeno v rozsahu frekvencí 0.1-5000 Hz, což odpovídá 51 bodům, potenciálová amplituda 10 mV.

Časová závislost inkubace DNA/GCE v roztoku anthracenu a 2-aminoanthracenu: Na elektrodu bylo naakumulována DNA, poté byl změřen DP voltamogram v 10 mL roztoku ethanol/BR pufr o pH 5,0 (v poměru 1:1) v případě anthracenu a v 10 mL roztoku ethanol/BR pufr o pH 7,0 (v poměru 1:9) pro 2-aminoanthracen. Tím došlo k zoxidování bází DNA. Elektroda byla poté přenesena do roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/L) v prostředí ethanol/BR pufr o pH 5,0 (v poměru 1:1) nebo do roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/L) v prostředí ethanol/BR pufr pH 7,0 (v poměru 1:9). V těchto roztocích probíhala inkubace po dobu 1, 2, 3, 5 a 7 min, poté byl v tomto roztoku zaznamenán DP voltamogram.

Koncentrační závislost na DNA/GCE: Kalibrační závislost koncentračního řádu 10^{-7} mol/L pro anthracen byla měřena metodou spikování, kdy do 10 mL základního elektrolytu, složeného z 5 mL ethanolu a 5 mL BR pufru o pH 5,0, bylo pomocí automatické pipety přidáváno odpovídající množství zásobního roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L). Koncentrační řád 10^{-6} mol/L byl měřen stejnou metodou, jen koncentrace použitého zásobního roztoku anthracenu byla $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L). Po každém přidavku byla provedena inkubace DNA/GCE v roztoku po dobu 5 min za stálého míchání. Poté byl zaznamenán DP voltamogram. Koncentrační závislost 2-aminoanthracenu na DNA/GCE byla provedena stejným způsobem. Základním elektrolytem v případě 2-aminoanthracenu byl roztok složen z 1 mL ethanolu a 9 mL BR pufru o pH 7,0.

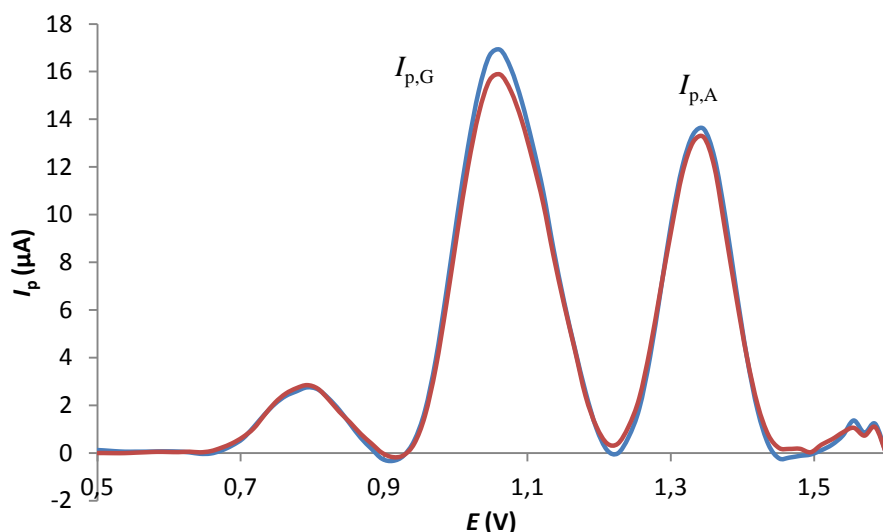
2.5 Modelové vzorky

3 g písku nebo šterku byly převedeny do extrakční nádoby. Pomocí automatické pipety bylo ke vzorku přidáno 30 μ L zásobního roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/L) nebo 30 μ L zásobního roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/L). Po odpaření ethanolu byly přidány ke vzorkům obsahujícím anthracen 3 mL hexanu jako extrakčního činidla. Vzorek byl protřepán a do voltametrické nádoby byl pomocí automatické pipety odebrán 1 mL extraktu. Po odpaření činidla byl extrakt anthracenu rozpuštěn v základním elektrolytu ethanol/BR pufr o pH 5,0 (v poměru 1:1). Po 5 min inkubaci v tomto roztoku byl změřen DP voltamogram na DNA/GCE. V případě 2-aminoanthracenu byl jako extrakční činidlo použit ethanol (3 mL). Po protřepání vzorku s extrakčním činidlem byl odebrán 1 mL extraktu a doplněn 9 mL BR pufru o pH 7,0. Po 5 min inkubaci v tomto roztoku byl změřen DP voltamogram na DNA/GCE.

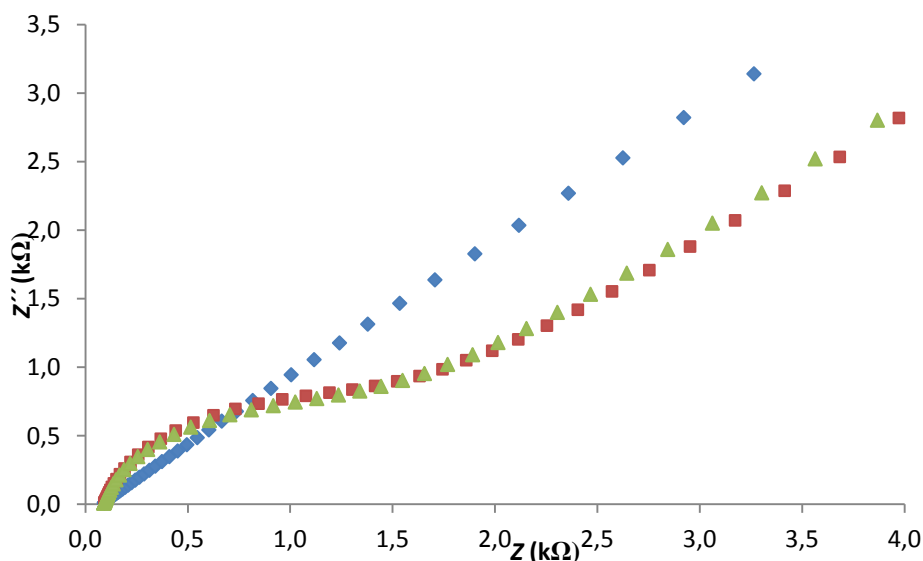
3. Výsledky a diskuze

3.1 Vyšetřování interakce s DNA

Byla vyšetřována interakce DNA se třemi zástupci z řad polycyklických aromatických uhlovodíků a jejich derivátů. Sledováním interakce DNA s naftalenem pomocí SW voltametrie (obr. 5) i EIS (obr. 6) můžeme pozorovat, že záznamy samotného DNA biosenzoru i po 5 min inkubaci DNA biosenzoru v roztoku naftalenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) ve směsi ethanol/PBS (v poměru 1:1) nevykazují žádné známky poškození DNA ani signál případně interkalovaného naftalenu. Na SWV nevidíme žádný významný pokles hodnot výšky píku guanosinu ($I_{p,G}$) ani adenosinu ($I_{p,A}$), který by značil odpadávání částí dvoušroubovice DNA z elektrody, a tím snižování počtu guanosinů a adenosinů přístupných oxidaci. Také záznam EIS, který poskytuje informace o povrchu elektrody, nasvědčuje, že povrch DNA biosenzoru po inkubaci v roztoku naftalenu zůstává stejně pokrytý (nedochází k poklesu odporu přenosu náboje R_{CT}), což opět naznačuje, že v molekule DNA nedochází vlivem interakce s naftalenem ke zlomům ve vláknech DNA, která by mohla odpadávat z elektrody. Při vzájemné interakci naftalenu s DNA tedy nedochází k poškození její struktury, nebo námi vybranými technikami není možné toto poškození pozorovat.

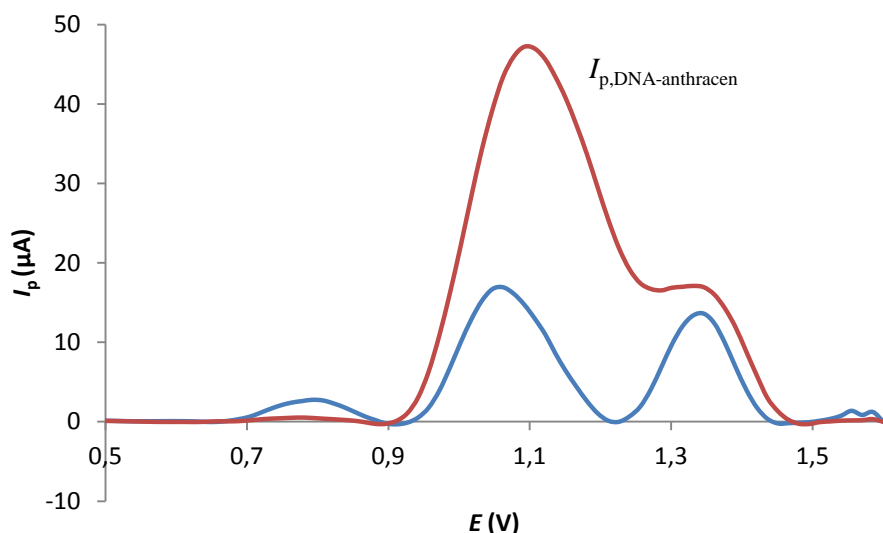


Obr. 5. SW voltamogramy měřeny v PBS ($c = 0,1$ mol/L, pH= 7,0) na DNA/GCE, po 5 min inkubaci v roztoku ethanol/PBS (v poměru 1:1) (modrá křivka), a na DNA/GCE, po 5 min inkubaci v roztoku naftalenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) v prostředí ethanol/PBS (v poměru 1:1) (červená křivka), voltamogramy jsou korigovány na základní linii.

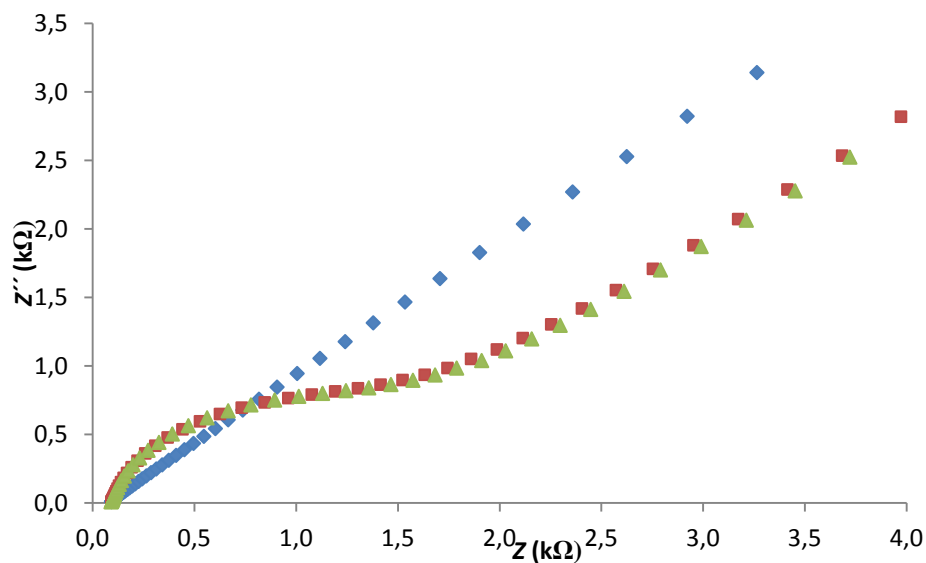


Obr. 6. Nyquistovy grafy měřené v roztoku redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ v PBS ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/L) na GCE (modrá křivka), na DNA/GCE, po 5 min inkubaci v roztoku ethanol/PBS (v poměru 1:1) (červená křivka), na DNA/GCE, po 5 min inkubaci v roztoku naftalenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) v prostředí ethanol/PBS (v poměru 1:1) (zelená křivka).

Při vyšetřování interakce DNA s anthracenem ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) ve směsi ethanol/PBS (v poměru 1:1) jsme při SW voltametii na DNA/GCE (obr. 7) pozorovali vznik komplexu [DNA–anthracen], který vzniká v důsledku interkalace anthracenu do dvoušroubovice DNA. Polohy tohoto komplexu a oxidačního píku guanosinu jsou ale shodné, což neumožňuje další vyšetřování poškození DNA. Na EIS (obr. 8) opět nevidíme pokles odporu přenosu náboje (R_{CT}), to ukazuje, že povrch elektrody se vlivem interkalace anthracenu do dvoušroubovice DNA neobnažil. Můžeme proto říct, že interakce DNA s anthracenem nevede ke vzniku jednořetězcových zlomů, které by odpadávaly z povrchu elektrody, a umožnily tak lepší přístupnost povrchu elektrody elektronům přeneseným z roztoku redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$. Zjištěná interkalace anthracenu do molekuly DNA byla využita při vývoji elektrochemické metody pro stanovení anthracenu na DNA/GCE (kapitola 3.2.3).



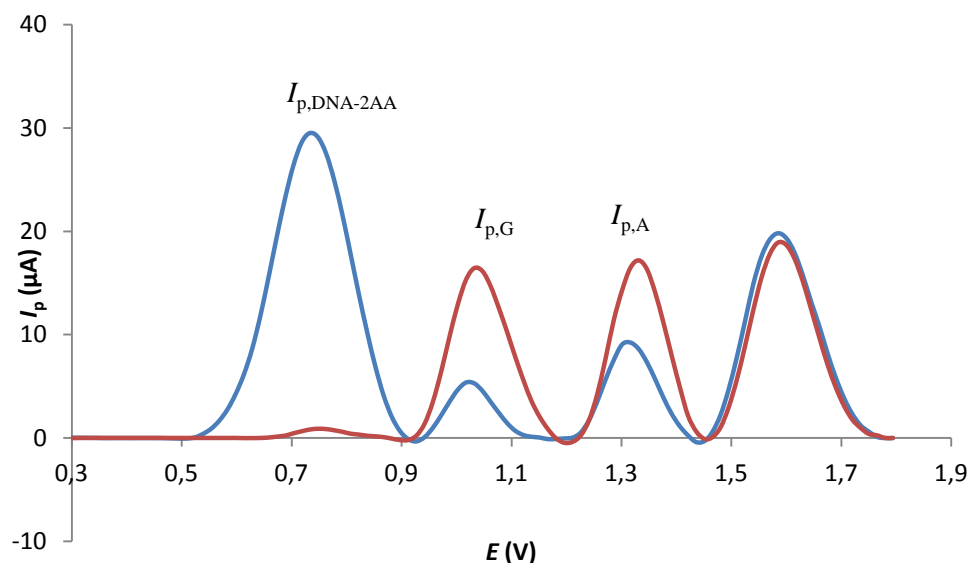
Obr. 7. SW voltamogramy měřeny v PBS ($c = 0,1 \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 7,0$) na DNA/GCE, po 5 min inkubaci v roztoku ethanol/PBS (v poměru 1:1) (modrá křivka), a na DNA/GCE, po 5 min inkubaci v roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$) v prostředí ethanol/PBS (v poměru 1:1) (červená křivka), voltamogramy jsou korigovány na základní linii.



