

Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Analytical Chemistry

Study program:
Analytical Chemistry

Summary of the Dissertation Thesis



Mgr. Eva Horáková

**Mercury Electrodes as Tools for Voltammetric
Determination of Biologically Active Organic Compounds
and for Detection of Their
Interaction with DNA**

Supervisor: doc. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.
Supervisor-consultant: prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.

Prague, 2016

Abstract

The main aim of this work was to use traditional mercury electrodes for the development of voltammetric methods of determination of organic xenobiotics and for the electrochemical study of the interaction between double-stranded deoxyribonucleic acid (DNA) and these compounds.

In relation to my previous research work (conducted in the framework of my diploma thesis), firstly, 4-nitrobiphenyl (4-NBP), the suspected carcinogen, was studied. Interaction of DNA with 4-NBP was studied using differential pulse voltammetry (DPV), cyclic voltammetry (CV), and chronocoulometry at a hanging mercury drop electrode (HMDE), and using CV and alternating current voltammetry at a DNA modified HMDE. Using CV, the reduction mechanism was investigated. The interaction of DNA with 4-aminobiphenyl (4-ABP), a metabolite of 4-NBP, and 4-NBP reduction intermediates was studied. It was found that the interaction of DNA with 4-NBP or 4-ABP results in a formation of a DNA aggregate with these analytes.

The second studied analyte was methyl violet 2B (MV). For determination of MV in a buffered solution were used: direct current fast polarography and differential pulse polarography at a dropping mercury electrode, and direct current voltammetry, DPV, and differential pulse adsorptive stripping voltammetry (DPAdSV) at HMDE. The lowest limit of quantification was reached using DPAdSV at HMDE, i.e., 13 nmol L^{-1} . The developed methods were used for determination of MV in model samples of drinking and river water.

Interaction of DNA with MV in buffered solution was studied using DPV, CV, chronocoulometry, and UV-Vis spectrophotometry. As same as for 4-NBP, the reduction mechanism of MV was studied using CV. It was found that the reduction of DNA with MV results in a formation of a DNA–MV complex. Moreover, based on the decrease of the MV peak current with an increasing concentration of DNA in the measured solution, the method of indirect determination of DNA was developed.

Contents

1.	Introduction.....	7
1.1	Analytes	7
1.2	DNA Damage Detection	9
2.	Aims of the Study	11
3.	Methods and Reagents.....	12
3.1	Working Electrodes	12
3.2	Polarography and Voltammetry	13
3.3	General Procedures	14
3.4	Reagents.....	14
4.	Results and Discussion.....	15
4.1	Study of the Interaction of DNA with 4-Nitrobiphenyl	15
4.2	Polarographic and Voltammetric Determination of Methyl Violet 2B at Mercury Electrodes	17
4.3	Study of the Interaction of DNA with Methyl Violet 2B	17
5.	Conclusion	19
	References	20
	Curriculum Vitae	25
	List of Publications, Oral and Poster Presentations	27

The financial support of my work was provided by the following sources: Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (SVV-2012-265201, SVV-2013-267215, SVV-2014-260084, SVV-2015-260205, SVV-2016-260713), the "Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových" Foundation, and by the Czech Science Foundation (P206/12/G151).

1. Introduction

Since the polarography was invented by Jaroslav Heyrovský in 1922, wide range of inorganic and organic analytes in various matrices was studied, and a number of different electrode materials was developed. For the basic research of the electrochemical behavior and study of the reduction mechanism, mercury still represents the most reliable electrode material. Nowadays, voltammetry is not intended only for the determination of analytes in different samples, but it is also a useful tool for a modern biochemical research.

Presented dissertation thesis is focused on the use of mercury electrodes for the determination of biologically active compounds, and for the study of the DNA damage caused by its interaction with them [1-5]. In this thesis, (i) the DNA damage caused by 4-nitrobiphenyl (4-NBP, CAS Number 92-93-3) [3], the environmental pollutant [6], and (ii) the electrochemical behavior of methyl violet 2B (MV, CAS Number 8004-87-3), belonging to the group of triphenylmethane (TPM) dyes inducing many negative effects [7-9], its determination [4], and interaction with DNA [5] are studied in detail.

1.1 Analytes

4-NBP belongs to the group of nitrated aromatic hydrocarbons (NAHs). Sometimes, it is categorized also to the group of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (NPAHs). They are formed by reactions of (polycyclic) aromatic hydrocarbons with atmospheric nitrogen oxides during incomplete combustion processes or in polluted atmosphere [10]. 4-NBP is one of the most volatile NAHs, and in the air, it occurs in the gas phase [11]. From the air, it can be transferred by rain into natural waters and soil. 4-NBP was found in soil extracts [12], air [13], residential honeycomb coal briquette combustion emissions [14], and diesel exhaust particles [15].

In living organisms, the genotoxicity of NAHs/NPAHs is induced by forming of free anion-radicals from NAHs/NPAHs by their enzymatic transformation [16]. By the metabolic reduction of the aromatic nitro group, harmful species, which can react with the cellular macromolecules, are formed [17]. Therefore, the importance of monitoring NAHs and NPAHs in the environment is still increasing [18].

According to the International Agency for Research on Cancer (IARC), 4-NBP is listed in group 3 (agents not classifiable as to its carcinogenicity to humans) [19]. However, its

carcinogenic effect was observed on dogs [20]. There are ten reductive metabolites of 4-NBP [21], the major ones are 4-aminobiphenyl (4-ABP, CAS Number 92-67-1) and *N*-hydroxy-4-aminobiphenyl, both are carcinogens [22-24]. A general overview of the metabolism, DNA damage, and mutagenesis induced by NAHs is figured in Fig. 1 [24], it is expected that 4-NBP undergoes the same metabolic ways.

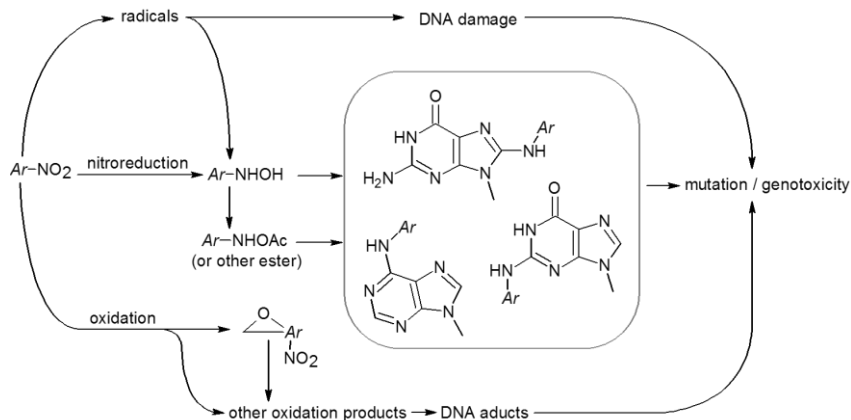


Fig. 1. An overview of the metabolism, DNA damage, and mutagenesis induced by NAHs [24]. *Ar* stands for aromatics.

For the determination of 4-NBP, chromatographic techniques are very useful and in a routine analysis often used [6,13,15,25]. Electrochemical behavior and determination of 4-NBP have been studied at mercury electrodes [26], a mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode [27], or a glassy carbon rotating disk electrode [26].

MV is a synthetic dye belonging to the group of TPM dyes. These organic dyes were used for fabrics dyeing [28,29]. Nowadays, TPM dyes are used in paper dyeing [30], as inks [31], as pH indicators [32], and for coloring in food industry [33], pharmacy, and cosmetics. Because of the bactericidal and fungicidal effects, TPM dyes are used for medical purposes, e.g., as local antiseptic agents [34]. TPM dyes are potentially harmful for humans because of their many negative effects [7,9,35]. Studies engaged in the biological effects, and monitoring of their occurrence are required [30], as same as the studies of the treatment of environment and removal of TPM dyes from it [36,37].

MV can be determined using spectrometric methods [28,29]. MV is chemically reducible due to the presence of the double bond between nitrogen and carbon atoms. Hence, the investigation of its electrochemical behavior and its determination are possible using electrochemical methods [38,39].

1.2 DNA Damage Detection

Damage to DNA arises from the interactions of DNA with chemical or physical agents occurring in the environment and may involve a variety of entities [40]. There are several types of consecutive DNA structural changes. Two basic groups can be distinguished, i.e., strand breaks or damage to DNA bases [41]. Formation of DNA double-strand breaks frequently leads to chromosome aberrations and mitotic faults; their accumulation represents carcinogenic or teratogenic risk [40].

Non-covalent DNA interactions with small molecules, e.g., potentially genotoxic agents, can be monitored using electrochemical measurements. Formation of the non-covalent DNA–analyte complexes may lead to the changes of electrochemical signals of either DNA [3,42] or the analytes [3,5]. Electrochemical techniques represent in these studies very useful tools, utilizing mercury [3,5,42], amalgam [43], and carbon [44] working electrodes. DNA biosensors are useful tools for the detection of DNA damage. In general, a biosensor is a device incorporating a biological sensing element (e.g., DNA) either intimately connected to or integrated within a transducer (e.g., carbon or mercury electrode) [3,5,44,45]. For this purpose, HMDE is suitable. The mercury is simply dropped into the DNA stock solution. After flushing with deionized water, the DNA modified HMDE (DNA-HMDE) biosensor is ready to use, see Fig. 2.

For DNA damage detection, cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV), square wave voltammetry (SWV), and chronopotentiometry are the most frequently used techniques [2,3,43], other used are electrochemical impedance spectroscopy and alternating current voltammetry (ACV) [2]. The DNA detection techniques can be categorized into the following groups: (i) label-free [3,5,42]; (ii) using redox indicators non-covalently bound to DNA [46]; and (iii) employing electrochemically active labels covalently bound to DNA. All three groups are described in [2].

Use of CV in the label-free mode allows the study of the peak of cytosine and adenine moieties (peak CA) at ca -1.45 V in a reduction scan, and of the 7,8-dihydroguanine moiety

at ca -0.3 V in an anodic scan. Causes of the changes of the DNA CV peak currents are explained in detail in [2,3,5].

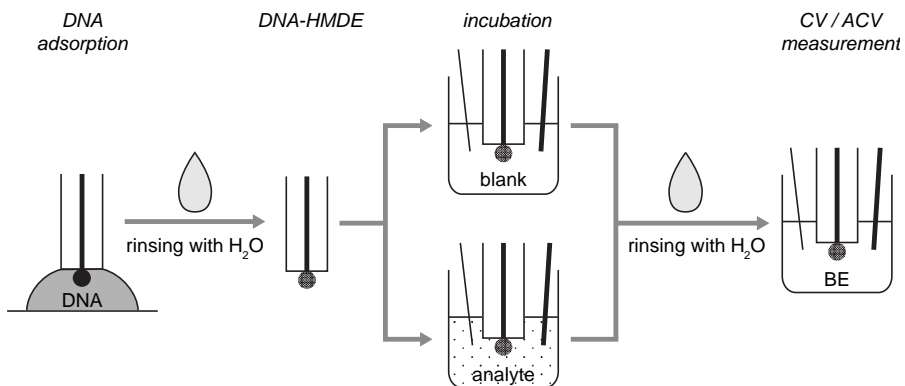


Fig. 2. Scheme of the preparation of DNA modified hanging mercury drop electrode (DNA-HMDE). *BE* stands for a base electrolyte.

Using ACV in the label-free mode, DNA structural changes and DNA damage are studied via the surface changes of DNA-HMDE. In AC voltammograms of DNA, three peaks can be distinguished: peak 1 at ca -1.2 V (reorientation or desorption of adsorbed DNA), peak 2 at ca -1.3 V (caused by native (double-stranded) DNA form), and peak 3 at ca 70 mV more negative potential than peak 2 (caused by denatured (single-stranded) DNA form). Changes of the DNA ACV peak currents are explained in detail in [3,42].

Using DPV in the label-free mode, the study of the analyte peak is possible, too. If the analyte can serve as a redox indicator and the interaction is noncovalent, it is possible to predict how the analyte interacts with DNA from the peak potential (E_p) shift [2]. Moreover, from the change of the analyte peak current (I_p), it is possible to calculate values of the binding constant (K) and binding ratio (m) [5].

2. Aims of the Study

This dissertation thesis has been submitted as a contribution to a demand for methods of determination of biologically active organic compounds and for the methods of DNA damage detection caused by the interaction with these compounds. It was elaborated under the framework of a long-term research at UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry in Prague. In this dissertation thesis, the research continues on the diploma thesis Voltammetric Determination of Genotoxic Nitrobiphenyls, and voltammetric behavior and interaction of DNA with another biologically active compound, methyl violet 2B, is investigated.

The presented dissertation thesis is based on the following five scientific publications [1-5]. To distinguish the references referring to these publications in the entire text of the thesis, corresponding numbers in square brackets are in bold.

- [1] J. Gajdár, **E. Horáková**, J. Barek, J. Fischer, V. Vyskočil: Recent Applications of Mercury Electrodes for Monitoring of Pesticides: A Critical Review. *Electroanalysis* **28** (2016), DOI: 10.1002/elan.201600239, in press.
- [2] V. Vyskočil, M. Blašková, A. Hájková, **E. Horáková**, Z. Krejčová, K. Stávková: *Electrochemical DNA Biosensors – Useful Diagnostic Tools for the Detection of Damage to DNA Caused by Organic Xenobiotics (A Review)*. In Book *Sensing in Electroanalysis*, K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vyřas (Eds.), 141-162. University Press Centre, Pardubice 2012.
- [3] **E. Horáková**, J. Barek, V. Vyskočil: Voltammetry at a Hanging Mercury Drop Electrode as a Tool for the Study of the Interaction of Double-Stranded DNA with Genotoxic 4-Nitrobiphenyl. *Electroanalysis* **28** (2016), DOI: 10.1002/elan.201600241, in press.
- [4] **E. Horáková**, J. Barek, V. Vyskočil: Determination of Methyl Violet 2B Using Polarographic and Voltammetric Methods at Mercury Electrodes. *Analytical Letters* **49**, 56-65 (2016).
- [5] **E. Horáková**, V. Vyskočil, J. Barek: Interaction Study of Methyl Violet 2B with DNA and Voltammetric Determination of DNA in Aqueous Solutions. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **147**, 119-126 (2015).

With respect to the facts mentioned in previous chapter, the presented dissertation thesis is focused on the use of mercury electrodes for the determination of biologically active compounds, and for the study of the DNA damage caused by the interaction with them. In this thesis, (i) the DNA damage caused by its interaction with 4-NBP, and (ii) the electrochemical behavior of MV, its determination, and interaction with DNA are studied in detail.

Main aims of this study were:

- Development of the methods for the investigation of the interaction between DNA and 4-NBP at a hanging mercury drop electrode (HMDE) and DNA modified HMDE (DNA-HMDE), and a characterization of the interaction. Investigation of the reduction of 4-NBP in the absence and in the presence of DNA.
- Study of DNA damage caused by its interaction with 4-NBP.
- Development of sensitive polarographic and voltammetric methods for the determination of MV in solution at a dropping mercury electrode (DME) and HMDE, and verification of developed methods on model samples of drinking and river water.
- Study of the interaction of DNA with MV at HMDE, and characterization of this interaction. Investigation of the reduction of MV in the absence and in the presence of DNA.

