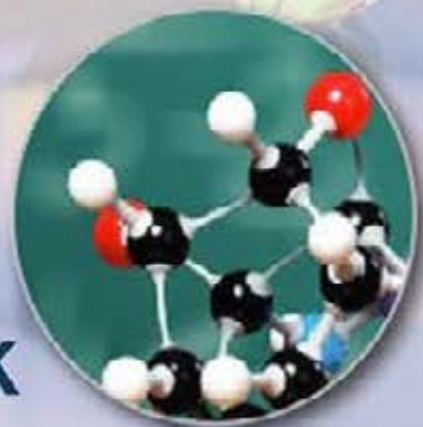


# XXXIX.

## MODERNÍ ELEKTROCHEMICKÉ METODY

SBORNÍK PŘEDNÁŠEK

Květen 2019





Best servis Ústí nad Labem  
Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v. v. i., Praha

Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Brno

UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí,  
Katedra analytické chemie,  
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha



**Sborník přednášek**  
**mezinárodní odborné konference**

# **XXXIX.**

# **Moderní Elektrochemické Metody**

**Jetřichovice, 20. – 24. května 2019**

Uspořádali:

Tomáš Navrátil, Miroslav Fojta a Karolina Schwarzová

**ISBN 978-80-905221-7-6**

Tato publikace je určena pro účastníky konference a členy pořádajících organizací.

Za obsah veškerých textů nesou plnou zodpovědnost autoři. Publikace neprošla odbornou ani jazykovou úpravou. Zveřejněné informace mohou být dále použity za předpokladu úplného citování původního zdroje. Přetiskování, kopírování či převádění této publikace do jakékoliv tištěné či elektronické formy a její prodej je možný pouze na základě písemného souhlasu vydavatele. (Bona fide vědečtí pracovníci si mohou pořídit jednotlivé kopie pro vlastní potřebu).

Název: XXXIX. Moderní Elektrochemické Metody  
Vydal: Srsenová Lenka - Best servis Ústí nad Labem  
Autor: kolektiv autorů  
Počet stran: 258  
Náklad: 90  
Vydání: 1.  
Formát: A5  
ISBN: 978-80-905221-7-6

Best servis Ústí nad Labem

J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry  
of the Czech Academy of Sciences, Prague

Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, Brno

UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry,  
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science,  
Charles University, Prague



FACULTY OF SCIENCE  
Charles University



Proceedings of the International Conference

# Modern Electrochemical Methods

## XXXIX

Jetřichovice, Czech Republic

May 20<sup>th</sup> - May 24<sup>th</sup>, 2019

**Editors:**

Tomáš Navrátil, Miroslav Fojta, and Karolina Schwarzová

ISBN 978-80-905221-7-6

Poděkování partnerům konference  
XXXIX. Moderní Elektrochemické Metody



PŘÍRODOVĚDECKÁ  
FAKULTA  
Univerzita Karlova



ECO-TREND PLUS s.r.o.

<b>Obsah</b>	<b>Strana</b>
<u>Simona Baluchová, Michal Nedvěd, Jana Vosáhllová, Andrew Taylor, Vincent Mortel, and Karolina Schwarzová-Pecková</u> Boron-Doped Diamond Electrodes: The Role of Doping Level and Surface Treatment in the Electrooxidation of m-Cresol	9
<u>Miroslav Bchůl, Marian Vojs, Marián Marton, Pavol Michniak, Mario Kurniawan, Hauke-Lars Honig, Dmitry Zyabkin, Manuel Oliva Ramirez, and Andreas Bund</u> Influence of TiO <sub>2</sub> Thickness on PEC Properties of BDD/TiO <sub>2</sub> Electrodes	14
<u>Lenka Benešová, Polina Yershova, and Karolina Schwarzová-Pecková</u> Voltammetry of cholesterol and its precursor 7-dehydrocholesterol on boron doped diamond electrode	18
<u>Mariola Brycht, Jana Vosáhllová, Karolina Schwarzová-Pecková, Andrew Taylor, Ladislav Klimša, Jaromír Kopeček, Ivan Dittert, and Jan Krůšek</u> Boron-Doped Diamond Microelectrodes Fabricated by Microwave Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition Process with Linear Antenna Delivery	22
<u>Tomas Bystron, Anastasiia Alexandrova, and Balamurungan Devadas</u> Anodic Oxidation of 2-Iodobenzoic and 2-Iodosobenzoic Acid at Boron-Doped Diamond Anode	27
<u>Andrea Gregorio Castano, Romana Sokolova, and Ilana Degano</u> On UV-Vis Spectroelectrochemistry of Luteolin-7-O-Glucoside	31
<u>Aleš Daňhel, Peter Šebest, Lukáš Kejřk, Filip Ligmajer, and Michal Horák</u> Spectro-Electrochemical and Plasmonic Behavior of Silver Amalgam Particles	36
<u>Hana Dejmková and Manuel Knaf</u> Application of Carbon Felt Detector for the Determination of Dinitrophenol Metabolites	41
<u>Juraj Dian, Ivan Jelínek, Jindřich Jindřich, and Jiří Mosinger</u> Spectroelectrochemistry of Natural Porphyrins	44
<u>Daniel Dobrovodský, Jana Malíková, Aleš Daňhel, and Miroslav Fojta</u> Electrochemical Study of Selected G4 Ligands and Their Interaction with Oligonucleotides	47
<u>Libor Dušek and Gabriela Kuchtová</u> Electrochemical Decolourization and Cleaning of Waste Water Containing Acid Blue 80	51
<u>Amir Shaaban Farag, Jitka Klikarová, Milan Sýs, and Karel Vytřas</u> Analytical Method to Evaluate Taurine in Energy Drinks after o-Phthalaldehyde-Ethanethiol Derivatization Using Square Wave Voltammetry	57
<u>Jan Fischer, Adamantia Apostolopoulou, Anastasios Economou, and Jiří Barek</u> Voltammetric Determination of Anthraquinone-2-sulfonate at a Boron-Doped Diamond Electrode	61
<u>Miroslav Fojta</u> Mercury Electrodes in Biomacromolecule Research of 21 <sup>st</sup> Century: Still Unbeatable?	64

<u>Július Galdár</u> , Tomáš Goněk, Josef Jampílek, Marie Brázdová, Zuzana Bábková, Miroslav Fojta, Jiří Barek, and Jan Fischer Cathodic Voltammetric Determination of a Nitro Substituted 1-Hydroxynaphthalene-2-carboxanilide in Dimethyl Sulfoxide in Electrochemical Microcell	70
<u>Miroslav Gál</u> , Aneta Anna Dunajová, and Kornélia Tomčíková Impedimetric Biosensor for the Detection of Protein Virus Residues	74
<u>Luděk Havran</u> , Pavlína Havranová, Monika Hermanová, Mojmír Trefulka, Lukáš Fojt, and Miroslav Fojta New Possibilities in DNA Electroactive Labelling	77
<u>Pavlína Havranová</u> , Lukáš Fojt, Miroslav Fojta and Aleš Daňhel Preparation and Characterization of Silver Amalgam Particles on Screen Printed Silver Electrodes Surface	81
<u>Monika Hermanová</u> , Hana Pivoňková, Zuzana Bábková, and Miroslav Fojta Accumulation of Mercury Ions in Homothymine Stretches of DNA: A Voltammetric Study	85
<u>Karel Holub</u> , Zdeněk Samoc, <u>Vladimír Maroček</u> Mechanism of the Water Clusters Formation in the Organic Phase in the Presence of Hydrated Ions	88
<u>Jan Hrbáč</u> , Mamas I. Prodromidis, Maria G. Trachioti, Eleni I. Tzianni, and Daniel Riman Modification of Screen Printed Electrodes using Spark Discharge	93
<u>Maďdaléna Hromadová</u> , Viliam Kolivoška, Jakub Šebera, Táňa Sebechlebská, Jindřich Gasior, Štěpánka Nováková Lachmanová, Gábor Mészáros, Marcin Lindner, Marcel Mayor, and Michal Valášek Charge Transport in Single Oligophenylene Molecular Wires with Different Anchoring Groups	96
<u>Jaromíra Chýlková</u> , Lenka Janíková, Miloš Sedlák, Jan Bartáček, Jiří Váňa, and Renáta Šelešovská Voltammetric Analysis of Daminozide after its Acidic Hydrolysis Employing Boron-Doped Diamond Electrode	100
<u>Aleksandr V. Ivanishchev</u> , Nelly A. Gridina, Kirill S. Rybakov, Irina A. Ivanishcheva, Arseni V. Ushakov, and Ambesh Dixit Structural and Electrochemical Investigation of Lithium Ions Insertion Processes in Polyanionic Compounds of Lithium and Transition Metals	104
<u>Michal Jakl</u> and Jana Jaklová Dyrťová Cocktail Interactions of Cyproconazole and Tebuconazole in Copper Presence	109
<u>Jana Jaklová Dyrťová</u> and Michal Jakl Cocktail Reactions of Azoles in the Environment	113
<u>Granit Jashari</u> , Milan Sýs, Radovan Metelka, and Ivan Švancara Possibilities of Simultaneous Voltammetric Detection of Tocopherols in Non Aqueous Media	117
<u>Kristýna Jelšíková</u> , Michal Zelenský, <u>Karolina Schwarzová-Pecková</u> Electrochemical Oxidation of Phytosterols at Carbon-based Electrode Materials	121



<u>Bohdan Josypčuk, Jiří Barek, and Oksana Josypčuk</u> Electrochemical Enzymatic Biosensors for Determination of Catecholamines in Flow Systems	125
<u>Barbora Kamenická, Tomáš Weidlich, and Ivan Švancara</u> A Study of Adsorption of Diclofenac onto an Adsorbent of the Biochar Type in Combination with Voltammetry with Chemical Modified Carbon Paste Electrode	130
<u>Jan Klouda, Jiří Barek, Karel Nesměrák, and Karolina Schwarzová-Pecková</u> Voltammetric Determination of Cholic and Chenodeoxycholic Acids in Artificial Serum	135
<u>Regina M. Kluge, Richard W. Haid, Yunchang Liang, David McLaughlin, Christoph Csoklich, Jonas H. K. Pfisterer, Oliver Schneider, and Aleksandr S. Bandarenka</u> Identification of Active Electrocatalytic Sites using Electrochemical Scanning Tunneling Microscopy	139
<u>Veronika Kočanová, Libor Dušek, Aneta Karásková, and Ladislav Novotný</u> Galvanostatic Recycling Zinc from Selected Industrial Waste Waters	143
<u>Lucie Koláčková, Peter Polák, Tomáš Tobrman, and Jiří Ludvík</u> Pyrene Derivatives for Organic Semiconductors	147
<u>Ishak Kovač, Michal Jakl, and Jana Jaklová Dytrtová</u> Reactivity of Penconazole in the Presence of Zinc	152
<u>Erika Medvecká, Marian Vojs, Marian Marton, Pavol Michniak, Roman Grabic, and Andrea Vojs Staňová</u> BDD Electrodes for Electrochemical Degradation of Selected Pharmaceuticals	157
<u>Tomáš Mikysek, Milan Sýs, Michaela Obluková, and Romana Sokolová</u> Characterization of Complexes Based on Tyrosinase Motif	160
<u>Katarína Nemčeková, Jozef Sochr, and Ján Labuda</u> Effect of Silver Nanoparticles towards DNA via Formation of Reactive Oxygen Species	163
<u>Štěpánka Nováková Lachmanová, Lubomír Pospíšil, Barisa Talbi, Michèle Salmain, and Magdaléna Hromadová</u> Chronopotentiometry of Papain Modified by Ruthenium Complexes	167
<u>Anna Ondráčková, Luděk Havran, Karolina Schwarzová, and Miroslav Fojta</u> Voltammetry of Sudan I at Pyrolytic Graphite and Boron Doped Diamond Electrodes in Aqueous Media	170
<u>František Opekar, Jakub Hraníček, and Petr Tůma</u> Rapid Determination of Major Minerals in Yogurt Using Microdialysis On-line Connected with Capillary Electrophoresis	174
<u>Olha Sarakhman and Lubomír Švorc</u> Novel Voltammetric Protocol for Reliable Determination of a Platelet Aggregation Inhibitor Dipyridamole on a Bare Miniaturized Boron-Doped Diamond Electrochemical Sensor	178
<u>Táňa Sebechlebská, Eva Vaněčková, Violetta Shestivska, and Viliam Kolivoška</u> Electrochemical Investigation of Polylactic Acid/Carbon Black Composite Filament for the Manufacture of 3D Printed Electrodes	183

<i>Jana Skopalová, Andrea Rajcová, Šárka Vokounová, and Tomáš Navrátil</i> Voltammetric Determination of Chili Peppers Pungency using Phospholipid Modified Glassy Carbon Electrode	188
<i>Veronika Svitková, Ján Labuda, and Vlastimil Vyskočil</i> Indirect Detection of DNA Damage at Silver Solid Amalgam Electrodes	193
<i>Milan Sýs, Aneta Hartmanová, and Tomáš Mikysck</i> Effect of Immobilization Methods on Service Life of Tyrosinase Biosensors Developed for Dopamine Monitoring	197
<i>Renáta Šelešovská, Kateřina Krejčová, Karolína Schwarzová, Lenka Janíková, and Jaromíra Chýlková</i> Voltammetric Behavior of Triazole Fungicides on Boron Doped Diamond Electrode	201
<i>Ivana Šestáková and Tomáš Navrátil</i> Voltammetry at Silica Gel-Modified Carbon Paste Electrode	205
<i>Iveta Třísková, Libuše Trnková, Iva Kejnovská, and Michaela Vorlíčková</i> Electrochemical and Spectral Analysis of Cytosine-rich Nonamers	209
<i>Petr Tůma</i> Determination of Different Kinds of Pharmaceuticals in Blood Plasma by Capillary Electrophoresis and Acetonitrile-Based Sample Stacking	213
<i>Sofia Tvorynska, Jiří Berek, and Bohdan Josypčuk</i> Construction and Application of Flow Amperometric Biosensor Based on Enzymatic Reactor for Determination of Choline	218
<i>Elena Ushakova, Daniil Itkis, Vladimir Sergeev, and Evgenij Karpushkin</i> Solid Electrolyte Interface Formation on Lithium Metal Anode in Polymer Electrolytes	223
<i>Eva Vaněčková, Táňa Sebechlebská, Violetta Shestivska, and Viliam Kolivoška</i> Manufacture of Patterned Copper Foam Electrodes Employing 3D Printed Masks	227
<i>František Vavrek, Olena Butsyk, Viliam Kolivoška, Štěpánka Nováková Lachmanová, Táňa Sebechlebská, and Magdaléna Hromadová</i> Simultaneous Measurement of Single Molecule Conductance and Thermopower	231
<i>Marian Vojs, Vlastimil Řeháček, Andrea Vojs Staňová, Erika Medvecká, Miroslav Behúl, Pavol Michniak, Pavel Škvára, and Manán Marton</i> Boron Doped Diamond Electrodes: the Effect of Hierarchical Nanostructuring	236
<i>Jakub Wantulok, Romana Sokolova, Jacek Nycz, and Ilaria Degano</i> Oxidation and Reduction of Selected 1,10-Phenanthrolines	240
Author Index	244

**Boron-Doped Diamond Electrodes: The Role of Doping Level and Surface Treatment in the Electrooxidation of *m*-Cresol**  
(**Bórom dopované diamantové elektródy: Vplyv úrovne dopovania a úpravy povrchu na elektrooxidáciu *m*-krezolu**)

Simona Baluchová<sup>a,b</sup>, Michal Nedvěd<sup>a</sup>, Jana Vosáhlová<sup>a</sup>, Andrew Taylor<sup>c</sup>, Vincent Mortet<sup>b,c</sup>, and Karolina Schwarzová-Pecková<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic, E-mail: simona.baluchova@natur.cuni.cz

<sup>b</sup> Czech Technical University in Prague, Faculty of Biomedical Engineering, Sítňá Sq. 3105, 272 01 Kladno, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute of Physics of the Czech Academy of Sciences, Na Slovance 2, 182 21 Prague, Czech Republic

**Abstract**

The influence of boron-doping level (B/C ratio in the gas phase (ppm): 500, 1000, 2000, 4000, and 8000) and surface termination (H- vs. O-) of conventional planar and porous boron-doped diamond (BDD) samples on their electrochemical properties and on the voltammetric behaviour of *m*-cresol, a toxic major water waste pollutant, was thoroughly investigated. Within this study, it has been proved that both examined factors have a significant impact on *m*-cresol electrooxidation, thus have to be carefully considered when BDD is applied for electrochemical sensing of this environmental contaminant.

**Key words:** Boron-doped diamond electrode, Doping level, *m*-Cresol, Surface treatment, Voltammetry.

**Úvod**

Planárne BDD filmy sa v priebehu 25 rokov od svojho zavedenia zaradili medzi obľúbené elektródové materiály vďaka svojim unikátnym vlastnostiam, ktoré zahŕňajú výnimočnú chemickú a mechanickú stabilitu, extrémne široké potenciálové okno, stabilitu voči korózii, a to i v agresívnych médiách, inertný povrch zabezpečujúci odolnosť voči znečisteniu, biokompatibilitu, veľmi nízku kapacitu elektrickej dvojvrstvy a prúdov pozadia. BDD elektródy umožňujú stanovenie organických látok v biologických, environmentálnych a farmaceutických matriciach vďaka svojej malej náchylnosti k pasivácii elektródového povrchu, prípadne jednoduchému elektrochemickému čisteniu *in-situ* pomocou vkladania kladného či záporného potenciálu v oblasti úniku základného elektrolytu, čím je možné ovplyvniť i hydrofilné vlastnosti a vodivosť BDD elektródy<sup>1-6</sup>.

BDD filmy sa najčastejšie pripravujú chemickou depozíciou zmesi pár (chemical vapour deposition, CVD) obsahujúcich uhlík (metán, acetón), vodík a zdroj bóru (diboran, trimetylbor) na kremíkový podklad. Pripravené konvenčné planárne filmy majú zrnitosť v rozmedzí 0,1 – 3 μm a hrúbku deponovanej vrstvy BDD *ca* 1 – 5 μm a na konci depozičného procesu sú ukončené vodíkmi (H-terminácia; H-BDD), ktoré vedú k nepolárnemu, hydrofóbnemu povrchu s vysokou vodivosťou<sup>1, 7</sup>. Naopak, hydrofilný, polárny charakter s nízkou elektrickou vodivosťou majú BDD elektródy s naviazanými kyslíkovými funkčnými skupinami (O-terminácia; O-BDD), pričom konverzia z H-BDD na O-BDD je umožnená oxidačnými vlastnosťami hydroxylových radikálov vznikajúcich pri vložení vysokého kladného potenciálu v oblasti anodického rozkladu vody<sup>7,8</sup>.

Okrem spôsobu ukončenia BDD povrchu sa medzi kľúčové faktory silne ovplyvňujúce finálne vlastnosti pripravených BDD filmov radí obsah bóru<sup>9-12</sup>. Koncentrácia bóru sa zvyčajne pohybuje v rozmedzí  $\sim 1 \times 10^{-19} - 1 \times 10^{-21}$  atómov  $\cdot \text{cm}^{-3}$  a je určená pomerom B/C v plynnej fáze a ďalšími parametrami CVD procesu. Koncentrácia  $3 \times 10^{-20}$  atómov bóru  $\cdot \text{cm}^{-3}$  (spravidla odpovedá B/C 1000 ppm – 2000 ppm) určuje hranicu medzi polovodivými filmami a filmami s kovovým typom vodivosti, ktorých využitie pre elektroanalýzu je spravidla výhodnejšie<sup>11</sup>.

Zväčšovanie elektródového povrchu je obľúbeným prístupom využívaným k zvýšeniu citlivosti elektroanalytických meraní. V prípade BDD je vítanou alternatívou bez nutnosti ďalšej modifikácie povrchu, ktorá často vedie k strate ideálnych charakteristík deponovaných filmov. Štruktúrovaním diamantového povrchu sa už podarilo dosiahnuť výrazne lepších výsledkov v podobe vyššej selektivity a senzitivity v elektroanalýze mnohých organických látok v porovnaní s konvenčnými planárnymi filmami<sup>13-16</sup>, a tak je možné považovať porézny BDD za perspektívny elektródový materiál.

Táto práca je venovaná štúdiu vplyvu úrovne dopovania bórom a terminácie povrchu planárných a poréznych BDD filmov na ich elektrochemické správanie a na elektroanalýzu *m*-krezolu (3-methylfenol, Obr. 1), ktorý patrí medzi najrozšírenejšie polutanty priemyslových odpadných vôd.

### Experimentálna časť

Príprava všetkých BDD filmov použitých v rámci tejto štúdie bola prevedená na Oddelení funkčných materiálov na Fyzikálnom ústave AV ČR, a to procesom CVD s využitím mikrovlnného žiarenia ako zdroja energie, detaily podmienok depozičných procesov sú uvedené v ref<sup>11,17</sup>. Ako substráty k syntéze planárných BDD filmov o hrúbke  $\sim 1$   $\mu\text{m}$  poslúžili *p*-kremikové doštičky (ON Semiconductor, Rožnov pod Radhoštěm, ČR), zatiaľ čo porézne BDD filmy, ktorých hrúbka bola odhadnutá na približne  $\sim 20$   $\mu\text{m}$ , boli deponované na 3D templát zložený z SiO<sub>2</sub> nanovláken (Elmarco, Liberec, ČR).

Všetky chemikálie boli kvality p.a. a boli použité bez akéhokoľvek ďalšieho čistenia: *m*-krezol, chlorid hexaaminruthenitý (obe Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemecko), chlorid draselný, kyselina octová (99 %), trihydrát hexakynoželeznatanu draselného (všetky Lachema, Brno, ČR), hydroxid sodný, kyselina trihydrogénfosforečná (85 %), kyselina sírová (všetky Penta, Chrudim, ČR), kyselina boritá, dihydrát dihydrogénfosforečnanu sodného (obe Lach-Ner, Neratovice, ČR). Deionizovaná voda (Millipore Mili plus Q systém, Billerica, USA), ktorej odpor nebol menší než 18,2 M $\Omega$  bola použitá k príprave všetkých vodných roztokov. Ako základný elektrolyt pre elektroanalýzu *m*-krezolu slúžil Brittonov – Robinsonov (BR) pufoer o pH 2,0, ktorý bol pripravený zmiešaním jeho kyslej zložky, tvorenej tromi kyselinami, bórítou, fosforečnou a octovou, každá o koncentrácii 0,04 mol  $\cdot \text{l}^{-1}$ , a zásaditej zložky v podobe 0,02 mol  $\cdot \text{l}^{-1}$  hydroxidu sodného.

Voltametrické merania boli prevedené na prístroji Eco-Tribo Polarograf ovládaný programom PolarPro 5.1 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Bolo využívané konvenčné trojelektrodové usporiadanie, s referenčnou argentchloridovou elektródou (Ag|AgCl|3 mol  $\cdot \text{l}^{-1}$  KCl), pomocnou platinovou elektródou (obe Elektrochemické detektory, Turnov, ČR), a ako pracovné elektródy boli použité konvenčné planárne BDD filmy s rôznou úrovňou dopovania bórom (B/C pomer v plynnej fáze (ppm): 500, 1000, 2000, 4000 a 8000) i porézna BDD doštička (B/C 4000 ppm) umiestnené v elektródovom tele (NeoCoat, La Chaux-de-Fonds,

Švajčiarsko) s prístupnou geometrickou plochou  $7,07 \text{ mm}^2$ , a to pred (H-BDD) i po ich anodickej aktivácii ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ,  $E_{\text{AKT}} = +2,4 \text{ V}$ ,  $t = 20 \text{ min}$ ; O-BDD).

K voltametrickým experimentom boli využívané metódy cyklickej voltametrie (CV) s rýchlosťou polarizácie povrchu elektródy  $\nu = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , a diferenciálnej pulznej voltametrie (DPV) s  $\nu = 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , u ktorej parametre vkladaneho pulzu nadobúdali hodnoty  $+50 \text{ mV}$  pre výšku a  $80 \text{ ms}$  pre šírku pulzu. Medzi jednotlivými DPV scanmi boli O-BDD elektródy elektrochemicky čistené priamo v analyzovanom roztoku ( $E_{\text{AKT}} = +2,4 \text{ V}$ ,  $t = 30 \text{ s}$ ). Hodnoty kapacít elektrickej dvojvrstvy  $C_{\text{dl}}$  boli stanovené pre H-terminované BDD filmy na základe CV nameraných v základnom elektrolyte  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KCl}$  a použitím rovnice (1):

$$C_{\text{dl}} = \Delta I_{\text{AV}} / A_{\text{geom}} \nu \quad (1),$$

v ktorej  $\Delta I_{\text{AV}}$  predstavuje priemerný rozdiel medzi anodickým a katodickým prúdom pri  $0 \text{ V}$  (A),  $\nu$  je rýchlosť scanu ( $\text{V s}^{-1}$ ) a  $A_{\text{geom}}$  je geometrická plocha elektród ( $0,0707 \text{ cm}^2$ ).

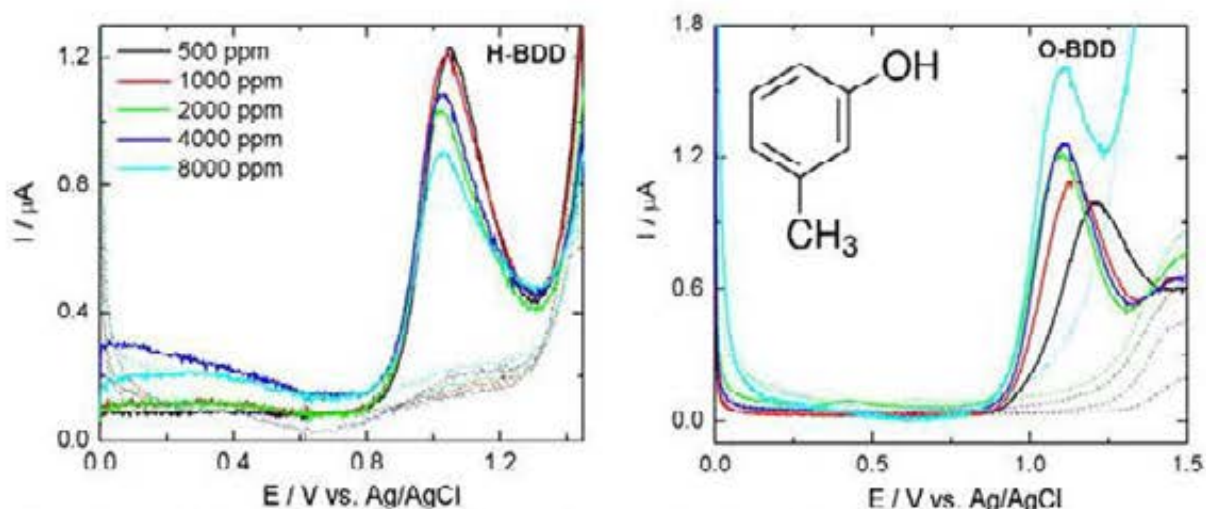
### Výsledky a diskusia

Elektrochemická charakterizácia planárnych H-BDD i O-BDD doštičiek o rôznom pomere B/C a porézneho H-BDD filmu bola prevedená využitím CV redoxných markerov  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  a  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  (oba o  $c = 1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) v  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KCl}$ . Získané hodnoty rozdielov potenciálov anodického a katodického píku  $\Delta E_p$  pre oba redoxné páry sa blížili hodnote  $59 \text{ mV}$  pre reverzibilné systémy vymieňajúce jediný elektrón, čím potvrdzujú vysokú rýchlosť prenosu elektrónu na všetkých skúmaných BDD, a zároveň indikujú vysokú kvalitu pripravených elektród. V prípade redoxného páru  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  bola pozorovaná stabilizácia  $\Delta E_p$  hodnôt ( $51 - 55 \text{ mV}$ ) na planárnych O-BDD filmoch. U redoxného markeru  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  neboli pozorované žiadne výrazné rozdiely na BDD filmoch o rôznej úrovni dopovania bórom alebo v závislosti na terminácii či štruktúrovaní ich povrchu. Na poréznom H-BDD filme však boli zaznamenané vyššie prúdy pozadia oproti planárnym elektródam, čo pravdepodobne súvisí s väčším aktívnym elektródovým povrchom porézneho materiálu. Na H-terminovaných planárnych i poréznych filmoch boli experimentálne určené hodnoty kapacity elektrickej dvojvrstvy  $C_{\text{dl}}$ , pričom najvyššia ( $80,0 \text{ }\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) bola dosiahnutá na poréznej vzorke, na planárnom sete elektród boli vypočítané nižšie hodnoty v rozsahu od  $16,1$  do  $53,0 \text{ }\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ , pri čom bol pozorovaný trend nárastu  $C_{\text{dl}}$  so zvyšujúcim sa obsahom dopantu.

Hlavným predmetom skúmania bola elektrooxidácia  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} m$ -krezolu v BR pufrí o pH  $2,0$  na všetkých BDD filmoch pomocou CV a DPV (Obr. 1). Na základe CV nameraných na H- i O-BDD filmoch bolo zistené, že oxidácia  $m$ -krezolu je ireverzibilný dej, čo sa prejavilo objavením jediného oxidačného píku v anodickom scane, žiadne katodické píky neboli pozorované v sledovanom rozsahu potenciálov od  $-0,5 \text{ V}$  do  $+1,5 \text{ V}$ . Tento anodický pík, ktorého výška výrazne poklesla v priebehu následných cyklov o vyše  $80 \%$ , nezávisle od typu terminácie BDD filmov a ich pomere B/C, pravdepodobne odpovedá oxidácii  $m$ -krezolu na príslušný fenoxylradikál, pri čom na základe predchádzajúcich štúdií<sup>18</sup> je možné usudzovať, že vzniknuté fenoxylradikály vzájomne reagujú za vzniku polymérnych filmov, ktoré sú príčinou pasivácie povrchu elektród a poklesu prúdových odoziev. Na H-terminovanom planárnom sete boli dosiahnuté relatívne stabilné hodnoty oxidačných potenciálov  $E_p$   $m$ -krezolu, konkrétne  $+1,15 \pm 0,02 \text{ V}$  u CV a  $+1,04 \pm 0,02 \text{ V}$  u DPV, a nebol teda zistený žiadny výrazný trend závislosti  $E_p$  na koncentrácii bóru, avšak u oboch voltametrických techník bol pozorovaný pokles prúdov píkov  $m$ -krezolu na BDD filmoch s rastúcim B/C pomerom.

Na anodicky aktivovaných planárnych O-BDD filmoch došlo k posunu oxidačných potenciálov  $m$ -krezolu k pozitívnejším hodnotám v porovnaní s H-BDD setom elektród, čo

svedčí o čiastočnej inhibícii prenosu elektrónu na O-terminovaných filmoch v dôsledku nižšej vodivosti oxidovaného povrchu. Po konverzii na O-BDD sa tiež prejavili väčšie rozdiely medzi potenciálmi oxidácie *m*-krezolu v rámci BDD filmov a ich závislosť na koncentrácii bóru. U CV sa rozsah hodnôt  $E_p$  pohybuje v intervale od +1,04 V (8000 ppm) do +1,20 V (500 ppm), hodnoty  $E_p$  z DPV scanov sú v rozsahu od +1,09 V (8000 ppm) do +1,20 V (500 ppm). Tieto výsledky indikujú, že s rastúcou úrovňou dopovania dochádza k znižovaniu oxidačných potenciálov, tj. oxidácia *m*-krezolu prebieha jednoduchšie na O-BDD filmoch s vyšším pomerom B/C (4000 ppm a 8000 ppm), teda na filmoch majúcich kovový typ vodivosti. Na oxidovanom povrchu je tiež nápadné zvyšovanie prúdovej odozvy *m*-krezolu s rastúcim obsahom bóru.



**Obr. 1.** DP voltamogramy  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  *m*-krezolu v BR pufrí o pH 2,0 namerané na planárnych H- i O-terminovaných BDD filmoch o rôznej úrovni dopovania bórom (B/C 500 – 8000 ppm). Čiarkovane znázornený základný elektrolyt.

Na poréznom H-BDD filme s B/C 4000 ppm bol pozorovaný mierne nižší oxidačný potenciál +1,01 V než na planárnych BDD elektródach, čo môže súvisieť s adsorpciou *m*-krezolu na porézny povrch. Tiež je viditeľný nárast prúdu pozadia, avšak výška signálu *m*-krezolu tomuto nárastu neodpovedá, príčinou môže byť obmedzená rýchlosť difúzie skúmaného polutantu k poréznemu „vnútru“ elektródového materiálu<sup>15</sup>. Pri pokuse anodicky oxidovať porézny BDD došlo k odpadávaniu poréznych vrstiev z podkladu v dôsledku tvorby bubliniek kyslíka mechanicky poškodzujúcich porézny elektródový materiál, ktorý tak nie je možné anodicky aktivovať, a teda elektrochemicky čistiť.

### Záver

Elektrochemická oxidácia *m*-krezolu na planárnych BDD elektródach je ovplyvnená spôsobom terminácie ich povrchu (H- vs. O-) i koncentráciou bóru. U H-terminovaných filmoch s B/C od 500 ppm do 8000 ppm boli pozorované mierne nižšie oxidačné potenciály *m*-krezolu v porovnaní s O-BDD, ktoré ale nezáviseli na obsahu dopantu, obdobné hodnoty potenciálov boli dosiahnuté na celom sete H-BDD. Naopak, pri konverzii na oxidovaný povrch sa prejavil rozdiel medzi polovodivými filmami (B/C 500 ppm až 2000 ppm) a filmami s kovovým typom vodivosti (B/C 4000 ppm a 8000 ppm). Na druhých menovaných sa potenciál piky odpovedajúci oxidácii *m*-krezolu posunul k negatívnejším hodnotám a zároveň bol pozorovaný jeho nárast, príčinou oboch javov je vyššia úroveň dopovania bórom, ktorý v diamantovom filme predstavuje elektrochemicky aktívne miesta. Elektroanalýza *m*-krezolu bola prevedená i na poréznom H-BDD, avšak očakávaný efekt

zvýšenia prúdovej odozvy v súvislosti so zväčšením aktívneho elektródového povrchu nebol pozorovaný. Navyše bolo zistené, že proces anodickej aktivácie poškodzuje porézny film a jeho konverzia na oxidovaný povrch tak nie je možná. Výsledky tejto štúdie prispievajú k ďalšiemu porozumeniu faktorov ovplyvňujúcich vlastnosti a elektrochemické správanie BDD elektród.

#### Pod'akovanie

Táto práca bola finančne podporená Špecifickým vysokoškolským výskumom (SVV 260440), Grantovou agentúrou Univerzity Karlovej (projekt 1390217) a Grantovou agentúrou Českej republiky (projekt 17-15319S).

#### Referencie

1. Macpherson J. V.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 2935 (2015).
2. Kraft A.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **2**, 355 (2007).
3. Luong J. H., Male K. B., Glennon J. D.: *The Analyst* **134**, 1965 (2009).
4. Peckova K., Musilova J., Berek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* **39**, 148 (2009).
5. Musilova J., Berek J., Peckova K.: *Chem. Listy* **103**, 469 (2009).
6. Yang N. J., Yu S. Y., Macpherson J. V., Einaga Y., Zhao H. Y., Zhao G. H., Swain G. M., Jiang X.: *Chem. Soc. Rev.* **48**, 157 (2019).
7. Szunerits S., Boukherroub R.: *Journal of Solid State Electrochemistry* **12**, 1205 (2008).
8. Hutton L. A., Iacobini J. G., Bitziou E., Channon R. B., Newton M. E., Macpherson J. V.: *Anal. Chem.* **85**, 7230 (2013).
9. Watanabe T., Honda Y., Kanda K., Einaga Y.: *Phys. Status Solidi A-Appl. Mat.* **211**, 2709 (2014).
10. Azevedo A. F., Baldan M. R., Ferreira N. G.: *J. Phys. Chem. Solids* **74**, 599 (2013).
11. Schwarzová-Pecková K., Vosáhlová J., Berek J., Šloufová I., Pavlova E., Petrák V., Závazalová J.: *Electrochim. Acta* **243**, 170 (2017).
12. Yu P., Zhang J., Zheng T., Wang T.: *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* **494**, 241 (2016).
13. Wang Q., Vasilescu A., Subramanian P., Vezeanu A., Andrei V., Coffinier Y., Li M. S., Boukherroub R., Szunerits S.: *Electrochem. Commun.* **35**, 84 (2013).
14. Li Y., Li H., Li M., Li C., Sun D., Yang B.: *Electrochim. Acta* **258**, 744 (2017).
15. Lourenco B. C., Silva T. A., Zanin H., May P. W., Corat E. J., Fatibello O.: *Journal of Solid State Electrochemistry* **20**, 2403 (2016).
16. May P. W., Clegg M., Silva T. A., Zanin H., Fatibello-Filho O., Celorrio V., Fermin D. J., Welch C. C., Hazell G., Fisher L., Nobbs A., Su B.: *J. Mat. Chem. B* **4**, 5737 (2016).
17. Petrák V., Vlčková Živcová Z., Krýsová H., Frank O., Zúkal A., Klimša L., Kopeček J., Taylor A., Kavan L., Mortet V.: *Carbon* **114**, 457 (2017).
18. Ferreira M., Varela H., Torresi R. M., Tremiliosi-Filho G.: *Electrochimica Acta* **52**, 434 (2006).

## Influence of TiO<sub>2</sub> Thickness on PEC Properties of BDD/TiO<sub>2</sub> Electrodes

Miroslav Behúl<sup>a</sup>, Marian Vojs<sup>a</sup>, Marián Marton<sup>a</sup>, Pavol Michniak<sup>a</sup>, Mario Kurniawan<sup>b</sup>, Hauke-Lars Honig<sup>c</sup>, Dmitry Zyabkin<sup>c</sup>, Manuel Oliva Ramirez<sup>c</sup>, and Andreas Bund<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Electronics and Photonics, Faculty of Electrical Engineering and Information Technology, Slovak University of Technology, Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: miroslav.behul@stuba.sk

<sup>b</sup> Electrochemistry and Electroplating Group; Technische Universität Ilmenau; TU Ilmenau, Ilmenau, Germany

<sup>c</sup> Chair Materials for Electronics, Institute of Materials Science and Engineering and Institute of Micro and Nanotechnologies MacroNano®, TU Ilmenau, Ilmenau, Germany

### Abstract

Photoelectrochemical (PEC) water splitting provides a promising way for development of sustainable methods for hydrogen generation and water treatment without chemicals. However, to produce an effective PEC water splitting system, high chemical stability of the electrode material over time is necessary. In this paper, we report on the development of a unique PEC electrode consisting of well-known chemical stable boron doped diamond (BDD) layer covered by n-type TiO<sub>2</sub> thin film. To investigate the influence of TiO<sub>2</sub> film thickness on PEC properties, three different times were used in RF plasma sputtering process. The highest photocurrent 19.1 mA/cm<sup>2</sup> was obtained in case of the BDD sample covered by 1 μm thick TiO<sub>2</sub> layer.

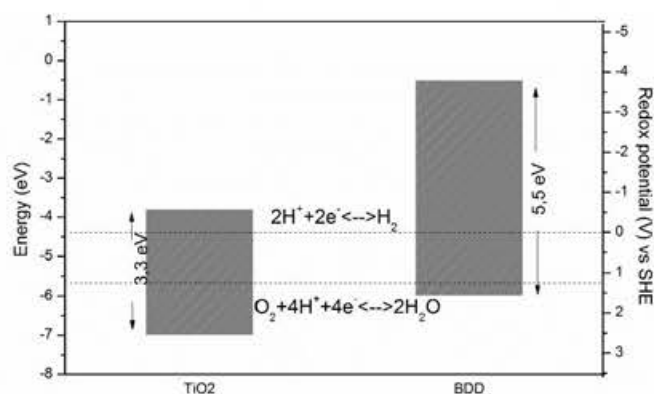
**Key words:** PEC, BDD, TiO<sub>2</sub>.

### Introduction

Water pollution – a problem with global dimensions<sup>1</sup>, threatens our future for a long time. Pollution of water sources is a complex problem, which probably cannot be solved by single cleaning method, so new approaches must be implemented. A promising way is to add PEC water splitting as one of many stages in water purification processes. This requires mechanically and chemically stable electrodes with good conductivity and long-term stability. TiO<sub>2</sub> is well-known and relatively stable photocatalytic wide bandgap metal oxide (Eg ~3.2 eV)<sup>2, 3</sup> with conduction band (CB) just above the hydrogen evolution potential versus standard hydrogen electrode (SHE)<sup>4</sup>. On the other hand, BDD is a p-type material (bandgap ~5.5 eV) with very high CB minima (-4 V vs SHE) offering unique mechanical and chemical stability. Despite of the high CB position, the valence band (VB) of diamond (and also BDD) lies near +1.5 V versus SHE, and therefore is a poor photooxidant catalyst, unlike TiO<sub>2</sub> (VB position at +3 V vs SHE making it a strong photooxidant candidate) (Fig. 1).

Deposition of TiO<sub>2</sub> layer on BDD layer creates a p-n junction photoelectrochemical electrode enhanced by hole injection from BDD<sup>4, 5</sup>. Terashima et. al<sup>4</sup> prepared BDD / TiO<sub>2</sub> electrode with 1.6-fold higher photocurrent at 1.5 V vs SHE in comparison with TiO<sub>2</sub> electrode. In this study we report on the development of unique PEC electrodes consisting of mechanical and chemical stable boron doped diamond (BDD) layer prepared by microwave chemical vapor deposition (MW CVD), covered by n-type TiO<sub>2</sub> thin films with different thickness. This work is thus focused on the influence of TiO<sub>2</sub> thickness on generated photocurrent.





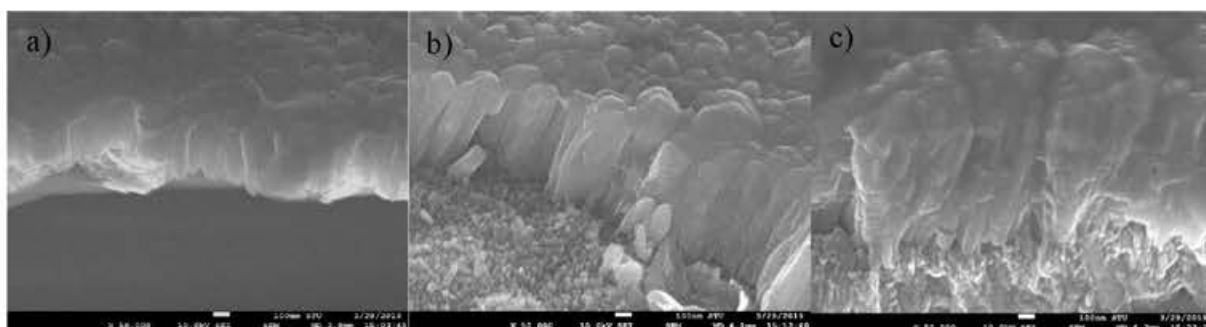
**Fig. 1.** Electronic band positions of TiO<sub>2</sub> and BDD with respect to vacuum level and SHE <sup>4</sup>.

### Experimental

Polycrystalline BDD layers were prepared by MW CVD <sup>6</sup>. Before the BDD deposition, the n-type silicon substrates were seeded in an ultrasonic bath <sup>6</sup> in suspension of 50 mg nanodiamond powder (diameter < 10 nm, CAS No. 7782 - 40 - 3, Sigma Aldrich) in 1 L of demineralized water (18 MΩ) for 40 minutes. The BDD layers with thickness of 1.5 μm were deposited for 60 hours in a CH<sub>4</sub> / H<sub>2</sub> gas mixture with an addition of trimethylboron at process pressure of 25 Pa. The substrate holder temperature 600 °C was monitored during the growth process by an infrared pyrometer. The concentration of CH<sub>4</sub> in H<sub>2</sub> was set up to 0.5 %. The B / C ratio in gas phase was set up to 10 000 ppm. The surface nano-structuring was performed by reactive ion etching in H<sub>2</sub> + N<sub>2</sub> gas atmosphere for 60 minutes and 200 W of radio frequency (RF) power (PE-200, Plasma etch USA). Subsequently, BDD samples were washed in NH<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution heated to 70 °C after etching to remove the amorphous phase. TiO<sub>2</sub> thin films were then deposited onto all types of BDD layers by RF sputtering (LA 440S by VON ARDENNE, Germany) employing a ceramic TiO<sub>2</sub> target (99.9% FHR Anlagenbau, Germany) for 5 minutes ~ 100 nm at room temperature. During the process, the sputtering power was kept at 200 W and argon flux was maintained at 80 sccm. To investigate the influence of TiO<sub>2</sub> layer thickness, the deposition time was set up to 25, 50 and 75 minutes in order to achieve 0.5 μm, 1 μm and 1.5 μm thick layer. After sputtering, the samples were annealed at 500 °C in argon atmosphere for 4 hours. The BDD + TiO<sub>2</sub> samples were investigated by scanning electron microscopy at 45° tilt and by Raman spectroscopy. The photocurrent and dark current were measured by linear sweep voltammetry in the range from 0 to 2.5 V using a Biologic VSP potentiostat and a solar simulator with airmass (AM) 1.5 filter from LOT-Quantum Design GmbH (calibrated at 100 mW / cm<sup>2</sup> intensity at the photoelectrode), which is equipped with a mechanical shutter. Three electrode configuration was used, which consisted of BDD / TiO<sub>2</sub> as working electrode, Ag / AgCl as the reference electrode and Pt as the counter electrode in 0.5 M NaOH (pH ~13) aqueous solution.

### Results and discussion

The BDD substrates overgrown with TiO<sub>2</sub> layer with different thicknesses were studied by SEM (Fig. 2). In all cases, vertically oriented TiO<sub>2</sub> grains were observed and despite deposition onto the nanostructured diamond surface, no cavities between BDD and TiO<sub>2</sub> layer were observed.



**Fig. 2.** SEM images of cross-section of BDD layers overgrown by TiO<sub>2</sub> layer with thickness of a) 0.5 μm, b) 1 μm and c) 1.5 μm.

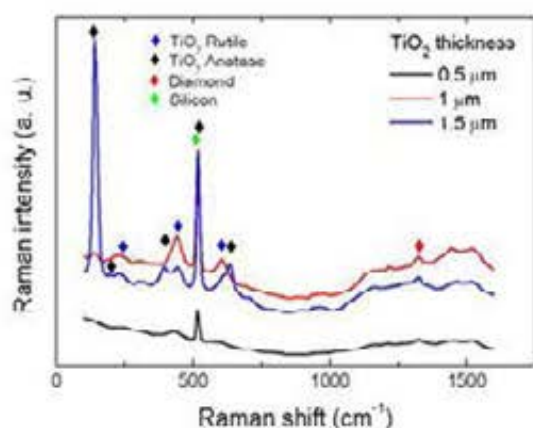
Raman spectra confirmed the presence of anatase and rutile phase in case of all samples. In Fig. 3, we can see the increase of anatase to rutile ratio with the increase of TiO<sub>2</sub> thickness. We suppose that after the amorphous TiO<sub>2</sub> crystallizes to anatase, by increasing the annealing time the rutile phase ratio is increasing. Because thinner layers crystallize faster, the higher amount of rutile should be present in case of thinner samples. This hypothesis is confirmed, as we can see higher anatase to rutile ratio in case of thicker TiO<sub>2</sub> samples. Fig. 4 shows the linear sweep voltammograms of BDD / TiO<sub>2</sub> electrodes obtained in 0.5 M NaOH (pH 13) aqueous solution. The phenomena of hole injection from BDD to TiO<sub>2</sub> layer was observed at 0.7 V vs Ag / AgCl for all samples. The best results after applied voltage >0.7 V were observed in case of thicker samples (TiO<sub>2</sub> = 1 and 1.5 μm). This is caused most probably because of a higher light absorption in thicker sample. On the other hand, photocurrent without applied voltage, where the effect of hole injection from BDD is not expected, is highest in case of 0.5 μm thick TiO<sub>2</sub> sample (70 μA / cm<sup>2</sup>). Comparing the electrodes at 1 V vs Ag / AgCl, the electrode with the 0.5 μm TiO<sub>2</sub> layer is comparable with a similar BDD / TiO<sub>2</sub> electrode developed by Terashima et. al.<sup>4</sup> and the electrode with 1 μm achieved 4-fold higher photocurrent.

## Conclusion

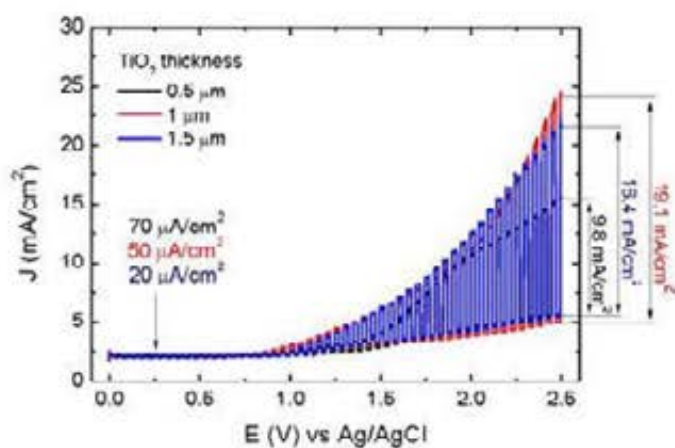
In this study we investigated the influence of TiO<sub>2</sub> thickness of BDD / TiO<sub>2</sub> electrodes on the photocurrent generated by PEC process. For investigation, samples with TiO<sub>2</sub> thickness of 0.5 μm, 1 μm and 1.5 μm were prepared by RF plasma sputtering. Hole injection from BDD to TiO<sub>2</sub> layer was observed at 0.7 V vs Ag / AgCl. The best results at applied voltage >0 V were observed in case of thicker samples (TiO<sub>2</sub> = 1 and 1.5 μm), where the photocurrent was up to 4x higher compared to similar published work. On the other hand, photocurrent without applied voltage, where the effect of hole injection from BDD is not expected was highest in the case of 500 nm thick TiO<sub>2</sub> sample (70 μA / cm<sup>2</sup>). Measurement of repeatability did not show any decrease of photocurrent or degradation of TiO<sub>2</sub> layer.

## Acknowledgement

This work was financially supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-16-0124 and by the grants of Slovak National Grant Agency No. 1/0558/17 and by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) project 5K16SII. The authors are also grateful for the support of the DAAD for funding the cooperation.



**Fig. 3.** Raman spectra of TiO<sub>2</sub> / BDD samples with different TiO<sub>2</sub> thickness.



**Fig. 4.** Linear sweep voltammograms of TiO<sub>2</sub> / BDD samples with different TiO<sub>2</sub> thickness.

### References

1. Dybern B.: *Ambio* 3, 139 (1974).
2. Reddy M.K., Manorama S.V., Reddy A.R.: *Mater. Chem. Phys.* 78, 984 (2003).
3. Rafieian D., Driessen R.T., Ogieglo W., Lammertink R.G.H.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 8727 (2015).
4. Terashima C., Hishinuma R., Roy N., Sugiyama Y., Latthe S.S., Nakata K., Kondo T., Yuasa M., Fujishima A.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 1583 (2016).
5. Qu J., Zhao X.U.: *Environ. Sci. Technol.* 42, 4934 (2008).
6. Izak T., Marton M., Varga M., Vojs M., Vesely M., Redhammer R., Michalka M.: *Vacuum* 84, 46 (2010).

**Voltammetry of cholesterol and its precursor 7-dehydrocholesterol on boron doped diamond electrode**  
**(Voltametrie cholesterolu a jeho precursoru 7-dehydrocholesterolu na borem dopované diamantové elektrodě)**

Lenka Benešová, Polina Yershova, and Karolina Schwarzová-Pecková  
Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO  
Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 43, Prague 2,  
Czech Republic, E-mail: benesole@natur.cuni.cz

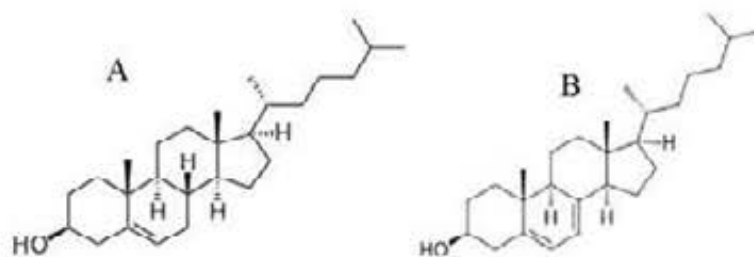
**Abstract**

In this study a novel approach for simultaneous determination of cholesterol and its precursor 7-dehydrocholesterol by differential pulse voltammetry on boron doped diamond electrode was developed. They are oxidizable in mixed media of acetonitrile and strong acid exhibiting voltammetric peaks at potentials of ca +0.8 V and +1.1 V (7-dehydrocholesterol) and +1.45 V (cholesterol) (vs. Ag/0.01 mol.l<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>/1 mol.l<sup>-1</sup> NaClO<sub>4</sub>). Detection limits in micromolar concentration range were obtained for both compounds. DP voltammetry was applied on their determination in milk cream after liquid-liquid extraction standard addition method.

**Key Words:** Cholesterol, 7-Dehydrocholesterol, Differential pulse voltammetry, Electrochemical oxidation, Liquid-liquid extraction.

**Úvod**

Cholesterol (obr. 1A) je prekurzor steroidních látek v organismu, např. žlučových kyselin, steroidních hormonů nebo vitaminů. Je nedílnou součástí všech živočišných a rostlinných membrán a je tudíž nezbytný pro správnou funkci metabolických drah v živých organismech. Jeho biosyntéza probíhá v jaterních buňkách tzv. mevalonátovou dráhou, kde výchozí látkou syntézy je acetyl-koenzym A. Posledním krokem biosyntézy cholesterolu je přeměna jeho prekurzoru 7-dehydrocholesterolu (obr. 1b) enzymem 7-dehydrocholesterol reduktázou, provázená zánikem dvojné vazby na C<sub>7</sub><sup>1</sup>.



Obr. 1. Chemické struktury (A) cholesterolu a (B) 7-dehydrocholesterolu

Poruchy metabolismu cholesterolu se projevují zvýšením či snížením hladiny cholesterolu a jeho prekurzorů v krvi, což má za následek vznik závažných onemocnění. Například při zvýšené hladině cholesterolu dochází k jeho hromadění v cévách a vzniku aterosklerózy či kardiovaskulárních onemocnění. Snížená hladina cholesterolu v krvi ukazuje na poruchu metabolismu enzymu 7-dehydrocholesterol reduktázy během posledního kroku biosyntézy cholesterolu, což má za následek zvýšení koncentrace 7-dehydrocholesterolu a možný vznik Smith-Lemli-Opitzova syndromu (SLOS) poprvé popsáno v roce 1964<sup>2</sup>. SLOS je autozomálně recesivní genetické onemocnění vznikající během vývoje plodu a způsobující různé stupně mentálního a tělesného postižení<sup>3,4</sup>. 7-dehydrocholesterol je dále prekurzorem

vitaminu D<sub>3</sub> a jeho zvýšená koncentrace v krvi může být také způsobena poruchou jednoho či více kroků biosyntézy vitaminu D<sub>3</sub> <sup>5</sup>.

Nejběžněji používanou instrumentální metodou pro stanovení cholesterolu v různých matricích je HPLC s tandemovou MS detekcí <sup>6,7</sup> či enzymatické metody. Ty jsou založené na štěpení cholesterol esteru za vzniku cholesterolu a příslušné mastné kyseliny enzymem cholesterol esterázou s následnou oxidací cholesterolu na 4-cholestene-3-on a peroxid vodíku. Jako detekční metoda se při enzymatickém stanovení cholesterolu používá UV/VIS spektrometrie. Enzymatické reakce jsou také velmi často využívány pro stanovení cholesterolu elektrochemickými biosenzory, které jsou zpravidla založeny na aktivitě enzymu cholesterol esterázy <sup>8,9</sup>. Pro stanovení 7-dehydrocholesterolu v matricích se nejčastěji používá HPLC s UV detekcí <sup>3</sup> či detektory s diodovým polem <sup>4</sup>.

Možnosti neenzymatických elektrochemických metod pro detekci cholesterolu, 7-dehydrocholesterolu a dalších sterolů jsou velmi omezené vzhledem k nasycenému charakteru steroidního skeletu (viz review <sup>10</sup>). Derina a spol. <sup>11,12</sup>, použili pro přímou detekci cholesterolu v lidském séru a mléce pracovní uhlíkové elektrody s povrchem modifikovaným 2,6-di-*N,N*-4,4'-(2-aminothiazolyl) -4,8-diacetyl -2,4,6,8-tetraazobicyclo [3,3,0] octane-3,7-dione (DATDAGUD)<sup>12</sup> a 1,4-diacetylglycoluril (DPADGU) <sup>11</sup>. V práci Morzycki a spol. <sup>13</sup> byla studována přímá i nepřímá oxidace cholesterolu při pozitivních potenciálech ve vodném prostředí acetonitrilu s LiClO<sub>4</sub>. Cholesterol může podléhat elektrochemické oxidaci na C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub> a C<sub>7</sub> a na terciárním uhlíku C<sub>25</sub> postranního řetězce. Metody přímé oxidace 7-dehydrocholesterolu nebyly dosud publikovány.

Naše skupina nedávno navrhla metodu elektrochemické oxidace žlučových kyselin po jejich dehydrataci silnou kyselinou (např. kyselina chloristá, kyselina sírová) <sup>14</sup>. Obdobná dehydratační reakce je známá pro cholesterol jako Liebermann-Burchardova reakce (LB). Jedná se o sled sulfonačních reakcí s následnou acetylací hydroxylových skupin na C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> či C<sub>6</sub>, při kterých dochází k zavedení dvojných vazeb do sterolového jádra a může dojít až k aromatizaci steroidního skeletu. Spektrálními metodami bylo identifikováno až 20 produktů LB reakce <sup>15</sup>.

V této práci byla vyvinuta metoda pro současné stanovení cholesterolu a jeho prekursoru 7-dehydrocholesterolu metodou diferenční pulzní voltametrie na borem dopované diamantové elektrodě. Další fází výzkumu byl vývoj metody pro stanovení cholesterolu v matici smetánky do kávy, za použití extrakce kapalina-kapalina.

## Experimentální část

### Chemikálie

HClO<sub>4</sub> (70 %, Penta, Chrudim) a KOH (85 %, Penta, Chrudim), acetonitril (99,9 %, Merck, Německo), ethanol (96 %, Lach-Ner, Neratovice), AgNO<sub>3</sub> a NaClO<sub>4</sub> (Fluka). Standardy 7-dehydrocholesterolu a cholesterolu a n-hexan (<96 %) od Sigma Aldrich.

### Aparatura

Byla použita tři komorová detekční cela, jednotlivé komory jsou od sebe odděleny fritami. Největší prostor odpovídá pracovnímu prostoru s BDDE a pomocnou platinovou elektrodou. Druhá komora slouží jako prostor pro referenční Pleskovovu elektrodu (Ag/AgNO<sub>3</sub> v 0,01 mol.l<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> v acetonitrilu a 1 mol.l<sup>-1</sup> NaClO<sub>4</sub> v acetonitrilu). Prostor oddělený fritami od zbylých dvou prostorů, tzv. meziprostor slouží jako solný můstek mezi pracovním a referenčním prostorem, obsahuje 0,5 mol.l<sup>-1</sup> NaClO<sub>4</sub> v acetonitrilu. Bylo měřeno

v třielektrodeovém zapojení řízeném Eco-Tribo potenciostatem se softwarem Polar.Pro 5.1 (Eco-Trend Plus, Praha).

#### *Liquid-Liquid extrakce cholesterolu z matrice*

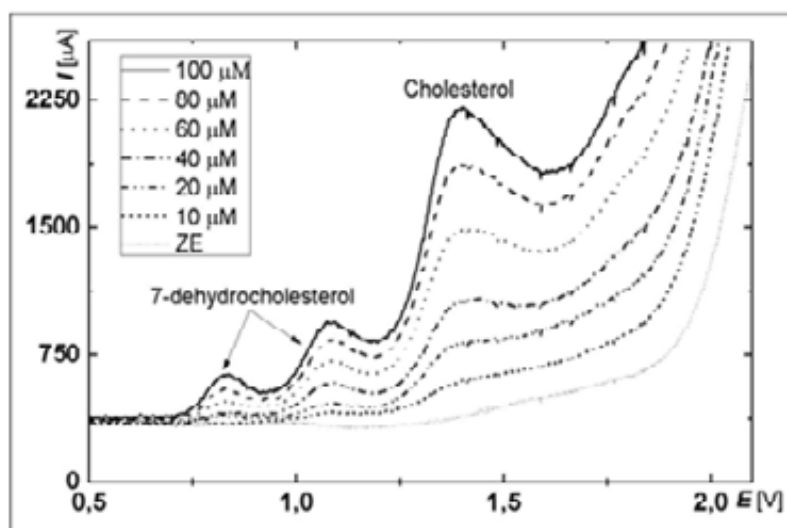
Extrakce cholesterolu byla inspirována <sup>16</sup> s menšími modifikacemi. Postup extrakce byl následující: 1 g matrice (smetánka do kávy, 10 % obsah tuku, 10 ml, značka Pilos, LIDL) byl smíchán s 5 ml roztoku KOH v ethanolu ( $0,4 \text{ mol l}^{-1}$ ). Směs byla míchána na vortexu po dobu jedné minuty, poté byla saponifikována na vodní lázni při  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 30 minut. Po odstavení z vodní lázně se směs nechala vychladnout na pokojovou teplotu. Vychlazená směs byla smíchána s 5 ml deionisované vody a míchána po dobu 1 minuty. Poté se směs převedla do dělicí nálevky, kde byla dvakrát extrahována 10 ml n-hexanu. Horní vrstvy (n-hexan) byly spojeny a z nich bylo odebráno 5 ml a vysušeno dusíkem. Odparek byl rozpuštěn v 5 ml základního elektrolytu, který obsahoval  $0,1 \text{ M}$  kyselinu chloristou v acetonitrilu (obsah vody  $0,43 \%$ ), a byl proveden DP voltametrický scan v rozsahu potenciálu  $0 \text{ V}$  až  $+2,1 \text{ V}$ .

#### **Výsledky a diskuze**

Voltametrická detekce cholesterolu a jeho prekurzoru 7-dehydrocholesterolu by prováděna v prostředí  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  kyseliny chloristé v acetonitrilu s obsahem vody  $0,43 \%$ , které odpovídá minimálnímu možnému zastoupení vody v roztoku (dáno obsahem vody v koncentrované  $70 \%$  kyselině chloristé).

#### *Koncentrační závislost směsi cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu*

7-dehydrocholesterol poskytuje dva signály při potenciálu  $E_{det} + 0,8 \text{ V}$  a  $+ 1,1 \text{ V}$ . Druhý pik se vyskytuje jen v prostředí s  $0,43\%$  obsahem vody v roztoku, při vyšších zastoupení vody se druhý pik již nevyskytuje a je tedy přisuzován vznikajícímu oxidovatelnému meziprojektu během dehydratační reakce. Oxidační potenciál cholesterolu je  $ca + 1,5 \text{ V}$ . Dostatečně odlišné oxidační potenciály obou látek umožňují jejich současnou voltametrickou detekci. Jednotlivé oxidační píky se vzájemně neovlivňují. Limity detekce odpovídající jednotlivým detekčním potenciálům  $+ 0,8 \text{ V}$  a  $+ 1,1 \text{ V}$  pro 7-dehydrocholesterol a  $+ 1,5 \text{ V}$  pro cholesterol byly  $3,0 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  a  $5,5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  pro 7-dehydrocholesterol a  $3,4 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  pro cholesterol.



**Obr. 2.** Koncentrační závislost směsi cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu v prostředí  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$   $\text{HClO}_4$  v acetonitrilu metodou diferenční pulzní voltametrie na BDDE (vs.  $\text{Ag/AgNO}_3$  ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$   $\text{AgNO}_3$  v acetonitrilu,  $1 \text{ mol.l}^{-1}$   $\text{NaClO}_4$  v acetonitrilu)). Rychlost polarizace  $20 \text{ mV.s}^{-1}$ , výška pulzu  $50 \text{ mV}$ , šířka pulzu  $80 \text{ ms}$ . Koncentrační rozmezí obou sterolů:  $10, 20, 40, 60, 80$  a  $100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

### *Extrakce cholesterolu z matrice*

Obsah cholesterolu ve smetance do kávy po provedení extrakce kapalina-kapalina byl určen metodou standardního přídatku metodou DPV. Množství cholesterolu v mléce se pohybuje okolo hodnoty 5 mg/100 g, jak bylo publikováno pro jiné mléčné matrice<sup>11</sup>. Toto množství by odpovídalo koncentraci cholesterolu 20  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  v 5 ml základního elektrolytu při 100 % účinnosti extrakce. Standardní přídatky cholesterolu v acetonitrilu o koncentraci 30, 60 a 90  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  byly přidány ke vzorku matrice a předběžné výsledky ukazují, že koncentrace cholesterolu v analyzovaném vzorku je *ca* 2 mg/100 g. Obsah 7-dehydrocholesterolu je pod detekčním limitem metody.

### **Závěr**

Vyvinutá DP metoda představuje experimentálně nenáročný, levný a rychlý přístup pro stanovení cholesterolu, případně 7-dehydrocholesterolu v reálné matrici. Dále bude aplikována i na jiné vzorky matrice, např. jiné mléčné výrobky či vajíčka. Možnost současného stanovení obou sterolů bude ověřena při jejich stanovení v plodové vodě či lidském séru, s výhledem na vyvinutí citlivé elektrochemické metody na diagnostikování SLOS v prenatálním stadiu.

### **Acknowledgments**

Tento výzkum byl proveden v rámci specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260 440). Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentuře České republiky (GAČR 18-01710S

### **References**

1. Hana L., Marek V.: *Chem. Listy* 103, 40 (2009).
2. Smith D. W., Lemli L., Opitz J. M.: *J. Pediatrics* 64, 210 (1964).
3. Honda A., Batta A. K., Salen G., Tint G. S., Chen T. S., Shefer S.: *Am. J. Med. Genet.* 68, 288 (1997).
4. Rizzo C., Dionisi-Vici C., D'Ippoliti M., Fina F., Sabetta G., Federici G.: *Clin. Chim. Acta* 291, 97 (2000).
5. Anderson N. A., Shiang J. J., Sension R. J.: *J. Phys. Chem. A* 103, 10730 (1999).
6. Baila-Rueda L., Cenarro A., Cofan M., Orera I., Barcelo-Batlloiri S., Pocovi M., Ros E., Civeira F., Nerin C., Domeno C.: *Anal. Methods* 5, 2249 (2013).
7. Jaukovic Z. D., Grujic S. D., Bujagic I. V. M., Lausevic M. D.: *Microchem J.* 135, 39 (2017).
8. Nantaphol S., Chailapakul O., Siangproh W.: *Anal. Chim. Acta* 891, 136 (2015).
9. Liu X., Nan Z., Qiu Y., Zheng L., Lu X.: *Electrochim. Acta* 90, 203 (2013).
10. Klouda J., Barek J., Nesmerak K., Schwarzova-Peckova K.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 47, 384 (2017).
11. Derina K., Korotkova E., Taishibekova Y., Salkeeva L., Kratochvil B., Barek J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 410, 5085 (2018).
12. Derina K. V., Korotkova E. I., Dorozhko E. V., Voronova O. A.: *J. Anal. Chem.* 72, 904 (2017).
13. Morzycki J. W., Sobkowiak A.: *Beilstein J. Org. Chem.* 11, 392 (2015).
14. Klouda J., Barek J., Kocovsky P., Herl T., Matysik F. M., Nesmerak K., Schwarzova-Peckova K.: *Electrochem. Commun.* 86, 99 (2018).
15. Xiong Q. B., Wilson W. K., Pang J. H.: *Lipids* 42, 87 (2007).
16. Albuquerque T. G., Oliveira M., Sanches-Silva A., Costa H. S.: *Food Chemistry* 193, 18 (2016).

## Boron-Doped Diamond Microelectrodes Fabricated by Microwave Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition Process with Linear Antenna Delivery

Mariola Brycht<sup>a,b</sup>, Jana Vosáhlová<sup>a</sup>, Karolina Schwarzová-Pecková<sup>a,c</sup>, Andrew Taylor<sup>d</sup>, Ladislav Klimša<sup>d</sup>, Jaromír Kopeček<sup>d</sup>, Ivan Dittert<sup>e</sup>, and Jan Krůšek<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 6, 128 43 Prague, Czech Republic, E-mail: brychtmariola@gmail.com

<sup>b</sup> University of Lodz, Faculty of Chemistry, Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Tamka 12, 91-403 Łódź, Poland

<sup>c</sup> Czech Technical University in Prague, Faculty of Biomedical Engineering, Sitná Sq. 3105, 272 01 Kladno, Czech Republic

<sup>d</sup> Institute of Physics of the Czech Academy of Sciences, Na Slovance 2, 182 21 Prague, Czech Republic

<sup>e</sup> Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Vídeňská 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

### Abstract

In this work, boron-doped diamond microelectrodes (BDD $\mu$ E) were fabricated using a linear antenna microwave plasma enhanced chemical vapour deposition process (MW-LA-PECVD). To observe the surface morphology and estimate the thickness of deposited BDD layers, scanning electron microscopy was used. It revealed incomplete coverage of BDD on the tungsten wires (20  $\mu$ m diameter) used as a substrate. Comparison of electrochemical behaviour of the BDD $\mu$ E with complete and incomplete BDD coverage was performed by cyclic voltammetry in different supporting electrolytes evaluating the widths of the potential windows. The reversibility of the electron transfer for the outer-sphere  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  and inner-sphere  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  redox markers and the effective surface area were experimentally assessed.

**Key words:** Boron-doped diamond microelectrode, Linear antenna microwave plasma enhanced chemical vapour deposition, Scanning electron microscopy, Cyclic voltammetry.

### Introduction

Today, the use of boron-doped diamond (BDD) as an electrode material is widely recognized due to its exceptional characteristics including sufficiently wide electrochemical potential window in aqueous solutions, low and stable background current, biocompatibility, long term stability, relatively rapid rates of electron-transfer for soluble redox systems without conventional pre-treatment, resistance to electrode fouling, and low sensitivity to dissolved oxygen<sup>1</sup>. These extremely interesting properties leads to BDD being an especially appropriate tool for a variety of applications including wastewater treatment<sup>2</sup>, *in vivo* neurotransmitter detection<sup>3</sup>, and electrochemical studies of analytes with high oxidation potentials<sup>4</sup>, among others.

BDD electrodes can be produced in the forms of macroelectrodes or microelectrodes. The microelectrode design is such that it has considerable advantages when compared to conventional macroelectrodes including increased current densities, decreased ohmic drop and charging currents, and enhanced mass transport due to the small diffusion layer across the surface and the convergent diffusion at its edges, allowing steady state limiting currents to be achieved<sup>5</sup>. Moreover, BDD microelectrodes can be fabricated in different ways including microfabrication as individual microelectrodes or microelectrode arrays (MEA)<sup>6</sup>.



BDD thin films can be grown by using one of several energy-assisted chemical vapour deposition (CVD) methods. The most popular are hot-filament CVD (HFCVD) and microwave plasma enhanced CVD (MW-PECVD) <sup>7</sup>. Nevertheless, typical conditions for diamond films growth by MW-PECVD processes are restricted to a substrate temperature of about 600–1000 °C and a growth area of 15 cm diameter. MW-LA-PECVD enables to growth of diamond films with good homogeneity at low temperatures, e.g. compatible with glass, and on large areas <sup>8</sup>. However, in MW-LA-PECVD systems, the addition of CO<sub>2</sub> in the gas phase is necessary for enhanced growth rates and diamond quality. This addition of CO<sub>2</sub> (or O<sub>2</sub>) into the process gas leads to significantly reduced boron incorporation into the diamond lattice manifested by decreased electrical conductivity <sup>9</sup>.

Within this study, BDD films deposited on tungsten wires by MW-LA-PECVD system were used for fabrication of BDD $\mu$ Es. Their characterization by scanning electron microscopy (SEM) and electrochemically by cyclic voltammetry (CV) using different redox probes was performed to evaluate the effect of quality of coverage of the W support by BDD.

### Experimental

Analytical grade reagents were used as-received without any further purification: potassium chloride, potassium hexacyanoferrate, hexaammineruthenium chloride, sodium dihydrogen phosphate dihydrate, sodium hydroxide, sulfuric acid, nitric acid, and orthophosphoric acid. All aqueous solutions were prepared with deionized water (Millipore Mili plus Q system, Billerica, USA) with resistance of not less than 18.2 M $\Omega$ .

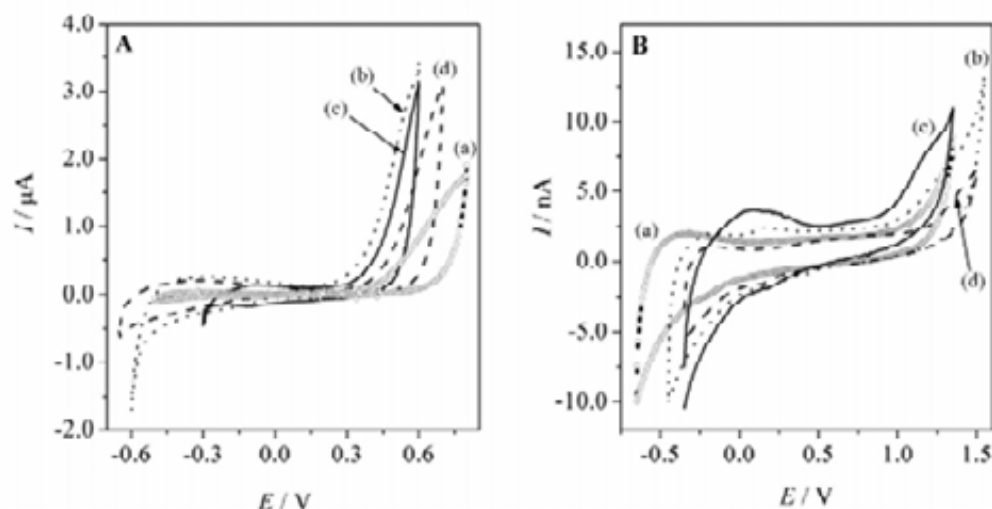
A MW-LA-PECVD was used for the preparation of BDD microelectrodes, further details are reported in <sup>10</sup>. Tungsten (W) wires with a diameter of 20  $\mu$ m were used as substrates. Within this work, two types of BDD $\mu$ Es were investigated, namely: BDD $\mu$ E with incomplete BDD coverage, further marked as BDD $\mu$ E<sub>1</sub>, and BDD $\mu$ E with complete BDD coverage, further marked as BDD $\mu$ E<sub>2</sub>. Prior to BDD growth wires were seeded with nano-diamond seeds suspended in a mixture of DMSO and PVA. Growth conditions for both sets of wires were the same and set to produce BDD with conductivity  $\sim 30$  S cm<sup>-1</sup> and [B] content  $\sim 2 \times 10^{21}$  cm<sup>-3</sup>, full growth conditions can be found in <sup>10</sup>. Differences between the two sets of samples, with respect to the completion of the BDD layer is most likely related to the orientation of the samples in the growth chamber, BDD $\mu$ E<sub>1</sub> samples were held vertically in the chamber, whereas BDD $\mu$ E<sub>2</sub> were held horizontally. Subsequently, the BDD coated W wires were embedded in glass micropipettes using UV light curable resin (Norland Optical Adhesive 68), and uncoated ends of tungsten wires were contacted to copper wires using conductive silver paint (Leitsilber, Degussa). The surface morphology of deposited layers was observed by scanning electron microscopy (SEM, Tescan FERA 3), and the layer thickness of samples was evaluated from cross section SEM observations of reference BDD coated Si samples, which were placed close to the W wires during growth.

Cyclic voltammetry measurements were performed using bipotentiostat/bigalvanostat BP-300 (Bio-Logic Science Instruments, France) with EC-LAB software (version 11.20). A three-electrode set-up was used in which BDD microelectrodes, a silver chloride electrode (Ag | AgCl | 3 mol L<sup>-1</sup> KCl) and a platinum wire (both BASi, USA) served as a working, reference, and counter electrodes, respectively. pH measurements were performed using a digital pH meter 3510 with a combined glass electrode (Jenway, Essen, UK). All electroanalytical experiments were carried out at laboratory temperature (23  $\pm$  1°C).

## Results and discussion

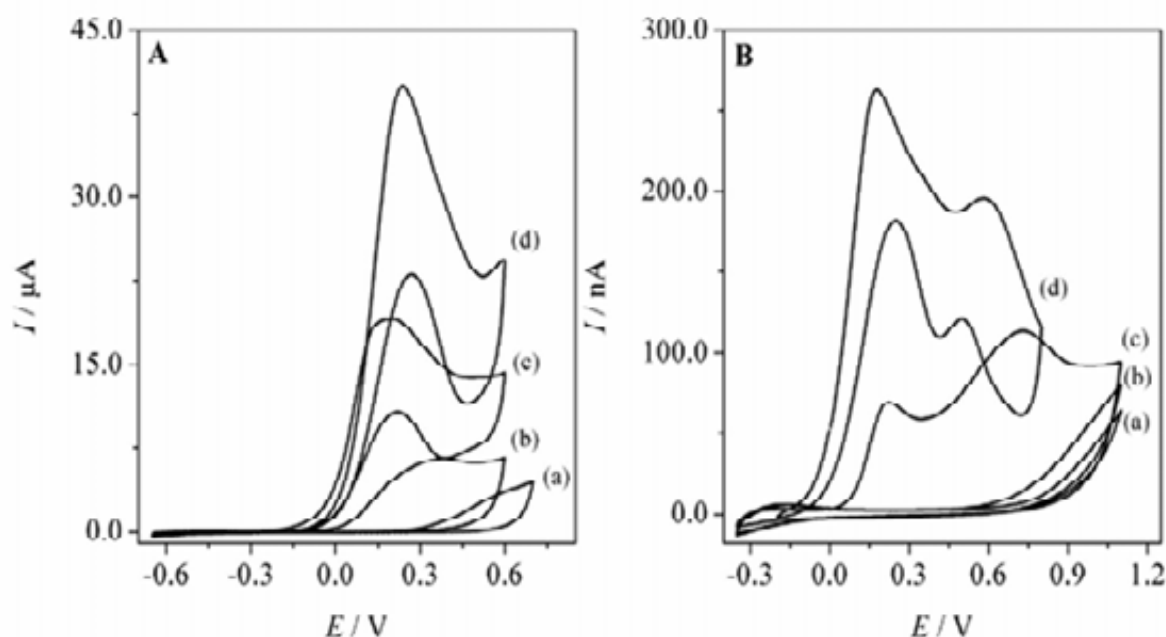
SEM investigation of the BDD coated W wires revealed incomplete coverage, *i.e.* either bare W or isolated BDD islands with poorly developed crystals, for BDD $\mu$ E<sub>1</sub> samples, and complete, *i.e.* closed BDD layer with well-developed crystalline structure, for BDD $\mu$ E<sub>2</sub> samples. Measurements from BDD coated reference Si samples showed the thickness of the layers to be  $\sim 340$  nm for BDD $\mu$ E<sub>1</sub> and  $\sim 420$  nm for BDD $\mu$ E<sub>2</sub>.

Evaluation of the widths of the potential windows on both BDD microelectrodes in different supporting electrolytes, *i.e.* 1 mol·L<sup>-1</sup> KCl, 1 mol·L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>, 0.5 mol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and 0.1 mol·L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, was performed by CV for the scan rate of 100 mV·s<sup>-1</sup> (Fig. 1). As it can be seen, much higher currents ( $\mu$ A) were obtained on BDD $\mu$ E<sub>1</sub> when compared to BDD $\mu$ E<sub>2</sub> (nA). In addition, the shortened potential window in anodic region was observed on BDD $\mu$ E<sub>1</sub> for all tested supporting electrolytes as a result of uncoated areas on the tungsten wire. Nevertheless, in acidic media still reasonable electrochemical performance was detected with potential windows ranging from *ca.* -0.7 V to *ca.* +0.7 V. It was found that BDD $\mu$ E<sub>2</sub> exhibited an extended potential window in the anodic region to *ca.* +1.5 V in acidic media. Thus, these simple electrochemical measurements represent an easy tool for recognizing the uniformity of tungsten wire coverage by BDD.