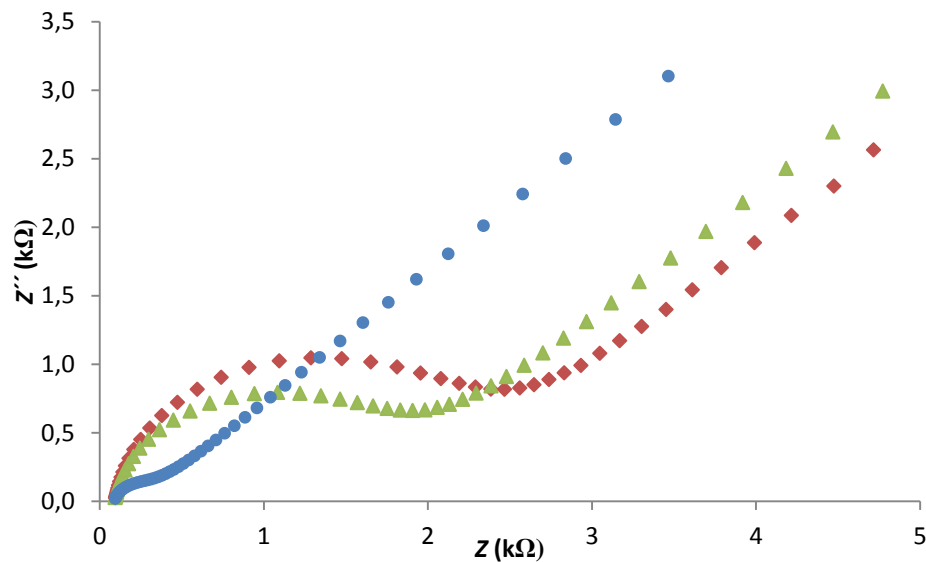
Obr. 8. Nyquistovy grafy měřené v roztoku redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ v PBS ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$) na GCE (modrá křivka), na DNA/GCE, po 5 min inkubaci v roztoku ethanol/PBS (v poměru 1:1) (červená křivka), na DNA/GCE, po 5 min inkubaci v roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$) v prostředí ethanol/PBS (v poměru 1:1) (zelená křivka).

Při sledování interakce DNA s 2-aminoanthracem po inkubaci DNA/GCE v inkubačním roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) ve směsi ethanol/PBS (v poměru 1:9) na SWV (obr. 9) vidíme opět vznik komplexu [DNA–2-aminoanthracen]. Dále můžeme pozorovat poklesy hodnot $I_{p,G}$ a $I_{p,A}$. Tento pokles je způsoben poškozením DNA vlivem interakce s 2-aminoanthracem, který se vmezeřuje do molekuly DNA, způsobuje pnutí ve dvoušroubovici, a tím vznik jednořetězcových zlomů. Na záznamu EIS (obr. 10) vidíme na DNA/GCE po inkubaci v roztoku 2-aminoanthracenu pokles R_{CT} . To opět odpovídá vzniku jednořetězcových zlomů DNA, které odpadávají z povrchu elektrody a umožňují lehčí přístup elektronům k povrchu elektrody.

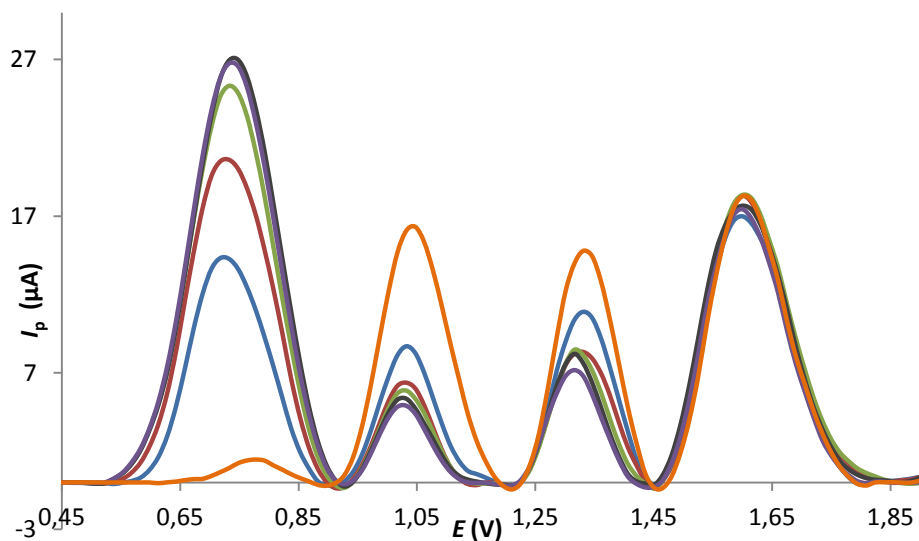
Tyto výsledky umožnily další vyšetřování poškození DNA způsobené 2-aminoanthracem. Pomocí SWV byla změřena závislost poklesu $I_{p,A}$ a $I_{p,G}$ na době inkubace v inkubačním roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) ve směsi ethanol/PBS (v poměru 1:9) (obr. 11). Můžeme pozorovat, že poškození DNA, tedy pokles $I_{p,A}$ a $I_{p,G}$, s rostoucím časem inkubace roste. Značné rozdíly $I_{p,G}$, který je pro hodnocení poškození DNA nejvhodnější, pozorujeme po inkubační době 1 min (pokles na 54 % výšky píku na DNA/GCE bez poškození) a 2 min (pokles na 39 %), poté už se poškození DNA razantně nemění. Ve čtvrté až páté minutě dochází k ustálení signálů a měřitelné poškození DNA dále nepokračuje. Byla také proměřena závislost poškození DNA na koncentraci inkubačního roztoku 2-aminoanthracenu ve směsi ethanol/PBS (v poměru 1:9) po 5 min inkubaci (obr. 12). Po inkubaci DNA/GCE v $1 \cdot 10^{-6}$ mol/L roztoku 2-aminoanthracenu pozorujeme pokles $I_{p,G}$ na 47 %, s rostoucí koncentrací roztoku 2-aminoanthracenu poškození roste až v $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L roztoku hodnota poškození $I_{p,G}$ dosáhne 82 %. Spolu s rostoucím poškozením DNA (pokles $I_{p,G}$ a $I_{p,A}$) pozorujeme nárůst píku odpovídající komplexu [DNA–2-aminoanthracen]. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 1 a 2. Pomocí EIS byla změřena závislost poklesu R_{CT} na koncentraci roztoku 2-aminoanthracenu ve směsi ethanol/PBS (v poměru 1:9) (obr. 13). I na Nyquistových grafech je viditelný růst poškození DNA s rostoucí koncentrací 2-aminoanthracenu v inkubačním roztoku. Pokles R_{CT} při inkubaci v $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L roztoku 2-aminoanthracenu je 12 %, zatímco pokles R_{CT} po inkubaci v $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L roztoku 2-aminoanthracenu je 22 %. Zjištěná interakce 2-aminoanthracenu s DNA byla opět využita při vývoji elektrochemické metody pro stanovení této látky (kapitola 3.3.3).



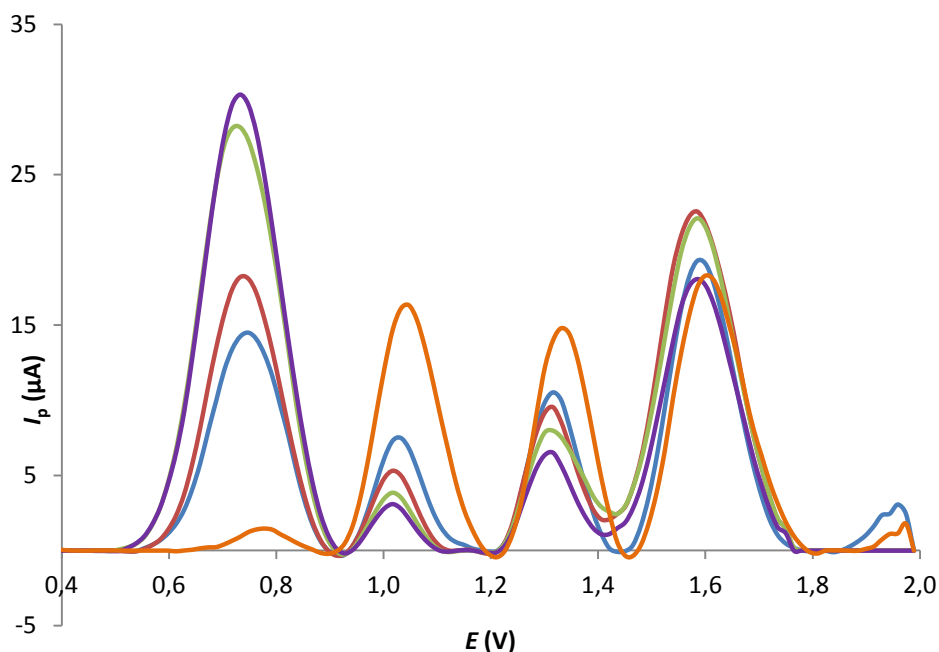
Obr. 9. SW voltamogramy měřeny v PBS ($c = 0,1 \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 7,0$) na DNA/GCE, po 5 min inkubaci v roztoku ethanol/PBS (v poměru 1:9) (modrá křivka), a na DNA/GCE, po 5 min inkubaci v roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$) v prostředí ethanol/PBS (v poměru 1:9) (červená křivka), voltamogramy jsou korigovány na základní linii.



Obr. 10. Nyquistovy grafy měřené v roztoku redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ v PBS ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$) na GCE (modrá křivka), na DNA/GCE, po 5 min inkubaci v roztoku ethanol/PBS (v poměru 1:9) (červená křivka), na DNA/GCE, po 5 min inkubaci v roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$) v prostředí ethanol/PBS (v poměru 1:9) (zelená křivka).



Obr. 11. Časová závislost poškození DNA způsobeného 2-aminoanthracenem, měřeno pomocí SW voltametrie v PBS ($c = 0,1 \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 7,0$) na DNA/GCE v roztoku ethanol/PBS (v poměru 1:9) (oranžová křivka), na DNA/GCE po 1 min inkubaci (modrá křivka), 2 min inkubaci (červená křivka), po 3 min inkubaci (zelená křivka), po 4 min inkubaci (černá křivka), a po 5 min inkubaci (fialová křivka) v roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 10^{-4} \text{ mol/L}$) v prostředí ethanol/PBS (poměr 1:9).



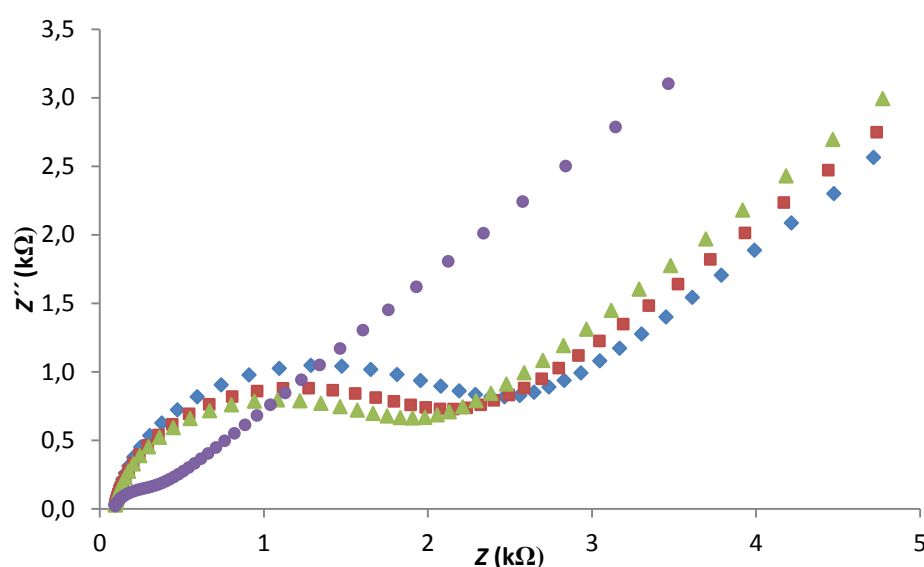
Obr. 12. Koncentrační závislost poškození DNA způsobeného 2-aminoanthracenem, měřeno pomocí SW voltametrie v PBS ($c = 0,1 \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 7,0$) na DNA/GCE v roztoku ethanol/PBS (v poměru 1:9) (oranžová křivka), na DNA/GCE po 5 min inkubace v roztoku 2-aminoanthracenu v prostředí ethanol/PBS (poměr 1:9) o koncentraci 2-aminoanthracenu $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ (modrá křivka), $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ (červená křivka), $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ (zelená křivka) a $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ (fialová křivka).

Tabulka 1. Závislost relativních výšek píků guanosinu, adenosinu (poškození vyjádřeno jako procentuální pokles výšky píku na danou hodnotu) a výšky píku vznikajícího komplexu [DNA–2-AA] na době inkubace biosenzoru v 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$) ve směsi ethanol/PBS (1:9)); měřeno SWV na DNA/GCE v $0,1 \text{ mol/L}$ PBS o $\text{pH} 7,0$.

Doba inkubace (min)	Relativní výška píku guanosinu (%)	Relativní výška píku adenosinu (%)	Výška píku komplexu DNA–2-AA (μA)
1	54	73	14,5
2	39	54	22,1
3	37	54	25,5
4	34	54	26,8
5	33	53	27,1

Tabulka 2. Závislost relativních výšek píků guanosinu, adenosinu (poškození vyjádřeno jako procentuální pokles výšky píku na danou hodnotu) a výšky píku vznikajícího komplexu [DNA–2-AA] na koncentraci 2-aminoanthracenu v inkubačním roztoku (různá c (2-AA) ve směsi ethanol/PBS (1:9)), měřeno SWV na DNA/GCE v 0,1 M PBS o pH = 7,0.

Koncentrace 2-AA v inkubačním roztoku ($\mu\text{mol/L}$)	Relativní výška píku guanosinu (%)	Relativní výška píku adenosinu (%)	Výška píku komplexu DNA–2-AA (μA)
1	47	71	14,5
5	33	64	18,2
10	24	54	28,1
50	18	44	30,3

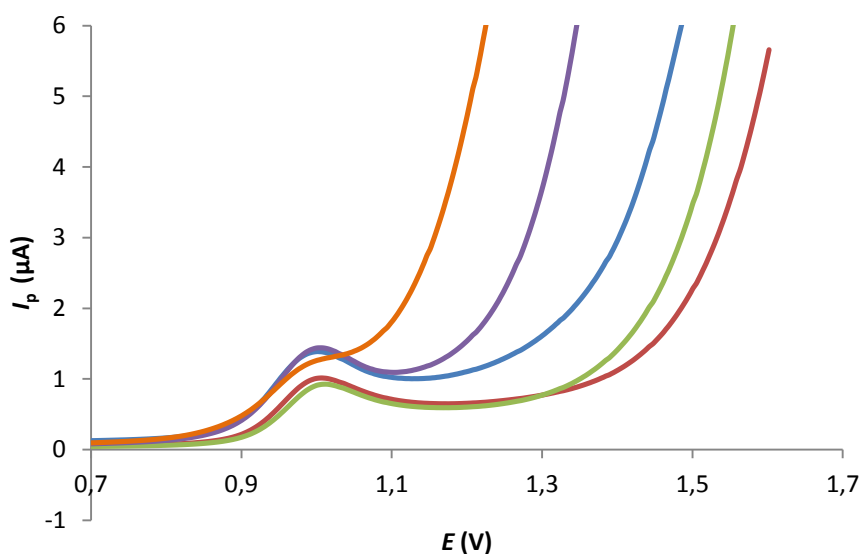


Obr. 13. Nyquistovy grafy měřené v roztoku redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ v PBS ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/L) na GCE (fialová křivka), na DNA/GCE, po 5 min inkubaci v roztoku ethanol/PBS (v poměru 1:9) (modrá křivka), na DNA/GCE, po 5 min inkubaci v roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/L) v prostředí ethanol/PBS (v poměru 1:9) (červená křivka), a na DNA/GCE, po 5 min inkubaci v roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) v prostředí ethanol/PBS (v poměru 1:9) (zelená křivka).