3. Methods and Reagents

3.1 Working Electrodes

DME was used for the basic polarographic studies of the electrochemical behavior of MV. Determination of MV was performed using direct current polarography (DCTP) and differential pulse polarography (DPP). The electronically controlled (by the Eco-Tribo Polarograph potentiostat driven by Polar Pro 5.1) mercury drop lifetime was 1 s, the maximum mercury drop surface was 2.25 mm², and the flow rate of mercury through the capillary was 4.30 mg s⁻¹ [4]. The main advantages of DME are the inhibited passivation by

the products and intermediates of the reduction, the wide potential range, reliability, simplicity, etc. [47,48]. The greatest disadvantages are low robustness and lower selectivity. The usual limits of quantification (L_Q) achieved using DPP at DME are around 10^{-5} mol L⁻¹ [48].

HMDE was used for the determination of MV and for the interaction studies of DNA with 4-NBP or MV. HMDE is a very useful tool for the environmental analysis [1,5,47] and detection of DNA damage [4,5]. There are many advantages of the use of HMDE in comparison to the use of DME, e.g., the reachable L_Q are lower thanks to the opportunity of the use of adsorptive or electrolytic accumulation (L_Q up to 10^{-10} mol L⁻¹), a consumption of mercury is lower, and it is possible to modify the electrode surface. On the other hand, it can be passivated, and the mechanics and electronics are more complex [48]. For the determination of MV [3], the HMDE was controlled by the Eco-Tribo Polarograph potentiostat driven by Polar Pro 5.1, the mercury drop surface was 1.37 mm². For the interaction studies of DNA with 4-NBP [3] or MV [5], the HMDE was controlled by the Autolab PGSTAT10 potentiostat/galvanostat connected to a Metrohm 663 VA Stand controlled by the Nova 1.1 (measurements of DPV, CV, and chronocoulometry) or Nova 2.0 (CV and ACV) software, the mercury drop surface area was 0.49 mm².

3.2 Polarography and Voltammetry

Thanks to the use of modern digital potentiostats, wide range of voltammetric techniques is available. In analytical chemistry for the determination of analytes, the most frequently used are DCV, DPV, and DPAdSV [1,27,43].

For the purposes of the research on reduction/oxidation mechanisms or DNA damage, CV, ACV, and SWV are often employed [2,3,5,40,42,49,50].

DCTP and DPP represent very robust polarographic techniques which are employed in current research and analysis [1]. In this work, DCTP and DPP at DME with scan rate (ν) 4 mV s⁻¹; and DCV, DPV, and DPAdSV at HMDE with ν 20 mV s⁻¹ were used for the determination of MV. DPV, CV, and ACV were used for the interaction studies. The specific values of ν and other method settings are given in the appropriate papers [3,4,5].

The measurements were performed in a three-electrode system, with DME or HMDE as a working electrode, a Ag|AgCl (3 mol L⁻¹ KCl) reference electrode, and platinum wire as an auxiliary electrode.

3.3 General Procedures

Measurements at DME and HMDE: The measured solutions were prepared into a 10 mL volumetric flask, and transferred into a voltammetric cell. When the interaction was studied, then, an appropriate volume of DNA was added. Oxygen was removed by bubbling with nitrogen (purity class 4.0, Linde Gas, Czech Republic) for 5 min before each measurement, and a nitrogen atmosphere was then maintained above the solution in the cell; this time served also for the equilibration of the interaction of DNA with the analyte.

Measurement at DNA-HMDE: the HMDE drop was created into a drop of the DNA solution (1 mg mL^{-1}), immediately washed with deionized water, and transferred into a base electrolyte. In this way, the DNA modified HMDE was prepared. The incubation of DNA-HMDE in the analyte solution was foregoing some measurements (for the scheme, see Fig. 2). All measurements were performed after 2 min bubbling with nitrogen.

All measurements were performed three times, and all values for the construction of functional dependences were calculated as arithmetic averages. All measurements were carried out at laboratory conditions. All figures were drawn up using the Origin Pro 8.0 software (OriginLab Corporation, USA), and mathematical and statistical quantities (all for the significance level $\alpha = 0.05$) were calculated using the Microsoft Excel 2013 software (Microsoft Corporation, USA).

3.4 Reagents

Stock solutions (1 mmol L^{-1}) of 4-NBP, MV, and 4-ABP (all p.a. purity) were prepared by dissolving of appropriate amount of the substance in 100 mL of methanol (99.9%, p.a. purity). The stock solutions of DNA (γ_{DNA} : 1, 10, and 50 mg mL^{-1} ; concentration 10 mg mL^{-1} corresponds to the concentration of DNA base pairs 0.04 mol L^{-1}) were prepared by dissolving low molecular weight salmon sperm double-stranded DNA in 0.3 mol L^{-1} NaCl or in deionized water, and stored at 4 °C. Phosphate buffer (pH 7.0) was prepared from $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ in concentrations 0.1, 0.01, or 0.001 mol L^{-1} . Britton-Robinson buffers were prepared by titrating a mixture of H_3BO_3 , H_3PO_4 , and CH_3COOH (all 0.04 mol L^{-1}) with 0.2 mol L^{-1} NaOH. Acetate buffer (0.01 mol L^{-1} , pH 4.0) was prepared from $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ and from CH_3COOH .

All used chemicals were of p.a. purity. Deionized water produced by a Milli-Q Plus system (Millipore, USA) was used in all cases. If not stated otherwise, all solutions were stored in glass bottles in the dark at laboratory temperature.

4. Results and Discussion

4.1 Study of the Interaction of DNA with 4-Nitrophenyl

The first series of experiments was performed in the solution of 4-NBP in 0.01 mol L⁻¹ phosphate buffer pH 7.0 (PB)–methanol (8:2) at HMDE at laboratory temperature with interaction time (t_{int}) 5 min. The 4-NBP I_p was investigated. Using DPV, it was found that the presence of DNA in the solution of 4-NBP resulted (i) in a decrease of I_p of 4-NBP; (ii) in a peak CA formation at ca -1500 mV; and (iii) in a significant shift of E_p to less negative values at the DNA concentrations over 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. It was concluded that during the mutual interaction between DNA and 4-NBP, the DNA structure changes occurs, however, a DNA–4-NBP complex is not formed (explained in detail in [3]).

Then, cyclic voltammograms of 4-NBP in the absence and in the presence of DNA in PB–methanol (8:2) were measured. At t_{int} from 0 to 30 min in the presence of DNA (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), the change of the 4-NBP I_p was not significant, and the peak CA current (I_{CA}) decrease to ca 75% (after 5 min). After 30 min, the decrease was the same. The decrease of I_{CA} can be caused by the DNA aggregation with 4-NBP, leading to the DNA structure changes. The resulting DNA behavior can be affected by the presence of 4-NBP, and vice versa. From slopes of plotting $\log(-I_p)$ of 4-NBP on the logarithm of the scan rate ($\log \nu$), it can be concluded that in both the absence and the presence of DNA, the electrochemical reduction is controlled by both adsorption and diffusion [52].

The values of diffusion coefficients (D) were determined using chronocoulometry in the solution of 4-NBP in PB–methanol (8:2) in the absence and in the presence of DNA, and with reaction times from 4 to 64 s. The values of D of 4-NBP were calculated using Anson's equation [53]. The standard rate constant (k^0) was determined using the data from CV [54]. The reaction is electrochemically irreversible, and is not affected by the presence of DNA in the solution [52]. It is concluded, that the DNA–analyte complex is not formed, and the competitive sorption of 4-NBP and DNA on the electrode surface occurs.

Using measurements at DNA-HMDE in buffered solution, the DNA damage was investigated after incubation in the 4-NBP solution. For this purpose, CV in PB and ACV in 0.3 mol L⁻¹ NaCl with 0.05 mol L⁻¹ NaH₂PO₄ (adjusted to pH 8.5 by titration with 0.2 mol L⁻¹ NaOH) were employed investigating I_{CA} and peak 3 current (I_{ac3}), respectively. The optimization of the interaction conditions and the parameters are described in detail in [3]. Firstly, the influence of DNA denaturation processes of DNA (by the increased temperature, by the chemical agents NaOH and DMSO) on I_{AC} and I_{ac3} was studied. The influence of the DNA damaging process is described in detail in [3]. In comparison to previously published works investigating DNA damage, our voltammograms are similar to voltammograms of single-stranded DNA [55]. Based on this, it can be concluded that in comparison to ACV, CV is a more sensitive and reliable tool for the study of DNA damage.

Using CV, interaction between DNA and 4-NBP was studied at DNA-HMDE in PB. The relative change of I_{CA} was not significant, and was affected neither by the 4-NBP concentration nor by the t_{inc} .

Using CV (from -300 mV to -800 mV or from 0 to -800 mV) or potentiostatic electrolysis (at -800 mV) during the incubation of DNA-HMDE in the solution of 4-NBP in PB, the reduction intermediates of 4-NBP were generated. After that, changes of I_{CA} measured using CV or of I_{ac3} measured using ACV were investigated. The interaction of DNA with the reduction intermediates (generated by CV and potentiostatic electrolysis) was conclusively confirmed (the changes of I_{CA} were observed, suggesting the destabilization or denaturation of DNA).

Interaction of DNA with 4-ABP was studied using CV at HMDE and using CV and ACV at DNA-HMDE (all at the same experimental conditions as those used for 4-NBP). It is supposed that the DNA aggregate with 4-ABP is formed, too. The interaction between DNA and 4-ABP was confirmed.

For a purpose of a long-term study, the solutions of 4-NBP in PB and 4-ABP in PB, both with DNA, and DNA in PB (as a blank) were studied using CV (investigating I_{CA}) and ACV (investigating I_{ac3}) at HMDE for 7 days 16 hours. DNA damage was not confirmed. As mentioned above, the DNA aggregates with the analyte can be formed and influence the voltammetric behavior of DNA.

4.2 Polarographic and Voltammetric Determination of Methyl Violet 2B at Mercury Electrodes

Firstly, the influence of pH on the electrochemical behavior MV was investigated using DCTP and DPP in Britton-Robinson (BR) buffer (pH 2.0 – 12.0) at DME. For the determination of MV using DCTP and DPP, the optimum medium BR buffer pH 4.0 was chosen. The calibration curves were linear across the entire calibration range, i.e., from 1 to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for DCTP and from 0.1 to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for DPP. The obtained L_Q s were 1.7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for DCTP and 0.16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for DPP.

For measurements of MV in BR buffer (at pH 2 – 12) using both DCV and DPV at HMDE, two peaks were observed. The calibration dependences were evaluated from the second peak of MV in BR buffer at pH 4.0 using both DCV and DPV. Calibration curves were linear from 0.2 to 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for DCV and from 0.1 to 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for DPV. The obtained L_Q s were 65 nmol L^{-1} for DCV and 45 nmol L^{-1} for DPV.

To achieve a lower L_Q of MV, DPAdSV at HMDE was investigated. The optimum accumulation time was 600 s at an accumulation potential -500 mV (the optimization is described in [4]). The calibration curve was linear from 20 to 100 nmol L^{-1} , and the achieved L_Q was 13 nmol L^{-1} .

For the comparison, UV-Vis spectrophotometric determination of MV in BR buffer pH 4.0 was utilized, with L_Q 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (measured at the maximum absorbance ($\lambda = 584$ nm)).

The developed method of determination of MV using DPAdSV at HMDE was employed in the analysis of drinking and river water. The calibration curves of MV were linear from 0.04 to 1.00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in drinking water and from 0.02 to 1.00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in river water. The achieved L_Q s were 40 nmol L^{-1} in drinking water and 20 nmol L^{-1} in river water.

4.3 Study of the Interaction of DNA with Methyl Violet 2B

Experiments were performed in the solution of MV in 0.1 mol L^{-1} acetate buffer pH 4.0 (AB) in the absence and in the presence of DNA at laboratory temperature with t_{int} 5 min.

Using DPV at HMDE, electrochemical behavior of MV in the absence and in the presence of DNA (0 – 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was studied in AB. The presence of DNA in the solution of MV resulted in (i) a decrease of the I_p of MV, and (ii) a shift of E_p to more positive values, reaching the most positive value at the concentration of DNA 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$,

suggesting that the interaction occurs by DNA intercalation or binding into the DNA minor or major groove, followed by the electrostatic interaction which is supported by the low ionic strength [56].

Cyclic voltammograms of MV ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) in the absence and in the presence of DNA (5 and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) in AB were measured, too. No peaks or waves were observed in the reverse scan for both the free form of MV and the DNA–MV complex. It can be assumed that the reduction of MV, as well as of the DNA–MV complex, is chemically irreversible.

The dependences of the $\log(-I_p)$ of MV on $\log v$ were investigated in the absence and in the presence of DNA (5 and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) using CV. From the slopes of plotting $\log(-I_p)$ of MV vs. $\log v$, it can be concluded that in the absence of DNA the electrochemical reduction is controlled by both adsorption and diffusion [52]. On the other hand, the values of the slopes in the presence of DNA in the MV solution show the reduction is diffusion controlled, suggesting the formation of the DNA–MV complex formation.

The UV-Vis spectrophotometric behavior of MV in AB in the absence and in the presence of DNA was investigated. A shift of the MV spectral band maximum was not significant. However, the hypochromic effect was observed, reaching the absorbance minimum at the DNA concentration $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Results and conclusions obtained using UV-Vis spectrophotometry are the same as those obtained using voltammetric methods.

Values of D were calculated Anson's equation [53], and values of k^0 were determined using data from CV. It is concluded that the reaction of both the free form of MV and the DNA–MV complex is electrochemically irreversible [52].

The values of K and m of the DNA–MV complex were evaluated using DPV with the constant concentration of DNA and the changing concentration of MV. The value of K was determined as $(4.6 \pm 0.3) \times 10^4$, and from the value of m it is estimated that MV and DNA base pairs formed the complex in the ratio 1:1. The value of K was determined using a titration of the solution of MV with the DNA solution, too, as $(6.5 \pm 0.1) \times 10^4$. Using UV-Vis spectrophotometry, the value of K was determined as $(6.0 \pm 1.4) \times 10^4$.

The decrease of I_p of MV caused by the addition of DNA into the solution was used for the construction of calibration curves of DNA ($1 - 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) in aqueous solution. The procedure of optimization is described in detail in [5]. The optimal concentration of MV was $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, with L_Q of DNA $0.77 \mu\text{g mL}^{-1}$.