**Fig. 1.** Cyclic voltammograms recorded in different supporting electrolytes: (a) 1.0 mol L<sup>-1</sup> KCl, (b) 0.5 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (c) 1.0 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>, and (d) 0.1 mol L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> on the BDD microelectrodes (A: BDD $\mu$ E<sub>1</sub>, B: BDD $\mu$ E<sub>2</sub>). Scan rate of 100 mV s<sup>-1</sup>.

Moreover, the potential window of the 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (PB) at different pHs in the range of 2.0–7.4 on the BDD microelectrodes was also tested (Fig. 2). It was found that the background current of BDD $\mu$ Es strongly depends on the pH value: its increase was observed for pH values higher than 4.0 for BDD $\mu$ E<sub>1</sub> and 5.0 BDD $\mu$ E<sub>2</sub>, *i.e.* more promising results were obtained using BDD $\mu$ E<sub>2</sub>. Nevertheless, the reason for current increase in PB with increasing pH is unknown, and could be connected with pH stability of the resin used for insulation of the BDD coated W wires in the glass capillary.



**Fig. 2.** Cyclic voltammograms recorded in 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer solutions: (a) pH 4.0, (b) pH 5.0, (c) 6.0, (d) 7.4, and on the BDD microelectrodes (**A**: BDDμE<sub>1</sub>, **B**: BDDμE<sub>2</sub>). Scan rate of 100 mV s<sup>-1</sup>.

As the quality of the prepared BDD microelectrodes can be diagnosed by assessing the values of anodic and cathodic peak potential difference ( $\Delta E_p$ ) indicating both reversibility and the electron-transfer rate of the redox process occurring on the electrode surface, electrochemical characterization of both BDD microelectrodes was performed by recording cyclic voltammograms of the inner-sphere:  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , and the outer-sphere:  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  redox markers (both 1 mmol L<sup>-1</sup> in 1 mol L<sup>-1</sup> KCl) for the scan rate  $\nu$  of 100 mV·s<sup>-1</sup>. The evaluation of  $\Delta E_p$  for  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  for the BDDμE<sub>1</sub> was not possible due to the absence of the redox couple (only anodic peak for  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  redox marker was observed), whereas the value of  $\Delta E_p$  for the BDDμE<sub>2</sub> was evaluated as 17 mV.  $\Delta E_p$  values for  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  were estimated as 75 mV and 130 mV for BDDμE<sub>1</sub> and BDDμE<sub>2</sub>, respectively.

Further, the effective surface area ( $A_{\text{eff}}$ ) of the BDD microelectrodes was estimated by recording CVs with  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  probe in the range of scan rates  $\nu$  from 5 mV·s<sup>-1</sup> to 1000 mV·s<sup>-1</sup>, and by using the Randles-Sevcik equation for a reversible process:  $I_p = (2.69 \times 10^5) n^{2/3} A_{\text{eff}} D^{1/2} \nu^{1/2} c_0$ . Calculated  $A_{\text{eff}}$  value for the BDDμE<sub>2</sub> is much smaller ( $2.86 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>) than the value determined for BDDμE<sub>1</sub> (0.34 mm<sup>2</sup>) confirming non-complete BDD coverage of the BDDμE<sub>1</sub>.

### Conclusions

In this study, BDD microelectrodes fabricated by MW-LA-PECVD process were characterized by scanning electron microscopy and cyclic voltammetry. Preliminary electrochemical results with different supporting electrolytes show that simple electrochemical measurements represent an easy tool to recognize the uniformity of BDD coverage of tungsten wires. In addition, results suggest that BDDμEs fabricated by MW-LA-PECVD exhibit sufficient width of potential window especially in acidic media, and thus represent a perspective microelectrode for detection of biologically active organic compounds.

## Acknowledgements

The financial support was provided by Czech Science Foundation (project 17-15319S), Charles University (SVV 260440, GAUK 1390217), International Mobility of Researchers at Charles University (CZ.02.2.69/0.0/0.0/16\_027/0008495).

## References

1. Yang N.J., Yu S.Y., Macpherson J.V., Einaga Y., Zhao H.Y., Zhao G.H., Swain G.M., Jiang X.: *Chem. Soc. Rev.* *48*, 157 (2019).
2. Panizza M., Brillas E., Comninellis C., J.: *Environ. Eng. Manage. J.* *18*, 139 (2008).
3. Garrett D.J., Tong W., Simpson D.A., Mellin H.: *Carbon* *102*, 437 (2016).
4. Compton R.G., Foord J.S., Marken F.: *Electroanalysis* *15*, 1349 (2003).
5. Lawrence N.S., Pagels M., Meredith A., Jones T.G.J., Hall C.E., Pickles C.S.J., Godfried H.P., Banks C.E., Compton R.G., Jiang L.: *Talanta* *69*, 829 (2006).
6. Pecková K., Barek J.: *Curr. Org. Chem.* *15*, 3014 (2011).
7. Xu J.S., Granger M.C., Chen Q.Y., Strojek J.W., Lister T.E., Swain G.M.: *Anal. Chem.* *69*, 591 (1997).
8. Vlčková Živcová Z., Mortet V., Taylor A., Zúkal A., Frank O., Kavan L.: *Diamond Relat. Mater.* *87*, 61 (2018).
9. Taylor A., Ashcheulov P., Cada M., Fekete L., Hubík P., Klimša L., Olejníček J., Remeš Z., Jirka I., Janíček P., Bedel-Pereira E., Kopeček J., Mistrík J., Mortet V.: *Phys. Status Solidi A-Appl. Mat.* *212*, 2418 (2015).
10. Taylor A., Ashcheulov P., Hubík P., Klimša L., Kopeček J., Remeš Z., Vlčková Živcová Z., Remzová M., Kavan L., Scheid E., Lorinčík J., Mortet V.: *Carbon* *128*, 164 (2018).

# Anodic Oxidation of 2-Iodobenzoic and 2-Iodosobenzoic Acid at Boron-Doped Diamond Anode

Tomas Bystron, Anastasiia Alexanderova, and Balamurungan Devadas  
University of Chemistry and Technology, Prague, Technicka 5, 166 28 Prague 6,  
Czech Republic, E-mail: bystront@vscht.cz

## Abstract

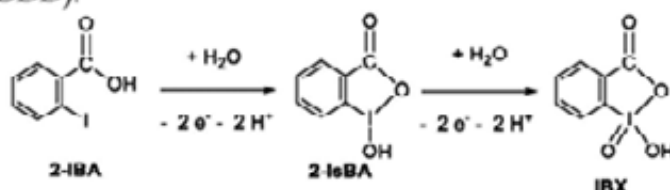
Several organic hypervalent iodine compounds are popular, highly selective and environmentally friendly oxidants. They can be effectively used in countless important oxidative conversions. However, their practical application is limited to laboratory scale. The main reasons are safety issues connected with their preparation and storage. These problems can be obviated if the compounds were prepared on-site by means of anodic oxidation and immediately used up. In this contribution, electrochemical behaviour of selected hypervalent iodine compounds in aqueous solutions will be discussed. Understanding electrochemistry of these compounds is prerequisite of any potential future application on larger scale.

**Key words:** hypervalent iodine, anodic oxidation, boron-doped diamond, 2-iodoxybenzoic acid, 2-iodosobenzoic acid, 2-iodobenzoic acid, kinetics, diffusion coefficient.

## Introduction

Hypervalent iodine compounds attract lot of attention as a mild and highly selective oxidation agents for oxidation of e.g. alcohols to carbonyl compounds<sup>1</sup>. Probably the most important representative of this group is 2-iodoxybenzoic acid (IBX)<sup>2-3</sup>. However, application of many other iodoxy and iodosoarenes has been reported and it has already been summarised by several books and reviews<sup>1,2,4-6</sup>. When it comes to synthesis of these compounds, the number of useful methods is more than limited. For example, the most user friendly method of IBX preparation is oxidation of 2-iodobenzoic acid (2-IBA) by peroxymonosulfate in the form of its triple salt 2KHSO<sub>5</sub>·KHSO<sub>4</sub>·K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (OXONE<sup>®</sup>)<sup>7</sup>. This is potential source of problems since OXONE<sup>®</sup> slowly decomposes (releasing O<sub>2</sub>) upon storage and special care has to be taken to ensure safety. At the same time, content of active oxygen is rather low (< 5 wt %) in OXONE<sup>®</sup>, leading to production substantial amount of waste. Other IBX preparations involve application of permanganate solution, fuming nitric acid or even acidified solutions of carcinogenic bromate (undesired byproduct is gaseous Br<sub>2</sub>) making them rather inconvenient for larger scale production<sup>8,9</sup>.

Recently, we have shown that IBX can be prepared by anodic oxidation of 2-IBA in aqueous environment using boron-doped diamond anode<sup>10</sup>. It was shown that reaction proceeds with high selectivity and charge yield with 2-iodosobenzoic acid as a stable intermediate. The reaction is summarised in the scheme in **Scheme 1**. In the present contribution, we focused at the kinetic aspects of 2-iodobenzoic and 2-iodosobenzoic acid oxidation at the boron-doped diamond electrode (BDD).



**Scheme 1.** Anodic oxidation of 2-iodobenzoic acid (2-IBA) to 2-iodoxybenzoic acid (IBX) via 2-iodosobenzoic acid intermediate.

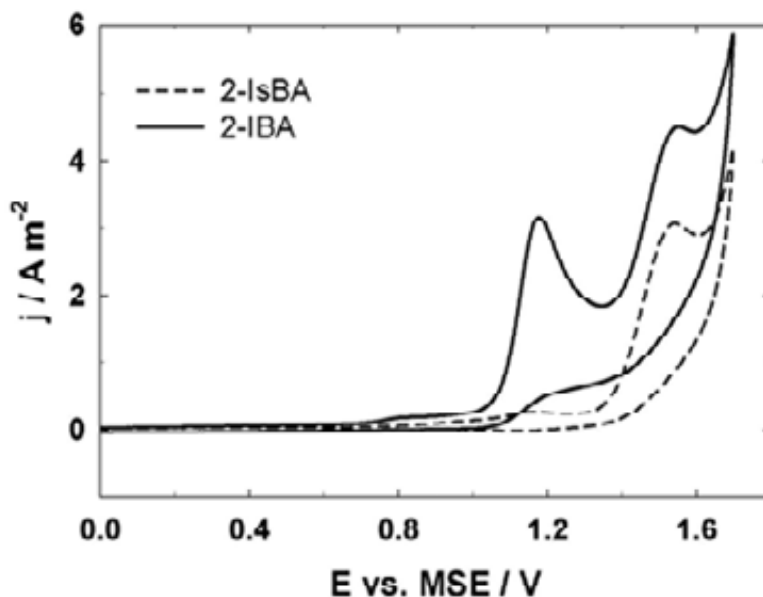
## Experimental

The following chemicals were used as received in the experiments: 2-iodobenzoic acid (99 %, Sigma Aldrich), 2-iodosobenzoic acid (Acros Organics, 98%), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Penta, Czech Republic, 96%), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Lach-Ner, Czech Republic, ≥99.0 %), K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Lach-Ner, Czech Republic, ≥99.0 %), KOH (Lach-Ner, Czech Republic, ≥85 %, Lach-Ner). All the solutions were prepared using distilled water. The voltammetry measurements were carried out with an electrochemical workstation (Zennium Pro, ZAHNER, Germany) using conventional three-electrode cell setup. Pt wire and Hg|Hg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>|K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(sat) (MSE) served as the counter and reference electrodes, respectively. The reference electrode was placed in a Luggin capillary filled with saturated K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution. Diachem® BDD (Condias, Germany) was used as the working electrode. The cell body was made of hollow polytetrafluoroethylene cylinder (volume of 10 cm<sup>3</sup>) pressed onto the BDD plate electrode (geometric surface area 0.5 cm<sup>2</sup>).

## Results and discussion

Cyclic voltammograms of 2-IBA and 2-IsBA are shown in Fig. 1. The oxidation peak at about 1.2 V visible on voltammogram of 2-IBA corresponds to anodic oxidation of 2-IBA to 2-IsBA. At potentials above 1.4 V, 2-IsBA is further oxidised to IBX. A nature of the second oxidation peak is confirmed by the voltammogram of 2-IsBA, where only the second oxidation peak is present. When the current density ( $j_p$ ) of both oxidation peaks was plotted as a function of square root of potential sweep rate, a linear dependences were found, see Fig. 2. Therefore, it can be concluded that both the 2-IBA and 2-IsBA are coming from the electrolyte solution bulk and are not pre-adsorbed at the BDD electrode surface.

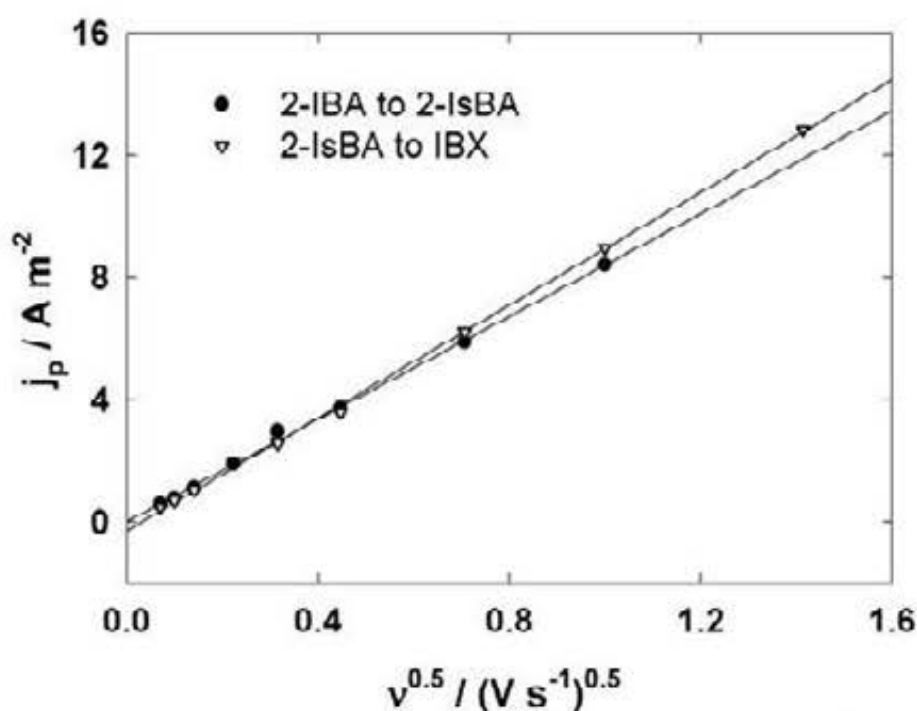
$$dj_p/dv^{1/2} = 2.99 \cdot 10^5 c_i F z D_i^{1/2} \left( \frac{Fz\alpha a}{RT} \right)^{1/2} \quad (\text{Eq. 1})$$



**Fig. 1.** Cyclic voltammograms of 2-iodobenzoic acid ( $4.9 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>, 2-IBA) and 2-iodosobenzoic acid ( $4.8 \cdot 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>, 2-IsBA) in 0.2 mol dm<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on stationary BDD electrode. Scan starts at 0 V in positive direction, electrode potential swept with rate of 100 mV s<sup>-1</sup>. Room temperature. Curves are corrected for uncompensated resistance of the electrolyte.

Analysis of the peak potentials by plotting their dependence on the logarithm of potential sweep rate allowed determining the charge transfer coefficients (in particular product  $\alpha a$ ).

The charge transfer coefficient values were parallelly determined using differences between peak potentials and potentials in the half of the peaks and finally also using Tafel slope analysis. The values of charge transfer coefficients summarised in the Table I were consequently used in calculation of diffusion coefficients of 2-IBA and 2-IsBA using Eq. 1. Their values are again given in Table I.



**Fig. 2.** Peak current density vs. square root of sweep rate. Approx.  $5.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  iodine compound in  $0.2 \text{ mol dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$  on stationary BDD electrode. Potential swept from 0 V in positive direction. Data corrected for background currents and uncompensated resistance of the electrolyte. Points represent experimental data, line was obtained by linear regression. Peaks considered are given in the figure caption.

**Table I.**

**Summary of electrode reactions analysis.**  $\alpha$  is charge transfer coefficient,  $z_\alpha$  is number of electrons transferred within and up to rate determining step,  $z$  overall number of electrons transferred per molecule of substrate,  $D$  apparent diffusion coefficient of specie.

Process	$\alpha z_\alpha$	$z$	$D \cdot 10^9$ $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$
2-IBA $\rightarrow$ 2-IsBA	$0.55 \pm 0.05$	2	$1.0 \pm 0.1$
2-IsBA $\rightarrow$ IBX	$0.52 \pm 0.04$	2	$1.1 \pm 0.2$

### Conclusion

Cyclic voltammograms of a BDD electrode in aqueous  $0.2 \text{ mol H}_2\text{SO}_4 \text{ dm}^{-3}$  solution containing IBA implied that it could be oxidised in two 2-electron sequential steps to IsBA and IBX. The first electron transfer, i.e., formation of radical-cation or radical-anion, appeared to be the rate-determining step for both reactions studied, with derived diffusion coefficients of ca.  $1.1 - 1.2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  at 298 K.

### Acknowledgement

The work was supported from European Regional development Fund-Project "Organic redox couple based batteries for energetics of traditional and renewable resources (ORGBAT)" No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_025/0007445.

### References

1. Yoshimura A., Zhdankin V. V.: *Chem. Rev.* *116*, 3328 (2016).
2. Duschek A., Kirsch S. F.: *Ang. Chem. Int. Ed.* *50*, 1524 (2011).
3. Nicolaou K. C., Mathison C. J. N., Montagnon T.: *Journal of the American Chemical Society* *126*, 5192 (2004).
4. Zhdankin V. V.: *Arkivoc* *2009*, 1 (2009).
5. Zhdankin V. V., Ladziata U.: *Arkivoc* *2006*, 26 (2006).
6. Stang P. J., Zhdankin V. V.: *Chem. Rev.* *96*, 1123 (1996).
7. Frigerio M., Santagostino M., Sputore S.: *J. Org. Chem.* *64*, 4537 (1999).
8. Hartmann C., Meyer V.: *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* *26* (1893).
9. Greenbaum F. R.: *Am. J. Pharm.* *108* (1936).
10. Bystron T., Horbenko A., Syslova K., Hii K. K., Hellgardt K., Kelsall G.: *ChemElectroChem* *5*, 1002 (2018).



## On UV-Vis Spectroelectrochemistry of Luteolin-7-O-Glucoside

Andrea Gregorio Castano <sup>a</sup>, Romana Sokolova <sup>a</sup>, and Ilaria Degano <sup>b</sup>

<sup>a</sup>J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: sokolova@jh-inst.cas.cz

<sup>b</sup>University of Pisa, Department of Chemistry and Industrial Chemistry, Via Moruzzi 13, 56124 Pisa, Italy

### Abstract

The UV-Vis spectroelectrochemical cell containing an optically transparent platinum net used as the working electrode was tested in two regimes of electrochemical measurement, cyclic voltammetry and chronoamperometry, respectively. A three electrode setup used silver quasi reference electrode and platinum electrode serving as a counter electrode. The calibration of the spectroelectrochemical cell was performed for one-electron oxidation processes as well as for two-electron oxidations. The spectral changes during the oxidation of luteolin-7-O-Glucoside gave the information about the electroactive chromophores in molecule. Resulted spectra were compared with luteolin. The identification of products of oxidation was done by complementary analytical techniques HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS.

**Key words:** Spectroelectrochemistry, Oxidation, Luteolin, Antioxidants, Luteolin-7-O-Glucoside.

### Introduction

The investigation of electron transfer processes participating between an electrode and a molecule is usually done by means of classical electrochemical methods like cyclic voltammetry and polarography. Regarding to the analytical determinations of analytes there are methods like square wave voltammetry, differential pulse voltammetry etc. used with advantage of low LOD <sup>1</sup>.

The characterization of electron transfer mechanism, particularly determination of so called reaction schemes, where the heterogeneous reactions are coupled with homogeneous chemical reactions is an important domain of electrochemistry and electrochemistry plays a significant role in the explanation of the first reactions of a molecule, formation of intermediates and participating of coupled chemical reactions. The mechanistic studies were done by group of Savéant, Amatore and others <sup>2</sup>. Our previous works combined electrochemical studies with analytical separation techniques, which allowed to identify the final redox products after the exhaustive electrolysis. Together with redox products, also, possible decomposition products of starting compound and/or formed product were identified <sup>2</sup>. Electrochemical methods become more efficient tools in identification changes in molecule during the application of potential when they are accompanied with the in-situ measurements of spectroscopic properties <sup>3,4</sup>. Flavonoids are natural compounds present in berries, fruit and herbs <sup>5</sup>. They have antioxidative, anti-inflammatory and anti-carcinogenic properties and this bioactive efficiency is often connected to the electron transfer properties <sup>6</sup>. A luteolin-7-O-glucoside was selected for testing of the spectroelectrochemical cell because of its large pharmaceutical potential <sup>7,8</sup>. This compound belonging to flavones contains in its chemical structure glucoside moiety, which improves its solubility properties and as a consequence its bioavailability importantly. Interestingly, even if the oxidation mechanism of flavonols containing one additional hydroxy group in position C-3 is well known <sup>9,10</sup>, the oxidation mechanism of luteolin is still not properly explained. Flavonol derivatives, containing a double bond between atoms C2 and C3 and hydroxy group in position C-3, are oxidized by an ECEC

(Electron transfer - Chemical reaction = deprotonation – Electron transfer - Chemical reaction = deprotonation and nucleophilic addition of water) mechanism to a benzofuranone derivative and also the formation of several open structures was reported<sup>11</sup>. Luteolin was found to be oxidized to the corresponding hydroxyl-derivative and typical open structures<sup>11,12</sup>. Luteolin-7-O-Glucoside has not been electrochemically studied yet to our best knowledge. The aim of this study was the testing of a spectroelectrochemical cell on the oxidation of a bioactive compound. We believe that a combination of electrochemical techniques with UV-Vis spectrophotometry significantly help to explain an oxidation mechanism of luteolin-7-O-Glucoside.

## Experimental part

### Reagents

Luteolin-7-O-glucoside and luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone), were purchased from Sigma Aldrich, Czech Republic. The reagents used for preparation of Britton-Robinson buffers (0.04 mol L<sup>-1</sup> stock solutions of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> and 0.2 mol L<sup>-1</sup> NaOH) were of reagent grade p. a. The solutions were prepared with ultrapure water (Millipore). All reagents and chemicals were used without any further purification.

### Electrochemical setup

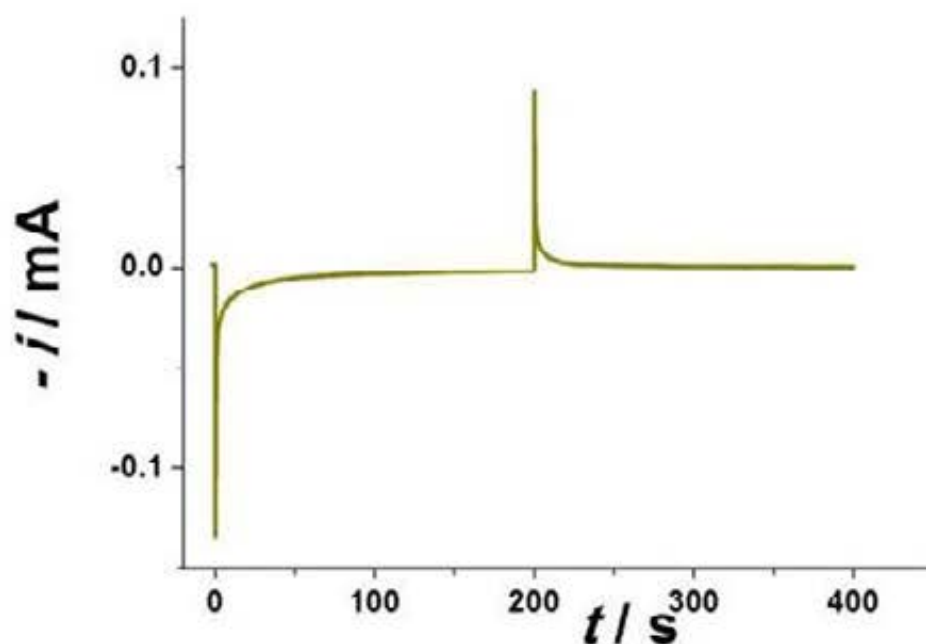
The cleaning of the spectroelectrochemical cell was an important part of the research. Firstly, the spectroelectrochemical cell was cleaned chemically by washing of aqueous solutions with water and ethanol. Afterwards, acetone and then acetonitrile were used for cleaning of the cell, and then the electrode was cleaned electrochemically by application of negative potential -2.0 V until a development of hydrogen at the surface of electrode. This electrochemical cleaning was carried out in 0.1 M TBAPF<sub>6</sub> in acetonitrile.

Cyclic voltammetry as well as chronoamperometry were performed in an optically transparent thin-layer electrode cell using a PAR potentiostat (model 263, Princeton Applied Research, USA). The thickness of spacer between optical windows made of CaF<sub>2</sub> was 0.18 mm.

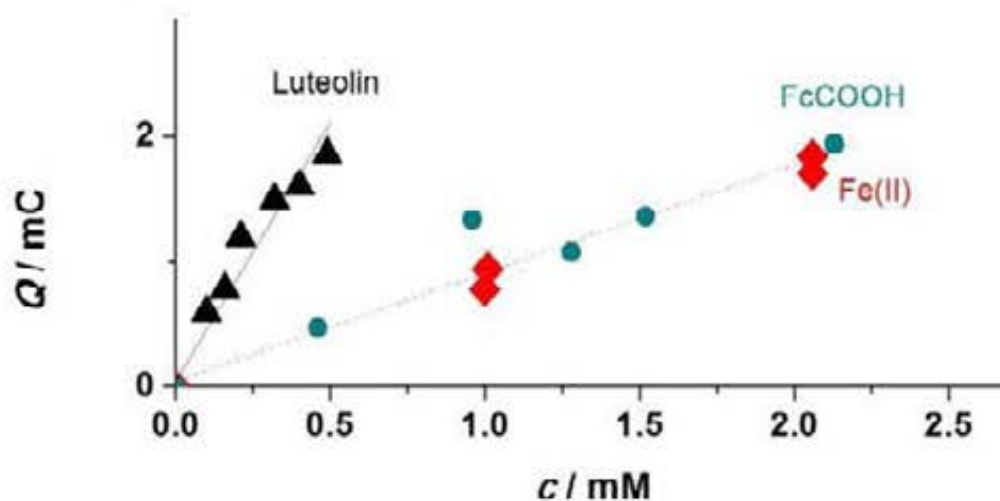
The cell contains a three electrode system (Ag/AgCl reference electrode, platinum working and auxiliary electrodes) mounted in a thin layer.

## Results and discussion

The spectroelectrochemical cell was used for oxidation of flavones luteolin and luteolin-7-O-glucoside. Two modes of measurement were used, a cyclic voltammetry showing a symmetrical shape of anodic peak typical for thin-layer setup<sup>13</sup> (not shown) and a chronoamperometry with two potential steps (Fig. 1). During the cyclic voltammetry the electrode was polarized by the rate of 5 mV/s and absorption spectra were recorded every 3 s. During chronoamperometric measurement absorption spectra were recorded before and during the potential step to the potential behind the first oxidation wave of luteolin and luteolin-7-O-Glucoside every 3 s and also during the second potential step to the potential -0.1 V lower than that of luteolin redox pair. The charge was calculated by integration of current-time curves at different concentrations of luteolin (one concentration is shown in Fig. 1) and was plotted against concentration (Fig. 2). The slope of this dependence is twice higher than the slope corresponding to one electron oxidation obtained for ferrocene carboxylic acid and ferro/ferri couple. It means that number of participating electrons in oxidation process was two. During electrolysis of luteolin-7-O-Glucoside and luteolin in the spectroelectrochemical cell absorption spectra were recorded (Fig. 3A,B, respectively).



**Fig. 1.** The current – time dependence of 0.49 mM luteolin during the chronoamperometry. Initial potential was  $E_{ini} = -0.05$  V, the first potential step was  $E_1 = 0.3$  V for 200 s, the second potential step was  $E_2 = -0.1$  V for 200 s.

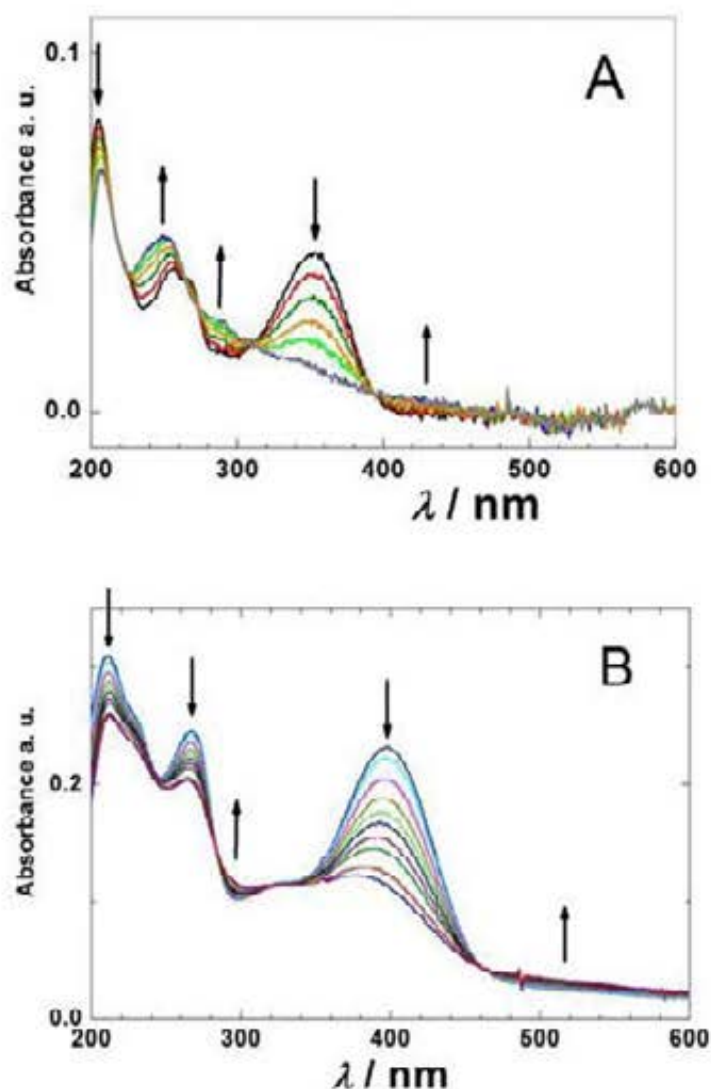


**Fig. 2.** Calibration of the spectroelectrochemical cell. Dependence of the total consumed charge of luteolin ( $\blacktriangle$ ), Fe(II)/Fe(III) couple ( $\blacklozenge$ ) and ferrocene carboxylic acid Fc/Fc<sup>+</sup> ( $\bullet$ ) on concentration of oxidized compounds.

Luteolin-7-O-glucoside absorption spectrum contains absorption bands at 205, 256, 268 and 353 nm. The oxidation is accompanied by a decrease of bands at 205, 268 and 353 nm, while 250 and 288 nm increase together with broad band at 428 nm. The increase of 256 nm band is accompanied by slight blue shift.

Luteolin is characterized by the absorption bands at 211, 267 nm and 399 nm. During oxidation these absorption bands decrease. The change is accompanied by an increase of 245 nm, 298 nm and broad 491 nm absorption bands (Fig. 3B). In both cases, the oxidation leads

to the low molecular weight compound, the slow increase of the 298 nm absorption band supports the formation of 3,4-dihydroxybenzoic acid (3,4-DHBA)<sup>9,10</sup>.



**Fig. 3.** UV-Vis spectroelectrochemistry of A) 0.1 mM luteolin-7-O-Glucoside and B) 0.49 mM luteolin.

### Conclusion

The calibration of the spectroelectrochemical cell was done for one-electron oxidation processes as well as for two-electron oxidation of selected polyphenols. The spectral changes during the oxidation of luteolin-7-O-Glucoside and luteolin were compared. The identification of products of oxidation will be the other stage of the research by means of complementary analytical techniques HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS.

### Acknowledgements

This work is supported by the Czech Science Foundation (GAČR 19-03160S).

### References

1. Gironi S.T., Alexiadou D.K., Ioannou A.K. *Microchim Acta* 160, 435 (2008).

2. Savcánt J.-M., Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry, Wiley-Interscience, John Wiley and Sons. Inc., New Jersey; Hoboken 2006.
3. Kaim W., Fiedler J.: Chem Soc Rev 38, 3373 (2009).
4. Sokolova R., Kocabova J., Marhol P., Fiedler J., Biedermann D., Vacek J., Kren, V.: J. Phys. Chem. B, 121, 6841 (2017).
5. Arai Y., Watanabe S., Kimira M., Shimoi K., Mochizuki R., Kinae N.: J. Nutr. 130, 2243 (2000).
6. Ramesova S., Sokolova R.: Chem Listy, 108, 507 (2014).
7. Cui X.X., Yang X., Wang H.J., Rong X.Y., Jing S., Xie Y.H., Huang D.F., Zhao C.: Front. Microbiol. 8, 2425 (2017).
8. Iakovleva I., Begum A., Pokrzywa M., Walfridsson M., Sauer-Eriksson A.E., Olofsson A.: PLoS ONE 10, e0128222 (2015).
9. Ramesova S., Degano I., Sokolova R.: J. Electroanal. Chem. 788, 125 (2017).
10. Ramesova S., Sokolova R., Degano I.: Electrochim. Acta, 182, 544 (2015).
11. Sokolova, R., Ramesova, S., Kocabova, J., Kolivoska, V., Degano, I., Pitzalis, E.: Monatsh. Chem., 147, 1375 (2016).
12. Ramesova S., Sokolova R., Tarabek J., Degano I.: Electrochim. Acta, 110, 646 (2013).
13. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. Electrochemical methods: fundamentals and applications, John Willey & Sons, New York, USA, 2001.

## Spectro-Electrochemical and Plasmonic Behavior of Silver Amalgam Particles

Aleš Daňhel<sup>a</sup>, Peter Šebest<sup>a</sup>, Lukáš Kejlik<sup>a,b,c</sup>, Filip Ligmajer<sup>b,c</sup>, and Michal Horák<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, 612 00 Brno, Czech Republic, \*E-mail: danhel@ibp.cz

<sup>b</sup> Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Purkyňova 123, 612 00 Brno, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute of Physical Engineering, Brno University of Technology, Technická 2, 616 69 Brno, Czech Republic

### Abstract

Silver amalgam particles (AgAP) may be electrodeposited from the solution containing both metal ions on various supporting materials, such as transparent indium tin oxide (ITO), golden film and/or pyrolytic graphite electrodes (PGE). Composition, morphology, surface density and/or particle size may be optionally selected for require purposes and exhibit broad variability of optical and electrochemical properties. Inside of the cuvette/spectrophotometer, transparent ITO decorated by AgAP (final transparency about 80 %), could be oriented perpendicularly and non-transparent PGE-AgAP parallel to passing UV/Vis light beam. These arrangements were successfully applied for continuous monitoring of absorbance during potentiostatic electrolysis of selected organic nitro-compounds (nitrobenzofurazan and 4-nitrophenol) with a purpose to determine a number of exchanged electrons and corresponding reduction rate constants. Predominant adsorption of fluorescently labeled DNA or green fluorescent protein on AgAP then on underlying ITO or PGE has been observed by fluorescent microscopy in reflected mode. This set up opens perspective possibility to directly observe biopolymers' secondary structures and their intrinsic behavior on charged surfaces. Furthermore, optical and plasmonic behavior of AgAP micro- and nano-particles were studied in more detail. Optical spectroscopy techniques on the ensemble level and electron energy loss spectroscopy on the single-particle level proved the extremely wide spectral range covered by the AgAP localized plasmonic resonances, what allows its perspective utilization in photochemical and/or spectroelectrochemical applications.

**Key words:** Electrochemistry, Fluorescence, Nanostructures, Plasmonics, Spectroscopy, Silver amalgam.

### Introduction

Nanostructured surfaces and nanoparticles of silver amalgam (AgA) combine advantages of nanomaterials in general (high charge transfer, catalytic properties *etc.*) and electrochemical properties, such as broad negative potential window, mechanical stability, and strong adsorption ability of nucleic acid or proteins<sup>1-3</sup>. Electrochemical deposition of silver amalgam micro- and nano-particles (AgAP) from the solution of both Ag<sup>+</sup> and Hg<sup>2+</sup> ions opens a wide range of electrochemical and spectro-electrochemical applications within cathodic potential window. In principle, this simple procedure could be used at all conductive material. Transparent indium tin oxide (ITO)<sup>4</sup>, pyrolytic graphite (PGE)<sup>5</sup> and/or vapor deposited golden films electrodes (AuFE)<sup>6</sup> were found to be suitable underlying materials.

Spectro-electrochemical utilization of the AgAPs provides convenient platform for electro-analytical studies and/or development of novel detection systems. Nevertheless up to date, there is lack of knowledge about optical properties, e.g. dielectric function or nature and position of their plasmonic resonances. Therefore, these properties were systematically

investigated and supported by numerical simulations. Results are discussed in this work.

### Experimental

AgA nano- and microparticles were electrodeposited onto ITO substrate electrodes (CG-511N, Delta Technologies, USA), homemade AuFE (150 nm of Au film were deposited on 3 nm of Ti adhesion layer on bare silicon wafers using electron beam evaporation system (Bestec GmbH, Germany)) or on PGE (Momentive, USA) from a mixture of 0.01 M AgNO<sub>3</sub> and 0.01 M Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (45% Ag<sup>+</sup> (n/n)) in 0.1 M KNO<sub>3</sub>. Studied model organic nitrocompounds: N-methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan (NBF) and 4-nitrophenol (4-NP) were of p.a. purity and purchased from Sigma-Aldrich. Double pulse chronoamperometry (DPCA) was used for the electrodeposition in a two-electrode setup with silver wire pseudo-reference electrode in a Teflon cell. The nucleation pulse potential ( $E_1$ ) -1.0 V was applied for the nucleation time ( $t_1$ ) 50 ms and followed by the growth potential ( $E_2$ ) -0.1 V lasting for the variable growth time ( $t_2$ ) 1-30 min.

Electrochemical measurements were carried out by Autolab operated by Nova software Ver. 2.13 (both Metrohm-Autolab), while chronopotentiometric stripping of GFP was performed by Autolab 302N (Metrohm-Autolab) with GPES as operating software. The potentiostat was connected with VA Stand 663 in three electrode setup including: ITO, AuFE or PGE with or without AgAP as working electrode, Ag/AgCl/3M KCl as reference electrode and platinum rod as counter electrode (both Metrohm-Autolab). Oxygen was removed from the solution by 5 min passing a stream of argon (5.0 grade, SIAD) saturated with vapours of the water in all voltammetric and chronoamperometric experiments. Chronopotentiometric stripping was performed under the air. All the measurements were carried out at room temperature 25°C<sup>4-6</sup>

Spectroelectrochemical cell was assembled in 1 cm quartz cuvette and the potentiostatic chronoamperometry was controlled by potentiostat PalmSens 3 using PStace 5 software (both PalmSens). Spectra were registered within 230 and 450 nm in 10 seconds intervals by Specord 210 Plus (Jena) using software WinASPECT Plus Ver. 4.2.0.0 (both Jena)<sup>4</sup>.

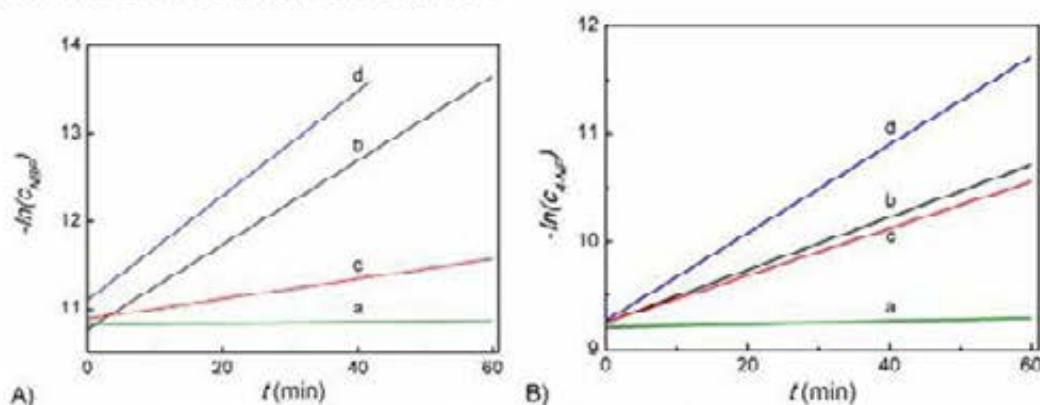
Inverted fluorescence microscope (IX83, Olympus) using LED light source (pA-300White, CoolLED), CMOS camera (ORCA-Flash 4.0 LT, Hamamatsu) and objective 60x (UPLFLN, N.A. 0.90, W.D. 0.2, Olympus) was used for imaging of the bPGE and edge plane PGE (ePGE) surfaces with electrodeposited AgAP and adsorbed DNA or GFP. Fluorescence of the labelled DNA was registered using 635 nm excitation and 560 nm emission wavelengths. A 488 nm excitation and 509 nm emission wavelengths were used for GFP<sup>5</sup>.

The morphology of the samples was investigated using a scanning electron microscope (SEM, FEI Verios 460L) equipped with an energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS, EDAX SDD Octane Super). The transmission electron microscope (TEM) measurements were performed on a silicon nitride membrane (30 nm thick; Agar Scientific) with FEI Titan microscope equipped with GIF Quantum spectrometer for electron energy loss spectroscopy (EELS) and Super-X spectrometer for energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) operated in monochromated scanning regime at 300 kV. Beam current was set to 0.4 nA and the full width at half maximum of the zero-loss peak (ZLP) was around 0.13 eV. In the case of EELS, the convergence angle was set to 10 mrad, collection angle to 6.6 mrad, and dispersion of the spectrometer to 0.01 eV/pixel. The far-field optical reflectance spectra were taken using an infrared microscope (Bruker Hyperion 3000, 15x objective), which was coupled to a Fourier-transform infrared spectrometer (Bruker Vertex v80)<sup>7</sup>. Further experimental details may be found in Ref. <sup>4-7</sup>.

## Results and Discussion

Transparent ITO-AgAP system is convenient for spectro-electrochemical applications with about 80% transparency and high electrode surface active area. Highly dense AgAPs with mirror shine then may considerably reflect the light. Applicable potential window is however limited by anodic dissolution of AgAP (+0.1 V) and cathodic reduction of underlying ITO (-1.0 V) what poses significant limitation. Presence of the AgAP enhances the electroreduction of NBF about 300 mV to less negative potentials and speedup its first order electroreduction process about 20-times (at applied potential -400 mV, Tab. 1) in comparison to bare ITO. Experiments with fluorescently labeled DNA revealed its preferential adsorption at AgAP then on bare ITO, which is negatively charged as well as the sugar-phosphate backbone of the DNA and thus mutual electrostatic repulsion occurs<sup>4</sup>.

Utilization of the PGE for electrodeposition of AgAP profits from broad potential window ( $\pm 2$  V) and high mechanical stability of the PGE. Since it is nontransparent material, the spectro-electrochemical experiments had to be carried out in parallel orientation of the PGE towards a passing through light beam. Voltammetric analysis of model organic nitrocompound, 4-nitrophenol, revealed significant shift of cathodic reduction signal to less negative potential about 300 mV, as well as the AgAP at ITO in case of NBF reduction. Further experiments with spectro-electrochemistry (Fig. 1B) allow us to determine number of exchanged electrons, reaction order and reduction rate constant (Tab. 1). Electrochemical reduction of 4-NP is about 20-times faster at PGE-AgAP then at bare PGE. Fluorescent microscopy of the fluorescently labeled DNA and green fluorescent protein (GFP) revealed their preferential adsorption on the AgAP then on bare PGE. Thank to catalytic hydrogen evolution reaction of the GFP on AgAP, this protein could be determined by constant current chronopotentiometry at PGE-AgAP and opens broad application possibilities in protein analysis. Intrinsic redox signals of the DNA could also be detected<sup>5</sup>.



**Fig 1.** Linear straight lines corresponding to first reaction order of chronoamperometric reduction of: A) NBF (20  $\mu$ M in 0.2 M AcB pH 5.0) with applied potential: -400 mV at ITO (a), -700 mV at ITO (b), -400 mV at ITO-AgAP (c) and -700 mV at ITO-AgAP (AgAP were electrodeposited at ITO by DPCA using  $E_1$  -1.0 V,  $t_1$  50ms,  $E_2$  -0.1V and  $t_2$  30 min from 0.01 M  $\text{Ag}^+/\text{Hg}^{2+}$  (30.6 w%<sub>Ag</sub>) in 0.1 M  $\text{KNO}_3$ , and B) 4-NP (100  $\mu$ M in 0.2 M AcB pH 5.0) by chronoamperometry with applied potential: -600 mV at PGE (a), -900 mV at PGE (b), -600 mV at PGE-AgAP (c) and -900 mV at PGE-AgAP (AgAP were electrodeposited at PGE by DPCA using  $E_1$  -1.25 V,  $t_1$  50 ms,  $E_2$  +0.4 V and  $t_2$  5 min from 0.01 M  $\text{Ag}^+/\text{Hg}^{2+}$  (30.6 w%<sub>Ag</sub>) in 0.1 M  $\text{KNO}_3$ .

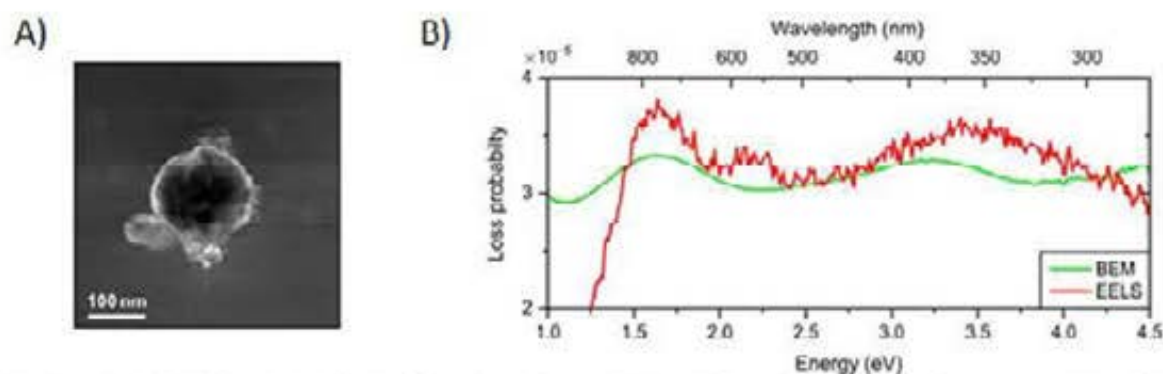
**Table I.**



Number of exchanged electrons ( $n$ ), reaction order and reaction rate constants ( $k$ ) obtained from spectroelectrochemical study of the 20  $\mu\text{M}$  NBF and 100  $\mu\text{M}$  4-NP in 0.2 M AcB pH 5.0. All experiments were done at laboratory temperature 25°C.

Electrode/ Applied potential	Analyte	$n$	Reaction order	$k / \text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$
ITO/ -400 mV	NBF	0	1 <sup>st</sup>	$1 \cdot 10^{-5}$
ITO/ -700 mV	NBF	4	1 <sup>st</sup>	$8 \cdot 10^{-4}$
ITO-AgAP/ -400 mV	NBF	6	1 <sup>st</sup>	$2 \cdot 10^{-4}$
ITO-AgAP/ -700 mV	NBF	8	1 <sup>st</sup>	$1 \cdot 10^{-3}$
PGE/ -600 mV	4-NP	0	1 <sup>st</sup>	$2 \cdot 10^{-5}$
PGE/ -900 mV	4-NP	4	1 <sup>st</sup>	$4 \cdot 10^{-4}$
PGE-AgAP/ -600 mV	4-NP	4	1 <sup>st</sup>	$4 \cdot 10^{-4}$
PGE-AgAP/ -900 mV	4-NP	4	1 <sup>st</sup>	$7 \cdot 10^{-4}$

Optical properties including plasmonic behavior of AgAPs were observed on the particle ensembles electrodeposited on ITO. Obtained broad particle size distribution results in wide range of multimodal plasmonic resonances occurred from the UV to mid-infrared wavelengths. Although sharp resonances are often necessary for applications on refractive index sensing or light modulation, observed broadband resonances are indispensable in MIR spectroscopy sensing. Better understanding to the nature of AgAP plasmonic resonance modes was supported by numerical simulations of dielectric function of a bulk silver amalgam, which was prepared by direct mixing of the metals in proper ratio. No optical properties of the silver amalgam were reported up to date. This calculation was confirmed experimentally. The dielectric function of the bulk silver amalgam was measured by spectroscopic ellipsometry within UV to near-infrared (NIR) frequencies. Unfortunately, the MIR connected to micro-particles was out of the ellipsometer spectral range and thus could not be experimentally achieved by available instrumentation. Therefore our attention was focused on nano-particles (NPs, Fig. 2A) exhibiting optical losses at UV/Vis wavelengths. Their scattering and extinction coefficients were verified by commercial Finite-Difference Time-Domain (FDTD) method. Extinction efficiency was modeled for a set of silver amalgam NPs (50 – 1000 nm) in vacuum with dielectric functions. Resulting spectra (Fig. 2B) revealed the characteristic red-shift dipolar resonances, as well as the higher-order multipolar resonances at short wavelengths. Smaller NPs offered resonances of higher quality and strength in the UV/Vis spectral range. Therefore, experiments on single-particle level was carried out by EELS.



**Fig. 2.** A) SEM image of a silver amalgam NP selected for the electron energy loss probability spectra (EELS) analysis and B) Measured (red) and calculated by BEM (green) EEL spectra of the same particle.

The EEL spectrum of the selected NP exhibits two resonance peaks at 1.65 eV and 3.50 eV (Fig. 2B) which was in reasonably good agreement with a boundary element method (BEM) numerical simulation of NP with comparable dimensions (diameter of 175 nm and thickness of 80 nm). Spectral range covered by the plasmonic resonance of the silver amalgam NPs has also been analyzed within the size 30 – 470 nm. Resulting resonances span extremely wide spectral region from UV, across Vis, to MIR wavelengths. Thus, AgA nano and micro-particles were confirmed to be promising plasmonic material with extraordinary tunability in the photochemical and spectroelectrochemical applications.

### Conclusion

The AgAPs were found to be suitable alternative electrode material for development of novel electrochemical as well as spectroelectrochemical detection systems. Organic nitro compounds, DNA and/or proteins may be determined by means of voltammetric, amperometric or constant current chronopotentiometric stripping techniques. Moreover, the optical and the electron energy loss spectroscopy verified broad plasmonic resonances of the AgAPs in dependence on their tunable size from the mid-infrared for the largest particles, down to the UV for the smallest ones. Obtained results offer an interesting perspective for further development of spectroelectrochemical or photochemical applications.

### Acknowledgment

This work has been supported by a Grant Agency of the Czech Republic (project 17-23634Y) and a part of the work was carried out with the support of CEITEC Nano Research Infrastructure (MEYS CR, 2016–2019).

### References

1. Danhel A., Barek J.: *Curr. Org. Chem.* *15*, 2957 (2011).
2. Palecek E., Bartosik M.: *Chem Rev* *112*, 3427 (2012).
3. Palecek E., Tkac J., Bartosik M., Bertok T., Ostatna V., Palecek J.: *Chem Rev* *115*, 2045 (2015).
4. Danhel A., Ligmaier F., Sikola T., Walcarius A., Fojta M.: *J Electroanal Chem* *821*, 53 (2018).
5. Sebest P., Fojt L., Ostatna V., Fojta M., Danhel A.: *Anal. Chem.* Submitted 2019.
6. Havranova P., Ligmaier F., Danhel A.: *Electroanalysis.* Submitted 2019.
7. Ligmaier F., Horak M., Sikola T., Fojta M.: *ACS Nano*, Submitted 2019.

## Application of Carbon Felt Detector for the Determination of Dinitrophenol Metabolites (Využití detektoru z uhlíkové plsti pro stanovení metabolitů dinitrofenolu)

Hana Dejmková and Manuel Knaf

Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry,  
UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2,  
Czech Republic, E-mail: dejmkova@natur.cuni.cz

### Abstract

Method for the determination of dinitrophenol metabolites was developed using HPLC with recently introduced coulometric carbon felt detector. Model samples in urine matrix were used as the example of practical utilization. This setting allowed comparing the advantages and disadvantages of the cathodic and anodic detection on this detector, with higher selectivity of the cathodic measurement and lower detection limits of the anodic measurement.

**Key words:** Carbon felt, Coulometry, HPLC, Dinitrophenol metabolites.

### Úvod

Uhlíková plst je materiál tvořený uhlíkovými vlákny, náhodně propletenými a slisovanými do deskovitého tvaru. Z hlediska výroby velkoplošných elektrod má mnoho výhodných vlastností – má velký povrch v malém objemu, velkou elektronovou vodivost, ale malý hydrodynamický odpor, je snadno opracovatelný a mechanicky tvarovatelný a finančně dostupný.<sup>1</sup> Proto se, přestože je to původně konstrukční materiál, již nějakou dobu v elektrochemii využívá, zejména při zhotovování palivových článků<sup>2</sup> či při čištění odpadních vod<sup>3</sup>. Elektroanalytické využití se soustředilo zejména na stanovení kovů<sup>4</sup> nebo využívá plst jako podkladový materiál pro nanášení kovových částic<sup>5</sup>, nicméně je, jak jsme již dříve prokázali, schopna fungovat v průtokovém uspořádání také jako coulometrický detektor pro stanovení oxidovatelných organických látek.<sup>6,7</sup> V tomto příspěvku bude věnována pozornost chromatografickému stanovení aminonitrofenolů, metabolitů dinitrofenolu, schopných oxidační i redukční elektrochemické reakce, s využitím detekce na uhlíkové plsti; budou porovnány podmínky stanovení probíhajícího v těchto dvou oblastech potenciálů a využitelnost vyvinuté metody bude ukázána na stanovení v matrici moči.

### Experimentální část

Pro chromatografická měření byla využita sestava složená z vysokotlaké pumpy Beta 10 (Ecom, ČR), kolony Gemini 5  $\mu\text{m}$  C18 110 Å, 150 x 4,6 mm (Phenomenex) a elektrochemického detektoru ADLC 2 (Laboratorní přístroje Praha, ČR). Elektrochemická detekce probíhala v tříelektrodovém uspořádání s pracovní elektrodou z uhlíkové plsti (Karbotechnik, ČR), referentní argentchloridovou elektrodou (Monokrystaly Turnov, ČR) a pomocnou platinovou elektrodou.

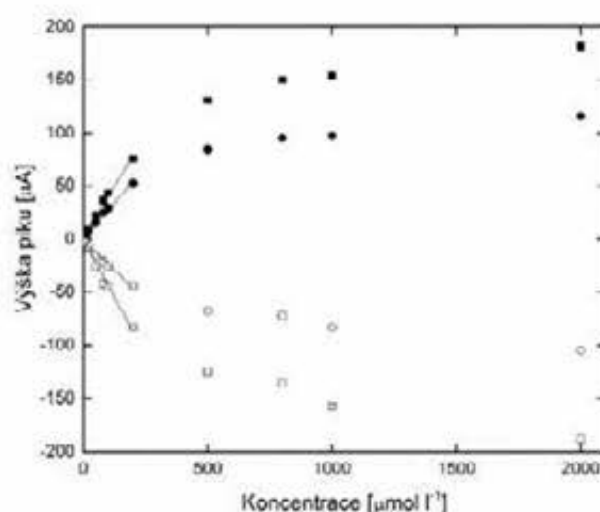
Jako mobilní fáze byl využit fosfato-acetátový pufr ve směsi s methanolem; zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním 2-amino-4-nitrofenolu (2A4NP) a 4-amino-2-nitrofenolu (4A2NP) v methanolu a ředěny na požadovanou koncentraci mobilní fázi.

### Výsledky a diskuse

Obsah methanolu v mobilní fázi byl pro účely optimalizace přizpůsoben vzájemné separaci obou analytů a byla zvolena poměr 30 % methanolu a 70 procent pufru. Vzhledem k disociovatelným skupinám ovlivňuje pH významně chromatografické chování látek a i tento

parametr byl proto přizpůsoben separačnímu a nikoliv detekčnímu kroku; používáno bylo pH 3. Za těchto podmínek byly naměřeny hydrodynamické voltamogramy obou látek v anodické i katodické oblasti potenciálů. V anodické oblasti je pozorovatelné zřetelně širší potenciálové okno než v oblasti katodické, umožňující rozvinout tvar voltametričeských vln analytů, zatímco v katodické oblasti interferuje odezva analytu již s koncem potenciálového okna; pozorovatelný je rovněž zvýšený šum, pravděpodobně související se zbytkovým obsahem kyslíku v mobilní fázi. Zvolený potenciál pro další měření je +0,8 V, respektive -0,8 V. Opakovatelnost měření je v případě obou analytů i oblasti potenciálů pod 3 % (RSD, n=10).

Koncentrační závislosti jsou lineární pouze v oblasti koncentrací pod 200  $\mu\text{mol/l}$ , jak lze vidět na Obr. 1. Meze stanovitelnosti jsou výrazně vyšší v případě katodického detekčního potenciálu, kdy dosahují okolo 10  $\mu\text{mol/l}$ , zatímco v případě anodického stanovení klesají až na přibližně 0,5  $\mu\text{mol/l}$ . Souhrn parametrů koncentrační závislosti je uveden v Tabulce I.



**Obr. 1.** Koncentrační závislosti 2A4NP (čtverec) a 4A2NP (kruh), získané při detekčním potenciálu +0,8 V (plný symbol) a -0,8 V (prázdný symbol). Kolona Gemini 5  $\mu\text{m}$  C18 110  $\text{\AA}$ , 150 x 4,6 mm, mobilní fáze fosfáto-acetátový pufr pH 3 : methanol (70:30, V/V). Lineární částí závislosti je proložena přímkou.

Závěrem byla ověřena možnost stanovit analyty v matrici moči. Zde se naopak výhodně uplatnila selektivita detekce v katodické oblasti potenciálů – při anodické detekci bylo, v důsledku interference s píky dalších látek, nutno modifikovat složení mobilní fáze a prodloužit analýzu, a ani potom nebyly interference zcela odstraněny.

#### Tabulka I.

Parametry koncentračních závislosti 2A4NP a 4A2NP při anodické a katodické detekci.

Analyt	2A4NP	2A4NP	4A2NP	4A2NP
Detekční potenciál, V	+0,8	-0,8	+0,8	-0,8
Lineární dynamický rozsah, $\mu\text{mol/l}$	1 – 200	5 – 200	1 – 200	5 – 200
Směrnice, nA	0,27	-0,22	0,39	-0,43
Úsek, nA	0,9	-2,1	1,4	-1,6
Korelační koeficient	0,9970	-0,9943	0,9965	-0,9945
Mez detekce, $\mu\text{mol/l}$	0,21	3,7	0,16	3,5
Mez stanovitelnosti, $\mu\text{mol/l}$	0,70	12,3	0,54	11,7

## **Závěr**

Výsledky experimentů ukazují na jedné straně větší selektivitu stanovení při použití katodických potenciálů, kde nízká četnost redukovatelných látek umožňuje použít jednodušší separační podmínky a předejit interferencím jiných látek, a na straně druhé nižší dosažitelné meze detekce při použití anodických potenciálů v důsledku nižšího šumu a širšího potenciálového okna. Obě metody lze nicméně použít pro stanovení metabolitů dinitrofenolu v moči v mikromolárních koncentracích.

## **Acknowledgments**

Tato práce vznikla s podporou projektu GAČR č. 17-03868S. Poděkování patří firmě Metrohm CZ za technickou i intelektuální podporu.

## **References**

1. Castaneda L.F., Walsh F.C., Nava J.L., Ponce de Leon C.: *Electrochim. Acta* 258, 1115 (2017).
2. Smith R.E.G., Davies T.J., Baynes N.D., Nichols R.J.: *J. Electroanal. Chem.* 747, 29 (2015)
3. Nidheesh P. V., Gandhimathi R.: *Desalination* 299, 1 (2012).
4. Davies T.J.: *Analyst* 141, 4742 (2016).
5. Wei W., Wu S.-G.: *Chinese J. Anal. Chem.* 47, e19014 (2019).
6. Dejmková H., Baroch M., Krejčová M., Barek J., Zima J.: *Appl. Mater. Today* 9, 482 (2017).
7. Dejmková H., de Araújo Daniel M.: *Monatsh. Chem.* 150, 439 (2019).

## Spectroelectrochemistry of Natural Porphyrins

Juraj Dian <sup>a</sup>, Ivan Jelínek <sup>b</sup>, Jindřich Jindřich <sup>c</sup>, and Jiří Mosinger <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Charles University Prague, Faculty of Mathematics and Physics, Department of Chemical Physics and Optics, Ke Karlovu 3, 121 16 Prague, Czech Republic,  
E-mail: Juraj.Dian@mff.cuni.cz

<sup>b</sup> Charles University Prague, Faculty of Sciences, Department of Analytical Chemistry, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

<sup>c</sup> Charles University Prague, Faculty of Sciences, Department of Organic Chemistry, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

<sup>d</sup> Charles University Prague, Faculty of Sciences, Department of Inorganic Chemistry, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

### Abstract

Optical and spectroelectrochemical study of protoporphyrin IX and hematoporphyrin in non-aqueous media is presented. Optical spectra of these porphyrins in various redox states in dimethylformamide were studied. Several aspects of spectroelectrochemical experiment and consequences for practical applications of selected porphyrins are discussed.

### Keywords

Protoporphyrin, hematoporphyrin, dimethylformamide, optical absorption, cyclic voltammetry, spectroelectrochemistry

### Introduction

Porphyrins and related tetrapyrrole macrocycles occur in many biological redox systems like photosynthetic apparatus or respiration chain <sup>1</sup>. Porphyrins exhibit characteristic optical spectra that yield information about the position of electronic molecular orbitals. The nature and reactions of various redox forms of many porphyrin-based redox systems have been the subject of many investigations <sup>2</sup>. Spectroelectrochemical methods offer techniques for the study of electronic levels via optical spectroscopy on the time scales approaching those of electrochemical experiment. In this study, we focused on the determination of optical spectra of selected porphyrin derivatives in various redox states and on solving some practical challenges of the spectroelectrochemical experiment.

### Experimental

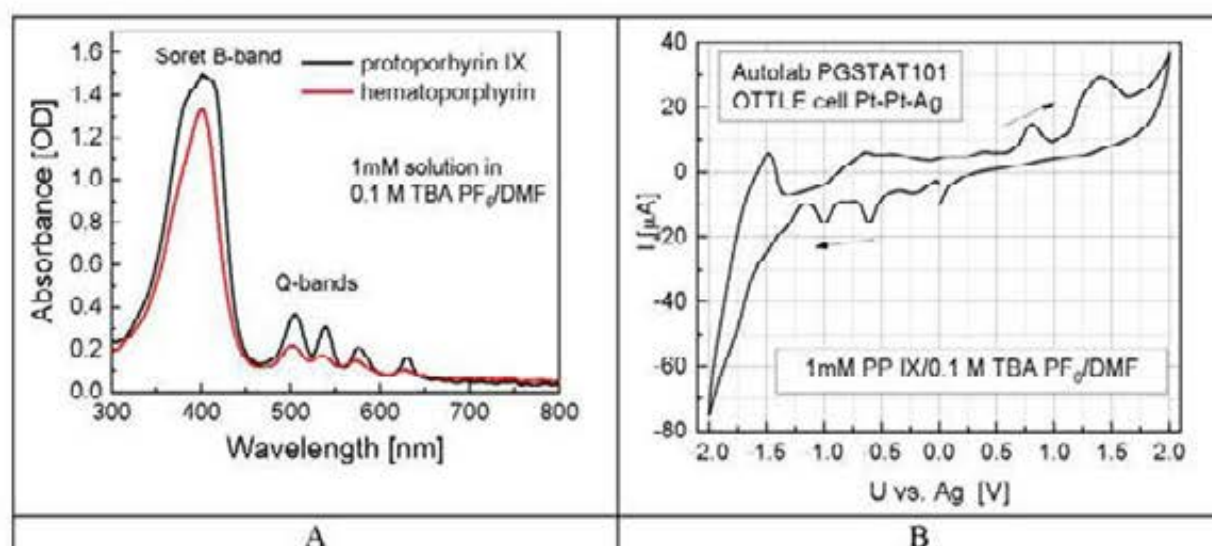
Protoporphyrin IX, hematoporphyrin and ferrocene were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification. N,N-dimethylformamide (DMF) was purchased from Sigma-Aldrich, dried under 4Å molecular sieves for about a week and then distilled using Schlenk techniques at about 20 Torr. Water content was controlled using Karl-Fischer 831 coulometer (Metrohm). Tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBA PF<sub>6</sub>) was used as a supporting electrolyte after drying in vacuum (~5 Torr) at 60°C for about 10 hours.

Optical spectra were measured using a fiber optics spectrometer Avantes ULS3648TEC with a halogen-deuterium lamp AvaLight DHc. Optical and spectroelectrochemical spectra were measured using room temperature Hartl type optical transparent thin-layer electrode (OTTLE) cell with platinum grid working and auxiliary electrodes and silver pseudo-reference electrode. The OTTLE cell was placed in a holder that fixed the propagation of the light beam through the grid working electrode. Cyclic voltammetry (CV) was performed using Autolab PGSTAT101 potentiostat, voltammetry at a scan rate of 2 mV/s. The CV and spectroelectrochemical experiment were controlled by the Nova 2.1 software. The potential of

Ag pseudoreference electrode was determined with 1 mM solution of ferrocene in 0.1 M supporting electrolyte.

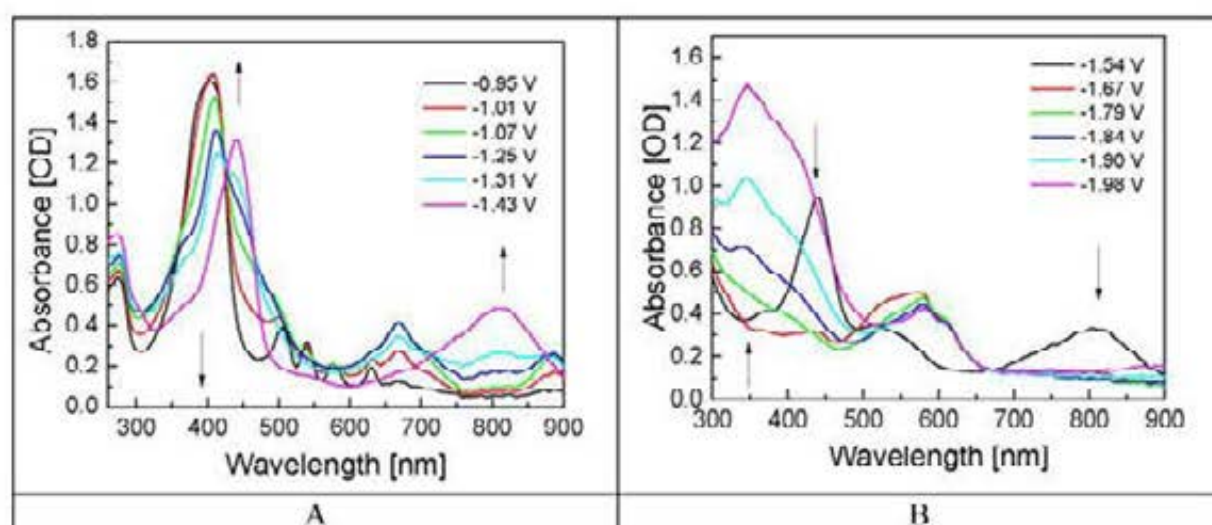
### Results and discussion

The optical spectrum of protoporphyrin IX and hematoporphyrin in DMF are in Fig. 1A. Spectra with a strong  $S_0 \rightarrow S_2$  Soret B-band at about 405 nm and four well-resolved  $S_0 \rightarrow S_1$  Q-bands in the spectral region 500-650 nm were observed. Cyclic voltammogram of 1 mM solution of protoporphyrin IX in 0.1 M TBA PF<sub>6</sub> is in Fig. 1B. The voltammogram indicates that the changes were not reversible most probably due to residual water in DMF<sup>3</sup>.



**Fig. 1.** A – Optical spectra of protoporphyrin IX and hematoporphyrin. B – Cyclic voltammogram of 1mM protoporphyrin IX in 0.1 M TBA PF<sub>6</sub> in DMF, scan rate 2 mV/s.

Optical spectra of porphyrin ring strongly depend on electronic levels shift during reduction and oxidation processes. Observed changes are presented in Fig. 2. Reduction of protoporphyrin ring started at about -0.6 V and the Soret band of  $\pi$ -anion radical was gradually shifted to about 440 nm (Fig. 2A). At potentials below -1.7 V this red-shifted peak disappeared and a new blue-shifted band at about 345 nm corresponding to dianion was observed (Fig. 2B).



**Fig. 2.** Optical spectra of protoporphyrin IX in supporting electrolyte of: A –  $\pi$ -anion radical during the first reduction step, B – dianion during the second reduction step.

The origin of four  $S_0 \rightarrow S_1$  Q-bands is described with a four-level Gouterman model<sup>4</sup>. The behavior of these bands was much more complicated, as the reduction process lowers the symmetry of the porphyrin ring. For  $\pi$ -anion radical we observed a fast replacement of four Q-bands with two Q-bands at about 540 and 810 nm (Fig. 2B) whereas further reduction to dianion resulted in a disappearance of 800 nm peak and in the visible region remained only one structured band at about 580 nm (Fig. 2B).

Optical absorption changes in the anodic region lead to the continuous restoration of the original shape of the spectrum with four Q-bands, and at about 1.2 V the absorbance value in the spectral maximum was restored. Further oxidation lead to the creation of  $\pi$ -cation radical and resulted in irreversible changes due to the presence of residual water<sup>3</sup> and porphyrin spectral pattern disappeared.

### Conclusions

Optical spectra and spectroelectrochemical behavior of protoporphyrin IX and hematoporphyrin in DMF were studied using OTTLE cell. Reversible changes in optical spectra at various electrode potentials enabled determination of optical spectra of  $\pi$ -anion radical and dianion of the studied porphyrin derivatives.

### Acknowledgments

Authors would like to thank prof. František Hartl and prof. Petr Štěpnička for fruitful discussions and valuable advice concerning spectroelectrochemistry and electrochemistry experiments in non-aqueous media and dr. Jan Fischer for the help with Karl-Fischer titration. Spectroelectrochemistry procedures in Nova software were developed with the help of Metrohm Czech Republic.

### References

1. Dolphin D.: *The Porphyrins, Vol. 1, Structure and Synthesis – Part A*, Academic Press, New York 1978.
2. Kadish K.M, Smith, K.M., Guillard R.(ed.): *The Porphyrin Handbook, Vol. 8, Electron Transfer*, Academic Press, San Diego 2000.
3. Saji T., Bard A.J.: *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 2235 (1977).
4. Gouterman M. in: *The Porphyrins, Vol. 3, Physical Chemistry – Part A*, (Dolphin, D., ed.), chapter 1, p. 1, Academic Press, New York 1978.



## Electrochemical Study of Selected G4 Ligands and their Interaction with Oligonucleotides

Daniel Dobrovodský<sup>a</sup>, Jana Malíková<sup>a</sup>, Aleš Daňhel<sup>a</sup>, and Miroslav Fojta<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic, E-mail: daniel.d@ibp.cz

### Abstract

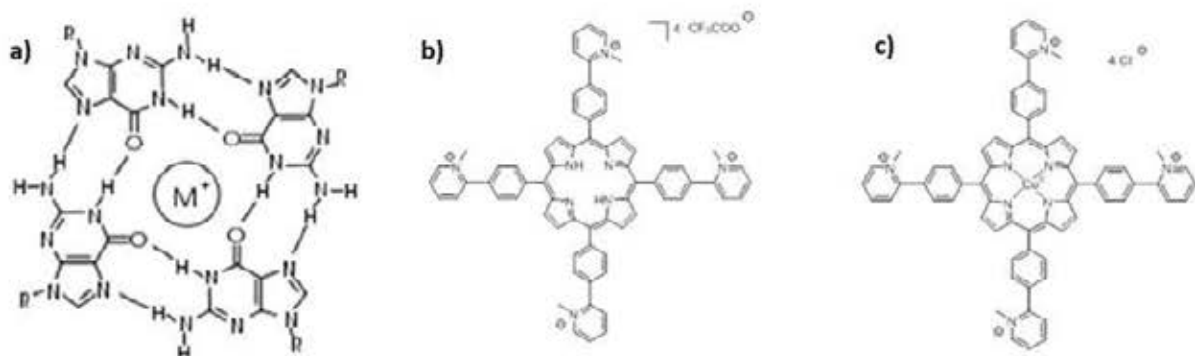
Porphyryns are a prominent class of ligands stabilising guanine quadruplexes (G4) in nucleic acids. Electrochemical behaviour of selected porphyryns (H<sub>2</sub>-MA and Cu-MA) was studied using cyclic voltammetry (CV) at hanging mercury drop electrode (HMDE). Dependences of the ligands on pH as well as electrode processes driving the electrochemical reactions have been observed. The amount of compound necessary for analysis was minimised by using the adsorptive transfer stripping technique (AdTS). The analysis of G4 forming and non-forming oligonucleotides in the solution of the ligand Cu-MA revealed changes in position and intensity of voltammetric signals of the porphyryn, suggesting interaction taking place.

**Key words:** G-quadruplex, Porphyryns, Cyclic voltammetry, Hanging mercury drop electrode.

### Introduction

Guanine quadruplex (G-quadruplex, G4) is a type of stable, non-canonical secondary structure present in nucleic acids. The basic building block of G-quadruplexes are square planar structures formed by four guanines called G-tetrads (Fig. 1. a), in which each guanine is both a donor and an acceptor of Hoogsteen hydrogen bonds. Stacking of at least two G-tetrads leads to formation of the four-stranded helical quadruplex structure<sup>1,2</sup>. These structures arise from nucleic acid sequence containing tracts of several guanines and can adapt a wide variety of topologies based on the number of contributing molecules (unimolecular, bimolecular or teramolecular), relative strand orientation (parallel/antiparallel), N-glycosidic bond orientation as well as the sequence itself which dictates the number of stacked tetrads and length, type and stability of loop regions<sup>3</sup>. An essential factor impacting the G-quadruplex formation, structure, topology and stability is the presence of cations. Most notably, these structures are stabilised by monovalent cations (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>) occupying the central cavity of the quadruplex<sup>4</sup>.

In genomic DNA, G-quadruplex forming sequences are particularly often represented in biologically relevant regions of the genome, namely in gene promoters and telomeres and thus play a role in key processes like gene expression and DNA transcription but are also often linked to disease or cancer phenotypes<sup>1,2</sup>. Consequently, targeting of G-quadruplexes by small molecules (G4 ligands) is a potential promising direction in cancer treatment<sup>5,6</sup>. G4 ligands are molecules containing several aromatic rings and often a coordinated metal atom that recognise quadruplexes through various binding modes<sup>6</sup>. Cationic porphyryns are well-known class of G4 ligands interacting with G-quadruplexes via external stacking<sup>7</sup>. Modification of the aromatic ring of porphyryns by a central coordinated metal ion can improve their binding specificity for G-quadruplexes<sup>8</sup>. In this work, two porphyryn ligands (Fig. 1. b, c), meso-5,10,15,20-tetrakis(4-(N-methyl-pyridinium-2-yl)phenyl)-porphyryn (H<sub>2</sub>-MA) and its newly synthesised copper(II) complex (Cu-MA) were studied by the means of cyclic voltammetry (CV) at hanging mercury drop electrode (HMDE). Interaction of the ligands with G-quadruplex forming oligonucleotide based on human telomeric sequence and its complementary oligonucleotide was also analysed.



**Fig. 1.** Structure of a G-tetrad with a monovalent cation  $M^+$  (a) and the studied G4 ligands H<sub>2</sub>-MA (b) and Cu-MA (c).

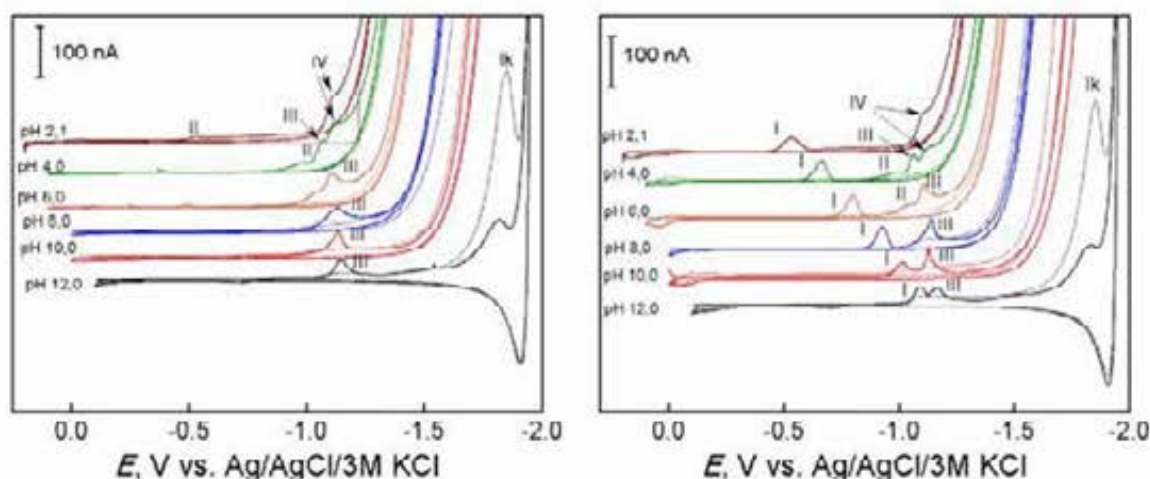
## Experimental

The studied porphyrins were provided by the research group of Dr. Genevieve Pratviel (Toulouse, France). As a base electrolyte for electrochemical measurements of the porphyrin G4 ligands Britton-Robinson (BR) buffer of various pH was used, prepared from a mixture of acidic solution ( $0.04 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$ ,  $0.04 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ ,  $0.04 \text{ mol l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH}$ ) and alkaline solution ( $0.2 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH}$ ). For all measurements using adsorption transfer stripping (AdTS),  $0.05 \text{ mol l}^{-1}$  sodium phosphate with  $0.3 \text{ mol l}^{-1}$  ammonium formate buffer pH 6.9 was used. All chemicals were supplied by Sigma-Aldrich. Human telomere sequence (hut-T2, (AGGGTT)<sub>3</sub>AGGG) and complementary sequence (hut-com, (CCCTAA)<sub>3</sub>CCCT) oligonucleotides were purchased from Eurofins Genomics.

All electrochemical measurements were carried out using potentiostat PGSTAT128N controlled by software Nova 2.1 (both Metrohm Autolab) in a standard three electrode system using HMDE as working electrode, Ag/AgCl/3M KCl reference electrode and platinum auxiliary electrode. The measurements were performed by CV in a potential window appropriate for each pH value with selected scan rate. AdTS of the porphyrins was performed by adsorption of the analyte from  $5 \mu\text{l}$  of sample for a selected time followed by CV (scan rate  $1 \text{ V s}^{-1}$ ) in the potential range (0.00 V; -1.85 V). Measurements of interaction of oligonucleotides with porphyrins were done by adsorption from  $1 \mu\text{mol l}^{-1}$  oligonucleotide solution for 3 minutes, resulting in full HMDE surface coverage, and CV measurement in a solution of the porphyrin after a short incubation period (15 – 60 s).

