

## Miniaturized Electrochemical Detectors for Analysis in Capillary Flowing Systems (Miniaturizované elektrochemické detektory pro analýzu v kapilárních průtočných systémech)

Martina Komendová, Radovan Metelka, Zuzana Holiková, and Jiří Urban  
University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, 53210 Pardubice, Czech Republic, E-mail: radovan.metelka@upce.cz

### Abstract

Several designs of miniaturized electrochemical detectors based on incorporation of various types of microelectrodes into the ending of capillaries were developed. Capillary devices consisting of platinum tetrodes or free platinum and carbon microfibers were tested in biamperometric mode of operation. Detectors utilizing carbon or platinum microfibers as working and silver microwire as reference electrodes were used in amperometry of selected catecholamines. Analytical performance of different arrangements of microelectrodes in flowing streams was evaluated in the detection of dopamine in phosphate buffer carrier solutions and the detection limit as low as 110 pg of dopamine on injection was attained.

**Key words:** Capillary electrochemical detectors, HPLC column, Microelectrodes, Tetrode, Dopamin, Amperometry, Biamperometry.

### Úvod

Elektrochemická detekce v kapalinové chromatografii je v současnosti snadno proveditelná a citlivá detekční technika, která je dostatečně selektivní pro širokou škálu elektroaktivních biologicky důležitých látek, jako jsou např. fenolické sloučeniny, neurotransmitery, sacharidy a další<sup>1</sup>. Pro tyto účely se nejčastěji využívá přímá nebo pulzní amperometrie na pevných elektrodách nebo coulometrie s použitím porézních elektrod s velkým povrchem. Pro dlouhodobou a spolehlivou elektrochemickou detekci je nutná hlavně robustní konstrukce referenční elektrody, zajišťující konstantní potenciál při amperometrických nebo coulometrických měřeních<sup>2</sup>.

Pro patřičné umístění pracovní, referenční a případné pomocné elektrody se konstruují průtokové cely různých návrhů. Důležitou roli hraje objem a geometrické uspořádání průtokové cely, ve které je umístěna pracovní elektroda. Prostor pro detekci musí být dostatečně malý, aby detektor minimálně přispíval k rozmyvání stanovované látky. Mezi nepoužívanější geometrická uspořádání patří tenkovrstvý, kdy je analyzovaný roztok veden podél pracovní elektrody, a wall-jet detektor, kdy proud roztoku směřuje kolmo k elektrodovému povrchu. Referenční elektrody klasické konstrukce jsou většinou umístěny z prostorových důvodů mimo detekční celu. Dalšími používanými typy jsou tubulární, porézní a detektor s vláknovými elektrodami, který se využívá v miniaturizovaných HPLC systémech. Tubulární detektor využívá vnitřní stěnu detekční trubice, ve které je umístěna pracovní elektroda a prochází přes ni roztok z HPLC kolony. Referenční a pomocná elektroda jsou umístěny na výstupu z detekční trubice<sup>3</sup>. Porézní typ detektoru využívá porézní vrstvu materiálu jako pracovní elektrodu<sup>4</sup>. Detektory s vláknovými elektrodami, například z uhlíku, jsou využívány pro přímé spojení s kapilárními kolonami HPLC systémů<sup>5</sup>.

Příspěvek se věnuje konstrukci kapilárních elektrochemických detektorů s využitím různých konfigurací mikroelektrod pro jejich nasazení v průtočných systémech, jako jsou např. FIA nebo HPLC. Velmi malé rozměry elektrod v řádu jednotek až desítek mikrometrů u jednotlivých vláken umožnily připravit detektory přímo v kapilárách o průměru až 320 μm

s možností dále zmenšovat průměr pracovní kapiláry při použití vhodného mikromanipulátoru. Analytické parametry takto připravených kapilárních detektorů byly testovány při amperometrické detekci dopaminu na uhlíkové pracovní a stříbrné referenční mikroelektrodě. Stejný analyt byl monitorován také biamperometricky na tetrodě s platinovými mikroelektrodami a různou geometrií hrotu bez použití klasické referenční elektrody.