5. Conclusion

In this dissertation thesis, it was shown that mercury electrodes represents very useful and reliable tool for the environmental analysis, interaction studies of double-stranded DNA with organic compounds, and DNA damage investigation. Voltammetry and polarography are suitable for these purposes. For the determination of methyl violet 2B (MV), triphenylmethane dye, dropping mercury electrode (DME) and hanging mercury drop electrode (HMDE) were used. HMDE was used for the investigation of the interaction between DNA and MV or 4-nitrobiphenyl (4-NBP), environmental pollutant, too. Moreover, HMDE was modified by DNA (DNA-HMDE) which served as a biosensor for the study of the interaction between DNA and 4-NBP.

All the aims were fulfilled. Using cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV), and alternating current voltammetry (ACV), the interaction of DNA with 4-NBP was studied in phosphate buffer or phosphate buffer–methanol (8:2) at HMDE and at DNA-HMDE. It was found that the interaction results in the decrease of I_p of 4-NBP and the peak of cytosine and adenosine moieties (peak CA) decrease. Electrochemical reduction of 4-NBP is a quasi-reversible process controlled by both adsorption and diffusion in the absence of DNA as well as in the presence of DNA. Using CV in PB and ACV in 0.3 mol L⁻¹ NaCl with 0.05 mol L⁻¹ NaH₂PO₄ (pH 8.5), the peak CA and peak 3 currents were investigated at DNA-HMDE. After incubation in 4-NBP solution, no significant changes of peak CA or peak 3 were observed. However, the interaction of DNA with reduction intermediates of 4-NBP was confirmed.

Moreover, the interaction of DNA with 4-aminobiphenyl (4-ABP), the metabolite of 4-NBP, was studied at the same conditions as 4-NBP. A long-term study of the solutions of DNA with 4-NBP or 4-ABP was performed using CV and ACV, too. It can be concluded, that the interaction of DNA with 4-NBP or 4-ABP results in formation of DNA aggregate with the analytes.

The second analyte, MV, was firstly studied using polarographic techniques at DME and voltammetric techniques at HMDE. The optimum medium for its determination was found to be Britton-Robinson buffer pH 4.0. The lowest limit of quantification (L_Q) 13 nmol L⁻¹ was observed using differential pulse adsorptive stripping voltammetry (DPAdSV) at HMDE. The obtained values of L_Q s are comparable or lower than the one

obtained using UV-Vis spectrophotometry. Using DPAdSV at HMDE, MV was determined in model samples of drinking and river water.

Secondly, the interaction of DNA with MV in acetate buffer was studied using CV and DPV at HMDE and UV-Vis spectrophotometry. The interaction of MV with DNA results in the formation of a supramolecular complex. The electrochemical reduction of both the free form of MV and the DNA–MV complex is an irreversible process. Using UV-Vis spectrophotometry and results from DPV, the values of the binding constant and the binding constant of the DNA–MV complex were calculated.

The decrease of the MV peak current caused by the increasing of DNA in the solution was used for the development of a method for the indirect determination of DNA in aqueous solutions, with L_Q $0.77 \mu\text{g mL}^{-1}$.

It was shown that the employment of HMDE for the investigation of the interaction of DNA with biologically active compounds is possible using several approaches and confirming different types of interactions. Mercury electrodes still represent reliable and modern tools for the basic in vitro studies.

References

- [1] J. Gajdar, **E. Horakova**, J. Barek, J. Fischer, V. Vyskocil: Recent Applications of Mercury Electrodes for Monitoring of Pesticides: A Critical Review. *Electroanalysis* **28** (2016), DOI: 10.1002/elan.201600239, in press.
- [2] V. Vyskočil, M. Blašková, A. Hájková, **E. Horáková**, Z. Krejčová, K. Stávková: *Electrochemical DNA Biosensors – Useful Diagnostic Tools for the Detection of Damage to DNA Caused by Organic Xenobiotics (A Review)*. In Book *Sensing in Electroanalysis*, K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytrás (Eds.), 141-162. University Press Centre, Pardubice 2012.
- [3] **E. Horakova**, J. Barek, V. Vyskocil: Voltammetry at a Hanging Mercury Drop Electrode as a Tool for the Study of the Interaction of Double-Stranded DNA with Genotoxic 4-Nitrobiphenyl. *Electroanalysis* **28** (2016), DOI: 10.1002/elan.201600241, in press.
- [4] **E. Horakova**, J. Barek, V. Vyskocil: Determination of Methyl Violet 2B Using Polarographic and Voltammetric Methods at Mercury Electrodes. *Analytical Letters* **49**, 56-65 (2016).
- [5] **E. Horakova**, V. Vyskocil, J. Barek: Interaction Study of Methyl Violet 2B with DNA and Voltammetric Determination of DNA in Aqueous Solutions. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **147**, 119-126 (2015).

- [6] X. Jinhui, F. S. C. Lee: Analysis of Nitrated Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. *Chemosphere* **42**, 245-250 (2001).
- [7] N. A. Littlefield, B. N. Blackwell, C. C. Hewitt, D. W. Gaylor: Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies of Gentian-Violet in Mice. *Fundamental and Applied Toxicology* **5**, 902-912 (1985).
- [8] Z. Sklenář: Riziková léčiva v pediatrické dermatologické magistraliter receptuře a jejich vhodné alternativy. *Pediatric pro praxi* **11**, 232-235 (2010).
- [9] L. J. Stevens, T. Kuczek, J. R. Burgess, M. A. Stochelski, L. E. Arnold, L. Galland: Mechanisms of Behavioral, Atopic, and Other Reactions to Artificial Food Colors in Children. *Nutrition Reviews* **71**, 268-281 (2013).
- [10] J. N. J. Pitts, K. A. Van Cauwenberghe, V. Cauwenberghe, D. Grosjean, J. P. Schmid, D. R. Fitz, W. L. Belser, G. P. Knudson, P. M. Hynds: Atmospheric Reactions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Facile Formation of Mutagenic Nitro Derivatives. *Science* **202**, 515-519 (1978).
- [11] J. Cvačka, J. Barek, J. Zima, A. G. Fogg, J. C. Moreira: Critical Review: High-Performance Liquid Chromatography of Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Analyst* **123**, 9R-18R (1998).
- [12] L. Chibwe, M. C. Geier, J. Nakamura, R. L. Tanguay, M. D. Aitken, S. L. M. Simonich: Aerobic Bioremediation of PAH Contaminated Soil Results in Increased Genotoxicity and Developmental Toxicity. *Environmental Science and Technology* **49**, 13889-13898 (2015).
- [13] Y. Lin, X. Qiu, Y. Ma, J. Ma, M. Zheng, M. Shao: Concentrations and Spatial Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Nitrated PAHs (NPAHs) in the Atmosphere of North China, and the Transformation from PAHs to NPAHs. *Environmental Pollution* **196**, 164-170 (2015).
- [14] W. Huang, B. Huang, X. Bi, Q. Lin, M. Liu, Z. Ren, G. Zhang, X. Wang, G. Sheng, J. Fu: Emission of PAHs, NPAHs and OPAHs from Residential Honeycomb Coal Briquette Combustion. *Energy and Fuels* **28**, 636-642 (2014).
- [15] E. Mutlu, S. H. Warren, P. P. Matthews, C. King, W. P. Linak, I. M. Kooter, J. E. Schmid, J. A. Ross, M. I. Gilmour, D. M. Demarini: Bioassay-Directed Fractionation and Sub-Fractionation for Mutagenicity and Chemical Analysis of Diesel Exhaust Particles. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **54**, 719-736 (2013).
- [16] M. W. Anders: *Bioactivation of Foreign Compounds*. Academic Press, Orlando 1985.
- [17] S. Ning, X. Xiaobai: Reductive Metabolism of 4-Nitrobiphenyl by Rat Liver Fraction. *Carcinogenesis* **18**, 1233-1240 (1997).
- [18] J. C. Moreira, J. Barek: Analysis of Carcinogenic Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Química Nova* **18**, 362-367 (1995).
- [19] Anonymous: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 4: Some Aromatic Amines, Hydrazine and Related Substances, N-Nitroso Compounds and Miscellaneous Alkylating Agents*. IARC, Lyon 1974.
- [20] W. B. Deichmann, W. M. Macdonald, M. M. Coplan: Paranitrobiphenyl, a New Bladder Carcinogen in the Dog. *Industrial Medicine and Surgery* **27**, 634-637 (1958).

- [21] S. Ning, X. Xiaobai: Optimization of Experimental Conditions in Studies on Metabolism of 4-Nitrobiphenyl. *Journal of Environmental Sciences* **10**, 64-68 (1998).
- [22] A. L. Walpole, M. H. Williams, D. C. Roberts: Tumours of the Urinary Bladder in Dogs after Ingestion of 4-Aminodiphenyl. *British Journal of Industrial Medicine* **11**, 105-109 (1954).
- [23] Anonymous: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 1: Some Inorganic Substances, Chlorinated Hydrocarbons, Aromatic Amines, N-Nitroso Compounds and Natural Products*. IARC, Lyon 1972.
- [24] V. Purohit, A. K. Basu: Mutagenicity of Nitroaromatic Compounds. *Chemical Research in Toxicology* **13**, 673-692 (2000).
- [25] V. Prchal, J. Krejčová, V. Vyskočil, K. Pecková, J. Fischer, J. Zima, J. Barek: Determination of 4-Aminobiphenyl and 4-Nitrobiphenyl by HPLC with Electrochemical, UV Spectrophotometric, and Fluorescent Detection. *International Journal of Electrochemical Science* **8**, 2524-2535 (2013).
- [26] J. Barek, A. Berka, M. Müller, J. Zima: Determination of 4-Nitrobiphenyl and 4-Aminobiphenyl by Controlled Potential Coulometry, DPP a DPV. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **50**, 2853-2862 (1985).
- [27] **E. Horakova**, D. Smidova, V. Vyskocil, J. Barek: Voltammetric Determination of 2-Nitrobiphenyl and 4-Nitrobiphenyl Using a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode. *International Journal of Electrochemical Science* **10**, 2155-2169 (2015).
- [28] A. L. Woodhead, B. Cosgrove, J. S. Church: The Purple Coloration of Four Late 19th Century Silk Dresses: A Spectroscopic Investigation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **154**, 185-192 (2016).
- [29] J. Liu, Y. Zhou, F. Zhao, Z. Peng, S. Wang: Identification of Early Synthetic Dyes in Historical Chinese Textiles of the Late Nineteenth Century by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Diode Array Detection and Mass Spectrometry. *Coloration Technology* **132**, 177-185 (2016).
- [30] M. Oplatowska, R. F. Donnelly, R. J. Majithiya, D. Glenn Kennedy, C. T. Elliott: The Potential for Human Exposure, Direct and Indirect, to the Suspected Carcinogenic Triphenylmethane Dye Brilliant Green from Green Paper Towels. *Food and Chemical Toxicology* **49**, 1870-1876 (2011).
- [31] Q. Sun, Y. Luo, X. Yang, P. Xiang, M. Shen: Detection and Identification of Dyes in Blue Writing Inks by LC-DAD-Orbitrap MS. *Forensic Science International* **261**, 71-81 (2016).
- [32] R. W. Sabnis: *Handbook of Acid-Base Indicators*. CRC Press, Boca Raton 2007.
- [33] F. Martin, J.-M. Oberson, M. Meschiari, C. Munari: Determination of 18 Water-Soluble Artificial Dyes by LC-MS in Selected Matrices. *Food Chemistry* **197**, 1249-1255 (2016).
- [34] M. Balabanova, L. Popova, R. Tchipeva: Dyes in Dermatology. *Clinics in Dermatology* **21**, 2-6 (2003).
- [39] R. D. Combes, R. B. Haveland-Smith: A Review of the Genotoxicity of Food, Drug and Cosmetic Colours and Other Azo, Triphenylmethane and Xanthene Dyes. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* **98**, 101-243 (1982).

- [35] W. C. Andersen, S. B. Turnipseed, C. M. Karbiwnyk, R. H. Lee, S. B. Clark, W. D. Rowe, M. R. Madson, K. E. Miller: Multiresidue Method for the Triphenylmethane Dyes in Fish: Malachite Green, Crystal (Gentian) Violet, and Brilliant Green. *Analytica Chimica Acta* **637**, 279-289 (2009).
- [36] S. H. Chen, A. S. Yien Ting: Biodecolorization and Biodegradation Potential of Recalcitrant Triphenylmethane Dyes by *Corioliopsis* sp. Isolated from Compost. *Journal of Environmental Management* **150**, 274-280 (2015).
- [37] L. B. L. Lim, N. Priyantha, C. M. Chan, D. Matassan, H. I. Chieng, M. R. R. Kooh: Investigation of the Sorption Characteristics of Water lettuce (WL) as a Potential Low-Cost Biosorbent for the Removal of Methyl Violet 2B. *Desalination and Water Treatment* **57**, 8319-8329 (2016).
- [38] A. Vachálková, L. Novotný, M. Blesová: Polarographic Reduction of Some Triphenylmethane Dyes and Their Potential Carcinogenic Activity. *Neoplasma* **43**, 113-117 (1996).
- [39] R. C. Kaye, H. I. Stonehill: The Polarographic Reduction of Crystal-Violet, Brilliant-Green, Malachite-Green, and Auramine. *Journal of the Chemical Society* 3231-3239 (1952).
- [40] M. Fojta: Electrochemical Sensors for DNA Interactions and Damage. *Electroanalysis* **14**, 1449-1463 (2002).
- [41] M. Fojta: *Detecting DNA Damage with Electrodes*. In Book *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics*, E. Paleček, F. Scheller, J. Wang (Eds.), 386-418. Elsevier Science, Amsterdam 2005.
- [42] M. Fojta, L. Havran, J. Fulnečková, T. Kubičárová: Adsorptive Transfer Stripping AC Voltammetry of DNA Complexes with Intercalators. *Electroanalysis* **12**, 926-934 (2000).
- [43] Z. Krejčová, J. Barek, V. Vyskočil: Voltammetric Determination of Fenitrothion and Study of Its Interaction with DNA at a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode. *Monatshfte für Chemie - Chemical Monthly* **147**, 135-142 (2016).
- [44] F. C. Abreu, M. O. Goulart, A. M. Brett: Detection of the Damage Caused to DNA by Niclosamide Using an Electrochemical DNA-Biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **17**, 913-919 (2002).
- [45] A. P. F. Turner: *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, New York 1987.
- [46] J. Galandová, R. Ovádeková, A. Ferancová, J. Labuda: Disposable DNA Biosensor with the Carbon Nanotubes-Polyethyleneimine Interface at a Screen-Printed Carbon Electrode for Tests of DNA Layer Damage by Quinazolines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **394**, 855-861 (2009).
- [47] J. Barek, J. C. Moreira, J. Zima: Modern Electrochemical Methods for Monitoring of Chemical Carcinogens. *Sensors* **5**, 148-158 (2005).
- [48] J. Barek, A. G. Fogg, A. Muck, J. Zima: Polarography and Voltammetry at Mercury Electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **31**, 291-309 (2001).
- [49] M. Bartošík, M. Fojta, E. Paleček: Electrochemical Detection of 5-Methylcytosine in Bisulfite-Treated DNA. *Electrochimica Acta* **78**, 75-81 (2012).