## Results and Discussion

The electrochemical behaviour of the G4 ligands H<sub>2</sub>-MA and Cu-MA was studied using CV at HMDE in BR buffer within the pH range from 2.1 to 12.0 (Fig. 2.). Reduction of both studied molecules offers analogous peaks II, III and IV at specific pH intervals and a catalytic peak I<sub>k</sub> present at pH 12. Characteristic for Cu-MA is the peak I, attributed to the reduction of  $\text{Cu}^{2+}$  from the complex. Based on the pH dependency measurements, peaks III for H<sub>2</sub>-MA and I and III for Cu-MA were recognised as the best developed and thus the most suitable for further analytical applications. Similarly, BR buffer pH 5 was selected for following studies.



**Fig. 2.** Cyclic voltammograms of the G4 ligand H<sub>2</sub>-MA (left) and Cu-MA (right, both 10 mol l<sup>-1</sup>) at HMDE in BR buffer pH 2.1, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0; scan rate 100 mV s<sup>-1</sup>.

To determine the driving forces controlling the electrode processes CV of both porphyrins was recorded at increasing scan rates from 20 to 2000 mV s<sup>-1</sup>. The process behind peak III of H<sub>2</sub>-MA was determined to be diffusion controlled up to 500 mV s<sup>-1</sup> and adsorption controlled at higher scan rates. In the case of Cu-MA, the peak III corresponds to an adsorption controlled process in the entire studied scan rate range and peak I corresponds to a diffusion controlled process for scan rates from 20 mV s<sup>-1</sup> to 1000 mV s<sup>-1</sup>. Because the scan rate dependence studies have shown that the electrode processes of both G4 ligands are affected by their adsorption on the HMDE surface, AdTS technique can be used for their analysis. Time of adsorption was optimised for both studied compounds in the range of 10 – 300 seconds. Full HMDE surface coverage by H<sub>2</sub>-MA was reached at 90 s but Cu-MA did not saturate the surface even at 300 s, likely as a result of adsorption in several layers.

Because of the easily analytically distinguishable peak I of Cu-MA, this ligand was selected for studies of porphyrin interaction with hut-T2 and hut-com oligonucleotides. When the G4-forming hut-T2 adsorbed on HMDE was incubated with the solution of Cu-MA, considerable, concentration dependent peaks of the ligand were observed among the intrinsic peaks of DNA. Most notably, the position of peak I was shifted by approximately 0.2 V towards more negative values, as a result of an interaction between the ligand and the G-quadruplex. With the complementary hut-com oligonucleotide, the potential shift of peak I was still present, suggesting that the DNA-ligand interaction is not entirely specific for G-quadruplexes. However, substantially lower peaks of the ligand were observed, which may offer a possibility to distinguish between the oligonucleotide capable to form a G-quadruplex or not.

### Conclusions

Basic electrochemical properties of selected G-quadruplex ligands were determined by CV at HMDE. Based on the discovered pH dependency of the analytes, optimal electrolyte pH and peaks best suited for analysis were determined. Because the studied electrode processes were found out to be adsorption controlled, AdTS technique was employed and optimised for the analysis of the ligands. Interaction of the ligand Cu-MA with oligonucleotides of interest was also studied. The ligand was observed to interact both with G-quadruplex and with single-stranded oligonucleotide, but these interactions are well distinguished by signal intensity of Cu-MA using proper interaction time.

### Acknowledgements

This work was supported by the project SYMBIT reg. no.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/15\_003/0000477 funded from European Regional Development Fund (EFRD)

### References

1. Lipps H. J., Rhodes D.: *Trends Cell Biol.* 19, 414 (2009).
2. Murat P., Balasubramanian S.: *Curr. Opin. Genet. Dev.* 25, 22 (2014).
3. Neidle S., Balasubramanian S. (ed.). *Quadruplex nucleic acids*. RSC Biomolecular Sciences, Cambridge 2006.
4. Bhattacharyya D., Arachchilage G. M., Basu S.: *Front. Chem.* 4, 38 (2016).
5. Neidle S.: *J. Med. Chem.* 13, 5987 (2016).
6. Ou T., Lu Y., Huang Z., Wong K., Gu L.: *ChemMedChem.* 3, 690 (2008).
7. Pratviel G.: *Coord. Chem. Rev.* 308, 460 (2016).
8. Romera C., Bombarde O., Bonnet R., Gomez D., Dumy P., Calsou P., Gwan J., Lin J., Defrancq E.: *Biochimie.* 93, 1310 (2011).

## Electrochemical Decolourization and Cleaning of Waste Water Containing Acid Blue 80

Libor Dušek and Gabriela Kuchtová

Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 95, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: libor.dusek@upce.cz

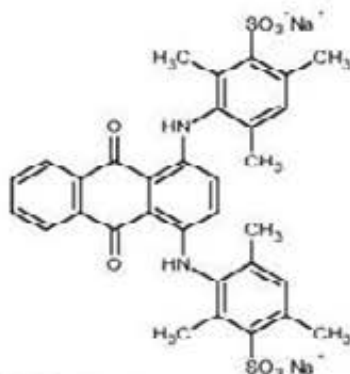
### Abstract

The aim of this work was to evaluate the possibility of bleaching effluents that contain aminoanthraquinone dye Acid Blue 80 by an indirect electrochemical oxidation in a single-chamber laboratory electrolyser. A suitable method for monitoring the effectiveness of decolourization of model wastewater containing Acid Blue 80 was UV-VIS spectroscopy. The changes in bleaching velocity of model solution were measured during electrochemical oxidation in dependence on the amount of auxiliary electrolyte, which was NaCl. Furthermore, decolourization rate was observed dependently on the voltage and current density, which was constant during each measurement. The influence of initial pH on decolourization rate was also assessed. The samples were taken at various time intervals corresponding to chromacity change of electrolyzed solution. Methods as TOC, TN, COD, and AOX were used for the analysis of samples

**Key words:** Acid Blue 80, Decolourization of wastewater, Indirect oxidation.

### Introduction

Synthetic anthraquinone dyes are widely used in various branches of the textile industry. Not only can they cause a considerable change in water appearance e.g.  $1\text{mgL}^{-1}$  of a dye is likely to cause a visible colorization of water, but also some serious health risks. As they usually present aromatic compounds with high stability under the sunlight and resistance to microbial attack, they are not degradable in conventional wastewater treatment plants. Therefore new treatment approaches like anodic oxidation are appealing<sup>1,2</sup>. The aim of this study was to investigate the decolourization and degradation of the anthraquinonic dye Acid Blue 80 (molecular structure of AB80 shown in Fig. 1) by indirect electrooxidation in model wastewaters in the presence of sodium chloride with the use of Pt anode and BDD anode.

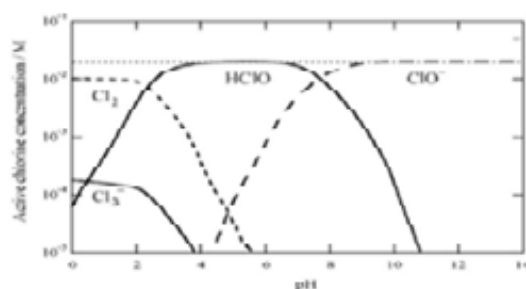


**Fig. 1.** Molecular structure of Acid Blue 80.

In this case a pollutant is attacked by an oxidizing agent generated in-situ by the anode. The most commonly used oxidizing agent is chlorine. However, the formation of the different chlorine-based active agents<sup>3,4</sup> is dependent on the temperature and also pH of the medium as it is shown in Fig. 2.

The use of Pt anode leads to high decolourization efficiency, but with very low decontamination, which is caused by a small quantity of hydroxyl radicals accumulated on its

surface. However this anode has a higher electrocatalytic power for oxidizing chloride ion therefore it can be used for the treatment of organic dye solutions mediated with active chlorine species <sup>5,6</sup>.



**Fig. 2.** Diagram describing concentration dependence of chlorine-based active agents on pH during electrooxidation at concentration of  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Active agents were generated in-situ via electrolysis of  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  solution of NaCl in a non-divided single-chamber electrolytic cell at  $t = 25^\circ\text{C}$  <sup>3</sup>.

On contrary, BDD anode produces high amounts of hydroxyl radicals. Several organic dyes have already been successfully degraded to elementary molecules with the use of this anode. In a few cases, the degradation was also studied in the presence of chlorine species, where the indirect oxidation also takes place and BDD is reported to be very efficient in generation of secondary oxidants <sup>7,8</sup>.

### Experimental

The athraquinone dye AB80 (the commercial name is Rybacid Blue 150) was supplied by Synthesia a.s. and it was used without further treatment. Sodium hydroxide and 0.1 M hydrochloric acid were of the highest purity available.

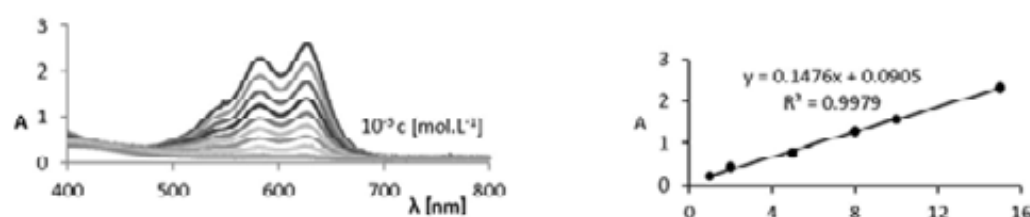
Electrochemical oxidation was carried out in the single-chamber laboratory electrolytic cell with the volume of 0.25 L at room temperature. The model wastewater was prepared by mixing distilled water, NaCl and AB80. The initial concentration of electrolyzed solutions was  $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $204 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). The anode of the electrolytic cell used for kinetic measurements was made of polished platinum (dimensions:  $10 \times 10 \times 0.4 \text{ mm}$ ) or BDD (dimensions:  $20 \times 20 \text{ mm}$ ), the cathode was made of austenitic stainless steel AISI 316 (CSS 17.346, dimensions:  $30 \times 3,5 \text{ mm}$ , composition: C 0.08%, Cr 16-18%, Ni 10-14%, Mn 2%, Mo 2-3%, P 0.045%, S 0.03% and Si 1%) with a declared corrosion resistance in sea water. The active area of the Pt anode, BDD anode and steel cathode was  $1 \text{ cm}^2$ ,  $4 \text{ cm}^2$  and  $6 \text{ cm}^2$  respectively at specified conditions. Stabilized DC Power Supply Matrix MPS-3005 L-3 was used for the electrolysis of the solution. The laboratory DC Power Supply provides voltage from 0 to 30 V and current from 0 to 5 A. For kinetic measurements the electrolytic cell was equipped with a closed circulation circuit composed of peristaltic pump PP1B-05, connecting tubes and 1 cm quartz flow cell which was located in the temperate block of UV-VIS spectrophotometer Libra S22. The electrolyzed solutions were stirred by magnetic stirrer Heidolph MR Hei-Tec (100 rpm). During the electro-oxidation the actual concentration of dyes was determined using UV-Vis spectrometer Libra S 22 according to Lambert-Beer law at the dye's maximum wavelength ( $\lambda_{\text{max}} = 627 \text{ nm}$ ). The determination of TOC, COD and AOX was carried out by standard analytical methods <sup>9, 10</sup>. The total organic carbon and total nitrogen was measured by Protoc® 300 analyser. The samples were taken after decolourization and after 6 hours of the analysis.

The cuvette tests for determination of chemical oxygen demand (LCK 314, HACH LANGE), thermostat LT 200 (HACH LANGE) and spectrophotometer DR 2800 (HACH LANGE) were used for the determination of COD. The samples were taken after decolourization and after 6 hours of the analysis. The COD value of solution dyes was established before and after the electrooxidation by the standard method determining the chemical oxygen consumption by potassium dichromate based on oxidation of organic substances by potassium dichromate in strongly acidic conditions of sulfuric acid in 2 hours, boiling at the temperature  $148^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

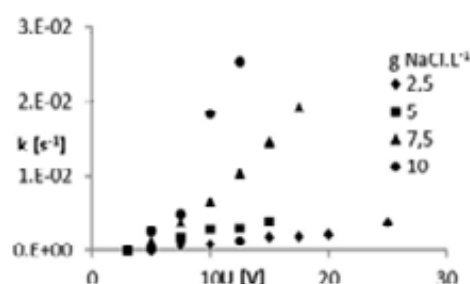
Adsorbable organohalogenic compounds were determined by AOX/TOX multi X® 2500 analyser. The samples were taken after decolourization and after 6 hours of the analysis. The sample was acidified with  $\text{HNO}_3$ . The adsorption of organic compounds was carried out by batch system on activated carbon (Analytik Jena, particle size 30-63  $\mu\text{m}$ ). The inorganic chlorides were removed by  $\text{NaNO}_3$  washing. Then the activated carbon was burned in an oxygen atmosphere at the temperature of  $950^{\circ}\text{C}$ . Incurred halohydrogens were determined by argentometry.

### Results and discussion

The wavelengths of absorption maxima of the dye AB80 had to be determined before kinetic measurements. For this purpose the UV-VIS spectra of aqueous solution was obtained and the wavelength of 627 nm was chosen for the calibration dependence of absorbance on concentration of the pure dye. The kinetics of indirect electrochemical oxidation was then monitored by UV/VIS spectroscopy in a closed circulation circuit, see Fig. 3.



**Fig. 3.** AB80 absorption spectra, concentration dependence, measured in distilled water,  $t = 25^{\circ}\text{C}$ .



**Fig. 4.** Dependency of observed kinetic constants on the amount of supporting electrolyte NaCl and constant voltage, measured in 0.25 L chamber with  $1\text{ cm}^2$  Pt anode,  $t = 25^{\circ}\text{C}$ .

#### *Influence of electrolyte concentration and voltage*

The conductivity of model wastewater was increased by relatively cheap sodium chloride, which is usually present in a dye bath for increasing the use of the dye. It also serves as a supporting electrolyte. The amount of sodium chloride in our experiments ranged from the mass concentration 2.5 to  $10.0\text{ g.L}^{-1}$ . Velocity of the decolourization process of the model dye solutions with concentration  $3 \cdot 10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$  was measured during the electrooxidation. The rate of decolourization was monitored with dependence on the concentration of sodium chloride 2.5; 5; 7.5 and  $10\text{ g.L}^{-1}$  and on the constant voltage of electrodes 3; 5; 7.5; 10; 12.5 V. In some

cases conditions allowed to increase the voltage to 15; 17.5; 20; 25 V. Results of these kinetic measurements are represented in Fig. 4. Generally, the oxidation rate decreases accordingly to the decrease of voltage and conductivity of the electrolyte, which corresponds to the amount of sodium chloride in the model wastewater.

#### *Influence of initial pH and anode material*

As different chlorine-based active agents are expected at various values of pH, decolourization of model waste waters containing anthraquinone dye AB 80 was carried out at initial pH ranging from 3 to 11. Applied current was held constant during measurement at the value 0.16 A and the responding voltage was  $10 \pm 3$  V. The current density was therefore 0.16 A for the Pt anode and 0.04 A for the BDD anode. Samples were collected right after decolourization and also at constant time 6 hours. In the next step parameters COD, AOX, TOC and TN were measured. The concentration of NaCl was almost 300 times higher than the concentration of AB80. Therefore we assumed that the concentration of oxidation agent would stay constant in the reaction and the reaction would follow pseudo-first order. We were then able to determine the kinetic constant of decolourization in dependence of pH for both platinum and BDD anode. Fig. 5a depicts negative logarithm of obtained constants accordingly to pH for BDD anode on the upper graph and platinum anode on the graph below. The highest rate of decolourization on BDD electrode was obtained at pH range from 4 to 9, with its peak toward 4. On the other hand the optimum pH for bleaching velocity for Pt anode was around 6. In all cases was the total decolourization had been reached within 1 hour, demonstrating the effectiveness of indirect oxidation. Initial values of COD and TOC were  $270 \text{ mg L}^{-1}$  and  $107 \text{ mg L}^{-1}$  respectively. Obtained values for pH 3, 5, 7, 9, 11 were much more influenced by the type of electrode and the time of electrolysis rather than initial pH.

#### *Influence of current density*

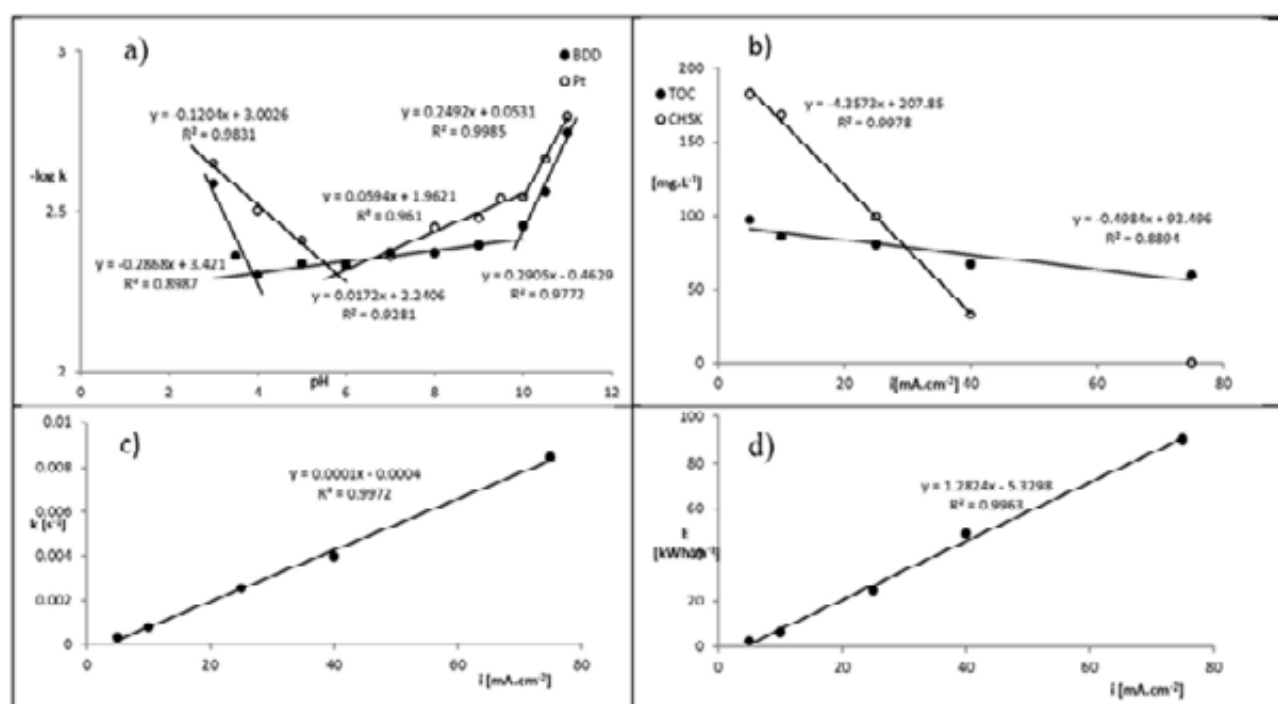
Current density is one of the parameters highly influencing electrical consumption. Therefore the proportion between expenses and outcome of electrolysis should be well considered. The decolourization rate was established for current density 5, 10, 24, 40 and  $75 \text{ mA cm}^{-2}$  on BDD anode. The linear relationship between current density and kinetic constant as well as obtained parameters of COD and TOC after 6 hours of galvanostatic electrolysis are shown in Figure 6. Increase in current density generally yielded higher COD and TOC removal with no significant differences in AOX formation. The concentrations of AOX were about  $3.8 \pm 1.6 \text{ mg L}^{-1}$  in the case BDD anode after decolourization model water and about  $4 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$  if Pt anode was used. The responding electric consumption ranged from 2 to  $90 \text{ Wh.m}^{-3}$ , which does indicate diversity in costs for electrochemical treatment.

#### **Conclusions**

The decolourization and degradation of AB80 can be affected by many criteria. We evaluated influence of voltage, NaCl concentration, initial pH, current density and electrode material. Platinum anode represented active electrode and BDD non-active type of electrode. No significant differences were found between the COD, TOC, TN and AOX cured for the same time on the same anode at different pH. We concluded that the type and the time of electrolysis influenced these parameters much more than the initial pH. BDD anode in comparison with Pt anode performed noticeably higher COD removal, corresponding to 15-20%. The decrease of value TOC and TN, after 6 hours of electrolysis, favoured also BDD anode. This could be explained by the different mechanism of oxidation on various electrode materials [1]. The BDD anode interacts less with arising radicals and favours formation of oxy-chloro radicals thus possess higher oxidising power. The best performance of BDD electrode was obtained at pH range from 4 to 9, with its peak toward 4. On the other hand the optimum



pH for decolourization velocity for Pt anode was at 6. This correlates the formation of the strongest form of active chlorine which is hypochlorous acid ( $E_0 = 1.49$  V vs. SHE) rather than chlorine ( $E_0 = 1.36$  V vs. SHE) or perchlorate ( $E_0 = 0.89$  V vs. SHE) formed in alkaline media. The highest rate of colour removal was in both cases lower than 7.5 (pKa of HClO), supporting the assumption that the high concentration of HClO contributes to the oxidation rate. The amount of oxidising agents corresponds to the amount of sodium chloride in the model wastewater, therefore the oxidation rate increase accordingly to the concentration of sodium chloride in the model wastewater and also by applied voltage. Furthermore current density influences not only the velocity of the reaction but also abatement of COD and TOC parameters. The proper conditions should be adjusted to wanted outcomes in consideration of economical possibilities. However, the presence of AOX indicates that after decolourization the additional purification procedures e.g., reductive dehalogenation, adsorption or photocatalysis should be involved. In conclusion, indirect oxidation on both BDD and Pt anode is suitable for effective decolourization in a primary treatment of wastewater.



**Fig. 5** a) Influence of initial pH on kinetic constants, measured for electrochemical decolourization of AB80 ( $c_0 = 3 \cdot 10^{-4} M$ ) on BDD and Pt anode in the presence of supporting electrolyte NaCl ( $c_0 = 5 g L^{-1}$ ),  $V = 0.25 L$ ,  $t = 25 ^\circ C$ ,  $\lambda = 627 nm$ , b) Results of analysis TOC and COD after 6 hours of indirect electrochemical oxidation AB80 on BDD anode without pH adjustment, c) Dependence of the observed kinetic constants on current density,  $t = 25 ^\circ C$ ,  $V = 0.25 L$  and concentration NaCl  $5 g L^{-1}$ , d) Dependence of electrical consumption on current density,  $t = 25 ^\circ C$ ,  $V = 0.25 L$  and concentration NaCl  $5 g L^{-1}$ .

#### Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Project No. SGS\_2019\_001).

#### References

1. Martínez-Huitle C., Brillas E.: Appl. Catal., B 87, 105, (2009).
2. Bianco P. A.: Environ. Sci. Technol. 35, 971, (2001).
3. Martínez-Huitle C., Ferro S.: Chem. Soc. Rev. 35, 1324, (2006).
4. Dušek L., Vystrčilová B., Novotný L.: Chem. Listy 106, 1054 (2012).
5. Lopez G. V., Gutiérrez M. C.: Chemosphere 62, 106 (2006).

6. Vlyssides, A., Loizidou M, Karlis P. K, Zorpas A. A, Papaioannou D.: *J. Hazard. Mater.* 70, 41 (1999).
7. Jalife-Jacobo H., Feria-Reyes R., Serrano-Torres O., Gutiérrez-Granados S., Peralta-Hernández J. M.: *J. Hazard. Mater.* 319,78 (2016).
8. Garcia-Segura S., Ocon J., Chong M.: *Process Saf. Environ. Prot.* 113, 48 (2018).
9. ČSN EN ISO 9562 (757531) *Jakost vod - Stanovení adsorbovatelných organicky vázaných halogenů (AOX)*. ČNI Praha, 1995.
10. *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater*. 21<sup>st</sup>. ed. APHA, AWWA and WEF, Washington, 2005.
11. Bezerra Rocha J.H., Soares Gomes M.M., Vieira dos Santos E., Martins de Moura E. C., Ribeiro da Silva D., Quiroz M. A., Martínez Huitle C.A.: *C.A.: Electrochim. Acta* 140, 419 (2014).

## Analytical Method to Evaluate Taurine in Energy Drinks after *o*-Phthalaldehyde-Ethanthiol Derivatization Using Square Wave Voltammetry

Amir Shaaban Farag, Jitka Klikarová, Milan Sýs, and Karel Vytřas

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic,

E-mail: st56093@student.upce.cz

### Abstract

A completely new voltammetric method has been developed for quantitative determination of food additive Taurine (Tau) in energy drinks. This electroanalytical method is based on voltammetric oxidation of *o*-phthalaldehyde-ethanthiol derivative of Tau at glassy carbon electrode in 95% methanol containing 0.1 mol L<sup>-1</sup> lithium perchlorate. Working conditions necessary for quantitative Tau derivatization reaction and electrochemical detection using square wave voltammetry were optimized. Linear range from 1.0×10<sup>-5</sup> to 1.0×10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> characterized by coefficient of determination 0.9998, limits of quantification 6.81×10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> and detection 2.07×10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> were obtained at pulse amplitude 50 mV and frequency 80 Hz. Analytical method of calibration curve was used for monitoring of Tau in several commercially available energy drinks. The procedure was validated using standard reference high performance liquid chromatography (HPLC) method.

**Key words:** Food analysis; Derivatization; Energy drinks; Glassy carbon electrode; Taurine; Square wave voltammetry.

### Introduction

Recently, energy drinks have become very popular among teenagers and represent a significant percentage of non-alcoholic beverages sales <sup>1</sup>. They increase awareness <sup>2</sup>, alertness, physical and mental performance of humans <sup>3</sup>. Taurine (Tau) together with caffeine <sup>1</sup>, several vitamins of B group, sugars and other ingredients such as tyrosine, citicoline and extract of guarana (*Paullinia cupana*) belong to fundamental ingredients of energy drinks. As known, these compounds stimulate brain activity, memory and attention.

Numerous voltammetric methods have been developed for monitoring of mentioned biological organic compounds <sup>4,5</sup>. However, none of them focused on Tau determination which is natural, organic <sup>6</sup>, sulfuric, non-proteinogenic <sup>6,7</sup>, non-essential β amino acid <sup>7</sup>, but essential only for cats <sup>1</sup>. From chemical point of view, it has carboxyl group replaced by sulfonic acid.

Although Tau is the main component (usually 0.4% content; w/w) of all energy drinks <sup>1</sup>, it can be also found in biological fluids and mammalian tissues in low concentration levels. Tau is biosynthesized by decarboxylation of methionine or cysteine followed by oxidation of its thiol group <sup>6-8</sup>.

Tau plays an important role in many significant physiological processes in living organism due to its anti-inflammatory and antioxidant effects. Furthermore, it protects against many kidney and cardiovascular diseases <sup>7</sup>, growth retardation, ischemia reperfusion injury, sepsis, diabetes mellitus, epilepsy (including other seizure diseases) and several kinds of cancer. Several psychological effects are engaged to Tau presence such as diminishing of depression, trauma and schizophrenia <sup>6</sup>.

It contributes to osmotic regulation and membranes stabilization, detoxication of livers by binding to harmful substances. Tau aids in cholesterol transformation to bile acids, which causes decreasing of low-density lipoproteins (LDL) in the blood<sup>8</sup>. Further, it indirectly improves strength of bones by increasing production of alkaline phosphatase binding to osteopontin. Utilization of fats and proteins to form and maintain muscles is enhanced with its presence<sup>1,8</sup>.

### Experimental

Analytical standard of >98% taurine, 98% phenylisothiocyanate, ≥99% o-phthalaldehyde, ≥97% ethanethiol, 99.99% lithium perchlorate, 99% sodium tetraborate and ≥99% boric acid were purchased from Sigma Aldrich (Prague, Czech Republic). Other reagents such as methanol (gradient grade), 99.8% triethylamine, sodium acetate (p.a.), ≥99% ammonium acetate, sodium hydroxide (p.a. grade) and 96% ethanol were purchased from Lach Nér, s.r.o. (Neratovice, Czech Republic). Ultrapure water obtained by passing of the already deionized water through a purification unit Milli Q system from Merck Millipore (Darmstadt, Germany) was used throughout the experimental work. In the prepared solutions, values of pH were determined at pre-calibrated pH meter from Metrohm (Prague, Czech Republic). All electrochemical measurements were carried out at conventional three electrodes arrangement consisting always one of the working electrodes tested, together with the reference (Ag/AgCl/3.0 mol L<sup>-1</sup> KCl) and auxiliary electrode (Pt-wire). Mentioned setup was connected to a potentiostat PGSTAT101 from Metrohm (Prague, Czech Republic) operating with Nova software. The modification of GCE surface was made by addition of 10 μL dispersion of CNTs (2 mg mL<sup>-1</sup> in 1% Nafion<sup>®</sup> neutralized by 8% ammonia solution) and left to dry at laboratory condition for 30 min. Corresponding dispersions were prepared using ultrasonic bath for minimally 10 min.

### Results and Discussion

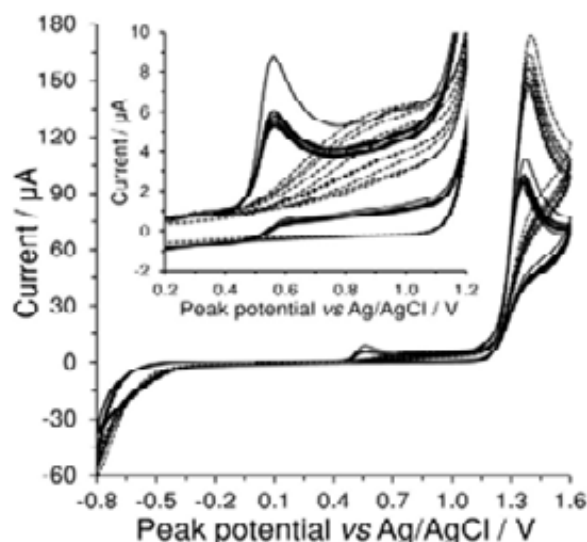
Tau represents an electrochemically low-active amino acid. For potential range from -0.8 to +1.6 V, no voltammetric peak was obtained at GCE in the first cycle. As shown in Fig. 1S (belonging to the Supplementary materials), it was confirmed that Tau provides two broad oxidation peaks at +1.083 and +1.314 V within repetitive cyclic voltammetry. Their peak current responses increase with number of cycles, indicating an electrochemically controlled polymerization reaction. Resulting polymer has been used for development of poly(taurine) film-based voltammetric sensors. Initially, there was idea to utilize this polymeric reaction to develop adsorptive stripping voltammetric method, but it was unsuccessful.

On the other hand, OPA-EtSH-Tau derivative provides one irreversible oxidation peak at +0.554 V. Moreover, it was found that derivatizing agent (OPA with EtSH) also provides very sensitive oxidation peak at +1.41 V. After some addition of Tau, an evident decreasing of its peak current response was observed (Fig. 1). It seems that both oxidation peaks could be used for analytical purpose. However, the firstly mentioned oxidation peak was chosen for determination of Tau in selected energy drinks because an interference of electroactive accompanying substances (pyridoxine and caffeine) is excluded.

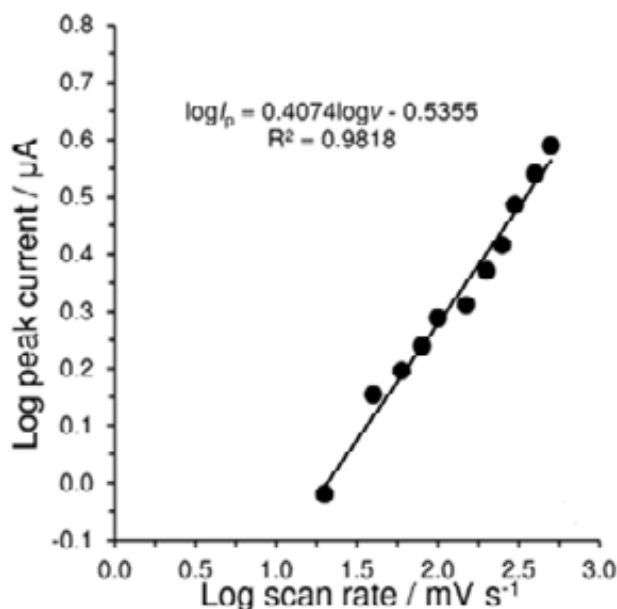
The effect of scan rate ( $\nu$ ) on OPA-EtSH-Tau derivative oxidation peak in the range from 20 to 500 mV s<sup>-1</sup> was investigated. Linear relationship between peak current ( $I_p$ ) and square root of scan rate ( $\nu^{1/2}$ ) was described by equation  $I_p(\mu\text{A}) = -0.1551\nu^{1/2} + 0.3135$  and correlation coefficient ( $R^2$ ) 0.9846 (Fig. 2SA). Additionally, it was found that also logarithm of oxidation peak current ( $\log I_p$ ) linearly ( $R^2=0.9818$ ) increased with logarithm of scan rate ( $\log \nu$ ).

Calculated slope (k) value 0.4074, which is close to the theoretical value 0.500 shows (Fig. 2) that diffusion-controlled electrochemical oxidation reaction, can be accepted.

The derivatization reaction was characterized using ultraviolet spectrophotometry from 400 to 200 nm. A single absorption band was obtained at 250 nm for derivatizing agent (mixture of OPA and EtSH in pure methanol). After addition of Tau, completely new bands at maximums 226 and 328 nm were observed.



**Fig. 1.** Repetitive (10 cycles) cyclic voltammetry of  $3.7 \text{ mmol L}^{-1}$  OPA with  $7.1 \text{ mmol L}^{-1}$  EtSH mixture (dashed) and their  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  Tau derivate (solid line) performed in 95% methanol containing  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  at potential step 5 mV and scan rate  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Fig. 2.** Kinetic study of derivative resulting from reaction of  $500 \text{ μmol L}^{-1}$  Tau with  $0.45 \text{ mmol L}^{-1}$  OPA and  $0.86 \text{ mmol L}^{-1}$  EtSH for six minutes at  $25^\circ\text{C}$ .

The performance of the proposed voltammetric method was studied at optimal conditions for derivatization reaction and proper SWV parameters. Limits of quantification (LOQ) and detection (LOD) were calculated according to the equations  $\text{LOQ} = 10s/k$  and  $\text{LOD} = 3s/k$ , respectively, where  $s$  is the standard deviation of minimally ten repetitions ( $n=10$ ) of chosen

concentrations  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  Tau ( $I_p=1.464\pm 0.056 \mu\text{A}$ ; presented as arithmetic mean and corresponding standard deviation) and  $k$  represents the slope of calibration curve from 10 to  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  Tau. Precision of developed voltammetric method was evaluated using above-mentioned repetitive measurement. Value 3.8% of relative standard deviation (RSD) was determined. Linear dependence was characterized with equation  $I_p(\mu\text{A})=0.0822.c(\mu\text{mol L}^{-1})-0.2159$  and coefficient of determination ( $R^2$ ) 0.9998 (Fig. 4). Values  $6.81 \mu\text{mol L}^{-1}$  of LOQ and  $2.07 \mu\text{mol L}^{-1}$  of LOD were calculated. Moreover, if calibration curve is prolonged up to  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  Tau, equation  $I_p(\mu\text{A})=0.0745c(\mu\text{mol L}^{-1})+0.1293$  with  $R^2=0.9965$  will be achieved.

Laboratory protocol of reference chromatographic method had to be validated before the analysis of energy drinks. Under described conditions, it was necessary to determine a time needed for quantitative pre-column derivatization reaction of Tau with PITS. It was found that a size of peak area for resulting PITS derivative of Tau obtained at retention time ( $t_r$ ) 2.7 min does not increase after 20 min and for that reason, this time was chosen as optimum. Fig. 6 shows typical chromatograms obtained during validation of reference RP-HPLC method with the appropriate calibration curve which is described by the equation  $A(\text{mAU})=0.7493c(\mu\text{mol L}^{-1})-0.2581$  and  $R^2=0.9982$ . Precision of the reference method was determined (2.9% RSD) using repeated measurements ( $n=10$ ) of  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$  Tau. Accuracy describing a difference between determined and true analyte content was characterized using calculation of recovery for concentration of  $320 \mu\text{g mL}^{-1}$  Tau. A satisfactory value 102.1% of recovery has been achieved.

### Conclusions

Finally, it can be concluded that a simple and rapid electroanalytical method for Tau determination in commercial energy drinks has been developed. This method is based on direct voltammetric oxidation of OPA-EtSH-Tau derivative at GCE in 95% methanol containing  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  as supporting electrolyte. This method was also compared with the reference RP HPLC method utilizing Tau pre-column derivatization with PITS with spectrophotometric detection. As well, it could find its application in the routine food analysis for small laboratories which cannot afford to acquire chromatographic instrumentation.

### Acknowledgment

The support received from the Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice (project No. SGS-2018-001) is gratefully acknowledged.

### References

1. Tampu R., Finaru A., Elfakir C.: *Sci. Stud. Res.* **19**, 23 (2018).
2. Vochyánová B., Opekar F., Tůma P.: *Electrophoresis* **35**, 1660 (2014).
3. Nguyen T.D., Nguyen M.H., Vu M.T., Duong H.A., Pham H.V., Mai T.D.: *Talanta* **193**, 168 (2019).
4. Švorc L.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **8**, 5755 (2013).
5. Brunetti B., Desimoni E.: *J. Food Compos. Anal.* **33**, 155 (2014).
6. Revenga-Parra M., Martínez-Periñán E., Moreno B., Pariente F., Lorenzo E.: *Electrochim. Acta* **240**, 506 (2017).
7. Hasanzadeh M., Javidi E., Jouyban A., Mokhtarzadeh A., Shadjou N., Mahboob S.: *J. Mol. Recognit.* **31** (2018).
8. Kominkova M., Horky P., Cernei N., Tmejova K., Ruttkay-Nedecky B., Guran R., Pohanka M., Zitka O., Adam V., Kizek R.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **10**, 1716 (2015).

## Voltammetric Determination of Anthraquinone-2-sulfonate at a Boron-Doped Diamond Electrode

Jan Fischer<sup>a</sup>, Adamantia Apostolopoulou<sup>b</sup>, Anastasios Economou<sup>b</sup>, and Jiří Barek<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic, E-mail: jan.fischer@natur.cuni.cz

<sup>b</sup> University of Athens, Department of Chemistry, Laboratory of Analytical Chemistry, Athens 15771, Greece, Email: aeconomou@chem.uoa.gr

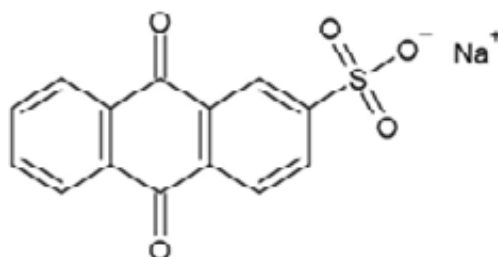
### Abstract

In this contribution a DP voltammetric method for the determination of anthraquinone-2-sulfonate (AQS) at boron doped diamond electrode (BDDE) is presented. Optimal conditions were found for its determination in Britton-Robinson buffer pH 6 within the concentration range from 3 to 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Polishing of electrode surface before each series of measurements was used to obtain acceptable repeatability of results.

**Key words:** Anthraquinone-2-sulfonate, Boron doped diamond electrode, Voltammetry.

### Introduction

Anthraquinones constitute the largest group of natural pigments; hundreds of these compounds were isolated from plants, while the rest were isolated from lichens and fungi. They have remarkable bioactive properties. Some of these compounds stand out because of their anticancer, antitumor, antiinflammatory, antiarthritic, antifungal, antibacterial, and antimalarial activities. There are, currently, four DNA-intercalating compounds derived from anthraquinones approved by the Food and Drug Administration (FDA) for clinical use: daunorubicin, doxorubicin, mitoxantrone, and amsacrine.<sup>1</sup> AQS, a water-soluble derivative of anthraquinone, was selected as a precursor of these anticancer drugs.<sup>2</sup> The quinone group in the structure can be easily reduced and therefore, electrochemical techniques can be used for its analytical determinations.<sup>3</sup> In contrast to other conventional carbon and metal based electrodes, boron doped diamond has been generally reported to exhibit significant resistance to electrode fouling, which is of particular advantage in electroanalytical applications, where adsorption to the electrode is a frequent reason for electrode failure.<sup>3</sup>



**Fig. 1.** Chemical structure of sodium anthraquinone-2-sulfonate (AQS).

### Experimental

A stock solution of 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  sodium anthraquinone-2-sulfonate (AQS, CAS number: 131-08-8; Merck, Germany) was prepared by dissolving the substance in ultra-pure deionized water. Voltammetric experiments were performed using computer controlled potentiostat Eco-Tribo Polarograph (Polaro Sensors Praha, Czech Republic). The working electrode was BDDE (Windsor Scientific LTD D-670-SA) with diameter 3 mm, reference electrode was Ag|AgCl|3 mol L<sup>-1</sup> KCl, and auxiliary electrode was platinum wire. Before measurement the

BDDE surface was polished with  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Measurements were carried out at a scan rate of  $20 \text{ mV s}^{-1}$ , pulse amplitude of  $-50 \text{ mV}$ , pulse duration of  $100 \text{ ms}$ , sampling time of  $20 \text{ ms}$  beginning  $80 \text{ ms}$  after the onset of the pulse, and interval between pulses of  $100 \text{ ms}$ . Limits of quantification (LOQ) were calculated as a concentration corresponding to a tenfold of a standard deviation of ten subsequent measurements at the lowest measurable concentration.

### Results and discussion

DP voltammetric properties of AQS were explored in Britton-Robinson buffer medium. The compound gave one peak in the range from  $-0.7 \text{ V}$  to  $-1.0 \text{ V}$  according to given pH from 2 to 12. The signal was highest at pH 6 and decreased with shift of pH to higher or lower values. Therefore, pH 6 was selected as optimal for analytical application.

Interaction between analyte, matrix or products of electrochemical reaction and solid electrode surface is common effect. Therefore, we have tested signal stability for 10 consecutive measurements in high concentration of AQS, namely  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ . We have observed increase of signal to 120% of initial value after 10 consecutive measurements. Therefore, we have polished working electrode surface with  $\text{Al}_2\text{O}_3$  before each series of 5 measurements which resulted in practically constant signal. Under these conditions, the calibration dependence was explored in the range from 1 to  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Highest concentration  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  deviated from linear dependence, but difference was on acceptable level (see Fig. 2) LOQ being  $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ . All parameters of calibration dependence are summarized in Table 1.

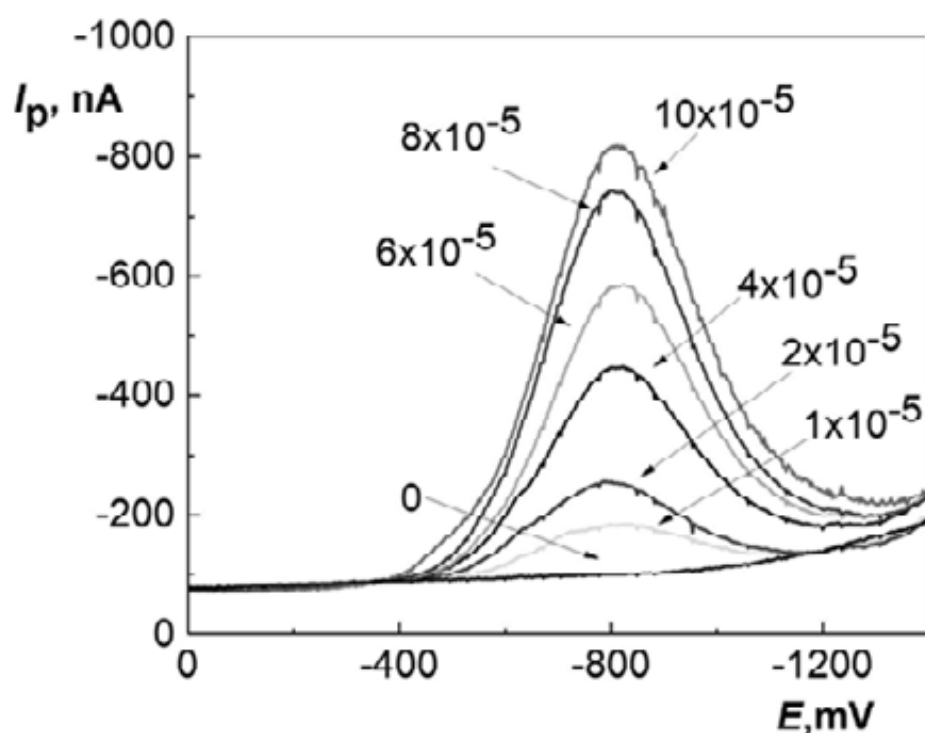


Fig. 2. DP voltammograms of AQS with concentration (1–10)  $10^{-5} \text{ M}$  (denoted next to curves) at BDDE in Britton-Robinson buffer pH 6. The electrode was polished before every first measurement in series of five measurements with  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .



**Table I.**

Parameters of AQS calibration straight lines measured by DPV at BDDE in Britton-Robinson buffer pH 6. The electrode was polished before every first measurement in series of five measurements with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

concentration, μmol L <sup>-1</sup>	slope, nA L μmol <sup>-1</sup>	intercept, nA	corr. coeff.	LOQ, μmol L <sup>-1</sup>
10–100	-7.02±0.30	-4.7±17.9	0.9911	-
1–10	-5.27±0.25	-4.5±1.5	0.9885	3.2

### Conclusions

The newly developed method proves the applicability of BDDE for the cathodic determination of anthraquinone based compounds. Pre-treatment of boron bopped surface seems to be a necessary step to received repeatable results.

### Acknowledgements

This research was supported by the Czech Science Foundation (project 17-03868S). We thank to Metrohm CZ (<https://www.metrohm.com/cs-cz>) for efficient technical, material and intellectual support.

### References

1. Diaz-Munoz G., Miranda I. L., Sartori S. K., de Rezende D. C., Diaz M. A. N., Anthraquinones: An Overview, in: *Studies in natural products chemistry*. (Rahman A., ed.) Elsevier, Amsterdam; New York, 2018.
2. Skalova S., Navratil T., Berek J., Vyskocil V.: *Monatsh. Chem.* *148*, 577 (2017).
3. Fischer J., Dejmekova H., Berek J.: *Curr. Org. Chem.* *15*, 2923 (2011).
4. Shpilevaya I., Foord J. S.: *Electroanalysis* *26*, 2088 (2014).

## Mercury Electrodes in Biomacromolecule Research of 21<sup>st</sup> Century: Still Unbeatable? (Rtuťové elektrody ve výzkumu biomakromolekul v 21. století: stále nedostižné?)

Miroslav Fojta

Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, 612 65 Brno,  
Czech Republic, E-mail: fojta@ibp.cz

*Věnováno památce profesora Emila Palečka (\*3. 10. 1930 – †30. 10. 2018).*

### Abstract

The invention of polarography and early application of electroanalytical methods, including discoveries of electrochemical activities of proteins and nucleic acids, are inherently connected with mercury electrodes. Despite massive development and application of solid electrodes, the mercury ones keep their uniqueness up to present time, particularly in the areas of (a) structure sensitive analysis of nucleic acids and proteins, and (b) utilization of catalytic hydrogen evolution processes in the presence of natural peptides and proteins, thiol compounds, chemically modified nucleic acids and newly also sulfated carbohydrates, amino sugars, as well as unmodified nucleic acids. In spite of recently reported extension of the working window of carbon electrodes towards the range of highly negative potentials (to allow detection of nucleobase reduction) it appears that mercury electrodes hold their position in electrochemical studies of biomacromolecules.

**Key words:** Mercury electrodes, Graphite, Boron doped diamond, Nucleic acids, proteins, Carbohydrates, Glycoproteins, Redox labeling, Catalytic hydrogen evolution.

### Úvod

V letošním roce si připomínáme 60. výročí udělení Nobelovy ceny prof. Jaroslavu Heyrovskému za vynález polarografie. Tato metoda je úzce spjata s kapající rtuťovou elektrodou (DME) a jejími unikátními vlastnostmi, mezi které patří dokonalá obnovitelnost, atomárně hladký povrch a – díky vysokému přepětí vylučování vodíku – široké negativní potenciálové okno v protických rozpouštědlech. Tyto vlastnosti předurčují rtuťové elektrody k aplikacím v oblasti analýzy nejen jednoduchých anorganických iontů, ale i redukovatelných organických látek a také biomakromolekul, v jejichž případě je práce ve vodném prostředí nezbytností. První práce zabývající se polarografií proteinů se objevily již koncem dvacátých let minulého století (ve spojení se jmény Jaroslava Heyrovského a Rudolfa Břidčky), tedy relativně krátce po objevu polarografie samotné (1922). Ve druhé polovině padesátých let pak byla Emilem Palečkem objevena elektrochemická aktivita nukleových kyselin (NK). Prakticky až do sedmdesátých let byl elektrochemický výzkum v oblasti těchto biopolymerů spojen se rtuťovými elektrodami, ať již v podobě DME nebo se stacionární visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE) využívanou ve voltametrickém režimu (přehledně např. v <sup>1,2</sup>). Teprve později začala éra širokých aplikací tuhých elektrod, např. zlatých (mj. v oblasti proteinů obsahujících neproteinové redoxní centra) a zejména uhlikových, které jsou vhodné pro detekci oxidace jak bází NK, tak některých aminokyselin v proteinech (pro tyto účely se rtuťové elektrody z principiálních důvodů nehodí – potenciály oxidace zmíněných látek jsou vesměs pozitivnější než potenciál anodického rozpouštění rtuti).

V roce 2004 publikoval autor toho příspěvku přehledný článek o využití rtuťových elektrod v oblasti studia NK <sup>3</sup>. Zde prezentované mikro-review je věnováno využití unikátních vlastností rtuťových elektrod ve výzkumu biopolymerů na Biofyzikálním ústavu AV ČR zejména v uplynulých patnácti letech.

### **Nukleové kyseliny**

Výše zmíněné vlastnosti rtuťových elektrod umožňují měření elektrochemických signálů spojených s ireverzibilní redukcí některých nukleobází, jmenovitě adeninu a cytosinu (v NK obvykle dávají společný „pík CA“) a s reoxidací produktu chemicky reverzibilní redukce guaninu (pík G). Dále se rtuťové elektrody ukázaly být vhodnými pro měření kapacitních (tensametrických) signálů spojených se změnou adsorpčního stavu polynukleotidových řetězců na jejich negativně nabitým povrchu (přehledně v <sup>2, 4</sup>). Právě souhra či soutěž mezi adsorpcí hydrofobních nukleobází (jejichž dostupnost je závislá na sekundární struktuře DNA) na rtuťovém povrchu a elektrostatickou repulzí mezi negativně nabitým povrchem a cukrfosfátovou páteří NK je důvodem vysoké citlivosti elektrochemického chování NK na rtuťových elektrodách ke struktuře DNA. Ta byla mnohokrát využita jak v samotných strukturálních studiích, tak v elektrochemických metodách navržených pro detekci poškození DNA (přehledně v <sup>5-7</sup>), případně pro detekci konformačních změn dvoušroubovice DNA po interakci s některými nízkomolekulárními ligandy <sup>8</sup>. Zatímco donedávna se tento výzkum týkal téměř výhradně dvouřetězcových (ds) struktur DNA, v posledních letech se zaměřujeme na alternativní struktury, např. guaninové kvadruplexy <sup>9</sup>. Tyto struktury přirozeně obsahují jednořetězcové (ss) úseky (přesahy, smyčky), které do značné míry ovlivňují jejich interakce s povrchem elektrody; proto je jim věnována zvláštní pozornost. Ukazuje se, že chování DNA na negativně nabitým povrchu je řízeno nejen sekundární strukturou, ale i zastoupením a sekvencí ss úseků. Zde vstupuje do hry další jev, jehož studium je typicky spojeno s aplikací atomárně hladkých rtuťových elektrod – dvourozměrná kondenzace molekul na elektrodovém povrchu. Ta byla pozorována nejen u monomerních složek NK (a jejich derivátů využívaných jako léčiva, např. 5-fluorocytosin <sup>10</sup>), ale i pro homopyrimidinové oligonukleotidy <sup>11</sup>. Na rozdíl od malých molekul, které typicky kondenzují okolo potenciálu nulového náboje, delší pyrimidinové úseky vykazují 2D kondenzaci v oblasti negativních potenciálů (podrobnější studie je připravována k publikaci).

Na rozdíl od proteinů (viz níže) byly NK donedávna považovány za látky, které neprodukují analyticky využitelné signály spojené s katalytickým vylučováním vodíku (catalytic hydrogen evolution, CHE). To je z určitého pohledu výhodou: absence CHE u přirozených NK umožňuje citlivě detekovat jejich modifikaci katalyticky aktivními skupinami (viz níže) nebo stanovit v jejich přítomnosti katalyticky aktivní proteiny. V nedávné době však bylo ukázáno, že za jistých podmínek jsou báze DNA katalyticky aktivní a CHE v jejich přítomnosti produkuje signál analogický píku H peptidů a proteinů <sup>12</sup>. Rovněž tento signál je citlivý ke struktuře DNA prostřednictvím rozdílů v dostupnosti zbytků bází. Na základě těchto pozorování byla pomocí chronopotenciometrie konstantním proudem (constant current chronopotentiometric stripping, CPS) poprvé zkoumána deuterace DNA, resp. vodík-deuteriová výměna v závislosti na její struktuře <sup>13</sup>.

### **Peptidy, proteiny a látky obsahující thiolové skupiny**

Elektrochemie peptidů a bílkovin na rtuťových elektrodách je od počátku úzce spjata s CHE a – v případě peptidů a proteinů obsahujících cysteinové zbytky – se specifickou interakcí thiolových skupin s povrchem elektrody (tvorba thiolátů rtuť, případně jejich analyticky využitelná katodická redukce) (přehledně v <sup>1</sup>). Látky obsahující thiolové skupiny dávají v přítomnosti iontů kobaltu tzv. Brdičkovu reakci (proces spojený s CHE), která je tak výhodným nástrojem pro detekci zejména peptidů a proteinů bohatých na cystein, typicky metalothioneinů (přehledně v <sup>14</sup>) a fytochelatinů <sup>15</sup>. Tyto peptidy vázající těžké kovy je možno pomocí Brdičkovy reakce poměrně jednoduše stanovit v biologických matricích bez složitých separačních procedur.

Brdičkovské signály byly pozorovány i v případě DNA oligonukleotidů nesoucích thiolové skupiny<sup>16</sup> a byly využity pro studium možností reduktivního odštěpení chránících skupin (benzylu, tritylu) z arylthiolů enzymaticky inkorporovaných do DNA<sup>17</sup>. DNA oligonukleotidy funkcionalizované thiolovými skupinami byly úspěšně využity pro tvorbu samoorganizovaných vrstev nejen na zlatých, ale i na rtuťových elektrodách<sup>18</sup>. Nizkomolekulární thioly slouží jako ochranné vrstvy na povrchu rtuťových elektrod zabraňující nechtěné denaturaci proteinů v případě jejich strukturně specifické elektrochemické analýzy (viz níže) – vedle nejčastěji využívaného dithiothreitolu (DTT)<sup>19</sup> byly pro tento účel testovány i různé thioalkany<sup>20</sup>.

Jiný druh katalytického signálu byl v přítomnosti proteinů pozorován již ve 20. letech minulého století jako tzv. prcnatriová vlna. Tato polarografická vlna byla později identifikována s tzv. pikem H obvykle zaznamenávaným pomocí CPS (přehledně v<sup>1</sup>). Jedná se o signál CHE, kde role katalyzátorů byla přisouzena jednak thiolovým skupinám (v nepřítomnosti iontů kobaltu) a jednak bazickým dusíkatým skupinám v postranních řetězcích aminokyselin lysinu, argininu a histidinu<sup>21</sup>. Pik H vykazuje vysokou citlivost ke struktuře proteinů. Při vhodně zvolených podmínkách a při použití ochranné vrstvy DTT na povrchu HMDE<sup>19</sup> poskytují nativní proteiny výrazně menší pik H než stejné proteiny v denaturovaném stavu, u kterých došlo v důsledku zborcení původní prostorové struktury k odhalení většího počtu katalyticky aktivních skupin, které se tak dostaly do kontaktu s povrchem elektrody. Naopak při agregaci bílkovin dochází k poklesu jejich katalytické aktivity a tím i intenzity piků H<sup>1</sup>. Mezi nejzajímavější aplikace piků H měřeného na HMDE modifikované DTT patří detekce destabilizace a strukturních změn centrální domény proteinu p53 po odstranění stabilizujícího iontu zinku<sup>22</sup> a sledování interakce tohoto proteinu se specifickou a nespecifickou DNA<sup>23</sup>.

### **Sacharidy a glykoproteiny**

Sacharidy, zejména oligo- a polysacharidy složené ze základních stavebních jednotek obsahujících pouze atomy uhlíku, vodíku a kyslíku (tedy čistě „karbohydráty“) jsou obecně považovány za elektrochemicky neaktivní látky. V případě některých jejich derivátů však byla v nedávné době zjištěna katalytická aktivita dávající na rtuťových elektrodách vznik signálům CHE. Jmenovitě jde o sulfatované polysacharidy, tzv. karagenany izolované z červených mořských řas<sup>24</sup>, a polysacharidy obsahující jako stavební kameny aminocukry (např. glukosamin), jako je chitosan<sup>25</sup>. Tento polysacharid je deacetylačním produktem chitinu (hlavní složky vnějších koster členovců a buněčných stěn hub) skládajícího se z N-acetylglukosaminových jednotek. Chitin sám o sobě signály CHE neposkytuje, což ukazuje na klíčovou roli volných aminoskupin v případě katalyticky aktivního chitosanu.

### **Modifikované biopolymery**

Kromě vlastní elektrochemické aktivity přirozených složek NK, bílkovin a sacharidů je možno pro účely elektrochemické analýzy do jejich molekul inkorporovat redox- nebo katalyticky aktivní značky. Z analytického hlediska a z pohledu výhod plynoucích z využití rtuťových elektrod stojí za zmínku fakt, že signály některých redukovatelných značek bývají na rtuťových lépe vyvinuté ve srovnání s elektrodami uhlíkovými a lepší reprodukovatelnost měření na HMDE je výhodná pro studium příslušných reakčních mechanismů (jako příklad lze uvést redukci fenylazidu připojeného k bázím DNA<sup>26</sup>). Jiným příkladem je studium struktury a interakcí DNA na povrchu HMDE s využitím modifikace dsDNA různě objemnými, elektroaktivními a povrchově aktivními skupinami v jejím velkém žlábků, kde se

jako výhodná „sonda“ jeví např. formylthiofen dříve zavedený jako reaktivní modifikace pro navázání dalších redoxních značek <sup>27</sup>.

Tradičně rozvinuté a dále rozvíjené jsou přístupy využívající modifikaci biomakromolekul pomocí oxokomplexů osmia. Komplexy oxidu osmičelého jsou využívány pro modifikaci na dvojných vazbách C=C pyrimidinových bází v NK nebo indolové skupiny tryptofanu v proteinech (přehledně v <sup>28</sup>), případně uměle zavedených reaktivních skupin připojených k bázím DNA <sup>29</sup>. Naproti tomu osmylace cukerných zbytků lze dosáhnout reakcí příslušných vicinálních diolů s reagensy na bázi osmanu draselného. Tímto způsobem byly pro analytické účely modifikovány 3'-koncové zbytky ribózy v molekulách RNA <sup>30</sup> i specifické oligosacharidy – glykanové složky glykoproteinů <sup>31</sup>. Příslušné adukty lze analyzovat pomocí redoxních signálů na rtuťových nebo uhlíkových elektrodách (což je přístup poskytující možnost rozlišení různých typů aduktů, včetně rozlišení glykanových izomerů <sup>31</sup>), anebo, má-li být dosaženo vysoké citlivosti, s využitím CHE na HMDE, které doprovází poslední redukční krok atomu osmia. Podobně bylo využito CHE na HMDE pro citlivé stanovení modifikace DNA protinádorovým činidlem cisplatinou <sup>32</sup>. Za zmínku stojí zjištění, že CHE v přítomnosti cisplatin výrazně podporuje redukci zbytků guaninu na HMDE, což svědčí o příspěvku chemického mechanismu k tomuto procesu <sup>33</sup>. V poslední době byly studovány signály CHE v přítomnosti některých nepřirozených bází využívaných v oblasti syntetické biologie (připravovaný rukopis).

#### **Alternativy ke rtuťovým elektrodám**

V některých zemích bylo v důsledku tlaku na omezování práce s toxickými materiály používání rtuťových elektrod legislativně znemožněno. Úmyslem autora není na tomto místě vést polemiku o racionálnosti podobných opatření, pouze konstatuje fakt, který (někdy spolu s jinými důvody technického charakteru) vyvolává potřebu hledat jiné elektrodové materiály, které by byly z toxikologického hlediska méně problematické, ale umožňovaly by zkoumat a využívat podobné jevy, jaké pozorujeme na rtuťových elektrodách. Svými vlastnostmi nejbližší HMDE jsou některé amalgamy, zejména stříbrné (AgHg), pro něž lze v literatuře nalézt řadu elektroanalytických aplikací (přehledně v <sup>34,35</sup>). V posledních letech byly vyvinuty nové metody depozice mikročástic AgHg na površích elektrod ze směsného oxidu india a cínu (ITO) <sup>36</sup> nebo na uhlíkových površích a takto připravené elektrody byly úspěšně aplikovány v modelových elektrochemických, spektroechemických a plasmonických experimentech (viz též příspěvky autorů *Daňhel a kol.* a *Havranová a kol.* v tomto sborníku).

Jakkoli lze označit (pevný) stříbrný amalgam za stabilní, netoxický materiál, stále se jedná o materiál obsahující rtuť (která mu na jedné straně propůjčuje výhodné vlastnosti, na druhé straně může způsobovat legislativní problémy či komplikace emočního charakteru). Mezi rtuťovými elektrodovými materiály se jako slibný pro práci v oblasti vysoce negativních potenciálů jeví bórem dopovaný diamant (BDD) <sup>37, 38</sup>. Tradičně uváděná netečnost povrchů BDD elektrod vůči adsorpci analytů (která by byla v tomto případě spíše nevýhodou), se nepotvrdila v případě oligonukleotidů (nepublikované výsledky) a složitějších organických molekul včetně modifikovaných nukleosidů <sup>37</sup>, s nimiž lze i na BDD elektrodách pracovat v režimu přenosové (*ex situ*) voltametrie. Dosud se však nepodařilo na BDD získat vyvinuté redukční signály nukleobází. To se naopak podařilo s elektrodou z pyrolytického grafitu (PGE) v bazální orientaci <sup>39</sup>, na které byly pozorována nejen redukce cytosinu a adeninu a anodický „pík G“ <sup>2-4</sup>, ale i signály odpovídající redukci thyminu, uracilu a guaninu, které se paradoxně právě na HMDE za obvyklých podmínek nacházejí mimo její pracovní okno. Tato pozorování, jakkoli jsou v oblasti elektrochemie NK průlomová, však neodpovídají na otázku, zda lze rtuťové elektrody v oblasti výzkumu biomakromolekul zcela nahradit. Na úrovni

současných znalostí se spíše zdá, že díky rozšíření pracovního okna uhlíkových elektrod směrem do negativní oblasti máme poprvé možnost provádět srovnávací studie se dvěma různými povrchy (které navíc v případě grafitových a BDD elektrod mohou být různě opracovány jak z hlediska tvorby povrchových nanostruktur, tak z hlediska jejich chemického „zakončení“<sup>38, 40</sup>) v oblasti vysoce negativních potenciálů.

### Závěr

Rtuťové elektrody jsou stále vynikajícím nástrojem pro elektrochemickou analýzu obecně a pro výzkum biomakromolekul zvláště. Vlastnosti rtuťových elektrod jsou vhodné jak pro citlivé stanovení přirozených i chemicky modifikovaných nukleových kyselin, bílkovin a sacharidů, tak pro jejich strukturní analýzu. Dosud unikátní vlastnosti rtuťových elektrod je možnost využití katalytického vylučování vodíku v přítomnosti biopolymerů. Přestože v poslední době byly úspěšně využity nejen amalgamové, ale i uhlíkové elektrody pro redukci bází nukleových kyselin v oblastech vysoce negativních potenciálů, současný stav znalostí nenapovídá, že by bylo možno rtuťové elektrody ve výzkumu biomakromolekul nahradit v plném rozsahu. Otázku, zda je možno „nertuťové“ elektrody využívat i v případech, kdy do hry vstupuje sekundární a vyšší struktura NK a bílkovin nebo katalytické děje (včetně nově objevených elektrokatalytických vlastností nukleových kyselin, některých sacharidů a skupin uměle vnesených do biopolymerů), zodpoví až další systematický výzkum.

### Finanční podpora

Tato práce vznikla za podpory projektu SYMBIT reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15\_003/0000477 financovaného z ERDF.

### References

1. Paleček, E., Tkáč, J., Bartosik, M., Bertok, T., Ostatná, V., Paleček, J.: *Chem Rev* *115*, 2045 (2015).
2. Paleček, E., Bartošik, M.: *Chem Rev* *112*, 3427 (2012).
3. Fojta, M.: *Collect Czech Chem Commun* *69*, 715 (2004).
4. Fojta M., Jelen F., Havran L., Paleček E.: *Curr Anal Chem* *4*, 250 (2008).
5. Fojta M.: *Electroanalysis* *14*, 1449 (2002).
6. Fojta, M.: Detecting DNA damage with electrodes, in: Paleček E., Scheller F., Wang J. (Eds.) *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics*, Elsevier, Amsterdam, 2005, pp. 386-430.
7. Fojta M., Danhel A., Havran L., Vysokocil V.: *Trac-Trends* *79*, 160 (2016).
8. Fojta M., Havran L., Fulneckova J., Kubicarova T.: *Electroanalysis* *12*, 926 (2000).
9. Vidlakova P., Pivonkova H., Kejnovska I., Trnkova L., Vorlickova M., Fojta M., Havran L.: *Anal Bioanal Chem* *407*, 5817 (2015).
10. Fojt L., Doneux T., Fojta M.: *J Electroanal Chem* *821*, 121 (2018).
11. Hason S., Vetterl V., Fojta M.: *Electrochimica Acta* *53*, 2818 (2008).
12. Paleček E., Bartosik M.: *Chemelectrochem* *5*, 936 (2018).
13. Dorcak V., Paleček E.: *Chemelectrochem* *6*, 1032 (2019).
14. Adam V., Fabrik I., Eckschlager T., Stiborova M., Trnkova L., Kizek R.: *Trac-Trends* *29*, 409 (2010).
15. Fojta M., Fojtova M., Havran L., Pivonkova H., Dorcak V., Sestakova I.: *Anal Chim Acta* *558*, 171 (2006).
16. Ostatná V., Jelen F., Hianik T., Paleček E.: *Electroanalysis* *17*, 1413 (2005).
17. Macickova-Cahova H., Pohl R., Horakova P., Havran L., Spacek J., Fojta M., Hocek M.: *Chem Eur J* *17*, 5833 (2011).
18. Ostatná V., Paleček E.: *Langmuir* *22*, 6481 (2006).

19. Ostatna V., Cernocka H., Palecek E.: *J Am Chem Soc* *132*, 9408 (2010).
20. Ostatna V., Cernocka H., Hason S., Palecek E.: *Chemelectrochem* *5*, 1373 (2018).
21. Dorcak V., Vargova V., Ostatna V., Palecek E.: *Electroanalysis* *27*, 910 (2015).
22. Palecek E., Ostatna V., Cernocka H., Joerger A. C., Fersht A. R.: *J Am Chem Soc* *133*, 7190 (2011).
23. Palecek E., Cernocka H., Ostatna V., Navratilova L., Brazdova M.: *Anal Chim Acta* *828*, 1 (2014).
24. Strmecki S., Plavsic M., Cosovic B., Ostatna V., Palecek E.: *Electrochem Commun* *11*, 2032 (2009).
25. Palecek E.: *Electrochim Acta* *187*, 375 (2016).
26. Danhel A., Trosanova Z., Balintova J., Simonova A., Pospisil L., Cvacka J., Hocek M., Fojta M.: *Electrochim Acta* *259*, 377 (2018).
27. Raindlova V., Pohl R., Klepctarova B., Havran L., Simkova E., Horakova P., Pivonkova H., Fojta M., Hocek M.: *Chempluschem* *77*, 652 (2012).
28. Fojta M., Kosticka P., Pivonkova H., Horakova P., Havran L.: *Curr Anal Chem* *7*, 35 (2011).
29. Havranova-Vidlakova P., Spacek J., Vitova L., Hermanova M., Dadova J., Raindlova V., Hocek M., Fojta M., Havran L.: *Electroanalysis* *30*, 371 (2018).
30. Bartosik M., Trefulka M., Hrstka R., Vojtesek B., Palecek E.: *Electrochem Commun* *33*, 55 (2013).
31. Trefulka M., Palecek E.: *Electrochem Commun* *85*, 19 (2017).
32. Horakova P., Tesnohlikova L., Havran L., Vidlakova P., Pivonkova H., Fojta M.: *Anal Chem* *82*, 2969 (2010).
33. Danhel A., Havran L., Trmkova L., Fojta M.: *Electroanalysis* *28*, 2785 (2016).
34. Danhel A., Josypchuk B., Barck J., Fojta M.: *Chem Listy* *110*, 215 (2016).
35. Yosypchuk B., Berek J.: *Crit Rev Anal Chem* *39*, 189 (2009).
36. Danhel A., Ligmajer F., Sikola T., Walcarius A., Fojta M.: *J Electroanal Chem* *821*, 53 (2018).
37. Vosahlova J., Kolacna L., Danhel A., Fischer J., Balintova J., Hocek M., Schwarzova-Peckova K., Fojta M.: *J Electroanal Chem* *821*, 111 (2018).
38. Schwarzova-Peckova K., Vosahlova J., Berek J., Sloufova I., Pavlova E., Petrak V., Zavazalova J.: *Electrochim Acta* *243*, 170 (2017).
39. Spacek J., Danhel A., Hason S., Fojta M.: *Electrochem Commun* *82*, 34 (2017).
40. Hason S., Danhel A., Schwarzova-Peckova K., Fojta, M.: *Carbon Electrodes in Electrochemical Analysis of Biomolecules and Bioactive Substances: Roles of Surface Structures and Chemical Groups*, in: Nikolelis, D.P., Nikolelim G-P. (Eds.) *Nanotechnology and Biosensors - Advanced Nanomaterials*, Elsevier, Amsterdam 2018, pp. 51-11.

## Cathodic Voltammetric Determination of a Nitro Substituted 1-Hydroxynaphthalene-2-carboxanilide in Dimethyl Sulfoxide in Electrochemical Microcell

Július Gajdár<sup>a</sup>, Tomáš Goněc<sup>b</sup>, Josef Jampilek<sup>c</sup>, Marie Brázdová<sup>d</sup>, Zuzana Bábková<sup>d</sup>,  
Miroslav Fojta<sup>d</sup>, Jiří Barek<sup>a</sup>, and Jan Fischer<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry,  
UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 12843 Prague 2,  
Czech Republic. E-mail: gajdarj@natur.cuni.cz

<sup>b</sup> University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy,  
Department of Chemical Drugs, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

<sup>c</sup> Comenius University, Faculty of Natural Sciences, Department of Analytical Chemistry,  
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovakia

<sup>d</sup> Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, 612 65 Brno,  
Czech Republic

### Abstract

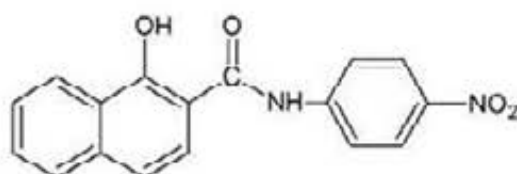
In this contribution a new voltammetric method for the determination of a novel antibacterial agent 1-hydroxy-*N*-(4-nitrophenyl)naphthalene-2-carboxamide is introduced. This compound is determined at a glassy carbon electrode in dimethyl sulfoxide. Focus of this study is a possibility of measuring very small volumes in a microcell and removing interference of oxygen in cathodic voltammetry either by altering microcell measuring protocols or by using a method of square wave voltammetry.

**Key words:** Hydroxynaphthalene-2-carboxanilide, glassy carbon electrode, microcell, non-aqueous voltammetry.

### Introduction

One of the development paths of analytical methods is directed towards miniaturization. Voltammetric methods offer rapid, cheap, and sensitive methods that can be easily miniaturized. Electrochemical methods can be included into micro-analytical systems and used for applications such as *in-situ* analysis, point-of-care testing and they can be built into portable devices or lab-on-chip devices<sup>1, 2</sup>. Resulting lower consumption of samples, reagents, and organic solvents is in an agreement with principles of green chemistry<sup>3, 4</sup>. In the last few years several designs of electrochemical cells for measurements in very small volumes were proposed<sup>5, 7</sup> and this study is based on our previously introduced electrochemical microcell<sup>8-10</sup>.

1-Hydroxy-*N*-(4-nitrophenyl)naphthalene-2-carboxamide (HNN, Fig. 1) belongs to the group of novel antimycobacterial agents prepared and investigated for their biological activities<sup>11-16</sup>.



**Fig. 1.** Chemical structure of 1-hydroxy-*N*-(4-nitrophenyl)naphthalene-2-carboxamide (HNN).

### Experimental

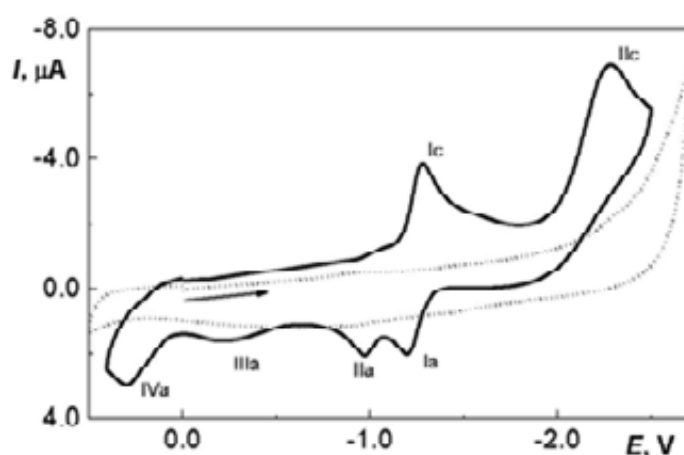


A stock solution of HNN (CAS number: 68352-27-2; Sigma Aldrich, Germany) was prepared by dissolving the substance in dimethyl sulfoxide (DMSO, p.a., Penta, Czech Republic). 0.1 mol L<sup>-1</sup> solution of tetrabutylammonium tetrafluoroborate (Bu<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub>, p.a., Sigma Aldrich, Germany) in DMSO was used as a supporting electrolyte. Commercially obtained DMSO was dried over molecular sieves (0.3 nm, Metrohm, Switzerland) to water content approximately 60 ppm measured by Karl Fischer titration in the study of reduction mechanism of HNN. Determination of HNN was carried out in non-dried solvent.

All voltammetric measurements were carried out using Autolab PGSTAT101 (Metrohm) controlled by Nova 1.11.2 software (Metrohm). Voltammetric measurements were carried out in a three-electrode system with a working glassy carbon disc electrode (GCE, 2 mm diameter, Metrohm), an auxiliary platinum wire electrode (0.5 mm diameter) and a reference electrode: Ag|AgNO<sub>3</sub> (0.01 mol L<sup>-1</sup>), Bu<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> (0.1 mol L<sup>-1</sup>) in DMSO. Electrochemical microcell and procedures were described in detail in our previous publications<sup>8-10</sup>. GCE was polished prior to measurements with an aqueous slurry of alumina powder (1.1 μm) on a polishing pad for 5 minutes and then sonicated for 30 s in methanol and DMSO. Scan rate 20 mV s<sup>-1</sup>, pulse width of 100 ms, current sampling time of 20 ms, and pulse amplitude -50 mV were used in DP voltammetry. Square wave voltammetry (SWV) was carried out at frequency 100 Hz, pulse amplitude -50 mV and step -4 mV. Limits of quantification were calculated as a concentration corresponding to a tenfold of a standard deviation of ten subsequent measurements at the lowest measurable concentration.

### Results and discussion

HNN is reduced in two steps in a non-aqueous DMSO. Cyclic voltammogram of HNN is shown in Fig. 2 and the reduction should proceed similarly to the reduction of nitro group studied extensively by voltammetric methods<sup>17, 18</sup>. First reversible peak at -1.3 V (Ia/Ic) corresponds to one-electron reduction of nitro group to an anion-radical which is afterwards reduced in an irreversible process at -2.3 V (IIc). Processes IIa-IVa are related to products of reduction (IIc) and were not further studied. The first peak Ia at -1.3 V was utilized for the determination of HNN. No passivation of the electrode surface was observed and GCE gave repeatable signals with RSD = 6% (30 scans, 0.1 mmol L<sup>-1</sup> HNN) with no apparent trends.



**Fig. 2.** Cyclic voltammogram (scan rate 100 mV s<sup>-1</sup>) of HNN (0.1 mmol L<sup>-1</sup>) obtained at GCE in 5 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> Bu<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> in non-aqueous DMSO (~60 ppm H<sub>2</sub>O). Supporting electrolyte voltammogram is illustrated by dotted line. Arrow denotes the start and the direction of a scan.

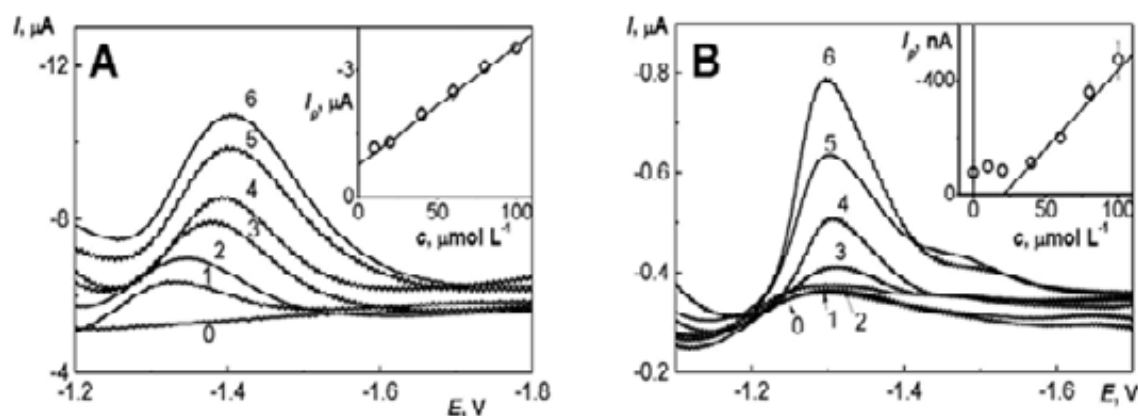
Determination of HNN was performed in small volumes (20  $\mu\text{L}$ ) of DMSO by DPV and SWV. The main problem with cathodic voltammetry was oxygen which is rather difficult to remove from the drop of a solution. Oxygen gave three signals in DMSO at GCE<sup>8</sup>. There were two possible solutions to this problem that provided two different sets of advantages and disadvantages. The microcell described in<sup>8,9</sup> enables work in the nitrogen atmosphere with the lowest LOQ (Table 1) but about 15 mins are necessary for oxygen removal. The second solution to this problem is to use SWV which is much faster and less sensitive to oxygen but has slightly higher LOQ (Table 1). Additionally, SWV calibration dependency has statistically different, much lower slope and higher intercept at higher concentration range (Table 1).

Parameters of SWV were primarily optimised based on a ratio of the peak of HNN to the peak of oxygen. The main parameter that influenced this ratio was frequency. The optimal frequency was chosen as 100 Hz (from 25-300 Hz range) where the ratio was the most favourable for the HNN peak. Higher frequencies also meant an unfavourable increase in the noise level. Secondly, as can be seen from DPV determination on Fig. 3B, there was an irreversible signal of oxygen reduction in DMSO<sup>8</sup> interfering with the peak evaluation. This peak is successfully suppressed by using optimised SWV as shown in Fig. 3A.

**Table 1**

Figures of merits for the determination of HNN in a drop (20  $\mu\text{L}$ ) of a solution by DPV and SWV at the GCE in supporting electrolyte 0.1 mol L<sup>-1</sup> Bu<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> in DMSO.