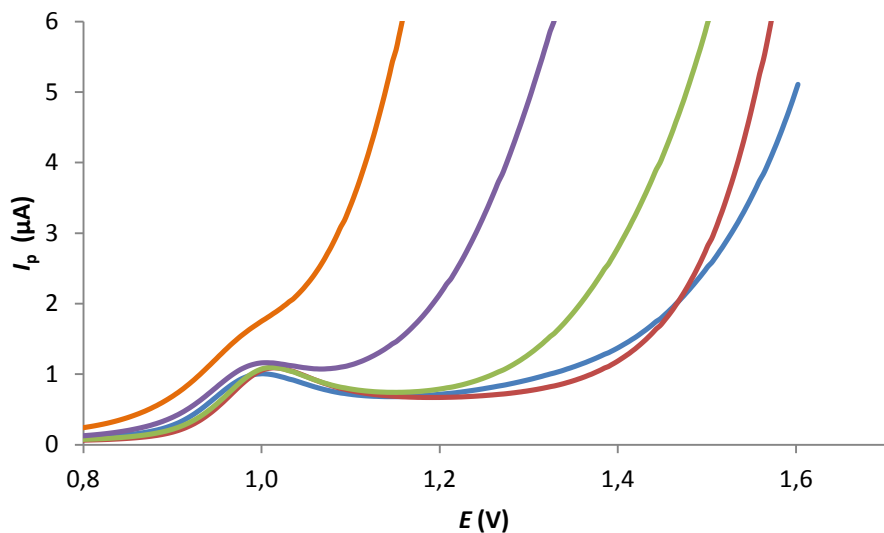
3.2 Stanovení anthracenu

3.2.1 Zjištění optimálního pH

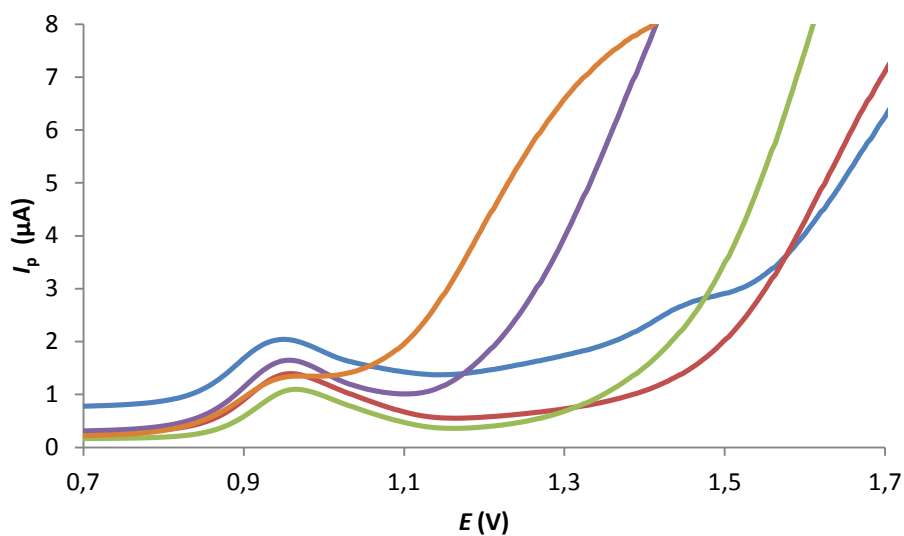
Při vývoji metody pro stanovení anthracenu byl nejdříve sledován vliv pH prostředí na elektrochemické chování anthracenu na GCE pomocí DCV a DPV. Na základě výsledků bylo vybráno optimální pH pro další měření. Byly měřeny roztoky obsahující $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L anthracenu v BR pufru v rozmezí pH 2,0 – 11,0. Anthracen je málo rozpustný ve vodě, proto byly všechny roztoky ethanolicke, v poměru ethanol/BR pufr 1:1. V celém rozsahu měřených pH hodnot poskytoval anthracen pouze jeden pík, a to v anodické oblasti. Na obr. 14 a 15 pro DCV a 16 a 17 pro DPV můžeme vidět, že potenciál oxidačního píku anthracenu se s měnícím se pH nemění. Oxidace anthracenu tedy pravděpodobně neprobíhá za výměny vodíkových kationtů, ale radikálově⁽⁵⁸⁾. Optimální hodnotu pH jsme tedy vybírali pouze na základě výšky píku (I_p) jejíž závislost na pH je znázorněna na obr. 18 pro DCV a na obr. 19 pro DPV. Jako optimální pH prostředí byla zvolena hodnota pH= 5,0 pro obě techniky, kde oxidační pík anthracenu dosahoval nejvyšších hodnot I_p . Výsledky obou technik jsou v přehledové tabulce 3 (pro DCV) a tabulce 4 (pro DPV).



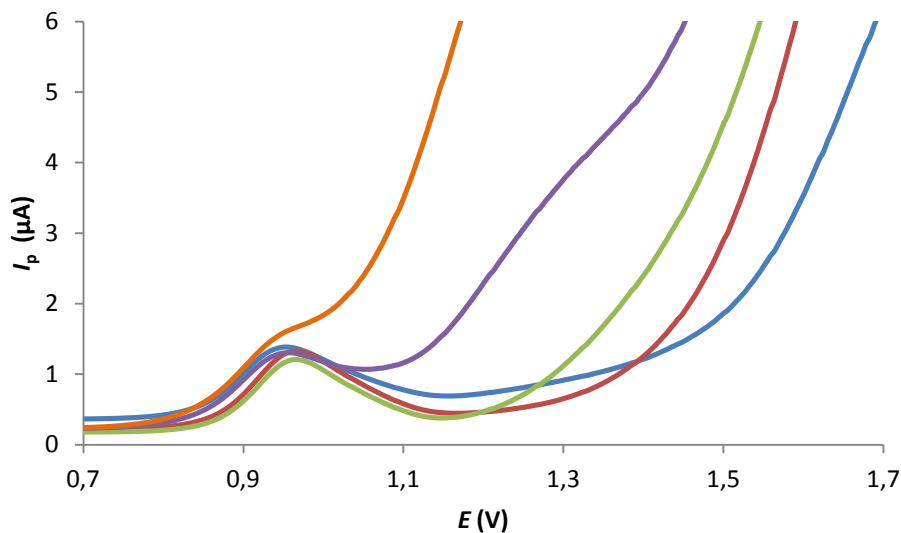
Obr. 14. DC voltamogramy roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) na GCE v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 2,0 (modrá křivka), pH = 4,0 (červená křivka), pH = 6,0 (zelená křivka), pH = 8,0 (fialová křivka), pH = 10,0 (oranžová křivka) (v poměru 1:1).



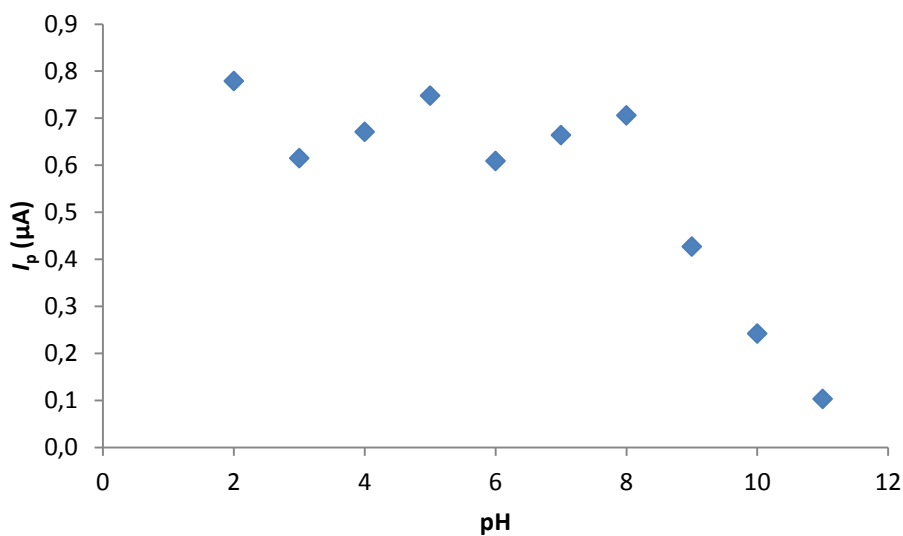
Obr. 15. DC voltamogramy roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) na GCE v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 3,0 (modrá křivka), pH = 5,0 (červená křivka), pH = 7,0 (zelená křivka), pH = 9,0 (fialová křivka), pH = 11,0 (oranžová křivka) (v poměru 1:1).



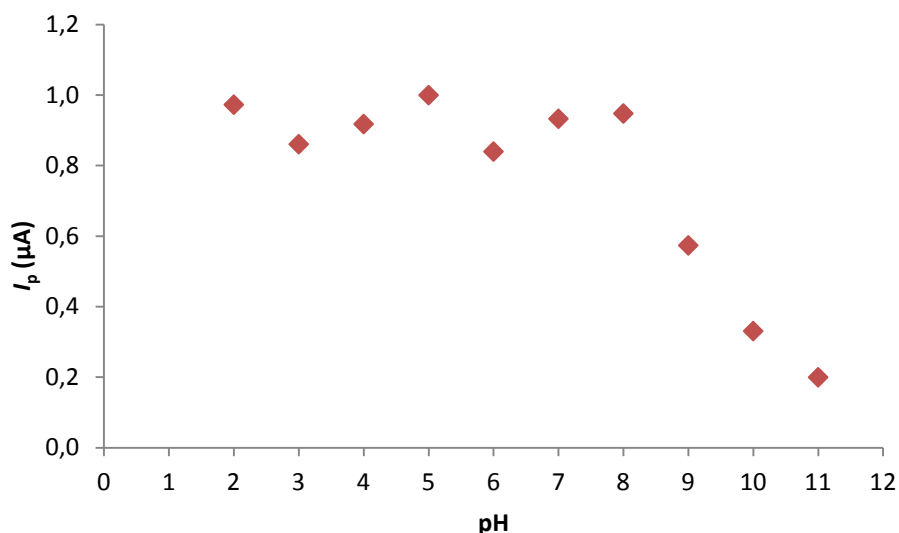
Obr. 16. DP voltamogramy roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) na GCE v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 2,0 (modrá křivka), pH = 4,0 (červená křivka), pH = 6,0 (zelená křivka), pH = 8,0 (fialová křivka), pH = 10,0 (oranžová křivka) (v poměru 1:1).



Obr. 17. DP voltamogramy roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) na GCE v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 3,0 (modrá křivka), pH = 5,0 (červená křivka), pH = 7,0 (zelená křivka), pH = 9,0 (fialová křivka), pH = 11,0 (oranžová křivka) (v poměru 1:1).



Obr. 18. Závislost výšky oxidačního píku (I_p) anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) na pH, měřeno na GCE pomocí DC voltametrie v prostředí ethanol/BR pufr o různém pH (v poměru 1:1).



Obr. 19. Závislost výšky oxidačního píku (I_p) anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) na pH, měřeno na GCE pomocí DP voltametrie v prostředí ethanol/BR pufr o různém pH (v poměru 1:1).

Tabulka 3. Závislost výšky píku (I_p) a polohy píku (E_p) na pH, měřeno na GCE, technikou DC voltametrie v roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) v prostředí ethanol/BR pufr o různých pH (v poměru 1:1).

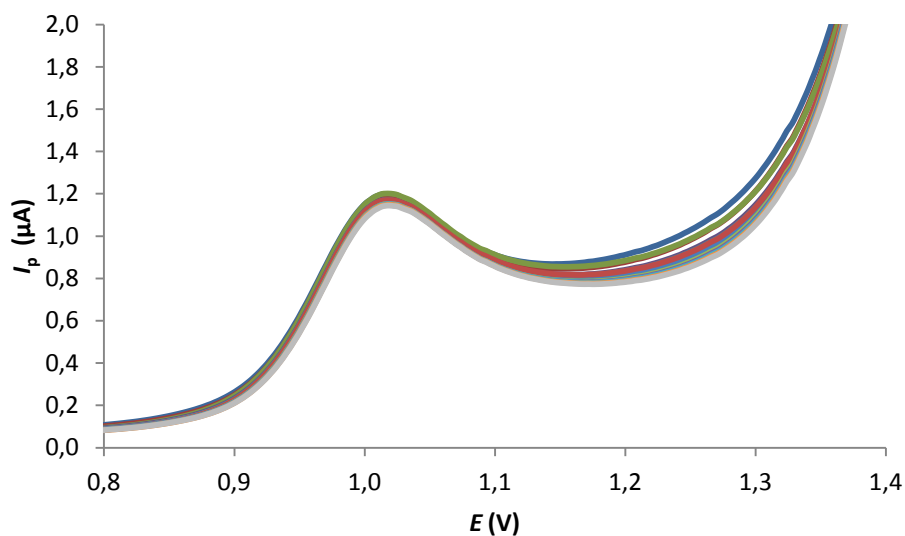
pH	E_p (V)	I_p (μA)
2,0	0,995	0,779
3,0	0,995	0,615
4,0	1,001	0,671
5,0	1,010	0,748
6,0	1,007	0,609
7,0	1,007	0,664
8,0	0,995	0,702
9,0	0,986	0,427
10,0	0,983	0,242
11,0	0,989	0,103

Tabulka 4. Závislost výšky píku (I_p) a polohy píku (E_p) na pH, měřeno na GCE, technikou DP voltametrie v roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) v prostředí etanol/BR pufr o různých pH (v poměru 1:1).