- [50] O. Zitka, S. Krizkova, S. Skalickova, P. Kopel, P. Babula, V. Adam, R. Kizek: Electrochemical Study of DNA Damaged by Oxidation Stress. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* **16**, 130-141 (2013).
- [51] G. Somer, S. Kalayci, Z. Almas: A New, Fast and Sensitive Method for the Determination of Trace Amounts of Nitrite Using Differential pulse Polarography. *Nitric Oxide* **57**, 79-84 (2016).
- [52] D. K. Gosser: *Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*. Wiley-VCH, New York 1993.
- [53] A. J. Bard, L. R. Faulkner, J. Leddy, C. G. Zoski: *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH, New York 1980.
- [54] J. G. Velasco: Determination of Standard Rate Constants for Electrochemical Irreversible Processes from Linear Sweep Voltammograms. *Electroanalysis* **9**, 880-882 (1997).
- [55] R. Fadrná, K. Cahová-Kucharíková, L. Havran, B. Yosypchuk, M. Fojta: Use of Polished and Mercury Film-Modified Silver Solid Amalgam Electrodes in Electrochemical Analysis of DNA. *Electroanalysis* **17**, 452-459 (2005).
- [56] M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah: Drug-DNA Interactions and Their Study by UV-Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **124**, 1-19 (2013).

Curriculum Vitae

Mgr. Eva Horáková

Personal details

Date of birth 20th January 1988
Place of birth Liberec
Nationality Czech Republic
Address Nová Pasiřská 4041/21, Jablonec nad Nisou, CZ 466 01
Contact address Orelská 8, Prague 10, CZ 101 00
Cell phone +420 607 767 945
E-mail eva.horakova@natur.cuni.cz; evinka.horakova@seznam.cz

Education

2012 – present doctoral studies
Charles University in Prague, Faculty of Science, Prague, CZ
Study programme: Analytical chemistry
State final exams passed on 18th June 2014

2010 – 2012 master's studies
Charles University in Prague, Faculty of Science, Prague, CZ
Study programme: Chemistry
Study subject: Analytical chemistry
Diploma thesis: Voltammetric Determination of Genotoxic Nitrobiphenyls

2007 – 2010 bachelor's studies
Charles University in Prague, Faculty of Science, Prague, CZ
Study programme: Chemistry
Study subject: Chemistry in Science (Chemie v přírodních vědách)
Bachelor's thesis: Voltammetric Determination of 4-Nitrobiphenyl at a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode

1999 – 2007 secondary school studies
Gymnázium a SOŠPg Jeronýmova, Liberec, CZ

Related Work Experience

- 2012 – 2015 Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Prague, CZ
Research of the project of the Grant Agency of Czech Republic (P206/12/G151)
- 2012 – present doctoral studies
Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Prague, CZ
Dissertation thesis research: Electrochemical study of the interaction of DNA with biologically active substances
Supervision on Advanced practical course of analytical chemistry
Erasmus intensive programme 31. 8. – 14. 9. 2013, Portalegre, Portugal
(The environmental protection and energy conversion technologies, with a strong incidence in electrochemistry and photocatalysis, the fundamental principles of electrochemistry and aspects of industrial electrochemistry)

References

- doc. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D. (dissertation thesis supervisor)
Phone: +420 221 951 599
E-mail: vlastimil.vyskocil@natur.cuni.cz
- prof. RNDr. Jiří Barek, CSc. (dissertation thesis consultant)
Phone: +420 221 951 224
E-mail: jiri.barek@natur.cuni.cz

Language Skills

- Czech mother tongue
English upper intermediate (FCE, April 2014)
German beginner

Additional Skills

- PC work (MC Office, Adobe)
Driving license (B type)
Certified yoga instructor

- Interests** choir singing in Akcent Liberec, yoga, inline skating

List of Publications, Oral and Poster Presentations

Theses

1. **E. Horáková**, *Bachelor's Thesis*, Charles University in Prague, Prague 2010: *Voltammetric Determination of 4-Nitrobiphenyl at a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode (Voltametrické stanovení 4-nitrobifenylu na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě)*.
2. **E. Horáková**, *Diploma Thesis*, Charles University in Prague, Prague 2012: *Voltammetric Determination of Genotoxic Nitrobiphenyls (Voltametrické stanovení genotoxických nitrobifenylů)*.

Journal Articles

1. **E. Horáková**, V. Vyskočil, J. Barek: Voltammetric Determination of Carcinogenic 4-Nitrobiphenyl (Voltametrické stanovení karcinogenního 4-nitrobifenylu). *Chemické Listy* **106**, s32-s36 (2012).
2. **E. Horakova**, D. Smidova, V. Vyskocil, J. Barek: Voltammetric Determination of 2-Nitrobiphenyl and 4-Nitrobiphenyl Using a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode. *International Journal of Electrochemical Science* **10**, 2155-2169 (2015).
3. **E. Horakova**, V. Vyskocil, J. Barek: Interaction Study of Methyl Violet 2B with DNA and Voltammetric Determination of DNA in Aqueous Solutions. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **147**, 119-126 (2015).
4. **E. Horakova**, J. Barek, V. Vyskocil: Determination of Methyl Violet 2B Using Polarographic and Voltammetric Methods at Mercury Electrodes. *Analytical Letters* **49**, 56-65 (2016).

5. **E. Horakova**, J. Barek, V. Vyskocil: Voltammetry at a Hanging Mercury Drop Electrode as a Tool for the Study of the Interaction of Double-Stranded DNA with Genotoxic 4-Nitrobiphenyl. *Electroanalysis* **28** (2016), DOI: 10.1002/elan.201600241, in press.
6. J. Gajdar, **E. Horakova**, J. Barek, J. Fischer, V. Vyskocil: Recent Applications of Mercury Electrodes for Monitoring of Pesticides: A Critical Review. *Electroanalysis* **28** (2016), DOI: 10.1002/elan.201600239, in press.

Book Chapters

1. V. Vyskočil, A. Daňhel, J. Fischer, V. Novotný, D. Deýlová, **E. Horáková**, J. Barek, B. Yosypchuk, J. Wang: *Silver Amalgam Electrodes – A Look Back at the Last Five Years of Their Development and Applications*. In Book *Sensing in Electroanalysis*, K. Vyřas, K. Kalcher, I. Švancara (Eds.), 13-31. University Press Centre, Pardubice, 2010.
2. V. Vyskočil, M. Blařková, A. Hájková, **E. Horáková**, Z. Krejčová, K. Stávková: *Electrochemical DNA Biosensors – Useful Diagnostic Tools for the Detection of Damage to DNA Caused by Organic Xenobiotics (A Review)*. In Book *Sensing in Electroanalysis*, K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vyřas (Eds.), 141-162. University Press Centre, Pardubice 2012.

Oral Presentations

1. **E. Horáková**, V. Vyskočil, J. Barek: *Voltammetric Determination of 4-Nitrobiphenyl at a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode (Voltamrické stanovení 4-nitrobifenylu na rtuřovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě)*. Book of Abstracts - 13. Študentská vedecká konferencia, Bratislava, Slovakia, 9. 11. 2011. Bratislava, Slovakia 2011, 54-55.

2. **E. Horáková**, V. Vyskočil, J. Barek: *Voltammetric Determination of Carcinogenic 4-Nitrobiphenyl (Voltammetrické stanovení karcinogenního 4-nitrobifenyly)*. Book of Abstracts - 15. ročník celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu firmy Merck“, Prague, Czech Republic, 1. – 2. 2. 2012. Prague, Czech Republic 2012.
3. V. Vyskočil, A. Daňhel, J. Fischer, **E. Horáková**, J. Barek: *Recent Trends in Development and Applications of Silver Amalgam Electrodes in Environmental Analysis of Biologically Active Organic Compounds*. Book of Abstracts - 9th Spring Meeting of the International Society of Electrochemistry, Turku, Finland, 8. – 11. 5. 2011. Lausanne, Switzerland 2011, 104.
4. V. Vyskočil, Z. Krejčová, **E. Horáková**, J. Barek: *DNA-Modified Electrodes in Voltammetric Analysis of Nitro and Amino Derivatives of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Book of Abstracts - 45th Heyrovský Discussion - Electrochemistry of Biopolymers and Bioactive Compounds, Brno, Czech Republic, 13. – 17. 7. 2012. Brno, Czech Republic 2012.
5. V. Vyskočil, D. Deýlová, A. Hájková, **E. Horáková**, J. Barek: *Recent Trends in Development and Applications of Silver Amalgam-Based Working Electrodes in Environmental Electroanalysis*. Book of Abstracts - Electrochemistry 2012, Munich, Germany, 16. – 20. 9. 2012. Frankfurt am Main, Germany 2012, 135.
6. **E. Horáková** V. Vyskočil, J. Barek: *Voltammetric Determination of 4-Nitrobiphenyl at a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode*. Book of Abstracts - XXXIII. Modern Electrochemical Methods, Jetřichovice, Czech Republic, 20. – 24. 5. 2013. Jetřichovice, Czech Republic 2013, 68-72.

7. **E. Horáková**, V. Vyskočil, J. Barek: *Study of Differential Pulse Voltammetric Behavior of Selected Nitro-Compounds at a Hanging Mercury Drop Electrode in the Presence of Double-Stranded DNA*. Book of Abstracts - 9th International Students Conference „Modern Analytical Chemistry“, Prague, Czech Republic, 23. – 24. 9. 2013. Prague, Czech Republic 2013, 21-23.
8. **E. Horáková**, J. Barek, V. Vyskočil: *Determination of Methylviolet 2B Using Polarographic and Voltammetric Methods at Mercury Electrodes*. Book of Abstracts - XXXIV. Modern Electrochemical Methods, Jetřichovice, Czech Republic, 19. – 23. 5. 2014. Jetřichovice, Czech Republic 2014, 60-64.
9. **E. Horáková**, V. Vyskočil, J. Barek: *Voltammetric Study and Determination of Methyl Violet 2B Using a Hanging Mercury Drop Electrode*. Book of Abstracts - 10th International Students Conference „Modern Analytical Chemistry“, Prague, Czech Republic 22. – 23. 9. 2014. Prague, Czech Republic 2014, 21-22.
10. **E. Horáková**, V. Vyskočil, J. Barek: *Voltammetric Study of the Interaction of Methyl Violet 2B with DNA and Its Use for the Determination of DNA in Aqueous Solutions*. Book of Abstracts - XXXV. Modern Electrochemical Methods, Jetřichovice, Czech Republic, 18. – 25. 5. 2015. Jetřichovice, Czech Republic 2015, 60-64.
11. V. Vyskočil, A. Hájková, **E. Horáková**, A. Daňhel, M. Fojta: *Electrochemical Detection of DNA Damage Caused by Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. Book of Abstracts - 16th Meeting of the European Society of Electroanalytical Chemistry, Bath, Great Britain, 12. – 16. 6. 2016. Bristol, Great Britain 2016.
12. V. Vyskočil, D. Arustamian, A. Hájková, **E. Horáková**: *High-Throughput Detection of DNA Damage – A Step towards Genotoxicity Screening Assays*. Book of Abstracts - XXV. Biochemický sjezd, Prague, Czech Republic, 13. – 16. 9. 2016. Prague, Czech Republic 2016, abstract accepted.

13. **E. Horáková**, J. Barek, V. Vyskočil: *Study of the Interaction between DNA and 4-Nitrobiphenyl Using Voltammetry at a Hanging Mercury Drop Electrode*. Book of Abstracts - 12th International Students Conference „Modern Analytical Chemistry“, Prague, Czech Republic 22. – 23. 9. 2016. Prague, Czech Republic 2014, abstract submitted.

Poster Presentations

1. V. Vyskočil, **E. Horáková**, D. Šmídová, J. Barek: *Voltammetric Determination of Genotoxic Nitrobiphenyls Using a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode*. Book of Abstracts - Electrochemistry 2010: From Microscopic Understanding to Global Impact, Bochum, Germany, 13. – 15. 9. 2010. Frankfurt am Main, Germany 2010, 210.
2. V. Vyskočil, Z. Krejčová, **E. Horáková**, J. Barek: *Non-Traditional Electrode Materials for the Development of New Voltammetric DNA Biosensors*. Biosensors 2012, Cancun, Mexico, 15. – 18. 5. 2012. Oxford, Great Britain 2012.
3. **E. Horakova**, V. Vyskocil, J. Barek: *Study of the Interaction of 4-Nitrobiphenyl with DNA at a Hanging Mercury Drop Electrode*. Book of Abstracts - 9th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications, Kalamata, Greece, 20. – 24. 9. 2015. Kalamata, Greece 2015, 278.
4. **E. Horáková**, V. Vyskočil, J. Barek: *Study of the Interaction of 4-Nitrobiphenyl with Double-Stranded DNA Using Voltammetric Methods*. Book of Abstracts - 6th European Chemistry Congress, Seville, Spain, 11. – 15. 9. 2016, Seville, Spain 2016, abstract accepted.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Studijní program:
Analytická chemie

Autoreferát dizertační práce



Mgr. Eva Horáková

**Rtuťové elektrody jako nástroje pro voltametrické
stanovení biologicky aktivních organických látek a pro
detekci jejich interakce s DNA**

Školitel: doc. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.

Praha, 2016

Abstrakt

Hlavní cílem této dizertační práce bylo využití pro voltametrickou analýzu tradičních rtuťových elektrod k vývoji elektroanalytických metod stanovení organických xenobiotik a ke studiu jejich interakce s dvouvláknovou deoxyribonukleovou kyselinou (DNA).

V návaznosti na můj předchozí výzkum (vedený v rámci mé diplomové práce) byl prvním zkoumaným analytem 4-nitrobifenyl (4-NBP), který je podezřelý z karcinogenity. Interakce DNA se 4-NBP byla studována diferenční pulzní voltametrií (DPV), cyklickou voltametrií (CV) a chronocoulometrií na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE), a dále s využitím CV a AC voltametrie (voltametrie se střídavým potenciálem) na DNA modifikované HMDE. Pomocí CV byl studován mechanismus redukce 4-NBP. Dále byla věnována pozornost studiu interakce DNA se 4-aminobifenylem (4-ABP), metabolitem 4-NBP, a s meziprodukty redukce 4-NBP. Bylo zjištěno, že vlivem interakce DNA se 4-NBP a 4-ABP dochází ke vzniku agregátů DNA s těmito analyty.

Druhým studovaným analytem byla methylová violet 2B (MV). Ke stanovení MV v pufovaném roztoku byly použity DC tast polarografie a diferenční pulzní polarografie na kapající rtuťové elektrodě (DME) a DC voltametrie, DPV a diferenční pulzní adsorpční rozpouštěcí voltametrie (DPAdSV) na HMDE. Nejnižší mez stanovitelnosti (13 nmol L^{-1}) byla dosažena metodou DPAdSV na HMDE. Vyvinuté metody byly použity ke stanovení MV v modelových vzorcích pitné a říční vody.