### **Experimentální část**

#### *Chemikálie a přístroje*

0,1 M fosforečnanový pufr (pH 6,6) byl připraven smícháním odpovídajících navážek  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (Lachema a.s.) a  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Sigma-Aldrich) v ultračisté vodě (Milli-Q, Millipore S.A.S.). K přípravě vodně-organického nosného roztoku byl smíchán 0,1 M fosforečnanový pufr s acetonitrilem (Sigma-Aldrich) v poměru 1:1 (v/v). Zásobní roztok dopamin hydrochloridu (Sigma-Aldrich) ve fosforečnanovém pufru a ve směsi s acetonitrilem o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  byl připravován denně čerstvý a nižší koncentrace dopaminu zředěním použitým nosným roztokem.

Roztoky byly čerpány syringou pumpou (KD Scientific) z plastové stříkačky o objemu 5 ml do šesticestného dávkovacího ventilu s nerezovou smyčkou 5  $\mu\text{l}$  (ECOM s.r.o.) a dále do kapilární kolony o průměru 530 nebo 320  $\mu\text{m}$  s integrovaným elektrochemickým detektorem. Proudové odezvy v čase za konstantního potenciálu byly sledovány ve dvouelektrodovém uspořádání potenciostaty PGSTAT128N a software GPES (Metrohm Autolab) nebo PalmSens a software PStace (PalmSens BV). Konektory tetrody byly pro experimenty spojeny v uspořádání 1+3 nebo 2+2. Kapilára s detektorem byla umístěna ve Faradayově kleci (Metrohm Autolab).

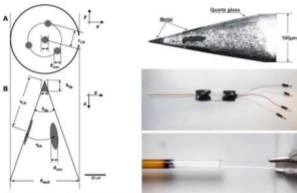
#### *Připrava kapilárních detektorů*

Na keramickou destičku (Coors Ceramics) byl pomocí kyanoakrylátového a epoxidového lepidla připevněn buď čtyřelektrodový detektor – tetroda (Thomas Recording GmbH) nebo mikrovlákna z platiny, stříbra (obě průměr 25  $\mu\text{m}$ ) a uhlíku (průměr 7  $\mu\text{m}$ , vše Goodfellow). Mikroelektrody byly před přilepením na podklad kontaktovány k pozinkovanému drátu stříbrným vodivým lakem (Ted Pella, Inc.). Křemenná kapilára o vnitřním průměru 320  $\mu\text{m}$  nebo 530  $\mu\text{m}$  (Agilent) byla plamenem zbavena částí ochranné vrstvy polyimidu a upevněna do mikromanipulátoru (Narishige). Následně byla tetroda nebo pracovní a referenční mikroelektroda vsunuta pod mikroskopem do kapiláry a uchytcena lepidlem. Takto připravený detektor se nechal 24 hodin vytvrdnout a poté se všechny spoje přetřely epoxidovým lepidlem pro získání větší mechanické a chemické odolnosti.

### **Výsledky a Diskuse**

Použitá tetroda obsahuje čtyři oddělené mikroelektrody ze slitiny Pt-W (95:5) o průměru jádra 26  $\mu\text{m}$  a sousedních elektrod 14  $\mu\text{m}$ . Vnější průměr křemenného vlákna je 100  $\mu\text{m}$  a je umístěno v ochranné kapiláře ke zvýšení mechanické odolnosti (Obr. 1). Výrobce garantuje reprodukovatelnou geometrii hrotu, který může být buď kuželovitý, nebo rovný. Takto integrované tetrody byly testovány jako kapilární elektrochemické detektory pro biamperometrickou detekci dopaminu. Byl sledován vliv geometrie hrotu, způsobu zapojení jednotlivých elektrod, průměru kapiláry, typu a průtoku nosného elektrolytu a detekčního napětí na proudovou odezvu modelového vzorku analytu. Nejvyšší citlivosti bylo dosaženo při detekci dopaminu ve fosforečnanovém pufru bez přídavku acetonitrilu, na druhou stranu byla patrná výraznější pasivace elektrod, kdy proudy jednotlivých nástříků analytu klesaly postupně v čase. V menších kapilárách byla citlivost měření srovnatelná jak pro