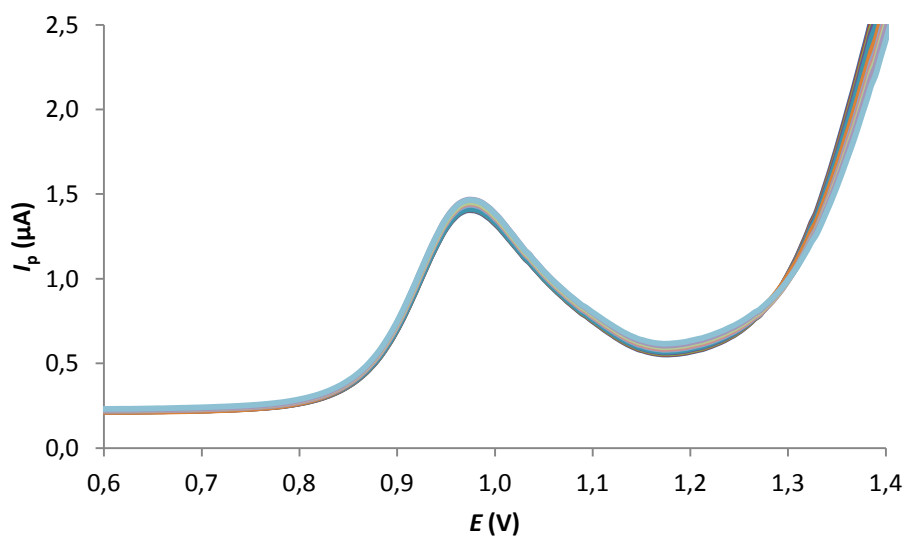
pH	E_p (V)	I_p (μ A)
2,0	0,956	1,010
3,0	0,949	0,885
4,0	0,958	0,972
5,0	0,964	0,992
6,0	0,964	0,902
7,0	0,964	0,952
8,0	0,949	0,905
9,0	0,946	0,554
10,0	0,947	0,387
11,0	0,947	0,190

3.2.2 Opakovatelnost měření

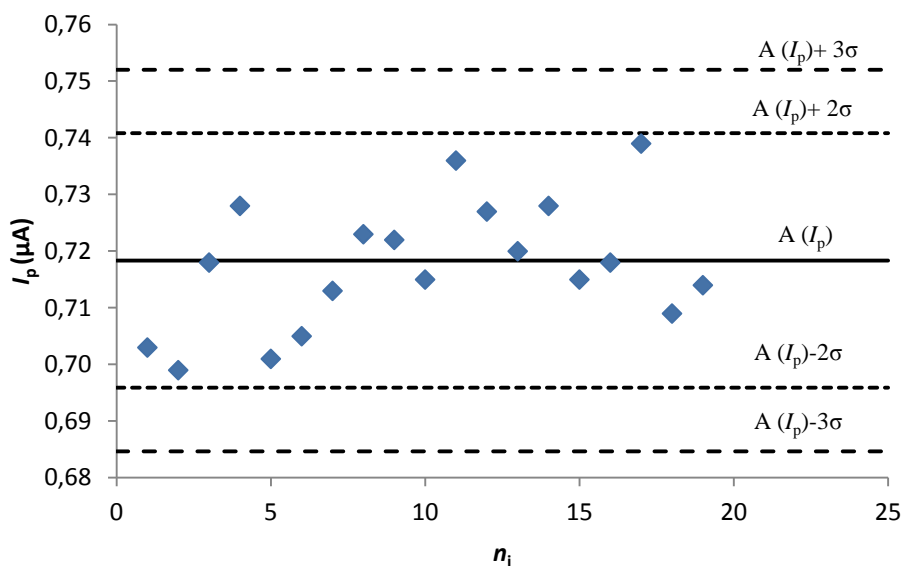
Po zjištění optimální hodnoty pH prostředí byla změřena opakovatelnost dvaceti po sobě následujících měření opět pomocí DCV a DPV v roztoku anthracenu ($c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/L) v prostředí etanol/BR pufr o pH = 5,0 (v poměru 1:1). Před začátkem měření byla elektroda zaktivována vložením potenciálu 1,8 V po dobu 60 s. Mezi každým měřením byl roztok promíchán. Na obr. 20 a 21 jsou vyobrazeny voltametrické záznamy pro DCV a DPV. Hodnoty výšky oxidačního píku anthracenu (I_p) byly zaneseny do regulačních diagramů na obr. 22 (pro DCV) a obr. 23 (pro DPV). V případě DP voltametrie můžeme pozorovat celkový pokles hodnot I_p , tento pokles ale nemá statistickou významnost pro daný soubor dat. Hodnota opakovatelnosti měření DP voltametrií je 1,8 %. V případě DC voltametrie vidíme normální rozdělení s hodnotou opakovatelnosti 1,5 %.



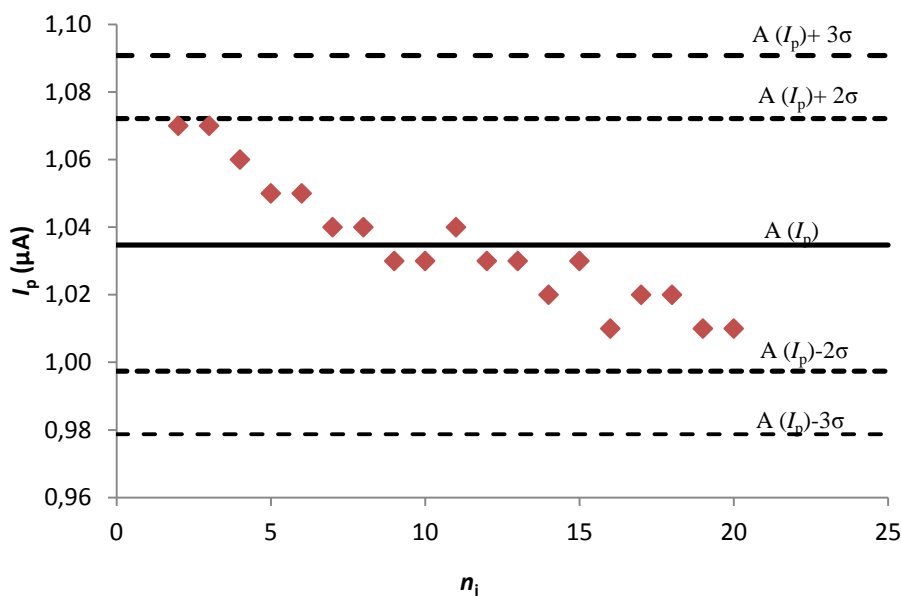
Obr. 20. DC voltamogramy oxidace anthracenu ($c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/L), měření opakovatelnosti na GCE v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 5,0 (v poměru 1:1), počet měření (n_i) = 20.



Obr. 21. DP voltamogramy oxidace anthracenu ($c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/L), měření opakovatelnosti na GCE v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 5,0 (v poměru 1:1), počet měření (n_i) = 20.



Obr. 22. Závislost výšky oxidačního píku anthracenu (I_p) na pořadovém čísle měření, měřeno DCV na GCE v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 5,0 (v poměru 1:1). Vyhodnoceno na hladině významnosti 95 %, hodnota $A(I_p)$ představuje aritmetický průměr naměřených hodnot pro $n_i = 20$, hodnoty $A(I_p) \pm 2\sigma$ představují varovné meze a hodnoty $A(I_p) \pm 3\sigma$ představují regulační meze.

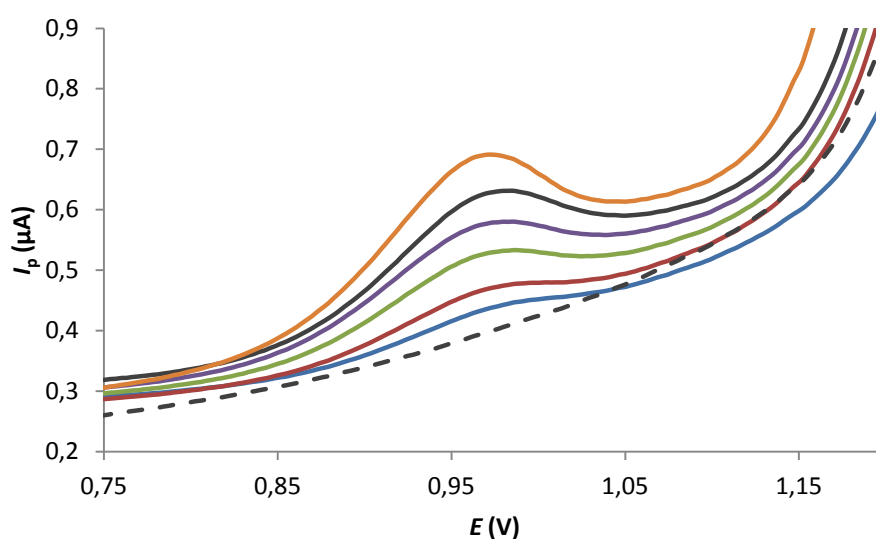


Obr. 23. Závislost výšky oxidačního píku anthracenu (I_p) na pořadovém čísle měření, měřeno DPV na GCE v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 5,0 (v poměru 1:1). Vyhodnoceno na hladině významnosti 95 %, hodnota $A(I_p)$ představuje aritmetický průměr naměřených hodnot pro $n_i = 20$, hodnoty $A(I_p) \pm 2\sigma$ představují varovné meze a hodnoty $A(I_p) \pm 3\sigma$ představují regulační meze.

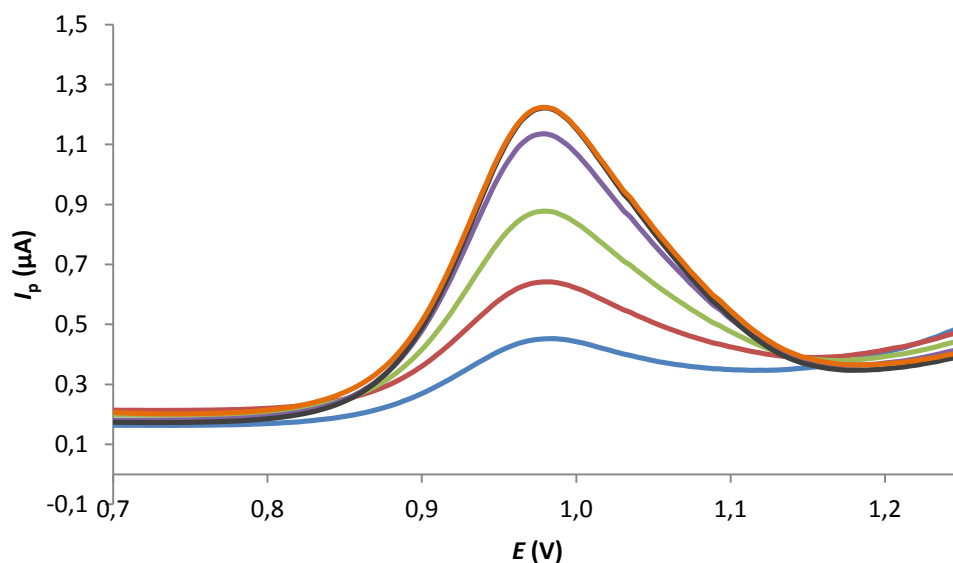
3.2.3 Kalibrační závislosti

Protože během dosavadních měření byla pozorována vyšší citlivost DP voltametrie oproti DC voltametii, což odpovídá známému faktu, že pulzní techniky jsou díky eliminaci nabíjecího proudu citlivější, a také kvůli shodným pracovním podmínkám obou technik, bylo dále měřeno pouze technikou DP voltametrie.

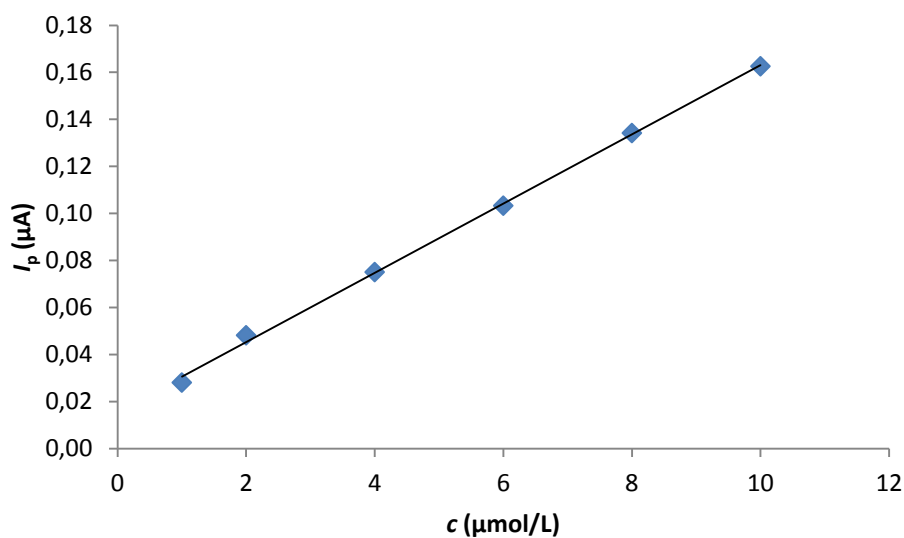
Byly proměřeny kalibrační závislosti koncentrace anthracenu na GC elektrodě v prostředí ethanol/BR pufru o $\text{pH} = 5,0$ (v poměru 1:1) v rozmezí koncentrací $(1-10) \cdot 10^{-6}$ mol/L a $(1-10) \cdot 10^{-5}$ mol/L. Naměřené voltamogramy jsou zobrazeny na obr. 24 (pro řád 10^{-6} mol/L) a obr. 25 (pro řád 10^{-5} mol/L) a jim odpovídající kalibrační závislosti na obr. 26 a 27. Ve vyšším koncentračním řádu (obr. 27) pozorujeme od koncentrace $6 \cdot 10^{-5}$ mol/L zakřivení kalibrační závislosti v důsledku pasivace elektrodového povrchu. X Mez stanovitelnosti (L_Q) pro anthracen byla vypočítána jako podíl desetinásobku směrodatné odchylky pro deset měření nejnižší změřitelné koncentrace kalibrační přímkou a směrnice kalibrační přímkou. L_Q má hodnotu $2,2 \cdot 10^{-6}$ mol/L. Parametry kalibračních přímek jsou shrnuty v tabulce 5.



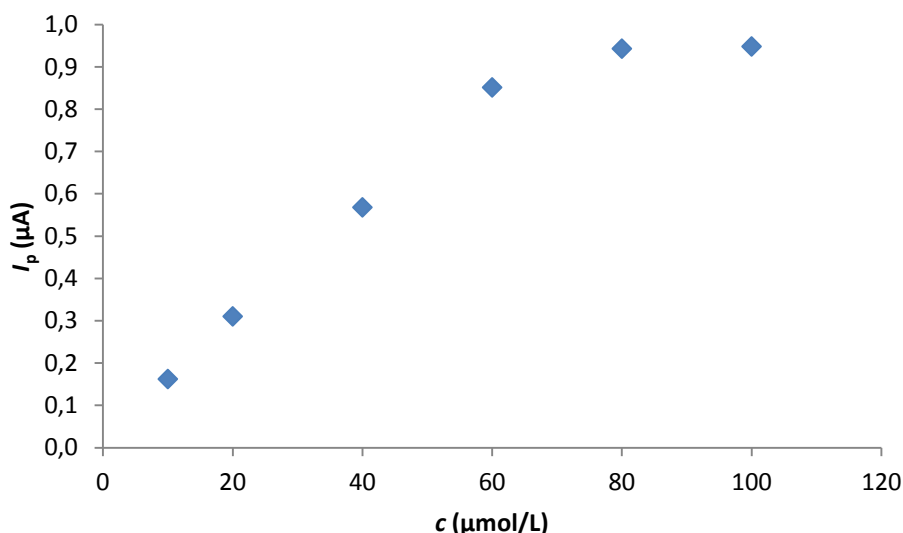
Obr. 24. DP voltamogramy anthracenu měřeno na GCE v prostředí ethanol/BR pufr o $\text{pH} = 5,0$ (v poměru 1:1); koncentrace $0 \cdot 10^{-6}$ mol/L (-- křivka), koncentrace $1 \cdot 10^{-6}$ mol/L (modrá křivka), $2 \cdot 10^{-6}$ mol/L (červená křivka), $4 \cdot 10^{-6}$ mol/L (zelená křivka), $6 \cdot 10^{-6}$ mol/L (fialová křivka), $8 \cdot 10^{-6}$ mol/L (černá křivka), $10 \cdot 10^{-6}$ mol/L (oranžová křivka).



Obr. 25. DP voltamogramy anthracenu měřeno na GCE v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 5,0 (v poměru 1:1); koncentrace $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L (modrá křivka), $2 \cdot 10^{-5}$ mol/L (červená křivka), $4 \cdot 10^{-5}$ mol/L (zelená křivka), $6 \cdot 10^{-5}$ mol/L (fialová křivka), $8 \cdot 10^{-5}$ mol/L (černá křivka), $10 \cdot 10^{-5}$ mol/L (oranžová křivka).