Method	$c$ , $\mu\text{mol L}^{-1}$	slope, mA L mol <sup>-1</sup>	intercept, nA	corr. coeff.	LOQ, $\mu\text{mol L}^{-1}$
DPV (with O <sub>2</sub> )	10–100	-5.50	+114	0.9812	~60
DPV (in N <sub>2</sub> atm.)	2–10	-15.7	+4.08	0.9985	5.0
	10–100	-5.32	-11.8	0.9974	
SWV (with O <sub>2</sub> )	2–10	-129	+657	0.9958	7.3
	10–100	-28.1	-758	0.9978	



**Fig. 3.** Comparison of SW (A) and DP (B) voltammograms of HNN (0 (0); 10 (1); 20 (2); 40 (3); 60 (4); 80 (5); and 100 (6)  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) obtained at GCE in 20  $\mu\text{L}$  of 0.1 mol L<sup>-1</sup> Bu<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> in DMSO in the presence of oxygen. Calibration straight lines are shown in insets.

## Conclusions

HNN was successfully determined by cathodic voltammetry in DMSO in 20  $\mu\text{L}$  of solution dramatically decreasing an amount of sample necessary for an experiment. Two methods of removing oxygen signal from measurements were introduced and verified.

### Acknowledgements

This research was carried out within the framework of Specific University Research (SVV 260440). This research was supported by the Czech Science Foundation (project 17-03868S). We thank to Metrohm CZ (<https://www.metrohm.com/cs-cz>) for efficient technical, material and intellectual support.

### References

1. Xu X., Zhang S., Chen H., Kong J.: *Talanta* **80**, 8 (2009).
2. Wang J.: *Talanta* **56**, 223 (2002).
3. Koel M., Kaljurand M.: *Pure Appl. Chem.* **78**, 1993 (2006).
4. Wang J.: *Accounts Chem. Res.* **35**, 811 (2002).
5. Skalová Š., Gonçalves L. M., Navrátil T., Barek J., Rodrigues J. A., Vyskočil V.: *J. Electroanal. Chem.* **821**, 47 (2018).
6. Hájková A., Vyskočil V., Josypčuk B., Barek J.: *Sens. Actuator B-Chem.* **227**, 263 (2016).
7. Hrdlička V., Navrátil T., Barek J.: *J. Electroanal. Chem.* **835**, 130 (2019).
8. Gajdár J., Barek J., Fojta M., Fischer J.: *Mon. Chem.* **148**, 1639 (2017).
9. Gajdár J., Goněc T., Jampilek J., Brázdová M., Bábková Z., Fojta M., Barek J., Fischer J.: *Electroanalysis* **30**, 38 (2018).
10. Gajdár J., Barek J., Fischer J.: *Sens. Actuator B-Chem.* *Submitted* (2019).
11. Gonce T., Kos J., Zadrazilova I., Pesko M., Govender R., Keltosova S., Chambel B., Pereira D., Kollar P., Imramovsky A., O'Mahony J., Coffey A., Cizek A., Kralova K., Jampilek J.: *Molecules* **18**, 9397 (2013).
12. Gonce T., Kos J., Zadrazilova I., Pesko M., Keltosova S., Tengler J., Bobal P., Kollar P., Cizek A., Kralova K., Jampilek J.: *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 6531 (2013).
13. Kos J., Zadrazilova I., Pesko M., Keltosova S., Tengler J., Gonce T., Bobal P., Kauerova T., Oravec M., Kollar P., Cizek A., Kralova K., Jampilek J.: *Molecules* **18**, 7977 (2013).
14. Gonce T., Kos J., Nevin E., Govender R., Pesko M., Tengler J., Kushkevych I., Stastna V., Oravec M., Kollar P., O'Mahony J., Kralova K., Coffey A., Jampilek J.: *Molecules* **19**, 10386 (2014).
15. Kos J., Nevin E., Soral M., Kushkevych I., Gonce T., Bobal P., Kollar P., Coffey A., O'Mahony J., Liptaj T., Kralova K., Jampilek J.: *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 2035 (2015).
16. Gonce T., Kos J., Pesko M., Dohanosova J., Oravec M., Liptaj T., Kralova K., Jampilek J.: *Molecules* **22**, 1709 (2017).
17. Hammerich O., v knize: *Organic Electrochemistry*, (Hammerich O., Speiser B., Eds.),sv.Vol. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2016.
18. Zuman P., Fijalek Z., Dumanovic D., Suznjevic D.: *Electroanalysis* **4**, 783 (1992).

## **Impedimetric Biosensor for the Detection of Protein Virus Residues (Impedimetrický imunobiosenzor na detekciu vírusových proteínových reziduí)**

Miroslav Gál<sup>a</sup>, Aneta Anna Dunajová<sup>b</sup>, and Kornélia Tomčíková<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Department of Inorganic Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia

<sup>b</sup> Church High School of st. Cyril and Methodius, Švermova 10, 069 01 Snina, Slovakia

### **Abstract**

The World Health Organization (WHO) estimates that annually 250 -500 thousand deaths is caused globally by imprecise and insufficient detection of the virus in patients. Early diagnostics of infection requires an efficient and fast diagnostic test, showing high sensitivity, simplicity and economic viability. The goal of this work is to create an ultra-sensitive and highly selective impedimetric biosensor the base on the interaction with monoclonal antibodies, using screen printed GC electrodes. Electrochemical methods were used to characterize sensors and describe their basic properties.

**Key words:** Influenza, Virus, Impedance spectroscopy, antibodies.

### **Úvod**

Vírusy spolu s baktériami patria medzi pôvodcov najväznejších infekčných ochorení v súčasnosti. Vírusy sú nebunkové intracelulárne častice selektívne pre daný typ hostiteľskej bunky. Bez daného typu bunky nie sú schopné replikačného cyklu. Vírusy nedisponujú enzymatickým vybavením, nemajú charakteristické bunkové zloženie ani proteosyntetický aparát. Vírusy disponujú iba jedným typom nukleovej kyseliny<sup>1</sup>.

Chrípkové virióny pozostávajú z troch základných subvírusových komponentov: obalová membrána, vrstva matrixu na spodnej strane lipidovej dvojvrstvy a ribonukleoproteínové jadro<sup>1-3</sup>. Hemaglutinín (HA) a neuraminidáza (NA) predstavujú hlavé povrchové glykoproteíny. Obe tvoria funkčný základ pre vstup vírusu do hostiteľskej bunky a jeho následné infikovanie. Poznáme 18 subtypov HA a 11 subtypov NA a to spolu s genetickou variabilitou predstavuje neustálu výzvu pre výrobu vakcín a vhodných diagnostických metód<sup>1</sup>.

Najdôležitejším krokom v klinickej liečbe pacientov je určenie správnej diagnózy. Včasná diagnostika infekcie vyžaduje rýchly a presný diagnostický test. Momentálne využívané metódy sú zamerané na existenciu špecifických vírusových antigénov vyvolávajúcich imunologickú reakciu organizmu (imunofluorescenčný test), dokazovanie vírusových enzýmov, hemaglutinácia a taktiež sérologické vyšetrenia založené na princípe dôkazu špecifických protilátok (ELISA,RIA). Najpresnejšou z metód je však priama izolácia mikroorganizmu, kedy sa toto detegovanie stáva časovo a ekonomicky príliš náročným<sup>1-6</sup>.

V našom laboratóriu sme potvrdili, že je možné elektrochemicky pomocou vhodnej modifikácie popísať priechodnosť malých organických molekúl cez fosfolipidovú membránu<sup>7</sup>, interakcie peptidov s fosfolipidmi<sup>8</sup>, študovať bioaktívne látky fenolového typu a hormónov na modifikovaných povrchoch pevných a ortuťových elektród<sup>9-14</sup> a študovať kinetiku degradácie biocídnych látok v modelových roztokoch<sup>15,16</sup>.

Táto práca sa venuje modelovaniu ultraselektívneho a senzitivného impedimetrického biosenzora, na základe protilátok na detekciu najrozšírenejšieho subtypu chrípkového vírusu

H3N2, pomocou zvolených GC sieťotlačových elektród, popisaniu jeho vlastností pomocou elektrochemických metód.

### Experimentálna časť

Pracovali sme v 0,05 M fosforečnanovom tlmivom roztoku (PB), pH = 7,4 pozostávajúci z  $K_2HPO_4$  a  $KH_2PO_4$ . Na chemickú aktiváciu GC elektród sme využívali zmes *N*-hydroxysukcinimid (NHS)  $c = 0,2$  M a *N*-3-(dimetylamino)propyl-*N'*-etylkarbodiimid hydrochlorid (EDC)  $c = 0,05$  M v pomere 1:1. Ako podkladovú vrstvu pre monoklonálne protilátky sme využívali ľudský sérový albumín HSA. Analyt sme pripravili z purifikovaného vírusu H3N2. Ako redukčnú sondu sme využívali 5 mM roztok  $K_3Fe(CN)_6$ . Pripravený senzor sme testovali v reálnom prostredí defibrovanej konskej krvi.

Elektrochemická aktivácia elektród prebiehala pomocou chronoampérometrie<sup>1</sup>. Počas tohto procesu dochádzalo k oxidácii voľných uhlíkových skupín, až do vzniku karboxylových skupín. Karboxylové skupiny sa následne chemicky aktivovali po nakvapnutí 10  $\mu$ l roztoku EDC/NHS (1:1). Chronoampérometria prebiehala v trojelektrodovom zapojení, kde sieťotlačové GC elektródy boli v pozícii pracovných (WE), ako referenčná elektróda bola využitá elektróda Ag/AgCl (RE) a ako protielektroda (CE) bol použitý Pt drôtik. Na WE sa vkladalo napätie 1,7 V, meranie trvalo 90 s.

Biosenzor sme charakterizovali pomocou elektrochemickej impedančnej spektroskopie (EIS). Pri konštrukcii senzora dochádzalo k naadsorbovaniu molekúl, čím sa menila hrúbka vrstvy, čo sa prejavilo zmenou odporu voči prenosu náboj,  $R_{et}$ <sup>1,3</sup>. Merania sa uskutočnili v trojelektrodovom systéme v 0,05 M PB s pH = 7,4 a s prídavkom 5 mM  $K_3Fe(CN)_6$ . Merania sa uskutočnili pri 60-tich rôznych frekvenciách v rozsahu od 0,1 Hz až po 100 kHz. Potenciál WE 0,15 V vs. RE sme stanovili pomocou cyklickej voltampérometrie.

V poslednej časti práce sme namiesto pôvodného elektrolytu využívali defibrovanú konskú krv. Elektrochemická a chemická aktivácia elektród prebiehala rovnako ako aj v predošlom prípade. Biosenzor sme testovali v elektrolyte tvorenom 500  $\mu$ l krv/PSB (riedené v pomere 1:1) a 50  $\mu$ l  $K_3Fe(CN)_6$ .

Vzorky purifikovaného vírusu H3N2 a monoklonálne protilátky boli poskytnuté z Oddelenia Ortomyxovírusov. BMC Virologického ústavu SAV.

Počas celej experimentálnej časti tejto práce sa pracovalo pri laboratórnej teplote  $21 \pm 2$  °C.

### Výsledky a diskusia

Dôležitým parametrom pri chemickej aktivácii elektród sa ukázal čas pôsobenia zmesi imidov EDC/NHS na povrch uhlíkovej elektródy. Ideálnym časom na aktiváciu bol čas medzi 12 až 15 minútami, kedy sa už výsledný odpor  $R_{et}$  takmer nemenil. Na základe týchto výsledkov sme sa rozhodli v nasledujúcich meraniach zvoliť čas 15 minút na chemickú aktiváciu.

Zároveň sme testovali aj optimálne množstvo protilátok, ktoré je potrebné naadsorbovať na povrchu elektródy. Na základe výsledkov sme zvolili 1 nM roztok protilátky, ktorý sa následne použil pri celej práci modelovania selektívneho biosenzora.

Meraním elektrochemickej impedancie sa získali odpory proti prenosu náboja  $R_{et}$ , na základe ktorých sa posudzovala časová závislosť obsadzovania voľných väzbových miest (epitopov) protilátok s vírusovými časticami. Z výsledkov vyplýva, že môžeme určiť orientačný čas

potrebný na vytvorenie väzby antigén – protilátka. Z toho vyplýva, že čas potrebný k vysýteniu väčšiny väzbových miest je 30 min. Po uplynutí tejto doby je nárast zmeny odporu už len pozvoľný. Z tejto časti vyplýva, že čas 30 – 60 minút môžeme považovať za limit potrebný pre vzájomnú interakciu antigén – protilátka.

Limit detekcie (LOD) sme vypočítali z výrazu, kde  $S$  je smernica priamky a  $\sigma$  štandardná odchýlka. Hodnota smernice priamky hovorí aj o citlivosti metódy, keďže väčšia hodnota smernice priamky značí väčšie nárasty odporov proti prenosu náboja a tým aj citlivejšie stanovenie analytu v roztoku. V prípade biosenzora bez vrstvy HSA  $LOD=0.79\text{fM}$  a smernica mala hodnotu  $4.8\pm 0.3$ . Ak sme na konštrukciu biosenzora použili aj vrstvu HSA  $LOD$  bol  $0.69\pm 0.18\text{pM}$ , ale smernica lineárnej závislosti zmeny nárastu odporu proti prenosu náboja v závislosti od koncentrácie H3N2 sa zvýšila na  $25.3\pm 6.7$ . Z toho vyplýva, že hoci sa  $LOD$  zvýšilo približne o tri rády, citlivosť tohto detektora sa vďaka prídaniu HSA vrstvy zvýšila takmer 6-násobne. V prípade testov v reálnom krvnom konskom sére mala smernica priamky hodnotu  $24.7\pm 8.1$  a limit detekcie bol  $0.52\pm 0.13\text{pM}$ .

### Acknowledgements

This research was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-17-0149 and Scientific grant agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic and of Slovak Academy of Sciences VEGA 1/0343/19.

### References

1. Tomčíková, K., Detekcia vírusu chrípky pomocou impedimetrického biosenzora. Diploma Thesis. Slovak University of Technology in Bratislava, Bratislava 2017.
2. Varcčková E., Mucha V., Kostolanský F.: *Acta virologica*. 57, 247 (2013).
3. Hushegyi A., Bertók T., Tkáč J.: *Chem. Listy*. 108, 451 (2014).
4. Chandra P.: *Nanobiosensors for Personalized and Onsite Biomedical Diagnosis*. [online] Phoenix: Institution of Engineering and Technology. 2016. [cit. 2019-02-02].
5. Sadow, S. E.: *Silicon Carbide Biotechnology – A. Biocompatible Semiconductor for Advanced Biomedical Devices and Applications (2nd Edition)*. Elsevier. 2016.
6. Tatarkovič M., Broncová G., Krondák M.: *Chem. Listy*. 106, 1067 (2012).
7. Kocabova J., Kolivoska V., Gal M. et al.: *J. Electroanal. Chem.* 821, 67 (2018).
8. Gal M., Sokolova R., Naumowicz M. et al.: *J. Electroanal. Chem.* 821, 40 (2018).
9. Sokolova R., Kocabova J., Marhol P. et al.: *J. Phys. Chem. B* 121, 6841 (2017).
10. Ramesova S., Degano I., Sokolova R.: *J. Electroanal. Chem.* 788, 125 (2017).
11. Kocabova J., Fiedler J., Degano I. et al.: *Electrochim. Acta* 187, 358 (2016).
12. Bulickova J., Sokolova R., Giannarelli S. et al.: *Electroanalysis* 25, 303 (2013).
13. Ramesova S., Sokolova R., Degano I.: *Electrochim. Acta* 182, 544 (2015).
14. Ramesova S., Degano, I., Sokolova R.: *Electrochim. Acta* 133, 359 (2014).
15. Pospisil L., Sokolova R., Colombini M.P. et al.: *Microchem. J.* 67, 305 (2000).
16. Pospisil L., Sokolova R., Colombini M.P. et al.: *J. Electroanal. Chem.* 472, 33 (1999).

## New Possibilities in DNA Electroactive Labelling

Luděk Havran, Pavlína Havranová, Monika Hermanová, Mojmir Trefulka, Lukáš Fojt, and Miroslav Fojta

Institute of Biophysics of the Czech Academy of , Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic, E-mail: raven@ibp.cz

### Abstract

DNA labelling by redox active tags is one from approaches how to increase selectivity and sensitivity of its electrochemical analysis. Commonly are used several methods for introduction of such electroactive labels into DNA molecules. Some of them are based on incorporation of chemically modified nucleosides by DNA polymerases, such as PCR or PEX methods. Others used direct chemical modification of before synthesized DNA molecules. In this contribution will be demonstrated application of oxoosmium complexes and boron cluster compounds for DNA electroactive functionalisation.

**Key words:** Chemically modified DNA, Electroanalytical methods, Oxoosmium complexes, Boron cluster compounds.

### Introduction

DNA is naturally electroactive molecule producing set of analytically useful voltammetric signals on different types of working electrodes. Some of them are due to reduction or oxidation of nucleobases, another due to adsorption/desorption or reorientation of DNA at electrode surface<sup>1</sup>. For some types of analysis (e.g. analysis of DNA interaction) is sensitivity and specificity of DNA intrinsic voltammetric signals insufficient. In these cases is useful applied labelling of DNA by electroactive tags<sup>2</sup>. There are several methods for DNA redox functionalization.

The simplest method for this purpose is direct chemical modification of DNA molecules. Modification of DNA by complexes of osmium tetroxide with nitrogen ligands (Os(VII),L) is example of such approach. Os,L preferentially react with pyrimidines in single strand DNA producing electroactive adducts. Primary reaction site for Os(VIII),L is C=C double bond in pyrimidine nucleobases<sup>3</sup>. Covalent adducts resulting from this reaction are electroactive and can be analyzed at mercury (HMDE) or carbon (PGE) based working electrodes. At HMDE these adducts produce, besides others, catalytic signal serving for ultrasensitive determination of modified DNA<sup>4</sup>. PGE can be used for direct analysis of reaction mixtures because allow application of simple extraction of unreacted Os(VIII),L directly from electrode surface by organic solvent<sup>5</sup>. Besides modification of pyrimidine nucleobases by Os(VIII),L, ribonucleosides and other biomolecules containing suitable sugar moieties can be osmium-labeled through reaction of the ribose 2',3'-cis-diol group with analogous oxoosmium(VI) Os(VI),L complexes to form the osmium glycolate adducts<sup>6</sup>. This type of modification was used for end-labelling of RNA and for study of polysaccharides<sup>7</sup> or oligosaccharides<sup>8</sup>.

Methods using DNA polymerases are most commonly used for chemically modified DNA molecules<sup>2</sup>. These enzymes incorporate into DNA nucleosides bearing different functional group including redox active ones. Primer extension method (PEX) and polymerase chain reaction (PCR) are used for preparation of double strand (ds) DNA. Single strand (ss) DNA can be prepared with using terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), which add nucleosides (including chemical modified) on free 3'-OH end of ssDNA.

Boron cluster compounds (BBC) are synthetic species based on electron rich, exact two-center two-electron bonds, however boron cluster architecture is based on three-center twoelectron bonds<sup>9</sup>. Research on BCCs revealed that BCCs possess unique chemical, surface, solution, stability, and also electrochemical properties, which all substantially differ from naturally occurring compounds. Their biocompatibility and electroactivity makes them candidates for new type of DNA electroactive tags.

In this contribution will be show results of electrochemical study of Os(VIII).L reactivity to DNA bearing alkyne or alkene moieties and Os(VI).L reactivity to DNA bearing cis-diols. Next will be presented results obtained with DNA functionalized by BCC.

### Experimental

Synthetic oligonucleotides (ONs) were purchased from Gencri Biotech (Czech Republic). TdT and T4 Polynucleotide kinase were purchased from New England Biolabs, KOD XL DNA polymerase (Novagen, USA). Oxoosmium complexes modified DNAs were analyzed at PGE in combination with AdTS SWV. Samples were accumulated at the electrode surface from 5  $\mu$ L aliquots for 60 s. Then the electrode was rinsed by deionized water, by ethanol, followed by 30s washing in isopropanol. After it electrode was rinsed by ethanol and by water and placed into the electrochemical cell. Instruments settings: AdTS SWV: PGE,  $E_i = -1$  V,  $E_{end} = 1.6$  V, amplitude 50 mV, frequency 200 Hz,  $t_a = 60$ s, electrolyte: 0.2 M acetate buffer (pH 5.0). All electrochemical measurements were performed at room temperature with an Autolab analyzer (EcoChemie, Utrecht, The Netherlands) connected to VA-Stand 663 (Metrohm, Herisau, Switzerland) in three-electrode setup (Ag/AgCl/3M KCl electrode as a reference and platinum wire as an auxiliary electrode).

### Results and discussion

DNAs samples containing dA and dU bearing vinyl (V) or ethynyl (E) groups were prepared by incorporation of corresponding nucleoside triphosphates (Fig. 1).

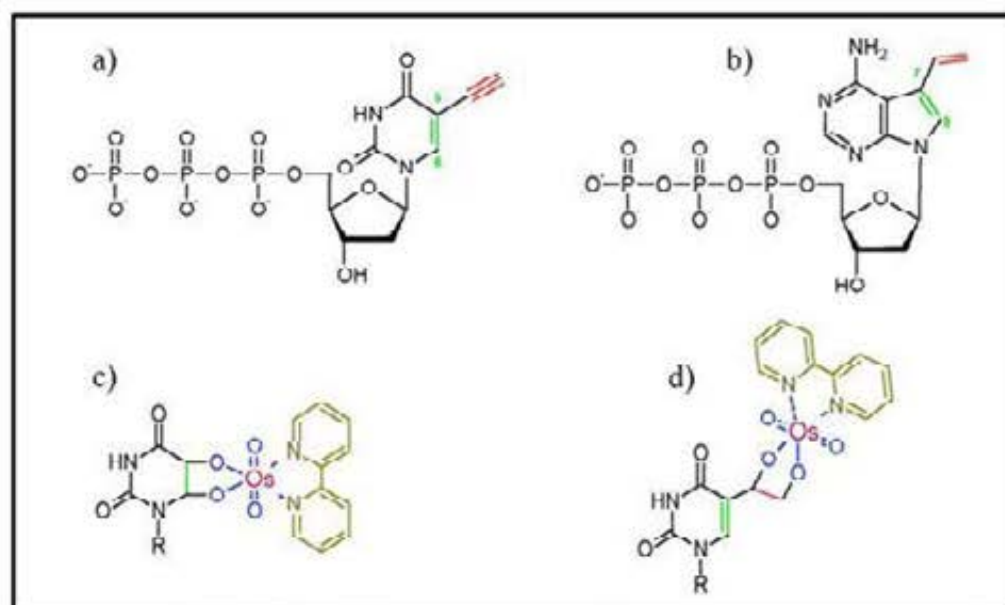


Fig. 1. Structures dU<sup>E</sup>-TP (a), dA<sup>V</sup>-TP (b); structures of Os(VIII),bpy adducts with U (c), and U<sup>V</sup>(d).

TdT tailing, PEX reaction, and PCR were used for this purpose. Experiments with ss DNA revealed strong preference of the osmium reagent to V group. Reactivity to E group was



significantly smaller. In the case of ds DNA prepared by PEX, a slight preference to  $dA^V$  compared to  $dU^V$  was found. Reactivity to E group was almost negligible with a small preference to  $dA^E$ . Contrary to results with the PEX products, in the case of these significantly longer ds DNA molecules (350 bp) better developed voltammetric peak specific for adduct (peak  $\alpha$ ) was obtained with PCR product containing  $dU^V$ . DNAs containing  $dA^V$  produced peak  $\alpha$  at a potential very close to the peak potential of unbound (Os(VIII),bpy) reagent (peak I). On the other hand, peak  $\alpha$  of  $dU^V$ -containing PCR product was significantly shifted to more negative values and easily distinguishable from peak I.

Reactivity of Os(VI),pyridine (py) to DNA bearing cis-diols was tested on series of dsDNAs prepared by incorporation of corresponding nucleoside triphosphates (Fig. 2.) using PEX reaction.

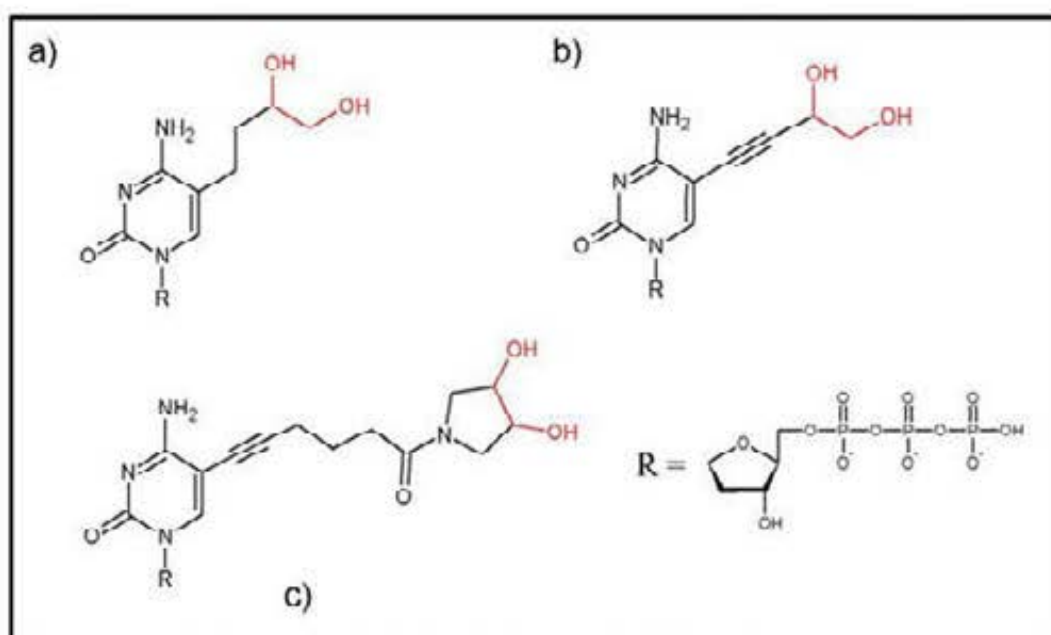
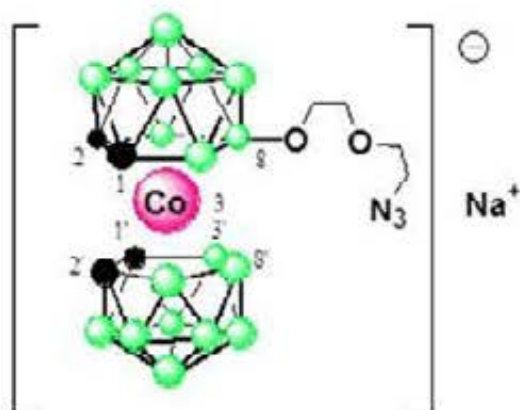


Fig. 2. Structures of  $dC^{DHA}$ -TP (a),  $dC^{DHY}$ -TP (b), and  $dC^{PDI}$ -TP (c).

Resulting adducts were undergoing ligand exchange<sup>10</sup> reaction. Py was exchange for N, N, N',N'-tetramethylethylenediamine, which significantly stabilize these adducts. DNA containing cyclic diol with extended linker (see Fig. 2.) showed significantly higher affinity to Os(VI),py reagent than DNAs with "linear" diol moieties. This is probably due to locked position of -OH groups in cyclic molecule mimicking situation in sugars molecules, which are known as a good targets for reaction with Os(VI),I. reagents

BCC bearing reactive azide functional group (8- $N_3(CH_2CH_2O)_2(1,2-C_2B_9H_{10})(1',2'-C_2B_9H_{11})-3,3'-Co$ ] Na) (Fig.3.) was conjugated to ds DNA bearing ethynyl moieties by copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition - click reaction<sup>11</sup>. Electrochemical properties of prepared functionalised DNA were studied at PGE. Both signals, due to oxidations of BCC skeleton and due to reduction of Co atom were examined by differential pulse voltammetry and square wave voltammetry.



**Fig. 3.** Structure formula of  $8\text{-N}_3(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})(1',2'\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})\text{-3,3'}\text{-Co}] \text{Na}$ .

### Conclusions

In this contribution was demonstrated application of Os(VIII).bpy, Os(VI).py, and BCC in DNA electroactive functionalisation. Reactivity of Os(VIII).bpy to DNA bearing ethynyl or vinyl as well as reactivity of Os(VI).py to DNA containing cis-diols was proved by voltammetric techniques at PGE. Also was studied electrochemical behavior of DNA decorated by BCC.

### Acknowledgements

This research has been supported by the Czech Science Foundation (project no. 19-04630S) and by the SYMBIT project reg. no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15\_003/0000477 financed from the ERDF.

### References

1. Paleček E., Bartošik M.: *Chem. Rev.* **112**, 3427 (2012).
2. Hocek M., Fojta M.: *Chem. Soc. Rev.* **40**, 5802 (2011).
3. Fojta M., Kostečka P., Pivoňková H., Horáková P., Havran L.: *Curr. Anal. Chem.* **7**, 35 (2011).
4. Paleček E., Hung M. A.: *Anal. Biochem.* **132**, 236 (1983).
5. Fojta M., Havran L., Kizek R., Billova S.: *Talanta* **56**, 867 (2002).
6. Trefulka M., Ostatna V., Havran L., Fojta M., Paleček E.: *Electroanalysis* **19**, 1281 (2007).
7. Trefulka M., Palecek E.: *Electroanalysis* **21**, 1763 (2009).
8. Trefulka M., Palecek E.: *Bioelectrochemistry* **88**, 8 (2012).
9. Williams R.E.: *Chem. Rev.* **92**, 177 (1992).
10. Trefulka M., Palecek E.: *Electroanalysis* **25**, 1813 (2013).
11. Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **40**, 2004 (2001).

## Preparation and Characterization of Silver Amalgam Particles on Screen Printed Silver Electrodes Surface

Pavčina Havranová, Lukáš Fojt, Miroslav Fojta and Aleš Daňhel

Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, 61265 Brno, Czech Republic, E-mail: vidlakova@ibp.cz

### Abstract

Silver solid amalgam represents the most suitable alternative electrode material to metallic mercury in electroanalytical chemistry. Preparation of silver amalgam particles by its direct electrodeposition on screen printed silver electrodes using double pulse chronoamperometry from solution containing  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Hg}^{2+}$  ions is reported in this work. Different parameters of the chronoamperometry (pulse and grow potentials and times) and various Ag/Hg ratios in the solution were optimized during electrodepositions of silver amalgam particles. Voltammetric application of prepared screen-printed silver electrode decorated by silver amalgam particles was confirmed by analysis of 4-nitrophenol using cyclic voltammetry.

**Key words:** Silver amalgam, Screen-printed silver electrode, 4-nitrophenol, Voltammetry, Double pulse chronoamperometry

### Introduction

Design, study and use of new types of working electrodes represent a significant part of electrochemical instrumentation research. Even though metal mercury represents unique electrode material advancing from its ideally smooth surface and high hydrogen overpotential<sup>1</sup>, strict ecological and safety rules with its low mechanical stability make it difficult to utilize. Searching for alternatives to mercury electrodes exhibiting an analogous electrochemical behavior represents an important contribution to the research in electroanalytical chemistry. Miniaturized electrodes, based on nontoxic material with proper analytical selectivity, reproducibility and sensitivity are required preferences. Different solid composite electrodes<sup>2,3</sup> can serve as substitutes for liquid mercury. Silver amalgam was found to be one of the most suitable alternative electrode material with its electrochemical behavior very close to mercury electrodes<sup>4-8</sup>. The silver solid amalgam electrodes (AgSAE) are usually prepared by mixing silver powder with liquid mercury or by electrodeposition of metal mercury on silver wire or vapor deposited silver film<sup>9-11</sup>. However, silver amalgam can be prepared by its direct electrodeposition on various conductive materials from the solution of both  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Hg}^{2+}$  ions<sup>12</sup>.

This work is focused on the preparation of silver amalgam particles (AgAP) by its direct electrodeposition on disposable screen printed silver electrodes (SPAgE) using double pulse chronoamperometry from the solution containing soluble  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Hg}^{2+}$  salts. Voltammetric application of the SPAgE decorated by AgAP was confirmed by analysis of model organic nitro compound (4-nitrophenol) using cyclic voltammetry.

### Experimental

Solution of 0.01 M  $\text{AgNO}_3$  (p.a. 99.8 % Safina) in 0.1 M  $\text{KNO}_3$  (p.a. >98 %, Fluka) was used. Solution of 0.01 M  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  in 0.1 M  $\text{KNO}_3$  was prepared by dissolution of exact amount of metal mercury (99.999%, Polarografie Praha) in quantitative volume of concentrated  $\text{HNO}_3$  (p.a. 65%, Sigma-Aldrich) in fume hood, then given amount of  $\text{KNO}_3$  and deionized water was added to reach required concentrations. 4-nitrophenol (Sigma-Aldrich). All solutions

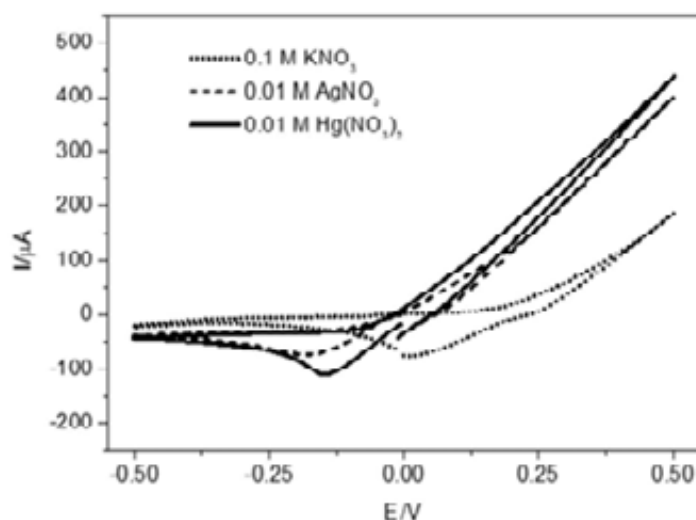
were prepared using deionized water (Millipore, Milli-Q water system). Other chemicals were of analytical grade.

Screen printed silver electrode used for all electrochemical measurements were printed on Horizon 8 (DEK) screen-printing machine. SPAgE carry three-electrode system consisting of silver working electrode, carbon auxiliary electrode and silver/silver chloride pseudoreference electrode.

Electrodeposition of the was carried out by double pulse chronoamperometry (DPCA) from net 0.01 M  $\text{Ag}^+/\text{Hg}^{2+}$  in 0.1 M  $\text{KNO}_3$ . All electrochemical measurements were carried out by Autolab PGStat128N operated by Nova software Ver. 1.10 (both Metrohm-Autolab). Cyclic voltammetry (CV) measurements of 4-nitrophenol were performed with initial potential 0.0 V, switching potential  $-1.0$  V, scan rate  $0.1 \text{ V s}^{-1}$ , and in background electrolyte 0.2 M acetate buffer (AcP) pH 5.0. The solution was purged with argon before each measurement. All experiments were performed at room temperature.

### Results and discussion

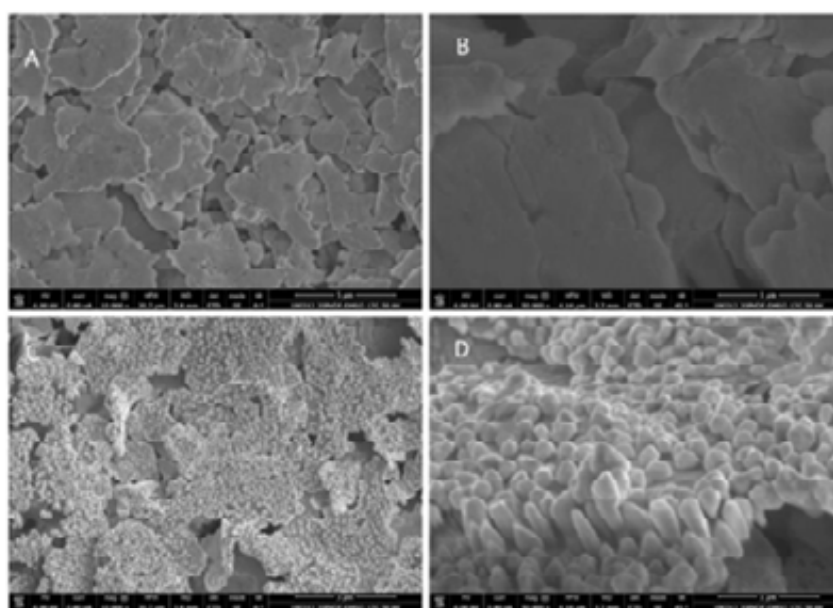
Before the electrodeposition of AgAP on SPAgE, electrochemical behaviour of the  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  ions and their mixture ( $\text{Ag}^+/\text{Hg}^{2+}$ , 30,6 % ( $w_{\text{Ag}}$ )) were individually studied using cyclic voltammetry within potential ranges of  $+0.5$  V to  $-0.5$  V at SPAgE CVs were measured in the solutions containing 0.01 M  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  or their mixture in  $0.1 \text{ mol.l}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ . Silver ions produced cathodic peak at  $-200$  mV at SPAgE and mercury produced cathodic peak at  $-150$  mV (Fig. 1). Voltammograms of  $\text{Ag}^+/\text{Hg}^{2+}$  mixture were analogous to voltammograms of single metals and allowed us to select suitable potentials for electrodeposition of AgAP on SPAgE.



**Fig. 1.** Cyclic voltammogram of 0.01 M  $\text{AgNO}_3$  and  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  in 0.1 M  $\text{KNO}_3$ . Initial potential 0.0 V, switching potentials  $-0.5$  V and  $0.5$  V, scan rate  $0.1 \text{ V.s}^{-1}$ .

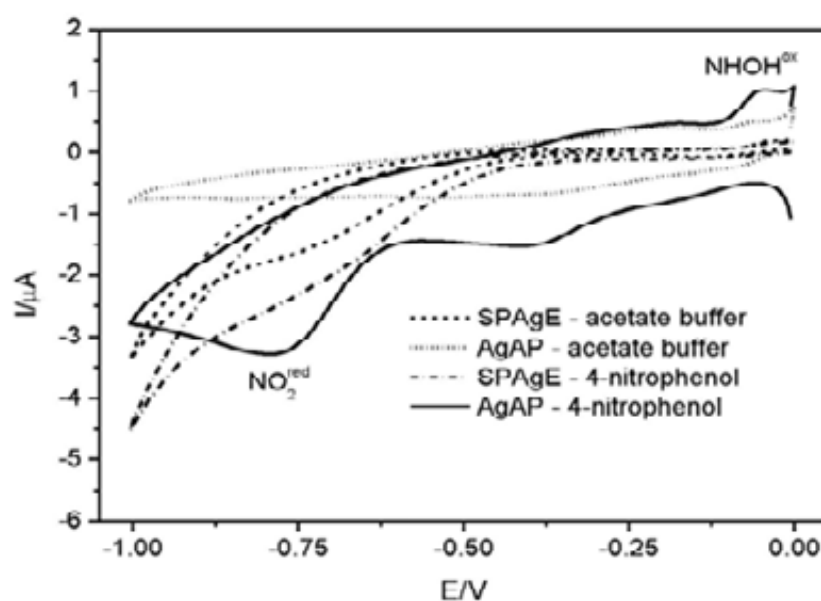
In agreement with results obtained for preparation of silver amalgam particles on ITO<sup>12</sup>, DPCA was selected as suitable method for electrodeposition of AgAP on SPAgE. During the optimization of the electrodepositions, different Ag/Hg ratio in solution and different parameters of chronoamperometry (pulse ( $E_1$ ) and grow ( $E_2$ ) potentials and times) were used. Morphology and constitution of the AgAP were characterized by scanning electron microscope with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX). Fig. 2 shows SEM

images of bare SPAgE and SPAgE decorated with AgAP prepared by DPCA ( $E_1 -1.5$  V,  $t_1$  50 ms,  $E_2 -0.2$  V,  $t_2$  60 s from Ag/Hg solution containing 30,6% (w/w) of  $Ag^+$ ).



**Fig. 2.** SEM images of SPAgE (magnification 10 000x (A) and 50 000x (B)) and SPAgE decorated with AgAP (magnification 10 000x (C) and 50 000x (D)).

Electrochemical qualities of all prepared SPAgE-AgAP were observed by CVs of 100  $\mu$ M 4-nitrophenol in 0.2 M AcB pH 5.0. While 4-nitrophenol yields only weakly developed wave at bare SPAgE noticeable cathodic peak  $NO_2^{red}$  related to reduction of  $NO_2$  group to hydroxylamine (NHOH) appeared close to -0.75 V at SPAgE-AgAP. Anodic signal related to electrochemical oxidation of arisen NHOH to NO appeared close -50 mV (Fig. 3). Hydrogen evolution shifted around 250 mV to more negative potentials at AgAP than at bare SPAgE.



**Fig. 3.** Cyclic voltammograms of 100  $\mu$ M 4-nitrophenol at SPAgE and SPAgE decorated with AgAP in 0.2 M acetate buffer pH 5.0. Initial potential 0.0 V, switching potential -1.0 V, scan rate 0.1  $V \cdot s^{-1}$ .

## Conclusion

This work confirmed the SPAgE as suitable platform for direct electrodeposition of silver amalgam particles from small volume of the solution decreasing its consumption. Simultaneous electro-reduction of silver and mercury ions could be applied for preparation of nanostructured and sufficiently stable silver amalgam particles with controllable distribution and surface coverage. This system combines advantages of nanomaterials (high charge transfer and common catalytic properties) and qualities of silver amalgam, which may further be applied for development of various electrochemical methods. Its electroanalytical application was proved by detection of model organic nitrocompound, 4-nitrophenol.

## Acknowledgements

This work was supported by The Czech Science Foundation (grant 17-23634Y). A part of the work was carried out with the support of CEITEC Nano Research Infrastructure (MEYS CR, 2016-2019).

## References

1. Barek J., Fogg A. G., Muck A., Zima J.: *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 31, 291 (2001).
2. Navratil T., Kopanica M.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32, 153 (2002).
3. Navratil T.: *Curr. Org. Chem.* 15, 2996 (2011).
4. Yosypchuk B., Novotny L.: *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 32, 141 (2002).
5. Yosypchuk B., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 189 (2009).
6. Danhel A., Barek J.: *Curr. Org. Chem.* 15, 2957 (2011).
7. Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B.: *Sensors* 6, 445 (2006).
8. Mikkelsen O., Schroder K. H.: *Electroanalysis* 15, 679 (2003).
9. Juskova P., Ostatna V., Palecek E., Foret F.: *Anal. Chem.* 82, 2690 (2010).
10. Bas B., Kowalski Z.: *Electroanalysis* 14, 1067 (2002).
11. Deylova D., Yosypchuk B., Vyskocil V., Barek J.: *Electroanalysis* 23, 1548 (2011).
12. Danhel A., Ligmajer F., Sikola T., Walcarius A., Fojta M.: *J. Electroanal. Chem.* 821, 53 (2018).

**Accumulation of Mercury Ions in Homothymine Stretches of DNA:  
A Voltammetric Study  
(Akumulace iontů rtuti v homothyminových úsecích DNA: voltamtrická studie)**

Monika Hermanová, Hana Pivoňková, Zuzana Bábková, and Miroslav Fojta  
Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, 61265, Brno,  
Czech Republic. E-mail: hermanova@ibp.cz

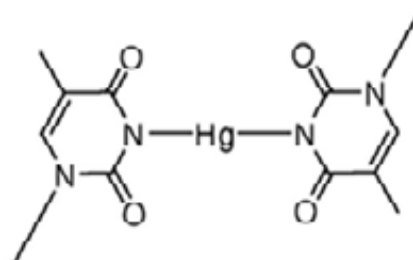
**Abstract**

Thymine residues in DNA are known to form T-Hg-T pairs mediated by mercury atom bound to N3 atoms in two thymines. In this work we studied complexation of mercury ions, anodically dissolved from mercury drop electrode, with thymine residues present in DNA oligonucleotides (ODNs) adsorbed at the electrode surface. Signals corresponding to reduction/oxidation of the mercury species were observed with homothymine but not homoadenine ODNs confirming specificity of this process for the thymine nucleobase. Moreover, analogous signals were detected with ODNs derived from telomeric repeat motifs involving dT<sub>n</sub> blocs for n ≥ 3. Intensity of these signals responded to the length of the dT<sub>n</sub> stretches.

**Key words:** Thymine, Oligonucleotide, Mercury, Complexation, Cyclic voltammetry.

**Úvod**

Dvojitá šroubovice DNA i alternativní struktury nukleových kyselin jsou založeny na párování nukleobází prostřednictvím vodíkových můstků<sup>1</sup>. Kromě tohoto přirozeného způsobu existují i možnosti tvorby párů bází prostřednictvím atomů (iontů) přechodných kovů. Tento jev je v literatuře dobře popsán pro tvorbu „párů“ thymin-thymin<sup>2</sup>, v nichž je mezi atomy dusíku v poloze 3 obou thyminových zbytků vázán atom rtuti (Obr. 1). Analogické páry mohou tvořit také dva cytosinové zbytky prostřednictvím iontu stříbra<sup>3</sup>. Podobně jako v případě přirozených párů bází, i tento typ párování může stabilizovat různé sekundární struktury jako intermolekulární dvoušroubovice nebo vlásenky tvořené příslušným homonukleotidovým úsekem<sup>2,4</sup>. Toho bylo využito v oblasti DNA nanotechnologií a ve vývoji biosenzorů pro těžké kovy pracující na bázi detekce konformačních změn sond DNA po navázání příslušného kovu<sup>4</sup>.



**Obr. 1.** Párování dvou thyminových zbytků prostřednictvím atomu rtuti.

Elektrochemické metody se osvědčily jako nástroje vhodné pro studium různých vlastností nukleových kyselin<sup>5</sup>, včetně jejich struktury a strukturních změn, enzymatické syntézy a dalších enzymových reakcí, poškození DNA a jejich interakcí jak s malými molekulami, tak s proteiny. Voltamtrické metody jsou obecně vhodné pro sledování tvorby, případně rozpouštění komplexů různých ligandů (včetně nukleobází) s ionty redox aktivních kovů (např. rtuti nebo mědi)<sup>6,7</sup>. V této práci jsme využili možnosti jednoduchého sledování interakce iontů rtuti generovaných přímo anodickou oxidací materiálu visící rtuťové kapkové

elektrody (HMDE) s ODN obsahujícími homothyminové úseky, adsorbovanými na jejím povrchu.

### Experimentální část

Pro měření byly použity následující jednořetězcové oligodeoxynukleotidy (ODN): dT<sub>30</sub> nebo dA<sub>30</sub> a oligodeoxynukleotidy odvozené z telomerových repetitivních sekvencí d(TTAGGG)<sub>4</sub> (lidský typ), d(TTTAGGG)<sub>4</sub> (*Arabidopsis*), d(TTTTAGGG)<sub>4</sub> (*Chlamydomonas*) a d(TTTTTAGGG)<sub>4</sub> (*Cestrum*) (Generi Biotech). Koncentrace ODN byla 10 µg ml<sup>-1</sup>, vzorky, ze kterých byly ODN adsorbovány na povrch elektrody, obsahovaly 0,2 M NaCl.

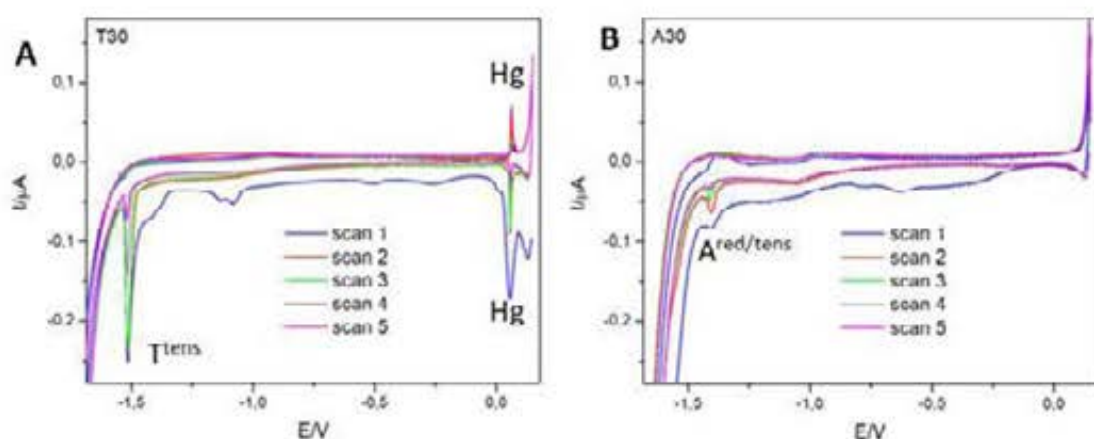
Všechna elektrochemická měření byla prováděna při laboratorní teplotě v tříelektrodevém zapojení (s visící rtuťovou kapkovou elektrodou, HMDE jako pracovní elektrodou, Ag/AgCl/3 M KCl jako referenční elektrodou a platinovým drátkem jako pomocnou elektrodou) na přístroji Autolab (Ecochemie) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm). Měření byla provedena adsorptivní přenosovou rozpouštěcí voltametrií (AdTS). DNA byla akumulována na povrchu elektrody ze 4 µl alikvotů po dobu 60 s, poté byla elektroda opláchnuta v deionizované vodě a umístěna do elektrochemické cely obsahující čistý elektrolyt. Cyklická voltametrie (CV) na HMDE byla prováděna v elektrolytu obsahujícím 0,3 M mravenčan amonný a 0,05 M fosforečnan sodný, pH 6,9; nastavení pro cyklickou voltametrii byla následující: počáteční potenciál 0,15 V, potenciál bodu obratu -1,85 V, koncový potenciál 0,15 V, scan rate 1 V s<sup>-1</sup>.

### Výsledky a diskuse

Na cyklických voltamogramech naměřených na HMDE s adsorbovanou vrstvou dT<sub>30</sub> (obrázek 2A) jsou patrné výrazné proudové signály ve dvou potenciálových oblastech. Ostrý pík na katodické větvi CV okolo -1,5 V (pík T<sup>ens</sup>) lze připsat desorpci či reorientaci řetězců dT<sub>30</sub> v důsledku elektrostatické repulze na negativně nabitým povrchu elektrody (elektrochemickou redukcí thyminových zbytků nelze za daných podmínek na HMDE pozorovat). Píky označené v obrázku 1 jako „Hg“ odpovídají redukcí, resp. oxidaci iontů/atomů rtuti interagujících s thyminovými zbytky v adsorbované vrstvě dT<sub>30</sub>. Ze zaznamenaných křivek je patrné, že při hodnotě počátečního potenciálu dochází k akumulaci iontů rtuti v dT<sub>30</sub> na povrchu HMDE. Rtuť ze vzniklých komplexů s thyminovými zbytky je v katodickém skenu potenciálu redukována za vzniku výrazného katodického píku okolo 0.0 V. V opakovaných CV skenech pak dochází ke stabilizaci páru reverzibilních ostrých píků, jejichž výška postupně klesá. Paralelně dochází k poklesu výšky píku T<sup>ens</sup> v důsledku postupného odstraňování dT<sub>30</sub>, což napovídá, že množství iontů/atomů rtuti vstupující do zmíněné reverzibilní redox reakce je dáno množstvím dT<sub>30</sub> dostupného na povrchu elektrody. V analogickém experimentu s dA<sub>30</sub> jsme nepozorovali tvorbu komplexů ODN se rtuť, jak je patrné z obr. 2B, kde se v oblasti potenciálů kolem 0.0 V nevyskytují žádné dobře definované píky. Toto pozorování je ve shodě s očekávanou tvorbou specifických komplexů T-Hg-T (obr. 1).

V dalším experimentu jsme zkoumali možnost detekce komplexů rtuti s thyminovými zbytky v úsecích DNA obsahujících kratší homothyminové bloky. K tomu účelu jsme mimo jiné zvolili telomerové sekvence z různých organismů, které se liší právě počtem thyminových zbytků (viz experimentální část). Zatímco v případě sekvence z lidské telomery (dva thyminové zbytky v bloku) nebyl pozorován dobře vyvinutý signál Hg, již tři thyminové zbytky v bloku stačily na to, aby byly signály odpovídající tvorbě komplexů se rtuť dobře patrné. S dalším prodlužováním úseků dT<sub>n</sub> výška příslušných signálů výrazně rostla.





**Obr. 2.** Cyklické voltamogramy získané na HMDE modifikované adsorbovanou vrstvou ODN (A) dT<sub>30</sub> nebo (B) dA<sub>30</sub> (zobrazeno je vždy pět po sobě následujících potenciálových cyklů)

### Závěr

V naší práci ukazujeme, že je možno pomocí CV na HMDE jednoduše sledovat specifickou tvorbu komplexů rtuti s thyminovými zbytky v adsorbované vrstvě DNA oligonukleotidů. Tvorba těchto komplexů probíhá nejen v homooligonukleotidu dT<sub>30</sub>, ale i v oligothyminových blocích uvnitř sekvencí obsahujících jiné báze. Výsledky této práce naznačují možnost využití tohoto přístupu k detekci a odhadu zastoupení dT<sub>n</sub> úseků v DNA.

### Acknowledgement

Tato práce vznikla za podpory projektu SYMBIT reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15\_003/0000477 financovaného z ERDF a institucionálních zdrojů Biofyzikálního ústavu AVČR (č. 68081707).

### References

1. Kypř J., Kejnovská I., Renčíuk D., Vorličková M.: *Nucleic Acids Res.* **37**, 1713 (2009).
2. Liu G. F., Li Z. W., Zhu J. F., Liu Y., Zhou Y., He J. L.: *New J Chem* **39**, 8752 (2015).
3. Ono A., Cao S., Togashi H., Tashiro M., Fujimoto T., Machinami T., Oda S., Miyake Y., Okamoto I., Tanaka Y.: *Chem Commun* **2008**, 4825.
4. He L. L., Cheng L., Lin Y., Cui H. F., Hong N., Peng H., Kong D. R., Chen C. D., Zhang J., Wei G. B., Fan H.: *J Electroanal Chem* **814**, 161 (2018).
5. Paleček E., Bartošík M.: *Chem Rev* **112**, 3427 (2012).
6. Hason S., Pivonkova H., Vetterl V., Fojta M.: *Anal Chem* **80**, 2391 (2008).
7. Hason S., Vetterl V.: *Talanta* **69**, 572 (2006).

## Mechanism of the Water Clusters Formation in the Organic Phase in the Presence of Hydrated Ions

Karel Holub, Zdeněk Samec, and Vladimír Mareček

J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences,  
Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: vladimir.marecek@jh-inst.cas.cz

### Abstract

A two-electrode cell comprising a liquid/liquid interface is used to study the water clusters formation in the organic solvent phase following the extraction of tetraalkylammonium chloride (TAACl) from the aqueous phase. The change in the concentration of the common TAA<sup>+</sup> ion on the aqueous side of the interface is monitored by the open circuit potential measurements. It is shown that the amount of TAACl extracted into the organic phase exceeds considerably the limit determined by the concentration of Cl<sup>-</sup> in the organic phase at a given interfacial potential difference and the electroneutrality condition. A mechanism is proposed including an accumulation of the excess TAACl in the water clusters formed from the hydration shell of the Cl<sup>-</sup> ions, water already dissolved in the organic phase, and additional water extracted from the aqueous phase. At higher concentration of TAACl in the aqueous phase this process leads to the formation of emulsion in the organic phase.

**Key words:** Liquid/liquid interface, Water co-extraction dynamics, Emulsification, OCP measurement.

### Introduction

Since its discovery in 1879<sup>1</sup>, the spontaneous emulsification at the boundary between two immiscible liquids has attracted a great deal of interest mainly due to its practical significance. Numerous experimental findings on this subject have been reviewed, and several mechanisms accounting for the spontaneous emulsification have been considered<sup>2,3</sup>. These mechanisms were based on the interfacial turbulence, transient (negative) interfacial tension, diffusion and stranding, or Marangoni effect. On the other hand, only few studies dealt with the spontaneous emulsification from the electrochemical point of view. An electrochemical system with a liquid/liquid interface represents an excellent tool to study the mechanism of this process. Thus, the formation of water-in-oil emulsion droplets was observed microscopically at the nonpolarized interface between two immiscible electrolyte solutions (ITIES), which was formed at the boundary between an aqueous solution of tetraethylammonium chloride (TEACl) and the solution of potassium chloride in *o*-NPOE<sup>4</sup>. Subsequently, we have shown that the emulsification process at the nonpolarized ITIES can be monitored indirectly by means of the transient open circuit potential (OCP) measurements using an electrochemical measuring cell<sup>5</sup>. Theoretical analysis of experimental data indicated that the emulsification process is probably controlled by diffusion. More recently, based on the new transient OCP measurements, we have proposed a mechanism comprising the transfer of the tetraalkylammonium chloride (TAACl) salt across the ITIES followed by its reaction with the co-extracted water molecules, which leads to the formation of clusters of water containing TAACl in the organic phase<sup>6</sup>. It is worth noticing that the inverse process, i.e., the fusion of the emulsion droplets with the ITIES, can be also investigated electrochemically<sup>5,7,8</sup>.

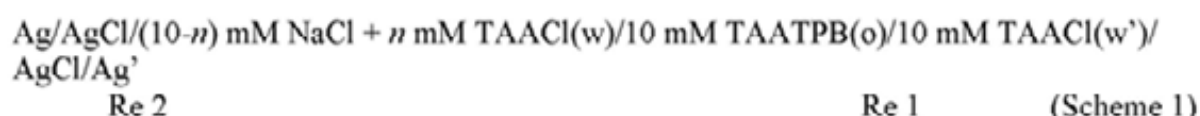
The aim of this study was to perform a detailed analysis of the water cluster formation in the organic phase. This analysis is based on the monitoring of the transfer of TAACl across a liquid/liquid interface using the OCP method at defined initial conditions at the interface. The

advantage of the OCP method is that the electroneutrality is maintained by the ions transport across the interface only, and not by the current supplied by the counter electrodes under the potentiostatic conditions. Consequently, the processes at the interface are not influenced by an applied voltage, and the ions are crossing the interface in the form of a neutral salt.

### Experimental

Reagent grade sodium tetrphenylborate (NaTPB), tetrabutylammonium chloride (TBACl), tetrabutylammonium tetrphenylborate (TBATPB) and tetrapentylammonium chloride (TPeACl) were supplied by Fluka AG, and used as received. Tetrapentylammonium tetrphenylborate (TPeATPB) was prepared by metathesis of TPeACl and NaTPB. Electrolyte solutions were prepared using deionized water ( $< 0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$ , GORO system, Czech Republic), and 1,2-dichloroethane (1,2-DCE, 99%, Penta).

A two-electrode cell was used throughout, the scheme of which can be described by



where  $n = 1$  or  $10$ , and TAA is TBA or TPeA. A liquid/liquid interface was supported at the tip of an L-shaped glass capillary with an orifice diameter of  $1.5 \text{ mm}$ <sup>6</sup>. The capillary was filled with the aqueous phase (w) and immersed in the organic phase (o) (volume  $< 2 \text{ mL}$ ). A small air bubble was left in the capillary tip to prevent contact between the phases before starting the first OCP measurement. At the start, the air bubble was ejected by a syringe connected to the capillary. This procedure enabled us to initiate the OCP measurement under the defined initial conditions, in particular with the chloride concentration in the organic phase being equal to zero. In all experiments, the organic phase was equilibrated with pure water before preparing the cell. The solutions forming the reference interface w'/o were equilibrated mutually.

### Results and discussion

#### *The OCP and concentration transients*

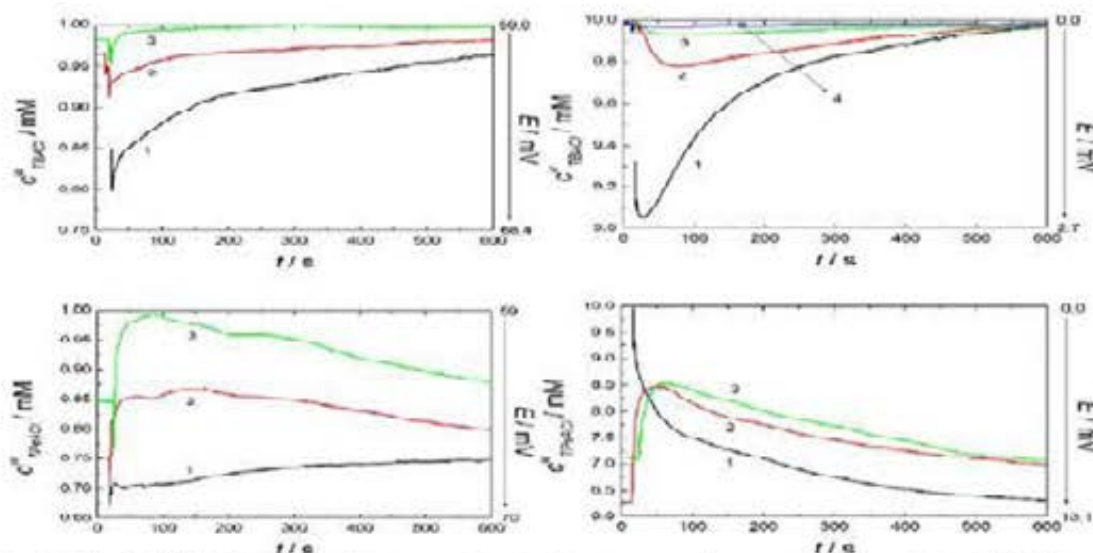
Assuming that the potential differences of the Ag/AgCl electrodes in the cell described by Scheme 1 compensate for one another, the cell potential difference  $E$  can be expressed as<sup>9</sup>

$$E(t) = \left(\frac{RT}{F}\right) \ln \left[ \frac{c_{\text{TAACl}}^{\text{w}}}{c_{\text{TAACl}}^{\text{w}}(0, t)} \right] \quad (1)$$

where the concentration of TAACl in the reference aqueous phase (w') is a constant,  $c_{\text{TAACl}}^{\text{w}} = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ . While the concentration increment of the extracted TAACl in the organic phase should balance the concentration decrement of TAACl in the aqueous phase (w), the concentration of TAA<sup>+</sup> in the organic phase is limited by the very low equilibrium concentration of the chloride ions, cf. Table I<sup>9</sup> and electroneutrality condition. Consequently, the changes in the concentration of the potential-determining TAA<sup>+</sup> in the organic phase can be neglected, though the transfer of TAACl is taking place being presumably driven by its accumulation in the formed water clusters. The OCP transient can be then related directly to the transient concentration  $c_{\text{TAACl}}^{\text{w}}(0, t)$  of TAACl on the aqueous side of the interface ( $x=0$ ).

In this study, four different potential differences have been utilised using the common TBA<sup>+</sup> or TPeA<sup>+</sup> cation in the concentration ratio 1:1 or 1:10 (w/o). In all cases the initial

concentration of chloride ions was equal to 10 mmol L<sup>-1</sup> or zero in the aqueous phase (w) or the organic phase (o), respectively. The initial and subsequent concentration transients (CT) for 1 and 10 mM TBACl or TPeACl in the aqueous phase are shown in Fig. 1. After the first OCP measurement run, the interface was renewed with the help of the syringe connected to the capillary.

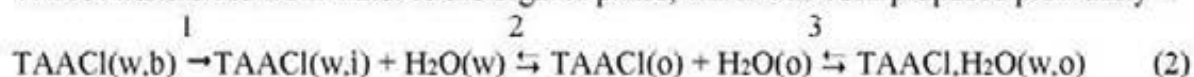


**Fig. 1.** The initial (1) and subsequent (2, 3, 4) concentration transients of TBACl(w) and TPeACl(w). Left: 1 mM, right: 10 mM. The time zero does not correspond to creating or renewing the liquid/liquid interface. The right axes show the open circuit potential change.

The most striking experimental observation is the remarkable decrease of the TAACl concentration on the aqueous side of the interface, which seems to exceed significantly the limit of the ionic concentration of Cl<sup>-</sup> in the organic phase (o), cf. Table 1<sup>9</sup>. Obviously, a mechanism is to be considered, which enables the extracted TAACl to be accumulated in the organic phase in a neutral form. There is a significant difference between TBACl and TPeACl CTs records shown in Fig. 1. After an abrupt initial concentration decrease, the concentration TBACl(w) at the interface slowly returns to the bulk concentration of 1 or 10 mmol L<sup>-1</sup>, the concentration of 10 mM TPeACl(w) decreases further to the value of 6.3 mM in 600 s. The subsequent CTs for TBACl display smaller and smaller concentration changes (records 2-4 in Fig 1), which indicates that the extraction of TBACl from the aqueous phase to the organic phase is slower than the diffusion of TBACl from the aqueous phase bulk to the interface. In contrast to this behaviour, the transfer of 10 mM TPeACl to the organic phase is dominant and exceeds its diffusion from the bulk of the aqueous phase. In the case of 1 mM TPeACl, the initial CT shows only a minor concentration change, while a concentration decrease is apparent from the subsequent CTs, cf. curves 2 and 3 in Fig. 1.

#### *Analysis of the concentration transients*

An analysis of the concentration transients can be based on the simplified mechanism of the TAACl transferred from water to the organic phase, which has been proposed previously<sup>6</sup>:



where (w,b) denotes bulk of the aqueous phase, (w,i) denotes the aqueous side of the interface and (w,o) water clusters in the organic phase. In the step 1, TAACl diffuses to the interface to replenish the amount  $\Phi$  of TAACl extracted into the organic phase in the step 2. The amount  $\Phi$  is generally defined as the integral of the diffusion flux  $J(t)$  with time as integration

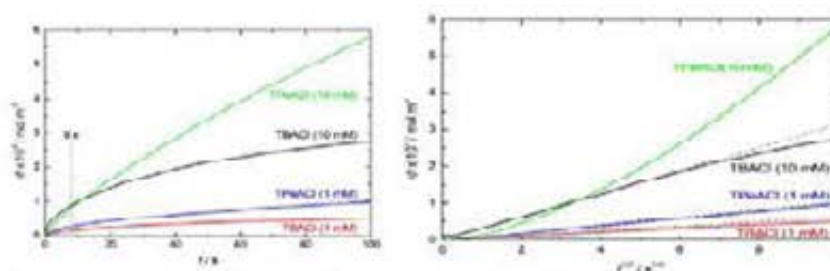
variable. The diffusion flux  $J(t)$  can be calculated from the concentration difference between the initial (bulk) TAACl concentration  $c_{\text{TAACl}}^{\text{w},0}$  and the concentration  $c_{\text{TAACl}}^{\text{w}}(0, t)$  of TAACl on the aqueous side of the interface, as inferred from a CT by using Eq. (3)

$$J(t) = Df(t)/\sqrt{(\pi Dt)} \quad (3)$$

where  $f(t) = c_{\text{TAACl}}^{\text{w},0} - c_{\text{TAACl}}^{\text{w}}(0, t)$  and  $D = 9 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ .

This approach was used to compare the time dependences of  $\Phi$  for all the TAACl electrolytes extracted into the organic solvent phase in the first 100 s, cf. Fig. 2, left. As indicated above in connection with the decrease of the TAACl concentration on the aqueous side of the interface, these estimates yield the amount  $\Phi$ , which is much higher than the amount corresponding to the equilibrium concentrations of TAA<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions in the organic phase (o), cf. Table I.

As it can be seen from Fig. 2, left, the amount of TAACl extracted from the aqueous to the organic phase is higher for 10 mM TAACl than for 1 mM TAACl, as expected. On the other hand, the amount of the salt extracted from 10 mM TBACl is higher than the amount of the salt extracted from 1 mM TPeACl, even though the equilibrium concentrations of TAA<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> in the organic phase for 1 mM TPeACl are 10 times higher. Such behavior indicates that the extraction process is controlled by the diffusion of TAACl in the aqueous phase. Indeed, the plots of the values of  $\Phi$  from Fig. 2, right, vs the square root of time  $t$  exhibit the linear part crossing the origin of coordinates being characteristic for a diffusion controlled process, except for the plot for 10 mM TPeACl. After ca. 20 s these plots decline from the linearity pointing to a kinetic effect. Transition from the diffusion to the kinetic control can be observed also on the CT 1 for 10 mM TBACl shown in Fig. 1. After 8 s from the beginning of the CT, the decrease of  $c_{\text{TAACl}}^{\text{w}}(0, t)$  slows down and then starts to rise, indicating that the transfer of TBACl to the organic phase becomes slower than the diffusion of TBACl in the aqueous phase. This time was used in a comparison of the extracted amounts  $\Phi$  of TAACl in the systems studied. The values of  $\Phi(8)$  at  $t = 8$  s are summarized in Table I.



**Fig. 2.** Left: The amount  $\Phi$  of TAACl extracted into the organic phase in the first 100 s estimated as the integral of the diffusion flux  $J(t)$  according to Eq. (3). Right: Plots of the amount  $\Phi$  of TAACl extracted into the organic phase vs the square root of time  $t$ .

The amount of water co-extracted from the aqueous phase can be estimated from the amount of TAACl extracted on assuming that the partition equilibrium holds between the dissolved TAACl and TAACl accumulated in the water clusters in the organic phase. The amount of water required to form water clusters was then estimated using the values of the partition coefficients for TBACl and TPeACl,  $P_{\text{TBACl}} = 4.8 \times 10^{-5}$  and  $P_{\text{TPeACl}} = 8.84 \times 10^{-3}$ , respectively<sup>10</sup>. The concentration of TAACl in the diffuse layer was calculated from the value of  $\Phi(8)$  cf. Table 1, and the volume  $1.5 \times 10^{-4} \text{ m}^3$  of the diffuse layer in 8 s. Estimated concentrations  $c_{\text{TAACl}}^{\text{w},o}$  of TAACl in water clusters and the amount of water (in moles) needed to form water clusters are also given in Table 1. It can be seen that the amount of water in water clusters  $\text{H}_2\text{O}(\text{w},o)$  is considerably higher than the amount of water dissolved in the

organic phase, i.e.,  $0.126 \text{ mol L}^{-1}$  <sup>10</sup> and that one co-extracted with the chloride ions from the aqueous phase,  $\sim 2.5$  moles of  $\text{H}_2\text{O}$  per 1 mole of  $\text{Cl}^-$  <sup>11</sup>. Contents of water in the diffuse layer (in 8 s) is only 0.019 moles, which is considerably lower than the amount of  $\text{H}_2\text{O}$  forming the water clusters.

**Table I.**

Equilibrium concentration  $c_{\text{Cl}^-}^o$  of chloride ions in the organic phase; amount  $Q(8)$  of TAACl extracted into the organic phase in the first 8 s, as derived from the CT; calculated concentration  $c_{\text{TAACl}(w,0)}$  of TAACl in the water clusters at  $t = 8$  s; amount  $n_{\text{H}_2\text{O}(w,0)}$  of water forming the water clusters at  $t = 8$  s.

Aqueous phase	$c_{\text{Cl}^-}^o$ [ $\mu\text{M}$ ]	$10^5 Q(8)$ [ $\text{mol m}^{-2}$ ]	$c_{\text{TAACl}(w,0)}$ [ $\text{mM}$ ]	$n_{\text{H}_2\text{O}(w,0)}$ [ $\text{mol}$ ]
1 mM TBACl	0.046	1.68	0.56	1.67
10 mM TBACl	0.46	8.87	5.55	0.87
1 mM TPeACl	8.73	2.5	0.58	2.4
10 mM TPeACl	87.3	8.35	5.83	0.8

## Conclusions

A new phenomenon is reported, which is represented by a superfluous and continuing extraction of TPeACl. This term refers to the amount of the salt extracted over the amount limited by the solubility of one salt component (here chloride anion) and the electroneutrality condition. Driving force of the superfluous extraction is the formation of a new phase (here the water cluster phase), which can accumulate the excess salt. For a limited time, the superfluous extraction is observed also in the case of TBACl. The mechanism of the water cluster formation at a liquid/liquid interface is proposed. It is demonstrated that the amount of water dissolved in the organic phase or transferred in the solvation shell of chloride ions is not sufficient to form the water clusters containing TAACl in the organic phase. Although a diffusion of water to the organic phase is crucial for the water clusters formation, it is not the rate determining step, because of its large concentration difference. More probably, the rate determining step is likely to be a reorganization of water molecules in the organic phase and to the formation of water clusters.

## Acknowledgements

Financial support from the Czech Science Foundation (project number 17-09980S) is gratefully acknowledged.

## References

- Gad J.: Arch. Anat. Physiol. *181* (1878).
- Miller C.: Colloids Surf. *29*, 89 (1988).
- Lopez-Montilla J.C., Herrera-Morales P. E., Pandey S., Shah D. O.: J. Dispers. Sci. Technol. *23*, 219 (2002).
- Aoki K., Li M., Chen J., Nishiumi T.: Electrochem. Commun. *11*, 239 (2009).
- Silver B.R., Holub K., Marecek V.: J. Electroanal. Chem. *805*, 91 (2017).
- Marecek V.: Electrochem. Commun. *88*, 57 (2018).
- Laborda E., Molina A., Espin V.F., Martinez-Ortiz F., de la Torre J.G., Compton R.G.: Angew. Chem. Int. Ed. *56*, 782 (2017).
- Trojanek A., Marecek V., Samec Z.: Electrochem. Commun. *86*, 113 (2018).
- Holub K., Samec Z., Marecek V.: Electrochim. Acta, submitted 2019.
- Czapkiewicz J., Czapkiewicz-Tutaj B.: J. Chem. Soc. Faraday Trans. *76*, 1663 (1980).
- Kenjo T., Diamond R.M.: J. Inorg. Nuclear Chem. *36*, 183 (1974).

## Modification of Screen Printed Electrodes using Spark Discharge (Modifikace tištěných elektrod jiskrovým výbojem)

Jan Hrbáč<sup>a</sup>, Mamas I. Prodromidis<sup>b</sup>, Maria G. Trachioti<sup>b</sup>, Eleni I. Tzianni<sup>b</sup>, and Daniel Riman<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Ústav Chemie, Masarykova Univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic,  
E-mail: jhrbac@atlas.cz

<sup>b</sup> Department of Chemistry, University of Ioannina, Ioannina 451 10, Greece

<sup>c</sup> Department of Analytical Chemistry, Palacky University, Faculty of Science, 17. listopadu 12,  
771 46 Olomouc, Czech Republic.

### Abstract

A novel way of electrode modification by electrical spark discharge allows simultaneous activation of the target sensing electrode and its modification by nanoparticles derived from the source electrode involved in the sparking process. Automated procedure using the 3D sparking affords dense coverage of the electrode by nanoparticles. The possibilities of the control of various aspects of the sparking process which could lead to control of the extent of the substrate electrode surface activation and/or damage, nanoparticle size and coverage density control are outlined.

**Key words:** Electric discharge, Spark deposition, Metal electrodes, Screen printed electrode.

### Úvod

Senzory pro stanovení nejrůznějších analytů důležitých v nejrůznějších odvětvích průmyslu a výzkumu často využívají elektrochemické principy. Nové strategie modifikace levných a jednorázově použitelných sensorových substrátů využívajících anorganické nanočástice (např. kovové), které zabezpečují odezvu na cílový analyt jsou stále intenzivně vyvíjeny. Zhotovení senzorů na bázi nanočástic může být poměrně komplikované a vyžadovat celou řadu kroků, jako např. syntéza nanočástic, jejich purifikace, smíchání s vhodnou maticí, nanosení na senzor, teplotní stabilizaci apod. Specifickým problémem tištěných senzorů bývá z elektrochemického hlediska nepříliš kvalitní povrch, způsobující pomalý přenos náboje mezi povrchem elektrody a elektroaktivním analytem nebo modifikující nanočásticemi. Protože je obtížné tištěné elektrody leštit, k aktivaci před vlastní modifikací nanočásticemi se používají elektrochemické postupy (vystavení konstantnímu potenciálu o dostatečné hodnotě ve vhodném elektrolytu, cyklování potenciálu mezi dvěma krajními hodnotami aj.), chemické postupy (např. ponoření do oxidujících směsí) nebo působení nízkoteplotní plasmy.

Nový přístup založený na vystavení povrchu tištěné elektrody jiskrovému výboji umožňuje současnou aktivaci sensorového substrátu a modifikaci povrchu nanočásticemi. Modifikace pomocí jiskrového výboje je založena na přiblížení elektrody z vodivého materiálu (kov, uhlík apod.) k tištěné elektrodě až na vzdálenost, při které přeskóčí jiskra. Při modifikaci jsou zdrojová a tištěná elektroda připojeny k stejnosměrnému vysokému napětí 800-1200 V. Toto napětí je dostatečné k překonání dielektrické pevnosti vzduchu a vzniklá elektrická jiskra vypaří malé množství materiálu obou elektrod a převede je do formy mikroplasmatu. Mikroplasma obsahující původní materiál elektrod, eventuálně převedený na oxidickou formu vlivem interakce s kyslíkem v atmosféře je prudce ochlazeno, přičemž vzniklé nanočástice jsou imobilizovány na povrchu tištěné elektrody. Tímto způsobem byla zhotovena řada senzorů pracujících na prekoncentračním principu, založených na tištěných elektrodách modifikovaných Bi<sup>1</sup>, Sn<sup>2</sup> a Au<sup>3</sup>, umožňujících stanovení kovových iontů monitorovaných z hlediska ochrany životního prostředí, tj. Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, As<sup>3+/5+</sup> apod., v souladu se snahami o nalezení elektrodových materiálů, které by se svými vlastnostmi vyrovnaly rtuťovým elektrodám, jejichž využití je v současnosti omežováno nařízením EU. Na příkladu riboflavinu (vitamin B2), u něhož prekoncentrace umožnila dosáhnout

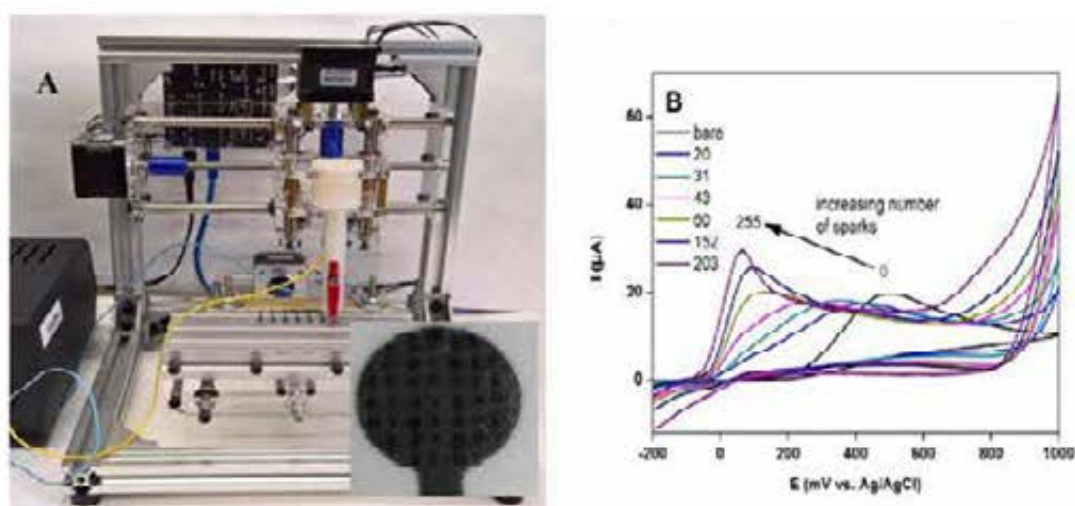
sub-nanomolárních koncentračních detekčních limitů<sup>4</sup> bylo ukázáno, že bismutem modifikované tištěné elektrody jsou využitelné jako alternativa rtuťových elektrod též pro stanovení redukovatelných organických látek. Kromě senzorů pracujících na prekoncentračním principu byl jiskrový výboj využit též pro přípravu funkčních senzorů. Tištěné elektrody ojískřené Cu, Ni a slitinami CuNi byly testovány jako neenzymatické glukosové senzory<sup>5</sup>, analytický signál je ovšem dán výhradně interakcí glukosy s nanočásticemi, zatímco uhlíkový podklad k signálu senzoru nepřispívá. Dalším krokem bylo nalezení podmínek, za kterých by modifikace jiskrového výboje vedla nejen k bifunkčním povrchům (tj. povrchu obsahujícímu jak uhlík, tak i nanočástice), ale i k povrchům, u nichž jsou vlastnosti dány jen nanočásticemi. Tento cíl je snadno dosažitelný v případě mikroelektrod z uhlíkového vlákna díky jejich malé velikosti<sup>6</sup>. Nedávno jsme ukázali, že monofunkční povrch lze vyrobit i u tištěných elektrod, kde husté pokrytí nanočásticemi bylo dosaženo kontrolou rozmístění výbojů pomocí 3D pozicionéru<sup>7</sup>.