fosforečnanový pufr, tak i pro jeho směs s acetonitrilem. Větší proudy byly registrovány v zapojení 2 + 2, kdy byly mezi sebou propojeny dvě boční elektrody a středová a zbývající boční elektroda. Rovněž tetroda s kuželovitým hrotem, kdy jsou boční elektrody zhroubeny do elipsy, poskytovala větší proudovou odezvu. Velký vliv na měřené proudy má tedy pracovní plocha elektrod ve dvouelektrodovém uspořádání. Po optimalizaci výše uvedených parametrů byla realizována biamperometrická detekce dopaminu v kapiláře 320  $\mu\text{m}$ , průtoku vodně-organického nosného roztoku 5  $\mu\text{l min}^{-1}$  a detekčním napětí 1,4 V v koncentračním rozmezí  $5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ . Zlepšení citlivosti o řád je možné dosáhnout integrací dvou uhlíkových nebo platinových mikroelektrod, podobně jako u následujícího amperometrického detektoru.



**Obr. 1.** Testované elektrochemické detektory v kapilářích. Tetroda: rozměrové schéma pro A) příčný řez a B) boční pohled <sup>5</sup> (vlevo), fotografie hrotu z elektronového mikroskopu <sup>6</sup> (uprostřed) a celkový pohled na detektor <sup>7</sup> (uprostřed). Detail umístění C pracovní a Ag referenční mikroelektrody v kapiláře u amperometrického detektoru <sup>8</sup> (dole).

Další typ miniaturizovaného elektrochemického detektoru představuje kombinace uhlíkové mikroelektrody jako pracovní a stříbrného mikrodrátu jako pseudoreferenční elektrody. Na Obr. 1 je zachyceno ukotvení vláken na kontaktní drátky pomocí vodivého laku a jejich umístění v kapiláře. Vlastnosti připraveného detektoru byly optimalizovány z hlediska použitého instrumentace, pracovního potenciálu, složení nosného roztoku a jeho průtoku. Bylo zjištěno, že během měření dochází k postupné pasivaci povrchu elektrody oxidačními produkty, což způsobuje pokles odezvy detektoru. Tento problém byl do velké míry potlačen elektrochemickým čištěním elektrody. Charakterizace analytických parametrů detektoru byla provedena amperometricky pomocí modelových vzorků dopaminu v koncentračním rozmezí  $5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ . V daném rozsahu koncentrací vykazoval elektrochemický detektor lineární odezvu. Limit detekce integrovaného elektrochemického detektoru byl stanoven na  $1,44 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ , což v použitém experimentálním uspořádání odpovídá 110,4 pg nadávkovaného dopaminu <sup>8</sup>.

### Závěr

Byly připraveny různé typy elektrochemických detektorů v kapilárách a testovány jejich analytické parametry při detekci dopaminu. V biamperometrickém režimu na polarizovatelných elektrodách, bez nutnosti používat referenční elektrodu klasické konstrukce, která se obtížně miniaturizuje, lze detekovat až mikromolární koncentrace elektroaktivních látek, v tomto případě dopaminu. V případě amperometrického detektoru, tvořeného uhlíkovou pracovní mikroelektrodou a stříbrným mikrodrátkem jako pseudoreferenční elektroda, bylo možné sledovat dopamin s lineární odezvou v rozmezí tří koncentračních řádů. V současné době byl amperometrický detektor integrován do kapilární monolitické kolony pro HPLC a úspěšně použit pro detekci elektroaktivních neurotransmiterů po jejich předchozí separaci.

### Poděkování

Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentuře České republiky v rámci projektu č. 14-22426S.

### Literatura

1. Özkan S. A.: *Chromatographia* 66, S3 (2007).
2. Trojanowicz M.: *Anal. Chim. Acta* 688, 8 (2011).
3. Barek J. a kol.: *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*. VŠCHT Praha, Praha 2006.
4. Flanagan R. J., Perrett D., Whelpton R.: *Electrochemical Detection in HPLC – Analysis of Drugs and Poisons*. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2005.
5. Mechler F., Victor J. D., Ohiorhenuan I., Schmid A. M., Hu Q.: *Journal of Neurophysiology* 106, 828 (2011).
6. <http://www.thomasrecording.com/electrochemical-products/electrochemical-microelectrodes/multi-core-microelectrodes/>, Downloaded April 7<sup>th</sup>, 2016.
7. Holíková Z.: *Diploma Thesis*. University of Pardubice, Pardubice 2015.
8. Komendová M.: *Diploma Thesis*. University of Pardubice, Pardubice 2015.