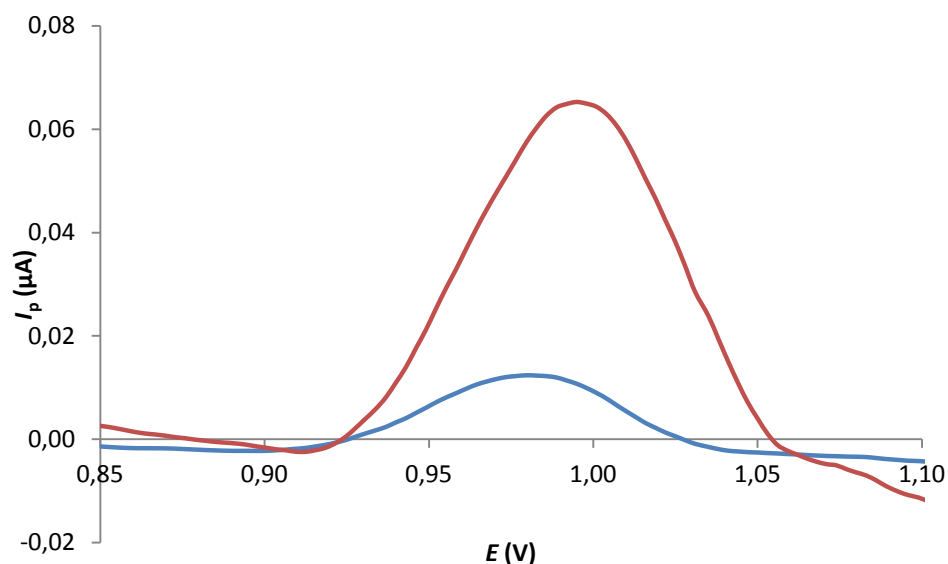
Obr. 26. Kalibrační závislost anthracenu, měřeno na GCE pomocí DP voltametrie v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 5,0 (v poměru 1:1), koncentrační řád 10^{-6} mol/L.



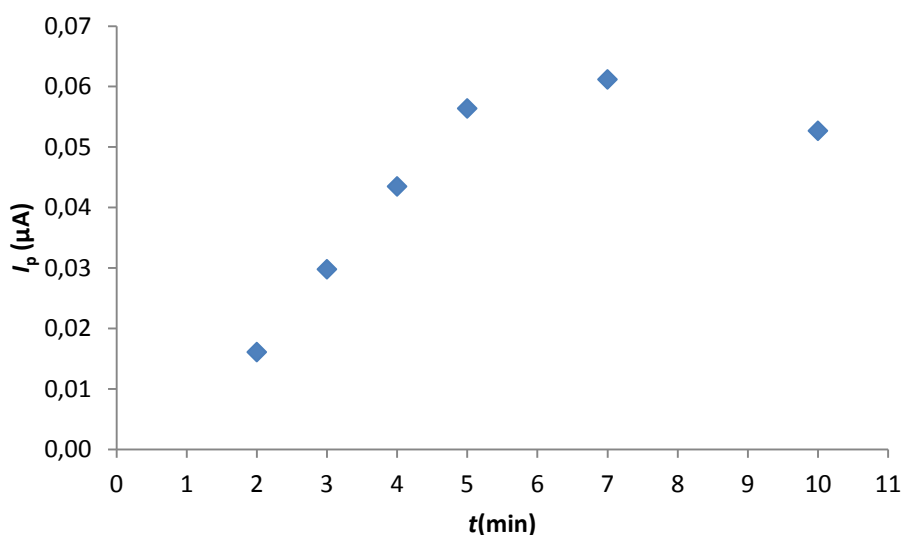
Obr. 27. Kalibrační závislost anthracenu, měřeno na GCE pomocí DP voltametrie v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 5,0 (v poměru 1:1), koncentrační řád 10^{-5} mol/L.

Z měření zjišťujících poškození DNA víme, že anthracen interkaluje do dvoušroubovice DNA. Této interakce bylo využito pro zvýšení citlivosti stanovení a snížení meze stanovitelnosti anthracenu. Na obr. 28 můžeme pozorovat nárůst výšky píku anthracenu (I_p) na DNA/GCE (červená křivka), po 5 min inkubaci elektrody v roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/L) v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 5,0 (v poměru 1:1), oproti I_p na holé GC elektrodě (modrá křivka) změřené v roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/L) v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 5,0 (v poměru 1:1). Inkubace je doba, po kterou probíhá interkalace anthracenu do dvoušroubovice DNA. Na DNA/GCE byla změřena závislost výšky píku anthracenu na době inkubace v roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/L) v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 5,0 (v poměru 1:1). Ze získané závislosti (obr. 29) je patrné, že při 5 min inkubace dochází téměř k nasycení. Další nárůst I_p prodloužením doby inkubace je velmi malý a nevyváží prodloužení celé procedury. Optimální doba inkubace byla tedy zvolena 5 min. Poté byly proměřeny kalibrační závislosti na DNA/GC elektrodě v prostředí ethanol/BR pufru o pH = 5,0 (v poměru 1:1) v rozsahu koncentrací $(1-10) \cdot 10^{-7}$ mol/L a $(1-10) \cdot 10^{-6}$ mol/L. Každá koncentrace byla měřena na nově připraveném DNA biosenzoru po 5 min inkubaci v roztoku anthracenu. Získané kalibrační závislosti jsou znázorněny na obr. 30 a 31. Z obr. 30 je patrné, že kalibrační závislost není přes dva měřené koncentrační řády lineární, nicméně v rámci jednotlivých koncentračních řádů je možné získané body proložit přímkou s vysokým korelačním koeficientem. Toto chování je patrně způsobeno různým mechanismem obsazování interakčních míst DNA v závislosti na rostoucí koncentraci

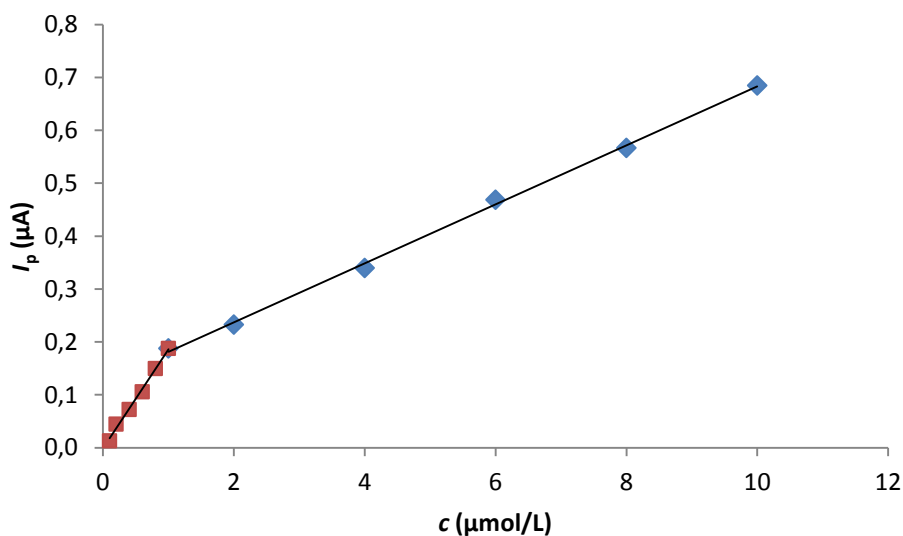
analytu. Mez stanovitelnosti byla vypočítána stejným způsobem jako při měření na GCE. Díky DNA biosenzoru se nám podařilo snížit L_Q o jeden řád na hodnotu $1,5 \cdot 10^{-7}$ mol/L. Parametry kalibračních přímek pro stanovení anthracenu pomocí DP voltametrie na GCE a na DNA/GCE jsou shrnuty v tabulce 5.



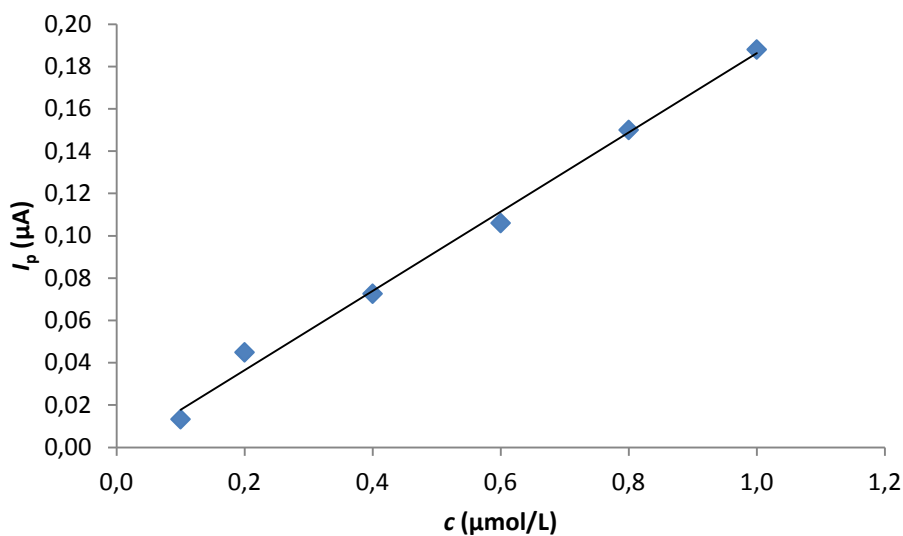
Obr. 28. DP voltamogramy měřeny v roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/L) v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 5,0 (v poměru 1:1) na GCE (modrá křivka) a na DNA/GCE (červená křivka), voltamogramy korigovány na základní linii.



Obr. 29. Závislost výšky píku anthracenu na čase inkubace v roztoku anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/L) v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 5,0 (v poměru 1:1), měřeno na DNA/GCE pomocí DP voltametrie.



Obr. 30. Kalibrační závislost anthracenu, měřeno na DNA/GCE pomocí DP voltametrie v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 5,0 (v poměru 1:1), koncentrační řády 10^{-7} a 10^{-6} mol/L, doba inkubace v roztoku anthracenu o různé koncentraci 5 min.



Obr. 31. Kalibrační závislost anthracenu, měřeno na DNA/GCE pomocí DP voltametrie v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 5,0 (v poměru 1:1), koncentrační řád 10^{-7} mol/L, doba inkubace v roztoku anthracenu o různé koncentraci 5 min.

Tabulka 5. Parametry kalibračních přímek a limity stanovitelnosti pro stanovení anthracenu na GCE a DNA/GCE, měřeno pomocí DP voltametrie v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 5,0 (v poměru 1:1).

elektroda	c (mol/L)	směrnice (mA·L/mol)	úsek (μ A)	korelační koeficient	L_Q (mol/L)
GCE	$(1-6) \cdot 10^{-5}$	13,8	0,022	0,999	–
	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	14,7	0,016	0,999	$2,2 \cdot 10^{-6}$
DNA/GCE	$(1-10) \cdot 10^{-6}$	55,7	0,126	0,999	–
	$(1-10) \cdot 10^{-7}$	187,3	-0,001	0,997	$1,5 \cdot 10^{-7}$

3.2.4 Modelové vzorky

Vzhledem k velmi nízké rozpustnosti anthracenu ve vodě, nebylo možné použít jako modelové vzorky různé druhy vod a provést měření kalibračních závislostí. Proto byly vybrány pevné reálné matrice - štěrk (průměrná velikost částic 3 mm) a písek (velikost částic menší než 1 mm) a byla zjišťována výtěžnost kapalinové extrakce anthracenu na DNA/GCE pomocí DPV (a tedy i celková výtěžnost/správnost metody stanovení). Pro anthracen, který je málo polární, byl jako extrakční činidlo použit hexan. V tabulce 6 jsou shrnuty výsledky extrakce. Výtěžnost extrakce anthracenu z modelových vzorků vyšla pro štěrk 98 % a pro písek 96 %. Tyto výsledky dokazují praktickou využitelnost vyvinuté metody pro stanovení anthracenu pomocí DNA biosenzoru. Při práci s modelovými vzorky jsme vycházeli z práce Germaniho a Armalise⁽⁵⁹⁾. Dosáhli jsme velmi podobných výtěžností extrakce, ale v našem případě jsme pracovali s o řád nižšími koncentracemi anthracenu.

Tabulka 6.

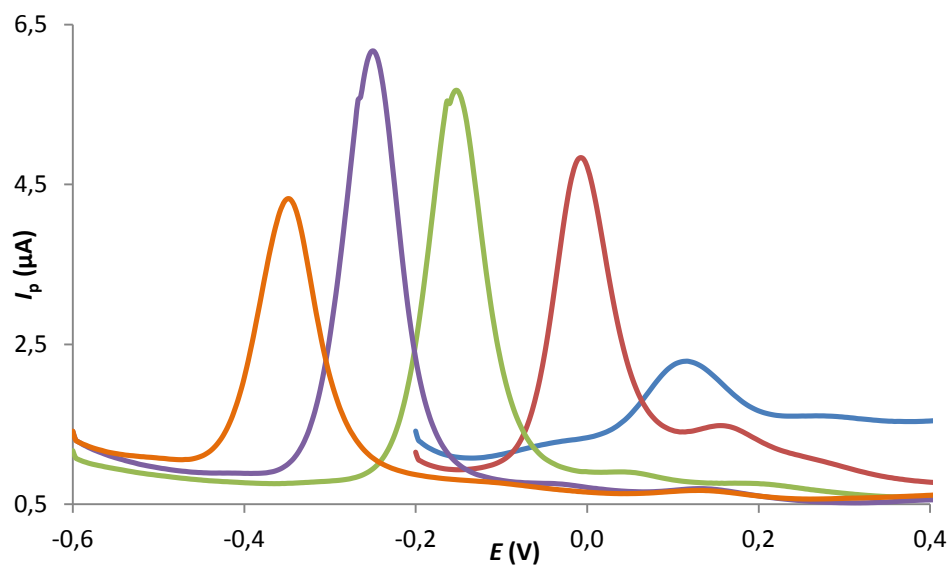
Vzorek	Koncentrace přidaná/nalezená (nmol/g)	Výtěžnost extrakce (%)
Štěrk	10/9,8	98 %
Písek	10/9,6	96 %

3.3 Stanovení 2-aminoanthracenu

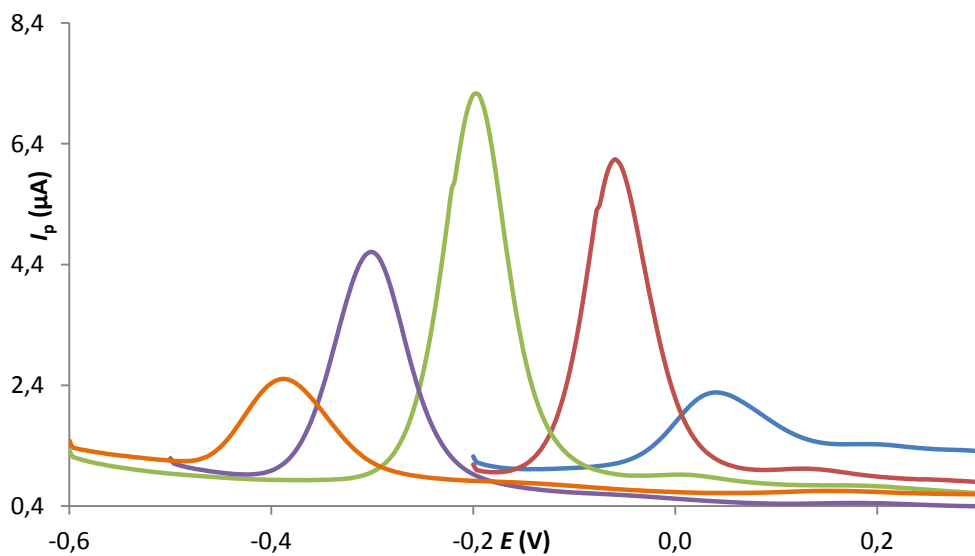
3.3.1 Zjištění optimálního pH

2-Aminoanthracen je látka poskytující více signálů v celém rozsahu potenciálů. Byly měřeny roztoky obsahující $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L 2-aminoanthracenu v BR pufru v rozmezí pH 2,0-11,0. 2-Aminoanthracen je lépe rozpustný ve vodných prostředích, proto roztoky pro stanovení 2-aminoanthracenu byly připraveny v poměru ethanol/BR pufr 1:9. Při měření byly opět použity obě techniky DCV i DPV, ale díky lepším výsledkům získaným pomocí DP voltametrie, budou ukázány pouze výsledky získané touto technikou. Proměřením pH závislosti jsme získali dva píky použitelné pro stanovení 2-aminoanthracenu. Na obr. 32 (sudá pH) a 33 (lichá pH) vidíme závislost píku objevujícího se při negativnějších potenciálech ($E_{p,1}$) na pH. Na rozdíl od anthracenu můžeme pozorovat s rostoucím pH posun píku do zápornějších hodnot potenciálu. Oxidace 2-aminoanthracenu tedy probíhá za přispění vodíkových kationtů v roztoku. Tento pík s velkou pravděpodobností odpovídá dimeru vzniklému reakcí dvou $-NH$ skupin za vzniku azosloučeniny ($N=N$). Skupiny $-NH$ vznikly zřejmě samovolnou oxidací $-NH_2$ skupiny 2-aminoanthracenu.^(56,57) Toto tvrzení podporuje jak tvar píku – vysoký a úzký značící reverzibilní děj, tak i nízký potenciál oxidace, což značí snadnou zpětnou redukci azosloučeniny. Reverzibilita tohoto děje byla ověřena pomocí cyklické voltametrie. Tento pík proto může sloužit pouze k nepřímému stanovení 2-aminoanthracenu. Optimální pH pro tento pík bylo zvoleno pH = 7,0, při kterém výška píku ($I_{p,1}$) byla nejvyšší a pík byl nejlépe vyhodnotitelný. Obr. 34 znázorňuje posun píku ($E_{p,1}$) směrem k negativnějším potenciálům v závislosti na pH prostředí.