Interakce DNA s MV v pufovaném roztoku byla studovaná pomocí DPV, CV, chronocoulometrie a UV-Vis spektrofotometrie. Stejně jako u 4-NBP, i mechanismus redukce MV byl studován pomocí CV. Bylo zjištěno, že vlivem interakce DNA s MV dochází ke vzniku komplexu DNA–MV. Na základě poklesu proudu píku MV se vzrůstající koncentrací DNA v roztoku byla vyvinuta metoda nepřímého stanovení DNA.

Obsah

1.	Úvod	7
1.1	Analyty	7
1.2	Detekce poškození DNA.....	9
2.	Cíle dizertační práce	11
3.	Metody a chemikálie	12
3.1	Pracovní elektrody	12
3.2	Polarografie a voltametrie.....	13
3.3	Obecné postupy.....	14
3.4	Chemikálie	14
4.	Výsledky a diskuze	15
4.1	Studium interakce DNA se 4-nitrobifenylem.....	15
4.2	Polarografické a voltametrické stanovení methylové violeti 2B na rtuťových elektrodách.....	16
4.3	Studium interakce DNA s methylovou violetí 2B.....	17
5.	Závěr	18
	Literatura	19
	Curriculum Vitae	25
	Seznam publikací, přednášek a posterových prezentací	27

Tato práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (SVV-2012-265201, SVV-2013-267215, SVV-2014-260084, SVV-2015-260205, SVV-2016-260713), Nadace "Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových" a Grantové agentury České republiky (P206/12/G151).

1. Úvod

Od vynalezení polarografie Jaroslavem Heyrovským v roce 1922 byla stanovena celá řada anorganických i organických analytů v rozličných maticích a bylo vyvinuto množství různých elektrodoových materiálů. Nicméně pro základní výzkum elektrochemického chování a studium redukčních mechanismů zůstává nejspolehlivější elektrodoovým materiálem rtuť. V současném výzkumu nabízí voltametrie, kromě stanovení analytu ve vzorku, také možnost využití v moderním biochemickém výzkumu.

Překládaná dizertační práce je zaměřena na využití rtuťových elektrod pro stanovení biologicky aktivních organických látek a na detekci poškození DNA, ke které může docházet po její interakci s těmito látkami [1-5]. V této práci bylo studováno 1) poškození DNA důsledkem interakce se 4-nitrobifenylenem (4-NBP, registrační číslo CAS: 92-93-3), polutantem životního prostředí [3], a 2) elektrochemické chování a stanovení [4] methylové violeti 2B (MV, registrační číslo CAS: 8004-87-3), triphenylmethanového (TPM) barviva, která má celou řadu negativních účinků [7-9]. Dále byla zkoumána interakce DNA s MV [5].

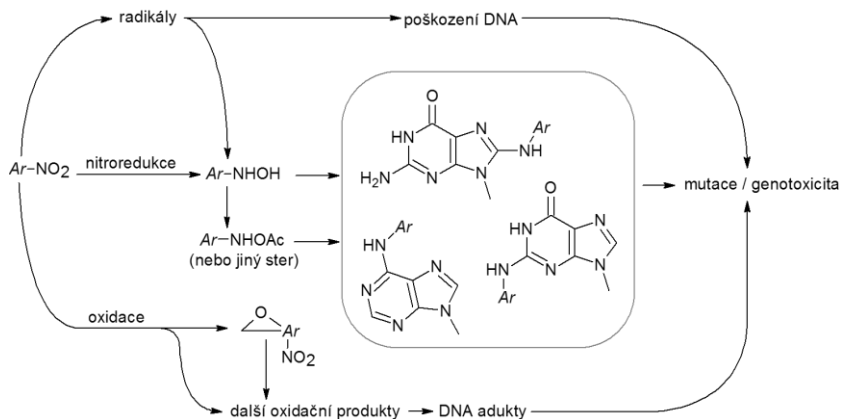
1.1 Analyty

4-NBP patří do skupiny nitrovaných aromatických uhlovodíků (NAH), někdy je zařazován také do skupiny nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků (NPAH). Tyto sloučeniny vznikají reakcí (polycyklických) aromatických uhlovodíků s oxidy dusíků při nedokonalém spalování nebo ve znečištěném ovzduší [10]. 4-NBP je jedním z nejtěkavějších NAH, v ovzduší se tedy nachází v plynné fázi [11]. Prostřednictvím deště se tak může dostávat do přírodních vod nebo půdy. 4-NBP byl nalezen v půdních extraktech [12], ovzduší [13], v emisích po spalování uhelných briket využívaných v domácnostech [14] a ve výfukových zplodinách z dieselových motorů [15].

K vyvolání jejich genotoxických účinků v živých organismech dochází vlivem enzymatické transformace NAH/NPAH na příslušné anion-radikály [16]. Metabolickou redukcí nitroskupiny vázané na aromatický kruh vznikají další nebezpečné sloučeniny, které mohou dále reagovat s buněčnými makromolekulami [17]. Na základě těchto skutečností roste zájem o sledování množství NAH a NPAH v životním prostředí [18].

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) řadí 4-NBP do skupiny 3 (látky, u nichž nebyla karcinogenita pro člověka prokázána) [19]. Nicméně u psů byl v důsledku

působení 4-NBP pozorován vznik rakoviny [20]. Metabolickou přeměnou 4-NBP vzniká alespoň deset redukčních metabolitů [21], tím hlavním je 4-aminobifenyl (4-ABP, registrační číslo CAS: 92-67-1) a *N*-hydroxy-4-aminobifenyl, obě látky vykazují karcinogenní účinky [22-24]. Přehled metabolické přeměny NAH a následné poškození DNA a vyvolání mutagenity jsou schematicky znázorněny na obr. 1 [24]. Předpokládá se, že 4-NBP prochází stejnými metabolickými drahami.



Obr. 1. Přehled metabolické přeměny NAH a následné poškození DNA a vyvolání mutagenity [24]. *Ar* označuje aromatický kruh.

Ke stanovení 4-NBP jsou velmi účinně používané chromatografické techniky [6,13,15,25]. Elektrochemické chování 4-NBP bylo již studováno za pomoci rtuťových elektrod [26], rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrody [27] a uhlíkové rotující diskové elektrody [26].

MV je syntetické barvivo patřící mezi TPM barviva. Tato organická barviva se dříve používala k barvení textilií [28,29], nyní se využívají při barvení papírů [30], jako součást inkoustů [31], jako pH indikátory [32] a jsou také používána jako potravinářská, farmaceutická a kosmetická barviva [33]. Díky baktericidním a fungicidním účinkům nacházejí TPM barviva uplatnění také v lékařství, např. při přípravě lokálních antiseptik [34]. TPM barviva jsou pro člověka potenciálně nebezpečná a vykazují řadu negativních účinků [7,9,35]. Z těchto důvodů jsou žádané studie zabývající se jejich biologickými účinky a sledováním výskytu TPM barviv v životním prostředí a jejich odstranění z něj [30,36,37].

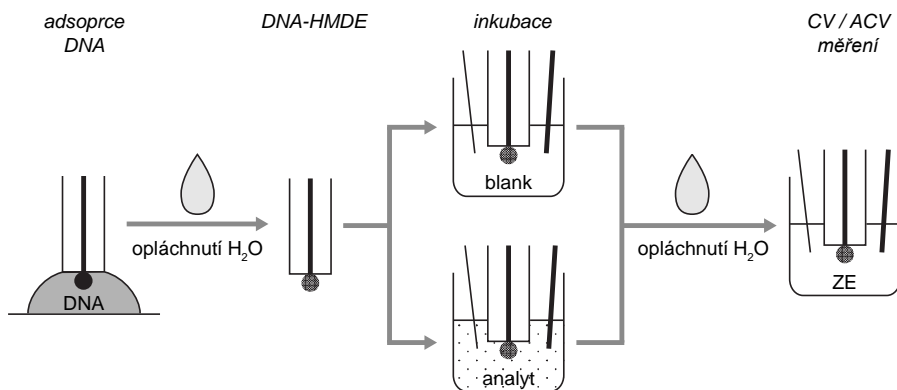
MV lze stanovit spektrofotometricky [28,29]. Díky přítomnosti dvojnásobné vazby mezi atomy dusíku a uhlíku je možné MV redukovat a studovat a stanovovat také elektrochemicky [38,39].

1.2 Detekce poškození DNA

Důsledkem interakce DNA s chemickými nebo fyzikálními vlivy přítomnými v okolním prostředí dochází k poškození DNA [40]. Existuje několik typů strukturálních změn DNA, lze je ale rozdělit na dvě základní skupiny: řetězcové zlomy a poškození bází DNA [41]. Po vzniku zlomů v obou řetězcích DNA často dochází k chromozomovým aberacím a k chybám v buněčném dělení. Hromadění těchto důsledků představuje karcinogenní a teratogenní riziko [40].

Nekovalentní interakce DNA s malými molekulami, např. potenciálně genotoxickými látkami, lze sledovat elektrochemicky. Vznik nekovalentně vázaného komplexu DNA–analyt může způsobit změnu elektrochemické odezvy DNA [3,42] i analytu [3,5]. Elektrochemické techniky se v této oblasti úspěšně používají ve spojení se rtuťovými [3,5,42], amalgamovými [43] a uhlíkovými [44] elektrodami. K detekci poškození DNA se možné použít DNA biosenzory. Obecně platí, že biosenzor je zařízení využívající biologický citlivý prvek (např. DNA), a to buď připojený přímo, nebo přes převodník (např. uhlíková nebo rtuťová elektroda) [3,5,44,45]. Pro tento účel je velmi vhodná HMDE. Kapka rtuti se jednoduše vytvoří do zásobního roztoku DNA. Po opláchnutí deionizovanou vodou je biosenzor, DNA modifikovaná HMDE (DNA-HMDE), připravený k okamžitému použití, viz obr. 2.

Nejpoužívanější techniky k detekci poškození DNA jsou cyklická voltametrie (CV), diferenční pulzní voltametrie (DPV), square wave voltametrie (voltametrie se superponovaným pravoúhlým napětím, SWV) a chronopotenciometrie [2,3,43]. Další elektrochemické techniky, které lze využít, jsou elektrochemická impedanční spektroskopie a AC voltametrie (alternating current, voltametrie se střídavým potenciálem, ACV) [2]. Techniky sloužící k detekci poškození DNA lze rozdělit do následujících skupin: 1) bez využití značek [3,5,42], 2) využívající na DNA nekovalentně vázané redoxní značky [46] a 3) využívající na DNA kovalentně vázané elektrochemicky aktivní značky. Všechny tři skupiny jsou přehledně popsány v [2].



Obr. 2. Příprava DNA modifikované visící rtuťové kapkové elektrody (DNA-HMDE). ZE označuje základní elektrolyt.

Při měření CV bez použití značek lze pozorovat v redukčním skenu pík cytosinu a adeninu (CA pík) při cca $-1,45$ V a v oxidačním skenu pík 7,8-dihydroguaninu při cca $-0,3$ V. Příčiny změn proudů píků DNA naměřených CV jsou detailně vysvětleny v pracích [2,3,5].

Při měření ACV bez použití značek lze prostřednictvím studia povrchových změn na DNA-HMDE sledovat strukturní změny DNA a poškození DNA. V AC voltamogramu lze pozorovat tři píky: pík 1 při cca $-1,2$ V (reorientace a desorpce adsorbované DNA), pík 2 při cca $-1,3$ V (způsobený dvouvláknovou formou DNA) a pík 3 při potenciálu negativnějším než pík 2 asi o 70 mV (způsobený denaturovanou (jednovláknovou) formou DNA). Změny proudů DNA píků naměřených ACV jsou podrobně vysvětleny v pracích [3,42].

Při měření DPV bez použití značek je možné studovat i signály analytu. Pokud se analyt chová jako redoxní indikátor a interkalace nemá kovalentní charakter, lze z posunu potenciálu píku (E_p) analytu odhadnout, jak DNA s analytem interaguje [2]. Ze změny výšky píku (I_p) analytu je možné vypočítat hodnotu vazebné konstanty (K) a vazebný poměr (m) komplexu DNA–analyt [5].

2. Cíle dizertační práce

Tato dizertační práce představuje příspěvek k aktuálnímu tématu vývoje metod stanovení biologicky aktivních organických látek a metod detekce poškození DNA, ke kterému dochází vlivem interakce DNA s těmito látkami. Tato dizertační práce byla vypracována v rámci dlouhodobého výzkumu UNESCO laboratoře elektrochemie životního prostředí v Praze. Tato práce navazuje na můj dosavadní výzkum prováděný v rámci diplomové práce (Voltametrické stanovení genotoxických nitrobifenylů) a navíc se zabývá voltametrickým chováním methylové violeti 2B a její interakcí s DNA.

Předkládaná dizertační práce je založena na následujících vědeckých publikacích [1-5]. K rozlišení citací odkazujících na tyto publikace jsou odpovídající čísla v celém textu vyznačena tučně.

- [1] J. Gajdar, **E. Horakova**, J. Barek, J. Fischer, V. Vyskocil: Recent Applications of Mercury Electrodes for Monitoring of Pesticides: A Critical Review. *Electroanalysis* **2** (2016), DOI: 10.1002/elan.201600239, v tisku.
- [2] V. Vyskočil, M. Blašková, A. Hájková, **E. Horáková**, Z. Krejčová, K. Stávková: *Electrochemical DNA Biosensors – Useful Diagnostic Tools for the Detection of Damage to DNA Caused by Organic Xenobiotics (A Review)*. V knize *Sensing in Electroanalysis*, K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas (Eds.), 141-162. University Press Centre, Pardubice 2012.
- [3] **E. Horakova**, J. Barek, V. Vyskocil: Voltammetry at a Hanging Mercury Drop Electrode as a Tool for the Study of the Interaction of Double-Stranded DNA with Genotoxic 4-Nitrobiphenyl. *Electroanalysis* **28** (2016), DOI: 10.1002/elan.201600241, v tisku.
- [4] **E. Horakova**, J. Barek, V. Vyskocil: Determination of Methyl Violet 2B Using Polarographic and Voltammetric Methods at Mercury Electrodes. *Analytical Letters* **49**, 56-65 (2016).
- [5] **E. Horakova**, V. Vyskocil, J. Barek: Interaction Study of Methyl Violet 2B with DNA and Voltammetric Determination of DNA in Aqueous Solutions. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **147**, 119-126 (2015).

Z důvodů uvedených výše, v kapitole 1, je tato práce zaměřena na použití rtuťových elektrod ke stanovení biologicky aktivních organických látek a na studium poškození DNA, které je důsledkem její interakce s těmito látkami. Tato práce se podrobně zabývá 1) poškozením DNA vlivem interakce se 4-NBP a 2) elektrochemickým chováním a stanovením MV a interakci DNA s MV.