### Experimentální část

Au drátek (Alfa Aesar, 99.95%), nebo eutektická slitina AuSi byly využity jako zdrojové elektrody. Tištěné elektrody byly zhotoveny na universitě v Ioannině. Kyselina askorbová byla zakoupena u firmy Sigma-Aldrich. Elektrochemická měření byla prováděna pomocí pracovní stanice Nanoampere1 (L-Chem, ČR) v běžném tříelektrodovém zapojení. Jako referentní elektroda byla použita Ag/AgCl, 3M KCl (RE5B, Bioanalytical Systems, Inc.), hodnoty potenciálů v textu jsou udávány proti této elektrodě.

### Výsledky a diskuse

Přes poměrně rozsáhlé zkušenosti získané ve výše uvedených studiích zůstává mnoho otázek k řešení. Většina prací byla prováděna primitivním způsobem, kdy elektroda ze zdrojového materiálu byla přibližována k cílové elektrodě ručně, až nastal výboj a ojískřená místa byla rozmístěna pokud možno rovnoměrně. V současnosti byla procedura automatizována pomocí 3D pozicionéru (Obr. 1A), v prvním kroku byl imitován osvědčený protokol, kdy zdrojová elektroda je k povrchu přiblížena a po proběhnutí výboje je zase oddálena.



**Obr. 1.** A: 3D pozicionér, B: Série voltamogramů askorbátu (1 mM, 100 mV/s) pro různý počet jisker pomocí protielektrody ze slitiny AuSi při 1000 V.

Výboje byly rozmístěny rovnoměrně po povrchu tištěné elektrody v různých vzdálenostech. Pilotní analyt (askorbát) poskytuje elektrochemické odezvy jak na zlatě, tak i na SPE uhlíku; kvalita povrchu elektrody může být proto snadno sledována v důsledku posunu potenciálu CV piku v důsledku elektrokatalytického efektu nanočástic zlata (Obr. 1B). Strojové provedení



zabezpečuje lepší reprodukovatelnost modifikace a její optimalizaci kontrolou rychlosti pohybu a vzdálenosti mezi modifikující a modifikovanou elektrodou. Pro příští studie se nabízí rovnoměrný posun elektrody v konstantní vzdálenosti od modifikovaného povrchu. Další možnosti kontroly modifikačního procesu skýtají úpravy zdroje vysokého napětí, např. kontrola vybíjecí charakteristiky.

### **Závěr**

V budoucích výzkumech se zamýšlíme věnovat následujícím otázkám, které by mohly ovlivňovat vlastnosti výsledných senzorů, tj. detekční limit, linearitu, stabilitu odezvy a reprodukovatelnost přípravy. Zejména půjde o: i. kontrolu vlivu jiskrového výboje na podkladovou vrstvu uhlíku za účelem nalezení optimálního kompromisu mezi aktivací povrchu a minimální destrukcí. Jiskrový výboj patrně způsobuje (částečnou nebo úplnou) exfoliaci grafitu přítomného v inkoustu tištěné elektrody a zavádí kyslíkaté funkční skupiny, pokud je výboj prováděn v atmosféře obsahující kyslík. ii. kontrolu velikost deponovaných nanočástic. Tento cíl by měl být dosažitelný kontrolou energie výboje a doby chlazení generované mikroplazmy. iii. Kontrolu hustoty pokrytí elektrody nanočásticemi. Úplná nebo alespoň částečná převaha konvergentní difúze, nastávající v určitém rozmezí hustoty pokrytí by měla umožnit dosažení výrazně nižších detekčních limitů (vlivem zlepšení poměru signál-šum) ve srovnání s makroelektrodou stejné geometrické velikosti.

### **References**

1. Riman D., Jirovsky D., Hrbac J., Prodromidis M. I.: *Electrochem. Commun.* *50*, 20 (2015).
2. Trachioti M. G., Hrbac J., Prodromidis M. I.: *Sensor. Actuat. B-Chem.* *260*, 1076 (2018).
3. Trachioti M. G., Karantzalis A. E., Hrbac J., Prodromidis M. I.: *Sensor. Actuat. B-Chem.* *281*, 273 (2019).
4. Riman D., Avgeropoulos A., Hrbac J., Prodromidis M. I.: *Electrochim. Acta* *165*, 410 (2015).
5. Riman D., Spyrou K., Karantzalis A. E., Hrbac J., Prodromidis M. I.: *Talanta* *165*, 466 (2017).
6. Bartosova Z., Riman D., Halouzka V., Vostalova J., Simanek V., Hrbac J., Jirovsky D.: *Anal. Chim. Acta* *935*, 82 (2016).
7. Trachioti M. G., Tzianni E. I., Riman D., Jurmanova J., Prodromidis M. I., Hrbac J.: *Electrochim. Acta* *304*, 292 (2019).

## Charge Transport in Single Oligophenylene Molecular Wires with Different Anchoring Groups

Magdaléna Hromadová<sup>a</sup>, Viliam Kolivoška<sup>a</sup>, Jakub Šebera<sup>a</sup>, Táňa Sebechlebská<sup>a,b</sup>, Jindřich Gasior<sup>a</sup>, Štěpánka Nováková Lachmanová<sup>a</sup>, Gábor Mészáros<sup>c</sup>, Marcin Lindner<sup>d</sup>, Marcel Mayor<sup>d,e</sup>, and Michal Valášek<sup>d</sup>

<sup>a</sup>J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: hromadom@jh-inst.cas.cz

<sup>b</sup>Department of Physical and Theoretical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak Republic

<sup>c</sup>Institute of Materials and Environmental Chemistry, Research Centre for Natural Sciences, HAS, Magyar tudósok krt. 2, H-1117 Budapest, Hungary

<sup>d</sup>Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Institute of Nanotechnology, P.O. Box 3640, 76021 Karlsruhe, Germany

<sup>e</sup>Department of Chemistry, University of Basel, CH-4056 Basel, Switzerland

### Abstract

This work compares single molecule conductance measurements of selected organic systems containing identical oligophenylene molecular wires and different tripodal anchoring groups. Single molecule conductance  $G$  was obtained by a scanning tunneling microscopy break junction technique complemented by theoretical calculations based on the density functional theory and non-equilibrium Green's function formalism. Two molecules were compared where the same oligophenylene wire is connected to one of the electrodes via a tripod substituted on each leg by a thiol group either in the *meta* or *para* position. By combined experimental and theoretical analysis it was possible to confirm that single molecule conductance in the metal-molecule-metal junction of both molecules corresponds to a fully extended molecular wire, which is attached to one of the electrodes by all three thiolate bonds of the tripod. Experimental results confirmed that  $G$  value of *meta*-connected molecules is lower than that of *para*, whereas junction formation probability was higher for *meta* functionalization.

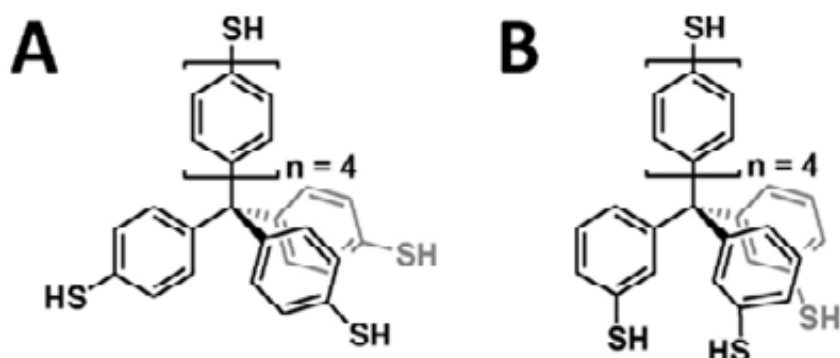
**Key words:** Single molecule conductance, Tetraphenylmethane Tripodal anchor, STM break junction.

### Introduction

Advancement of molecular electronics relies on the availability of highly stable electronic components with prescribed functionalities, for example well-conducting molecular wires<sup>1,2</sup>, molecular switches<sup>3-5</sup>, molecular diodes<sup>6</sup>, transistors<sup>7</sup> and single molecule magnets<sup>8</sup>. Directional attachment of molecular wires to an electronic board is thus sought for. This function can be implemented by use of the multipodal anchors that direct the molecular wire perpendicular to the main board. Recently, several such anchoring groups have been reported<sup>9-12</sup>. We have studied single molecule conductance properties and geometric arrangement of two types of tripodal anchoring groups: spirobifluorene-based<sup>13,14</sup> and tetraphenylmethane-based<sup>15-19</sup> ones.

In this work we will evaluate the single molecule conductance  $G$  of two molecular wires A and B that differ only by the position (*para* and *meta* substitution) of thiol anchoring groups on the tripodal tetraphenylmethane moiety. Their chemical structure is shown in Fig. 1. Experimental single molecule conductance studies will be complemented by theoretical

calculations based on the density functional theory and non-equilibrium Green's function formalism.



**Fig. 1.** Chemical structure of *para* (A) and *meta* (B) substituted tripodal oligophenylene molecular wires.

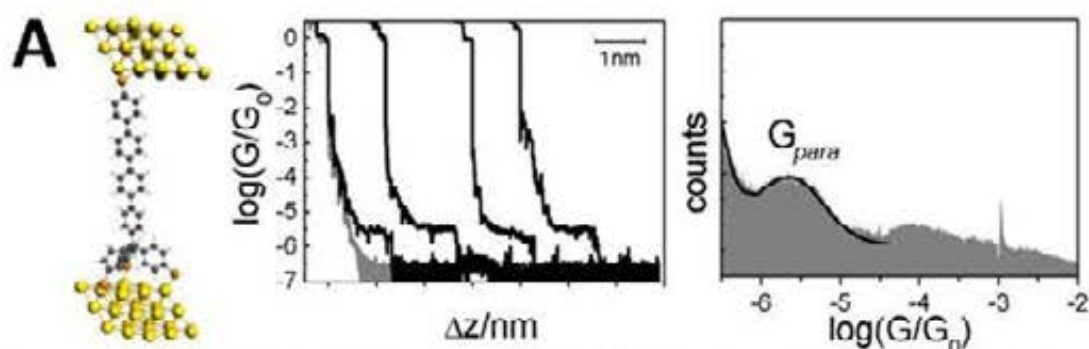
Aim of this work is to compare the effect of *meta* and *para* substitution of the thiol anchors in the tripodal anchoring groups on the charge transport in otherwise identical molecular wires containing four 1,4-phenylene units connected to such a tripod.

### Experimental

Single molecule conductance measurements were obtained by scanning tunneling microscopy break junction (STM-BJ) technique, where a sharp gold tip is moved in and out of the gold substrate in the solution of respective compound in 1,3,5-trimethylbenzene (98%, Sigma-Aldrich) solvent. Each time a plateau in the current-distance curve is observed a single molecule bridges two gold electrodes (tip and substrate). Molecules A and B were synthesized as thioacetates<sup>19,20</sup> and were deprotected in-situ by triethylamine (99.5%, Sigma-Aldrich). All glassware, liquid cells and Kalrez O-rings were cleaned by boiling in 25% nitric acid (Lach-Ner), washed copiously and boiled several times in ultrapure water (18.2 M $\Omega$  cm, MilliQ, Merck). The applied bias voltage was 130 mV and the tip retraction rate was 36 nm s<sup>-1</sup>. Theoretical calculations were done by the density functional theory (DFT) combined with the non-equilibrium Green's function (NEGF) formalism. Further details on this type of calculations can be found elsewhere<sup>19</sup>.

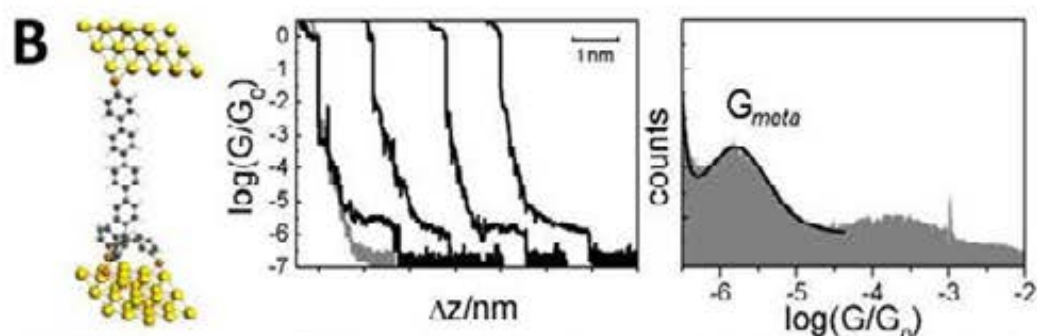
### Results and discussion

Charge transport characteristics for *para* (A) and *meta* (B) derivatives (see Fig.1) were obtained by STM-BJ method. Experimental current-distance curves were converted to the conductance-distance curves using Ohm's law. Fig. 2 shows representative conductance-distance curves for molecule A given on the logarithmic scale, where  $G_0$  represents the conductance quantum 77.5  $\mu$ S. Since the performed measurements are at the level down to individual molecules not all traces contain a plateau that represents the junction containing molecule. Many junctions do not contain any molecule during the measurement of conductance-distance curves and no plateau is detected in such a case (see grey trace in Fig. 2). Statistically one can obtain the conductance value for individual molecule from a large number of such measurements. Next to the individual conductance-distance curves in Fig. 2 is the histogram constructed from all experimentally obtained  $\log G/G_0$  values without any data selection. In the histogram a peak located at  $\log G/G_0 = -5.6 \pm 0.5$  represents the most probable single molecule conductance for metal-molecule-metal junction containing molecule A. DFT calculations combined with NEGF formalism yielded the most probable junction geometry explaining the experimental conductance value (see Fig. 2 left).



**Fig. 2.** Charge transport in metal-molecule-metal junction for *para* connected molecule A. Junction geometry (left), individual  $\log G/G_0$  conductance-distance curves (middle) in the absence (grey) and presence of molecule A (black), 1D conductance-distance histogram (right).

Single molecule conductance for metal-molecule-metal junction containing molecule B is presented in Fig. 3 together with selected individual  $\log G/G_0$  conductance-distance curves. Graph on the right represents the 1D conductance histogram constructed from all measured conductance-distance curves. The most probable  $\log G/G_0$  value for molecule B is  $-5.8 \pm 0.5$  corresponding to the metal-molecule-metal junction configuration shown in Fig. 3 (left).



**Fig. 3.** Charge transport in metal-molecule-metal junction for *meta* connected molecule B. Junction geometry (left), individual  $\log G/G_0$  conductance-distance curves (middle) in the absence (grey) and presence of molecule B (black), 1D conductance-distance histogram (right).

Conductance histograms in Figs. 2 and 3 show higher count number (counts) for  $G_{meta}$  compared to  $G_{para}$ , which would confirm that more stable geometry is observed for *meta*-connected molecule B. Higher conductance for molecule A is consistent with the interpretation of the experimental results in terms of the quantum interference effect<sup>21</sup>.

### Conclusions

We have studied two oligophenylene molecular wires that differ in their anchoring (*meta* versus *para*) attachment via thiols to the gold substrate. By a combined experimental and theoretical approach it was shown that *meta* substitution favors single molecule junction formation, but oligophenylene molecular wires connected this way display lower conductance. The conductance value for molecule A is 0.20 nS and for molecule B it is 0.12 nS, respectively.

### Acknowledgements

This research has been supported by the Czech Science Foundation (project no. 18-04682S).

## References

1. Hines T., Diez-Perez I., Hihath J., Liu H., Wang Z., Zhao J., Zhou G., Müllen K., Tao N.: *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 11658 (2010).
2. Kolivoška V., Valášek M., Gál M., Sokolová R., Bulíčková J., Pospíšil L., Mészáros G., Hromadová M.: *J. Phys. Chem. Lett.* **4**, 589 (2013).
3. Lörtscher E., Ciszek J. W., Tour J., Riel H.: *Small* **2**, 973 (2006).
4. Darwish N., Aragonès A. C., Darwish T., Ciampi S., Diez-Pérez I.: *Nano Lett.* **14**, 7062 (2014).
5. Xin N., Wang J., Jia C., Liu Z., Zhang X., Yu C., Li M., Wang S., Gong Y., Sun H., Zhang G., Liu Z., Zhang G., Liao J., Zhang D., Guo X.: *Nano Lett.* **17**, 856 (2017).
6. Capozzi B., Xia J., Adak O., Dell E. J., Liu Z.-F., Taylor J. C., Neaton J. B., Campos L. M., Venkataraman L.: *Nat. Nanotech.* **10**, 522 (2015).
7. Perrin M. L., Burzuri E., van der Zant H. S. J.: *Chem. Soc. Rev.* **44**, 902 (2015).
8. Bogani L., Wernsdorfer W.: *Nat. Mater.* **7**, 179 (2008).
9. Baisch B., Raffa D., Jung U., Magnussen O. M., Nicolas C., Lacour J., Kubitschke J., Herges R.: *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 442 (2009).
10. Wei Z., Wang X., Borges A., Santella M., Li T., Sørensen J. K., Vanin M., Hu W., Liu Y., Ulstrup J., Solomon G. C., Chi Q., Bjørnholm T., Nørgaard K., Laursen B. W.: *Langmuir* **30**, 14868 (2014).
11. Valášek M., Lindner M., Mayor M.: *Beilstein J. Nanotechnol.* **7**, 374 (2016).
12. Valášek M., Mayor M.: *Chem. Eur. J.* **23**, 13538 (2017).
13. Hromadová M., Kolivoška V., Sokolová R., Šebera J., Mészáros G., Valášek M., Mayor M.: *XXXVI. Moderní Elektrochemické Metody (Modern Electrochemical Methods XXXVI)*, *Jetřichovice, May 23<sup>rd</sup> – 27<sup>th</sup>, 2016*, Book of Abstracts (Navrátil T., Schwazová, K., Fojta M. eds.) p. 78.
14. Šebera J., Kolivoška V., Valášek M., Gasior J., Sokolová R., Mészáros G., Hong W., Mayor M., Hromadová M.: *J. Phys. Chem. C* **121**, 12885 (2017).
15. Kolivoška V., Šebera J., Lindner M., Valášek M., Mayor M., Mészáros G., Gasior J., Hromadová M.: *XXXVII. Moderní Elektrochemické Metody (Modern Electrochemical Methods XXXVII)*, *Jetřichovice, May 15<sup>th</sup> – 19<sup>th</sup>, 2017*, Book of Abstracts (Navrátil T., Schwazová, K., Fojta M. eds.) p. 99.
16. Kolivoška V., Sebechlebská T., Šebera J., Gasior J., Lindner M., Lukášek J., Valášek M., Mayor M., Mészáros G., Hromadová M.: *XXXVIII. Moderní Elektrochemické Metody (Modern Electrochemical Methods XXXVIII)*, *Jetřichovice, May 21<sup>st</sup> – 25<sup>th</sup>, 2018*, *Jetřichovice*, Book of Abstracts (Navrátil T., Schwazová, K., Fojta M. eds.) p. 132.
17. Lindner M., Valášek M., Homberg J., Edelman K., Gerhard L., Wulfhekel W., Fuhr O., Wächter T., Zharnikov M., Kolivoška V., Pospíšil L., Mészáros G., Hromadová M., Mayor M.: *Chem. Eur. J.* **22**, 13218 (2016).
18. Sebechlebská T., Šebera J., Kolivoška V., Lindner M., Gasior J., Mészáros G., Valášek M., Mayor M., Hromadová M.: *Electrochim. Acta* **258**, 1191 (2017).
19. Kolivoška V., Šebera J., Sebechlebská T., Lindner M., Gasior J., Mészáros G., Mayor M., Valášek M., Hromadová M.: *Chem. Commun.* **55**, 3351 (2019).
20. Wei L., Padmaja K., Youngblood W. J., Lysenko A. B., Lindsey J. S., Bocian D. F.: *J. Org. Chem.* **69**, 1461 (2004).
21. Manrique D. Z., Huang C., Baghernejad M., Zhao X., Al-Owaedi O. A., Sadeghi H., Kaliginedi V., Hong W., Gulcur M., Wandlowski T., Bryce M. R., C. J. Lambert: *Nat. Commun.* **6**, 6389 (2015).

**Voltammetric Analysis of Daminozide after its Acidic Hydrolysis Employing Boron-Doped Diamond Electrode**  
(Voltametriická analýza daminozidu po kyselé hydrolyze pomocí bórem dopované diamantové elektrody)

Jaromíra Chýlková<sup>a</sup>, Lenka Janíková<sup>a</sup>, Miloš Sedlák<sup>b</sup>, Jan Bartáček<sup>b</sup>, Jiří Váňa<sup>b</sup>, and Renáta Šelešovská<sup>a</sup>

<sup>a</sup> University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Institute of Environmental and Chemical Engineering, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic,  
E-mail: Jaromira.Chyilkova@upce.cz

<sup>b</sup> University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Institute of Organic Chemistry and Technology, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic,

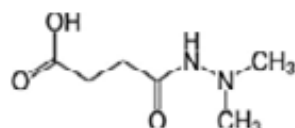
**Abstract**

Daminozide (DM) is widely used plant growth regulator for treatment of fruit trees, ornamental plants or vegetable. DM itself is electrochemically non-active compound therefore it must be hydrolyzed before its voltammetric analysis. Generally, alkaline hydrolysis of DM is recommended. For the first time, acidic hydrolysis, which represents easier way without creation of possible volatile hydrolysis products, was used in the present paper. Boron-doped diamond electrode was employed as a sensitive tool for analysis of 1,1-dimethylhydrazine, which was identified as a hydrolysis product of DM, with high sensitivity.

**Key words:** Daminozide, 1,1-dimethylhydrazine, Plant growth regulator, Boron-doped diamond electrode, Voltammetry.

**Úvod**

Daminozid (4-(2,2-Dimethylhydrazinyl)-4-oxobutanová kyselina, Obr. 1, DM) je jeden z nejdéle používaných regulátorů růstu. Poprvé byl na trh uveden v roce 1963 a od té doby je využíván pro zlepšení sklizně na celou řadu okrasných rostlin, ovocných stromů (zejména jabloni) nebo zeleniny (např. rajčat). DM je ve vodě poměrně dobře rozpustný a proto je v rostlinách velmi mobilní a snadno se dostává do všech jejich částí. Aplikace tohoto růstového regulátoru v případě jabloni podporuje růst květů, předchází předčasnému opadávání plodů a zlepšuje velikost, rozvoj barvy a skladovací vlastnosti jablek<sup>1-3</sup>. Bylo potvrzeno, že rezidua DM mohou být v jablkách detekována až rok po jeho aplikaci<sup>4</sup>. Během tepelného zpracování se v jablečných produktech objevuje degradační produkt DM, a to 1,1-dimethylhydrazin (DMH)<sup>5</sup>. DMH je nebezpečný z hlediska lidského zdraví vzhledem k jeho toxicitě, navíc byl, stejně jako DM, klasifikován jako pravděpodobný lidský karcinogen (třída B2, EPA)<sup>6</sup>.



**Obr. 1** Strukturální vzorec daminozidu (DM).

Vzhledem k významné biologické aktivitě a možným negativním účinkům na lidský organismus studovaného rostlinného regulátoru a jeho metabolitu, existuje řada analytických přístupů jeho stanovení. Vzhledem ke své povaze je tato látka nejčastěji stanovována po alkalické hydrolyze, např. plynovou chromatografií ve spojení s NP detektorem<sup>2</sup> nebo hmotnostním spektrometrem<sup>7</sup>. Některé pozdější chromatografické přístupy umožňují i přímé stanovení DM, např.<sup>3</sup>. Z hlediska elektrochemických metod, kterých se tato práce primárně

týká, není problematika stanovení DM příliš bohatá. V 60. a 70. letech bylo publikováno několik prací týkajících se polarografických studií hydrazinu a příbuzných látek včetně DMH<sup>8,9</sup> a oxidačního chování hydrazinu na platinové elektrodě<sup>10</sup>. Ianniello publikoval v roce 1987 studii<sup>11</sup> týkající se voltametričného stanovení DM na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) založeném opět na alkalické hydrolyze a následné oxidaci vzniklého DMH. Autor zjistil, že DMH poskytuje anodický signál okolo potenciálu  $-0,38$  V (vs. Ag/AgCl) s využitím square-wave voltametrie (SWV). Navíc bylo zjištěno, že ekvivalentní množství čistého DMH poskytuje vyšší signál než DMH jako produkt hydrolyzy DM. Dalšími experimenty byl potvrzen inhibiční efekt jantarové kyseliny, která vzniká jako vedlejší produkt zmíněné reakce. Po optimalizaci experimentálních podmínek bylo dosaženo limitu detekce (LD)  $2 \text{ mg L}^{-1}$  ( $1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Navržená metoda byla aplikována pro stanovení DM v jablkách<sup>11</sup>. V práci<sup>12</sup> byla pro stanovení DM v přítomnosti jeho degradačního produktu DMH využita HPLC s elektrochemickou detekcí, protože spektrofotometrická detekce při 210 nm vykazovala pouze nízkou citlivost. Jako detektor sloužil elektrochemický článek s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku, která byla ve formě vlákna. S využitím různých kolon došlo k účinné separaci obou látek a jejich následnému stanovení. S navrženou metodou bylo dosaženo dobré citlivosti ( $LD_{DM} = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , resp.  $LD_{DMH} = 6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ )<sup>12</sup>. Pro úplnost je vhodné doplnit, že pro přímé stanovení DM byl využit i piezoelektrický senzor na bázi molekulárně tištěného polymeru v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru o pH 9 a bylo dosaženo LD  $5 \times 10^{-8} \text{ mg mL}^{-1}$  ( $3,12 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ )<sup>13</sup>.

Z uvedeného přehledu je patrné, že elektrochemické chování DM a jeho metabolitu DMH je popsáno velmi málo a studium v této oblasti je, vzhledem k biologické aktivitě obou látek, žádoucí. Navíc možnost stanovení DM po jeho kyselé elektrolyze, která nevyžaduje tak náročné podmínky jako hydrolyza alkalická, nebylo dosud v literatuře publikováno. Cílem této práce je tedy nejen popsat možnosti využití kyselé hydrolyzy DM při jeho analýze ale i navrhnout jednoduchý voltametričský přístup pro jeho rutinní stanovení.

### Experimentální část

K přípravě modelových roztoků studovaných látek byl využit analytický standard daminozidu (CAS 1596-84-5, Sigma Aldrich, Německo), přípravek na ochranu rostlin B-NINE<sup>®</sup> SG (Arysta LifeScience Registration Great Britain, Velká Británie), který obsahoval 850 g daminozidu v 1 kg přípravku a kapalný standard 1,1-dimethylhydrazinu (98 %, Sigma Aldrich, Německo). Jako rozpouštědlo v případě  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  roztoků DM sloužil 96% ethanol a vodný roztok DMH o koncentraci  $3,55 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  byl stabilizován  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  kyselinou sírovou.

Zásobní roztoky těchto analytů byly uchovávány bez přístupu světla a vzduchu při teplotě okolo  $4^\circ\text{C}$ . Analyzované roztoky byly připravovány ředěním těchto standardů. Brittonův-Robinsonův pufr (BRB, pH 2-11), který sloužil jako základní elektrolyty při studiu vlivu pH na stanovení DMH byl připravován mísením kyselé a alkalické složky. Kyselou složkou byl  $0,04\text{M}$  roztok  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  a  $\text{CH}_3\text{COOH}$  a alkalickou  $0,2\text{M}$  NaOH (Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o., Praha)

K voltametričným analýzám byl použit elektrochemický analyzátor EP 100VA (HSC servis Bratislava, Slovensko). Měřicí článek se skládal z pracovní borem dopované diamantové elektrody (BDDE, Windsor Scientific, Velká Británie), referenční argentchloridové elektrody (sat.) a pomocné platinové elektrody (obě vyrobeny v Monokrystalech, Turnov, Česká republika). Stanovení DMZ v modelových vzorcích probíhalo pomocí elektrochemické oxidace s využitím diferenční pulzní voltametrie (DPV). Pracovní elektroda byla polarizována

v rozsahu potenciálů +200 až +1950 mV rychlosti nárůstu potenciálu 40 mV s<sup>-1</sup>. Amplituda pulzu byla 60 mV a délka pulzu 60 ms. Tyto parametry byly zjištěny experimentálně s cílem dosáhnout co největší odezvy navrhované metody.

Vážení probíhalo na vahách Denver TB 124 A (Denver Instruments, USA). K homogenizaci roztoků byl použit ultrazvuk UC 005 AJ1 (Tesla, Česká republika).

### Výsledky a diskuse

Vzhledem k tomu, že DM není elektrochemicky aktivní, lze nalézt v literatuře dvě publikace<sup>11,12</sup>, kdy se využívá pro jeho voltametrické stanovení produktu alkalické hydrolyzy. Autoři většinou uvádějí stanovení vzniklého DMH (1,1-dimethylhydrazinu). Jedná se o látku těkavou s bodem varu 63 – 64 °C v závislosti na tlaku<sup>14</sup>.

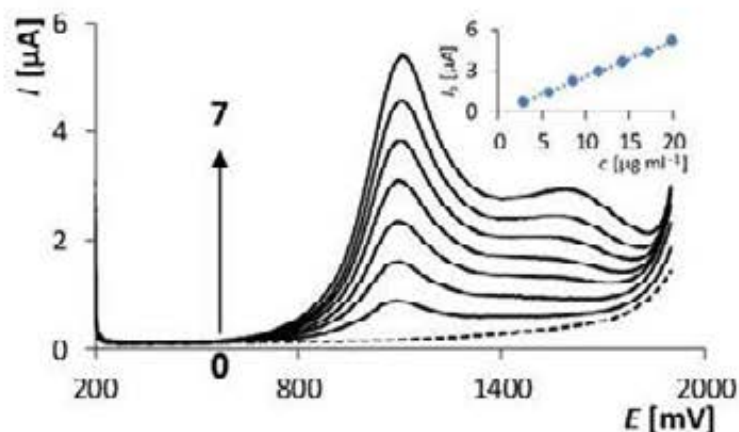
V této práci byla zvolena k hydrolyze DM kyselina sírová, a sice proto, že alkalická hydrolyza musí probíhat v uzavřeném systému za tepla a díky utěsněné tlustostěnné zkumavce i za tlaku. Při následné manipulaci s hydrolyzátem může docházet ke ztrátám analytu v důsledku těkání ze silně alkalického prostředí. Daleko jednodušší provedení hydrolyzy DM skýtá kyselé prostředí např. 1 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Proces probíhá za varu v otevřeném systému. Ke kondenzaci vodní páry, lze použít jednoduchý vzdušný chladič tvořený skleněnou trubicí o délce 25 cm se zábrusem, čímž je zajištěn konstantní objem hydrolyzované směsi. Doba hydrolyzy ovlivňuje množství vzniklého DMH. Pro analytické využití není nutné docílit kvantitativní výtěžnosti. Je však třeba dodržet stejné podmínky při hydrolyze vzorku a standardu, zejména dobu reakce a teplotu. Kyselé prostředí hydrolyzy je vhodné také proto, že vznikající DMH reaguje s kyselinou sírovou za tvorby stabilní soli 1,1-dimethylhydrazin sulfátu (DMHS).

Nejprve byly provedeny základní voltametrické studie. Ze závislosti výšky vlny naměřené cyklickou voltametří na rychlosti polarizace bylo potvrzeno, že probíhající děje jsou řízeny difúzí. Výšky vln vykazovaly nelineární průběh s rostoucí rychlostí polarizace. Lineární závislost byla pozorována při vynesení závislosti výšky sledované odezvy na druhé mocnině rychlosti polarizace. Kromě toho byla vynesena i logaritmická závislost ( $\log(I_p)$ - $\log(v)$ ), hodnota jejíž směrnice (0,44) se blížila k teoretické hodnotě 0,5, což opět potvrzuje difúzi jako řídicí elektrochemický děj.

K voltametrickému stanovení DMH byla zvolena anodická oxidace metodou DPV na BDDE. Ze studie vlivu pH základního elektrolytu na voltametrickou odezvu bylo zjištěno, že vyhodnotitelné křivky lze naměřit v rozmezí hodnot 8 – 11. Nejvyšší citlivosti bylo dosaženo při užití BRB o pH 9,01. Naměřené křivky v tomto prostředí jsou uvedené na obrázku 1 pro koncentrační rozmezí od 2,84 µg/ml do 19,88 µg/ml a signalizují postupný průběh oxidace. První pík vykazuje maximum v rozsahu potenciálů +1090 až +1110 mV, druhý pak v rozsahu +1560 až +1625 mV. Se zvyšující se koncentrací se posouvá odezva k pozitivnějším potenciálům. V prvním kroku pravděpodobně vzniká *N*-nitrozo-1,1-dimethylamin, který se následně oxiduje na *N*-nitro-1,1-dimethylamin.

Z obrázku je zřejmé, že výška prvního píku je za daných podmínek lineárně závislá na koncentraci podle vztahu  $I_p = 0,26c - 0,03$ , kde  $I_p$  je výška píku v µA a  $c$  je koncentrace DMH v µg mL<sup>-1</sup> analyzovaného roztoku, což bylo potvrzeno statistickým vyhodnocením programem NELIN (osobní konzultace doc. V. Jehlička, Univerzita Pardubice). Mez detekce byla za testovaných podmínek 0,19 µg mL<sup>-1</sup> a mez stanovitelnosti 0,63 µg mL<sup>-1</sup>. Navržená metoda bude dále aplikována na praktické vzorky.





**Obr. 2.** Voltammetrické křivky anodické oxidace DMH v závislosti na zvyšující se koncentraci v rozmezí 2,84 – 19,88  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Základní elektrolyt: BRB pH 9,01. Křivka 0 – základní elektrolyt, křivky 1 – 2,84  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 2 – 5,69  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 3 – 8,52  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 4 – 11,36  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 5 – 14,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 6 – 17,04  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 7 – 19,88  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### Závěr

Cílem této práce bylo nalézt vhodné experimentální podmínky pro voltammetrické stanovení rostlinného růstového stimulantu daminozidu. Bylo zjištěno, že v literatuře opomíjená kyselá hydrolyza, jako první krok analýzy, představuje výhodný postup převedení DM z jeho elektrochemicky neaktivní formy na formu oxidovatelnou (DMH). Kyselá hydrolyza je na rozdíl od alkalické snáže proveditelná a nevzniká při ní riziko vytěkání vzniklých produktů. Pro samotné stanovení byla využita bórem-dopovaná diamantová elektroda jako sensor a diferenčně-pulzní voltametrie, jejíž parametry byly optimalizovány pro dosažení nejlepší citlivosti a opakovatelných výsledků. Aplikovatelnost navrženého postupu bude ověřen při analýze reálných vzorků.

### Acknowledgements

Tato práce byla financována z Grantové agentury České republiky (projekt č. 17-03868S).

### References

1. Fan A. M., Jackson R. J.: *Regul. Toxicol. Pharm.* 9, 158 (1989).
2. Brinkman J. H. W., van Dijk A. G., Wagenaar R., Quirijns J. K.: *J. Chromatogr. A* 723, 355 (1996).
3. Mol H. G. J., van Dam R. C. J., Vreeken R. J., Steijger O. M.: *J. Chromatogr. A* 833, 53 (1999).
4. Drake S. R., Eisele T. A., Baranowski J. D.: *J. Food Saf.* 11, 247 (1991).
5. Newsome W. H.: *J. Agric. Food Chem.* 28, 319 (1980).
6. Pohanish R. P.: *Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*, 7th Edition, vol. 1: A-D, William Andrew: Applied Science Publishers, 2017.
7. Majumdar T. K., Geno P. W., Yau A.: *J. Agric. Food Chem.* 43, 1421 (1995).
8. Karp S., Meites L.: *J. Am. Chem. Soc.* 84, 906 (1962).
9. Iversen P. E., Lund H.: *Anal. Chem.* 41, 1322 (1969).
10. Harisson J. A., Khan Z. A.: *J. Electroanal. Chem.* 28, 131 (1970).
11. Ianniello R. M.: *Anal. Chim. Acta* 193, 81 (1987).
12. Berek J., Teraso A., Mejstrik V., Moreira I. C., Zima J.: *Chem. Anal. (Warsaw)* 48, 483 (2003).
13. Yan S., Fang Y., Gao Z.: *Biosens. Bioelectron.* 22, 1087 (2007).
14. Merck & Co., *The Merck index*, Whitehouse Station, N.J.: Merck & Co., 2001.

## Structural and Electrochemical Investigation of Lithium Ions Insertion Processes in Polyanionic Compounds of Lithium and Transition Metals

Aleksandr V. Ivanishchev <sup>a</sup>, Nelly A. Gridina <sup>a</sup>, Kirill S. Rybakov <sup>a</sup>, Irina A. Ivanishcheva <sup>a</sup>, Arseni V. Ushakov <sup>a</sup>, and Ambesh Dixit <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Chemistry, Saratov State University named after N. G. Chernyshevsky Astrakhanskaya str. 83, Saratov, 410012, Russian Federation, E-mail: ivanischevav@inbox.ru

<sup>b</sup> Department of Physics & Center for Solar Energy, Indian Institute of Technology Jodhpur, Karwad, Rajasthan, Jodhpur, 342 0137, India

### Abstract

The paper considers approaches to the synthesis as well as the structural and electrochemical properties of lithium and transition metals polyanionic compounds as promising cathode materials for lithium-ion battery. The relationships between the synthesis conditions and the structural and electrochemical characteristics of the materials were revealed. Based on the structural data the computational method of the bond valence strengths (BVS) applying the bond valence energy landscape algorithm (BVEL) provided activation energy maps of lithium ion migration in the crystal structures. Applying the electrochemical kinetics investigation methods (CV, GITT, EIS) the parameters of lithium ion transport in the electrodes were determined.

**Key words:** Lithium-Ion battery, Cathode, Polyanionic Compounds, Structural and electrochemical properties.

### Introduction

The importance of autonomous energy is currently increasing due to the rapid development of portable electronic devices, electric vehicles and storage devices for distributed energy systems. Among the energy-accumulating electrochemical systems, a lithium-ion system (lithium-ion battery, LIB) stands out, significantly ahead of other systems in terms of performance and level of development. At the same time, this system has significant potential for further development. LIB's cathode materials are the most numerous and diverse. Polyanionic compounds of lithium and transition metals are currently considered as the most promising materials for LIB's cathode. They owe their chemical stability to a strong structural framework formed by polyanions, for example,  $\text{PO}_4^{3-}$ . The electrode potential of intercalation compounds increases in the series of polyanions:  $\text{SiO}_4^{4-}$ ,  $\text{BO}_3^{3-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ . As can be seen, the sulfate ion in this series promises the highest electrode potential, and, consequently, the energy of the electrode material.

The most attractive redox couple for polyanionic compounds is  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  due to the availability and low cost of iron, as well as its non-toxicity. The authors <sup>1</sup> established a two-phase mechanism for the reversible insertion of lithium ions into the structure of  $\text{Li}_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ , resembling to the  $\text{LiFePO}_4$  compound with a similar level of volumetric changes of the structure (about 12%). However, some structural disorder or the formation of additional phases was also found, which may result in a lower level of structural stability during cycling. The authors <sup>2</sup> found that the defectiveness of the crystal structure plays a significant role in the electrochemical behavior of these materials. Thus, the band gap of  $\text{Li}_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  exceeds 5 eV, while for  $\text{LiFePO}_4$  it is only 3.7 eV. However, the electronic conductivity of lithium-iron sulfate significantly exceeds the conductivity of lithium-iron phosphate, and so much that

the sulfate in the composition of the electrode does not require conductive carbon for its work, while phosphate without carbon does not exhibit electrochemical activity at all.

Features of the synthesis of sulfate electrode materials were studied by the authors<sup>3</sup>. It was found that mechanochemical synthesis mainly leads to the formation of the densest crystalline modifications (having the smallest unit cell size). Due to the low thermal stability of sulfates (they are decomposed at temperatures above 400 °C) solid-state synthesis with thermal activation requiring high temperature appeared to be unable to produce such compounds with a noticeable yield. Therefore, mechanochemical activation in the absence of heat is the only possible way to obtain a highly crystalline pure product.

The relationships between the synthesis conditions and the structural characteristics of mixed lithium sulfates and transition metals were studied in detail and described in many publications. However, the features of the electrochemical properties of these materials are not well understood. One of the reasons is the lack of suitable electrolyte systems that are resistant to oxidation at high electrode potentials. Existing electrolytes allow working only with iron-lithium sulfate. Another reason for the low popularity of sulfate materials among researchers is rather modest theoretical characteristics of  $\text{Li}_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ . Since iron does not tend to show any degree of oxidation other than +2 and +3, only half of the lithium ions are mobile in this compound, which corresponds to the capacity of  $102 \text{ mAh}\cdot\text{g}^{-1}$ . Meanwhile, it seems to us that this compound demonstrates interesting peculiarity of the mechanism of reversible insertion of lithium ions and electrochemical characteristics that deserve attention.

In this work, we have systematically studied the effect of synthesis conditions on the electrochemical capacity of lithium-iron sulfate, the morphology of the material obtained, and its phase composition. Using the method of bond valence forces (BVS) based on the algorithm of bond valence energy landscape (BVLE) an analysis of the crystal structure of  $\text{Li}_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  was performed, and diffusion paths of lithium ions inside it were modeled. Using the method of cyclic voltammetry with a linear sweep of the electrode potential the characteristics of lithium ions insertion into the material were determined: the range of electrode potentials corresponding to the sequence of lithium alternating successive states and the diffusion coefficient of lithium ions. The method of electrochemical impedance spectroscopy made it possible to isolate the contributions of various stages of ionic transport to the general electrochemical process: transfer across the electrode | solution boundary, the surface layer and the bulk of the electrode material, as well as the accumulation of lithium in the bulk.

### Experimental

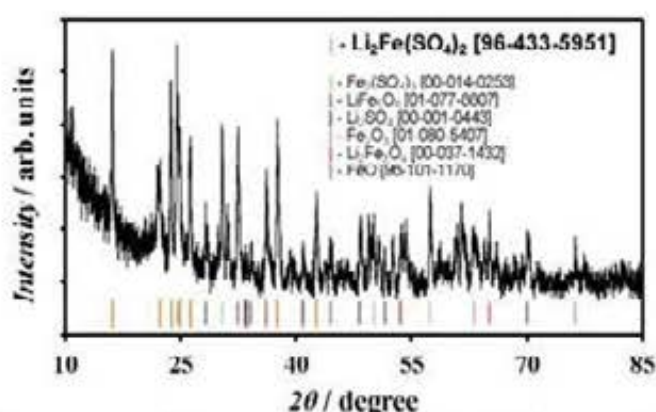
The approach to  $\text{Li}_2\text{Me}(\text{SO}_4)_2$  (Me = Fe, Mn, Co, Ni etc.) materials synthesis based on the implementation of various activation impacts on the reaction mixture: mechanochemical activation in the planetary ball mill, thermal activation in the furnace under appropriate atmosphere, and various combinations of mentioned ways. As starting materials for the synthesis of the  $\text{Li}_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  lithium and iron sulfates and their hydrates were used:  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Li}_2\text{SO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  with the content of main substance  $w>0.99$ . Molar ratio of lithium and iron in the reagent mixture were kept on the stoichiometric level  $\text{Li} : \text{Fe} = 2:1$ . Carbon black as the electroconductive additive was added to the mixture of sulfates in the amount of 5 – 15 weight %. Such composition was put into the ball mill drums with acetone media and treated during 20 minutes. After that the mixture was dried under vacuum at  $100^\circ\text{C}$  and further heat-treated at  $360^\circ\text{C}$  during 12 hours in a tube furnace under argon flow.

X-ray diffraction studies of the synthesized  $\text{Li}_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2/\text{C}$  composite were performed on a PANalytical Empyrean diffractometer using cobalt radiation with a wavelength of  $\text{Co K}\alpha \lambda = 1.790307\text{\AA}$ . The morphology of the  $\text{Li}_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2/\text{C}$  was investigated using scanning electron microscopy (SEM) with the Tescan Mira 2 LMU scanning electron microscope (W-cathode, 10 kV). Computational modelling of crystal structures was performed according to the BVEL method using the 3DBVSMAPPER software. For the visualization of crystal structures and diffusion paths the VESTA software<sup>4</sup> package was used.

The electrodes under study were prepared by mixing of 80 w%  $\text{Li}_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2/\text{C}$ , 10 w% acetylene black and 10 w% PVdF binder. The electrolyte composition was 1 M  $\text{LiPF}_6$  solution in ethylene carbonate, dimethyl carbonate (1:1, vol.). The electrode slurry was cast on the Al-foil with a coating density of  $5 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$  by «Dr. Blade» technique. The electrochemical measurements were performed in hermetically coin cells and pouch cells containing the electrode under testing, lithium counter electrode and lithium reference electrode (in the pouch cells only). Elins/P-45X potentiostat-galvanostat with FRA module (Elins, Russian Federation) and Autolab/PSTAT302N modular high-current potentiostat/galvanostat (ECO CHEMIE, Netherlands) with a FRA frequency response analyzer were used for GITT and EIS measurements. Neware/BTS10V10mA (Neware Technology Limited, China) and Booster/UZR 0.03-10 (Booster, Russian Federation) charge-discharge modules were utilized for galvanostatic charge-discharge tests. The electrode potentials hereafter are given versus a Li reference electrode in the same solution.

## Results and discussion

In the implementation of the syntheses, a unified approach was implemented, which consisted of a complex activation impact on the mixture of reagents, which contributed to obtaining the desired products of the required composition and having the necessary structural and functional (electrochemical) characteristics. All the products obtained were subjected to X-ray diffraction analysis of the phase composition and, in some cases, structural characteristics. The most interesting for us was the  $\text{Li}_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  phase, which has a monoclinic structure with the space group  $P2_1/c$ . Presented in Fig. 1 X-ray diffractogram of  $\text{Li}_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  indicates a significant number of crystalline impurity phases along with the target component.

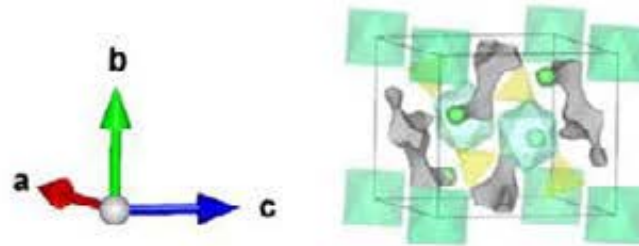


**Fig. 1.** X-ray diffraction pattern of the sample  $\text{Li}_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ . Main crystal component and minor impurities are specified with corresponding PDF card numbers.

This can be of an irremovable nature, because of the fact that the synthesis reactions are reversible and an increase in temperature leads to a shift in equilibrium towards the starting materials or intermediate products, and a decrease in temperature greatly slows down the

approaching of this equilibrium. At the same time, we minimized the content of impurities by optimization of the synthetic procedure.

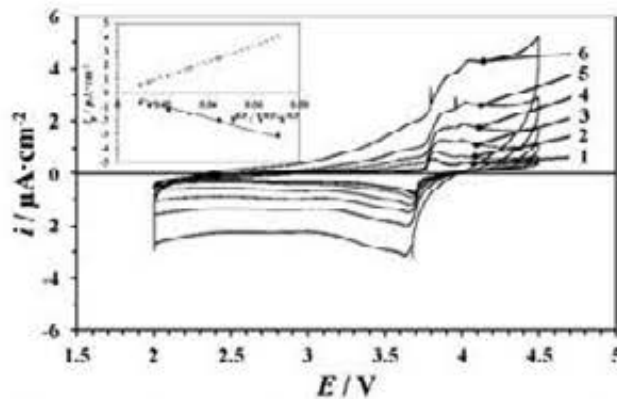
A typical energy landscape map for lithium ion diffusion in the  $\text{Li}_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  compound is shown in Fig. 2.



**Fig. 2.** Lithium ion diffusion map in the  $\text{Li}_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  compound.

Diffusion occurs in one-dimensional channels along the  $c$  axis. Each lithium ion can move in two directions, diffusion channels cross-section have dimension close to lithium ion diameter, therefore the diffusion system of this material can provide full and reversible intercalation / deintercalation of lithium ions.

When considering cyclic voltammograms recorded at a gradually increasing linear potential sweep rate (Fig. 3), the extremely small displacement of peak potentials attracts attention. This circumstance is very lucky, since it indicates a purely diffusion control of the intercalation process in this material, which simplifies the analysis of its kinetic behavior. In this case, it is appropriate to use the modified Randles-Shevchik equation (1), which uses the correction



**Fig. 3.** Cyclic voltammograms of the  $\text{Li}_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  electrode measured at a series of linear potential sweep rates: 1 –  $0.1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , 2 –  $0.2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , 3 –  $0.5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , 4 –  $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , 5 –  $2 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , 6 –  $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Inset shows anodic and cathodic  $i_p(v)$  dependences.

parameter  $z$  to take into account the true activity of lithium ions in a solid state and is determined from the slope of the  $E(c)$  dependence obtained by coulometric titration, similar to that considered in our previously published paper <sup>5</sup>.

$$i_p = 0.4463v^{1/2} \frac{z^{1/2}n^{3/2}F^{3/2}}{R^{1/2}T^{1/2}} c_0 D_{uv}^{1/2} \quad (1)$$

The estimation of the diffusion coefficient for the anodic process is  $3 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , and for the cathodic process is  $2 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Such a rather low diffusion coefficient of lithium ions can

be partly explained by the low practically realizable capacity of the  $\text{Li}_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  electrode. The well-known ratio  $\tau \sim L^2/D$  allows to estimate the time of diffusion front propagation inside the particle of a known size of an electrode material as it had been done previously in our works <sup>6-8</sup>. In the present case, with the particle size of 1  $\mu\text{m}$  and the specified diffusion coefficient the value of  $\tau$  should be  $\sim 13$  hours. This means that such material can provide 100% capacity at a current not exceeding 0.076 C. However, certain values will depend on the actual particle size distribution of the material.

## Conclusions

During the work performed, the synthesis and the comprehensive study of the electrode material based on mixed lithium-iron sulfate using physical, physico-chemical and electrochemical methods were carried out. The relationships between the synthesis conditions and the structural and functional characteristics of the materials were revealed. The stage sequence and the reversibility of the electrochemical process were evaluated using the method of cyclic voltammetry with a linear sweep of the electrode potential. The nature of the limiting stage in various ranges of the linear potential sweep rates was established on the basis of the current peaks of the cyclic voltammogram. In the range where the lithium ion diffusion was limiting, the diffusion coefficient was estimated using the modified Randles-Shevchik equation. Its value in the anodic process was  $3 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , in the cathodic process was  $2 \cdot 10^{-15} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ .

## Acknowledgements

The authors are grateful to the Russian Foundation for Basic Research (project No. 18-53-45004) and to the Department of Science and Technology of the Ministry of Science and Technology of the Republic of India (project No. INT/RUS/RFBR/320) for the financial support of the present work.

## References

11. Reynaud M., Ati M., Melot B. C., Sougrati M. T., Rouse G., Chotard J. N., Tarascon J. M.: *Electrochem. Commun.* **21**, 77 (2012).
12. Lander L., Reynaud M., Carrasco J., Katcho N. A., Bellin C., Polian A., Baptiste B., Rouse G., Tarascon J. M.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 14509 (2016).
13. Lander L., Reynaud M., Rouse G., Sougrati M. T., Laberty-Robert C., Messinger R. J., Deschamps M., Tarascon J. M.: *Chem. Mater.* **26**, 4178 (2014).
14. Momma K., Izumi F.: *J. Appl. Crystallogr.* **44**, 1272 (2011).
15. Ivanishchev A. V., Churikov A. V., Ivanishcheva I. A., Ushakov A. V.: *Ionics.* **22**, 483 (2016).
16. Ivanishchev A. V., Ivanishcheva I. A., Ushakov A. V., Churikov A. V.: *XXXVI International Conference Modern Electrochemical Methods (Moderní Elektrochemické Metody XXXVI)*, Jetrichovice, Czech Republic, May 23<sup>rd</sup> – May 27<sup>th</sup>, 2016, Book of Abstracts (Navratil T., Fojta M., Schwarzova K. ed.), p. 86.
17. Ivanishchev A. V., Abakumov A. M., Ivanishcheva I. A., Fedotov S. S., Khasanova N. R., Antipov E. V.: *XXXVII International Conference Modern Electrochemical Methods (Moderní Elektrochemické Metody XXXVII)*, Jetrichovice, Czech Republic, May 15<sup>th</sup> – May 19<sup>th</sup>, 2017, Book of Abstracts (Navratil T., Fojta M., Schwarzova K. ed.), p. 81.
18. Ivanishchev A. V., Bobrikov I. A., Ivanishcheva I. A., Ivanshina O. Yu.: *XXXVIII International Conference Modern Electrochemical Methods (Moderní Elektrochemické Metody XXXVIII)*, Jetrichovice, Czech Republic, May 21<sup>st</sup> – May 25<sup>th</sup>, 2018, Book of Abstracts (Navratil T., Fojta M., Schwarzova K. ed.), p. 100.

## Cocktail Interactions of Cyproconazole and Tebuconazole in Copper Presence

Michal Jakl <sup>a,b</sup> and Jana Jaklová Dyrtrtová <sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýčká 129, 165 00 Prague – Suchbátov, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic; E-mail: dyrtrtova@uochb.cas.cz

<sup>c</sup> Department of Physiology and Biochemistry, Faculty of Physical Education and Sport, Charles University, José Martího 31, 162 52 Prague 6, Czech Republic;

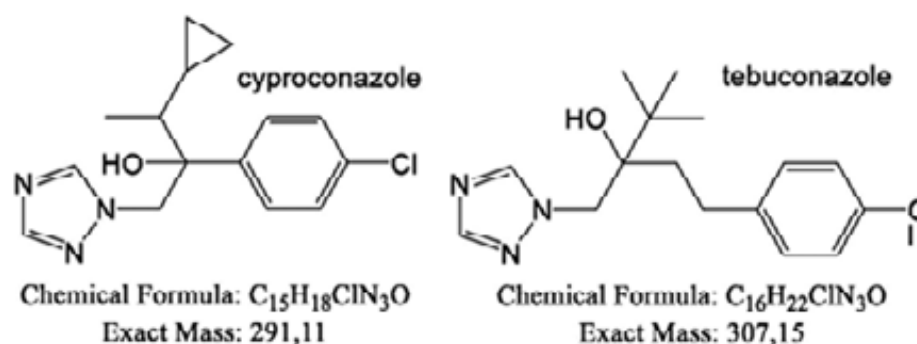
### Abstract

Cyproconazole and tebuconazole belong to the wide group of azoles frequently used as fungicides in crop production and human medicine. Their behaviour in real systems is strongly influenced by the presence of other (biologically active) substances, making its detailed description difficult. For this purpose, relevant mimicking efforts of their (cocktail) interactions are essential. This contribution reveals interesting findings about the stability of cyproconazole and tebuconazole in a mixture and in the presence of copper salts. Results are based on the electrospray gas phase experiments and previous knowledge. They may be useful for the design of agrochemical treatments and the estimation of effects to non-target species.

**Key words:** Triazoles, Cu(I), Mass spectrometry, ESI-MS, Gas phase, Degradation.

### Introduction

Cyproconazole and tebuconazole are systemic fungicides having the triazolic ring in their structure (Fig. 1). In agriculture, they are widely used for grape, strawberries, fruit trees or wheat protection against mildew, blocking C14-demethylase and aromatase, two key enzymes for sterol biosynthesis. As these biochemical processes are similar among various species, it is obvious that these azole fungicides may influence also non-target species <sup>1</sup>.



**Fig. 1.** Chemical structures of cyproconazole and tebuconazole.

The reactivity of azoles is significantly influenced by the presence of metal cations. The triazolic ring allows creation of complexes with d-elements, such as copper <sup>2-4</sup>, zinc <sup>5</sup> and others <sup>6</sup>. Meanwhile these elements are practically always present in the environment. The representative d-element serving as an essential element for many organisms is copper. Copper usually allows two oxidation states, Cu(II) and Cu(I), during electrospray process as well as in tebuconazole presence the Cu(I) oxidation state prevails <sup>2</sup>.

We have chosen to study simplified system consisted from tebuconazole, cyproconazole and Cu(II), and mimic their cocktail interactions in the gas phase of electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). We are aware that the transfer of information obtained in the gas phase has to be carefully and critically evaluated to significantly describe the changes under natural conditions. Our goal is to provide as much physico-chemical information as possible.

### Experimental

The reaction mixture consisted from tebuconazole (**Teb**), cyproconazole (**Cyp**) and CuCl<sub>2</sub> (equimolar, 2.5\*10<sup>-5</sup> M) in ethanol/water mixtures were studied using ion trap fitted with an electrospray ionization source ESI-MS (LCQ Advantage, Thermo Finnigan, USA), detailed methodology e.g. in <sup>3</sup>. The sample solutions were continuously (0.5 mL h<sup>-1</sup>) fed into the ion source through a silica capillary, nitrogen was used as the nebulizer gas. The operating conditions were set as follows: spray voltage: 4.5 kV, capillary voltage: 20-35 V, tube lens offset from 2 to 10 V, heated capillary temperature: 250°C, sheath-gas flow rate and auxiliary-gas flow rate: from 20 and 25 arbitrary units.

### Results and discussion

The full MS scan of **Teb**, **Cyp** and CuCl<sub>2</sub> (Fig. 2) shows various products (Tab. 1). Copper is present only as Cu(I) in the spectrum. The reduction of Cu(II) to Cu(I) is usually occurred during the electrospray process and it is influenced by the presence of ligands (see, <sup>2,4,7</sup>). Usually some significant amount of Cu(II) in the presence of **Cyp** remain <sup>3</sup>, however in the system consisted of both, **Cyp** and **Teb** no Cu(II) left.

Beside protonated **Cyp** (**CypH**<sup>+</sup>) and **Teb** (**TebH**<sup>+</sup>) also adducts with K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> (namely **TebNa**<sup>+</sup> and **CypK**<sup>+</sup>) are present. These cations are usually present in the positive mode and their adducts are highly expected also in soils and tissues. The presence of **TebNa**<sup>+</sup> and the absence of **TebK**<sup>+</sup> as well as the presence of **CypK**<sup>+</sup> and absence of **CypNa**<sup>+</sup> points to different affinities of **Cyp** and **Teb** to these metals.

The Cu(I) complexes can be divided into several groups: (i) Cyp complexes with general formula [Cu(**Cyp**)<sub>x</sub>]<sup>+</sup>, where x=1, 2; (ii) Teb complexes with general formula [Cu(**Teb**)<sub>y</sub>]<sup>+</sup>, where y=1, 2; (iii) complexes with Cyp fragment (**Cyp**\*frg, Fig. 3a) as one of the ligands ([Cu(**Cyp**)(**Cyp**\*frg)]<sup>+</sup>, [Cu(**Teb**)(**Cyp**\*frg)]<sup>+</sup>); (iv) complexes with Teb fragment (**Teb**\*frg, Fig. 3b) as one of the ligands ([Cu(**Cyp**)(**Teb**\*frg)]<sup>+</sup>, [Cu(**Teb**)(**Teb**\*frg)]<sup>+</sup>); and (v) mixed Teb-Cyp complexes ([Cu(**Cyp**)(**Teb**)]<sup>+</sup>).



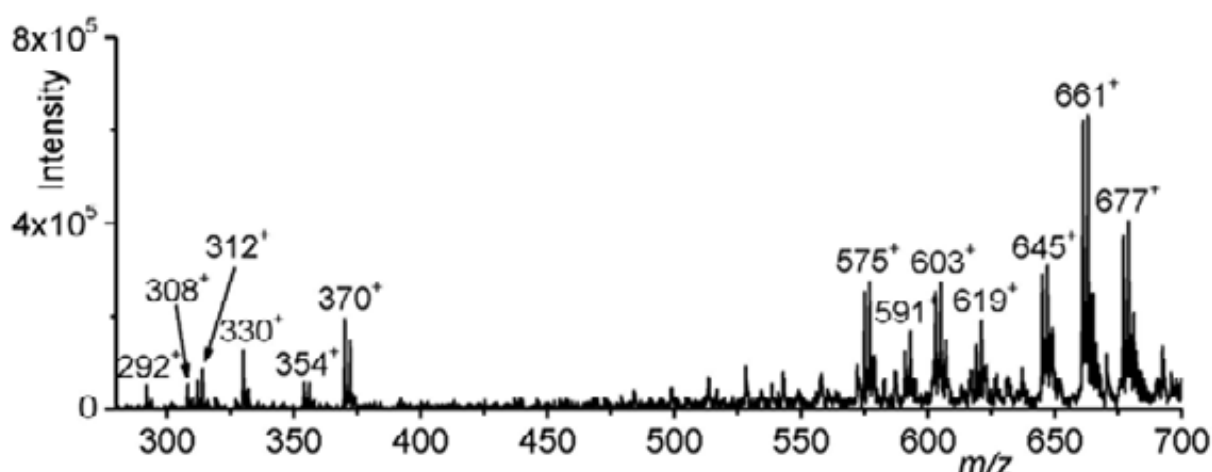


Fig. 2. Full MS scan of tebuconazole, cyproconazole and  $\text{CuCl}_2$  (all  $2.5 \cdot 10^{-5}$  M) in ethanol/water (1:1) mixture.

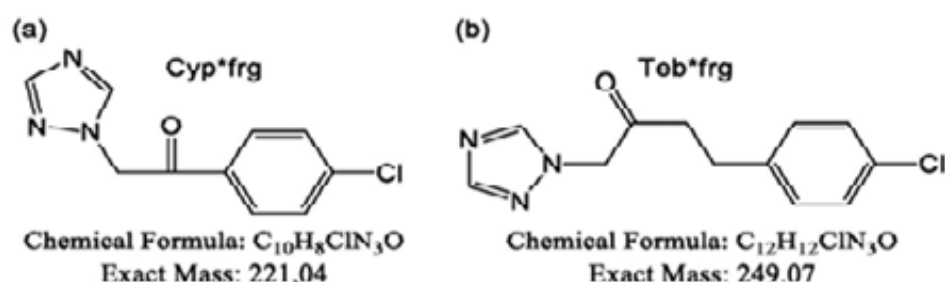
**Table I**

Most abundant cations present in the full mass spectra of the equimolar mixture ( $2.5 \cdot 10^{-5}$  M) of cyproconazole (Cyp), tebuconazole (Teb) and  $\text{CuCl}_2$  (Fig. 1).

$m/z$ (lightest isotopes)	formula	absolute intensity	relative intensity (%)
284 <sup>+</sup>	(Cyp*frg)Cu <sup>+</sup>	8.73E+03	0.33
292 <sup>+</sup>	CypH <sup>+</sup>	5.12E+04	1.96
308 <sup>+</sup>	TebH <sup>+</sup>	5.32E+04	2.04
312 <sup>+</sup>	(Teb*frg)Cu <sup>+</sup>	5.91E+04	2.27
330 <sup>+</sup>	TebNa <sup>+</sup> /CypK <sup>+</sup>	1.28E+05	4.91
354 <sup>+</sup>	[CuCyp] <sup>+</sup>	5.59E+04	2.14
370 <sup>+</sup>	[CuTeb] <sup>+</sup>	1.96E+05	7.51
575 <sup>+</sup>	[Cu(Cyp)(Cyp*frg)] <sup>+</sup>	2.54E+05	9.74
591 <sup>+</sup>	[Cu(Teb)(Cyp*frg)] <sup>+</sup>	1.24E+05	4.75
603 <sup>+</sup>	[Cu(Cyp)(Teb*frg)] <sup>+</sup>	2.54E+05	9.74
619 <sup>+</sup>	[Cu(Teb)(Teb*frg)] <sup>+</sup>	1.38E+05	5.29
645 <sup>+</sup>	[Cu(Cyp) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	2.89E+05	11.08
661 <sup>+</sup>	[Cu(Cyp)(Teb)] <sup>+</sup>	6.22E+05	23.85
677 <sup>+</sup>	[Cu(Teb) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	3.75E+05	14.38

There are two phenomena. As expected, **Teb** and **Cyp** react significantly with all present copper cations. In the sample where were equal concentrations of **Teb**, **Cyp** and Cu, the ratio of both azoles to Cu was 2:1 (**Table I**). From previous summarization<sup>3</sup> we know that the stoichiometric ratio correlates with the concentration ratio in the reaction mixture. E.g., the concentration ratio between the azole and Cu is 1:1 and the highest stoichiometric ratio (Cu/azole) might be also 1:3 or even 1:4. It means that in ratio of Cu/azoles 1:2 the azoles compete for binding to Cu and the stoichiometric ratio (Cu/azole) is usually higher than 1:4. Within the consideration of all reaction possibilities of our system we have to count all the possible reactions among all parts of the reaction mixture ( $\text{CuCl}_2$ , **Teb**, **Cyp**,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) as well as the impact of the solvent.

The complexes containing **Teb** and **Cyp** only as well as their equal combinations were expected. This combination and participation of **Teb** and **Cyp** on complexes creation occurs equally, it means that for **Cyp** and **Teb** the ability to create complexes with Cu is similar. The second phenomenon – the creation of **Cyp\*frg** as well as **Teb\*frg** was not expected before (Fig. 3). This reaction is situated on chiral carbon and is realized via the loss of one of the carbon moiety (the tricyclo carbon ring or the terc.butyl) and creation of keto-bond with oxygen. There is also other possibility, instead of the keto-bond, the double bond between the chiral carbon and its neighbour carbon can be created. The difference between these two isomers cannot be found using the ESI-MS experiments, because both isomers have the same isotope pattern. The most probable resonance structure may be predicted based on the DFT calculations, which will be provided in further research.



**Fig. 3.** Suggested structures of (a) cyproconazole fragment (**Cyp\*frg**) and (b) tebuconazole fragment (**Teb\*frg**).

### Conclusion

The reactivity of **Cyp** and **Teb** with Cu is similar. These azoles create Cu(I) complexes in the same stoichiometric manner. Moreover due to presence of Cu cations both azoles loss one functional group from the chiral carbon. The decayed products of **Cyp** and **Teb** have two possible resonance structure, which might be discovered later using DFT calculations. These decayed products might be considered as possible degradation product created in the presence of Cu cations. On the other hand, the different affinity of these azoles to  $K^+$  and  $Na^+$  is highly interesting with the respect to the fact that these alkali metals are important plant nutrients.

### Acknowledgements

This work was supported by the Czech Science Foundation project No. 18-01710S (Jana Jaklová Dyrtrtová).

### References

1. Takala N., Sirén H., Jakl M., Jaklová Dyrtrtová J.: Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly *In press* (2019).
2. Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Schröder D., Čadková E., Komárek M.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 25, 1037 (2011).
3. Jakl M., Fanfrlík J., Jaklová Dyrtrtová J.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 31, 2043 (2017).
4. Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Schröder D., Norková R.: Int. J. Mass Spectrom. 338, 45 (2013).
5. Jaklová Dyrtrtová J., Fanfrlík J., Norková R., Jakl M., Hobza P.: Int. J. Mass Spectrom. 359, 38 (2014).
6. Norková R., Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Schröder D.: Water Air Soil Pollut. 223, 2633 (2012).
7. Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Navrátil T., Cvačka J., Pačes O.: Electrochim. Acta 211, 787 (2016).

## Cocktail Reactions of Azoles in the Environment

Jana Jaklová Dyrtrtová <sup>a,b</sup> and Michal Jakl <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic; [dytrtova@uochb.cas.cz](mailto:dytrtova@uochb.cas.cz)

<sup>b</sup> Department of Physiology and Biochemistry, Faculty of Physical Education and Sport, Charles University, José Martího 31, 162 52 Prague 6, Czech Republic; [dytrtova@ftvs.cuni.cz](mailto:dytrtova@ftvs.cuni.cz)

<sup>c</sup> Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 00 Prague – Suchbát, Czech Republic

### Abstract

Azoles are the group of systemic fungicides broadly used in agriculture for protection of crops against fungal pathogens. Their action lies in the inhibition of two enzymes responsible for biosynthesis of sterols. However, the biosynthesis of sterols has similar scheme for most living organisms. It means that azoles influence not only the fungal pathogens but also non-target species including soil organisms, plants and eventually organisms in the end of the food chain such as human. The impact of azoles is described only for individual pure azoles or indirectly as the symptoms. As the environmental system is too complex and complicated it is not described yet what exactly happens there. To even estimate all possible reactions, it is essential to describe the azoles interactions systematically in simplified model systems first.

**Key words:** Triazoles, Nutrients, Mass spectrometry, Electrochemistry, Degradation.

### Introduction

The interactions of azoles in the environment are very broad and include interactions with nutrients, with enzymes and other biologically active compounds (**Fig. 1**). The reactivity of azoles is significantly influenced by the presence of metal cations such as copper <sup>1-3</sup>, zinc <sup>4</sup> and others <sup>5</sup>, practically always present in the environment. The interactions occurred in the environment have high level of complexity; therefore, we call them the cocktail interactions. It is practically impossible to study them directly. On the other hand, the main interactions can be isolated and transferred into the lab conditions to provide biomimetic reactivity of the selected mixtures. However, the extrapolation of the investigated reaction schemes has to be carefully and critically considered before general acceptance.

The aim of this contribution was to describe the interactions of three frequent azole pesticides (penconazole, tebuconazole, cyproconazole) in the presence of copper. Their simplified behaviour/interactions in the presence of essential metals were previously described <sup>1, 2, 4</sup>, however their complex behaviour in a cocktail mixture is missing. The experimental setup uses the advantages of ESI-MS to provide the gas-phase experiments; therefore the contribution brings clarification of possible interactions among penconazole, tebuconazole, cyproconazole and copper.

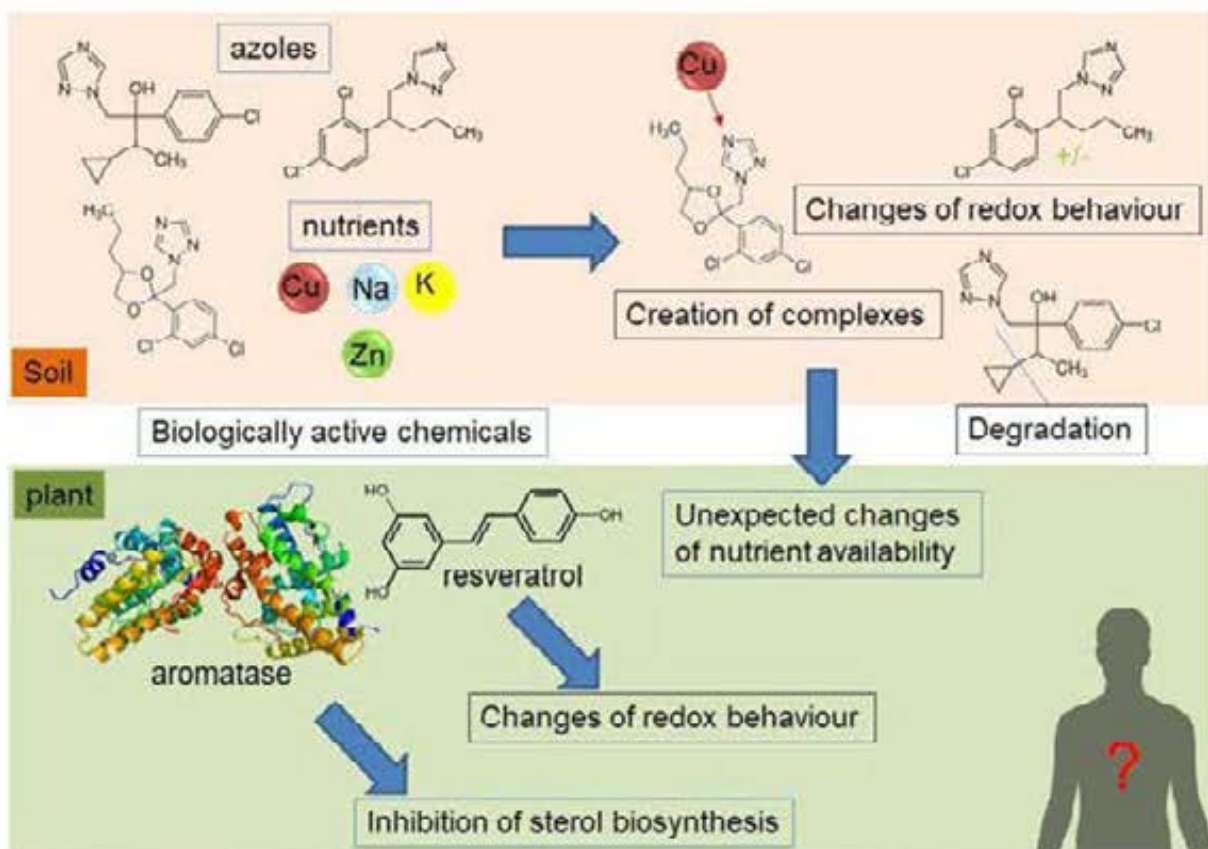


Fig. 1. The complexity of various interactions making the cocktail effect

### Experimental

The reaction mixture consisted from penconazole (**Pen**) tebuconazole (**Teb**), cyproconazole (**Cyp**) and  $\text{CuCl}_2$  (all  $2.5 \times 10^{-5}$  M) in ethanol/water mixtures were studied using ESI-MS (detailed methodology e.g., <sup>2</sup>) The mass spectrometry studies were performed using a quadrupole ion-trap mass spectrometer (QIT; Finnigan LCQ Advantage; ThermoFinnigan, USA) fitted with an electrospray ionization (ESI) source. The sample solutions were continuously ( $0.5 \text{ mL h}^{-1}$ ) fed into the ion source through a silica capillary. Nitrogen was used as the nebulizer gas. The operating conditions were set as follows: spray voltage: 4.5 kV, capillary voltage: 20-35 V, tube lens offset from 2 to 10 V, heated capillary temperature:  $250^\circ\text{C}$ , sheath-gas flow rate and auxiliary-gas flow rate: from 20 and 25 arbitrary units.

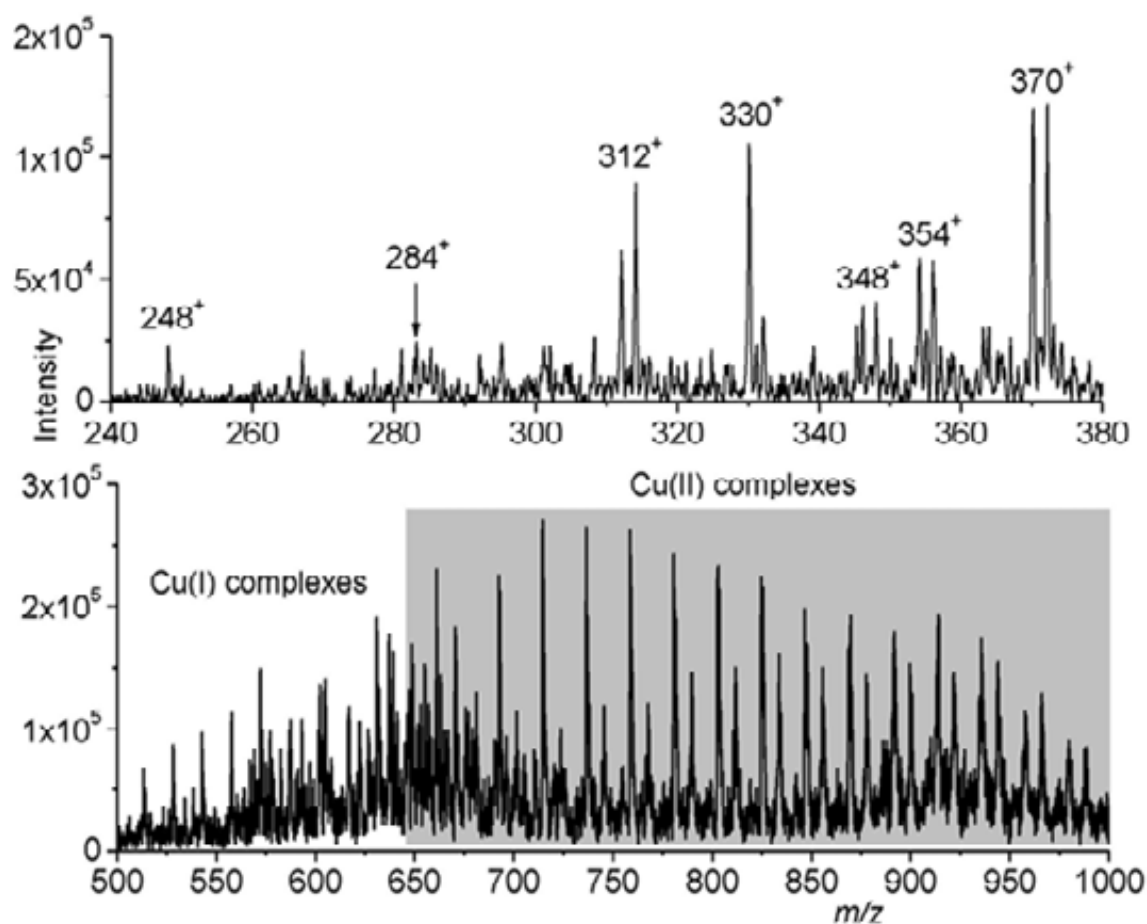
### Results and discussion

Full MS scan of **Teb**, **Cyp**, **Pen** and  $\text{CuCl}_2$  (Fig. 2) shows various products (Tab. 1). Copper in the spectrum is present as Cu(I) only as well as Cu(II). The reduction of Cu(II) to Cu(I) usually occurs during the electrospray process and it is influenced by the presence of ligands (see, <sup>1-3, 6</sup>). Usually some significant amount of Cu(II) in the presence of **Cyp** is remained <sup>2</sup>. The higher amount of Cu(II) in complexes can be explained by higher number of ligands in copper complexes (the ratio of Cu:azoles is 1:3). It is known that the higher number of ligands protects the Cu(II) oxidation state of copper <sup>7</sup>.

The spectrum can be divided into three parts. First part belongs to simple adducts of azoles including its fragments (Table 1). **Pen** is present a protonated ( $\text{PenH}^+$ ), as its fragment after loss of one Cl ( $\text{Pen}^*\text{fr}^+$ ) and as a adduct with Cu(I). **Teb** is present as adduct with  $\text{Na}^+$  and Cu(I) ( $\text{TebNa}^+$ ,  $[\text{TebCu}]^+$ ). **Cyp** is present as adduct with  $\text{K}^+$  and Cu(I) ( $\text{CypK}^+$ ,  $[\text{CypCu}]^+$ ). **Cyp** adduct is not present alone, but in its complexes with Cu(II) because of its high affinity

to copper<sup>2</sup>. **Teb** has the highest affinity to copper (among these azoles), which can be demonstrated on extremely high stability of the  $[\text{TebCu}]^+$  complex  $224 \text{ kJ/mol}^{-1}$  and by its high intensity in the spectra (Table I).

The second part of the spectra is affirmed to Cu(I) with two azole (or azole fragment) ligands. The ligands are combined statistically respecting the differences in their affinity to copper. In the third part of the spectra, Cu(II) complexes with three and four ligands are present.



**Fig. 2.** Full MS scan of tebuconazole, cyproconazole, penconazole and  $\text{CuCl}_2$  (all  $2.5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) in water/ethanol (1:1) mixture.

### Conclusion

The reactivities of **Pen**, **Cyp** and **Teb** with Cu are similar. These azoles create Cu(II) complexes in the same stoichiometric manner. **Teb** has slightly higher affinity to copper in contrast to **Cyp** and little bit more to **Pen**. In copper presence the less stable azole is **Pen** and there can be observed also as **Pen**<sup>•fr</sup> (after loss of Cl) in the spectra.

The electrospray ionization experiments in the gas phase revealed huge amount of possible interactions. However, we have to take into account that in the real environmental system not all the interactions occur. From this point of view the most important information is that copper induces the fragmentation of **Pen** (loss of Cl), the availability of copper as an essential nutrient is strongly influenced by the creation of various complexes with azole ligands and additionally the availability of nutrients such as  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  is also influenced by the azoles presence in the system.