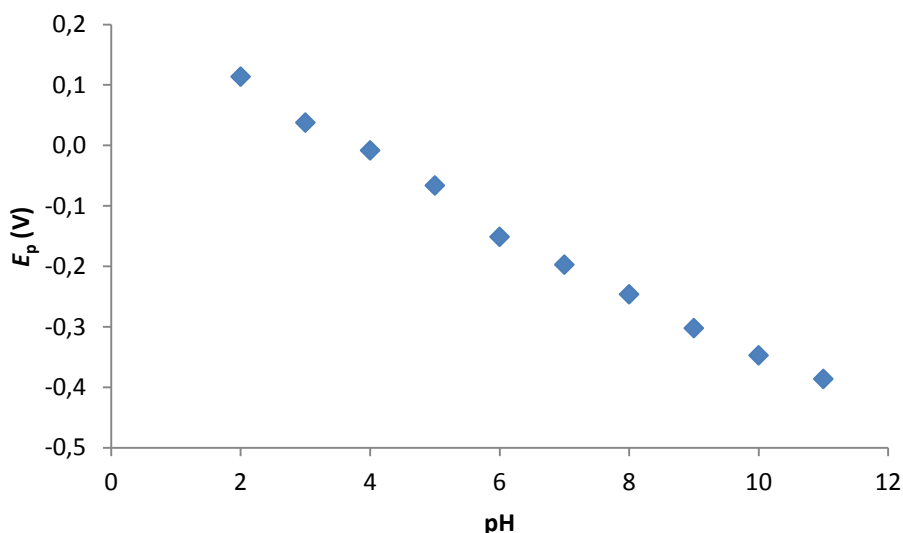
Na obr. 35 jsou znázorněny DP voltamogramy druhého píku (oxidace aminoskupiny), jenž byl pozorován při pozitivnějších potenciálech ($E_{p,2}$) – dobře vyhodnotitelný byl v rozmezí pH použitého BR pufru 5,0 až 10,0; závislost je vyhodnocena na obr. 36. Tento pík je viditelný v užším rozsahu pH, ale i tady se jeví pH = 7,0 jako optimální. Tomuto píku byla dále věnována pozornost v souvislosti s DNA biosenzorem. Vyhodnocená měření jsou shrnuta v tabulce 7.



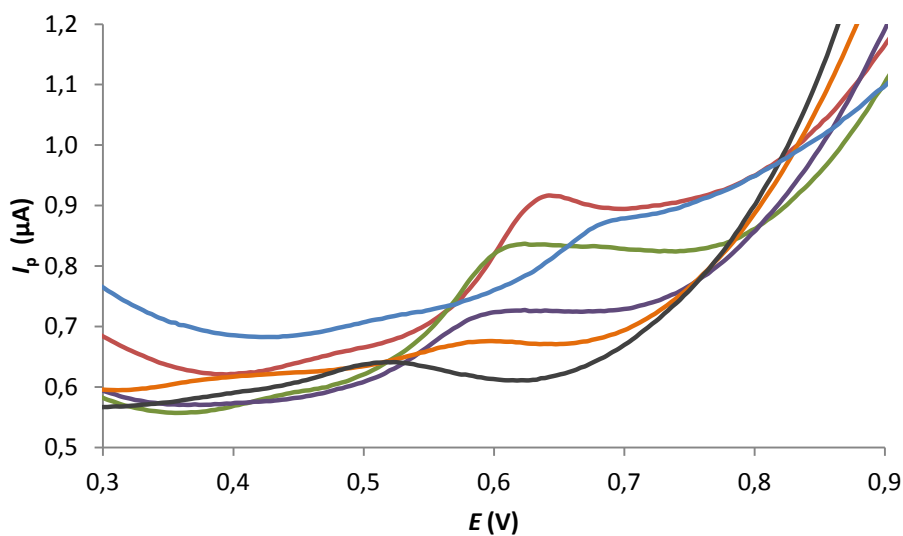
Obr. 32. DP voltamogramy roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) píku $E_{p,1}$ na GCE v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 2,0 (modrá křivka), pH = 4,0 (červená křivka), pH = 6,0 (zelená křivka), pH = 8,0 (fialová křivka), pH = 10,0 (oranžová křivka) (v poměru 1:9).



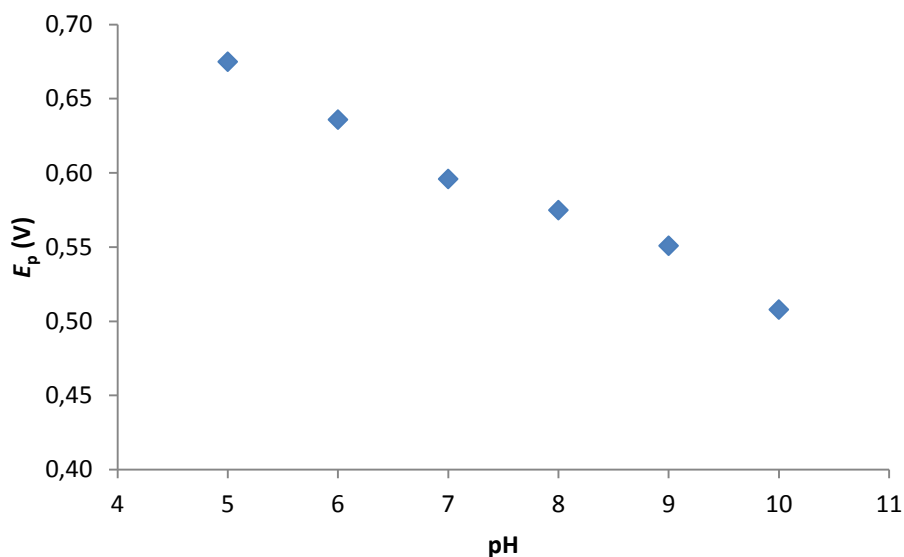
Obr. 33. DP voltamogramy roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) píku $E_{p,1}$ na GCE v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 3,0 (modrá křivka), pH = 5,0 (červená křivka), pH = 7,0 (zelená křivka), pH = 9,0 (fialová křivka), pH = 11,0 (oranžová křivka) (v poměru 1:9).



Obr. 34. Závislost polohy oxidačního píku 2-aminoanthracenu ($E_{p,1}$) ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) na pH, měřeno na GCE pomocí DP voltametrie v prostředí ethanol/BR pufr o různém pH (v poměru 1:9).



Obr. 35. DP voltamogramy roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) píku $E_{p,2}$ na GCE v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 5,0 (modrá křivka), pH = 6,0 (červená křivka), pH = 7,0 (zelená křivka), pH = 8,0 (fialová křivka), pH = 9,0 (oranžová křivka), pH = 10,0 (černá křivka) (v poměru 1:9).



Obr. 36. Závislost polohy oxidačního píku 2-aminoanthracenu ($E_{p,2}$) ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) na pH, měřeno na GCE pomocí DP voltametrie v prostředí ethanol/BR pufr o různém pH (v poměru 1:9).

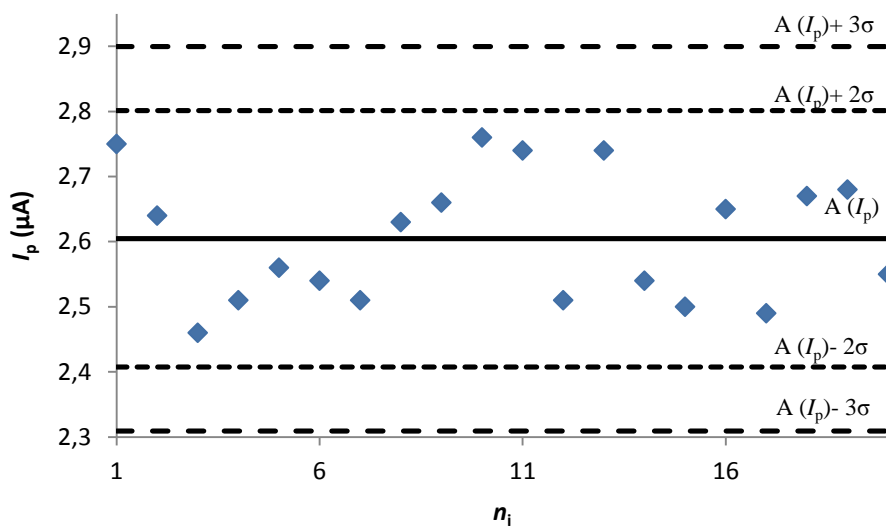
Tabulka 7. Závislost výšky píku (I_p) a polohy píku (E_p) na pH, měřeno na GC elektrodě, technikou DP voltametrie v roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) v prostředí ethanol/BR pufr o různých pH (v poměru 1:9).

pH	$E_{p,1}$ (V)	$I_{p,1}$ (μ A)	$E_{p,2}$ (V)	$I_{p,2}$ (μ A)
2,0	0,114	0,767	-	-
3,0	0,038	0,923	-	-
4,0	-0,008	4,40	-	-
5,0	-0,066	5,14	0,685	0,028
6,0	-0,151	4,83	0,639	0,127
7,0	-0,197	6,38	0,608	0,177
8,0	-0,246	5,79	0,587	0,126
9,0	-0,302	3,80	0,551	0,023
10,0	-0,347	3,76	0,514	0,045
11,0	-0,386	1,47	-	-

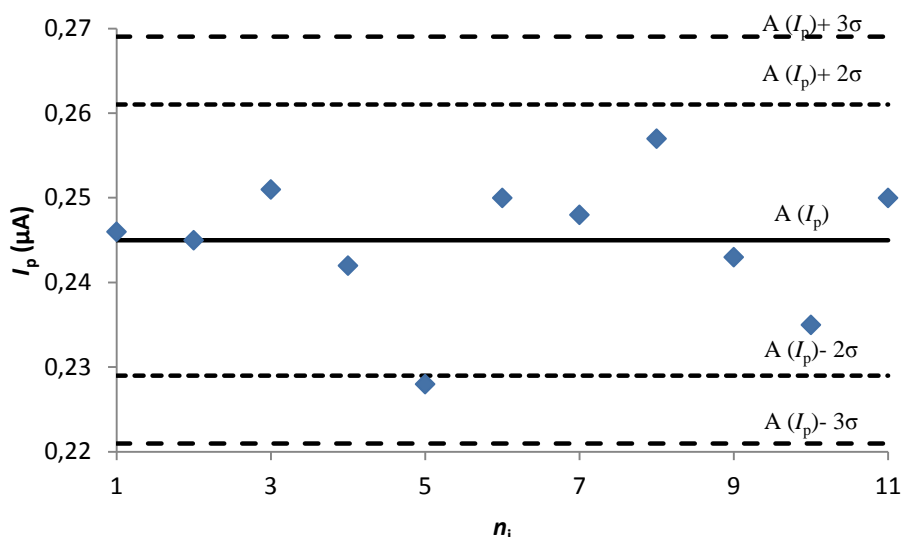
3.3.2 Opakovatelnost měření

Po zvolení optimální hodnoty pH prostředí bylo provedeno měření opakovatelnosti u obou píků $E_{p,1}$ (nepřímé stanovení) a $E_{p,2}$. Opakovatelnost píku $E_{p,1}$ se měřila na GCE, a protože u aminů běžně při oxidaci vznikají různé aminosloučeniny, které by se mohly usazovat na povrchu elektrody a způsobovat její pasivaci, byla elektroda před každým měřením oleštěna pomocí aluminového prášku na plstěné podložce. Měření probíhalo v roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 7,0 (v poměru 1:9). Měření bylo zopakováno dvacetkrát. Výsledky měření byly zaneseny do regulačního diagramu (obr. 37), ze kterého je patrné normální rozdělení výsledků. Opakovatelnost měření pro pík $E_{p,1}$ na GCE má hodnotu 2,9 %.

Opakovatelnost $E_{p,2}$ se měřila na DNA/GCE. V tomto případě probíhalo měření v roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/L) v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 7,0 (v poměru 1:9). Každé měření bylo provedeno na nově vyrobeném DNA biosenzoru a vzhledem k časové náročnosti bylo měření provedeno pouze desetkrát. Data byla opět zanesena do regulačního diagramu (obr. 38) a opět ukazují normální rozdělení. Opakovatelnost měření píku $E_{p,2}$ na DNA/GCE má hodnotu 3,1 %. Opakovatelnost píku $E_{p,2}$ byla měřena i na GCE elektrodě, hodnota této opakovatelnosti je 10 %. Je tedy patrné, že použitím DNA/GCE se opakovatelnost měření zlepšuje.



Obr. 37. Závislost výšky oxidačního píku 2-aminoanthracenu ($I_{p,1}$) ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L) na pořadovém čísle měření, měřeno DPV na GCE v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 7,0 (v poměru 1:9). Vyhodnoceno na hladině významnosti 95 %, hodnota $A(I_p)$ představuje aritmetický průměr naměřených hodnot pro $n_i = 20$, hodnoty $A(I_p) \pm 2\sigma$ představují varovné meze a hodnoty $A(I_p) \pm 3\sigma$ představují regulační meze.