Hlavní cíle této práce:

- Vývoj metod pro výzkum interakce DNA se 4-NBP pomocí visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE) a DNA modifikované HMDE (DNA-HMDE) a následný popis této interakce. Zkoumání redukce 4-NBP bez a v přítomnosti DNA v roztoku.
- Studium poškození DNA způsobeného její interakcí se 4-NBP.
- Vývoj citlivých polarografických a voltametrických metod stanovení MV v roztoku na kapající rtuťové elektrodě (DME) a HMDE a ověření aplikovatelnosti těchto metod na modelových vzorcích pitné a říční vody.
- Studium interakce DNA s MV na HMDE a popis této interakce. Zkoumání redukce MV bez a v přítomnosti DNA v roztoku.

3. Metody a chemikálie

3.1 Pracovní elektrody

Pro základní polarografické studium elektrochemického chování MV byla použita DME. Ke stanovení MV byly využity techniky DC tast polarografie (DCTP) a diferenční pulzní polarografie (DPP). Doba kapky 1 s byla řízena elektronicky (potenciostatem Eco-Tribo Polarograph kontrolovaným softwarem Polar Pro 5.1), maximální plocha rtuťové kapky byla 2,25 mm², průtok rtuti kapilárou byl 4,3 mg s⁻¹ [4]. Použití DME má několik výhod, např. vyloučení pasivace povrchu elektrody produkty a meziprodukty redukce, široké potenciálové okno, spolehlivost, jednoduchost [47,48]. Největšími nevýhodami jsou malá robustnost a

selektivita. Meze stanovitelnosti (L_Q) dosažitelné pomocí DPP na DME jsou v řádu $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ [48].

HMDE byla použita ke stanovení MV a ke studiu interakce DNA se 4-NBP a MV. HMDE je vhodným nástrojem pro environmentální analýzu [1,5,47] a detekci poškození DNA [4,5]. HMDE má ve porovnání s DME mnoho výhod: dosažitelné L_Q jsou nižší díky použití adsorpčních a elektrolytických akumulací (až $10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$), nižší spotřeba rtuti, možnosti modifikace elektrodového povrchu. Na druhou stranu může docházet k pasivaci elektrodového povrchu a použitá mechanická zařízení a elektronika jsou komplikovanější [48]. Ke stanovení MV [3] byla použita HMDE s plochou rtuťové kapky $1,37 \text{ mm}^2$ (řízena potenciostatem Eco-Tribo Polarograph kontrolovaným softwarem Polar Pro 5.1). Ke studiu interakce DNA se 4-NBP [3] a MV [5] byla použita HMDE s plochou rtuťové kapky $0,49 \text{ mm}^2$. HMDE byla řízena potenciostatem Autolab PGSTAT10 potentiostat/galvanostat připojeným k Metrohm 663 VA Stand kontrolovaným softwarem Nova 1.1 (pro měření DPV, CV a chronocoulometrie) nebo Nova 2.0 (CV a ACV).

3.2 Polarografie a voltametrie

Moderní digitální potenciostaty nabízejí možnost využití širokého spektra voltametrických technik. V analytické chemii se ke stanovení analytů nejčastěji používají DCV, DPV a DPAdSV [1,27,43].

Ve výzkumu redukčních/oxidačních mechanismů nebo poškození DNA jsou často využívány tyto techniky: CV, ACV a SWV [2,3,5,40,42,49,50].

V současné analýze představují DCTP a DPP velmi robustní a spolehlivé techniky [1]. V této práci byly ke stanovení MV použity DCTP a DPP na DME s rychlostí polarizace (v) 4 mV s^{-1} a DCV, DPV a DPAdSV na HMDE s v 20 mV s^{-1} . Ke studiu interakce DNA s analyty byly použity DPV, CV a ACV. Konkrétní hodnoty v a ostatní nastavení metod jsou uvedeny v příslušných článcích [3,4,5].

Měření byla provedena ve tříelektrodovém zapojení s DME nebo HMDE jako pracovní elektrodou, Ag|AgCl ($3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$) referentní elektrodou a drátkovou platinovou pomocnou elektrodou.

3.3 Obecné postupy

Měření na DME a HMDE: studovaný roztok by připraven do 10mL odměrné baňky a pak převeden do voltametrické nádoby. Při studiu interakcí DNA s analyty bylo navíc přidáno odpovídající množství DNA. Studovaný roztok byl před každým měřením probublán po dobu 5 min dusíkem (čistoty 4.0, Linde Gas, Česká republika) a po dobu měření byl dusík foukán nad studovaný roztok. Čas k vybublání sloužil také k ustavení interakce DNA s analytem.

Měření na DNA-HMDE: do roztoku DNA (1 mg mL^{-1}) byla vytvořena rtuťová kapka HMDE, jež byla bezprostředně poté opláchnutá deionizovanou vodou a následně přenesena do základního elektrolytu. Takto byla připravena DNA modifikovaná HMDE. Některým měřením předcházela inkubace DNA-HMDE v roztocích analytu (viz obr. 2). Roztoky byly před každým měřením probublány 2 min dusíkem.

Všechna měření byla provedena třikrát a hodnoty pro sestrojení závislostí byly vypočítány jako aritmetické průměry. Všechna měření byla provedena za laboratorních podmínek. Grafy byly vytvořeny pomocí softwaru Origin Pro 8.0 (OriginLab Corporation, USA) a k matematickým a statistickým výpočtům (na hladině významnosti $\alpha = 0.05$) byl použit software Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, USA).

3.4 Chemikálie

Zásobní roztoky (1 mmol L^{-1}) 4-NBP, MV a 4-ABP (čistota p.a.) byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího množství látky v methanolu (99.9 %, čistota p.a.). Zásobní roztoky DNA (γ_{DNA} : 1, 10 a 50 mg mL^{-1} ; koncentrace 10 mg mL^{-1} odpovídá koncentraci DNA bázi $0,04 \text{ mol L}^{-1}$) byly připraveny rozpuštěním nízkomolekulární dvouvláknové DNA z lososích spermií v $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl nebo v deionizované vodě a skladovány při $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Fosfátový pufr (pH 7,0) byl připraven z $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ v koncentracích 0,1; 0,01 a $0,001 \text{ mol L}^{-1}$. Brittonův-Robinsonův pufr byl připraven titrací směsí H_3BO_3 , H_3PO_4 a CH_3COOH (všechny $0,04 \text{ mol L}^{-1}$) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ roztokem NaOH. Acetátový pufr ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,0) byl připraven z $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ a CH_3COOH .

Všechny použité chemikálie byly p.a. čistoty. K přípravě všech roztoků byla použita deionizovaná voda z Milli-Q Plus systému (Millipore, USA). Pokud není uvedeno jinak, všechny roztoky byly skladovány ve tmě při laboratorní teplotě.

4. Výsledky a diskuze

4.1 Studium interakce DNA se 4-nitrobifenylem

První část experimentů byla provedena v roztoku 4-NBP v $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ fosfátovém pufru pH 7,0 (PB)–methanol (8:2) na HMDE. Byl studován proud píku 4-NBP (I_p). Při měření DPV bylo zjištěno, že přítomnost DNA v roztoku 4-NBP vede k: 1) poklesu I_p 4-NBP, 2) vzniku CA píku při potenciálu cca -1500 mV a 3) k významnému posunu potenciálu píku k méně negativním hodnotám při koncentraci DNA vyšší než $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Bylo vyvozeno, že během interakce DNA se 4-NBP dochází ke strukturálním změnám DNA, ale ne ke vzniku komplexu DNA–analyt, podrobně vysvětleno v [3].

Poté byla změřena CV 4-NBP v PB–methanol (8:2) bez a s DNA v měřeném roztoku. Změna proudu píku 4-NBP s DNA v roztoku nebyla v interakčním čase (t_{int}) 0 až 30 min významná, proud CA píku (I_{CA}) píku klesl po 5 min na 75 %. Po 30 min byl pokles stejný. Pokles I_{CA} může být způsoben strukturálními změnami DNA podmíněnými vznikem DNA agregátů se 4-NBP. Výsledné chování DNA může být ovlivněno přítomností 4-NBP a opačně. Ze směrnic závislosti $\log(-I_p)$ 4-NBP na logaritmu rychlosti polarizace ($\log v$) bylo zjištěno, že elektrochemická redukce 4-NBP je bez s DNA v roztoku kontrolována adsorpcí i difúzí [52].

Difúzní koeficient (D) byl stanoven z chronocoulometrických měření v roztoku 4-NBP v PB–methanol (8:2) bez a s DNA v roztoku, s reakčními časy 4 až 64 s. Hodnoty D byly vypočteny pomocí Ansonovy rovnice [53]. Standardní rychlostní konstanta (k^0) redukce byla vypočítána z dat naměřených pomocí CV [54]. Reakce je elektrochemicky ireverzibilní a není ovlivněna přítomností DNA v roztoku [52]. Lze shrnout, že nedochází ke vzniku komplexu DNA–analyt a dochází ke konkurenční sorpci 4-NBP a DNA na povrch elektrody.

Poškození DNA bylo studováno na DNA-HMDE po inkubaci v roztoku 4-NBP pomocí CV v PB, přičemž byl studován CA pík, a pomocí ACV v $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ NaH_2PO_4 (upraveném na pH 8.5 titrováním $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH), při které byl studován pík 3. Optimalizace interakčních podmínek je podrobně popsána v [3]. Nejprve byl studován vliv denaturačního procesu na I_{CA} a proud píku 3 (I_{ac3}), ten je podrobně popsán v [3]. V porovnání s již publikovanými pracemi, které se zabývají poškozením DNA, vykazují voltamogramy naměřené v rámci této práce podobnost s jednovláknovou DNA [55]. Na základě toho lze říci, že v porovnání s ACV je CV pro studium poškození DNA citlivější a spolehlivější.

Pomocí CV ($v = 200 \text{ mV s}^{-1}$) byla studována interakce DNA se 4-NBP na DNA-HMDE. Relativní změna I_{CA} nebyla významná, nebyla ovlivněna ani koncentrací 4-NBP ani t_{int} .

Pomocí CV (20 cyklů od -300 mV do -800 mV nebo od 0 do -800 mV , obojí $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) nebo potenciostatické elektrolýzy (při -800 mV po dobu 10 min) byly generovány meziproducty redukce 4-NBP během inkubace DNA-HMDE v roztoku 4-NBP. Poté byly sledovány změny I_{CA} měřeného pomocí CV a I_{ac3} měřeného pomocí ACV. Byly pozorovány změny I_{CA} , což naznačuje destabilizaci nebo denaturaci DNA. Tím byla interakce DNA s meziproducty redukce 4-NBP potvrzena.

Dále byla pomocí CV a ACV na HMDE studována interakce DNA se 4-ABP (při stejných experimentálních podmínkách, jako byl studován 4-NBP). Předpokládá se, že dochází také ke vzniku DNA agregátu. Interakce DNA se 4-ABP byla potvrzena.

V rámci dlouhodobé studie byly pomocí CV a ACV na HMDE po dobu 7 dní a 16 hodin studovány roztoky 4-NBP v PB a 4-ABP v PB (obojí s DNA) a DNA v PB (jako blank). Poškození DNA nebylo potvrzeno. Jak již bylo zmíněno výše, k ovlivnění voltametrického chování DNA může docházet vlivem vzniku DNA agregátu s analytem.

4.2 Polarografické a voltametrické stanovení methylové violeti 2B na rtuťových elektrodách

Nejprve byl pomocí DCTP a DPP na DME studován vliv pH na elektrochemické chování MV v Brittonově-Robinsonově (BR) pufru (pH 2,0 – 12,0). Ke stanovení MV pomocí DCTP a DPP byl jako optimální vybrán BR pufr pH 4,0. Závislosti proudu píku MV na koncentraci byly lineární v celém kalibračním rozsahu, tj. od 1 do $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ pro DCTP a od 0,1 do $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ pro DPP. Dosažené L_Q byly $1,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ pro DCTP a $0,16 \mu\text{mol L}^{-1}$ pro DPP.

Při měření MV v BR pufru (pH 2 – 12) pomocí DCV a DPV na HMDE byly pozorovány dva píky. Kalibrační závislosti změřené pomocí DCV a DPV byly sestrojeny z druhého píku MV v BR pufru pH 4,0. Závislosti proudu píku MV na koncentraci byly lineární v rozsahu od 0,2 do $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ pro DCV a od 0,1 do $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ pro DPV. Dosažené L_Q byly 65 nmol L^{-1} pro DCV a 45 nmol L^{-1} pro DPV.

K dosažení nižší L_Q MV byla použita technika DPAdSV na HMDE. Optimální akumulací podmínky byly: akumulací čas 600 s a akumulací potenciál -500 mV

(optimalizace je popsána v [4]). Kalibrační závislost byla lineární od 20 do 100 nmol L⁻¹ a bylo dosaženo L_Q 13 nmol L⁻¹.

Pro porovnání byla MV v BR pufru pH 4,0 stanovena UV-Vis spektrofotometricky, s L_Q 0,5 μmol L⁻¹ (měřeno při absorpčním maximu, λ = 584 nm).

Vyvinutá metoda stanovení MV pomocí DPAdSV na HMDE byla ověřena při stanovení v pitné a říční vodě. Závislosti proudu píku MV na koncentraci byly lineární v rozsahu od 0,04 do 1 μmol L⁻¹ v pitné vodě a od 0,02 do 1 μmol L⁻¹ v říční vodě. Dosažené L_Q byly 40 nmol L⁻¹ pro pitnou vodu a 20 nmol L⁻¹ pro říční vodu.

4.3 Studium interakce DNA s methylovou viletí 2B

Experimenty byly provedeny v roztoku MV v 0,1 mol L⁻¹ acetátovém pufru pH 4,0 (AB) bez a s DNA v roztoku za laboratorní teploty a v interakčním čase 5 min.

Pomocí DPV na HMDE bylo studováno elektrochemické chování MV v PB bez a s DNA v roztoku. Při měření DPV bylo zjištěno, že přítomnost DNA v roztoku MV vede k: 1) poklesu I_p MV, 2) posunu E_p k méně negativním hodnotám, dosahující nejkładnější hodnoty při koncentraci DNA 50 μg mL⁻¹. Z toho lze vyvodit, že dochází k interkalaci MV mezi páry bází DNA nebo k vazbě do malého nebo velkého žlábků DNA, vzniku komplexu DNA–MV, s následnou elektrostatickou interakcí, která je podpořena nízkou iontovou silou [56].

Dále byly změřeny CV MV v AB bez a s DNA v roztoku. Ve zpětném skenu nebyly pozorovány žádné signály, ani MV a ani komplexu DNA–MV. Lze předpokládat, že redukce MV i komplexu DNA–MV je chemicky ireverzibilní.

Ze směrníc závislostí log (-I_p) MV na log v bylo zjištěno, že elektrochemická redukce MV je kontrolována adsorpce i difúzí [52]. Na druhou stranu redukce komplexu DNA–MV je kontrolována difúzí, což naznačuje tvorbu komplexu DNA–MV.