**Table I**

The most significant monocations present in the full mass spectra of the reaction mixture consisting from equimolar amounts ( $2.5 \cdot 10^{-5}$  M) of cyproconazole (Cyp), tebuconazole (Teb), penconazole (Pen) and  $\text{CuCl}_2$  (Fig. 2)

<i>m/z</i> (lightest isotopes)	formula	absolute intensity
248 <sup>+</sup>	Pen*fr <sup>+</sup>	2.82E+04
284 <sup>+</sup>	PenH <sup>+</sup>	1.84E+04
312 <sup>+</sup>	(Teb*fr)H <sup>+</sup>	7.26E+04
330 <sup>+</sup>	TebNa <sup>+</sup> /CypK <sup>+</sup>	1.17E+05
346 <sup>+</sup>	[CuPen] <sup>+</sup>	4.52E+04
354 <sup>+</sup>	[CuCyp] <sup>+</sup>	6.32E+04
370 <sup>+</sup>	[CuTeb] <sup>+</sup>	1.19E+05

**Acknowledgements**

This work was supported by the Czech Science Foundation project no. 18-01710S (Jana Jaklová Dyrtrtová).

**References**

1. Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Schröder D., Čadková E., Komárek M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 1037 (2011).
2. Jakl M., Fanfrlík J., Jaklová Dyrtrtová J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 31, 2043 (2017).
3. Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Schröder D., Norková R.: *Int. J. Mass Spectrom.* 338, 45 (2013).
4. Jaklová Dyrtrtová J., Fanfrlík J., Norková R., Jakl M., Hobza P.: *Int. J. Mass Spectrom.* 359, 38 (2014).
5. Norková R., Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Schröder D.: *Water Air Soil Pollut.* 223, 2633 (2012).
6. Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Navrátil T., Cvačka J., Pačes O.: *Electrochim. Acta* 211, 787 (2016).
7. Tintaru A., Charles L., Milko P., Roithová J., Schröder D.: *J. Phys. Org. Chem.* 22, 229 (2009).

## Possibilities of Simultaneous Voltammetric Detection of Tocopherols in Non-Aqueous Media

Granit Jashari, Milan Sýs, Radovan Metelka, and Ivan Švancara

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 53210 Pardubice, Czech Republic,

E-mail: granit.jashari@student.upce.cz

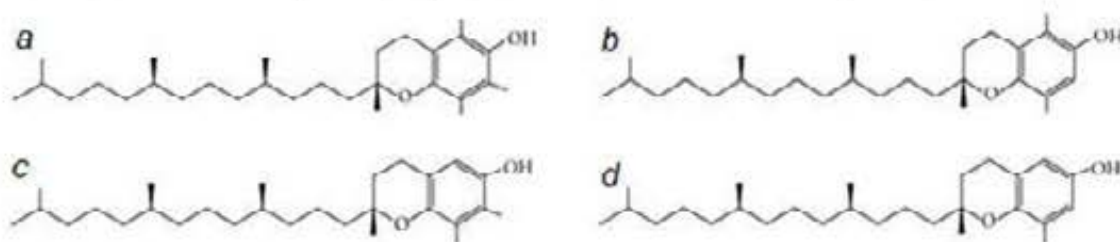
### Abstract

An electrochemical study on possibilities of simultaneous detection of tocopherols based on their anodic oxidation at various electrode materials in non-aqueous supporting electrolytes was performed. Several working conditions, such as selection of working electrode, supporting electrolyte, effect of surfactant, water content, and parameters of square-wave voltammetry, were optimized. An overlapping of corresponding peaks of alpha-, gamma- and delta- form. The separation of oxidation signals was improved at optimum working conditions, but the signals were not completely resolved. However, it was found that this phenomenon did not cause significant changes in peak currents for various concentration ratios of tocopherols, which could be possibly utilized in analytical applications.

**Key words:** Tocopherols; Glassy carbon electrode; Square wave voltammetry; Food analysis.

### Introduction

Tocopherols (vitamin E; VE) are lipophilic phenolic antioxidants, naturally occurring in vegetable oils, which are widely used in pharmaceutical and cosmetic industries<sup>1,2</sup>. These organic compounds are known as vitamins that organism needs in small quantities for the proper functioning of its metabolism. Hence, it is necessary to control their intake for dietary purposes and to determine their content in foodstuffs. VE protect human body against cancer, cataract and cardiovascular disease. Avitaminosis may cause circulatory disorders and affects the metabolism pathway in muscle<sup>2-4</sup>. From chemical point of view, tocopherols are classified according to number of methyl groups on chromanol ring containing an isoprenoid side chain without double bonds (see Fig. 1) which is responsible for their lipophilic character<sup>1,5</sup>.



**Fig.1.** Chemical structure of  $\alpha$ -tocopherol (a),  $\beta$ -tocopherol (b),  $\gamma$ -tocopherol (c) and  $\delta$ -tocopherol (d).

Their simultaneous voltammetric determination have been reported only in few papers. In all cases, an overlapping of the corresponding anodic peaks was observed<sup>5,7,9</sup>. In 1973, McBride and Evans used linear sweep voltammetry for the determination of the individual tocopherols in vegetable oils dissolved in the mixture of ethanol and benzene<sup>7</sup>. Clough utilized square wave voltammetry only for their simultaneous electrochemical detection in 1992. Unfortunately, voltammetric method for simultaneous quantification of all forms of tocopherols was not proposed. In 2001, Coatanca used differential pulse voltammetry of

tocopherols mixtures at platinum microelectrode. However, only one broad oxidation peak was obtained due to presence of sample matrix (edible oils) <sup>9</sup>. Diaz continued in the previously mentioned works and he used a chemometric method to resolve overlapping anodic peaks of tocopherols for the first time <sup>5</sup>. It is necessary to mention that effect of used organic solvent, content of water or presence of surfactant on overlapping signals have not been studied in detail yet. Such factors were studied thoroughly and obtained results are presented in this contribution.

## Experimental

Surfactants (Triton, sodium dodecyl sulfate, cetylpyridinium chloride, cetyltrimethylammonium bromide), organic solvents and analytical standards of (+)- $\alpha$ -tocopherol, (+)- $\gamma$ -tocopherol and (+)- $\delta$ -tocopherol were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Tested supporting electrolytes were different organic solvents (99.9% acetonitrile, 99.8% acetone, 96% ethanol, 99.8% dimethylformamide and 99.9% propylene carbonate) containing always 0.1 mol L<sup>-1</sup> LiClO<sub>4</sub>. Ultrapure water with resistivity >18.3 M $\Omega$  cm was obtained by Milli-Q system (Millipore, USA) and was used for preparation of surfactant solutions.

All electrochemical measurements were carried out at glassy carbon electrode (GCE) with 3 mm diameter from Metrohm (Prague, Czech Republic), together with the calomel electrode Hg|Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> with 0.1 M LiClO<sub>4</sub> as salt bridge (reference), and Pt-wire (auxiliary electrode). Above mentioned electrochemical setup was connected to a potentiostat PGSTAT101 from Metrohm (Prague, Czech Republic) operating with Nova 1.11 software. Surface of working electrode was renewed on a polishing pad with water suspension of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> powder (particle size 1.0  $\mu$ m) for 30 s, washed with ultrapure water and dried using pulp paper.

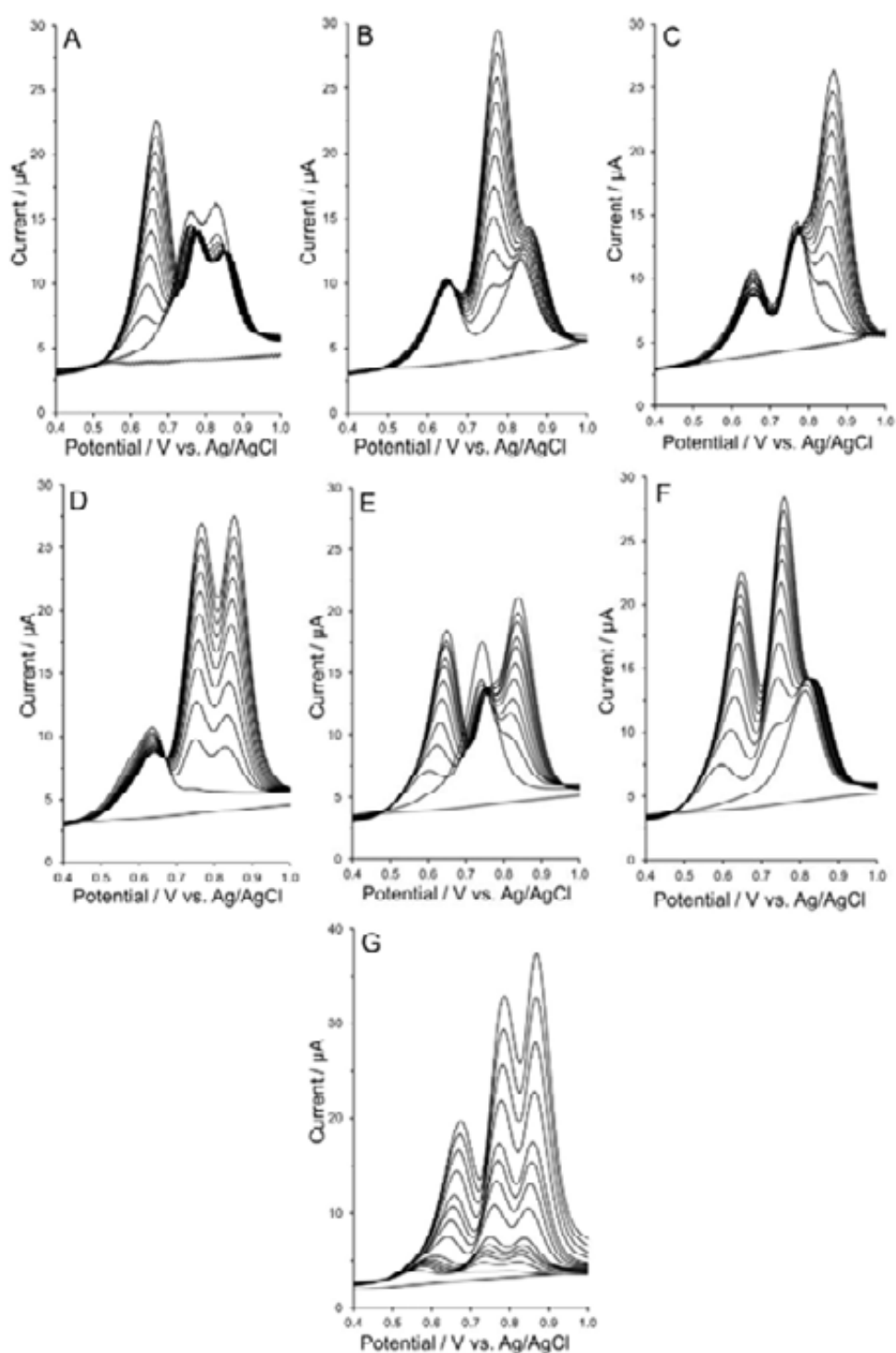
## Results and discussion

At the beginning, it must be mentioned that  $\beta$ -tocopherol was not investigated in this study because this form of vitamin E is not present in foodstuffs from plant origin which are target samples. During optimization studies, it was necessary to select optimum supporting electrolyte and working electrode providing the highest current response for oxidation of tocopherols and sufficient separation of anodic peaks. Dimethylformamide (DMF), propylene carbonate (PC), acetone (AC), ethanol (EtOH) and acetonitrile (ACN) were tested as optimum organic solvent. No current response of tocopherols was recorded when DMF and PC were used. Better results were obtained using AC and EtOH. Three overlapping peaks with low current responses were observed in case of EtOH. Glassy carbon electrode (GCE), Pt disk electrode (PtE), pyrolytic graphite electrode (PGE), boron-doped diamond electrode (BDDE) and GCE modified with thin layer of multi-wall carbon nanotubes (GCE/MWCNTs) were investigated in simultaneous voltammetric detection of tocopherols. The optimum peak separation of  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -TOH),  $\gamma$ -tocopherol ( $\gamma$ -TOH) and  $\delta$ -tocopherol ( $\delta$ -TOH) was obtained at GCE in pure ACN containing 0.1 mol L<sup>-1</sup> LiClO<sub>4</sub>. Presence of surfactants did not improve significantly the peak separation. Peaks were only shifted to more negative potentials in the presence of water (90% ACN).

As a second step, optimum working parameters of square wave voltammetry (SWV) were found varying the potential step ( $E_{step}$ ), frequency ( $f$ ) and amplitude, which influence resulting voltammetric response. The best peak separation of tocopherols was achieved at  $E_{step} = 1$  mV s<sup>-1</sup>,  $f = 25$  Hz and potential amplitude 25 mV. Peak potentials in these conditions were +0.641 V for  $\alpha$ -TOH, +0.767 V for  $\gamma$ -TOH and +0.852 V for  $\delta$ -TOH. These conditions were used to measure calibration curves for the mixture of tocopherols. Figs. 2A, 2B and 2C show calibration voltammograms within concentration range 20–200  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> always of one



selected form when two others had a constant concentration of  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Figs. 2D, 2E and 2F were recorded when concentration of two forms was simultaneously increased. The last Fig. 2G show voltammograms of each form in concentration range  $3\text{-}300 \mu\text{mol L}^{-1}$ .



**Fig 2.** Voltammograms of  $20\text{-}200 \mu\text{mol L}^{-1}$  of one tocopherol when two others had a constant concentration of  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  (A, B and C). Voltammograms of  $20\text{-}200 \mu\text{mol L}^{-1}$  of two tocopherols when one had a constant concentration of  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  (D, E and F). Simultaneous detection of  $3\text{-}300 \mu\text{mol L}^{-1}$  of all tocopherol forms. SWV at GCE in  $99.9\%$  ACN containing  $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ ,  $E_{\text{step}} = 1 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$  and  $f = 25 \text{ Hz}$ .

Finally, it can be concluded that signals between  $\gamma$ -tocopherol and  $\delta$ -tocopherol were so close when one of these forms were in higher concentration than other, whereas, the separation of

$\alpha$ -tocopherol and  $\delta$ -tocopherol was larger, as is observed in voltammograms. However, it was found that this phenomenon did not cause significant changes of peak currents for defined concentration range (20-80  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) which could be utilized for analytical applications.

Recovery of proposed protocol was investigated for chosen concentrations of tocopherols, namely 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\alpha$ -TOH, 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\gamma$ -TOH and 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\delta$ -TOH. Results showed that if the surface of GCE is polished after each measurement, recoveries of 116.3, 93.0 and 93.7 %, respectively, could be achieved. In contrast, recoveries of 127, 148.2 and 136.5 %, respectively, were obtained at unpolished GCE.

### Conclusion

Various working parameters were investigated to develop the voltammetric method suitable for simultaneous detection of  $\alpha$ -tocopherol,  $\gamma$ -tocopherol, and  $\delta$ -tocopherol and their possible quantification. Square wave voltammetry (potential step 1  $\text{mV s}^{-1}$ , frequency 25 Hz and potential amplitude 25 mV) of these forms of vitamin E at GCE in pure ACN containing 0.1  $\text{mol L}^{-1}$  lithium perchlorate was chosen as optimum electroanalytical method. Unfortunately, evident overlapping of anodic peaks has not yet been fully resolved. However, using of appropriate data processing, such as deconvolution of signals or application of elimination voltammetry, could help to further improve the resolution of signals and to enable precise analytical quantification of different tocopherols. Such investigations are currently in the progress.

### Acknowledgments

Financial support from the Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice (project No. SGS-2019-003) is gratefully acknowledged.

### References

1. Ruperez F.J., Martin D., Herrera E., Barbas C.: *J. Chromatography A* 935, 45–69 (2001).
2. Li S.G., Xue W.T., Zhanga H.: *Electroanalysis* 18, 2337 (2006).
3. Sýs M., Švecová B., Švancara I., Metelka R.: *Food Chem.* 229, 621 (2017).
4. Bakre S. M., Gadmale D.K., Toche R.B., Gaikwad V.B.: *J. Food Sci. Technol.* 52, 3093 (2015).
5. Diaz T.G., Merás I.D., Cabanillas A.G., Franco M.F.A.: *Anal. Chim. Acta* 511, 231 (2004).
6. Lubeckyj R.A., Winkler-Moser J.K., Phaner M.J.: *J. Am. Oil Chemists' Society* 94, 527 (2017).
7. McBride H.D., Evans D.H: *Anal. Chem.* 45, 446 (1973).
8. Clough A.E.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 456 (1992).
9. Coatanca M., Darchen A., Hauchard D.: *Sens. Actuator. B-Chem.* 76, 539 (2001).

## Electrochemical Oxidation of Phytosterols at Carbon-based Electrode Materials (Elektrochemická oxidace fytosterolů na uhlíkatých elektrodových materiálech)

Kristýna Jelšíková, Michal Zelenský, Karolina Schwarzová-Pecková

Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry,  
UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2,  
Czech Republic, E-mail: kpeckova@natur.cuni.cz

### Abstract

Phytosterols are problematic analytes when considering their detection, as they rarely possess moieties exhibiting electrochemical/fluorescent activity or sufficient absorbance in UV spectra. In this study, electrochemical oxidation of selected phytosterols was studied in a mixture of acetonitrile and a strong acid, presumably initiating dehydration of the steroid skeleton. This chemical reaction activates phytosterols so that their electrochemical oxidation proceeds at reasonable potentials within the potential window of boron doped diamond and glassy carbon electrode. Voltammetric behaviour was studied using inorganic acids (perchloric acid, sulfuric acid and trihydrogenphosphoric acid) as supporting electrolytes. The stability of the voltammetric response of phytosterols, dependence of peak heights on scan rate and the dependence of the phytosterol signal on the water content in the measured solution was studied.

**Key words:** Boron doped diamond electrode, Electrochemical oxidation, Glassy carbon electrode, Phytosterols, Voltammetry.

### Úvod

Fytosteroly jsou steroly rostlinného původu, které mají v buněčných membránách rostlinných buněk podobnou roli, jakou hraje cholesterol v buňkách živočišných. Jejich nejdůležitější funkcí je ovlivnění permeability a změna fluidity v buňce<sup>1</sup>. Fytosteroly se hromadí v semenech v průběhu klíčení, hrají důležitou roli v proliferaci a diferenciaci buněk a poskytují zásobu pro růst nových buněk a mladých výhonků<sup>2</sup>. Dosud bylo identifikováno více než 40 fytosterolů; nejhojněji se vyskytuje  $\beta$ -sitosterol, kampesterol a stigmasterol. Savci syntetizovat fytosteroly nedokáží; primárními zdroji fytosterolů je zelenina a rostlinné produkty bohaté na tuk, včetně rostlinných olejů, ovoce a ořechů. Většina necholesterolových sterolů se rychle vylučuje játry s tím, že méně jak 1 % původních sterolů je absorbováno, zatímco cholesterolu přijímaného v potravě je absorbováno 55 % – 60 % (ref. <sup>3</sup>). Absorpce fytosterolů ve sítěvě závisí na struktuře postranního řetězce, který je na uhlíku C<sub>17</sub>. Větvením tohoto postranního řetězce se zvyšuje hydrofobnost molekuly, a tím se snižuje absorpce<sup>4</sup>. V lidském séru fytosteroly snižují koncentrace cholesterolu tím, že kompetují s cholesterolem a žlučovými kyselinami o adsorpci na povrch střevní tkáně<sup>5</sup>. Tato skutečnost z nich činí atraktivní volbu jako nefarmakologické látky pro léčbu hypercholesterolemie.

Biosyntéza fytosterolů může probíhat několika dráhami. Příkladem takové dráhy je polymerace isoprenu mevalonátovou dráhou. Touto polymerací vzniká skvalen, který podléhá cyklizaci na 2,3-oxidoskvalen<sup>6</sup>. Samotná biosyntéza sterolů u rostlin se skládá z více jak 30ti enzymaticky katalyzovaných reakcí. Enzymatické kroky u rostlin s fotosyntetickým aparátem přeměňují 2,3-oxidoskvalen na cykloartenol pomocí enzymu cykloartenol syntetázy, který je poté přeměněn enzymatickými reakcemi na potřebný fytosterol. Živočichové, kteří nedokáží provádět fotosyntézu, přeměňují 2,3-oxidoskvalen na lanosterol pomocí enzymu lanosterol syntetázy. Lanosterol je poté dalšími enzymatickými reakcemi v houbách přeměněn na ergosterol a u živočichů na cholesterol<sup>7</sup>.

Možnosti detekce fytosterolů jsou poměrně omezené, jelikož jejich molekuly neobsahují chromoforní nebo fluoroforní části; pro plynovou chromatografii je problémem nízká těkavost, tj. nutnost derivatizace těchto molekul<sup>2</sup>. Nejčastěji je tedy využívána kapalinová chromatografie s tandemovou MS detekcí<sup>8</sup>. Problematická je i jejich přímá elektrochemická oxidace stejně jako v případě ostatních sterolů neobsahujících více než jednu dvojnou vazbu na steroidním skeletu (viz review<sup>9</sup>). V práci<sup>10</sup> bylo k ampérometrické detekci fytosterolů v HPLC použito bezvodé prostředí chloristanu lithného v acetonitrilu a elektrody ze skelného uhlíku. Limit detekce byl v rozmezí  $0,816 \mu\text{mol.l}^{-1} - 3,40 \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

V této práci je studována možnost oxidace stigmasterolu,  $\beta$ -sitosterolu a ergosterolu v prostředí acetonitril – kyselina chloristá, kdy je předpokládána dehydratace steroidního skeletu, obdobně jako u Liebermann-Burchardovy reakce cholesterolu. Ta vede ke tvorbě dvojných vazeb na steroidním skeletu a zvýšení elektrochemické aktivity, jak bylo prokázáno v případě primárních žlučových kyselin a cholesterolu<sup>11</sup>.

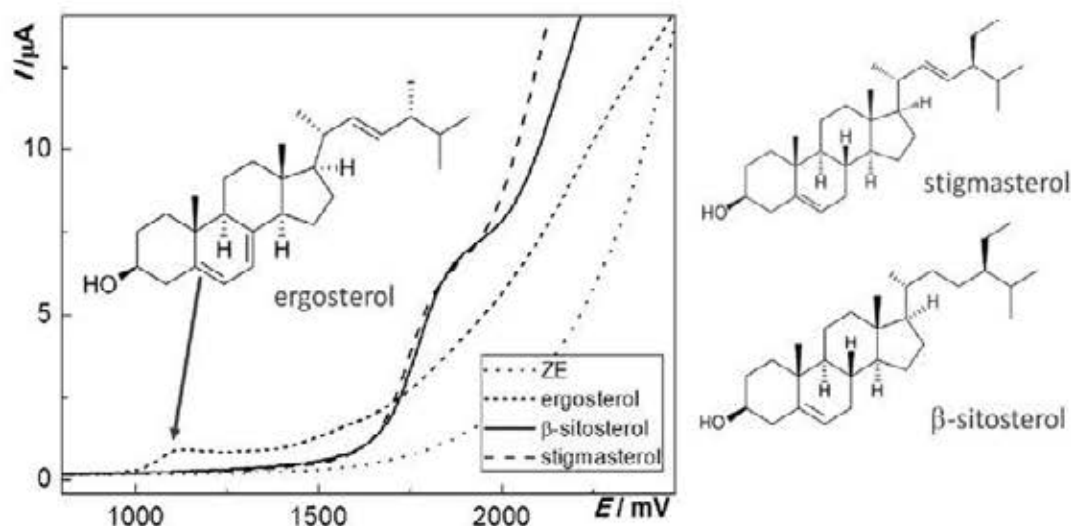
### Experimentální část

Stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol a ergosterol byly zakoupeny u Sigma-Aldrich. Minimální deklarovaná čistota byla 99,98%. Ostatní použité chemikálie byly (pokud není udáno jinak) analytické čistoty: acetonitril ChromaSolv (Sigma-Aldrich, obsah vody pod  $2 \cdot 10^{-3}$  vol.%) (vyhodnoceno plynovou chromatografií), bezvodý chloristan sodný pro HPLC (Fluka), dusičnan stříbrný Ph. Eur. 3 (Fluka), kyselina chloristá 70% (Sigma-Aldrich). Všechny experimenty byly provedeny v prostředí acetonitrilu nebo ve směsném prostředí acetonitril:voda. Jako základní elektrolyt byla používána  $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HClO}_4$ . Byl použit potenciostat EkoTribo polarograf se softwarem Polar-Pro verze 5.1. (EcoTrend Plus, Praha). Byly použity pracovní elektrody z bórem dopovaného diamantu (BDD,  $d = 3 \text{ mm}$ , Windsor Scientific, Slough, Velká Británie) a elektroda ze skelného uhlíku (GCE,  $d = 2 \text{ mm}$ , Metrohm, Švýcarsko). Jako referenční elektroda byla použita argentochloridová elektroda ( $3 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KCl}$ ) a jako pomocná elektroda byla použita platinová elektroda (obě elektrody Elektrochemické detektory, Turnov). Pracovní elektrody byly mezi jednotlivými měřeními leštěny za použití suspenze  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (zrnitost  $0,05 \mu\text{m}$ ) v destilované vodě a lešticí podložky (Elektrochemické detektory, Turnov, ČR). Před měřeními byl povrch BDD elektrody zoxidován v  $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  po dobu deseti minut při potenciálu  $+2,8 \text{ V}$ .

### Výsledky a diskuze

Elektrochemická oxidace dvou vybraných fytosterolů ( $\beta$ -sitosterolu a stigmasterolu) a ergosterolu byla nejprve studována v prostředí acetonitril –  $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HClO}_4$  s obsahem vody 0,43 %. Toto prostředí umožňuje pravděpodobně dehydrataci steroidního skeletu a následnou elektrochemickou oxidaci.  $\beta$ -sitosterol a stigmasterol, které mají ve své struktuře jednu  $3\beta$  hydroxylovou skupinu v homoallylové pozici k dvojně vazbě  $\Delta^5$  poskytují voltametrický signál při potenciálu *ca* + 1 850 mV ihned po přípravě roztoku (tj. smísení zásobního roztoku fytosterolu v acetonitrilu s kyselinou chloristou v acetonitrilu). U ergosterolu lze pozorovat dvoustupňovou oxidaci u +1050 mV a +1600 mV (obr. 1). Tento druhý pik se v závislosti na čase od doby přípravy zvyšuje a je nejlépe viditelný až po 45 minutách. Přísluší tedy oxidaci některého z produktů dehydratační reakce. Odlišné chování ergosterolu lze přičíst odlišné struktuře, tj. dvěma dvojným vazbám  $\Delta^5$  a  $\Delta^7$ . Všechny studované děje jsou ireverzibilní a v rozsahu nižších rychlostí skenu do  $160 \text{ mV.s}^{-1}$  řízeny difúzí. Na bórem dopované diamantové elektrodě jsou všechny signály dobře vyvinuté na rozdíl od elektrody ze skelného uhlíku, kde se piky položené pozitivněji než +1500 mV nacházejí v oblasti úniku základního elektrolytu.

Jelikož v průběhu elektrochemické oxidace dochází k pasivaci elektrodového povrchu, musel být tento aktivován leštěním mezi jednotlivými skeny na obou elektrodách. Anodická aktivace *in-situ* v měřeném roztoku, která je často využívána u BDD elektrod, se ukázala jako nedostatečná. Voltametrická odezva stigmasterolu i  $\beta$ -sitosterolu je viditelná i v prostředí kyseliny sirové, ta se však ukázala naprosto nevhodná pro ergosterol. V přítomnosti kyseliny fosforečné nejsou voltametrické odezvy fytoosterolů dobře vyvinuty. Voltametrická odezva taktéž klesá s rostoucím obsahem vody v roztoku. Koncentrační závislosti byly proměřeny metodou diferenční pulsní voltametrie. Nižší limity detekce byly získány na bórem dopované diamantové elektrodě.



**Obr. 1.** LS voltamogramy  $\beta$ -sitosterolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ), stigmasterolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ ) a ergosterolu ( $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ) v  $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HClO}_4$  v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,43 % na bórem dopované diamantové elektrodě. Rychlost polarizace  $100 \text{ mV.s}^{-1}$ , měřeno v rozsahu 0 až +2 500 mV. Voltamogramy zaznamenány ihned po přípravě smísením roztoku jednotlivých fytoosterolů s roztokem  $\text{HClO}_4$ .

### Závěr

Výše uvedené výsledky demonstrují možnost přímé elektrochemické oxidace fytoosterolů po jejich chemické aktivaci v přítomnosti silné kyseliny a jsou motivací pro další výzkum v oblasti využitelnosti redoxní aktivity sterolů pro elektroanalýzu. Pozornost bude věnována možnosti elektrochemické detekce v průtokových metodách, např. HPLC, kdy obsah vody v systému bude ovlivňovat jak detekci, tak separaci studovaných fytoosterolů. Jiným směrem dalšího vývoje je studium mechanismu a identifikace produktů jak dehydratačních, tak elektrochemických reakcí.

### Acknowledgments

Projekt vznikl s finanční podporou Grantové agentury České republiky (projekt GAČR GAČR18-01710S) a v rámci programu Specifického vysokoškolského výzkumu vedeného pod číslem SVV260440.

### References

1. Ellegard L. H., Andersson S. W., Normen A. L., Andersson H. A.: *Nutr. Rev.* 65, 39 (2007).

2. Liu X. X., Wang L. S., Zhang S. F., Deng X. R., Tang X. L., Huang X. J.: *Electroanalysis* *18*, 2385 (2006).
3. Ostlund R. E., McGill J. B., Zeng C. M., Covey D. F., Stearns J., Stenson W. F., Spilburg C. A.: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *282*, E911 (2002).
4. Heinemann T., Axtmann G., Vonbergmann K.: *Eur. J. Clin. Invest.* *23*, 827 (1993).
5. Patel M. D., Thompson P. D.: *Atherosclerosis* *186*, 12 (2006).
6. Japelt R. B., Jakobsen J.: *Front. Plant Sci.* *4* (2013).
7. Piironen V., Lindsay D. G., Miettinen T. A., Toivo J., Lampi A. M.: *J. Sci. Food Agric.* *80*, 939 (2000).
8. Mo S. Y., Dong L. L., Hurst W. J., van Breemen R. B.: *Lipids* *48*, 949 (2013).
9. Klouda J., Barek J., Nesmerak K., Schwarzova-Peckova K.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* *47*, 384 (2017).
10. Ito N., Hakamata H., Kusu F.: *Anal. Methods* *2*, 174 (2010).
11. Klouda J., Barek J., Kocovsky P., Herl T., Matysik F. M., Nesmerak K., Schwarzova-Peckova K.: *Electrochem. Commun.* *86*, 99 (2018).

## Electrochemical Enzymatic Biosensors for Determination of Catecholamines in Flow Systems

Bohdan Josypčuk<sup>a</sup>, Jiří Barek<sup>b</sup>, and Oksana Josypčuk<sup>a</sup>

<sup>a</sup>J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: josypcuk@jh-inst.cas.cz

<sup>b</sup>Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

### Abstract

Several biosensors (BS) based on flow enzymatic mini-reactors containing a mesoporous silica powder covered by enzyme laccase or tyrosinase were used for determination of L-DOPA, dopamine, noradrenaline, and adrenaline. The silica powder of MCM-41 with covalently bonded laccase was found to be the best reactor filling for the detection of catecholamines. Relative current response of such BS was 100 % for dopamine, 32.1 % for L-DOPA, 26.2 % for noradrenaline, and 0.71 % for adrenaline. The practical applicability of Lac-MCM41 biosensor was successfully verified by the determination of dopamine and noradrenaline in medical solutions for infusions.

**Key words:** Enzymatic biosensor, Catecholamines, Flow analysis, Amperometry, Silver solid amalgam

### Introduction

Catecholamines, namely dopamine, noradrenaline, and adrenaline, act as neurotransmitters or hormones at central and peripheral levels<sup>1</sup>. A precursor to catecholamines is tyrosine, which is converted to L-DOPA through a series of enzymatic reactions by the enzyme tyrosine hydroxylase. L-DOPA is converted to dopamine, which is further converted to noradrenaline and finally transformed to adrenaline<sup>2</sup>. Both adrenaline and noradrenaline are involved in the control of arousal, attention, mood, learning, memory, and stress response<sup>3</sup>. Dopamine regulates mood, attention, motivation, sleep-wake cycles, and cognition<sup>4</sup>. Abnormal concentrations of catecholamines are also associated with numerous diseases. For the determination of catecholamines various methods were used, e.g., chromatography, spectrophotometry, flow injection analysis or capillary electrophoresis. These methods offer good selectivity and low limits of detection but they often require complex pretreatment steps and expensive instrumentations. On the other hand, electrochemical methods provide an inexpensive and user friendly analytical tool for the sensitive and rapid determination of catecholamines (review<sup>5</sup>). This review does not describe enzymatic biosensors which can significantly increase the selectivity electrochemical determinations. The most commonly used enzymes that oxidize catecholamines are laccase and tyrosinase.

The aim of this work was to investigate the conditions for determination of L-DOPA, dopamine, noradrenaline, and adrenaline in a flow system with a mini-reactor filled by different mesoporous SiO<sub>2</sub> powders with covalently bound enzymes laccase and tyrosinase. On the basis of the data found, a simple protocol for the determination of dopamine and noradrenaline in infusion medicinal solutions was proposed and verified.

### Experimental

Laccase from *Trametes versicolor* (Lac, 12.9 U mg<sup>-1</sup>), tyrosinase from mushroom (Tyr, 2687 U mg<sup>-1</sup>), L-DOPA, dopamine, noradrenaline (norepinephrine), adrenaline (epinephrine), glutaraldehyde (GA), (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES), mesoporous silica SBA-15

(Sigma, product No 777242) and mesoporous silica MCM-41 (Sigma, product No 643645) were purchased from Sigma-Aldrich. All other chemicals were of p.a. or higher grade.

All amperometric measurements were carried out at room temperature using computer-controlled analyzer with MultiElchem v. 3.1 software (J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences) and electrochemical stand (Polaro-Sensors, Czech Republic). The three-electrode system consisted of a tubular detector of silver solid amalgam as a working electrode<sup>6</sup> (laboratory-made, inner diameter 0.5 mm, the amalgam tube length 6.0 mm), a miniaturized saturated calomel electrode based on silver paste amalgam<sup>7</sup> (laboratory-made, it has the same potential as a saturated calomel electrode) as the reference electrode. The auxiliary electrode was platinum wire (diameter 1.0 mm, length 10 mm). The system for flow injection analysis with electrochemical detection (FIA-ED) was used for amperometric measurements with a biosensor based on enzymatic bioreactor<sup>8-10</sup>. Schemes of the used FIA-ED in flow systems are shown and described in details in our previous papers<sup>10-12</sup>.

### Results and discussion

It was found in our previous study<sup>8, 13</sup> that mesoporous powders SiO<sub>2</sub> labelled SBA-15 and MCM-41 are the best fillings for enzymatic mini-reactors. Preparation of these powders with a covalently bound enzyme is relatively simple, fast, and universal (independent of enzyme used). These powders and mini-reactors filled by them have a long life time and they can be used for hundreds of days. Therefore, SBA-15 and MCM-41 were selected as substrates to which the laccase and tyrosinase were bound. Exclusively covalent bonds from the SiO<sub>2</sub> particle to the enzyme guarantee the stability and long life of the biosensors. After a detailed examination of the effect of the mobile phase composition and its pH on the determination of all four analytes, 100 mmol L<sup>-1</sup> acetate buffer (AcB) with pH 4.8 was found to be optimal and it was used for all further measurements. According to preliminary measurements of four studied substances, it was found that dopamine provides the greatest current response and therefore this catecholamine was chosen as a model substance to find optimal conditions for amperometric determination all tested catecholamines.

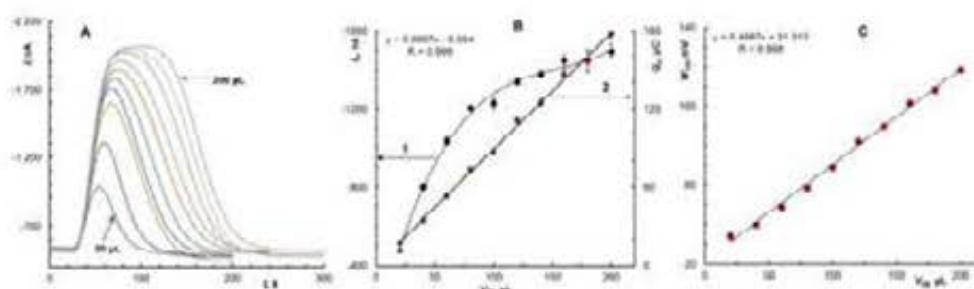
*The detection potential* is one of the most important parameters for amperometric determinations, influencing both sensitivity and selectivity of measurements. The largest current response was observed between +50 and -50 mV with maximum around 0 mV. These potentials correspond to the reduction of quinone molecules formed during enzymatic reaction. This potential is also appropriate due to the fact that at this potential there is practically no reduction of oxygen dissolved in the mobile phase, and therefore the background current is rather low (oxygen cannot be removed from the solution because it is involved in the enzymatic oxidation of catecholamines).

*The flow rate of the mobile phase* affects the contact time between analyte and enzyme, the analyte transport to the detector surface, the mobile phase consumption, the duration of the overall analysis and its sensitivity, etc. When using a mini-reactor with a fine powder, it is necessary to take into account its hydrodynamic resistance, especially in the low pressure flow system. In our system with a reactor volume of about 20  $\mu$ L (filling column length 10 mm), the flow rate greater than 0.2 mL min<sup>-1</sup> cannot be used to prevent the leakage of the solution through a seal at the reactor inlet. The peak current quickly increases from  $v_{\text{flow}} = 0.01$  mL min<sup>-1</sup> to  $v_{\text{flow}} = 0.06$  mL min<sup>-1</sup> and then decreases slowly. This flow rate should be used in analyses where the maximum sensitivity is required, but it should be assumed that one measurement will take 5 – 6 min. On the other hand, if the time between analyte injections is



less than 3 – 4 min, enzyme does not recover its activity and the current response of the parallel measurements gradually decreases. Increasing the flow rate from 0.01 to 0.20 mL min<sup>-1</sup> increases the current response 1.87 times.

The dependence of the peak current on the injection volume ( $V_{inj}$ ) is approximately linear only at low volumes (see Fig. 1B, curve 1) and then the increase of the current response gradually diminishes. After injection, the analyte zone is expanded due to different flow rates of the liquid in the centre of the capillary and at its wall. At low  $V_{inj}$  values, analyte is extensively diluted in the mobile phase and the current response corresponds to the concentration of analyte within the tubular detector. The gradual increase of the injecting volume causes a lower dilution rate of an analyte and thus an increase of the peak current. Once an undiluted analyte is inside the TD, the peak will not increase anymore and the current response will be limited by the transport of analyte to the detector surface (by liquid flow and by diffusion of analyte which are constant). It is logical that increasing injected volume results in peak broadening (see Fig. 1A, C) and thus in the increases of its area (charge) (see Fig. 1B, curve 2). Therefore, when a maximum sensitivity is required, larger volumes of analyte should be used and an evaluation of measurements should be based on peak area. When increasing the injection volume from 20 to 200  $\mu\text{L}$ , the peak current of BS increases 3.1 times and the peak area (charge) 10.1 times. The same behavior of the current response was observed with other enzymes and other analytes in a similar configuration of the flow system<sup>8</sup>.



**Fig. 1.** Dependences of the peak current  $I_p$  (A, B), the peak charge  $Q_p$  (B), and the peak width in the half height  $W_{1/2}$  (C) of dopamine on the injected volume  $V_{inj}$ . Experimental conditions: enzymatic mini-reactor Lac-MCM41 with  $V_{reactor} = 20.2 \mu\text{L}$ ; mobile phase 100 mmol L<sup>-1</sup> AcB with pH 4.8;  $V_{inj} = 20 - 200 \mu\text{L}$  with 20  $\mu\text{L}$  step;  $v_{flow} = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $E_{det} = 0 \text{ mV}$ ;  $t_{scan} = 200 - 300 \text{ s}$ ;  $c(\text{dopamine}) = 0.1 \text{ mmol L}^{-1}$ ;  $N = 5$ .

Reactor volume ( $V_{reactor}$ ) is an important parameter that affects measurement sensitivity, a reactor lifetime, consumption of enzyme-coated powder, a hydrodynamic resistance of a flow system, etc. The powder of Lac-MCM41 was used for gradually filling the reactor (PTFE tube with  $ID = 1.59 \text{ mm}$ ). Length of the powder column was measured and reactor volume was calculated. In this work, the reactors with following volumes (lengths) were used: 5.02  $\mu\text{L}$  (2.5 mm), 8.06  $\mu\text{L}$  (4.0 mm), 11.9  $\mu\text{L}$  (5.9 mm), 17.0  $\mu\text{L}$  (8.4 mm), and 25.5  $\mu\text{L}$  (12.6 mm). The current response increases only to a reactor volume of about 12  $\mu\text{L}$ . Further growth of  $V_{reactor}$  increases the reactor's enzymatic capacity, and hence its life time, but also increases a hydrodynamic resistance in the system.

Dependence of the peak current on analyte concentration was measured in the concentration range 0.004 – 0.50 mmol L<sup>-1</sup> of dopamine. The linearity is lost at higher concentrations and the linear section ended under the used conditions at dopamine concentration 0.2 mmol L<sup>-1</sup>.

*Repeatability and life time of biosensors.* Good repeatability of measurements ensures a reliable work with biosensor and it is one of the decisive parameters. In Table 1 results of the statistical processing of parallel measurements of four studied substances by two biosensors are shown. It can be seen that the current response of the biosensors varies considerably for different analytes and the activity of laccase is substantially higher than that of tyrosinase.

**Table 1.**

Parameters of amperometric determination of tested catecholamines. Silver solid amalgam tubular detector; reactor volume 20.2  $\mu\text{L}$ ; mobile phase: 100  $\text{mmol L}^{-1}$  AcB with pH 4.8;  $V_{\text{inj}} = 40 \mu\text{L}$  of 0.1  $\text{mmol L}^{-1}$  catecholamine;  $v_{\text{flow}} = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$ ;  $E_{\text{det}} = 0 \text{ mV}$ ;  $t_{\text{scan}} = 200 \text{ s}$ ;  $N = 5$ . SD - standard deviation; RSD - relative standard deviation, LD - detection limit.

Reactor Analyte	Average current, nA	Confidence interval, nA	SD, nA	RSD, %	LD, $\mu\text{mol L}^{-1}$
<b>Lac-MCM41 reactor</b>					
L-DOPA	-287	7.51	6.46	2.25	6.75
Dopamine	-892	18.9	16.2	1.82	5.46
Noradrenaline	-234	4.96	4.27	1.82	5.46
Adrenaline	-6.30	0.38	0.33	5.18	15.50
<b>Tyr-MCM41 reactor</b>					
L-DOPA	-24.2	1.07	0.92	3.82	11.50
Dopamine	-70.3	2.71	2.33	3.31	9.94
Noradrenaline	-13.5	1.49	1.29	9.53	28.60
Adrenaline	-8.54	0.47	0.41	4.77	14.30

From the analytical point of view, the repeatability of the enzymatic reactor preparation is also important. Seven Lac-MCM41 reactors were prepared and five parallel measurements of 0.1  $\text{mmol L}^{-1}$  solution of dopamine were carried out with each reactor. All results were statistically processed and it was shown that the reactor replacement did not introduce a major change in the measurement of dopamine (RSD = 4.71%,  $N = 7$ ). The reactor fillings had a volume of about 20  $\mu\text{L}$ , and as already mentioned, the biosensor response stabilizes at the reactor volume about 12  $\mu\text{L}$  and greater, which substantially reduces the demands on the accuracy of the reactor preparation.

The current response of seven biosensors with Lac-MCM41 reactors was monitored. Peak current values of 0.1  $\text{mmol L}^{-1}$  dopamine solution in biosensors with these freshly prepared reactors were comparable and average value of  $I_p$  was  $-921 \pm 64 \text{ nA}$  (RSD = 7.60%,  $N = 7$ ). The current response changed only marginally during the first two months and then it gradually began to decline. After approximately 6 months, the average peak current for the studied biosensors was  $-361 \pm 42 \text{ nA}$  (RSD = 10.0%,  $N = 7$ ) which is 39.2% of the original value.

*Practical samples* selected for the determination of the content of dopamine and noradrenaline as active substances contain relatively high concentrations of these ingredients. *Tensamin*<sup>®</sup> (Zentiva, ks, Prague, Czech Republic) is a concentrate for infusion solution sealed into a glass ampoule; volume 5 mL; active substance is dopamine hydrochloride 40  $\text{mg mL}^{-1}$  (210.9  $\text{mmol L}^{-1}$ ). To prepare the measured solution, 2.37  $\mu\text{L}$  of the medicament concentrate from the freshly opened ampoule was mixed with 4998  $\mu\text{L}$  of 100  $\text{mmol L}^{-1}$  AcB with pH

4.8. Thus prepared solution was injected into the flow system with a sample injector valve. The measured peak currents for the medicament samples were compared with those obtained for the standard  $0.1 \text{ mmol L}^{-1}$  dopamine solution. Statistical treatment of the measured results of seven samples ( $c = 40.41 \pm 1.26 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $SD = 1.39 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $RSD = 3.44\%$ ) indicates that the chosen analytical procedure is suitable for monitoring the dopamine content in the medicaments and the determined dopamine concentration well corresponds with the value declared by manufacturer ( $40 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

Medicament *Noradrenalin Leciva* (Zentiva, ks. Prague, Czech Republic) is also a concentrate for infusion solution sealed into a glass ampoule; volume  $1 \text{ mL}$ ; active substance is noradrenaline tartrate  $1.8872 \text{ mg}$  (noradrenaline  $1.000 \text{ mg}$ ) in  $1 \text{ mL}$  ( $2.965 \text{ mmol L}^{-1}$ ). The similar measurement procedure was used for this medicament. Performed and statistically processed analyses of seven noradrenaline samples ( $c = 1.12 \pm 0.06 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $SD = 0.07 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $RSD = 5.98\%$ ; the value declared by manufacturer is  $1.0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) testify that the infusion solution *Noradrenalin Leciva* can be analysed by the proposed procedure using the newly designed enzymatic biosensor with the sufficient sensitivity and accuracy.

### Conclusions

Four different biosensors based on flow enzymatic mini-reactors filled by two mesoporous silica powders modified by two enzymes (either laccase or tyrosinase) were used for the determination of L-DOPA, dopamine, noradrenaline, and adrenaline. Biosensor with Lac-MCM41 reactor proved to be the best one and basic parameters (e.g. detection potential, flow rate, injecting volume, reactor volume, analyte concentration) were optimized for it. A current response of this biosensor was  $100 \%$  for dopamine,  $32.1 \%$  for L-DOPA,  $26.2 \%$  for noradrenaline and  $0.71 \%$  for adrenaline. The linear part of dopamine concentration dependence was in the range  $0.004 - 0.2 \text{ mmol L}^{-1}$ . Statistical results of parallel determinations of studied analytes with this biosensor have proven its good accuracy ( $RSD = 1.82 - 5.18 \%$ ) and sensitivity ( $5.46 - 15.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). A life time of the studied biosensor is quite long and it allows determining catecholamines for several months. The biosensor based on the Lac-MCM41 reactor was successfully used for the determination of dopamine and noradrenaline in medical solutions for infusions.

### Acknowledgements

This work was financially supported by Grant Agency of the Czech Republic (project no. 17-03868S). We thank Metrohm CZ (<https://www.metrohm.com/cs-cz>) for efficient technical, material and intellectual support.

### References

1. Rozet E., Morello R., Lecomte F., Martin G. B.: *J. Chromatogr. B* **844**, 251 (2006).
2. Bholah R., Bunchman T. E.: *Frontiers in Pediatrics* **5**, 1 (2017).
3. Sofuoglu M., Sewell R. A.: *Addict. Biol.* **14**, 119 (2009).
4. Goldberg E., Grau J. B., Fortier J. H., Salvati E., Levy R. J., Ferrari G.: *Cardiovasc. Res.* **113**, 849 (2017).
5. Ribeiro J. A., Fernandes P. M. V., Pereira C. M., Silva F.: *Talanta* **160**, 653 (2016).
6. Yosypchuk O., Barek J., Yosypchuk B.: *Electroanalysis* **24**, 2230 (2012).
7. Yosypchuk B., Barek J., Yosypchuk O.: *Electroanalysis* **23**, 2226 (2011).
8. Josypčuk O., Barek J., Josypčuk B.: *Electroanalysis* **28**, 3028 (2016).
9. Josypčuk O., Barek J., Josypčuk B.: *Electroanalysis* **26**, 1729 (2014).
10. Josypčuk B., Barek J., Josypčuk O.: *Anal. Chim. Acta* **778**, 24 (2013).
11. Josypčuk O., Barek J., Josypčuk B.: *Electroanalysis* **26**, 1729 (2014).
12. Josypčuk O., Barek J., Josypčuk B.: *Electroanalysis* **26**, 306 (2014).
13. Josypčuk O., Fojta M., Danhel A., Josypčuk B.: *Electroanalysis* **28**, 1860 (2016).

**A Study of Adsorption of Diclofenac onto an Adsorbent of the Biochar Type in Combination with Voltammetry with Chemical Modified Carbon Paste Electrode  
(Studie adsorpce Diklofenaku na adsorbentu typu biouhlí ve spojení s voltametrií s chemicky modifikovanou uhlíkovou pastovou elektrodou)**

Barbora Kamenická <sup>a</sup>, Ivan Švancara <sup>b</sup>, and Tomáš Weidlich <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Chemical Technology Group, Institute of Environmental and Chemical Engineering,

<sup>b</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology,  
University of Pardubice, Studentská 95, 53210 Pardubice, Czech Republic,  
E-mail: barbora.kamenicka@student.upce.cz

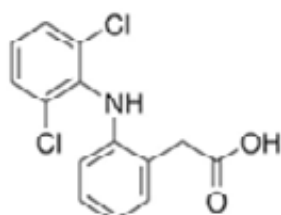
**Abstract**

This contribution deals with drug *Diclofenac* (*Dfc*) in its impact as a severe pollutant in the environment. A removal of the drug from water and the monitoring of its residual amounts are of main interest, when studying the adsorption of *Dfc* on the adsorbent of biochar type, as well as the possibilities of impregnation of adsorbent by ionic liquids (*Aliquat 336* dissolved in benzalkonium chloride). *Dfc* and its residua in water samples could be determined by using differential pulse voltammetry in combination with a carbon paste electrode modified with cetyltrimethylammonium bromide.

**Key words:** Diclofenac, Biochar, Adsorption, Monitoring, Carbon paste electrode.

**Úvod**

V životním prostředí se hromadí rozmanité chemické látky, které mohou mít při dlouhodobé expozici negativní dopady na životní prostředí, zdraví člověka či jiné necílové organismy. Takovéto látky jsou např. léčiva, mezi které se řadí i *Diklofenak* (*Dfc*, Obrázek 1), který je registrován jako léčivo určené k léčbě bolesti a zánětu včetně artrózy a akutních muskuloskeletálních potíží. Ve světovém měřítku je *Diklofenak* široce používán a v České republice je *Diklofenak* obsažen v cca dvaceti přípravcích, často i volně prodejných <sup>1,2</sup>.



**Obr. 1.** Diklofenak: 2-(2,6-dichloroanilino)fenyl]octová kyselina

Nejběžnější cesta pro kontaminaci životního prostředí je prostřednictvím nezměněného vylučování tohoto léčiva močí a stolicí, popřípadě likvidací neupotřebených léčiv <sup>3,4</sup>. Velmi časté způsoby odstraňování léčiv — včetně *Diklofenaku* — z vod zahrnují adsorpci na aktivní uhlí. Přestože je aktivní uhlí komerčně využíváno jako adsorbent k odstranění kontaminantů, jeho použití je spojeno s vysokými provozními náklady. Z těchto důvodů bylo studováno i použití alternativních adsorbentů, které jsou výrazně levnější — např. biochar („biouhlí“). Biochar je v průměru o 1 000 dolarů (tj. cca 22 000 Kč) na tunu levnější než aktivní uhlí <sup>5,6</sup>. V případě biocharu se adsorpční mechanismy a adsorpční kapacita významně liší podle surovin a způsobů přípravy. Bylo publikováno několik prací zaměřujících se na odstraňování *Diklofenaku* z vodných roztoků či vzorků odpadních vod pomocí tohoto alternativního sorbentu <sup>3-13</sup>.

V tomto příspěvku je prezentována studie adsorpce medikamentu *Diklofenak* na alternativním

sorbentu biochar *NovoCarbo*<sup>®</sup> s využitím voltametrické analýzy v režimu DPV modelových vzorků vod Diklofenaku pomocí modifikované pastové uhlíkové elektrody. Tento příspěvek navazuje na předchozí a víceméně úvodní studii<sup>14</sup>, zabývající se odstraňováním tohoto léčiva z odpadních vod některými iontovými kapalinami a následně možností voltametrického stanovení Diklofenaku a jeho zbytkových obsahů v environmentálních vzorcích typu přírodních vod.

## Experimentální část

### Použité chemikálie

Diklofenak, sodná sůl ( $C_{14}H_{10}Cl_2NO_2Na$ , viz obr. 1; *Sigma-Aldrich*), Hexadecyltrimethylamonium bromid, (*Alfa Aesar*), Aliquat 336 (*Merc Schuchardt OHG, Německo*), benzalkonium chlorid - 50% vodný roztok, (*Sigma-Aldrich*), biochar (*NovoCarbo, Německo*). Dále byl připraven impregnační roztok benzalkonium chloridu s ioncem *Aliquat 336* (označení: 1802BK) a k přípravě 0,1 mol/l roztoku základního elektrolytu na bázi fosfátového pufru bylo použito běžných laboratorních chemikálií. Všechny potřebné roztoky pro stanovení Diklofenaku byly připraveny z deionizované vody, ostatní roztoky s použitím demineralizované vody.

### Provedení adsorpčních experimentů

Experimenty zaměřené na adsorpční kinetiku byly prováděny v 1000ml Erlenmeyerově baňce, umístěné na elektromagnetickém míchadle. V průběhu adsorpce byly ve zvolených intervalech (1, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120 min.) odebírány vzorky pomocí jednorázové injekční stříkačky, vzorky byly následně zfiltrány a v nich stanovena koncentrace léčiva *Diklofenak*. Srovnávací experimenty pro stanovení adsorpčních izoterm byly prováděny v 250ml kulatých baňkách umístěných na speciálním nástavci (typ "Starfish", *Radleys Discovery Technologies, UK*) opatřených magnetickými míchadly. Pro stanovení jedné adsorpční izotermie bylo vždy provedeno 10 experimentů – 1 g biocharu, popř. stechiometrické množství tenzidu + 100 ml roztoku Diklofenaku o rozdílných koncentracích (8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,25 g.l<sup>-1</sup>). Reakční směsi byly míchány při 400 otáčkách do dosažení rovnovážného stavu za laboratorní teploty a atmosférického tlaku, poté zfiltrány a následně byla v těchto vzorcích stanovena koncentrace analytu s využitím přímé voltametrie s chemicky modifikovanou uhlíkovou pastovou elektrodou.

### Instrumentace

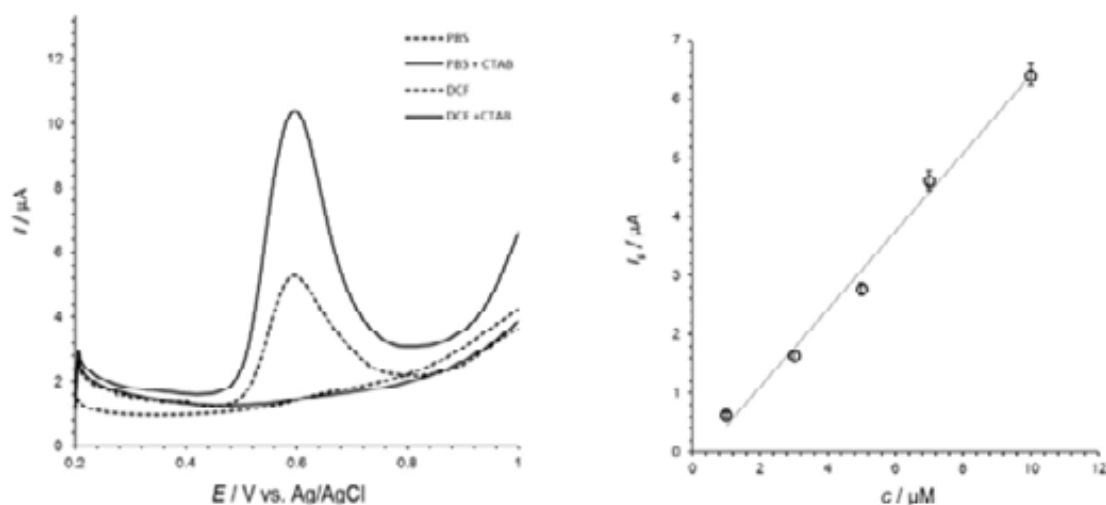
Všechna elektrochemická měření byla prováděna na analyzátoru AUTOLAB (model "PGSTAT-128N; *Autolab / Metrohm, NL / SUI*), ke kterému byla připojena měřicí cela s tříelektrodovým zapojením, jež tvořily pracovní uhlíková pastová elektroda (CPE) z uhlíkového prášku „CR-5“ (*Maziva Týn, CZ*) a parafinového oleje (*Merck*), referentní Ag/AgCl/KCl (nas.; *Metrohm*) a pomocná elektroda (Pt-plíšek vlastní výroby). Roztoky byly dávkovány automatickými (transfer) pipetami (*Finpipette; Labsystems, Finsko*).

## Výsledky a diskuse

### Vyhodnocení obsahu léčiva Diklofenak v modelových vzorcích vod

Voltametrické stanovení v modelových vodných vzorcích bylo prováděno dle navržené metodiky z předchozí studie<sup>14</sup>. Diklofenak byl stanovován na CPE, které byla modifikována cetyltrimethylamonium bromidem (CTAB), který fungoval jako modifikátor *in situ*. Povrch pracovní CPE byl obnovován otěrem tenké vrstvy po každém měření. Experimentální podmínky stanovení Diklofenaku ve vzorcích: DPV; 0,1 M PBS +  $1 \times 10^{-4}$  M CTAB; scan: +0,2 až 1,2 V vs. ref.; 100 mV.s<sup>-1</sup>. Pro potřeby stanovení byla sestrojena kalibrační křivka viz. Obrázek 2, který dokládá i vliv modifikace CPE kvarterní amoniou soli typu CTAB<sup>14</sup>.

V připravených modelových vzorcích po adsorpci na biochar *NovoCarbo* a na impregnovaný biochar kationaktivními tenzidy mohl pak být s potřebnou citlivostí stanoven obsah léčiva výše popsanou elektrochemickou metodou.



**Obr. 2:** Vlevo: Vliv přítomnosti tenzidu CTAB na velikost odezvy při oxidaci léčiva Diklofenak na uhlíkové pastové elektrodě\*. Experimentální podmínky: DPV; 0,1 M PBS +  $1 \times 10^{-4}$  M CTAB;  $c(\text{DCF}) = 5 \times 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>; scan: +0,2 až 1,2 V vs. ref.; 100 mV.s<sup>-1</sup>. \*) Pozn.: Pracovní povrch CPE obnovován otěrem tenké vrstvy po každém měření (skenu). Vpravo: Kalibrační křivka, proložená lineární regresí. Experimentální podmínky: 0,1 M PBS +  $1 \times 10^{-4}$  M CTAB; SWV-rampa:  $f_{\text{sw}} = 60$  Hz,  $E_{\text{sw}} = 40$  mV,  $p.i. = 5$  mV; scan: +0,2 až 1,2 V vs. ref.

#### Kinetika adsorpce Diklofenaku

Provedená měření ukázala, že adsorpce medikamentu Diklofenak (10 g biocharu *NovoCarbo* na 500 ml 25mM (8 g/l) roztoku *Dfc*, popř. impregnace směsí *Aliquat 336* v 50% benzalkonium chloridu), probíhající za míchání v uzavřené nádobě max. 120 min., dosahuje rovnovážného stavu v závislosti na impregnaci použitého adsorbentu. Bez impregnace biocharu bylo dosaženo rovnováhy po 60 minutách, avšak při impregnaci je rovnováha nastolena již po 30 min.; lišila se také adsorpční kapacita biocharu. Bez impregnace byla adsorpční kapacita 199 mg/g, avšak při použití iontových kapalin adsorpční kapacita biocharu dosahovala až 239 mg/g (*Aliquat 336* v benzalkonium chloridu). Na základě těchto pozorování lze tedy konstatovat, že adsorpce *Dfc* na biochar za spolupůsobení testovaných iontových kapalin je účinnější a rychlejší než využití samotného adsorbentu. Graf adsorpčních kinetik ukazuje Obrázek 3.

#### Adsorpční izotermy

K analyzování adsorpčních dat při adsorpci léčiva Diklofenak na biochar a na impregnovaný biochar ionexem *Aliquat 336* v benzalkonium chloridu) byly využity Freundlichova (1 – exponenciální tvar, 2 – logaritmický tvar) a Langmuirova adsorpční izoterma (3):

$$a = K c_{\text{dcf}}^{\frac{1}{n}} \quad (1)$$

$$\log a = \frac{1}{n} \cdot \log c_{\text{dcf}} + \log K \quad (2)$$

$$\frac{c_{\text{dcf}}}{a} = \frac{1}{a_{\text{max}} c_{\text{dcf}}} + \frac{1}{a_{\text{max}} b} = K \cdot c_{\text{dcf}} + Q \quad (3)$$

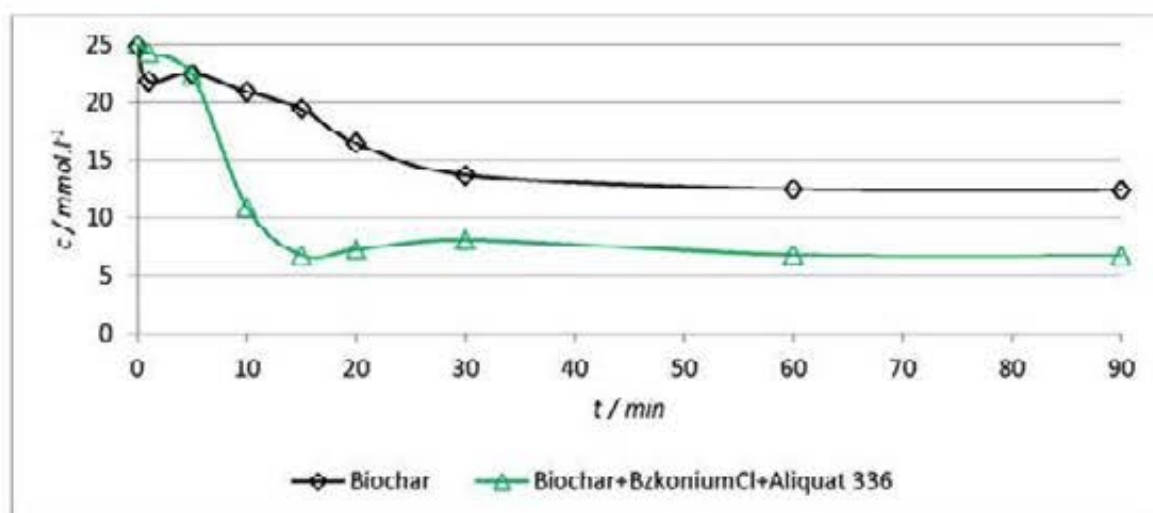
kde  $a$  je množství naadsorbovaného Diklofenaku na 1 g adsorbentu,  $c_{\text{dcr}}$  je rovnovážná koncentrace Diklofenaku,  $(K, n, b, Q)$  jsou empirické konstanty pro dané podmínky a  $a_{\text{max}}$  je maximální množství adsorbátu.

Adsorpce Diklofenaku na samotný biochar odpovídá Freundlichově izotermě (linearita závislosti  $\log a$  na  $\log c$ ) Jako Freundlichova izoterma byla vyhodnocena i adsorpce Diklofenaku na biochar impregnovaný směsí Aliquatu 336 v benzalkonium chloridu. Experimentálně zjištěné parametry Freundlichovy izotermy jsou uvedeny v Tabulce I. Adsorpční izotermy jsou na Obrázku 4.

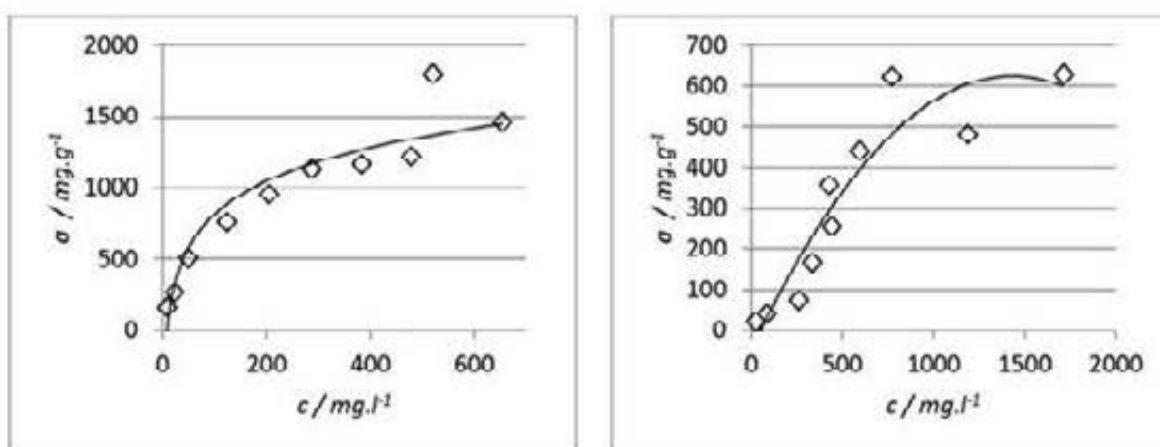
**Tabulka I.**

Experimentálně zjištěné parametry adsorpčních izotermem.

Adsorbent	Parametry - Freundlichova izoterma			Parametry - Langmuirova izoterma		
	K	n	R <sup>2</sup>	b	a <sub>max</sub>	R <sup>2</sup>
Biochar	$4,8 \cdot 10^{-1}$	0,538	0,975	-	-	0,526
Biochar + Aliquat 336 v BzkoniumCl	1,93	1,01	0,904	-	-	0,082



Obr. 3. Adsorpční kinetika adsorpce léčiva Diklofenak na biochar a na impregnovaný biochar.



Obr. 4. Adsorpční izotermy adsorpce léčiva na biochar (vlevo) a na biochar impregnovaný směsí benzalkonium chlorid + Aliquat 336 (vpravo).

## Závěr

V této práci byly prezentovány výsledky adsorpce léčiva Diklofenak na alternativní sorbent biochar *NovoCarbo*. Byla testována adsorpce na samotný adsorbent a na biochar impregnovaný zvolenými iontovými kapalinami (ze skupiny kationaktivních tenzidů). Bylo zjištěno, že při adsorpci na impregnovaný biochar dochází k účinnějšímu a rychlejšímu zachytu léčiva, než při využití stejného množství adsorbentu bez aplikace iontových kapalin, přičemž byly také sestrojeny a prezentovány příslušné adsorpční izotermy. Na základě získaných výsledků a pozorování lze usuzovat, že využití testovaného alternativního sorbentu typu biocharu v praxi by umožnilo snížit ekonomické náklady na aktivní uhlí a především jeho nákladnou regeneraci pro účinné odstraňování chlorovaných derivátů z vod (např. léčiv jako Diklofenak). Dále bylo ověřeno, že citlivá technika DPV ve spojení s uhlíkovou pastovou elektrodou modifikovanou *in situ* kationaktivním tenzidem je ke stanovení léčiva Diklofenak velmi vhodná a nabízí jednoduchý, a přitom rychlý, přesný a účinný způsob minitorování tohoto medikamentu ve složkách ŽP.

## Acknowledgements

B.K. a T.W. děkují za finanční podporu v rámci projektu TA ČR č.TH02030200: *Efektivní odstraňování aromatických halogenderivátů (AOX) z lokálních průmyslových zdrojů*.

## References

1. Halešová T.: Pesticidy, léčiva a možnost jejich eliminace z ŽP. Odpadové fórum. 2018.
2. Altman R., Bosh B. Brunne K.: *Drugs* 75, 8 (2015).
3. Santos L., Araujo A.N. Fachini A, Pena A.: *J. Hazard. Mater.* 1, 175 (2010).
4. Zhang Y.: *Chemosphere* 73, 8 (2008).
5. Lonappan L.: *Bioresour. Technol.* 249, 286 (2018).
6. Dlahmeh S.: *Sci. Total. Environ.* 612, 192 (2018).
7. Lonappan L.: *Waste Manage.* 49, 537 (2016).
8. Lin Y.: *Bioresour. Technol.* 249, 8 (2018).
9. De Rozari P.: *Ecol. Eng.* 111, 1 (2018).
10. Karunanayake A.G.: *Chem. Eng. J.* 331, 480 (2018).
11. Sahota S.: *Bioresour. Technol.* 250, 635 (2018).
12. Mahdi Z.: *J. Environ. Chem. Eng.* (2018).
13. Lonappan L.: *Waste Manage.* 16, 460 (2018).
14. Kamenická B., Bartášková A., Švancara I, Weidlich T.: *Monatsh. Chem.* 1, 9 (2019).



## Voltammetric Determination of Cholic and Chenodeoxycholic Acids in Artificial Serum (Voltamtrické stanovení cholové a chenodeoxycholové kyseliny v umělem séru)

Jan Klouda, Jiří Berek, Karel Nesměrák, and Karolina Schwarzová-Pecková  
Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry,  
UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2,  
Czech Republic, E-mail: kloudaj@natur.cuni.cz

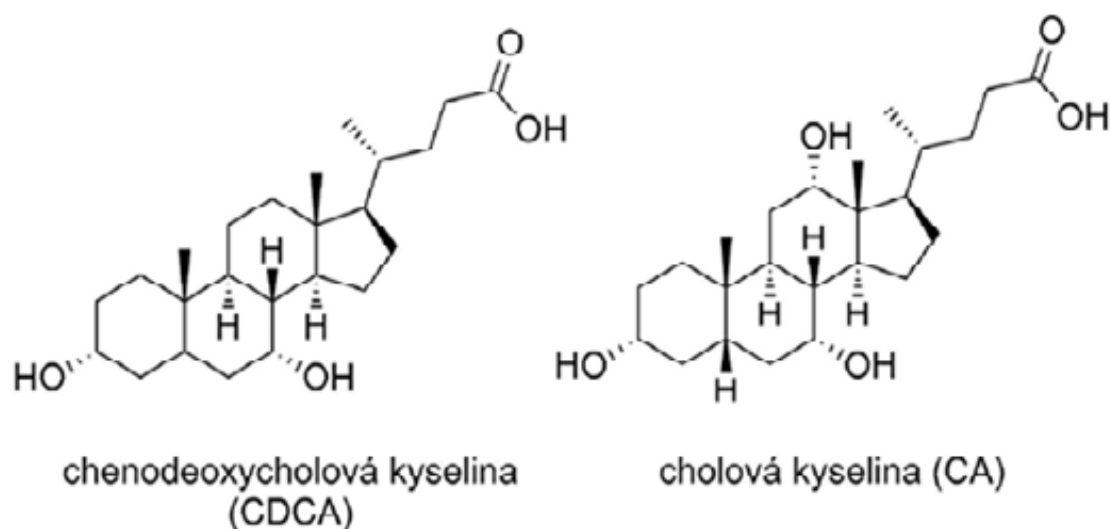
### Abstract

Bile acids are amphipathic biomolecules that play various important roles in human. They act as emulsifying agents, possess antimicrobial properties and can also be used as biomarkers of various liver diseases/damage. Concentration levels of bile acids in various tissues also serve as an indicator of the rate of their biosynthesis. There are various methods to determine bile acids. However, they all suffer from shortcomings to some extent. Therefore, the presented approach employing chemical activation of primary bile acids through dehydration with a strong acid ( $\text{HClO}_4$ ) after SPE could pose a plausible alternative to the currently employed methods.

**Key words:** Bile acid, Voltammetry, Artificial serum, Dehydration, Solid Phase Extraction.

### Úvod

Biosyntéza žlučových kyselin v játrech je v těle člověka cesta, kterou je regulována hladina cholesterolu <sup>1</sup>. Žlučové kyseliny lze rozdělit na primární (chenodeoxycholová, CDCA; cholová, CA; obr. 1) vznikající v játrech a sekundární (např. deoxycholová, DCA; lithocholová, LCA), které vznikají po jejich vyloučení do střeva a po chemických úpravách funkčních skupin přítomných na steroidním skeletu bakteriální florou. Žlučové kyseliny plní také významné fyziologické funkce jako je například emulzifikace tuků <sup>2</sup>, mají antimikrobiální účinky <sup>3</sup> a jejich koncentrační hladiny lze využít pro diagnostické účely, kdy jsou využity jako biomarkery onemocnění či poškození <sup>4,5</sup>.



**Obr. 1.** Strukturální vzorce chenodeoxycholové a cholové kyseliny.

Různá onemocnění se mohou projevovat jak snížením, tak zvýšením koncentračních hladin žlučových kyselin. Například porucha v biosyntéze žlučových kyselin se v naprosté většině případů projeví snížením jejich koncentračních hladin. V případě kompletní obstrukce žlučových cest dojde ke zvýšení jejich koncentrace v séru 10–20krát <sup>5</sup>. Také u dalších onemocnění dochází k výraznému nárůstu koncentrace žlučových kyselin. Sledovány byly

například koncentrační hladiny CA, CDCA a DCA a jejich konjugátů s glycinem a taurinem u pacientů s různými onemocněními jater vedoucími k jejich poškození<sup>4</sup>. S výjimkou DCA byl pozorován výrazný koncentrační nárůst u všech sledovaných žlučových kyselin a jejich konjugátů.

Žlučové kyseliny lze stanovit různými analytickými metodami, avšak mnoho z nich je zatíženo určitými nedostatky. K nejběžněji využívaným metodám patří kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní detekcí<sup>6,7</sup>. Jedná se o velmi mocný nástroj, avšak jak pořízovací, tak provozní náklady jsou vysoké. Dále je možné využít také metod jako je plynová chromatografie s hmotnostní detekcí<sup>8</sup>, či kapilární elektrochromatografii s fluorescenční detekcí, obě s nutností derivatizace<sup>9</sup>.

Elektrochemická detekce v anodické oblasti není v případě stanovení žlučových kyselin příliš využívána<sup>10</sup>. Jedná se o málo probádaný přístup, který v minulosti přinesl pouze několik studií, které se zabývaly převážně separačním aspektem stanovení a nepřináší téměř žádnou charakterizaci voltametričké chování žlučových kyselin<sup>11-13</sup>. Naše skupina v nedávno publikované studii ukázala postup, díky kterému je možné za pomoci silné kyseliny (HClO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) aktivovat primární žlučové kyseliny pro voltametričké stanovení<sup>14</sup>. Tato aktivace je založená na dehydratační reakci mezi silnou kyselinou a žlučovou kyselinou, zavedení dvojně vazby do její struktury v důsledku čehož dochází ke zvýšení elektronové hustoty, což vede ke vzniku produktu oxidovatelného při +1,2 V vs. Ag/AgNO<sub>3</sub>. Obdobný postup byl využit i v tomto příspěvku.

#### **Experimentální část**

Chenodeoxycholová a cholová kyselina (čistota >99%) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Všechny ostatní použité chemikálie byly analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

Voltametričká měření byla provedena za použití potenciostatu PalmSens 2.0 ovládaného osobním počítačem se softwarem PSTrace. Byla použita bořem dopovaná diamantová elektroda ( $A = 7,07 \text{ mm}^2$ , Windsor Scientific, Slough, UK), která byla leštěna před každým skenem za použití aluminu. Měření probíhala v elektrochemické cele SVC-3 (ALS, Tokio, Japonsko) s nevodnou referenční elektrodou RE-7 (ALS, Tokio, Japonsko) obsahující roztok 0,01 mol L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> a 1 mol L<sup>-1</sup> NaClO<sub>4</sub> v acetonitrilu. Jako pomocná elektroda byl použit platinový drátek dodávaný s celou SVC-3. Všechna měření proběhla za teploty 21 °C. Inkubační krok, při kterém byly žlučové kyseliny zahřívány, byl proveden po dobu 4,5 min při 50 °C pomocí vodní lázně s regulovatelnou teplotou.

Byly použity SPE kolony s C18 stacionární fází Discovery DSC-18 a se silným měničem aniontů Discovery DSC-SAX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Pro TLC analýzy byly použity následující podmínky – mobilní fáze: ethylacetát:hexan:octová kyselina 20:20:4; stacionární fáze: silikagel na hliníkových deskách (Kavalier, Sázava, ČR); vizualizace: kombinovaný postřík kyselinou sírovou a fosfomolybdenovou.

Umělé sérum bylo připraveno rozpuštěním následujících sloučenin v destilované vodě<sup>15-16</sup>: 4,5 mmol l<sup>-1</sup> KCl, 5,0 mmol l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 4,7 mmol l<sup>-1</sup> d(+) glukóza, 2,5 mmol l<sup>-1</sup> močovina, 0,1% (m/m) lidský sérový albumin; 145 mmol l<sup>-1</sup> NaCl.

## Výsledky a diskuse

Nejprve byly optimalizovány podmínky aktivace žlučových kyselin pro voltametriická měření. Aktivace proběhla dle dříve popsaného postupu<sup>14</sup>. Navíc byl do protokolu zařazen krok, kdy jsou žlučové kyseliny v prostředí  $\text{HClO}_4$  zahřáty na  $50\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 4,5 min. Takto aktivované žlučové kyseliny poté poskytují voltametriický signál při +1,2 V.

Dále byl optimalizován postup extrakce vybraných žlučových kyselin z umělého séra. Extrakce na C18 SPE koloně proběhla dle dříve popsaného postupu<sup>17</sup>. Dle literatury by konjugované žlučové kyseliny měly být zadržovány na měničích aniontů a nekonjugované nikoliv<sup>18</sup>, proto byl proveden experiment pro rozdělení těchto dvou frakcí za pomoci SPE se stacionární fází jednak C18 a dále silným aniontovým měničem. Avšak dle pilotních výsledků toto není za použití uvedených SPE kolon možné, protože po eluci z měniče aniontů se objevuje extrémně výrazný voltametriický signál okolo +1,6 V, který potenciální signál žlučových kyselin částečně překrývá.

Z důvodu omezených možností separace volných žlučových kyselin a jejich konjugátů je nutné vzít v úvahu fakt, že volné žlučové kyseliny a jejich konjugáty s glycinem či taurinem sice poskytují voltametriický signál při stejném potenciálu +1,2 V, avšak jejich molární odezva není stejná. Proto bylo přistoupeno k alkalické hydrolyze konjugátů žlučových kyselin<sup>19</sup>. Hydrolyza proběhla dle postupu popsaného v citované práci s jedním rozdílem – pro rozpuštění žlučových kyselin byl použit fosfátový pufr o pH 10.0. Analýzou pomocí TLC bylo demonstrováno, že kontrolní roztok konjugátů žlučových kyselin (3 h varu bez přítomnosti NaOH) vykazuje obdobné chování jako konjugáty a roztok po hydrolyze (3 h varu v  $2\text{ mol l}^{-1}$  NaOH) jako volné žlučové kyseliny. Lze tedy předpokládat, že popsaný způsob vede k uvolnění žlučových kyselin z konjugátů s glycinem a taurinem.

Po alkalické hydrolyze konjugátů a extrakci volných žlučových kyselin do diethyletheru (LLE) je možné žlučové kyseliny chemicky aktivovat pomocí  $\text{HClO}_4$  v acetonitrilu a následně voltametriicky stanovit. V tuto chvíli mají autoři k dispozici pouze prvotní výsledky a pro vyhodnocení analytických parametrů jako je opakovatelnost, reprodukovatelnost či správnost měření je potřeba provést další experimenty. Jako referenční metoda k voltametriické analytické koncepcce byla zvolena HPLC s fluorescenční detekcí, která vyžaduje derivatizaci žlučových kyselin pomocí 1,2-benzo-3,4-dihydro-karbazol-9-ethyl-p-toluensulfonátu.