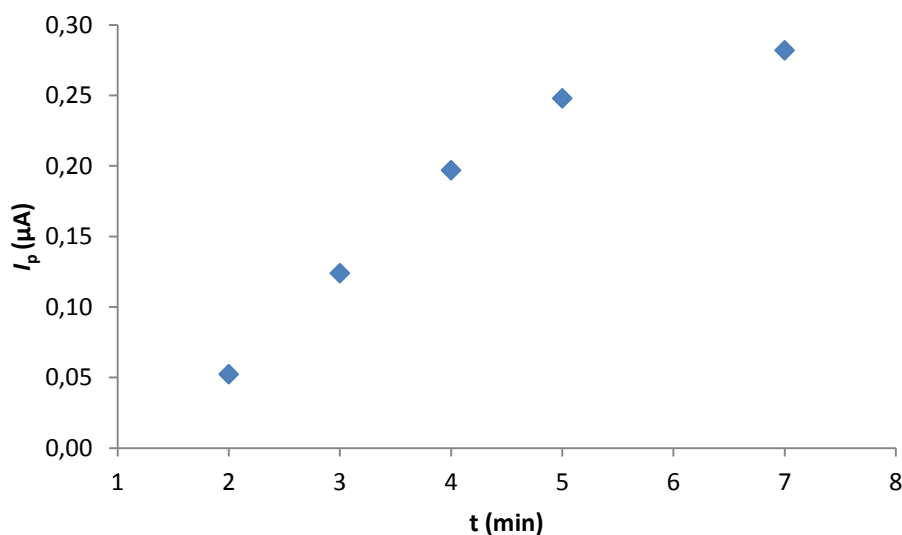


Obr. 38. Závislost výšky oxidačního píku 2-aminoanthracenu ($I_{p,2}$) ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/L) na pořadovém čísle měření, měřeno DPV na DNA/GCE v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 7,0 (v poměru 1:9). Vyhodnoceno na hladině významnosti 95 %, hodnota $A(I_p)$ představuje aritmetický průměr naměřených hodnot pro $n_i = 10$, hodnoty $A(I_p) \pm 2\sigma$ představují varovné meze a hodnoty $A(I_p) \pm 3\sigma$ představují regulační meze.

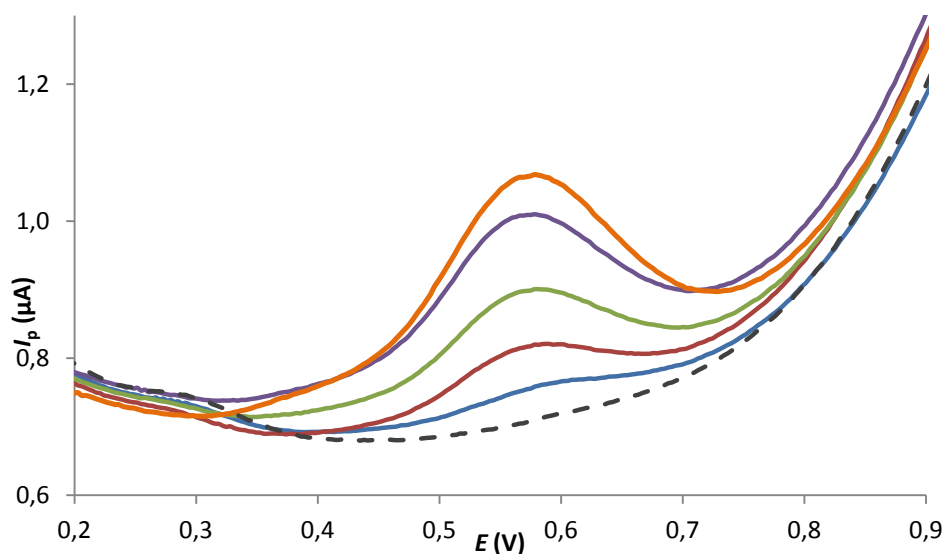
3.3.3 Kalibrační závislosti

Byly proměřeny kalibrační závislosti obou námi vybraných píků poskytovaných 2-aminoanthracenem. Mez stanovitelnosti (L_Q) píku $E_{p,1}$ byla stanovena pomocí DPV na $3 \cdot 10^{-7}$ mol/L. Ale z důvodu splnění cíle práce, kterým bylo vyvinout metody pro stanovení 2-aminoanthracenu díky DNA modifikované elektrodě budou dále diskutovány pouze kalibrační závislost naměřené tímto způsobem. Nejprve byla na DNA/GCE změřena závislost výšky píku 2-aminoanthracenu na době inkubace v roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/L) v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 7,0 (v poměru 1:9). Z naměřených hodnot (obr. 39) vychází optimální inkubační doba 5 min, stejně jako v případě anthracenu. Další nárůst I_p opět nevyváží prodloužení procedury. Při zvolené době inkubace byly proměřeny koncentrace $(1-10) \cdot 10^{-7}$ mol/L a $(1-8) \cdot 10^{-6}$ mol/L v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 7,0 (v poměru 1:9). Každá koncentrace byla měřena na nově připraveném DNA biosenzoru. Získané voltamogramy jsou zaznamenány na obr. 40 (pro koncentrační řád 10^{-7} mol/L) a obr. 41 (pro koncentrační řád 10^{-6} mol/L). Na obr. 42 a 43 jsou odpovídající kalibrační závislosti. Z kalibrační závislost celého rozsahu koncentrací (obr. 42) je patrné, že v řádu 10^{-6} mol/L dochází k výraznému zakřivení závislosti, a tím ztrátě citlivosti metody. Tento jev značí, že výška píku 2-aminoanthracenu nezávisí pouze na koncentraci, ale také na jiných vlivech, které jsou v nízkých koncentracích zanedbatelné (např. pasivace povrchu

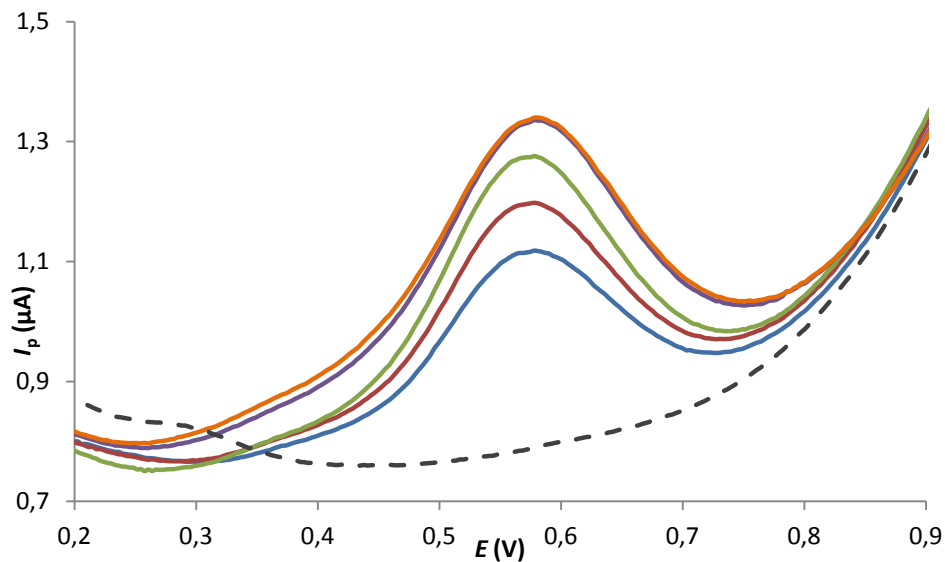
elektrody). Mez stanovitelnosti (L_Q) byla spočítána jako podíl desetinásobku směrodatné odchylky deseti měření nejnižší změřitelné koncentrace kalibrační přímky a směrnice kalibrační přímky. L_Q pro stanovení 2-aminoanthracenu na DNA/GCE má hodnotu $2,8 \cdot 10^{-7}$ mol/L. Rovnice kalibrační přímky má pro koncentrační rozmezí 0,2 až 1,0 $\mu\text{mol/L}$ tvar $I_p = 0,2633c - 0,0141$ (pro I_p v μA a c v $\mu\text{mol/L}$) s korelačním koeficientem (R) 0,999.



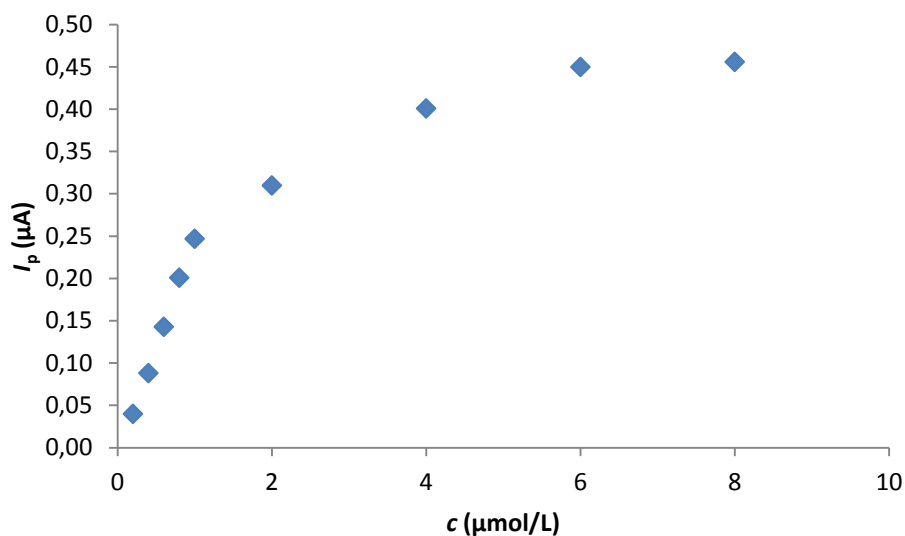
Obr. 39. Závislost výšky píku 2-aminoanthracenu ($I_{p,2}$) na čase inkubace v roztoku 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/L) v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 7,0 (v poměru 1:9), měřeno na DNA/GCE pomocí DP voltametrie.



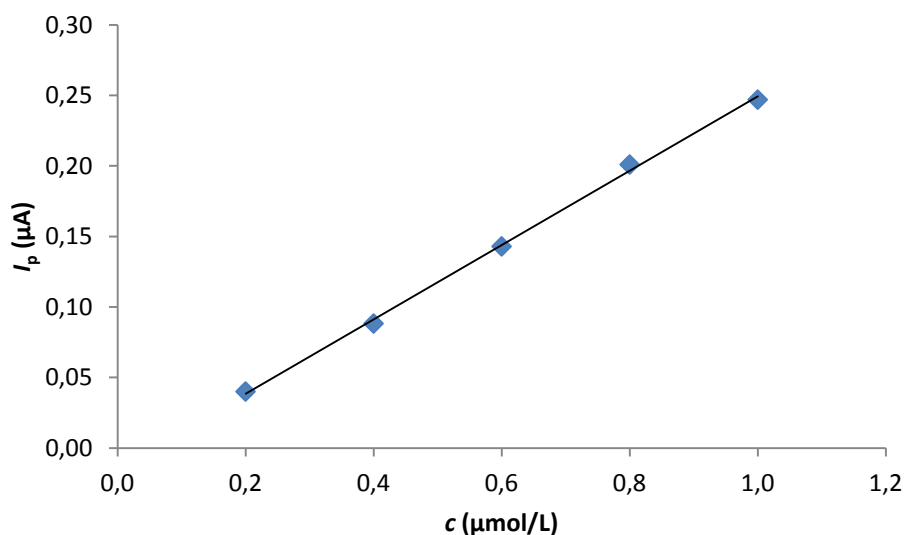
Obr. 40. DP voltamogramy 2-aminoanthracenu ($I_{p,2}$) měřeno na DNA/GCE v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 7,0 (v poměru 1:9); koncentrace $0 \cdot 10^{-7}$ mol/L (-- křivka), koncentrace $2 \cdot 10^{-7}$ mol/L (modrá křivka), $4 \cdot 10^{-7}$ mol/L (červená křivka), $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L (zelená křivka), $8 \cdot 10^{-7}$ mol/L (fialová křivka), $10 \cdot 10^{-7}$ mol/L (oranžová křivka).



Obr. 41. DP voltamogramy 2-aminoanthracenu ($I_{p,2}$) měřeno na DNA/GCE v prostředí ethanol/BR pufr o pH = 7,0 (v poměru 1:9); koncentrace $0 \cdot 10^{-6}$ mol/L (-- křivka), koncentrace $1 \cdot 10^{-6}$ mol/L (modrá křivka), $2 \cdot 10^{-6}$ mol/L (červená křivka), $4 \cdot 10^{-6}$ mol/L (zelená křivka), $6 \cdot 10^{-6}$ mol/L (fialová křivka), $8 \cdot 10^{-6}$ mol/L (oranžová křivka).



Obr. 42. Kalibrační závislost 2-aminoanthracenu ($I_{p,2}$), měřeno na DNA/GCE pomocí DP voltametrie v prostředí ethanol/BR pufr o $\text{pH} = 7,0$ (v poměru 1:9), koncentrační řády 10^{-7} a 10^{-6} mol/L.



Obr. 43. Kalibrační závislost 2-aminoanthracenu ($I_{p,2}$), měřeno na DNA/GCE pomocí DP voltametrie v prostředí ethanol/BR pufr o $\text{pH} = 7,0$ (v poměru 1:9), koncentrační řád 10^{-7} mol/L.

3.3.4 Modelové vzorky

Pro lepší porovnatelnost výsledků vyvinutých metod pro stanovení anthracenu (kapitola 3.2.4) a 2-aminoanthracenu byla i v případě 2-aminoanthracenu dána přednost pevným vzorkům (štěrk, písek), přestože 2-aminoanthracen vykazuje dobrou rozpustnost ve vodných roztocích. Byla opět sledována výtěžnost extrakce 2-aminoanthracenu na DNA/GCE technikou DPV. Vzhledem k jeho vyšší polárnosti byl jako extrakční činidlo použit ethanol. V tabulce 8 jsou ukázány výtěžky extrakcí z štěrku, který dosáhl 99 % a z písku 95 %. Tyto výsledky opět dokazují praktickou použitelnost vyvinuté metody.

Tabulka 8.

Vzorek	Koncentrace přidaná/nalezená (nmol/g)	Výtěžnost extrakce (%)
Štěrk	10/9,9	99 %
Písek	10/9,5	95 %

4. Závěr

Tato práce se zabývá vyšetřováním interakce a následného poškození DNA zástupci polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) a jejich aminoderivátů (APAH) pomocí jednoduchého elektrochemického biosenzoru na bázi elektrody ze skelného uhlíku (GCE) a nízkomolekulární DNA z lososích spermií. Touto cestou se snažíme poskytnout levnější, jednodušší, ale stejně citlivou metodu k již používaným metodám, jako jsou gelová elektroforéza nebo UV/VIS spektroskopie. K detekci poškození DNA způsobeného polycyklickými aromatickými uhlovodíky a jejich deriváty bylo využito dvou elektrochemických technik – square-wave voltametrie (SWV) a elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS). Poškození DNA bylo pozorováno na DNA modifikované elektrodě (DNA/GCE) pomocí poklesu výšky píku guanosinu ($I_{p,G}$) a adenosinu ($I_{p,A}$) při SWV a díky změně odporu přenosu náboje (R_{CT}) při EIS. Poklesy $I_{p,G}$ a $I_{p,A}$ značí snížení počtu guanosinu a adenosinu na povrchu elektrody, které může být způsobeno odpadáváním částí vláken DNA z povrchu elektrody vlivem interkalace poškozující látky do dvoušroubovice DNA. Odpor přenosu náboje (R_{CT}) nám dává informaci o změnách na povrchu elektrody. Zatímco u holé elektrody není R_{CT} téměř žádný, na DNA/GCE, kdy je povrch elektrody pokryt vrstvou DNA, R_{CT} výrazně roste. Při poškození DNA může dojít vlivem interkalace ke zlomům ve struktuře DNA, z povrchu elektrody odpadávají části DNA, tím se povrch opět odkrývá a R_{CT} klesá. Poškození DNA bylo pozorováno při interakci DNA s 2-aminoanthracenem. Při interakci DNA s anthracenem došlo ke vzniku komplexu vlivem interkalace anthracenu do molekuly DNA, potenciál komplexu je shodný s potenciálem oxidace guanosinu a to znemožňuje další vyšetřování. V případě interakce DNA s naftalenem nebyly pozorované žádné změny signálů – usuzujeme, že naftalen nezpůsobuje poškození DNA.