Chování MV v PB v bez a s DNA v roztoku bylo dále studováno pomocí UV-Vis spektrofotometrie. Posun maxima MV nebyl významný, ale byl pozorován hyperchromní efekt dosahující minimální absorbance při koncentraci DNA 50 μg mL⁻¹. Výsledky a závěry z UV-Vis spektrofotometrie jsou shodné s těmi dosaženými voltametricky.

Hodnoty D byly stanoveny z chronocoulometrických měření roztoku MV v AB bez a s DNA, s reakčními časy 4 až 64 s. Hodnoty D byly vypočteny pomocí Ansonovy rovnice [53]. Standardní rychlostní konstanta (k⁰) redukce byla vypočítána z dat naměřených

pomocí CV [52] Lze shrnout, že redukce MV i komplexu DNA–MV je elektrochemicky ireverzibilní.

Hodnoty K a m komplexu DNA–MV byly vypočítány z dat získaných pomocí DPV v roztoku s konstantní koncentrací DNA a měnící se koncentrací MV. Hodnota K byla vypočítána jako $(4,6 \pm 0,3) \times 10^4$ a z hodnoty m lze stanovit poměr MV a párů bází DNA 1:1. K byla dále stanovena z titrace roztoku MV roztokem DNA, $(6,5 \pm 0,1) \times 10^4$. Pomocí UV-Vis spektrofotometrie byla hodnota K stanovena jako $(6,0 \pm 1,4) \times 10^4$.

Pokles I_p MV způsobený přidávkem DNA do roztoku byl využit k sestavení kalibrační závislosti pro koncentrace DNA ve vodném roztoku 1 – 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Optimalizace metody je podrobně popsána v [5]. Optimální koncentrace MV byla 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ s L_Q DNA 0,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

5. Závěr

V této dizertační práci bylo ukázáno, že rtuťové elektrody jsou velmi užitečným a spolehlivým nástrojem pro environmentální analýzu, interakční studie dvouvláknové DNA s organickými látkami a k výzkumu poškození DNA. K tomuto účelu jsou vhodné polarografie a voltametrie. Ke stanovení methylové violeti 2B (MV), trifenylmethanového barviva, byly použity kapající rtuťová elektroda (DME) a visící rtuťová kapková elektroda (HMDE). HMDE byla dále použita ke studiu interakce DNA s MV a 4-nitrobifenylem (4-NBP), polutantem životního prostředí. Dále byla ke studiu interakce DNA se 4-NBP jako biosenzor použita DNA modifikovaná HMDE (DNA-HMDE).

Všechny cíle práce byly splněny. Pomocí cyklické voltametrie (CV), diferenční pulzní voltametrie (DPV) a AC voltametrie (ACV) ve fosfátovém pufru a prostředí fosfátový pufr–methanol (8:2) na HMDE a DNA-HMDE byla studována interakce DNA se 4-NBP. Bylo zjištěno, že vlivem interakce dochází k poklesu píku 4-NBP a k poklesu píku adenosinu a cytosinu (CA pík). Elektrochemická redukce 4-NBP bez i s DNA v roztoku je kvazireverzibilní děj kontrolovaný adsorpcí i difúzí.

Pomocí CV a ACV na DNA-HMDE byly studovány CA pík a pík 3. Po inkubaci v roztoku 4-NBP nebyla pozorována žádná významná změna CA píku ani píku 3. Nicméně byla potvrzena interakce DNA s redukčními meziprodukty 4-NBP.

Dále byla studována interakce DNA se 4-aminobifenylem (4-ABP), metabolitem 4-NBP, za stejných podmínek jako 4-NBP. Rovněž byla provedena dlouhodobá studie roztoku DNA se 4-NBP a 4-ABP pomocí CV a ACV. Bylo zjištěno, že interakcí DNA se 4-NBP i se 4-ABP dochází ke vzniku DNA agregátů s těmito analyty.

Druhý analyt, MV, byl nejprve studován polarograficky pomocí DME a voltametricky na HMDE. Optimální prostředí pro stanovení byl Brittonův-Robinsonův pufr pH 4,0. Nejnižší meze stanovitelnosti (L_Q), 13 nmol L^{-1} , bylo dosaženo pomocí diferenční pulzní adsorpční rozpouštěcí voltametrie (DPAdSV) na HMDE. Dosažené L_Q jsou srovnatelné s nebo nižší než L_Q získaná pomocí UV-Vis spektrofotometrie. DPAdSV na HMDE byla použita ke stanovení MV v modelových vzorcích pitné a říční vody.

Poté byla pomocí CV a DPV na HMDE a pomocí UV-Vis spektrofotometrie studována interakce DNA s MV v acetátovém pufru. Bylo zjištěno, že vlivem interakce dochází ke vzniku supramolekulárního komplexu DNA–MV. Elektrochemická redukce MV i komplexu DNA–MV je ireverzibilní. Pomocí UV-Vis spektrofotometrie a DPV byly vypočteny hodnoty konstanty stability a vazebný poměr komplexu DNA–MV.

Pokles proudu piky MV způsobený přítomností DNA v roztoku byl využit pro vývoj metody nepřímého stanovení DNA ve vodném roztoku s $L_Q 0,77 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tato práce ukazuje, že využití HMDE k výzkumu interakce DNA s biologicky aktivními organickými látkami je vhodné, a to s aplikováním různých přístupů a k potvrzení různých druhů interakcí. Rtuťové elektrody jsou stále spolehlivým a moderním nástrojem pro základní výzkum in vitro.

Literatura

- [1] J. Gajdar, E. Horáková, J. Barek, J. Fischer, V. Vyskočil: Recent Applications of Mercury Electrodes for Monitoring of Pesticides: A Critical Review. *Electroanalysis* **28** (2016), DOI: 10.1002/elan.201600239, v tisku.
- [2] V. Vyskočil, M. Blašková, A. Hájková, E. Horáková, Z. Krejčová, K. Stávková: *Electrochemical DNA Biosensors – Useful Diagnostic Tools for the Detection of Damage to DNA Caused by Organic Xenobiotics (A Review)*. V knize *Sensing in Electroanalysis*, K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas (Eds.), 141-162. University Press Centre, Pardubice 2012.

- [3] **E. Horakova**, J. Barek, V. Vyskocil: Voltammetry at a Hanging Mercury Drop Electrode as a Tool for the Study of the Interaction of Double-Stranded DNA with Genotoxic 4-Nitrobiphenyl. *Electroanalysis* **28** (2016), DOI: 10.1002/elan.201600241, v tisku.
- [4] **E. Horakova**, J. Barek, V. Vyskocil: Determination of Methyl Violet 2B Using Polarographic and Voltammetric Methods at Mercury Electrodes. *Analytical Letters* **49**, 56-65 (2016).
- [5] **E. Horakova**, V. Vyskocil, J. Barek: Interaction Study of Methyl Violet 2B with DNA and Voltammetric Determination of DNA in Aqueous Solutions. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **147**, 119-126 (2015).
- [6] X. Jinhui, F. S. C. Lee: Analysis of Nitrated Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. *Chemosphere* **42**, 245-250 (2001).
- [7] N. A. Littlefield, B. N. Blackwell, C. C. Hewitt, D. W. Gaylor: Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies of Gentian-Violet in Mice. *Fundamental and Applied Toxicology* **5**, 902-912 (1985).
- [8] Z. Sklenář: Riziková léčiva v pediatrické dermatologické magistraliter receptuře a jejich vhodné alternativy. *Pediatric pro praxi* **11**, 232-235 (2010).
- [9] L. J. Stevens, T. Kuczek, J. R. Burgess, M. A. Stochelski, L. E. Arnold, L. Galland: Mechanisms of Behavioral, Atopic, and Other Reactions to Artificial Food Colors in Children. *Nutrition Reviews* **71**, 268-281 (2013).
- [10] J. N. J. Pitts, K. A. Van Cauwenberghe, V. Cauwenberghe, D. Grosjean, J. P. Schmid, D. R. Fitz, W. L. Belser, G. P. Knudson, P. M. Hynds: Atmospheric Reactions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Facile Formation of Mutagenic Nitro Derivatives. *Science* **202**, 515-519 (1978).
- [11] J. Cvačka, J. Barek, J. Zima, A. G. Fogg, J. C. Moreira: Critical Review: High-Performance Liquid Chromatography of Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Analyst* **123**, 9R-18R (1998).
- [12] L. Chibwe, M. C. Geier, J. Nakamura, R. L. Tanguay, M. D. Aitken, S. L. M. Simonich: Aerobic Bioremediation of PAH Contaminated Soil Results in Increased Genotoxicity and Developmental Toxicity. *Environmental Science and Technology* **49**, 13889-13898 (2015).
- [13] Y. Lin, X. Qiu, Y. Ma, J. Ma, M. Zheng, M. Shao: Concentrations and Spatial Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Nitrated PAHs (NPAHs) in the Atmosphere of North China, and the Transformation from PAHs to NPAHs. *Environmental Pollution* **196**, 164-170 (2015).
- [14] W. Huang, B. Huang, X. Bi, Q. Lin, M. Liu, Z. Ren, G. Zhang, X. Wang, G. Sheng, J. Fu: Emission of PAHs, NPAHs and OPAHs from Residential Honeycomb Coal Briquette Combustion. *Energy and Fuels* **28**, 636-642 (2014).
- [15] E. Mutlu, S. H. Warren, P. P. Matthews, C. King, W. P. Linak, I. M. Kooter, J. E. Schmid, J. A. Ross, M. I. Gilmour, D. M. Demarini: Bioassay-Directed Fractionation and Sub-Fractionation for Mutagenicity and Chemical Analysis of Diesel Exhaust Particles. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **54**, 719-736 (2013).
- [16] M. W. Anders: *Bioactivation of Foreign Compounds*. Academic Press, Orlando 1985.

- [17] S. Ning, X. Xiaobai: Reductive Metabolism of 4-Nitrobiphenyl by Rat Liver Fraction. *Carcinogenesis* **18**, 1233-1240 (1997).
- [18] J. C. Moreira, J. Barek: Analysis of Carcinogenic Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Química Nova* **18**, 362-367 (1995).
- [19] Anonymous: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 4: Some Aromatic Amines, Hydrazine and Related Substances, N-Nitroso Compounds and Miscellaneous Alkylating Agents*. IARC, Lyon 1974.
- [20] W. B. Deichmann, W. M. Macdonald, M. M. Coplan: Paranitrobiphenyl, a New Bladder Carcinogen in the Dog. *Industrial Medicine and Surgery* **27**, 634-637 (1958).
- [21] S. Ning, X. Xiaobai: Optimization of Experimental Conditions in Studies on Metabolism of 4-Nitrobiphenyl. *Journal of Environmental Sciences* **10**, 64-68 (1998).
- [22] A. L. Walpole, M. H. Williams, D. C. Roberts: Tumours of the Urinary Bladder in Dogs after Ingestion of 4-Aminodiphenyl. *British Journal of Industrial Medicine* **11**, 105-109 (1954).
- [23] Anonymous: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 1: Some Inorganic Substances, Chlorinated Hydrocarbons, Aromatic Amines, N-Nitroso Compounds and Natural Products*. IARC, Lyon 1972.
- [24] V. Purohit, A. K. Basu: Mutagenicity of Nitroaromatic Compounds. *Chemical Research in Toxicology* **13**, 673-692 (2000).
- [25] V. Prechal, J. Krejčová, V. Vyskočil, K. Pecková, J. Fischer, J. Zima, J. Barek: Determination of 4-Aminobiphenyl and 4-Nitrobiphenyl by HPLC with Electrochemical, UV Spectrophotometric, and Fluorescent Detection. *International Journal of Electrochemical Science* **8**, 2524-2535 (2013).
- [26] J. Barek, A. Berka, M. Müller, J. Zima: Determination of 4-Nitrobiphenyl and 4-Aminobiphenyl by Controlled Potential Coulometry, DPP a DPV. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **50**, 2853-2862 (1985).
- [27] **E. Horakova**, D. Smidova, V. Vyskocil, J. Barek: Voltammetric Determination of 2-Nitrobiphenyl and 4-Nitrobiphenyl Using a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode. *International Journal of Electrochemical Science* **10**, 2155-2169 (2015).
- [28] A. L. Woodhead, B. Cosgrove, J. S. Church: The Purple Coloration of Four Late 19th Century Silk Dresses: A Spectroscopic Investigation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **154**, 185-192 (2016).
- [29] J. Liu, Y. Zhou, F. Zhao, Z. Peng, S. Wang: Identification of Early Synthetic Dyes in Historical Chinese Textiles of the Late Nineteenth Century by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Diode Array Detection and Mass Spectrometry. *Coloration Technology* **132**, 177-185 (2016).
- [30] M. Oplatomska, R. F. Donnelly, R. J. Majithiya, D. Glenn Kennedy, C. T. Elliott: The Potential for Human Exposure, Direct and Indirect, to the Suspected Carcinogenic Triphenylmethane Dye Brilliant Green from Green Paper Towels. *Food and Chemical Toxicology* **49**, 1870-1876 (2011).

- [31] Q. Sun, Y. Luo, X. Yang, P. Xiang, M. Shen: Detection and Identification of Dyes in Blue Writing Inks by LC-DAD-Orbitrap MS. *Forensic Science International* **261**, 71-81 (2016).
- [32] R. W. Sabnis: *Handbook of Acid-Base Indicators*. CRC Press, Boca Raton 2007.
- [33] F. Martin, J.-M. Oberson, M. Meschiari, C. Munari: Determination of 18 Water-Soluble Artificial Dyes by LC-MS in Selected Matrices. *Food Chemistry* **197**, 1249-1255 (2016).
- [34] M. Balabanova, L. Popova, R. Tchipeva: Dyes in Dermatology. *Clinics in Dermatology* **21**, 2-6 (2003).
- [39] R. D. Combes, R. B. Haveland-Smith: A Review of the Genotoxicity of Food, Drug and Cosmetic Colours and Other Azo, Triphenylmethane and Xanthene Dyes. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* **98**, 101-243 (1982).
- [35] W. C. Andersen, S. B. Turnipseed, C. M. Karbiwnyk, R. H. Lee, S. B. Clark, W. D. Rowe, M. R. Madson, K. E. Miller: Multiresidue Method for the Triphenylmethane Dyes in Fish: Malachite Green, Crystal (Gentian) Violet, and Brilliant Green. *Analytica Chimica Acta* **637**, 279-289 (2009).
- [36] S. H. Chen, A. S. Yien Ting: Biodecolorization and Biodegradation Potential of Recalcitrant Triphenylmethane Dyes by *Coriopsis* sp. Isolated from Compost. *Journal of Environmental Management* **150**, 274-280 (2015).
- [37] L. B. L. Lim, N. Priyantha, C. M. Chan, D. Matassan, H. I. Chieng, M. R. R. Kooh: Investigation of the Sorption Characteristics of Water lettuce (WL) as a Potential Low-Cost Biosorbent for the Removal of Methyl Violet 2B. *Desalination and Water Treatment* **57**, 8319-8329 (2016).
- [38] A. Vachálková, L. Novotný, M. Blesová: Polarographic Reduction of Some Triphenylmethane Dyes and Their Potential Carcinogenic Activity. *Neoplasma* **43**, 113-117 (1996).
- [39] R. C. Kaye, H. I. Stonehill: The Polarographic Reduction of Crystal-Violet, Brilliant-Green, Malachite-Green, and Auramine. *Journal of the Chemical Society* 3231-3239 (1952).
- [40] M. Fojta: Electrochemical Sensors for DNA Interactions and Damage. *Electroanalysis* **14**, 1449-1463 (2002).
- [41] M. Fojta: *Detecting DNA Damage with Electrodes*. V knize *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics*, E. Paleček, F. Scheller, J. Wang (Eds.), 386-418. Elsevier Science, Amsterdam 2005.
- [42] M. Fojta, L. Havran, J. Fulnečková, T. Kubičárová: Adsorptive Transfer Stripping AC Voltammetry of DNA Complexes with Intercalators. *Electroanalysis* **12**, 926-934 (2000).
- [43] Z. Krejčová, J. Berek, V. Vyskočil: Voltammetric Determination of Fenitrothion and Study of Its Interaction with DNA at a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode. *Monatshfte für Chemie - Chemical Monthly* **147**, 135-142 (2016).
- [44] F. C. Abreu, M. O. Goulart, A. M. Brett: Detection of the Damage Caused to DNA by Niclosamide Using an Electrochemical DNA-Biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **17**, 913-919 (2002).
- [45] A. P. F. Turner: *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, New York 1987.