## Závěr

V tomto příspěvku je popsán *proof of concept* analytického postupu, díky kterému je možné voltametriicky stanovit celkovou koncentraci primárních žlučových kyselin (CA, CDCA) ve volné formě a vázaných v konjugátech s glycinem a taurinem v umělém séru. Celkovou koncentraci primárních žlučových kyselin v různých fyziologických maticích (krev a její deriváty, žluč) lze využít pro sledování rozsahu poškození jater či fungování biosyntetických cest vzniku žlučových kyselin.

## Acknowledgments

Tento výzkum byl proveden v rámci specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260440). Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentuře Univerzity Karlovy (projekt GAUK 1440217) a Grantové agentuře České republiky (projekt 19-11268S).

## Reference

1. Russell, D. W., Setchell, K. D. R.: *Biochemistry* 31, 4737 (1992).
2. Hofmann, A.F., Hagey L.R.: *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2461 (2008).

3. Hofmann A.F., Eckmann L.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 4333 (2006).
4. Luo L., Aubrecht J., Li D., Warner R.L., Johnson K.J., Kenny J. Colangelo J.L.: *PLOS One* *13*, 1 (2018).
5. Rani K., Garg P., Pundir C.S.: *Anal. Biochem.* *332*, 32 (2004).
6. Jantti S.E., Kivilompolo M., Ohrnberg L., Pietilainen K.H., Nygren H., Orešič M., Hyotylainen T.: *Anal. Bioanal. Chem.* *406*, 7799 (2014).
7. Sarafian M.H., Lewis M.R., Pechlivanis A., Ralphs S., McPhail M.J.W., Patel V.C., Dumas M.E., Holmes E., Nicholson J.K.: *Anal. Chem.* *87*, 9662 (2015).
8. Tsai S.J.J., Zhong Y.S., Weng J.F., Huang H.H., Hsieh P.Y.: *J. Chromatogr. A* *1218*, 524 (2011).
9. Wu Y., Wang X., Wu Q., Wu X., Lin X., Xie Z.: *Anal. Methods* *2*, 1927 (2010).
10. Klouda J., Barek J., Nesměrāk K., Schwarzová-Pecková K.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* *47*, 384 (2017).
11. Dekker R., van der Meer R., Olieman C.: *Chromatographia* *31*, 549 (1991).
12. Chaplin M.F.: *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* *661*, 431 (1995).
13. Scalia S., Tirendi S., Pazzi P., Bousquet E.: *Int. J. Pharm.* *115*, 249 (1995).
14. Klouda J., Barek J., Kočovský P., Herl T., Matysik F.-M., Nesměrāk K., Schwarzová-Pecková K.: *Electrochem. Commun.* *86*, 99 (2018).
15. Canbaz M.Ç., Sezgintürk M.K.: *Anal. Biochem.* *446*, 9 (2014).
16. Şimşek Ç.S., Teke M., Sezgintürk M.K.: *Electroanalysis* *26*, 328 (2014).
17. Xiang X., Han Y., Neuvonen M., Laitila J., Neuvonen P.J., Niemi M.: *J. Chromatogr. B* *878*, 51 (2010).
18. Scalia S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* *8*, 235 (1990).
19. Beher W.T., Stradnieks S., Beher G.R., Lin G.J.: *Steroids* *32*, 355 (1978).

## Identification of Active Electrocatalytic Sites using Electrochemical Scanning Tunneling Microscopy

Regina M. Kluge<sup>a</sup>, Richard W. Haid<sup>a</sup>, Yunchang Liang<sup>a</sup>, David McLaughlin<sup>a</sup>, Christoph Csoklich<sup>a</sup>, Jonas H. K. Pfisterer<sup>a</sup>, Oliver Schneider<sup>b</sup>, and Aliaksandr S. Bandarenka<sup>a,c,d</sup>

<sup>a</sup> Physik-Department ECS, Technische Universität München, James-Franck-Straße 1, 85748 Garching, Germany, E-mail: regina.kluge@ph.tum.de

<sup>b</sup> Institut für Informatik VI, Technische Universität München, Schleißheimer Straße 90a, 85748 Garching, Germany

<sup>c</sup> Nanosystems Initiative Munich (NIM), Schellingstraße 4, 80799 Munich, Germany

<sup>d</sup> Catalysis Research Center, TUM, Ernst-Otto-Fischer-Straße 1, 85748 Garching, Germany. E-mail: bandarenka@ph.tum.de

### Abstract

In order for emission-free energy conversion devices to become competitive, suitable and high-performing catalysts have to be identified and developed. An approach to increase catalytic performance is to understand and take advantage of the relationship between a catalyst's surface structure and its activity. Commonly, fundamental understanding of this relationship is gathered via theoretical models. Here we demonstrate, as an experimental supplement, the abilities of a conventional scanning tunneling microscope to in-situ identify active sites.

**Key words:** Active catalytic sites, Electrocatalysis, Oxygen evolution reaction, Platinum, Scanning tunneling microscopy.

### Introduction

The advent of the hydrogen economy would provide a sustainable and worldwide accessible energy system based on abundant resources. However, in order for such electrochemical energy provision devices to become competitive in contributing to new environmentally friendly energy production schemes, suitable catalysts have to be developed. Commonly, Sabatier-type volcano plots are used to predict the geometric structure of optimal active sites<sup>1,2</sup>. Combining theoretical predictions with a technique that is able to directly identify and in-situ monitor such active sites would therefore be a powerful tool to advance the performance and rational design of catalysts. Here we demonstrate the potential of a conventional scanning tunneling microscope (STM) to spatially map and in-situ identify active sites on a catalyst's surface with resolutions down to the nanometer or even atomic scale.

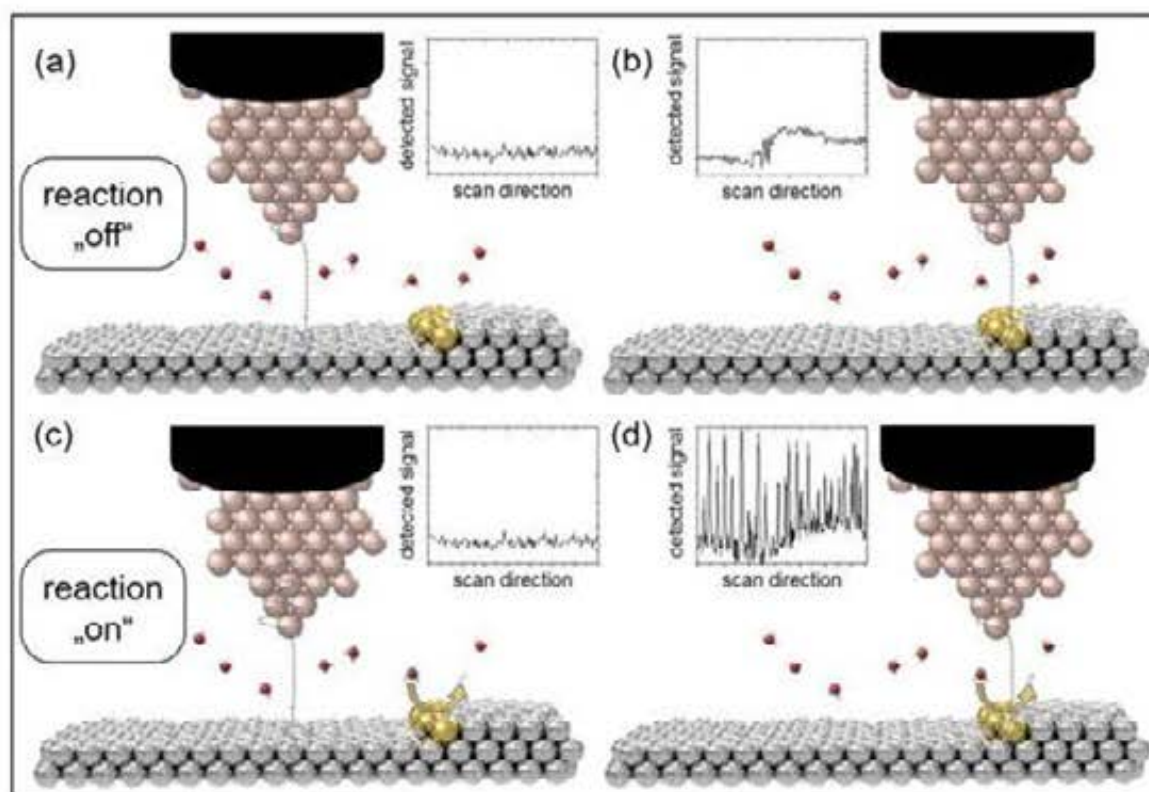
### Experimental

All STM experiments were carried out using a MultiMode scanning probe microscope (Veeco Instruments Inc.). A NanoScope III controller and a Universal Bipotentiostat (Veeco Instruments Inc.) were connected in series in order to feedback the scan and control the applied potentials, respectively. Tips were manually ripped from a Pt/Ir alloy wire (Good-Fellow, Pt80/Ir20, 0.25 mm) using a conventional side cutter. They were subsequently isolated with Apiezon wax<sup>3</sup>. Electrochemical STM was performed in a home-made cell consisting of a Teflon ring and a sample holder sandwiching the sample. The ring was then filled with the electrolyte such that 12.57 mm<sup>2</sup> of the sample's surface area was covered. As pseudo-reference and counter electrodes Platinum wires (MaTecK, 0.5 mm) were inserted into the electrolyte. As alkaline and acidic media 0.1M KOH and 0.1M HClO<sub>4</sub> were chosen, respectively. The here presented data were acquired examining a Pt(111) single crystal (MaTecK) with a diameter of 5 mm. In order to establish a well-defined surface, the crystal

was flame-annealed according to the procedure reported by Kibler *et al.*<sup>4</sup>. For data analysis, the WSxM 5.0 Develop 8.0 software was employed<sup>5</sup>.

### Results and Discussion

In conventional STM, an ideally atomically sharp, conducting tip is brought close enough to the sample's surface in order to allow electrons to tunnel between tip and surface. With this technique it is possible to access the electronic morphology of a material. Hereby, the recorded tunneling current depends on several factors such as tip-sample distance, surface electronic structure and tunneling medium. In electrochemical STM (EC-STM), the signal is especially dependent on the tunneling medium represented by the electrolyte. In general, the sample potential can be set such that the reaction can either take place or is hindered. Figure 1 compares these two situations.

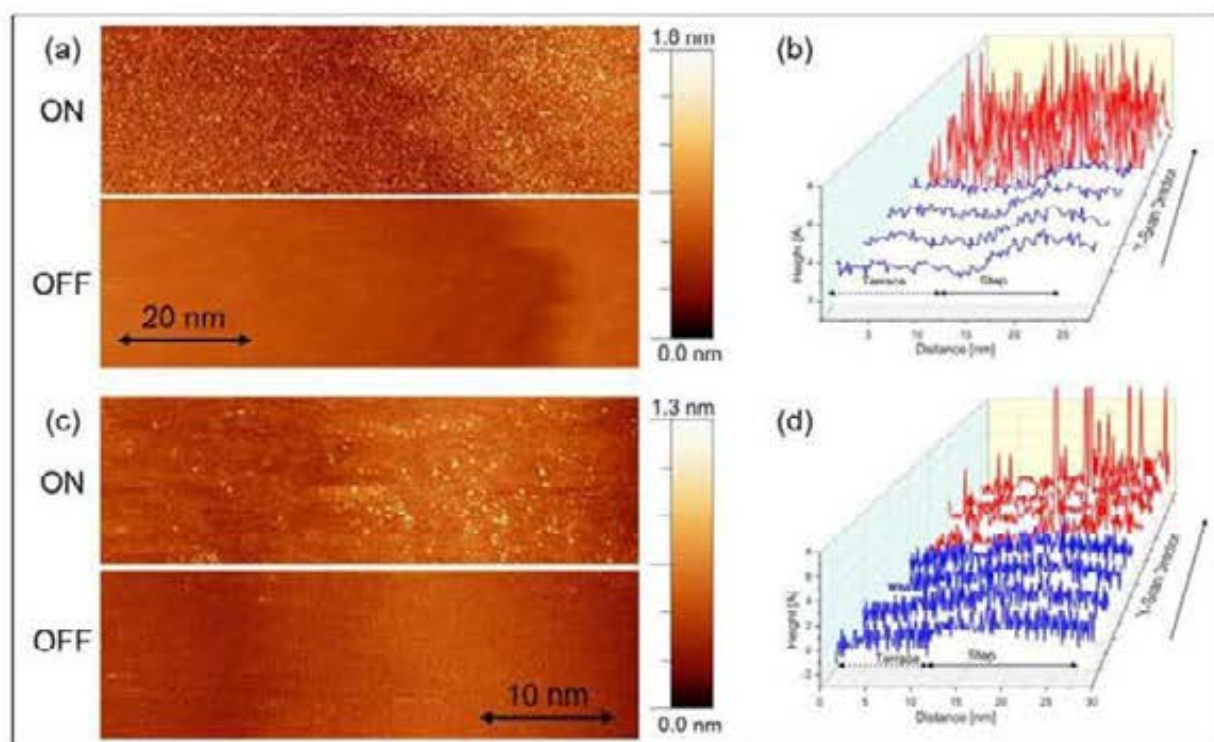


**Fig. 1.** Sketch of the EC-STM noise measurement. In the illustration, active sites are colored in gold. (a-b) In case the sample potential is set such that no reaction takes place, the detected signal corresponds to conventional STM. The noise level is low irrespective of the position of the tip which can either be at non-active or active sites. (c-d) If the potential is set such that a reaction takes place, the signal is dependent on tip's location. Only when the tip is positioned over active sites, a considerable increase in the noise level can be observed. During the reaction species ad- and desorb at and from the surface. This leads to changing conditions of the tunneling gap which influences the tunneling barrier. This variation in the tunneling barrier thus translates in the variation of the detected signal which can be seen as an increase in the noise level.

As shown in Fig. 1(a-b), if the reaction is turned off, the detected signal represents the morphology of the sample as in STM conducted in air or any other medium. However, when the reaction is turned on, chemical species start to ad- and desorb on and from the surface. This movement is especially prominent near active sites highlighted in gold. As shown in Fig. 1(d), this change in the tunneling medium leads to an increased noise level in the detected

signal. Thus, by the detection of an increased noise level, active sites can be localized. Thus, EC-STM is an elegant way to determine the position of active sites <sup>6</sup>.

Platinum-based materials catalyzing the oxygen reduction reaction (ORR) are not only known to be well performing but their activities are also highly dependent on crystal structure and orientation <sup>7</sup>. The here introduced method of noise EC-STM has a high potential of giving experimental insights in structure-activity relationships. The method's capabilities are shown in the following taking the example of Pt(111). Figure 2 (a-b) show ORR noise measurements performed in alkaline medium. The data were taken from reference 8 and reprinted with permission. Comparing the situations whether the reaction is turned on or off, noise can be clearly detected uniformly across the {111}-terraces. This is further highlighted in line-scans presented in Fig. 2(b). The location of active sites at the {111}-terraces is in agreement with the observation that the introduction of defects to the material will decrease its activity <sup>9</sup>.



**Fig. 2.** ORR noise measurements obtained on Pt(111) in (a-b) alkaline <sup>8</sup> and (c-d) acidic media <sup>6</sup>. (a,c) depict the EC-STM picture. (b,d) show the corresponding line scans for a better overview. Here, the red color corresponds to reaction on and blue to reaction off. When the ORR is turned on in alkaline media, noise evolves uniformly across the samples' surface. In contrast, in acidic media, noise can be only detected near the step edge. Thus, active sites can be located at the terrace and step edges in alkaline and acidic media, respectively.

By contrast, in acidic media, a higher noise level can be detected near the step edge rather than at the terrace, as shown in Fig. 2(c-d). This is well in accordance with experimental trends reporting that experimental ORR activity in acid increases with the surface step density <sup>2,10</sup>. A theoretical framework reported by Calle-Vallejo *et al.* explains that the occurrence of under-coordinated sites are responsible for this enhancement <sup>1,11</sup>.

## Conclusions

In this work we review the methodology of noise EC-STM measurements. This method is based on the dependence of the recorded STM signal on the tunneling barrier. During a

reaction, the composition of the electrolyte in the tunneling gap experiences local and time-dependent changes. These changes in turn influence the tunneling barrier and thus the detected signal. Consequently, the positions of active sites on a catalytic surface can be identified by a locally enhanced noise level.

A proof of the concept was given comparing ORR noise measurements on Pt(111) in alkaline and acidic media. In the former active sites are located at the {111}-terraces while in the latter active sites are concentrated at the step edges. Thus, the number of active sites in this model system can be quantified as being higher in alkaline medium than in acids. Moreover, theoretical considerations confirm that active sites in acidic media are located at concave sites<sup>1,11</sup> which is also in agreement with our experiment.

To conclude, noise EC-STM is a powerful method to in-situ identify electrocatalytically active sites. In addition to the ORR, the concept is currently extended to the hydrogen and oxygen evolution reactions with the prospect of achieving atomic resolution. Successfully tested model systems include graphene, metal alloys and metal oxides.

### Acknowledgements

Financial support from the DFG project BA 5795/3-1 is gratefully acknowledged.

### References

1. Calle-Vallejo F., Tymoczko J., Colic V., Vu Q. H., Pohl M. D., Morgenstern K., Loffreda D., Sautet P., Schuhmann W., Bandarenka A. S.: *Science* **350**, 185 (2015).
2. Bandarenka, A. S., Hansen, H. A., Rossmeisl, J., Stephens, I. E. L.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 27 (2014).
3. Nagahara L. A., Thundat T., Lindsay S. M.: *Rev. Sci. Instrum.* **60**, 10 (1989).
4. Kibler L. A.: *Int. Soc. Electrochem.* (2003).
5. Horcas, I., Fernández R., Gómez-Rodríguez J. M., Colchero J., Gomez-Herrero J., Baro A. M.: *Rev. Sci. Instrum.* **78**, 013705 (2007).
6. Pfisterer J. H. K., Liang Y., Schneider O., Bandarenka A. S.: *Nature* **549** (2017).
7. Gómez-Marín A. M., Rizo R., Feliu J. M.: *Catal. Sci. Technol.* **4**, 6 (2014).
8. Liang Y., McLaughlin D., Csoklich C., Schneider O., Bandarenka A.S.: *Energy Environ. Sci.* **12**, 1 (2019).
9. Rizo R., Herrero E., Feliu J. M., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 37 (2013).
10. Hitotsuyanagi, A., Nakamura, M., Hoshi, N.: *Electrochim. Acta* **82** (2012).
11. Calle-Vallejo F., Pohl M. D., Reinisch D., Loffreda D., Sautet P., Bandarenka A. S.: *Chem. Sci.* **8**, 3 (2017).



## Galvanostatic Recycling Zinc from Selected Industrial Waste Waters (Galvanostatická recyklace zinku z vybraných průmyslových odpadních vod)

Veronika Kočanová, Libor Dušek, Aneta Karásková, and Ladislav Novotný  
University Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Environmental and  
Chemical Engineering, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic,  
E-mail: nvt.l@seznam.cz

### Abstract

The article describes a study of galvanostatic recycling Zn from model selected industrial waters containing  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  zinc sulphate. Use of various types of electrode arrangements were discussed, based on Ti, Cu or other cathodic materials and Pd, Pt or Au anodes. The amount of deposited Zn, its concentration decrease, pH as well as an electric conductivity of treated aqueous solutions dependent on time  $t$  were registered. The obtained experimental data were fitted by adequate expressions providing reasonable values of kinetic parameters.

**Key words:** Galvanostatic deposition, Zinc, Industrial waste waters.

### Úvod

I když je zinek nezbytnou součástí živých organismů i životního prostředí, je tento prvek uváděn mezi toxickými kovy. WHO doporučila jako mezní přípustnou koncentraci Zn hodnotu  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  Zn. Významným zdrojem znečištění zinkem bývají průmyslové vody<sup>1</sup>. Dle nařízení vlády č. 401/2015 Sb.<sup>2</sup> je přípustné znečištění povrchových vod, způsobené vypouštěním odpadních vod, regulováno normou environmentální kvality pro obsah  $\text{Zn}^{2+}$  na úrovni průměrné roční hodnoty  $92 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ . Příkladem je odpadní voda z výroby viskózních vláken<sup>6</sup> obsahující Zn ve formě  $\text{ZnSO}_4$ . Celkové emise Zn odpadními vodami<sup>3</sup> značně zatěžují životní prostředí a představují ztráty desítek tun tohoto kovu ročně odpovídající ztrátám v milionech korun ročně. V současnosti je proto studováno galvanostatické vylučování Zn z odpadních vod z výroby viskózních vláken, zbařených organických zbytků, jako jsou celulóza, lignin, detergenty, hemicelulóza a další obtížně biologicky odbouratelné složky. Cílem je zavést recyklaci Zn jeho katodickým vylučováním<sup>4,5</sup> s následným rozpouštěním kyselinou sirovou a opětovným využitím vzniklého  $\text{ZnSO}_4$  pro zvláknění xantogenátu celulózy<sup>6</sup>. Tomuto cíli odpovídalo i téma diskutované práce, které zahrnovalo elektrochemické vylučování Zn ze vzorků obsahujících  $\text{ZnSO}_4$  a  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , jejichž vodivost byla podle potřeby upravována v rozsahu  $50\text{-}500 \text{ mS.m}^{-1}$ .

### Experimentální část

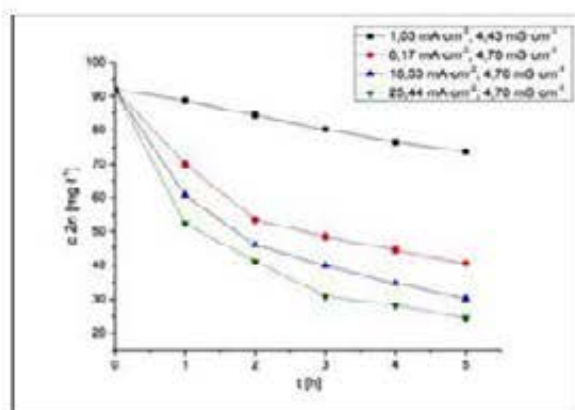
Zinek byl galvanostaticky vylučován z roztoků  $\text{ZnSO}_4$  o koncentraci  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  (tj.  $1,53 \cdot 10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$ ) s využitím jednokomorového reaktoru o aktivním objemu 250 ml roztoku, s magnetickým mícháním a při teplotě 298 K. Vodivost roztoku byla podle potřeby upravována mezi  $0,5$  a  $5 \text{ mS.m}^{-1}$  přidávkou  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Aktivní plochy použitých elektrod činily  $37 \text{ cm}^2$ . Použitými katodovými materiály byly Ti, Cu (event. i jiné, hybridní), jako anodové materiály sloužily Pd, Pt a Au.

Všechna měření byla uskutečněna pomocí programovatelného zdroje MANSION SDP 2210 (fa MANSION) v galvanostatickém režimu, s nastavitelnými proudovými hustotami mezi  $1$  a  $50 \text{ mA.cm}^{-2}$ . Každá elektrolýza s využitím daného elektrodového uspořádání trvala celkem 5 hod., přičemž byly vždy v hodinových intervalech odebrány vzorky (objem 1 ml) k analýze na obsah Zn pomocí ICP-OES a současně bylo gravimetricky určováno množství do té doby vyloučeného Zn na katodě. Stejně tak bylo v hodinových intervalech měřeno pH roztoku a zjišťována a případně i upravována vodivost roztoku  $\kappa$ .

K prováděným měřením byly dále využity multimetr DT-9929 (CEM, Čínská lidová republika), digitální analytické váhy ME 2014 (Mettler Toledo, Švýcarsko), magnetické míchadlo s ohřevem MR Hei-Standard (Heidolph, SRN), konduktometr inoLab Cond 730 VWR (VWR International, USA), pH metr Accumet AB15 Basic (Fishe Scientific, USA) a ICP-OES Integra XL2 (GBC, Austrálie).

### Výsledky a diskuze

Prováděná měření poskytla výsledky, které ukázaly, že galvanostatické odstraňování Zn z roztoku probíhalo nejrychleji na počátku aplikace popsaného pracovního režimu a jeho rychlost s časem klesala. Čím byla použita proudová hustota  $i$  vyšší, tím byl tento efekt výraznější. Dokumentuje to závislost koncentrace  $c$   $Zn^{2+}$  na čase  $t$  na Obr. 1.

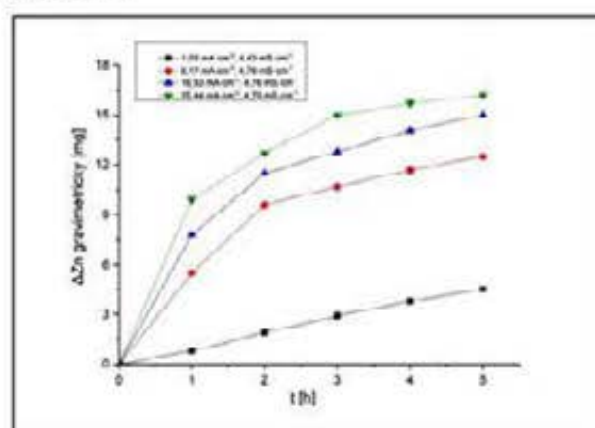


**Obr. 1.** Pokles koncentrace Zn resp. ionů  $Zn^{2+}$  vylučovaných na Ti-katodě (proti Pt-anodě) v závislosti na čase  $t = 0 - 5$  hod,  $i = 1,03 - 25,44 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $\kappa = 4,43-4,70 \text{ mS cm}^{-1}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ .

Změny koncentrace Zn s časem lze přitom snadno podložit odvozenou lineární závislostí mezi  $\log c$  a  $t$  při  $i = \text{konst}$ . Například pro  $i = 1,03 \text{ mA cm}^{-2}$  bylo tak možno psát rov. (1)

$$\log c = -(0,022 \pm 0,001) t + (1,944 \pm 0,003) \quad (1)$$

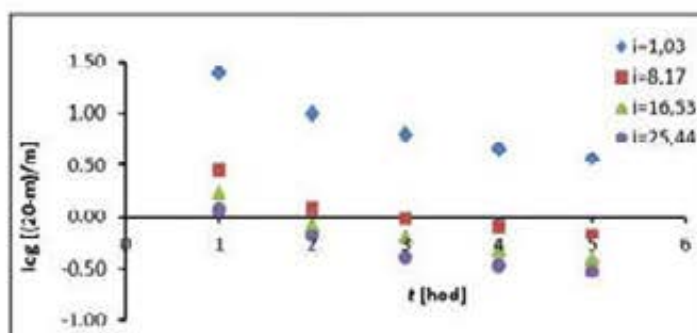
Odpovídající závislosti gravimetricky určených množství na katodě vyloučeného Zn ukazují průběhy  $\Delta Zn$  v mg na  $t$  na Obr. 2.



**Obr. 2.** Množství vyloučeného zinku  $\Delta Zn$  při jeho elektrolýze na Ti-katodě (vs. Pt-anoda) v závislosti na čase  $t = 0 - 5$  hod,  $i = 1,03 - 25,44 \text{ mA cm}^{-2}$ ,  $\kappa = 4,43-4,70 \text{ mS cm}^{-1}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ .

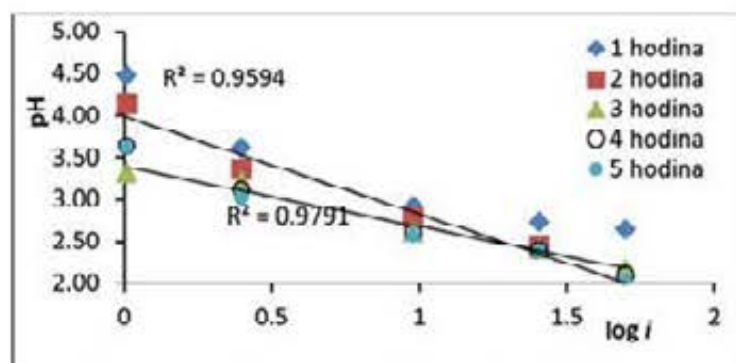
Chování popisovaného systému dokresluje vynášení výrazu  $\log[(20 - m)/m]$  proti času  $t$  při konstantních  $i$  (viz Obr. 3). V ustáleném stavu a bez rušivých vlivů by bylo možné očekávat

linární průběhy těchto závislostí. Jak z Obr. 3 vyplývá, ve skutečnosti odpovídaly této představě nejlépe podmínky okolo  $i = 10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ .



Obr. 3. Závislosti  $\log[(20 - m)/m]$  vs.  $t$  při konstantních  $i$  [ $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ ], kde  $m = \Delta\text{Zn}$  [mg].

Podobně vynesení hodnot pH proti  $\log i$  při  $t = \text{konst.}$  poskytlo závislosti na Obr. 4, jejichž průběh byl nejlépe linearizovatelný v okolí  $t = 3$  hod.



Obr. 4. Závislosti pH elektrolyzovaného roztoku  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ ZnSO}_4$  na  $\log i$  při  $t = \text{konst.}$

Ilustrují to jak bodové závislosti na Obr. 4, tak vztah (2) odpovídající proložení bodů pro  $t = 3$  hod.

$$\text{pH} = -(0,711 \pm 0,060) \log i + (3,387 \pm 0,066) \quad (2)$$

Z Obr. 3 a 4 mj. vyplývá, že například v oblasti krátkých dob  $t$  elektrolyzy mohlo hrát relativně větší roli ustalování procesů v blízkosti elektrod i v roztoku při dlouhých časech a zejména i při velkých proudových hustotách mohlo dále docházet k narušování deponované vrstvy (až k jejímu případnému odlupování) a patrně souběžně i k zesílení parazitních dějů nebo dějů ovlivňujících potenciálové poměry na použitých elektrodách (na katodě i anodě).

Při interpretaci souvislostí mezi měněnými a měřenyými veličinami lze mj. využít <sup>7</sup> obecný výraz (3) popř. jeho variantu pro katodické (4) nebo anodické (5) procesy, s rychlostní konstantou  $k'$ , s koeficientem přenosu náboje  $\alpha$  a standardním potenciálem  $E_c^0$ . Přitom je třeba pamatovat na to, že v reálných systémech, jako je náš, šlo o směsné elektrodové procesy s časově proměnnými koncentracemi a s potenciálovými rozdíly ovlivňovanými dalšími potenciálovými změnami, vyvolanými např. změnami pH v okolí Pt-anody

$$-i = nFk' \left\{ c_{ox} \cdot \exp \left[ -\frac{\alpha nF}{RT} (E - E_c^0) \right] - c_{red} \cdot \exp \left[ \frac{(1-\alpha)nF}{RT} (E - E_c^0) \right] \right\} \quad (3)$$

$$-i_k = nF c_{ox} k' \cdot \exp \left[ -\frac{\alpha nF}{RT} (E - E_c^0) \right] \quad (4)$$

$$i_a = nF c_{red} k' \cdot \exp \left[ \frac{(1-\alpha)nF}{RT} (E - E_c^0) \right] \quad (5)$$

Z Obr. 1 a 2 vyplývá, že depozice Zn spíše v závislosti na hodnotách  $i$  k různým maximálním úrovním, dosahujícím v optimálních případech 90-95 % odstranění Zn z roztoku. Tuto skutečnost ilustruje např. souhrnná Tabulka I.

**Tabulka I.**

Shrnutí podmínek a dosažených účinností pro Pt/Ti.

Č.	$\kappa (t=0)$ mS.cm <sup>-1</sup>	$i_{\text{průměr}}$ mA.cm <sup>-2</sup>	$c \text{ Zn}^{2+}$	$c \text{ Zn}^{2+}$	odstraň.	odstraň.	Energie	Energie
			ICP 2 hod. mg.L <sup>-1</sup>	ICP 5 hod. mg.L <sup>-1</sup>	Zn <sup>2+</sup> 2 hod. %	Zn <sup>2+</sup> 5 hod. %	2 hod. kWh.m <sup>-3</sup>	5 hod. kWh.m <sup>-3</sup>
1.	2,75	1,02	78,88	70,01	21,12	29,99	0,81	2,13
2.	2,74	25,48	18,85	8,25	81,15	91,75	110,12	264,97
3.	2,75	25,49	12,30	10,24	87,70	89,76	162,46	420,93
4.	2,74	50,05	8,56	19,19	91,44	80,81	336,53	703,00
5.	0,50	9,56	70,62	39,97	29,38	60,03	86,18	237,75
6.	1,16	8,22	49,14	47,01	50,86	52,99	48,84	118,54
7.	4,34	8,17	46,23	6,55	53,77	93,45	21,36	55,74
8.	1,17	18,05	40,24	23,80	59,76	76,20	181,06	454,15
9.	4,34	42,82	19,44	11,37	80,56	88,63	323,77	693,19
10.	5,00	25,48	29,06	13,48	70,94	86,52	106,44	267,78
11.	2,00	42,82	9,83	4,34	90,17	95,66	332,33	822,75
12.	5,00	2,50	33,83	8,20	66,17	91,80	3,32	8,65
13.	5,10	1,41	48,30	14,70	51,70	85,30	1,73	4,38
14.	5,06	0,71	56,90	25,39	43,10	74,61	0,74	1,93

### Závěr

Získané výsledky potvrdily možnost využití studovaných uspořádání a podmínek pro galvanostatickou recyklaci Zn z popsanych modelových průmyslových vod obsahujících ZnSO<sub>4</sub>. Za optimálních parametrů, při počátečním obsahu 100 mg.L<sup>-1</sup>, bylo možno dosáhnout víc jak 90-95 % depozice Zn.

### Acknowledgments

Tato práce vznikla s podporou projektu MSMT č. SGS\_2019\_001.

### References

1. Pitter P.: *Hydrochemie*. Vyd. 4. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1999. 373 s. ISBN 80-7080-340-1.
2. Nařízení vlády č. 401/2015 Sb. *o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech*. Sbírka zákonů 2015, částka 166, Příloha č. 1.
3. Winand R., v knize: *Modern Electroplating*. str. 285, John Wiley & Sons, New York 2010. ISBN 9780470602638.
4. Voglar D., Lestan D.: *Water Research* 46, 1999 (2012).
5. Issabayeva G., Aroua M. K., Sulaiman N. M.: *Desalination* 194, 192 (2006).
6. Dušek L.: *Výzkumná zpráva smluvního výzkumu SD353006-2015-30350*. Univerzita Pardubice, Pardubice 2015.
7. Novotný L.: *Obecná a aplikovaná elektrochemie – výukové materiály*. ÚEnviChI, FChT, Univerzita Pardubice, Pardubice 2018.

## Pyrene Derivatives for Organic Semiconductors (Deriváty pyrenu pro organické polovodiče)

Lucie Koláčná<sup>a</sup>, Peter Polák<sup>b</sup>, Tomáš Tobrman<sup>b</sup>, and Jiří Ludvík<sup>a</sup>

<sup>a</sup> J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: lucie.kolacna@jh-inst.cas.cz

<sup>b</sup> University of Chemistry and Technology Prague, Department of Organic Chemistry, Technická 5, 160 00 Prague 6, Czech Republic

### Abstract

Pyrene based molecules for OFETs comprising substituted pyrene and cyclobutene were investigated in different electrochemical systems. The reduction process of substituted pyrenes results in radical anion and subsequently at more negative potentials in dianion. The cyclobutene bridge enters in conjugation with aromatics extending the planar delocalized system. Investigated compounds are promising molecules for construction of green smart molecules for purely organic electronics.

**Key words:** Pyrene, Cyclobutene, Electrochemical Reduction, Polarography, Cyclic voltammetry, Rotating disc electrode, Glassy carbon.

### Úvod

Molekula polycyklického uhlovodíku pyrenu je složená ze čtyř benzenových kruhů propojených do planárního aromatického systému (Obr. 1). Pyren i další sloučeniny s konjugovanými dvojnými vazbami nacházejí široké uplatnění v materiálové chemii. Na rozdíl od anorganických látek požadované vlastnosti organických sloučenin je možné nastavovat přesnou modifikaci jejich chemické struktury. Konkrétně v tomto případě se jedná o přípravu látek obsahujících pyrenové jádro nesoucí nejrůznější substituenty. Tyto sloučeniny jsou vhodné pro konstrukci *OLED* (Organic light-emitting diode – světlo vyzařující organické diody), *OPV* (Organic Photovoltaics – organické fotovoltaické články) a *OFET* (Organic field-effect transistor – organické tranzistory řízené elektrickým polem)<sup>1</sup>, na které je zaměřen tento projekt.

Molekuly pro OFET na bázi pyrenu můžeme rozdělit podle jejich struktury do tří skupin: malé molekuly obsahující pyren jako koncovou skupinu, malé molekuly obsahující pyren ve svém centru a kondenzované pyrenové deriváty<sup>2</sup>. Pyren zde představuje významný strukturální prvek, který se může zapojovat do rozsáhlejších  $\pi$ -systémů a který je navíc oxidovatelný a redukovatelný, takže současně může sloužit i jako redoxní sonda.

Naše práce se věnuje derivátům pyrenů a dalších aromátů propojených cyklobutenovým můstkem. Tento cyklobutenový můstek je ve skutečnosti čtyřikrát substituovaná dvojná vazba, která, jakožto centrum („core“), je dalším významným strukturálním prvkem u těchto molekul pro OFET. Proto z elektrochemického hlediska je důležité studovat jak pyrenovou část molekuly, tak i redoxní vlastnosti a strukturální transformace této dvojně vazby jakožto centra.

Elektrochemické vlastnosti vybraných molekul byly sledovány na různých elektrodách pomocí redukce v nevodném prostředí. Interpretace redukčních potenciálů, jejich posunů a rozdílů umožnila určení podílu jednotlivých částí těchto složitých molekul na celkových redoxních vlastnostech systémů, umístění redukčních center v molekule i formulaci podmínek pro rozšíření delokalizace elektronů. Jelikož naměřená data na uhlíkových elektrodách jsou ve

shodě s předběžnými výsledky na rtuti, je zřejmé, že získané hodnoty potenciálů nezávisí na materiálu elektrod a jsou tedy termodynamicky relevantní.

### Experimentální část

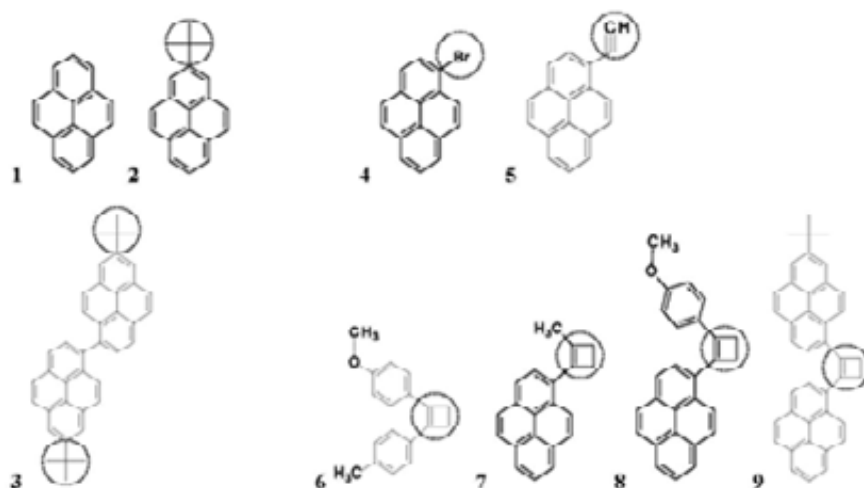
Všechna měření byla provedena v tříelektrodevém uspořádání v nedělené elektrochemické cele a v bezvodých rozpouštědlech: dimethylformamidu (DMF), přečištěném azeotropní destilací s benzenem<sup>3</sup> nebo acetonitrilu (AN) (HPLC gradient grade). Koncentrace studovaných látek byla přibližně 1mM, jako základní elektrolyt sloužil 0,1 M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> (TCI, Japonsko).

Jako pracovní elektrody byly použity rtuťová kapající elektroda s dobou kapky 1 s pro DC polarografii (DC-P), disková elektroda ze skelného uhlíku (GC) o průměru 3 mm (Metrohm, Švýcarsko) jako rotující disková elektroda (RDE) i stacionární elektroda pro cyklickou voltametrii (CV), visící rtuťová kapka (80 ms) jako stacionární elektroda (HMDE) pro CV. Referentní elektrodou byla standardní kalomelová elektroda (SCE) oddělená solným můstkem obsahující bezvodý elektrolyt, pomocnou elektrodou platinový drátek nebo plíšek. Při DC-P a voltametrii na RDE byla použita rychlost polarizace 10 mV s<sup>-1</sup>, pro CV 0,05 – 5,0 V s<sup>-1</sup>. Voltametrie na RDE byla měřena s rychlostmi rotace 500, 1000 a 1500 rpm.

DC-P byla zaznamenávána pomocí analogového potenciostatu PA4 a XY zapisovače 4103 (Laboratorní přístroje Praha, ČR). Pro CV na HMDE byla použita SMDE 1 (Laboratorní přístroje Praha, ČR), voltametrie na RDE a CV na elektrodě z GC byly měřeny pomocí Autolab RDE 2 (Metrohm, Švýcarsko). Měření CV a RDE byla řízena potenciostatem Autolab PGSTAT101 (Metrohm, Švýcarsko) a softwarem Nova 1.11. Kyslík byl ze vzorků odstraněn probubláváním argonem.

### Výsledky a diskuse

Studované látky (Obr. 1) obsahovaly tři typy elektroaktivních center (pyrenové jádro, substituenty a cyklobuten) v různých kombinacích a cílem bylo určit vliv jednotlivých center na celkové chování při redukci.



Obr. 1. Studované látky – deriváty pyrenu a cyklobutenu.

Hodnoty potenciálů na rtuťových elektrodách v DMF jsou systematicky posunuté k méně negativním hodnotám oproti AN přibližně o 70 mV; v DMF dochází ke zvýšení reverzibility, neboť DMF patří mezi slabě zásaditá protofilní rozpouštědla, následná protonace produktů je

tedy obtížnější a primární radikálové anionty jsou v tomto prostředí stabilnější. Hodnoty redukčních potenciálů jsou shrnuty v Tabulce I.

**Tabulka I.**

Přehled potenciálů pro jednotlivé redukční kroky v různých systémech (V; vs SCE).

	AN, Hg		DMF, Hg		AN, GC		Poměr limitních proudů
	DC-P ( $E_{1/2}$ )	CV (HMDE) ( $E^0, E_{pc}$ )	DC-P ( $E_{1/2}$ )	CV (HMDE) ( $E^0, E_{pc}$ )	RDE (GC) ( $E_{1/2}$ )	CV (GC) ( $E^0, E_{pc}$ )	
1	-2,14 ~ -2,65	<u>-2,15</u> -2,76	-2,07 ~ -2,64	<u>-2,07</u> -2,69	-2,12 ~ -2,70	<u>-2,11</u> -2,63	1:1
2	-2,18 -2,74	<u>-2,20</u> > -2,84	-2,11 -2,74	<u>-2,14</u> > -2,74	-2,14 -2,61	<u>-2,13</u> -2,65	1:1
3	-2,00 -2,15	<u>-2,02</u> <u>-2,16</u>	-1,93 -2,11 -2,81	<u>-1,92</u> <u>-2,10</u> -2,88	-1,96 -2,12	<u>-1,96</u> <u>-2,10</u>	1:1
4	-1,77 -2,15 -2,69	-1,81 <u>-2,15</u> -2,77	-1,70 -2,05 -2,65	-1,74 <u>-2,05</u> -2,69	-1,64 -2,12 -2,64	-1,71 <u>-2,11</u> -2,60	2:1:(1)
5	-1,89 -2,25 ~ -2,68	<u>-1,89</u> -2,37 -2,78	-1,80 -2,26 ~ -2,67	<u>-1,80</u> -2,35 -2,70	-1,85 -2,17 ~ -2,69	<u>-1,83</u> -2,23 -2,65	1:3:1
6	-2,50 > -2,80	<u>-2,53</u> * > -2,80	-2,44 > -2,78	<u>-2,43</u> * > -2,80	-2,48 > -2,70	<u>-2,48</u> * -2,70	1:(1)
7	-2,04 -2,42 -2,69	<u>-2,07</u> -2,53 -2,77	-1,96 -2,38 -2,61	<u>-1,97</u> -2,45 -2,66	-2,01 -2,36 -2,58	<u>-2,01</u> -2,40 -2,60	1:2:1
8	-1,95 -2,10 -2,64	<u>-1,97</u> <u>-2,13</u> ** -2,74	-1,89 -2,13 -2,63	<u>-1,88</u> <u>-2,11</u> ** -2,69	-1,92 -2,11 -2,56	<u>-1,91</u> <u>-2,07</u> ** -2,62	1:2:1
9	-1,79 -1,90 -2,05 -2,18 ~ -2,77	<u>-1,81</u> <u>-1,92</u> * <u>-2,08</u> * <u>-2,20</u> -2,79	-1,70 -1,86 -2,00 -2,13 ~ -2,73	<u>-1,71</u> <u>-1,87</u> * <u>-2,02</u> * <u>-2,11</u> -2,8	-1,77 -1,89 -1,90 -2,18 ~ -2,69	<u>-1,75</u> <u>-1,88</u> * <u>-2,01</u> * <u>-2,15</u> -2,63	1:1:1:1:2

$E_{pc}$  = potenciál katodického peaku;  $E^0$  = potenciál reverzibilního kroku  
( $E^0 = (E_{pa} + E_{pc}) / 2$ );  $E_{1/2}$  půlvlnový potenciál;

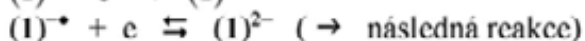
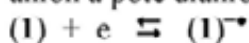
\* reverzibilní pouze při vyšších rychlostech polarizace (cca  $v > 1 \text{ V s}^{-1}$ ),

\*\* posun peaku k negativním hodnotám se zvyšující se rychlostí polarizace.

Na základě reakčního mechanismu lze studované látky rozdělit do tří skupin.

### I. Látky obsahující substituenty s indukčním efektem

Pyren (1) je redukován ve dvou jednoelektronových reverzibilních krocích na radikálový anion a poté dianion.



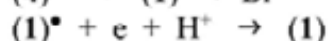
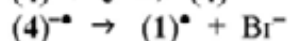
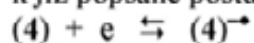
Radikálový anion je stabilní při CV i při nízkých rychlostech polarizace (50 mV/s). Druhý redukční krok probíhá až při potenciálech blízkých rozkladu elektrolytu. Jde také o jednoelektronový děj a lze předpokládat, že ačkoli nevykazuje na CV známky reverzibility, jedná se o tvorbu málo stabilního dianiontu.

**2-*terc*-butylpyren (2)** je redukován podobně jako pyren ve dvou jednoelektronových reverzibilních krocích, díky elektrondonorovému vlivu *terc*-butylu jsou však oba redukční potenciály posunuty k zápornějším hodnotám.

**1,1'-bis-(7-*terc*-butylpyren) (3)** je složen ze dvou molekul 2-*terc*-butylpyrenů spojených jednoduchou vazbou. Nejprve se postupně redukuje obě pyrenová jádra do prvního stupně. Malý rozdíl obou redukčních potenciálů je způsoben částečnou elektronovou interakcí obou pyrenů přes jednoduchou vazbu, která je omezena vzájemným vytočením rovin obou pyrenů. Druhý redukční stupeň obou pyrenů se nachází v oblasti potenciálů rozkladu elektrolytu.

## II. Látky obsahující dvě nezávislá redukční centra

**1-bromopyren (4)** obsahuje dvě redukovatelná centra – brom a pyren. V prvním redukčním kroku dochází ECE mechanismem k odštěpení bromidového aniontu, vzniklý radikál je okamžitě redukován dalším elektronem a stabilizován protonací. V dalších krocích dochází k již popsané postupné redukci pyrenu (1).



**1-ethynylpyren (5)** také obsahuje dvě redukovatelná centra – ethynyl a pyren. V prvním jednoelektronovém a reverzibilním ději, dochází k redukci pyrenu a tvorbě radikálového aniontu, potenciál je díky slabému indukčnímu (elektronakceptornímu) vlivu ethynylové skupiny posunutý k méně záporným hodnotám než u pyrenu. Trojná vazba v konjugaci s aromatickým jádrem rozšiřuje delokalizovaný systém, redukci tedy usnadňuje. Následuje multielektronový ireverzibilní proces – redukce trojné vazby, a to mechanismem prosté redukce trojné vazby a/nebo intermolekulárním procesem s dimerickým produktem. Další jednoelektronový děj (s nejnegativnějším potenciálem) pak přísluší druhému redukčnímu stupni pyrenu za vzniku nestabilního dianiontu.

## III. Látky obsahující cyklobuten

**1-(*p*-methoxyphenyl)-2-tolylcyklobuten (6)** je modelovou látkou, kdy na cyklobutenové redukovatelné centrum jsou navázané dva nereduovatelné aromatické substituenty. V prvním jednoelektronovém redukčním ději, který vykazuje částečnou reverzibilitu při vyšších rychlostech polarizace (od 0,5 V/s), se tvoří radikálový aniont. Jeho stabilita je podpořena delokalizací elektronů dvojně vazby cyklobutenu a obou aromátů za vzniku rozsáhlejšího planárního systému, což potvrzují i kvantově chemické výpočty. Výrazně negativní potenciál je zřejmě způsoben indukčním efektem methylové a methoxy-skupiny na přilehlých aromátech. Reakce dále pokračuje redukčním otevíráním cyklobutenového kruhu. Vazba CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> je štěpena za vzniku vinylů stabilizovaných opětovným vznikem dvojně vazby (za vzniku derivátu *trans*-stilbenu). Analogické chování bylo již pozorováno v roztoku THF/NaBPh<sub>4</sub><sup>4,5</sup>. V oblasti potenciálů rozkladu elektrolytu je patrný ještě další redukční děj.

**1-(1-pyrenyl)-2-methylcyklobuten (7)** obsahuje stejně jako látky (8) a (9) pyren i cyklobuten. Redukce začíná jednoelektronovým reverzibilním dějem odpovídajícím prvnímu redukčnímu kroku pyrenu. Méně negativní potenciál je důsledkem rozšíření delokalizovaného systému pyrenového jádra o cyklobuten, tedy snížením energie radikálového aniontu. Další



ireverzibilní krok je spojen s redukčním otevíráním cyklobutenového kruhu. V oblasti potenciálů rozkladu elektrolytu se objevuje druhá redukce pyrenového jádra spojená se vznikem pyrenového dianiontu.

**1-(1-pyrenyl)-2-(p-methoxyphenyl)cyclobuten (8)** je v prvním kroku opět redukován jednoelektronovým reverzibilním procesem za vzniku radikálového aniontu, který zahrnuje celý delokalizovaný systém. Následuje děj zahrnující dva až tři elektrony, kdy CV vykazuje při nižších rychlostech polarizace částečnou reverzibilitu. V tomto případě se pravděpodobně jedná o dva souběžné procesy propojené intramolekulárním elektronovým přenosem. Proto lze postulovat ireverzibilní pomalé reduktivní otevírání cyklobutenového kruhu, jehož stabilní produkt obsahuje pyren. Ten je dále reverzibilně redukován do prvního a pak i do druhého stupně.

**1-(1-pyrenyl)-2-(7-tert-butylpyren-1-yl)cyclobutene (9)** představuje nejrozsáhlejší delokalizovaný systém se dvěma pyrenovými jádry spojenými konjugovaným cyklobutenem. První čtyři redukční kroky jsou jednoelektronové, dochází k postupné redukci obou pyrenových jader. Pyren substituovaný terciárním butylem bude díky elektrondonorovému vlivu terciárního butylu redukován při zápornějších potenciálech – viz sloučeniny (1) a (2), první a třetí děj přísluší tedy nesubstituovanému, druhý a čtvrtý substituovanému pyrenu. Posledním krokem je dvouelektronové reduktivní otevírání cyklobutenu.

#### Závěr

Pyren a jeho deriváty jsou dobrými chromofory a díky svým redoxním vlastnostem jsou materiálem vhodným pro přípravu organických polovodičů. Ve studovaných systémech je pyrenová část redukována ve dvou krocích – nejprve na radikálový anion a poté při negativnějších potenciálech na příslušný dianion. Substitucí pyrenového jádra dochází v souladu s indukčním/mesomerním efektem ke změnám jejich redoxních vlastností, což umožňuje cílenou syntézu látek s požadovanými vlastnostmi.

Cyklobutenový můstek se zapojuje do konjugovaného systému (pyren / tolyl / anisyl / cyklobuten), což bylo prokázáno částečnou reverzibilitou jeho prvního redukčního kroku a zejména postupným posouváním prvního redukčního potenciálu látek **7**, **8** a **9** k méně negativním hodnotám. Naopak přímé propojení pyrenových jader jednoduchou vazbou omezuje jejich vzájemnou interakci, dochází k vzájemnému stočení rovin obou pyrenů. V současné době probíhají další práce rozšiřující naše poznatky – studium oxidačních vlastností těchto látek a analýza produktů jejich elektrolýz.

#### Acknowledgments

Tato práce vznikla s podporou projektu GAČR 18-12150 S.

#### References

1. Figueira-Duarte T. M., Mullen K.: *Chemical Reviews* *111*, 7260 (2011).
2. Gong Y. B., Zhan X. J., Li Q. Q., Li Z.: *Science China-Chemistry* *59*, 1623 (2016).
3. Liska A., Vojtisek P., Fry A. J., Ludvik J.: *J Org Chem* *78*, 10651 (2013).
4. Bauld N. L., Cessac J., Chang C. S., Farr F. R., Holloway R.: *Journal of the American Chemical Society* *98*, 4561 (1976).
5. Bohm A., Meerholz K., Heinze J., Mullen K.: *Journal of the American Chemical Society* *114*, 688 (1992).

## Reactivity of Penconazole in the Presence of Zinc

Ishak Kovač<sup>a,b</sup>, Michal Jakl<sup>c</sup>, and Jana Jaklová Dyrtrtová<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup> Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo nám. 542/2, 160 10 Prague 6, Czech Republic, E-mail: ishak.kovac@uochb.cas.cz

<sup>b</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 2038/6, 128 43 Prague 2, Czech Republic, E-mail: kovacish@natur.cuni.cz

<sup>c</sup> Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiological Sciences, Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Kamýcká 129, 165 00 Prague – Suchbátka, Czech Republic

<sup>d</sup> Charles University, Faculty of Physical Education and Sport, Department of Physiology and Biochemistry, José Martího 269/31, 162 52 Prague 6, Czech Republic

### Abstract

Penconazole is a widely used fungicide. It belongs to a group of triazoles, which are known to block steroid biosynthesis. On the other hand, its effect in the presence of potentially interfering compounds is not explored. We provide gas phase experiments of the reaction between penconazole and zinc using ESI-MS to give a particular approach to its probable behavior in a real environment. The gas-phase experiments undergo the information about complexes formation including their stability and stoichiometry.

**Keywords:** zinc, gas phase, ESI-MS, penconazole, triazole, fungicides.

### Introduction

Nowadays, triazole pesticides are one of the most utilized category of pesticides with antimycotic properties<sup>1</sup> due to their protective power against the wide-range of diseases. Their group structure is based on the 1,2,4-triazole ring (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**), where N<sup>1</sup> binds to variable hydrophobic chains<sup>2</sup>. Triazole pesticides inhibit *CYP51* – lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase – a key enzyme for biosynthesis of ergosterol in fungi<sup>3</sup>. Higher doses in humans can affect reproductive organs, fertility and disturb the balance of estrogens and androgens<sup>4</sup>. In laboratory animals testing, some of the azoles showed embryotoxic potential, congenital malformations and limb defects<sup>1</sup>. The half-life of triazole pesticides takes from less than 30 days up to more than 100 days<sup>5</sup>. That data are related to free triazoles in the soil, we suspect that half-life could be prolonged due to complexation (i.e. non-protonated penconazole) with zinc and copper<sup>6</sup> present in the soil.

Zinc is biologically important in plants as an essential component of proteins<sup>7</sup>. It belongs to the *d*-block metals and builds stable coordination compounds with S and N donors<sup>8</sup>. Typical coordination compound has the structure  $[Zn(H_2O)_n]^{2+} \cdot mH_2O$  in which  $n=5$  and  $m=1,2$  or  $n=6$  and  $m=1$ <sup>9</sup>, crystalizing in tetrahedral<sup>8</sup> and octahedral<sup>10</sup> geometries.

Protonated penconazole ((*RS*)-1-[2-(2,4-dichlorophenyl)pentyl]-1H-1,2,4-triazole) exists in a low pH ( $pK_a=1.57$ ) only<sup>11</sup>, thus it is expected that penconazole in soil exists in non-protonated form. The aim of this contribution is to describe the stoichiometry and stability of zinc-penconazole complexes.



**Fig. 1.** Triazole fungicide, penconazole.

### Experimental

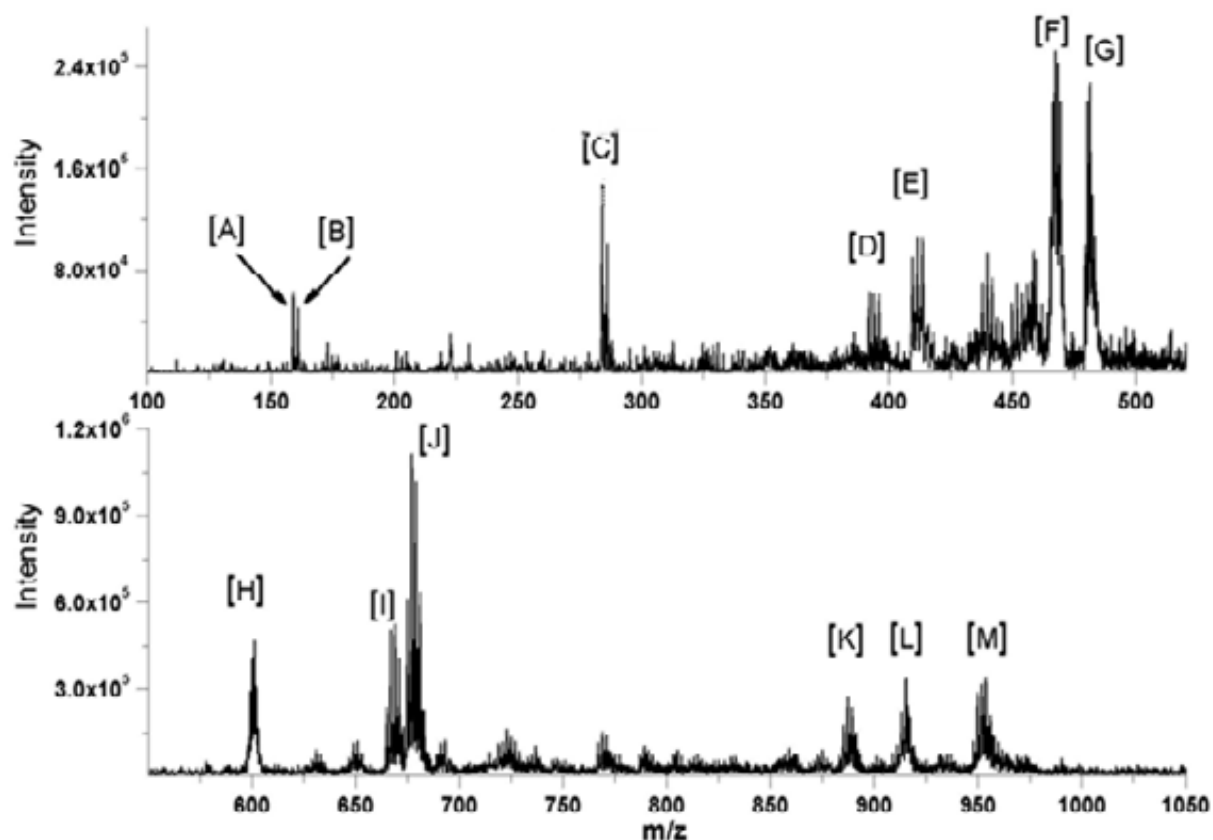
The experiments were performed using quadrupole ion-trap mass spectrometer (LCQ Advantage, Thermo Finnigan, USA) in positive mode. The stock solutions of penconazole and  $\text{ZnCl}_2$  ( $10^{-2}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ) were prepared from solid standard (PESTANAL; Sigma Aldrich, Czech Republic) and stored in a fridge until analysis. The penconazole stock solution was stored no longer than two weeks to prevent its possible degradation. The samples were prepared from the stock solutions at equimolar concentrations of all components (usually  $5 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ) in ethanol/deionized water ( $> 18.2$  M $\Omega$ ) (1:1 v/v). The ethanol was purchased from Penta s.r.o. (Czech Republic).

The sample solutions were continuously fed into ion source at  $0.5$  mL  $\text{h}^{-1}$  through a silica capillary. Nitrogen was used as a nebulizer gas and sweep/auxiliary-gas (8 to 15 arbitrary units) and helium as the collision gas. Other conditions of ion source were set as follows: spray voltage, 4.50 kV, capillary temperature,  $250^\circ\text{C}$ , capillary voltage 20 V, tube lens offset 15 V.

Mass spectra were recorded in  $m/z$  75-1500 range, appearance and fragmentation of complex compounds were highly influenced by set capillary voltage and tube lens offset. Applying the large voltages multicollisional activation in ion source regions leads to collision-induced dissociation (CID) <sup>12</sup>.

### Results and discussion

In the full mass spectra ( $m/z$  100-1050; Fig. ), the first three peaks do not represent complex compounds. A, B are the fragments of penconazole and C is the protonated penconazole with  $m/z$  159, 173, and 284, respectively (Table I).



**Fig. 2.** Positive mode ESI-MS spectra of an equimolar mixture of penconazole and  $ZnCl_2$  in EtOH/W solution in the range of  $m/z$  100-1050.

In the spectra, we observed Zn only in a 2+ oxidation state, due to its fully occupied  $d$ -orbitals. While complex compounds observed in our copper experiments are in 2+ and 1+ oxidation states, due to the reduction of copper in the gas phase<sup>12,13</sup>.

In a demand to comprehend generated complex compounds, selected precursors/parent ions were subjected to CID experiments to investigate the stability of the compound and fragments, which arise from fragmentation. During the fragmentation, there were changes in the behavior of penconazole fragmentation.

In the CID experiments, there was a difference in the behavior of penconazole in the copper<sup>14</sup> and zinc presence. Mostly observed fragments and degradation pathways were slightly different. However, the difference in reaction mechanisms in the presence of copper and zinc has to be explored more. This observation implies the plausible formation of radical species in the gas phase and must be researched more in the liquid phase using an electrochemical approach<sup>15</sup>.

Most of the species (Table I) are single charged apart from F, G, and H species which are double charged. Two species, which need more elucidation, are K and L, single charged complex compounds with deprotonated penconazole as contributing ligand.

**Table I.**

Summary of species observed in the gas phase of ESI-MS upon the reaction between penconazole and zinc with corresponding  $m/z$  values (light isotopes), numbers of ligands, and structural formulas.

Complex / fragment*	$m/z$	ligand						formula	
		Pen	(PenH) <sup>+</sup>	(Pen-H) <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sup>-</sup>	
A*	159 <sup>+</sup>								[C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
B*	173 <sup>+</sup>								[C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
C	284 <sup>+</sup>		1						[PenH] <sup>***</sup>
D	392 <sup>+</sup>	2						1	[Zn(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(Pen) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
E	409 <sup>+</sup>	1				1		1	[Zn(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(H <sub>2</sub> O)(Pen)] <sup>+</sup>
F (II)	466 <sup>+</sup>	3				1			[Zn(H <sub>2</sub> O)(Pen) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>
G (II)	479 <sup>+</sup>	3					1		[Zn(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)(Pen) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>
H (II)	599 <sup>+</sup>	4							[Zn(Pen) <sub>4</sub> ] <sup>2+</sup>
I	665 <sup>+</sup>	2			1				[ZnCl(Pen) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
J	675 <sup>+</sup>	2						1	[Zn(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)(Pen) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
K	885 <sup>+</sup>	1		1					[Zn(Pen-H)(Pen)(***)] <sup>+</sup>
L	913 <sup>+</sup>	2		1					[Zn(Pen-H)(Pen) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
M	949 <sup>+</sup>	3			1				[ZnCl(Pen) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>

\* common fragments;  
 \*\* penconazole, chemical formula C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>; abbr: Pen;  
 \*\*\* C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub><sup>+</sup>  
 (II) double charged

### Conclusion

Electrospray ionization mass spectrometry confirmed the tendency of zinc to be the coordination center and penconazole the ligand in the complexes in the positive mode gas phase. Although zinc has  $d$ -orbital full, this does not restrict its ability to generate a high variety of complexes in nature as observed in this research. In the gas-phase, we observed several different complex species with Zinc as a coordination center.

Complexation and stabilization of non-protonated penconazole in the first coordination sphere prolong its presence in the soil. This reaction has two standing points, beneficial and detrimental. The benefit in the generation of complex species with transition metals can help in phytoremediation of contaminated soil<sup>16, 17</sup>. The disadvantage is in the possibility of migration of these complex species into the agriculturally important plants.

Another finding, which needs more research in the future via ESI-MS and electroanalytical methods, is the behavior of protonated penconazole in CID experiments. We observed changes in the isotopic pattern of mass spectra of penconazole, which can predict radical species forming.

### Acknowledgments:

The research was supported by the Czech Science Foundation (project No. 18-01710S).

## References

1. Giavini E., Menegola E. J. T. L.: *198*, 106 (2010).
2. Wu Y., Lee H., Li S. J. J. o. C. A.: *912*, 171 (2001).
3. Norková R., Dyrtrtová J. J., Jakl M., Schröder D.: *Water, Air, & Soil Pollution* **223**, 2633 (2012).
4. Zarn J. A., Brüscheiler B. J., Schlatter J. R. J. E. H. P.: *111*, 255 (2003).
5. Komárek M., Čadková E., Chrástný V., Bordas F., Bollinger J.-C. J. E. i.: *36*, 138 (2010).
6. Jaklová Dyrtrtová J., Fanfrlík J., Norková R., Jakl M., Hobza P.: *International Journal of Mass Spectrometry* **359**, 38 (2014).
7. Broadley M. R., White P. J., Hammond J. P., Zelko I., Lux A. J. N. p.: *173*, 677 (2007).
8. Atkins P., Overton T.: *Shriver and Atkins' inorganic chemistry*. Oxford University Press, USA, 2010.
9. Hartmann M., Clark T., van Eldik R.: *Journal of the American Chemical Society* **119**, 7843 (1997).
10. Zumdahl S. S., Zumdahl S. A.: *Chemistry*. Houghton Mifflin, Boston 2007.
11. Konasova R., Dyrtrtova J. J., Kasicka V.: *Journal of chromatography. A* **1408**, 243 (2015).
12. Dyrtrtová J. J., Jakl M., Schröder D., Čadková E., Komárek M. J. R. C. i. M. S.: *25*, 1037 (2011).
13. Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Schröder D., Norková R.: *Int. J. Mass Spectrom.* **338**, 45 (2013).
14. Jakl M., Jaklová Dyrtrtová J. In *Modern Electrochemical Methods XXXVIII* Navrátil T., Fojta M., Schwarzová K., Eds.; Lenka Srsenová - BEST Servis: Jetřichovice, Czech Republic, 2018, pp 105.
15. Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Navrátil T., Cvačka J., Pačes O.: *Electrochim. Acta* **211**, 787 (2016).
16. Dyrtrtová J. J., Jakl M., Schröder D. J. T.: *90*, 63 (2012).
17. Schnoor J. L., Light L. A., McCutcheon S. C., Wolfe N. L., Carreia L. H. J. E. s., *technology: 29*, 318A (1995).

## BDD Electrodes for Electrochemical Degradation of Selected Pharmaceuticals (BDD elektródy pre elektrochemickú oxidáciu vybraných liečiv)

Erika Medvecká<sup>a</sup>, Marian Vojs<sup>b</sup>, Marián Marton<sup>b</sup>, Pavol Michniak<sup>b</sup>, Roman Grabic<sup>c</sup>, and  
Andrea Vojs Staňová<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Analytical Chemistry, Mlynská Dolina, Ilkovičova 6, 84215, Bratislava, Slovak Republic, E-mail: medveckea22@uniba.sk

<sup>b</sup>Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of electrical engineering and information technology, Institute of Electronics and Photonics, Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava, Slovak Republic

<sup>c</sup>University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Zatisi 728/II, 389 25 Vodnany, Czech Republic

### Abstract

Wastewater contains wide range of pharmaceuticals that are not enough removed in waste water treatment plants. Because of that there are some tertiary treatment processes which can improve their removal. In this work, the electrochemical degradation of selected pharmaceuticals in wastewater on BDD electrodes which varies in composition of BDD layer (different boron doping concentration and CH<sub>4</sub>/H<sub>2</sub> ratio) was performed. For identification of potentially formed degradation and transformation products of pharmaceuticals, the HPLC-MS/MS with hybrid mass analyzer IT-TOF were used. Crucial parameters of HPLC-MS/MS were optimized.

**Key words:** Pharmaceuticals, Wastewater, BDDE, Degradation products, LC-MS.

### Úvod

V poslednom období vzrastá počet štúdií venujúcich sa prítomnosti liečiv a ich metabolitov v odpadových vodách. Neschopnosť konvenčných čistiarní odpadových vôd (ČOV) eliminovať tieto látky z odpadových vôd umožňuje ich prestup do rôznych oblastí životného prostredia. Ich prítomnosť bola dokázaná v riekach, sedimentoch, vodných organizmoch a v podzemnej aj pitnej vode. Liečivá sú kvôli schopnosti bioakumulácie aj napriek ich nízkym koncentračným úrovňam (ng/L - µg/L) hrozbou pre vodný ekosystém. Hromadenie liečiv a ich metabolitov ako aj ich nejasný dopad na životné prostredie (ŽP) sú dôvodom prečo je v poslednom období snaha o čo najvyššiu účinnosť ich odstránenia už na úrovni čistenia odpadových vôd<sup>1</sup>. Použitie pokročilých oxidačných procesov (AOPs) umožňuje eliminovať liečivá z odpadovej vody a výrazne znížiť množstvo liečiv prestupujúcich do ŽP. AOPs sú založené na generovaní silných oxidantov, najmä hydroxylových radikálov (•OH), ktoré sú schopné oxidácie organických zlúčenín, teda aj liečiv a ich metabolitov. Jednou z podskupín AOPs sú procesy elektrochemickej oxidácie, ktoré využívajú rôzne typy elektród (SnO<sub>2</sub>, PbO<sub>2</sub>, RuO<sub>2</sub>,...). Najčastejšie využívaným typom elektród sú bórom dopované diamantové (BDD) elektródy, ktoré sú vďaka svojim vynikajúcim vlastnostiam (napr. chemickej inertnosti, širokému potenciálovému oknu, nízkemu prúdu pozadia a iné) vhodnou voľbou. Vďaka nízkej adsorpčnej entalpii •OH na povrchu BDD (oproti iným elektródovým materiálom) sú tieto radikály schopné rýchlejšie reagovať s látkami, ktoré sa dostávajú k povrchu elektródy. Sú teda schopné účinnejšej eliminácie<sup>2,3</sup>. S cieľom získania čo najvyššej účinnosti degradácie bol pri použití BDD elektród sledovaný vplyv rôznych parametrov akými sú prúdová hustota, typ a zloženie matrice, atď<sup>4</sup>. Na účinnosť degradácie

v neposlednom rade vplýva aj zloženie samotnej diamantovej vrstvy (pomer  $sp^3/sp^2$ ) a micra dopovania bórom (pomer B/C) <sup>5</sup>.

Využitie AOPs na degradáciu liečiv vo vzorkách vôd je väčšinou sprevádzané stratou biologickej aktivity pôvodných zlúčenín a stratou toxicity. Avšak schopnosť AOPs meniť štruktúru pôvodných molekúl môže rovnako viesť k vzniku rovnako toxických, prípadne toxickejších transformačných a degradačných produktov <sup>6</sup>. Preto je v súčasnosti veľkou výzvou pre analytickú chémiu hodnotenie kvalitatívneho aj kvantitatívneho zloženia odpadových vôd pred aj po ich úprave. Bežne používaná cieľená analýza známych kontaminantov by mala byť sprevádzaná necieľenou analýzou vznikajúcich látok. Vývoj kombinácie separačných techník ako je kvapalinová chromatografia (LC) v spojení s vysokorozlišovacou hmotnostnou spektrometriou (HRMS) umožnil skrining neznámych kontaminantov a poskytol nové možnosti a výhody v analýze environmentálnych vzoriek <sup>7,8</sup>.

Cieľom tejto práce bola elektrochemická degradácia vybraných liečiv s využitím rôzne pripravených BDD elektród s následnou identifikáciou vznikajúcich degradačných a transformačných produktov.

### Experimentálna časť

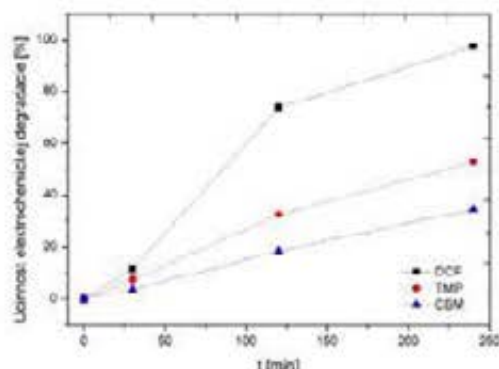
Na experimenty boli použité štandardy liečiv diklofenak, trimetoprim a karbamazepín zakúpené od firmy Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko). Na prípravu mobilných fáz a roztokov boli použité: kyselina mravčia ( $\geq 98\%$ ), kyselina octová ( $\geq 99,8\%$ ), mravčan a octan amónny ( $\geq 99,99\%$ ), acetonitril (Sigma Aldrich), metanol ( $\geq 99,9\%$ , Merck, Darmstadt, Nemecko). Voda, použitá na prípravu všetkých roztokov bola filtrovaná cez Millipore Simplicity filter (Lambda Life, Bratislava). Na experimenty bola použitá odpadová voda pochádzajúca z výstupu modelu domovej čistiarene na Fakulte elektrotechniky a informatiky Slovenskej technickej univerzity (FEI STU). Na elektrochemickú degradáciu liečiv v odpadovej vode bola použitá sada BDD elektród (FEI STU), ktoré sa líšili zložením BDD vrstvy (pomermi  $CH_4/H_2$  a B/C). Kvantitatívna analýza bola uskutočnená pomocou prístrojového vybavenia HPLC-MS/MS s hmotnostným analyzátorom TSQ Quantum Ultra s trojitým kvadrupólom (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Na identifikáciu vzniknutých degradačných a transformačných produktov bol použitý vysokorozlišovací hmotnostný spektrometer LCMS-IT-TOF™ (Shimadzu, Kyoto, Japonsko).

### Výsledky a diskusia

Pri hodnotení vplyvu zloženia BDD vrstvy elektród boli sledované účinnosti eliminácie troch liečiv –karmamazepínu (CBM), diklofenaku (DCF) a trimetoprimu (TMP), ktoré sú v konvenčných ČOV odstraňované s veľmi nízkou účinnosťou (v priemere: CBM 16%, DCF 20%, TMP 35%) <sup>9</sup>. Tieto liečivá súčasne patria do iných terapeutických skupín a majú rôzne fyzikálno-chemické vlastnosti.

Degradačné experimenty boli uskutočnené so sériou elektród lišiacich sa v pomere  $CH_4/H_2$  a/alebo B/C. Pred začiatkom degradačných experimentov bola do odpadovej vody pridaná zmes liečiv o známej koncentrácii a počas experimentu boli vzorky odoberané v časoch 0, 30, 120 a 240 minút. Na základe výsledkov kvantitatívnej analýzy možno povedať, že zloženie BDD vrstvy má vplyv na účinnosť elektrochemickej degradácie liečiv. Pri porovnaní troch elektród s rovnakým pomerom  $CH_4/H_2$  (2%) ale rôznymi pomermi B/C (10 000, 12 000 a 15 000 ppm) bola najlepšia účinnosť pre všetky tri liečivá dosiahnutá s použitím elektródy s pomerom 10 000 ppm B/C (Obr. 1).





**Obr. 1.** Účinnosť elektrochemickej degradácie CBM, DCF a TMP v odpadovej vode s využitím elektródy s parametrami 2% CH<sub>4</sub>/H<sub>2</sub> 10 000 ppm B/C.

Za účelom identifikácie degradačných produktov bola uskutočnená optimalizácia kľúčových parametrov pre HPLC-MS/MS analýzu (zloženie mobilnej fázy, akumulčný čas a kolízna energia). S využitím optimalizovaných podmienok bolo možné identifikovať niekoľko degradačných a transformačných produktov sledovaných liečiv v odpadovej vode.

### Záver

V tejto práci bol demonštrovaný vplyv zloženia BDD vrstvy na účinnosť eliminácie liečiv z odpadových vôd. Pri všetkých testovaných elektródach bola dosiahnutá vyššia účinnosť degradácie liečiv (až 59% CBM, 99% DCF a 95% TMP) než je priemerná účinnosť ich odstraňovania v konvenčných ČOV. Vzhľadom na to je táto technológia sľubným riešením problému kontaminácie vôd. S ohľadom na potenciálne riziká vznikajúcich degradačných a transformačných produktov a potreby ich identifikácie bola použitá kombinácia techník HPLC a HRMS, pomocou ktorej bolo možné identifikovať niekoľko degradačných a transformačných produktov vybraných liečiv.

### PodĎakovanie

Táto práca vznikla za finančnej podpory Agentúry na podporu výskumu a vývoja (APVV-16-0124) a VEGA grantu 1/0558/17.

### References

- Gogoi A., Mazumder P., Kumar Tyagi V., Tushara Chaminda G. G., Kyoingjin An A., Kumar M.: *Groundw. Sustain. Dev.* **6**, 169 (2018).
- Miklos D. B., Remy Ch., Jekel M., Linden K.G., Drewes J. E., Hubner U.: *Water res.* **139**, 118 (2018).
- Garcia-Segura S., Ocon J. D., Chong M. N.: *Process Saf. Environ. Prot.* **113**, 48 (2018).
- Lanzarini-Lopes M., Garcia-Segura S., Hristovski K., Westerhoff P.: *Chemosphere* **188**, 304 (2017).
- Fundala-Ksiazek S., Sobaszek M., Luczkiewicz A., Picczynska A., Ofiarska A., Fisyka-Borzynszkowska A., Sawczak M., Ficek M., Bogdanowicz R., Siedlecka E.: *Chem. Eng. J. (Amsterdam, Neth.)* **334**, 1074 (2018).
- Sharma A., Ahmad J., Flora S.J.S.: *Environ. Res.* **167**, 223 (2018).
- Kiss A., Bergé A., Domenjoud B., Gonzalez-Ospina A., Vulliet E.: *Environ Sci Pollut R.* **25**, 9230 (2018).
- Blestou A. A., Joen J., Hollender J., Archontaki E., Thomaidis N. S.: *Trends Anal Chem.* **66**, 32 (2015).
- Margot J., Rossi L., Barry D. A., Holliger Ch.: *WIREs Water* **2**, 457 (2015).

## Characterization of Complexes Based on Tyrosinase Motif (Charakterizace komplexů s motivem redoxního centra tyrosinázy)

Tomáš Mikysek<sup>a</sup>, Milan Sýs<sup>a</sup>, Michaela Obluková<sup>b,c</sup>, and Romana Sokolova

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 53210 Pardubice, Czech Republic,

E-mail: tomas.mikysek@upce.cz

<sup>b</sup> Charles University, First Faculty of Medicine, Kateřinská 1660/32, 12108 Prague 2, Czech Republic

<sup>c</sup> J. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 18223 Prague, Czech Republic

### Abstract

This contribution presents comparison of kinetics of enzyme tyrosinase (EC 1.14.18.1) and recently synthesized copper complex obtained from amperomerograms by Lineweaver-Burk plot. The Michaelis constants  $K_m$  obtained from electrochemical measurement is corresponding to preliminary results obtained by UV/VIS spectrometry.