U anthracenu a 2-aminoanthracenu, u kterých se prokázala interkalace do dvoušroubovice DNA, bylo studováno jejich elektrochemické chování za účelem vyvinout nové, jednoduché a citlivé elektrochemické metody pro jejich stanovení. Interakce látky s DNA mělo být využito pro získání vyšší citlivosti vyvinutých metod. Chování bylo studováno pomocí DC voltametri a diferenční pulzní voltametrie (DPV) nejprve na nemodifikované GC elektrodě. Proměřením pH závislosti v Brittonově-Robinsonově pufru jsme získali optimální pH. V případě anthracenu jsme zvolili pH = 5,0 pro obě techniky. Při zvoleném pH byla testována opakovatelnost měření, která měla pro anthracen hodnotu 1,8 % pro DPV a 1,5 % pro DCV ($n = 20$). Kalibrační závislost anthracenu na GCE byly změřeny za zvolených optimálních podmínek v rozsahu koncentrací $1 \cdot 10^{-6}$ až $10 \cdot 10^{-5}$ mol/L s dosaženou

mezi stanovitelností (L_Q) $2,2 \cdot 10^{-6}$ mol/L pro DPV. Na DNA/GCE bylo díky interkalaci látky do dvoušroubovice DNA dosaženo vyšší citlivosti stanovení a nižšího $L_Q = 1,5 \cdot 10^{-7}$ mol/L.

V případě 2-aminoanthracenu byla používána pouze DPV, kvůli vyšší citlivosti pro stanovovanou látku. 2-Aminoanthracen poskytuje více voltametrických signálů, které je možné použít pro stanovení. Nejvyšší pík s potenciálem $-0,2$ V při $\text{pH} = 7,0$ ($E_{p,1}$) by mohl sloužit k nepřímému stanovení 2-aminoanthracenu, odpovídá totiž pravděpodobně dimerní azosloučenině 2-aminoanthracenu. Hodnota opakovatelnosti pro $E_{p,1}$ je 2,9 %. Proměřením kalibrační závislosti tohoto píku metodou DPV na GCE v rozsahu $1 \cdot 10^{-7}$ až $10 \cdot 10^{-6}$ mol/L získáváme mez stanovitelnosti (L_Q) $3 \cdot 10^{-7}$ mol/L. V řádu 10^{-6} mol/L dochází k velkému zakřivení kalibrační závislosti. Tento jev může být způsoben tím, že výška píku 2-aminoanthracenu nezávisí pouze na koncentraci, ale i jiných vlivech, které jsou v nízkých koncentracích zanedbatelné (např. pasivace elektrodového povrchu). Druhým signálem vhodným ke stanovení 2-aminoanthracenu je signál s potenciálem okolo $0,6$ V při $\text{pH} = 7,0$ ($E_{p,2}$). Signál v této oblasti je využitelný pro stanovení 2-aminoanthracenu s pomocí DNA/GCE. L_Q i v tomto případě vyjde velmi podobně, a to $2,8 \cdot 10^{-7}$ mol/L. Díky DNA modifikované elektrodě ale získáváme lepší opakovatelnost měření $E_{p,2}$ rovnou 3,1 % oproti 10 % na GCE.

Použitelnost vyvinutých technik byla ověřena na modelových vzorcích. Byla provedena extrakce stanovovaných látek z reálných matic. Extrakcí anthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/L) pomocí hexanu ze štěrku (velikost částic 3 mm) bylo dosaženo 99 % výtěžnosti, z písku (velikost částic menší než 1 mm) 96 % výtěžnosti na DNA/GCE. Extrakcí 2-aminoanthracenu ($c = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/L) pomocí ethanolu ze štěrku bylo dosaženo 97 % výtěžnosti a z písku 98 % výtěžnosti na DNA/GCE.

5. Literatura

- (1) Mailu S. N., Waryo T., Ndangili P. M., Ngece F. R., Baleg A. A., Baker P. G., Iwuoha E. I.: Determination of anthracene on Ag-Au alloy nanoparticles/overoxidized-polypyrrole composite modified glassy carbon electrodes, *Sensors*, 2010, 10, 9449-9465.
- (2) Dodor D. E., Hwang H., Ekunwe S. I. N.: Oxidation of anthracene and bezo(a)pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 35, 210-217.
- (3) Liu K., Han W., Pan W., Riley J.: Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from a coal-fired pilot FBC system. *Journal of Hazardous Materials*, 2001, B84, 175-188.
- (4) Mastrangelo G., Fadda E., Marzia V.: Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environmental Health Perspectives*, 1996, 104, 1166-1170.
- (5) Pratt M. M., John K., MacLean A. B., Afework S., Phillips D. H., Poirier M. C.: Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA adduct semi-quantitation in archived human Tissues. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2011, 8, 2675-2691.
- (6) Mazur M., Blanchard G. J.: Photochemical and electrochemical oxidation reaction of surface-bound polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Physical Chemistry*, 2004, 108, 1038-1045.
- (7) Cremonesi P., Rogan E., Cavalieri E.: Correlation studies of anodic peak potentials and ionization potentials for polycyclic aromatic hydrocarbons, *Chemical Research in Toxicology*, 1992, 5, 346-355.
- (8) King A. J., Readman J. W., Zhou J. L.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid-phase microextraction – gas chromatography – mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 2004, 523, 259-267.
- (9) Zha Q., Qian N. X., Moldoveanu S. C.: Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in the particulate phase of cigarette smoke using a gas chromatographic-high-resolution mass spectrometric technique. *Journal of Chromatographic Science*, 2002, 40, 403-408.
- (10) Poster D. L., Schantz M. M., Sander L. C., Wise S. A.: Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental sample: A critical review of gas chromatographic (GC) methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 386, 859-881.

- (11) Hatrik Š., Lehotay J.: HPLC Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in tap water with on-line preconcentration. *Chemical Papers*, 1994, 48, 334-336.
- (12) Kishikawa N., Wada M., Kuroda N., Akiyama S., Nakashima K.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 2003, 789, 257-264.
- (13) Węgrzyn E., Grzeskiewicz S., Popławska M., Głód B. K.: Modified analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons using SEC for sample preparation and RP-HPLC with fluorescence detection. Application to different food samples. *Acta Chromatographica*, 2006, 17, 233-249.
- (14) Holoubek I.: Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) v prostředí. Český ekologický ústav. Praha, 1996.
- (15) Gato W. E., McGee S. R., Hales D. B., Means J. C.: Time-dependent regulation of apoptosis by AEN and BAX in response to 2-aminoanthracene dietary consumption. *Toxicology International*, 2014, 21, 57-64.
- (16) Morris I. D., Ilott S., Dixon L., Brison D. R.: The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction*, 2002, 17, 990-998.
- (17) Lee R. F., Steinert S.: Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 2003, 544, 43-64.
- (18) Hook S. E., Lee R. F.: Genotoxicant induced DNA damage and repair in early and late development stages of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* embryo as measured by the comet assay. *Aquatic Toxicology*, 2004, 66, 1-14.
- (19) Gao X., Stassinopoulos A., Gu J., Goldberg I. H.: NMR Studies of the post-activated neocarzinostatin chromophore-DNA complex. Conformation changes induced in drug and DNA. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 1995, 3, 795-809.
- (20) Sandström K., Wärmländer S., Leijon M., Gräslund A.: ¹H NMR studies of selective interaction of norfloxacin with double-stranded DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 304, 55-59.
- (21) Shen H., Shao X., Xu H., LI J., Pan S.: In vitro study of DNA interaction with trichlorobenzenes by spectroscopic and voltammetric techniques. *International Journal of Electrochemical Science*, 2011, 6, 532-547.

- (22) Wang Y. X., Ni Y. N., Kokot S.: Investigation of interaction of carbofuran and DNA by voltammetry and fluorescence with the aid of chemometrics. *Chinese Chemical Letters*, 2010, 21, 963-967.
- (23) Wang Q., Gao F., Yue X., Li W., Liu A., Jiao K.: Electrochemical studies on the binding of a carcinogenic anthraquinone dye, Purpurin (C.I. 58 205) with DNA. *Dyes and Pigments*, 2010, 84, 213-217.
- (24) Hajian R., Ekhlasi E., Daneshvar R.: Spectroscopic and electrochemical studies on the interaction of epirubicin with fish sperm DNA. *E-Journal of Chemistry*, 2012, 9, 1587-1598.
- (25) Hajian R., Takavol M.: Interaction of anticancer drug methotrexate with ds-DNA analyzed by spectroscopic and electrochemical methods. *E-Journal of Chemistry*, 2012, 9, 471-480.
- (26) Radi A. E., Wahdan T., Anwar Z., Mostafa H.: Electrochemical and spectroscopic studies on the interaction of gatifloxacin, moxifloxacin and sparfloxacin with DNA and their analytical application. *Electroanalysis*, 2010, 22, 2665-2671.
- (27) Bagni G., Osella D., Sturchio E., Mascini M.: Deoxyribonucleic acid (DNA) biosensors for environmental risk assessment and drug studies. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 573-574, 81-89.
- (28) Arotiba O., Owino J., Songa E., Hendricks N., Waryo T., Jahed N., Baker P., Iwuoha E.: An electrochemical DNA biosensor developed on a nanocomposite platform of gold and poly(propyleneimine) dendrimer, *Sensors*, 2008, 8, 6791-6809.
- (29) Skládal P.: Biosenzory. Masarykova univerzita v Brně. Brno, 2002, 3-12.
- (30) Barek J., Pecková K., Vyskočil V.: Kam směřují moderní elektroanalytické metody 50 let po udělení Nobelovy ceny za Polarografii. *Chemické Listy*, 2009, 103, 889-893.
- (31) Lucarelli F., Tombelli S., Minunni M., Marrazza G., Mascini M.: Electrochemical and piezoelectric DNA biosensor for hybridisation detection. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 609, 139-159.
- (32) Bagni G., Hernandez S., Mascini M., Sturchio E., Boccia P., Marconi S.: DNA biosensor for rapid detection of genotoxic compounds in soil samples. *Sensors*, 2005, 5, 394-410.
- (33) Ziyatdinova G., Labuda J.: Complex electrochemical and impedimetric evaluation of DNA damage by using DNA biosensor based on carbon screen-printed electrode. *Analytical Methods*, 2011, 3, 2777-2782.

- (34) Niu S., Li F., Zhang S., Wang L., Li X., Wang S.: Studies on the interaction mechanism of 1,10-phenantroline cobalt(II) complex with DNA and preparation of electrochemical DNA biosensor. *Sensors* 2006, 6, 1234-1244.
- (35) Vyskočil V., Blašková M., Hájková A., Horáková E., Krejčová Z., Stávková K., Wang J.: Electrochemical DNA biosensors – Useful diagnostic tools for the detection of damage DNA caused by organic xenobiotics (A review). *Sensing in Electroanalysis*, 2012, 7, 141-162.
- (36) Wang P., Ni Y., Kokot S.: A novel dsDNA/polydiphenylamine-4-sulfonic acid electrochemical biosensor for selective detection of the toxic catechol and related DNA damage. *Analyst*, 2013, 138, 1141-1148.
- (37) Salah K. M. A., Alrokyan S. A., Khan M. N., Ansari A. A.: Nanomaterials as analytical tools for genosensors. *Sensors*, 2010, 10, 963-993.
- (38) Wang J.: Electrochemical biosensors: Toward point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21, 1887-1892.
- (39) Qiu Y., Fan H., Liu X., Ai S., Tang T., Han R.: Electrochemical detection of DNA damage induced by in situ generated bisphenol A radicals through electro-oxidation, *Microchimica Acta*, 2010, 171, 363-369.
- (40) Du M., Yang T., Jiao K.: Carbon nanotubes/(pLys/dsDNA)_n layer-by-layer multilayer films for electrochemical studies of DNA damage. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2010, 14, 2261-2266.
- (41) Wu H., Zuo Y., Cui Ch., Yang W., Ma H., Wang X.: Rapid quantitative detection of *Brucella melitensis* by a label-free impedance immunosensor based on a gold nanoparticle-modified screen-printed carbon electrode. *Sensors*, 2013, 13, 8551-8563.
- (42) Hlavatá L., Beníková K., Vyskočil V., Labuda J.: Evaluation of damage to DNA induced by UV-C radiation and chemical agents using electrochemical biosensor based on low molecular weight DNA and screen-printed carbon electrode, *Electrochimica Acta*, 2012, 71, 134-139.
- (43) Nowicka A. M., Kowalczyk A., Scholz F., Stojek Z.: Changes in performance of DNA biosensor caused by hydroxyl radicals. *Electroanalysis*, 2011, 23, 55-62.
- (44) Fojta M.: Electrochemical sensors for DNA interaction and damage. *Electroanalysis*, 2002, 14, 1449-146.
- (45) Lopes H. C., Oliveira S. C. B., Oliveira-Brett A. M.: In situ electrochemical evaluation of anticancer drug temozolomide and its metabolites-DNA interaction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405, 3783-3790.

- (46) Yang Y., Zhou J., Zhang H., Gai P., Zhang X., Chen J.: Electrochemical evaluation of total antioxidant capacities in fruit juice based on the guanine/graphene nanoribbon/glassy carbon electrode. *Talanta*, 2013, 106, 206-211.
- (47) Barroso M. F., Delerue-Matos C., Oliveira M. B. P. P.: Electrochemical evaluation of total antioxidant capacity of beverages using a purine-biosensor. *Food Chemistry*, 2012, 132, 1055-1062.
- (48) Ziyatdinova G., Labuda J.: Biosensor with protective membrane for detection of DNA damage and antioxidant properties of fruit juice. *Electroanalysis*, 2012, 12, 2333-2340.
- (49) Xiong H., Wang Y., Zhang X., Ye Y., Wang S.: Evaluation of antioxidative capacity via measurement at the damage of DNA using an electrochemical biosensor and an ionic liquid solvent. *Microchimica Acta*, 2012, 176, 479-484.
- (50) Wang J.: Analytical Electrochemistry, 2. vydání. John Wiley, Hoboken 2001.
- (51) Barek J., Opekar F., Štulík K.: Elektroanalytická chemie. Univerzita Karlova v Praze, Praha, 2005, 77-81.
- (52) Kalvoda R., Kůta J.: Moderní polarografické a voltametrické metody. *Chemické Listy*, 1980, 74, 674-693.
- (53) Tatarkovič M., Broncová G., Krondřák M.: Elektroimpedanční spektroskopie a její využití v chemické analýze. *Chemické Listy*, 2012, 106, 1067-1074.
- (54) Guan J., Miao Y., Zhang Q.: Impedimetric biosensor, review, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004, 4, 219-226.
- (55) Daniels J. S., Pourmand N.: Label-free impedance biosensor: Opportunities and challenges. *Electroanalysis*, 2007, 19, 1239-1257.
- (56) Kariyajjanavar P., Narayana J., Nayaka Y. A., Umanaik M.: Electrochemical degradation and cyclic voltammetric studies of textile reactive azo dye Cibacron Navy WB. *Portugaliae Electrochimica Acta*, 2010, 28, 265-277.
- (57) Pinheiro H.M., Touraud E., Thomas O.: Aromatic amines from azo dye reduction: Status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes and Pigments*, 2004, 61, 121-139.
- (58) Hammerich O., Parker V. D.: Electrochemistry in Media of Intermediate Acidity Redox Equilibria of Anthracene Cation Radicals, Dications, and Cationic Addition Products. *Journal of the American Chemical Society*, 1974, 13, 4289-4296.
- (59) German N., Armalis S.: Voltammetric Determination of Naphthalene, Fluorene and Anthracene Using Mixed Water-organic Solvent Media. *Chemija*, 2012, 23, 86-90.