- [46] J. Galandová, R. Ovádeková, A. Ferancová, J. Labuda: Disposable DNA Biosensor with the Carbon Nanotubes-Polyethyleneimine Interface at a Screen-Printed Carbon Electrode for Tests of DNA Layer Damage by Quinazolines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **394**, 855-861 (2009).
- [47] J. Barek, J. C. Moreira, J. Zima: Modern Electrochemical Methods for Monitoring of Chemical Carcinogens. *Sensors* **5**, 148-158 (2005).
- [48] J. Barek, A. G. Fogg, A. Muck, J. Zima: Polarography and Voltammetry at Mercury Electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **31**, 291-309 (2001).
- [49] M. Bartošík, M. Fojta, E. Paleček: Electrochemical Detection of 5-Methylcytosine in Bisulfite-Treated DNA. *Electrochimica Acta* **78**, 75-81 (2012).
- [50] O. Zítka, S. Krízková, S. Skalicková, P. Kopel, P. Babula, V. Adam, R. Kizek: Electrochemical Study of DNA Damaged by Oxidation Stress. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* **16**, 130-141 (2013).
- [51] G. Somer, S. Kalayci, Z. Almas: A New, Fast and Sensitive Method for the Determination of Trace Amounts of Nitrite Using Differential pulse Polarography. *Nitric Oxide* **57**, 79-84 (2016).
- [52] D. K. Gosser: *Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*. Wiley-VCH, New York 1993.
- [53] A. J. Bard, L. R. Faulkner, J. Leddy, C. G. Zoski: *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH, New York 1980.
- [54] J. G. Velasco: Determination of Standard Rate Constants for Electrochemical Irreversible Processes from Linear Sweep Voltammograms. *Electroanalysis* **9**, 880-882 (1997).
- [55] R. Fadrná, K. Cahová-Kucharíková, L. Havran, B. Yosypchuk, M. Fojta: Use of Polished and Mercury Film-Modified Silver Solid Amalgam Electrodes in Electrochemical Analysis of DNA. *Electroanalysis* **17**, 452-459 (2005).
- [56] M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah: Drug-DNA Interactions and Their Study by UV-Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltammetry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **124**, 1-19 (2013).

Curriculum Vitae

Mgr. Eva Horáková

Osobní údaje

Datum narození 20. ledna 1988
Místo narození Liberec
Národnost česká
Bydliště Nová Pasiřská 4041/21, Jablonec nad Nisou, 466 01
Přechodné bydliště Orelská 8, Praha 10, 101 00
Telefon +420 607 767 945
E-mail eva.horakova@natur.cuni.cz; evinka.horakova@seznam.cz

Vzdělání

2012 – nyní doktorské studium
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha
Studijní program: Analytická chemie
Státní závěrečná zkouška složena 18. června

2010 – 2012 magisterské studium
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha
Studijní program: Chemie
Studijní plán: Analytická chemie
Diplomová práce: Voltametrické stanovení genotoxických nitrobifenylů

2007 – 2010 bakalářské studium
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha
Studijní program: Chemie
Studijní plán: Chemie v přírodních vědách
Bakalářská práce: Voltametrické stanovení 4-nitrobifenylu na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě

1999 – 2007 středoškolské studium
Gymnázium a SOŠPg Jeronýmova, Liberec

Pracovní zkušenosti

- 2012 – 2015 Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Praha
Výzkum v rámci projektu Grantové agentury České republiky (P206/12/G151)
- 2012 – nyní doktorské studium
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Praha
Výzkum v rámci dizertační práce: Elektrochemické studium interakce DNA s biologicky aktivními látkami
Dozor v Pokročilém praktiku z analytické chemie
Erasmus intenzivní kurz 31. 8. – 14. 9. 2013, Portalegre, Portugalsko (Ochrana životního prostředí a technologie energetické přeměny se silným důrazem na využití elektrochemie a fotokatalýzy, základní principy elektrochemie a průmyslové elektrochemie)

Doporučení

- doc. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D. (školitel dizertační práce)
Telefon: +420 221 951 599
E-mail: vlastimil.vyskocil@natur.cuni.cz
- prof. RNDr. Jiří Barek, CSc. (konzultant dizertační práce)
Telefon: +420 221 951 224
E-mail: jiri.barek@natur.cuni.cz

Jazykové dovednosti

- Čeština mateřský jazyk
Angličtina pokročily (FCE, duben 2014)
Němčina začátečník

Další dovednosti

- práce s PC (MC Office, Adobe)
Řidičský průkaz (skupina B)
Instruktor jógy III. třídy

- Zájmy** sborový zpěv v tělese Akcent Liberec, jóga, inline bruslení

Seznam publikací, přednášek a posterových prezentací

Závěrečné práce

1. **E. Horáková**, *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2010: *Voltametrické stanovení 4-nitrobifenyly na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě.*
2. **E. Horáková**, *Diplomová práce*, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2012: *Voltametrické stanovení genotoxických nitrobifenyly.*

Články

1. **E. Horáková**, V. Vyskočil, J. Barek: Voltametrické stanovení karcinogenního 4-nitrobifenyly. *Chemické Listy* **106**, s32-s36 (2012).
2. **E. Horakova**, D. Smidova, V. Vyskocil, J. Barek: Voltammetric Determination of 2-Nitrobiphenyl and 4-Nitrobiphenyl Using a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode. *International Journal of Electrochemical Science* **10**, 2155-2169 (2015).
3. **E. Horakova**, V. Vyskocil, J. Barek: Interaction Study of Methyl Violet 2B with DNA and Voltammetric Determination of DNA in Aqueous Solutions. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **147**, 119-126 (2015).
4. **E. Horakova**, J. Barek, V. Vyskocil: Determination of Methyl Violet 2B Using Polarographic and Voltammetric Methods at Mercury Electrodes. *Analytical Letters* **49**, 56-65 (2016).

5. **E. Horakova**, J. Barek, V. Vyskocil: Voltammetry at a Hanging Mercury Drop Electrode as a Tool for the Study of the Interaction of Double-Stranded DNA with Genotoxic 4-Nitrobiphenyl. *Electroanalysis* **28** (2016), DOI: 10.1002/elan.201600241, v tisku.
6. J. Gajdar, **E. Horakova**, J. Barek, J. Fischer, V. Vyskocil: Recent Applications of Mercury Electrodes for Monitoring of Pesticides: A Critical Review. *Electroanalysis* **28** (2016), DOI: 10.1002/elan.201600239, v tisku.

Kapitoly v knihách

1. V. Vyskočil, A. Daňhel, J. Fischer, V. Novotný, D. Deýlová, **E. Horáková**, J. Barek, B. Yosypchuk, J. Wang: *Silver Amalgam Electrodes – A Look Back at the Last Five Years of Their Development and Applications*. V knize *Sensing in Electroanalysis*, K. Vytřas, K. Kalcher, I. Švancara (Eds.), 13-31. University Press Centre, Pardubice 2010.
2. V. Vyskočil, M. Blašková, A. Hájková, **E. Horáková**, Z. Krejčová, K. Stávková: *Electrochemical DNA Biosensors – Useful Diagnostic Tools for the Detection of Damage to DNA Caused by Organic Xenobiotics (A Review)*. V knize *Sensing in Electroanalysis*, K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas (Eds.), 141-162. University Press Centre, Pardubice 2012.

Přednášky

1. **E. Horáková**, V. Vyskočil, J. Barek: *Voltametrické stanovení 4-nitrobifenylu na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě*. Sborník abstraktů - 13. Študentská vedecká konferencia, Bratislava, Slovensko, 9. 11. 2011. Bratislava, Slovensko 2011, 54-55.

2. **E. Horáková**, V. Vyskočil, J. Barek: *Voltametrické stanovení karcinogenního 4-nitrobifenyly*. Sborník abstraktů - 15. ročník celostátní soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu firmy Merck“, Praha, Česká republika, 1. – 2. 2. 2012. Praha, Česká republika 2012.
3. V. Vyskočil, A. Daňhel, J. Fischer, **E. Horáková**, J. Barek: *Recent Trends in Development and Applications of Silver Amalgam Electrodes in Environmental Analysis of Biologically Active Organic Compounds*. Sborník abstraktů - 9th Spring Meeting of the International Society of Electrochemistry, Turku, Finsko, 8. – 11. 5. 2011. Lausanne, Švýcarsko 2011, 104.
4. V. Vyskočil, Z. Krejčová, **E. Horáková**, J. Barek: *DNA-Modified Electrodes in Voltammetric Analysis of Nitro and Amino Derivatives of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Sborník abstraktů - 45th Heyrovský Discussion - Electrochemistry of Biopolymers and Bioactive Compounds, Brno, Česká republika, 13. – 17. 7. 2012. Brno, Česká republika 2012.
5. V. Vyskočil, D. Deýlová, A. Hájková, **E. Horáková**, J. Barek: *Recent Trends in Development and Applications of Silver Amalgam-Based Working Electrodes in Environmental Electroanalysis*. Sborník abstraktů - Electrochemistry 2012, Mnichov, Německo, 16. – 20. 9. 2012. Frankfurt nad Mohanem, Německo 2012, 135.
6. **E. Horáková**, V. Vyskočil, J. Barek: *Voltammetric Determination of 4-Nitrobiphenyl at a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode*. Sborník abstraktů - XXXIII. Moderní Elektrochemické Metody, Jetřichovice, Česká republika, 20. – 24. 5. 2013. Jetřichovice, Česká republika 2013, 68-72.
7. **E. Horáková**, V. Vyskočil, J. Barek: *Study of Differential Pulse Voltammetric Behavior of Selected Nitro-Compounds at a Hanging Mercury Drop Electrode in the Presence of Double-Stranded DNA*. Sborník abstraktů - 9th International Students Conference „Modern Analytical Chemistry“, Praha, Česká republika, 23. – 24. 9. 2013. Praha, Česká republika 2013, 21-23.

8. **E. Horáková**, J. Barek, V. Vyskočil: *Determination of Methylviolet 2B Using Polarographic and Voltammetric Methods at Mercury Electrodes*. Sborník abstraktů - XXXIV. Moderní Elektrochemické Metody, Jetřichovice, Āeská republika, 19. – 23. 5. 2014. Jetřichovice, Āeská republika 2014, 60-64.
9. **E. Horáková**, V. Vyskočil, J. Barek: *Voltammetric Study and Determination of Methyl Violet 2B Using a Hanging Mercury Drop Electrode*. Sborník abstraktů - 10th International Students Conference „Modern Analytical Chemistry“, Praha, Āeská republika 22. – 23. 9. 2014. Praha, Āeská republika 2014, 21-22.
10. **E. Horáková**, V. Vyskočil, J. Barek: *Voltammetric Study of the Interaction of Methyl Violet 2B with DNA and Its Use for the Determination of DNA in Aqueous Solutions*. Sborník abstraktů - XXXV. Moderní Elektrochemické Metody, Jetřichovice, Āeská republika, 18. – 25. 5. 2015. Jetřichovice, Āeská republika 2015, 60-64.
11. V. Vyskočil, A. Hájková, **E. Horáková**, A. Daňhel, M. Fojta: *Electrochemical Detection of DNA Damage Caused by Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. Sborník abstraktů - 16th Meeting of the European Society of Electroanalytical Chemistry, Bath, Velká Británie, 12. – 16. 6. 2016. Bristol, Velká Británie 2016.
12. V. Vyskočil, D. Arustamian, A. Hájková, **E. Horáková**: *High-Throughput Detection of DNA Damage – A Step towards Genotoxicity Screening Assays*. Sborník abstraktů - XXV. Biochemický sjezd, Praha, Āeská republika, 13. – 16. 9. 2016. Praha, Āeská republika 2016, abstrakt přijat.
13. **E. Horáková**, J. Barek, V. Vyskočil: *Study of the Interaction between DNA and 4-Nitrobiphenyl Using Voltammetry at a Hanging Mercury Drop Electrode*. Sborník abstraktů - 12th International Students Conference „Modern Analytical Chemistry“, Praha, Āeská republika 22. – 23. 9. 2016. Praha, Āeská republika 2016, abstrakt podán.

Posterové prezentace

1. V. Vyskočil, **E. Horáková**, D. Šmídová, J. Barek: *Voltammetric Determination of Genotoxic Nitrobiphenyls Using a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode*. Sborník abstraktů - Electrochemistry 2010: From Microscopic Understanding to Global Impact, Bochum, Německo, 13. – 15. 9. 2010. Frankfurt nad Mohanem, Německo 2010, 210.
2. V. Vyskočil, Z. Krejčová, **E. Horáková**, J. Barek: *Non-Traditional Electrode Materials for the Development of New Voltammetric DNA Biosensors*. Biosensors 2012, Cancun, Mexico, 15. – 18. 5. 2012. Oxford, Velká Británie 2012.
3. **E. Horakova**, V. Vyskocil, J. Barek: *Study of the Interaction of 4-Nitrobiphenyl with DNA at a Hanging Mercury Drop Electrode*. Sborník abstraktů - 9th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications, Kalamata, Řecko, 20. – 24. 9. 2015. Kalamata, Řecko 2015, 278.
4. **E. Horáková**, V. Vyskočil, J. Barek: *Study of the Interaction of 4-Nitrobiphenyl with Double-Stranded DNA Using Voltammetric Methods*. Sborník abstraktů - 6th European Chemistry Congress, Sevilla, Španělsko, 11. – 15. 9. 2016, Sevilla, Španělsko 2016, abstrakt přijat.