**Key words:** Amperometry; spectrophotometry; dopamine; copper complexes; Tyrosinase.

### Úvod

Tyrosináza je jedním z enzymů využívaných pro konstrukci biosenzorů vhodných především k monitorování různých biologicky aktivních látek (např. neurotransmiterů)<sup>1</sup>. Bohužel životnost tohoto enzymu v připraveném biosenzoru je omezena pouze na několik týdnů v závislosti na jeho konstrukci a skladování<sup>2-4</sup>. Proto byla v minulosti syntetizována celá řada látek tzv. "umělých enzymů", komplexů s cílem napodobit chování tyrosinázy a zajistit tak větší stabilitu<sup>5,7</sup>. Všechny tyto látky jsou sice schopny katalyzovat přeměnu substrátu, avšak v porovnání s enzymem (tyrosinázou) vykazují nižší rychlost této přeměny<sup>6</sup>. Aby bylo možné je mezi sebou porovnat, jsou u většiny z nich, v rámci prováděné charakterizace, uvedeny parametry, které jsou typické pro popis enzymem katalyzovaných reakcí. Tedy pomocí parametrů modelu Michaelis-Menten, což jsou  $K_m$  (Michaelisova konstanta)  $V_{max}$  (mezní rychlost) a  $K_{cat}$  ("turnover number"  $V_{max}/[E]_0$ ). Z tohoto modelu byly odvozeny způsoby získání výše uvedených parametrů a to pomocí Lineweaver-Burk, the Eadie-Hofstee plots<sup>8</sup>. V tomto příspěvku je dále uvedeno, diskutováno porovnání kinetiky enzymu (tyrosináza) s nově syntetizovaným komplexem mědi na základě dat z amperometrických měření.

### Experimentální část

#### Chemikálie

Dopamin hydrochlorid, enzym tyrosináza (EC 1.14.18.1 z (*Agaricus biosporus*)), a chloristan lithný byly získány od Sigma-Aldrich (Praha, ČR) stejně tak methanol (kvalita pro HPLC). Deionizovaná voda (odpor  $>18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) byla připravena z demineralizované vody pomocí systému Milli-Q systému od firmy Merck Millipore (Darmstadt, Německo) soli pro přípravu 0,1 M fosfátového pufru byly zakoupeny v Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, ČR). Studovaný komplex mědi s ligandem - 2,6-bis[(N-methyl piperazine-1-yl)methyl]-4-formyl phenol (L) byl syntetizován podle ref.<sup>9</sup>.

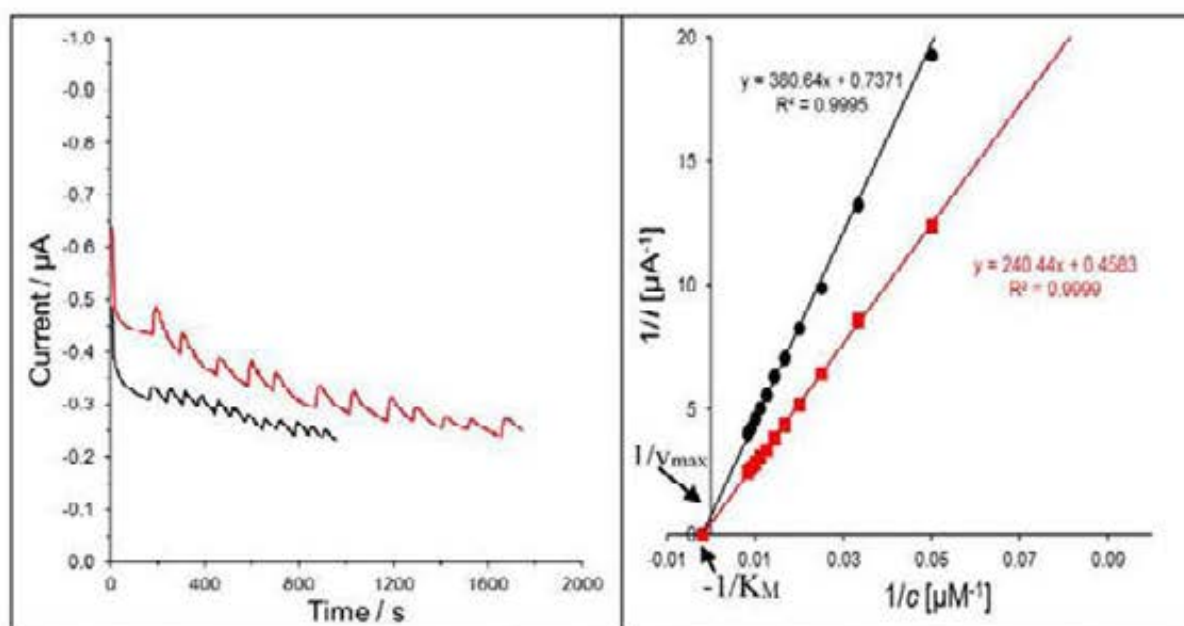
#### Instrumentace

Provedená amperometrická měření byla prováděna v klasickém tři-elektrodovém uspořádání, kde pracovní elektrodou byl zlatý disk (o průměru 3 mm), dále jako referentní byla zvolena chlorido-stříbrná elektroda s 3 M KCl (Pozn.: pro měření v bezvodém methanolu byla použita kalomelová elektroda s můstkem) a jako pomocná byl použit platinový plíšek. Elektrody byly

připojeny k potenciostatu AUTOLAB PGSTAT101 of firmy Metrohm (Praha, ČR), který byl ovládán prostřednictvím software NOVA 1.11.

### Výsledky a diskuse

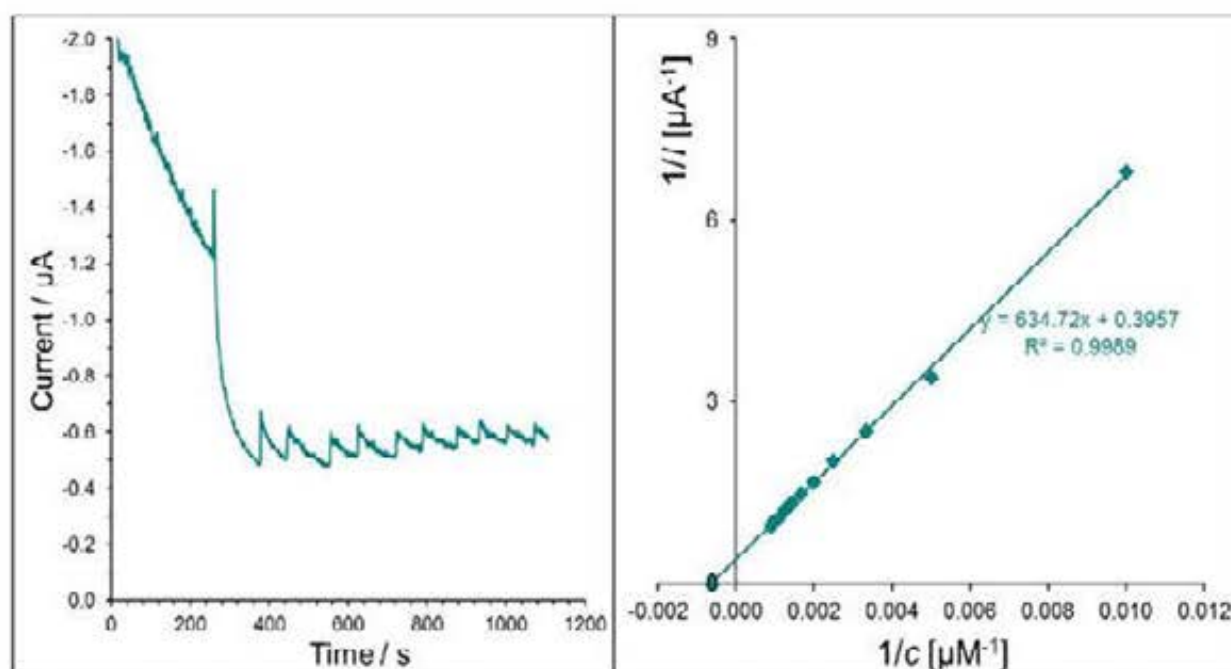
Jak je patrné z níže uvedených obrázků, všechna měření byla prováděna pomocí amperometrie ve vsádkovém uspořádání, kde na zlaté elektrodě byla sledována redukce o-chinonu dopaminu, který vznikl přeměnou z dopaminu (substrát). Nejprve byla provedeno měření při dvou koncentracích tyrosinázy (10 a 20  $\mu\text{g/ml}$ ) v 0,1 M fosfátovém pufru pro různé koncentrace dopaminu (Obr. 1) a poté bylo měření provedeno s komplexem mědi (200  $\mu\text{g/ml}$ ) v methanolu v přítomnosti 0,1 M  $\text{LiClO}_4$  viz. obr. 2. Následně byly tyto amperogramy vyhodnoceny pomocí analýzy Lineweaver–Burk plot vyjádřené rovnicí  $1/i = (K_m / i_{\text{max}}) (1/c) + 1/i_{\text{max}}$ <sup>10</sup>. Ze získaných křivek (obr. 1 a 2 - vpravo) byly vypočítány parametry  $K_m$  a  $V_{\text{max}}$ , kde první parametr lze získat z průsečíku s osou x, zatímco druhý z úseku na ose y jak je naznačeno u obr. 1.



**Obr. 1.** Ukázka amperogramu (vlevo) s přidavky dopaminu 10-120  $\mu\text{M}$  v přítomnosti tyrosinázy (10  $\mu\text{g/ml}$  – černá a 20  $\mu\text{g/ml}$  – červená křivka);  $E = -0,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ , 0,1M PBS; Lineweaver - Burk plot (vpravo).

Na základě teorie byly vyhodnoceny hodnoty  $K_m$  pro dvě koncentrace tyrosinázy (viz. obr.1). Pro nižší koncentraci enzymu vychází hodnota  $K_m$   $5,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  zatímco pro vyšší koncentraci je to  $5,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , což koresponduje s hodnotami uvedenými v literatuře (0,5 -1,4 mM)<sup>11</sup>. Dalším experimentálně zjištěným parametrem byla hodnota mezní rychlosti  $V_{\text{max}}$ , která vykazovala pro nižší koncentraci enzymu hodnotu  $1,3 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ , zatímco pro vyšší obsah to bylo  $2,2 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ . To ukazuje na fakt, pro poměr enzymu a substrátu je výhodnější nižší koncentrace enzymu.

Obdobným způsobem byla sledována katalytická aktivita nově syntetizovaného komplexu mědi. Na základě literatury<sup>12</sup>, kde podobné studie byly prováděny v čistě nevodném prostředí, bylo koncipováno i naše měření a to v methanolu. Již patrným rozdílem oproti experimentům s enzymem byla nutnost použití vyšších koncentrací komplexu i substrátu. Experimentálně byla získána hodnota  $K_m$   $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ , což je přibližně třikrát vyšší hodnota než v případě enzymu, z toho tedy vyplývá, že enzymatická katalýza je rychlejší.



**Obr. 2.** Ukázka amperogramu (vlevo) s přidavky dopaminu 50-550  $\mu\text{M}$  v přítomnosti studovaného komplexu mědi (200  $\mu\text{g/ml}$ );  $E = -0,1 \text{ V vs. SKE}$ ; 0,1 M PBS; Lineweaver-Burk plot (vpravo)

### Závěr

Ze získaných výsledků vyplývá, že prostřednictvím elektrochemických měření (např. amperometrie) lze dosáhnout podobných výsledků jako v případě většinou využívané spektrofotometrie v UV/VIS oblasti.

### Acknowledgments

The support received from the Czech Science Foundation (Project No. 19-03160S) is gratefully acknowledged.

### References

1. Sýs M., Vytřas K.: *Curr. Med. Chem.* **25**, 3988 (2018).
2. Wang Y., Zhang X., Chen Y., Xu H., Tan Y., Wang S.: *Am. J. Biomed. Sci.* **2**, 209 (2010).
3. Fritea L., Tertiş M., Cosnier S., Cristea C., Săndulescu R.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **10**, 7292 (2015).
4. Njagi J., Chernov M. M., Leiter J. C., Andreescu S.: *Anal. Chem.* **82**, 989 (2010).
5. Wendt F., Näther Ch., Tuzek F.: *Biol. Inorg. Chem.* **21**, 777 (2016).
6. Silavi R., Divsalar A., Akbar Saboury A.: *J. Biomol. Str. Dyn.* **30**, 752 (2012).
7. Selmeczi K., Réglér M., Giorgi M., Speier G.: *Coord. Chem. Rev.* **245**, 191 (2003).
8. Roskoski R.: *The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier, Amsterdam 2007.
9. Shanmuga Bharathi K., Kalilur Rahiman A., Rajesh K., Sreedaran S., Aravindan P.G., Velmurugan D., Narayanan V.: *Polyhedron* **25**, 2859 (2006).
10. Ahmada R., Tripathy N., Hoon Kim S., Umar A., Al-Hajry A., Hahn Y.-B.: *Electrochem. Comm.* **38**, 4 (2014).
11. Nairn R., Cresswell W., Nairn J.: *Biochem. Mol. Biol. Edu.* **43**, 370 (2015).
12. Dey S.K., Mukherjee A.: *Coordination Chem. Rev.* **310**, 80 (2016).

## Effect of Silver Nanoparticles towards DNA via Formation of Reactive Oxygen Species

Katarína Nemčeková, Jozef Sochr, and Ján Labuda

Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology,  
Institute of Analytical Chemistry, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic, E-mail:  
katarina.nemcekova@stuba.sk

### Abstract

Nowadays, silver nanoparticles (AgNPs) are commonly utilized materials in medicine, cosmetics or clothing industry due to their antibacterial and antimicrobial properties. However, their potential toxicity accompanied with environmental and health risks has been poorly revealed. The oxidation stress of biomolecules induced by AgNPs via the formation of reactive oxygen species (ROS) is considered as the main mechanism of their toxicity. The effective evaluation of oxidative damage to DNA represents an interesting matter of these days. For this reason, a rapid and reliable detection of DNA degradation was performed using electrochemical biosensing approaches.

**Key words:** Silver nanoparticles, Reactive oxygen species, DNA oxidative stress, Biosensing, Voltammetry, Spectrophotometry.

### Introduction

It is known that biologically active molecules can undergo various structural changes induced by different physical and chemical agents. Today, attention is given to nanomaterials and their potential toxicity accompanied with numerous environmental and health risks. According to their nano-size parameters, they are able to penetrate human and animal skin, accumulate in cells and induce the production of ROS. The formation of ROS in living organisms is a well-known action while their level is regulated by enzymes or antioxidants. However, the excessive accumulation of ROS can possess a potential risk for human and animal health. The balance disturbance between ROS production and antioxidant activity is called the oxidative stress which is accompanied with the degradation of all cellular components (proteins, lipids and DNA) which leads to the different types of diseases or genetic disorders<sup>1</sup>. They can be induced by several endogenous sources (mitochondria, peroxisomes, inflammatory cell activation) as well as by exogenous sources (environmental agents, radiation, ROS, pharmaceuticals and industrial chemicals). Regarding DNA damage as the result of an interaction between generated ROS radicals and a DNA molecule, various changes of DNA primary structure, resulting from the exchange/loss of DNA bases, the formation of strand breaks to the formation of crosslinks, can occur<sup>2</sup>.

AgNPs are characterised as a very attractive photosensitive material due to their antibacterial and antimicrobial properties and can find an application in medicine, cosmetics, clothing industry and others. Due to their electrical properties, they are incorporated in electronics and used in electrochemistry for the preparation and development of biosensors. However, AgNPs represent a potential risk associated with their short-term and long-term toxicity because of their ability to enter into almost all parts of the body. Some studies reported a negative effect of AgNPs in term of DNA damage including the induction of oxidative stress via the formation of ROS. Excessive radical production leads to damage of cellular components including proteins, lipids, DNA and to cell necrosis<sup>3</sup>. However, the generation of ROS becomes limited under the formation of protein corona at the incubation of metallic nanoparticles with biological fluid samples<sup>4</sup>. According to this effect, the toxicity of AgNPs

can be predicted without *in vivo* tests by monitoring the ROS trapping in the presence of double stranded DNA (dsDNA) in solution.

In this work, novel analytical approaches for the investigation of potential toxicity of AgNPs towards DNA after exposing their mixture to UV-C irradiation were performed. The methodology of this work was based on the detection of generated ROS under UV-C irradiation in the absence/presence of DNA using spectrophotometric analyses. The oxidative stress of DNA was observing on the changes of anodic peaks of DNA purine bases using differential pulse voltammetry.

### Experimental

AgNPs of 67 nm size were obtained from Mendel University in Brno (Czech Republic) and prepared by following the protocol of Martı́nez-Castañón and his co-workers<sup>5</sup>. Salmon sperm dsDNA (low molecular weight, CAS 100403-24-5) was purchased from Sigma-Aldrich (Slovakia). The 1 mg.mL<sup>-1</sup> stock solution of dsDNA was prepared in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). The molar concentration of dsDNA (in base pairs, bp) was determined spectrophotometrically at 278 nm using molar absorption coefficient as 6600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

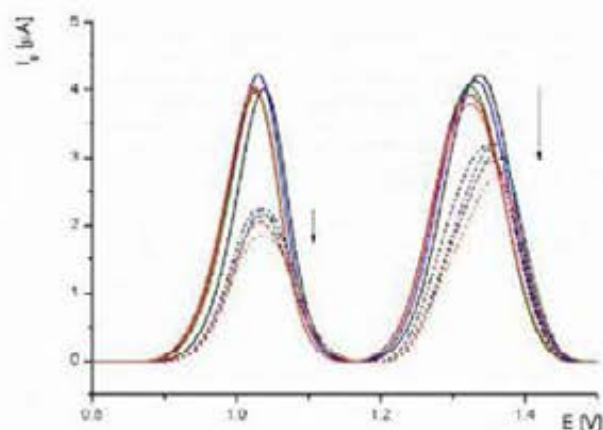
The oxidative stress of DNA induced by ROS was studied using the biosensing approaches in the solution of salmon sperm dsDNA and AgNPs after its exposure to UV-C irradiation. The DNA damage was observing while registering the oxidation peaks of guanine and adenine moieties directly at glassy carbon electrode (GCE) surface<sup>6</sup>. The ROS generation at the UV-C irradiation (254 nm) induced by AgNPs in solution was confirmed spectrophotometrically observing the formation of a new absorption band of corresponding indicator to its oxidized product of 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl)<sup>7,8</sup>.

Voltammetric measurements were performed using Metrohm Autolab PGSTAT12 Potentiostat/Galvanostat Electrochemical System (Eco Chemie, Netherlands) driven by the software NOVA version 1.10.23 (Metrohm Autolab, Netherlands). Graphical analysis was performed in software OriginPro 8.5. A three-electrode system consisted of a glassy carbon working electrode (GCE) with a disc diameter of 3 mm (Metrohm, Netherlands), a silver/silver chloride reference electrode (Ag/AgCl/salt KCl, L-CHEM, Czech Republic) and a platinum counter electrode was used. Phosphate buffer solution of 0.1 M (PB, pH 7.4) was used as a supporting electrolyte. Spectrophotometric analyses were performed by spectrophotometer Thermo Scientific-Evolution 201 (USA) in quartz cuvettes (volume of 1 mL, path length of 1 cm) in wavelength range from 300 nm to 600 nm. The experiments were performed in a 10 ml glass cells. All experiments were carried out at ambient temperature.

### Results and discussion

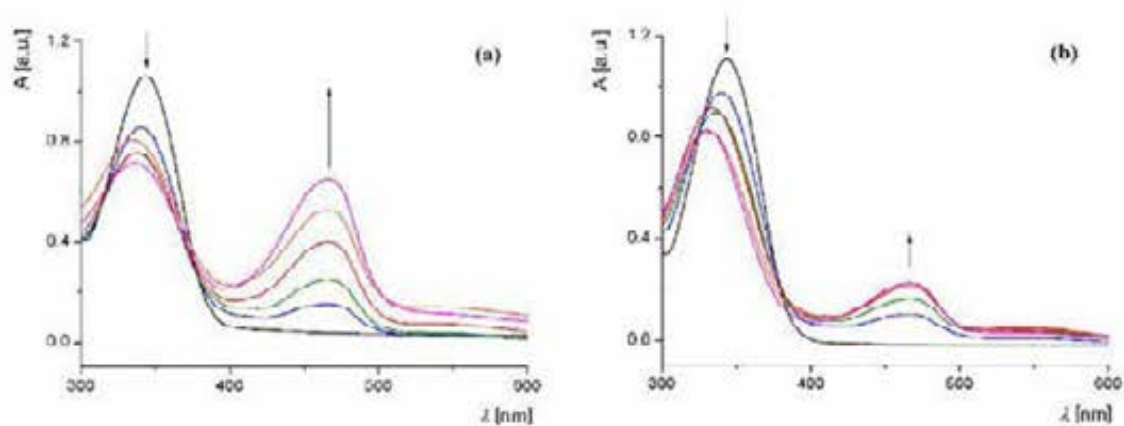
The oxidative stress of DNA nucleobases as a result of ROS formation induced by AgNPs was studied using voltammetric methods. After exposing DNA to UV-C irradiation for different time intervals, no decrease of guanine moiety was found while adenine moiety slightly decreased (Fig. 1). That means no significant effect of this radiation to DNA structure was found. In the presence of AgNPs, the decrease of anodic peaks of both nucleobases was observed (Fig. 1). It could be attributed to the interaction of DNA with AgNPs. According to the nano-scale size of AgNPs, they could penetrate to DNA double helix and block the oxidation of nucleobases. After exposing the mixture to UV-C irradiation, guanine and adenine moieties significantly decreased which should be related to the induction of oxidative stress to DNA structure by generated ROS which caused that less nucleobases could be detected at the electrode surface. The degradation process of DNA has been found to be

dependent on the amount and size of AgNPs as well as on their exposure to UV-C irradiation for different time intervals. AgNPs evidently contributed to the effect of simple UV-C irradiation of DNA which resulted in a deeper DNA degradation, thus, the irreversible oxidation of nucleobases, mainly in case of guanine moiety.



**Fig. 1.** DP voltammograms of guanine (+1.03 V) and adenine (+1.32 V) moieties of 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  salmon sperm dsDNA (a) in the absence (full lines) and in the presence (dashed lines) of 100  $\mu\text{M}$  AgNPs after the exposure to UV-C irradiation (254 nm) for 0 min (**black**), 5 min (**blue**), 10 min (**green**), 20 min (**red**) and 30 min (**orange**); conditions: prepared in PB (pH 7.4), measured on GCE in solution, scan rate of 10  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$

According to the spectrophotometric analysis, the superoxide ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) radical formation was confirmed by observing UV-Vis absorption spectra of generated ROS at 467 nm (Fig. 2a). The ROS formation was proportionally dependent on the concentration of AgNPs. In the presence of dsDNA, the absorption maxima of ROS reached to significantly lower values (in case of 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  and 200  $\mu\text{M}$  AgNPs) comparing to those in the absence of DNA, which indicates the ROS trapping by DNA structure (Fig. 2b). Moreover, the production of ROS and their trapping by DNA was found to be dependent on the size of AgNPs, their amount as well as the presence of different atmosphere (solutions saturated by oxygen, air or argon).



**Fig. 2.** UV-Vis absorption spectra of 100  $\mu\text{M}$  NBD-Cl (343 nm, **black**) and its oxidation product (467 nm) indicating the ROS generation induced by 10  $\mu\text{M}$  (**blue**), 25  $\mu\text{M}$  (**green**), 50  $\mu\text{M}$  (**red**), 100  $\mu\text{M}$  (**orange**) and 200  $\mu\text{M}$  (**pink**) AgNPs in the absence (a) and in the presence (b) of 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  salmon sperm dsDNA

## Conclusions

The oxidative stress towards the DNA nucleobases as a result of the formation of UV-C/AgNPs-induced ROS was studied using electrochemical biosensing method. The mixture of salmon sperm dsDNA and AgNPs was exposed to UV-C irradiation and the signal changes of DNA purine nucleobases were investigated using differential pulse voltammetry. The degradation of DNA was found to be dependent on the amount and size of AgNPs which evidently contribute to the effect of simple UV-C irradiation of DNA. Using spectrophotometric analysis, the production of ROS proportionally dependent on the AgNPs concentration, was confirmed as well as ROS trapping by DNA.

## Acknowledgements

This work was supported by the Scientific Grant Agency VEGA of the Slovak Republic (Project 1/0489/16) and the Slovak Research and Development Agency under the Contract No. APVV-0797-11.

## References

19. Zuberek M., Paciorek P., Bartosz G., Grzelak A.: *Redox Biol.* *11*, 646 (2017).
20. Klaunig J. E., Kamendulis L. M.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *44*, 239 (2004).
21. Lavado A. S., Chauhan V. M., Zen A. A., Giuntini F., Jones D. R. E., Boyle R. W., Beeby A., Chan W. C., Aylott J. W.: *Nanoscale* *7*, 14525 (2015).
22. Nguyen V. H., Lee B. J.: *Int. J. Nanomed.* *12*, 3137 (2017).
23. Martinez-Castanon G. A., Niño-Martínez N., Martínez-Gutiérrez F., Martínez-Mendoza J. R., Ruiz F. J.: *Nanoparticle Res.* *10*, 1343 (2008).
24. Olojo R. O., Xia R. H., Abramson J. J.: *Anal. Biochem.* *339*, 338 (2005).
25. Nemčková K., Labuda J., Milata V., Blaškovičová J., Sochr J.: *Bioelectrochemistry* *123*, 182 (2018).
26. Sochr J., Nemčková K., Tuktamyševová K., Labuda J.: *24th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2018) and 21st International Conference Analytical Methods and Human Health (AMHH 2018), Jasná, Slovakia, 17<sup>th</sup> – 20<sup>th</sup> June, 2018, Book of Abstracts (Bratislava 1, ed.), p. 173, Poster No. P095.*



## Chronopotentiometry of Papain Modified by Ruthenium Complexes

Štěpánka Nováková Lachmanová <sup>a</sup>, Lubomír Pospíšil <sup>a</sup>, Barisa Talbi <sup>b</sup>, Michéle Salmain <sup>b</sup>,  
and Magdaléna Hromadová <sup>a</sup>

<sup>a</sup>J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences,  
Dolejškova 3, 18223 Prague, Czech Republic, E-mail: stepanka.lachmanova@jh-inst.cas.cz

<sup>b</sup>Sorbonne Université, CNRS, Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM), 4 place  
Jussieu, F-75005 Paris, France

### Abstract

Catalytic hydrogen evolution reaction is one of known effects observed during the electrochemical studies of proteins. Constant current chronopotentiometric stripping technique is suitable tool for the study of catalytic hydrogen evolution reaction due to the formation of peak H. This contribution compares the catalytic behaviour of nonmodified papain and its artificial derivatives prepared by the interaction of organometallic complexes of ruthenium with free sulfhydryl group of protein. The comparison of the chronopotentiometric behaviour of papain and its derivatives would help to better understand the catalytic hydrogen evolution reaction in these derivatives.

**Key words:** Papain, Ruthenium organometallic complexes, Artificial metalloproteins, Catalytic hydrogen evolution reaction, Constant current chronopotentiometric stripping technique.

### Introduction

Protein papain (E. C. 3. 4. 22. 2) is cysteine endopeptidase present in latex and fruit of *Carica papaya* plant. Papain structure consists of 212 aminoacids <sup>1</sup>, the aminoacidic sequence contains seven sulfhydryl groups. The only free sulfhydryl group is located in the active site of the protein. The natural structure of papain does not contain any metallic atom, but the presence of free sulfhydryl group provides the possibility of the papain modification by covalently bonded organometallic complexes.

Preparation of the artificial metalloproteins provides new electrochemical properties compared to natural proteins. Typical electrochemical properties of proteins are the adsorption to the mercury electrode surface and catalytic hydrogen evolution reaction (CHER)<sup>2,3</sup>, which is affected by arginine, lysine, histidine and cysteine residues in the aminoacidic sequence of the protein <sup>3</sup>. Process of CHER causes well-resolved peak H formation on the constant current chronopotentiometric stripping curves at even less than nanomolar concentrations <sup>3</sup>. The aim of this contribution is to study CHER activity by nonmodified papain and its artificial metalloprotein derivatives. Papain was modified by three organometallic complexes of ruthenium. Chemical structure of compound **1** contains ruthenium cation, 1,10-phenantroline moiety and chloroacetamide group, which specifically interacts with the free papain sulfhydryl group<sup>4</sup>. Compound **1** was synthesized and tested for catalysis of Diels-Alder reaction. The yield of the Diels-Alder reaction was higher in the case of catalysis by papain modified by compound **1** <sup>5</sup>. Compounds **2** and **3** are bound to papain by the maleimide group. Molecule **2** was synthesized as the catalyst of hydrogenation reactions of ketones and imines <sup>6,7</sup>, compound **3** was prepared for its photophysical properties <sup>8</sup>.

### Experimental

Organometallic complexes **1** to **3** (for chemical structures see Fig. 3) were synthesized,

characterized and bound to papain by team of Dr. Michele Salmain in Paris. Nonmodified papain (from *Carica papaya* latex, activity 23 U·mg<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, USA), potassium chloride (99% purity, Lachema, Czech Republic) and argon gas (99.998 % purity, Messer, Czech Republic) were used as received. Ultrapure deionized water was prepared by Milli-Q Integral 5 water purification system (maximum resistivity 18.2 MΩ·cm, Millipore, France).

The electrochemical measurements were done by using potentiostat PGSTAT30 (Metrohm, Switzerland). Hydrogen evolution catalysis in the presence of proteins ( $c = 5 \times 10^{-7}$  mol·dm<sup>-3</sup>) was studied by chronopotentiometry in environment of 0.1M KCl in water on hanging mercury drop electrode HMDE (Laboratorní přístroje Praha, Czech Republic) of area 0.0097 cm<sup>2</sup>. As a reference electrode Ag wire covered by the layer of AgCl was used. Platinum net was employed as an auxiliary electrode. Data were analyzed in program OriginPro 2015 (OriginLab Corporation, USA).

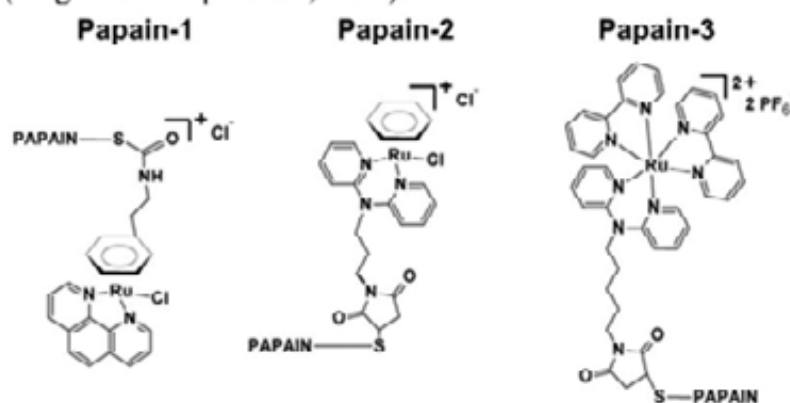


Fig. 3. Chemical structures of artificial derivatives of papain with covalently bound molecules 1 to 3.

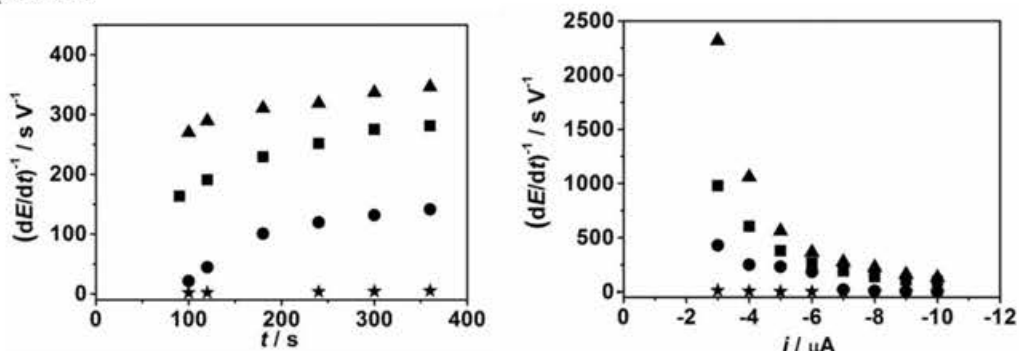
### Results and discussion

The aqueous solutions of nonmodified papain and its artificial derivatives papain-1, papain-2 and papain-3 were studied by constant current chronopotentiometric stripping technique on HMDE in the potential range from -0.2 V to -2 V against the Ag|AgCl|KCl reference electrode. All of the obtained chronopotentiograms show presence of well-resolved peak H. The influence of applied current<sup>9</sup> and accumulation period<sup>10</sup> on the development of peak H was tested.

The dependence of applied current was studied in range of values from -3 μA to -10 μA. All of the curves were measured after the deposition time 100 s at the potential value -0.2 V. For all of the proteins the decrease of peak H height and its shift to more negative potentials with higher current values was observed.

The second measurement was focused on the influence of the accumulation period. Chronopotentiograms of the solutions of nonmodified papain and the artificial metalloproteins were measured after the deposition time in the range of values 30 s to 360 s at applied potential -0.2 V. An increase of peak H height with prolonging the accumulation period was noticed for all of the studied proteins. This dependence confirms the electrochemical behavior of the proteins in adsorbed state. Strong peak H shift to more positive potential with longer waiting period was observed for the solutions of papain, papain-1 and papain-2. Shift of the peak for the solution of papain-3 was not noticed.

The constant experimental conditions provide the possibility of comparison of CHER activity for all studied proteins. Although the observed dependences of peak H height on the accumulation time and applied current were similar, the influence of the protein modification is visible (Fig. 4). The lowest peaks H were measured for all of the conditions for the solution of papain-2, the hydrogen evolution activity was even lower than for the nonmodified papain. On the other hand, modification of papain by the complexes 1 and 3 increased CHER activity of the protein.



**Fig. 4.** Dependence of peak H height on the accumulation time (left) and on the applied current (right) for aqueous solutions of papain (dot), papain-1 (square), papain-2 (star) and papain-3 (triangle) for concentration  $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  of protein in 0.1M KCl.

## Conclusions

Catalytic hydrogen evolution activity of proteins is influenced by their chemical structure. The addition of ruthenium organometallic complexes to papain changed the ability of protein to catalyze the hydrogen evolution during the chronopotentiometric measurements. The modification of papain by molecule 2 noticeably decreased CHER activity. On the other hand, the artificial metalloproteins papain-1 and papain-3 provided much higher electrochemical signal than nonmodified papain. The highest CHER activity was observed in the presence of papain-3, even though the catalytical properties were not the main aim for the synthesis of molecule 3.

## Acknowledgements

This research has been supported by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (project 8J18FR002) and by the Czech Science Foundation (project no. 18-04682S).

## References

1. Mitchel R. E. J., Chaiken I. M., Smith E. L.: *J. Biol. Chem.* *14*, 3485 (1970).
2. Paleček E., Ostatná, V.: *Electroanalysis* *19*, 2383 (2007).
3. Paleček E., Tkáč J., Bartošik M., Bertók T., Ostatná V., Paleček J.: *Chem. Rev.* *115*, 2045 (2015).
4. Haquette P., Talbi B., Canaguier S., Dagorne S., Fosse C., Martel A., Jaouen G., Salmain M.: *Tetrahedron Lett.* *49*, 4670 (2008).
5. Talbi B., Haquette P., Martel A., de Montigny F., Fosse C., Cordier S., Roisnel T., Jaouen G., Salmain M.: *Dalton Trans.* *39*, 5605 (2010).
6. Haquette P., Dumat B., Talbi B., Arbabi S., Renaud J.-L., Jaouen G., Salmain M.: *J. Organomet. Chem.* *694*, 937 (2009).
7. Madern N., Talbi B., Salmain M.: *Appl. Organometal. Chem.* *27*, 6 (2013).
8. Haquette P., Jacques J., Dagorne S., Fosse C., Salmain M.: *Eur. J. Inorg. Chem.* 5087 (2010).
9. Ostatná V., Kuralay F., Trnková L., Paleček E.: *Electroanalysis* *20*, 1406 (2008).
10. Tomschik M., Havran L., Fojta M., Paleček E.: *Electroanalysis* *10*, 403 (1998).

## Voltammetry of Sudan I at Pyrolytic Graphite and Boron Doped Diamond Electrodes in Aqueous Media

Anna Ondráčková<sup>a</sup>, Luděk Havran<sup>b</sup>, Schwarzová-Pecková Karolina<sup>a,c</sup>, Miroslav Fojta<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> CEITEC Masaryk university, Kamenice 753/5, 625 00, Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, 612 65, Brno, Czech Republic

<sup>c</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

### Abstract

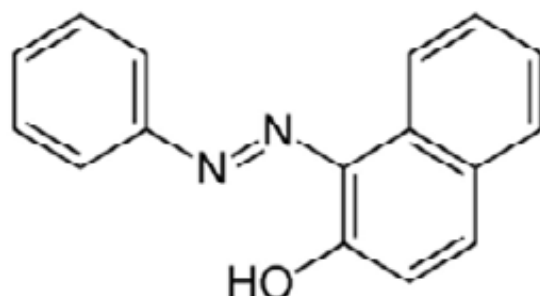
Sudan I is an aromatic azo compound, that is usually used as an orange colouring agent. A series of electrochemical measurements has been done to complete electrochemical analysis of the compound. A few important redox processes of the dye have been identified. Two types of carbon-based electrodes have been used during the measurements (pyrolytic graphite electrode and boron doped diamond electrode) for comparison of electrochemical behaviour studied by cyclic voltammetry in a series of Britton – Robinson buffers of pH 7.0.

**Key words:** Sudan I, Pyrolytic graphite electrode, Boron doped diamond electrode, Electrochemical analysis.

### Introduction

Sudan dyes are synthetic azo-based aromatic compounds, traditionally used in waxes, plastics, oils and polishes. Thanks to their low cost of manufacture they are often used in various industries, such as chemical, textile and woodworking. They are also used as colouring agents for microscopy samples. Their usage is forbidden in food industry as they have been categorized as class 3 carcinogens by the IARC<sup>1</sup>. A method for quick and easy determination of the presence of the Sudan dyes in food has been the focus of many articles. Sudan I (1-phenylazo-2-naphthol - Fig. 1) is a dye used as an orange colouring agent, also known under the names Solvent Orange R or CI Solvent Yellow 14. It is soluble in various organic solvents, such as methanol or trichloromethane, but almost insoluble in water. It is formed as a secondary product in the manufacture of the Sunset Yellow dye.

In mammalian organisms, Sudan I is metabolized by the microsomal detoxifying system with a central role of cytochrome P450 (CYP) hydroxylation activity<sup>2</sup>.



**Fig. 1.** Chemical structure of Sudan I.

Electrochemical methods have been applied to determine Sudan I in relevant matrices, with particular attention paid to analysis of food samples<sup>1,3</sup>. The dye can be detected either *via* oxidation of its phenolic group, or *via* reduction of the azo group present in its molecule. These primary conversions result in formation of other electrochemically active moieties.

Many other methods were tested to detect Sudan I among other dyes with similar chemical structure. The available techniques for the determination of Sudan I are mainly relied upon the high-performance liquid chromatography (HPLC) with various detectors such as UV/vis, fluorimetry, and MS. The HPLC/UV/vis is even recommended as the standard to evaluate the Sudan I level in food products. Nevertheless, the HPLC methods are somewhat cumbersome, time-consuming, and expensive. Electrochemistry on the other hand has proven to be a fast and precise method for identification of this compound <sup>4</sup>. Despite that, a detailed electrochemical study of Sudan I is still to be done.

### Experimental

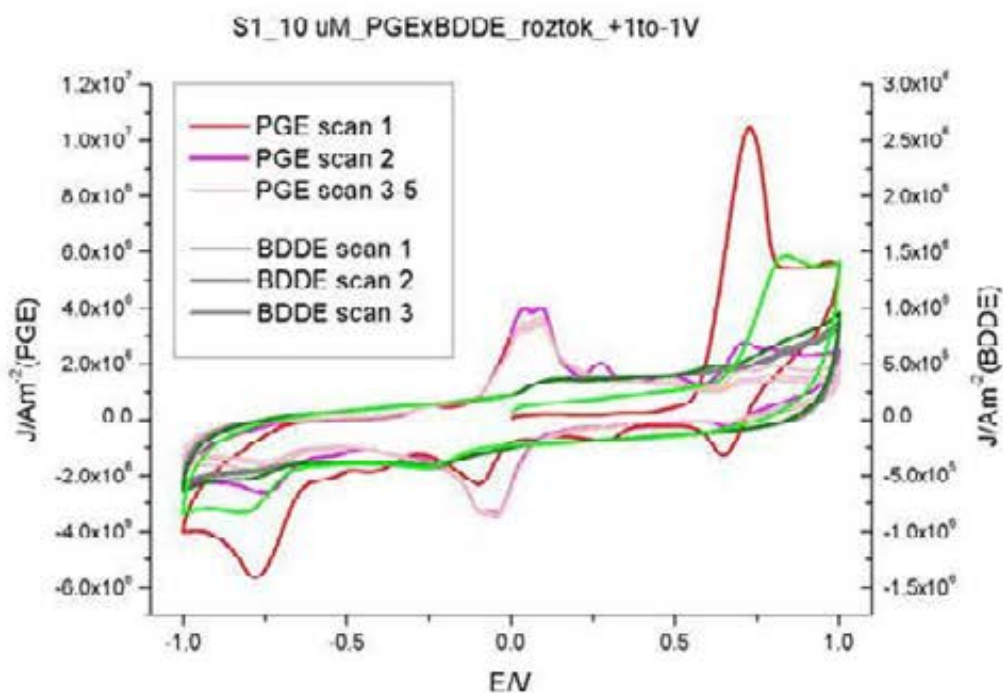
Sudan I has been purchased from Merck at an analytical standard grade and dissolved in ethanol. The stock solution has been kept in room temperature. Chemicals for Britton – Robinson (BR) buffer preparation (acetic acid, boric acid, orthophosphoric acid, sodium hydroxide) were from Merck with  $\geq 99\%$ , pH of the buffer was adjusted by preparing different ratios of the acidic part (acetic acid, boric acid, orthophosphoric acid) and sodium chloride solution.

Voltammetric measurements were carried out in BR buffer of pH 7 at room temperature. Sudan I was added to the solution of BR buffer to final concentration of 10  $\mu\text{M}$  and stirred. Before the measurement, the solution has been run through with argon for 3 minutes to rid it of oxygen. The cyclic voltametry measurements were performed using Autolab analyzer (Ecochemie, the Netherlands) in connection with VA-Stand 663 (Metrohm, Switzerland) in a three-electrode setup (with the pyrolytic graphite/boron doped diamond as working electrode, Ag/AgCl/3 M KCl as reference electrode and platinum wire as auxiliary electrode). Five scans were performed for each measurement with scan rate 1  $\text{Vs}^{-1}$ .

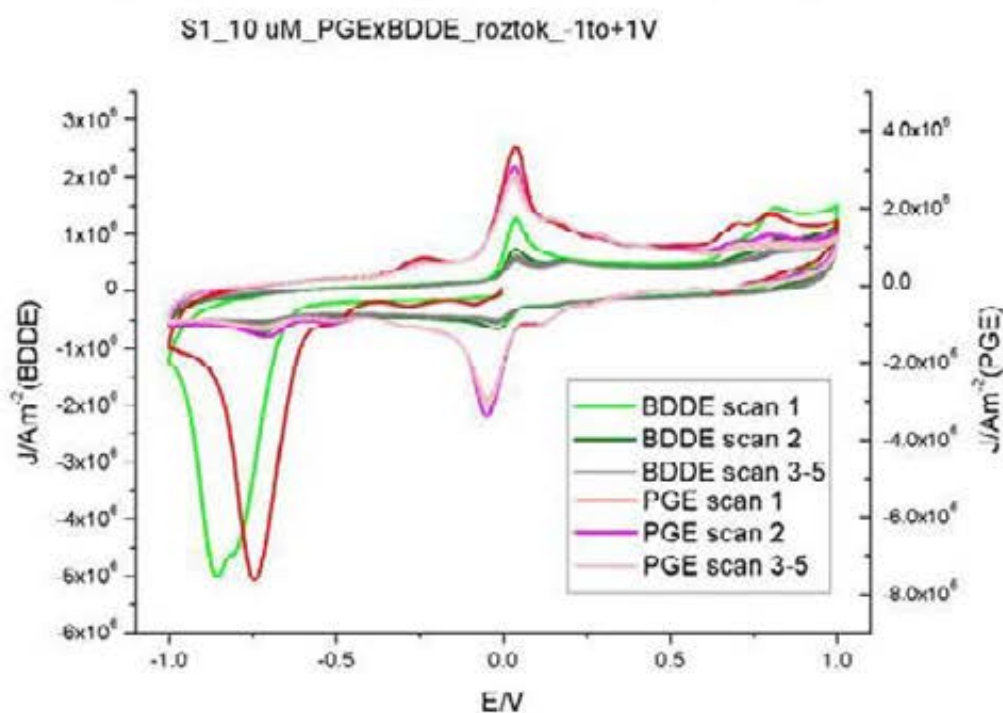
### Results and discussion

For each experiment two separate CV measurements were performed, one starting in 0 V, continuing to +1 V, turning towards -1 V and ending once again at 0 V (Fig. 2), while the other going from 0 V to -1 V, then to +1 V and ending at 0 V (Fig. 3). Thanks to this, we were able to observe the behaviour of Sudan I while first being reduced and then oxidised or *vice versa*.

The first anodic scan shows a clear large peak around +0.6 V that corresponds to oxidation of the phenolic group of the Sudan I. The azo group of the molecule is reduced in the cathodic scan; under conditions used in Fig. 2, corresponding signal is relatively poorly developed (compare to Fig. 3) due to partial electrode blocking by products of the former reaction. These species (hydroquinone/quinone originating from phenol oxidation and/or p-aminophenol/iminoquinone originating from reductive cleavage of the azo moiety, see below) give reversible processes apparent in the second, third, fourth and fifth scan around 0 V - +0.1 V.



**Fig. 2.** CV scans of Sudan I started with anodic scan from 0 V to +1 V recorded on pyrolytic graphite electrode (PGE) and on boron doped diamond electrode (BDDE).



**Fig. 3.** CV scans of Sudan I started with cathodic scan from 0 V to -1 V recorded on pyrolytic graphite electrode (PGE) and boron doped diamond electrode (BDDE).

When the cathodic scan is applied first (Fig. 3), four electron reduction of the azo moiety gives rise to the dominant peak around -0.75 V which results in the separation of the two aromatic cycles of Sudan I and generation of aniline and 2-amino-1-naphthol. The latter yields the reversible pair close to 0 V.

### **Conclusions**

While many articles have been published about this particular molecule, a full characterization of its electrochemical properties hasn't been completed yet (as the available articles usually focus more on determination of the dye in mixtures of other dyes with similar molecular structure). The process for the full analysis has barely started, but already the main processes have been mostly identified. Two electrodes, that are used during our experiments give similar results, but have enough differences to offer many possibilities in future identification of this compound and other experiments.

### **Acknowledgements**

This research was supported by the Czech Science Foundation (project No. 18-01710S).

### **References**

1. Chailapakul O., Wonsawat W., Siangproh W., Grudpan K., Zhao Y., Zhu Z.: *Food Chem.* *109*, 876 (2008).
2. Stiborova M., Martinek V., Rydlova H., Hodek P.: *Cancer. Res.* *20*, 5678 (2002).
3. Li B. L., Luo J. H., Luo H. Q., Li N. B.: *Food Chem.* *173*, 594 (2015).
4. Gómez M., Arancibia V., Aliaga M., Núñez C., Rojas-Romo C.: *Food Chem.* *212*, 807 (2016).

**Rapid Determination of Major Minerals in Yogurt Using Microdialysis On-line  
Connected with Capillary Electrophoresis  
(Rychlé stanovení majoritních kationtů v jogurtech pomocí on-line spojení kapilární  
elektroforézy s mikrodialýzou)**

František Opekar <sup>a</sup>, Jakub Hraniček <sup>a</sup>, and Petr Tůma <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 2030,  
128 43 Prague 2, Czech Republic, E-mail: opekar@natur.cuni.cz

<sup>b</sup> Charles University, Third Faculty of Medicine, Department of Hygiene, Ruská 87, 100 00  
Prague 10, Czech Republic

**Abstract**

A new analytical apparatus is described based on on-line connection of the rapid capillary electrophoresis with a continual micro-dialysis sampling. This apparatus was utilized for simultaneous estimation of four major minerals,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  and  $Mg^{2+}$ , in commercial white yogurts. The release of cations from organic structures is achieved simply by short digestion in boiling 6 M HCl. The complete separation of the four cations is achieved in 40 s. Within reliability interval, the total mineral content estimated by the reported method equals to both that stated at the label of commercial yogurts and that estimated in comparative flame atomic absorption spectrometry. RSD of the electrophoretic estimation is around 5 %.

**Key words:** Dairy products, Dialysis, Electrophoresis, Inorganic cations, Short capillary, Yogurt.

**Úvod**

Mléko a mléčné výrobky jsou velmi důležitou součástí stravy. Jsou cenné zejména pro svůj vysoký obsah bílkovin, vitamínů a minerálních látek. Jejich kvalita je proto analyzována z mnoha hledisek, nejen nutričního, ale i senzoričského, reologického a samozřejmě i z hlediska chemického složení <sup>1</sup>. Z nutričního hlediska je významný obsah minerálních látek, především vápníku. Majoritními anorganickými kationty v mléce a mléčných výrobcích jsou kromě vápníku, draslík a sodík a hořčík. Pro stanovení obsahu majoritních i minoritních minerálních látek v mléčných výrobcích je používána řada metod. V současné době je nejčastěji využíváno indukčně vázané plasmu v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (ICP-MS) <sup>2,3</sup> nebo optickou emisní spektrometrií (ICP-OES) <sup>4,5</sup>.

Anorganické kationty jsou v mléku a mléčných produktech částečně přítomny ve formě volných solí, ale ve větší míře jsou vázány v komplexech s proteiny, peptidy, tuky a řadou dalších molekul. Vápník je vázán především na různé typy kaseinových micel. Na další složky mléčných produktů, např. syrovátkový protein a laktoferin, jsou kromě vápníku vázány i další kationty<sup>6</sup>. Proto je v těchto matricích nedílnou součástí analýzy uvolnění iontů z organických struktur digescí kyselinou nebo suchou či mokrou mineralizací, často podpořenou tepelnou, ultrazvukovou nebo mikrovlnnou energií.

V předkládané práci je ke stanovení kationtů  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  a  $Mg^{2+}$  v mléčných produktech navržena metoda kombinující mikrodialyzační (MD) odběr vzorku s on-line elektroforetickou (CE) separací v krátké kapiláře. Metoda umožňuje současně stanovit všechny čtyři majoritní kationty. Kationty pevně vázané v organické matici vzorku jsou uvolněny digescí koncentrovanou kyselinou. Mineralizace za těchto podmínek sice není úplná, ale je dostatečná pro uvolnění stanovovaných kationtů z organických struktur. Nežádoucí zbytky organické matrice jsou zadrženy mikrodialyzační sondou, takže do separační kapiláry jsou nadávkovány

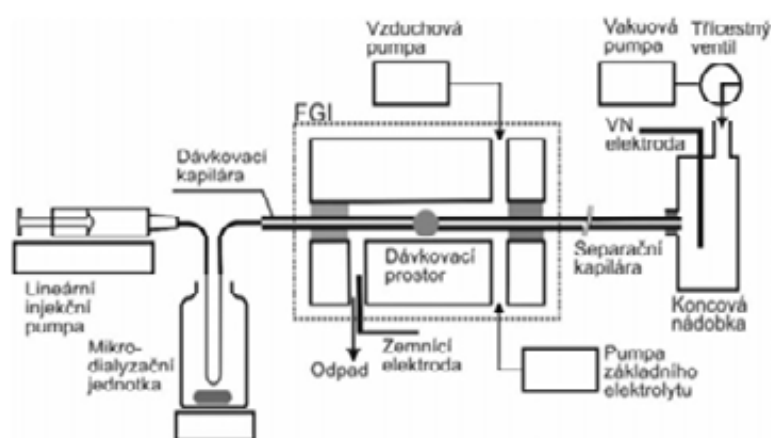


pouze anorganické ionty. Analyzovaným vzorkem byly dva bílé jogurty Activia firmy Danone, lišící se obsahem anorganických iontů. Referenční metodou byla plamenová atomová absorpční spektrometrie (FAAS) a komplexometrie.

### Experimentální část

#### Popis aparatury a její činnosti

Schema „laboratory-made“ aparatury je na obr. 1. Mikrodialyzační jednotkou je 4mL skleněná vialka s analyzovaným vzorkem, do níž je vsunuta mikrodialyzační sonda. Sondou je „Microdialysis Hollow Fiber“ (Spectrum Labs, USA), vnější průměr 216  $\mu\text{m}$ , vnitřní průměr 200  $\mu\text{m}$  a délka 5 cm. Roztok ve vialce je míchán magnetickým míchadlem. Do dialyzační sondy je kontinuálně přiváděn akceptorový roztok (deionizovaná voda) z lineární injekční pumpy (TJ-1A, MRC LTD, Israel) rychlostí 3  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Výstup ze sondy je veden dávkovací kapilárou do „Flow-Gating Interface“ (FGI). Bylo použito FGI jehož detailní popis a vlastnosti lze nalézt v publikacích <sup>7,8</sup>.



**Obr. 1.** Schéma aparatury pro on-line spojení CE-MD. Detaily a popis činnosti viz text.

Ve stručnosti: v dávkovacím prostoru jsou proti sobě ve vzdálenosti asi 380  $\mu\text{m}$  výstup dávkovací kapiláry a vstup separační kapiláry. Při separaci je dialyzát kontinuálně vystupující z dávkovací kapiláry odkláněn proudem základního elektrolytu (BGE) (250  $\mu\text{L min}^{-1}$ ) od ústí separační kapiláry. Při dávkování je tok BGE zastaven a BGE je z dávkovacího prostoru vytěsněn proudem vzduchu. Současně je z dávkovací kapiláry do prázdného dávkovacího prostoru vytlačována kapka dialyzátu, která po určité době (zde po 2 s) dosáhne ke vstupu separační kapiláry (tato situace je znázorněna na Obr. 1). Jakmile je kapka dialyzátu v kontaktu se vstupem separační kapiláry, je v koncové nádobce generován podtlakový puls definované délky (-500 mbar, 0,3 s) a dialyzát je do separační kapiláry nadávkován. Po nadávkování vzorku je obnoven tok BGE, během 10 s je kapka vzorku odplavena, dávkovací prostor je zaplněn BGE a roztok dialyzátu je odkláněn od vstupu CE kapiláry. Zapnutím vysokého napětí je zahájena separace. Celý dávkovací proces trvá asi 12 s.

#### Chemikálie a vzorky

Používané chemikálie byly čistoty pro analýzu, voda deionizovaná. Standardy byly připraveny ředěním standardních roztoků 1,000 g  $\text{L}^{-1}$   $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{Ca}^{2+}$  (Analytica, ČR). Vzorky jogurtů Activia (Danone) byly získány v lokální obchodní síti. Vzorek dále označován Activia I obsahuje dle etikety 195 mg  $\text{Ca}/100$  g jogurtu a 220 mg  $\text{NaCl}/100$  g jogurtu; vzorek označován Activia II obsahuje 145 mg  $\text{Ca}/100$  g jogurtu a 150 mg  $\text{NaCl}/100$  g jogurtu. Údaje o obsahu dalších minerálů nejsou uvedeny. Vzorky jogurtů, 2,0 g, byly před analýzou upravovány digescí varem v 6 M  $\text{HCl}$  po dobu 10 minut pod zpětným chladičem. Po

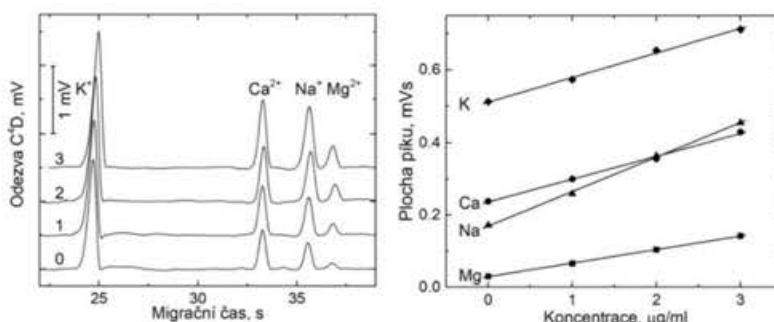
vychladnutí byl roztok doplněn na 100,0 mL vodou a z něj byly ředěním připravovány roztoky k analýze.

#### Pracovní parametry

Elektroforetická separace probíhala v BGE 500 mM kyselina octová + 12 mM LiOH (pH 4,2) při napětí/proud 10 kV/6  $\mu$ A v křemenné kapiláře vnější průměr 380  $\mu$ m, vnitřní průměr 25  $\mu$ m, délka celková/k detektoru 16,5/10,5 cm. Detekce je bezkontaktní vodivostní ( $C^4D$ ). Stanovení bylo provedeno metodou standardního přidavku, přidavky byly 1, 2 a 3  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Pro referenční měření byl použit atomový absorpční spektrometr s plamenovou atomizační (GBC 933 AA, GBC Scientific Equipment, Australia). Stanovení Na, K, Mg a Ca bylo prováděno při 589,0; 766,5; 285,2 a 422,7 nm. Atomizace byla prováděna s plamenem vzduch-acetylén pro stanovení Na, K a Mg, a plamenem oxid dusný-acetylén pro stanovení Ca. Stanovení bylo založeno na kalibračním grafu sestaveném v intervalu 0,25 až 5,0 mg mL<sup>-1</sup>. Obsah vápníku byl ověřen též komplexometrickou titrací roztokem 0,051 M chelatonu III v prostředí 1 M NaOH; indikátorem byl 0,5% roztok kalkonalidu v methanolu.

#### Výsledky a diskuse

Ilustrační elektroferogramy jogurtu Activia I před a po přidání standardních přidavků jsou na Obr. 2. Vyhodnocovány byly plochy piků. Ve stejném obrázku je i příklad kalibračních přímek; ve většině analýz byl koeficient determinace  $R^2 > 0,99$ . Průměry z pěti opakovaných stanovení jednotlivých kationtů jsou v Tabulce I. Pro srovnání jsou v tabulce rovněž výsledky srovnávacích analýz plamenovou atomovou absorpční spektrometrií a komplexometrií.



**Obr. 2.** Stanovení iontů  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  a  $Mg^{2+}$  v jogurtu Activia I (po digesci 6 M HCl) metodou standardního přidavku (standardní přidavky v  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> uvedeny u elektroferogramů) a příklad kalibračních přímek.

#### Tabulka I.

Přehled výsledků elektroforetického stanovení majoritních anorganických kationtů ve dvou různých jogurtech Activia (Danone) po digesci v 6 M HCl. Hodnoty v mg/100 g jogurtu jsou průměrem z pěti (CE) nebo tří (FAAS a komplexometrie) měření. Intervaly spolehlivosti a RSD in % (v závorce) jsou určeny pro 95% hladinu významnosti.

Metoda stanovení	Activia I				Activia II			
	K	Ca	Na	Mg	K	Ca	Na	Mg
CE	360±13 (2,8)	191±5 (4,0)	88±4 (5,9)	40±4 (11,1)	327±16 (4,1)	153±8 (5,7)	62±4 (5,5)	37±3 (8,2)
FAAS	328±14 (2,0)	189±10 (2,5)	89±1 (0,3)	38±3 (4,0)	309±28 (4,1)	154±11 (3,3)	71±3 (2,0)	33±2 (2,7)
Komplexometrie		202±6 (1,2)				159±4 (0,9)		

Z Tabulky I plyne, že totální obsah všech sledovaných kationtů stanovený elektroforézou je v rámci intervalu spolehlivosti ve většině případů shodný s hodnotami stanovenými referenční atomovou absorpční spektrometrií, a v případě vápníku i s hodnotou stanovenou komplexometricky. Malý rozdíl byl zjištěn pouze při stanovení draslíku. V intervalu spolehlivosti stanoveného obsahu vápníku jsou i hodnoty uvedené na etiketě jogurtů: 195 a 145 mg Ca/100 g jogurtu pro Activia I a Activia II. Stanovený obsah sodíku po přepočtu na NaCl je roven 225 a 157 mg/100 g jogurtu ve vzorku Activia I a Activia II; tyto hodnoty jsou prakticky shodné s hodnotami uvedenými na etiketě jogurtů: 220 a 150 mg NaCl/100 g jogurtu.

### **Závěr**

Navržená metoda rozšiřuje portfolio metod používaných pro analýzy mléčných výrobků. Využívá nově kapilární elektroforézu s on-line mikrodialyzačním odběrem vzorku. Je rychlá, předúprava vzorku digescí kyselinou je podstatně kratší než běžně používané totální mineralizace. Úplná mineralizace vzorku není nutná, stanovované ionty jsou odděleny od zbytku organické matrice dialýzou. Vzhledem k nenáročné mineralizaci a rychlé separaci je metoda vhodná pro rychlé screeningové testy a ukazuje cestu k malým mobilním analyzátorům použitelným přímo ve zpracovatelských provozech pro kontrolu kvality potravinářských produktů.

### **Acknowledgement**

Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentuře České Republiky, grant 18-04902S.

### **References**

1. Tunick M. H., Van Heckken D. L.: *J. Agric. Food Chem.* **63**, 9381 (2015).
2. Khan N., Jeong I. S., Hwang I. M., Kim J. S., Choi S. H., Nho E. Y., Choi J. Y., Park K. S., Kim K. S.: *Food Chem.* **147**, 220 (2014).
3. Llorent-Martinez E. J., de Cordova M. L. F., Ruiz-Medina A., Ortega-Barrales P.: *Microchem J.* **102**, 23 (2012).
4. Khan N., Choi J. Y., Nho E. Y., Hwang I. M., Habte G., Khan M. A., Park K. S., Kim K. S.: *Anal. Lett.* **47**, 1606 (2014).
5. Luis G., Rubio C., Revert C., Espinosa A., Gonzalez-Weller D., Gutierrez A. J., Hardisson A.: *J. Food Compos. Anal.* **39**, 48 (2015).
6. Gaucheron F.: *Reprod. Nutr. Dev.* **45**, 473 (2005).
7. Opekar F., Tůma P.: *Electrophoresis* **40**, 587 (2019).
8. Opekar F., Tůma P.: *Anal. Chim. Acta* **1042**, 133 (2018).

# Novel Voltammetric Protocol for Reliable Determination of a Platelet Aggregation Inhibitor Dipyridamole on a Bare Miniaturized Boron-Doped Diamond Electrochemical Sensor

Olha Sarakhman and Lubomír Švorc

Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology,  
Institute of Analytical Chemistry, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic,  
E-mail: olha.sarakhman@stuba.sk

## Abstract

A miniaturized boron-doped diamond electrode (BDDE) was used as a reliable electrochemical sensor for determination of dipyridamole (DIP). The electrochemical oxidation of DIP was shown to be irreversible and diffusion-controlled process with single peak at a potential of +0.45 V in Britton-Robinson buffer solution at pH 3. Using the suitable experimental and instrumental conditions, the limits of detection of 40 nM and 60 nM were achieved using differential pulse (DPV) and square-wave voltammetry (SWV), respectively. The proposed protocol was successfully applied to the determination of DIP in pharmaceuticals and model human urine samples with adequate recoveries.

**Key words:** Dipyridamole, Boron-doped diamond electrode, Electrochemical sensor, Human urine, Pharmaceuticals.

## Introduction

Dipyridamole is a drug used for the treatment of cardiovascular diseases due to its vasodilating and antiplatelet properties<sup>1</sup>. Unfortunately, it is consumed fraudulently in certain sports to improve efficiency and decrease tiredness. This drug can be easily absorbed by the human body and its effect lasts long. Besides, the uncontrolled usage of this drug could cause loss of mental power and serious secondary (side) effects with grave danger for health<sup>2</sup>. Therefore, pharmaceuticals containing DIP have to undergo a strict quality control, which requires the development of simple analytical methods for its reliable determination in both pharmaceuticals and biological samples.

Due to the meaningful sensitivity and selectivity, the most widely used analytical methods for DIP detection and determination are high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography. Among others - spectrophotometry, phosphorimetry, fluorimetry, fluorescence spectrophotometry and chemiluminescence methods were also employed for DIP quantification. However, it should be stated that the most of these techniques require highly skilled laboratory staff and expensive equipment. Moreover, they are also time-consuming since complex procedures such as derivatization, extraction or purification stage are usually necessary to be applied prior to analysis.

Modern electrochemical methods have been widely used for analysis of pharmaceuticals due to operation simplicity, low expense of instrument, suitability for real-time detection and less sensitivity to matrix effects in comparison with above mentioned analytical methods. The hanging drop mercury electrodes in combination with different voltammetric techniques have been mostly used for the determination of DIP. Moreover, carbon paste electrode was used as a matrix to prepare chemically modified electrodes in order to increase the electron transfer of DIP from solution to the electrode surface and thus enhance its current response. Among electrode modifiers are surfactant-cetyltrimethylammonium bromide, maghemite nanoparticles, methyltrioctylammonium chloride and multiwalled carbon nanotubes.

Nowadays, the use of boron-doped diamond electrode (BDDE) is very attractive for electrode reaction studies and electrochemical analysis due to its outstanding properties such as chemical stability, low background current, excellent biocompatibility, wide potential range in both aqueous and non-aqueous media as well as weak adsorption for most types of organic molecules<sup>3</sup>. In this respect, a commercial miniaturized electrochemical sensor based on bare BDD working electrode material has been recently applied by our working group in drug and food analysis<sup>4,5</sup>.

In this line, herein for the first time, the novel voltammetric protocol based on using miniaturized thick-film BDDE is introduced for simple, rapid and reliable determination of DIP<sup>6</sup>. The practical applicability of the proposed method is demonstrated in DIP determination in pharmaceutical tablets and model human urine samples.

### Experimental

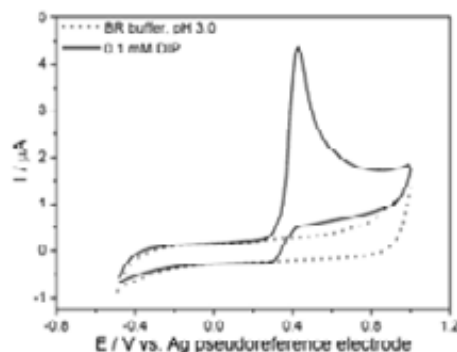
Dipyridamole (DIP, CAS. No 58-32-2, purity of 98%) was purchased from Sigma-Aldrich (China) and used without any further purification. 10 mM stock standard solution of DIP was prepared by dissolution of appropriate amount of its powder in 50 mL ethanol (p.a., Lachema, Czech Republic). The DIP working and calibration solutions of different concentrations were prepared by diluting the appropriate volume of the stock standard solution with supporting electrolyte. Britton-Robinson (BR) buffer solution was prepared by mixing of 40 mM of all necessary components (phosphoric acid, acetic acid and boric acid) and adjusting with sodium hydroxide (0.2 M) to the required pH value. All voltammetric measurements were carried out using potentiostat PSTAT 910 mini (Metrohm Ltd., Switzerland) driven by software PSTAT 1.0. The three-electrode system (purchased from DropSens, Asturias, Spain) situated on ceramic substrate, consisted of the miniaturized thick-film BDD working electrode (commercially marked as CBDD110, with the diameter of 3.6 mm and the boron doping level of 2500 ppm), screen-printed carbon auxiliary electrode and silver pseudoreference electrode. pH values were measured using *pHenomenal*<sup>®</sup> pH1100L meter (VWR, Slovakia) with a combined glass-reference electrode.

Prior to voltammetric measurement, an appropriate volume of DIP standard solution was transferred into the electrochemical cell already containing 10 mL of supporting electrolyte. Cyclic voltammetry (CV) was employed for the selection of suitable experimental conditions for electrochemical oxidation of DIP and assessment of nature of analyte electrode reaction on the miniaturized BDDE. Differential pulse voltammetry (DPV) and square-wave voltammetry (SWV) were utilized for analytical performance evaluation, method validation, interference study and practical applicability.

### Results and discussion

Cyclic voltammetric studies revealed that the oxidation of DIP is irreversible with single and well-shaped peak at the potential ranging approximately from +0.15 to +0.47 V in the pH range from 2 to 12 using BR buffer. The obtained results (Fig. 1) indicate that the maximum peak current (3.4  $\mu$ A) and the lowest background current (0.2  $\mu$ A) were recorded in the presence of BR buffer at pH 3.0, which was finally chosen for further analytical applications. It was found that  $E_p$  shifted linearly to less positive values as the pH of supporting electrolyte increased from 2 to 8 indicating proton transfer stage in electrochemical oxidation of analyte. Besides, it was shown that the oxidation of DIP on the miniaturized BDDE is a two-electron diffusion-controlled process.

The optimization of DPV and SWV instrumental parameters is an important step in the development of voltammetric protocols affecting the sensitivity and selectivity. Hence, the instrumental parameters such as modulation amplitude and modulation time for DPV and amplitude and frequency for SWV were investigated with the aim to obtain the highest current responses, low background currents and favourable peak shape for DIP determination.



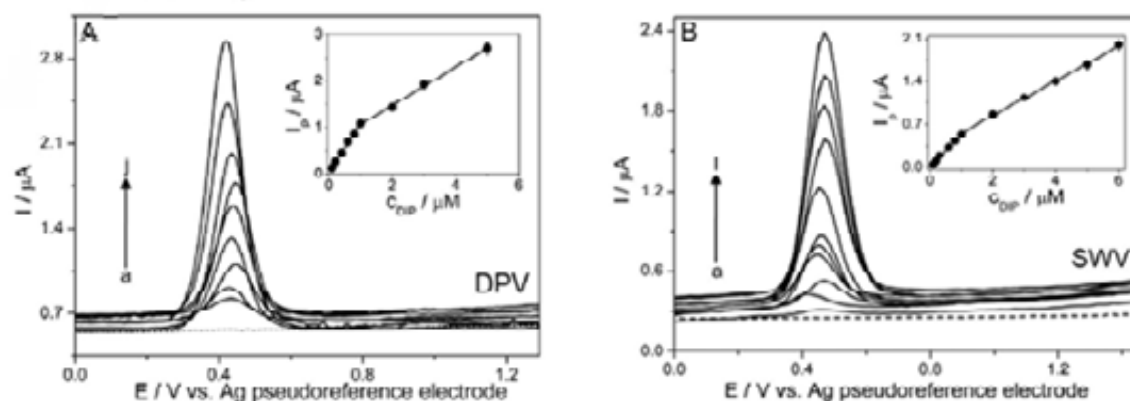
**Fig. 1.** CV records of blank (BR buffer pH 3.0) and 0.1 mM DIP in BR buffer at pH 3.0 on the miniaturized BDDE in the range from  $-0.5$  to  $+1.0$  V using the scan rate of  $100$  mV/s.

Using the optimal DPV (modulation amplitude of  $50$  mV, modulation time of  $25$  ms) and SWV (frequency of  $10$  Hz, amplitude of  $10$  mV) conditions, the calibration curves for DIP determination on the miniaturized BDDE were constructed for the different concentrations of analyte ranging from  $0.1$  to  $5.0$   $\mu$ M and from  $0.1$  to  $6.0$   $\mu$ M for DPV and SWV procedures, respectively. The dependence of  $I_p$  on DIP concentration and respective voltammograms are illustrated in Fig. 2A and B. The statistical evaluation of these curves and main analytical parameters for the proposed method are presented in Table I. For instance, the low detection limits (LODs, derived from the 1<sup>st</sup> linear segment of the corresponding calibration curve) of  $40$  nM and  $60$  nM were calculated for DPV and SWV techniques, respectively and without application of any chemical modification of the miniaturized BDDE surface. The influence of possible interfering agents (which can be present as other components in pharmaceuticals tablets or biological samples) on the current response of  $10$  mM DIP was investigated at the concentration ratios of 1:1, 1:10 and 1:100 between analyte and a particular interferent. In general, glucose does not exhibit any electrochemical activity on bare BDDE and caffeine is known to be oxidized at high positive potentials, far away from DIP signal. Ascorbic acid significantly increased DIP signal of above 35% of original current response already in 10-fold excess. In the case of dopamine, it was found that 10-fold excess interfere seriously with the analyte current response (the signal change of 80%). The peak potentials of DIP and uric acid (UA) ( $+0.4$  V and  $+1.15$  V for DIP and UA, respectively) are far enough away from each other and a good peak-to-peak separation is observed even in the presence of 100-fold excess of UA. Consequently, the interference study revealed that the use of proposed method in analysis of human urine samples containing DIP could be limited in the high excess of ascorbic acid and dopamine.

The analysis of pharmaceutical dosages *Aggrenox*<sup>®</sup> was performed using standard addition method in order to investigate the accuracy and validity of the proposed method. As can be seen in Table II, the recovery values for both pulse voltammetric procedures indicate that there were no significant matrix interferences in tablet samples affecting the voltammetric analysis.

Subsequently, in order to examine the biological relevance of the developed voltammetric protocol, the analysis of model human urine samples was undertaken by both pulse techniques

using standard addition method. The corresponding DP voltammograms for the urine sample of first volunteer in the absence and after addition of some aliquot amounts of DIP standard are illustrated in Fig. 3.



**Fig. 2.** **(A)** DPV records for the different DIP concentrations: (a) 0, (b) 0.1, (c) 0.2, (d) 0.4, (e) 0.6, (f) 0.8, (g) 1.0, (h) 2.0, (i) 3.0 and (j) 5.0  $\mu\text{M}$  in BR buffer (pH 3.0) on the miniaturized BDDE. **(B)** SWV records for the different DIP concentrations: (a) 0, (b) 0.1, (c) 0.2, (d) 0.3, (e) 0.6, (f) 0.8, (g) 1.0, (h) 2.0, (i) 3.0, (j) 4.0, (k) 5.0 and (l) 6.0  $\mu\text{M}$  in BR buffer (pH 3.0) on the miniaturized BDDE. The corresponding calibration curves with two linear segments are displayed in the insets.

**Table I.**

Analytical performance evaluation of the proposed method ( $n = 3$ ).

Analytical parameter	Pulse technique	
	DPV	SWV
Linear concentration range ( $\mu\text{M}$ )	0.1 – 1.0, 1.0 – 5.0	0.1 – 1.0, 1.0 – 6.0
Slope ( $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ ) for 1 <sup>st</sup> linear segment	$1.0431 \pm 0.0218$	$0.5434 \pm 0.0184$
Intercept ( $\mu\text{A}$ ) for 1 <sup>st</sup> linear segment	$0.0398 \pm 0.0133$	$0.0008 \pm 0.0110$
Correlation coefficient $R$ for 1 <sup>st</sup> linear segment	0.9978	0.9943
LOD (nM) for 1 <sup>st</sup> linear segment	40	60
LOQ (nM) for 1 <sup>st</sup> linear segment	125	202
Repeatability* (%)	4.8	4.5

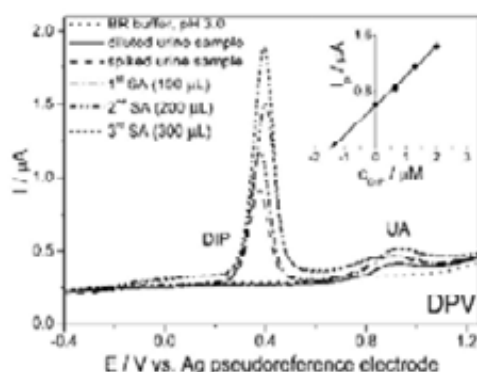
\* RSD calculated for 7 replicate DPV or SWV measurements using 0.5  $\mu\text{M}$  DIP

**Table II.**

The analysis of the pharmaceutical dosages of *Aggrenox*<sup>®</sup> using the proposed method ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ).

Pharmaceutical dosage	Declared amount (mg)	Determined amount (mg)		Recovery (%)	
		DPV	SWV	DPV	SWV
<i>Aggrenox</i> <sup>®</sup>	200	$191.5 \pm 9.6$	$193.3 \pm 8.7$	95.8	96.6

Table III presents the results of DIP determination in both model human urine samples with satisfactory recovery values revealing the good accuracy of the presented method.



**Fig. 3.** DPV records of analysis of the model human urine sample of volunteer 1 spiked with 1.30  $\mu\text{M}$  DIP and evaluated using standard addition method in BR buffer (pH 3.0) on the miniaturized BDDE. The corresponding standard additions (SA): 100, 200 and 300  $\mu\text{L}$  ( $C_{\text{DIP}} = 0.1 \text{ mM}$ ). The graphical evaluation of DIP quantification by standard addition in the inset.

**Table III.**

The analysis of spiked human urine samples using the proposed method ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ ).

Volunteer	Expected concentration ( $\mu\text{M}$ )	Determined amount ( $\mu\text{M}$ )		Recovery (%)	
		DPV	SWV	DPV	SWV
V1	1.30	$1.32 \pm 0.10$	$1.28 \pm 0.12$	101.5	98.5
V2	1.30	$1.38 \pm 0.17$	$1.25 \pm 0.15$	106.2	96.2

### Conclusions

In this work, the miniaturized BDDE in combination with DPV and SWV techniques was applied for the first time within the novel voltammetric protocol for the direct DIP determination in the pharmaceutical dosages and human urine samples. The developed method was sufficiently selective with no significant effect of uric acid as the most known urinary compound. Moreover, the determination of DIP in the pharmaceutical tablets and spiked human urine samples was successfully applied with good recoveries without any tedious extraction procedures. The proposed methodology with the miniaturized BDD electrode is simple, rapid and can be a good analytical alternative to complex and expensive ones reported in previous papers.

### Acknowledgments

This work has been supported by the National Scholarship Programme of the Slovak Republic for the Support of Mobility of Students, PhD Students, University Teachers, Researches and Artist and the Grant Agency of the Slovak Republic (grant No. 1/0489/16).

### References

1. Darbar D., Gillespie N., Main G., Bridges A.B., Kennedy N.S.J., Pringle T.H., Mcneill G.P.: *Am. J. Cardiol.* **78**, 736 (1996).
2. Nielsen-Kudsk F., Pedersen A.K.: *Acta Pharmacol. Toxicol.* **44**, 391-399 (1979).
3. Švorc L., Borovská K., Cinková K., Stanković D.M., Planková A.: *Electrochim. Acta.* **251**, 621 (2017).
4. Pysarevska S., Dubenska L., Plotycya S., Švorc L.: *Sens. Actuators B* **270**, 9 (2018).
5. Švorc L., M. Haššo M., Sarakhman O., Kianičková K., Stanković D.M., Otfisal P.: *Microchem. J.* **142**, 297 (2018).
6. Sarakhman O., Pysarevska S., Dubenska L., Stanković D.M., Otfisal P., Planková A., Švorc, L.: *J. Electrochem. Soc.* **166**, B1-B8 (2019).



## Electrochemical Investigation of Polylactic Acid/Carbon Black Composite Filament for the Manufacture of 3D Printed Electrodes

Táňa Sebechlebská<sup>a,b</sup>, Eva Vaněčková<sup>a</sup>, Violetta Shestivska<sup>a</sup>, and Viliam Kolivoška<sup>a</sup>

<sup>a</sup> J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: tana.sebechlebska@jh-inst.cas.cz

<sup>b</sup> Department of Physical and Theoretical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská Dolina, Ilkovičova 6, 84215 Bratislava 4, Slovakia

### Abstract

Fused deposition modeling 3D printing has recently attracted increasing attention as an inexpensive, fast, reliable, adaptable and environmentally friendly tool to fabricate electrodes and electrochemical cells from composites of thermoplastics and carbon nanostructures. In this work, we use electric conductance measurements and cyclic voltammetry employing  $\text{Ru}(\text{acac})_3^{0/1+}$  as an electroactive probe to demonstrate that commercial polylactic acid(PLA)/carbon black composite filaments may be readily used as functional working electrodes in aqueous electrolytes. We further devise a procedure that leads to an improvement of their electrochemical performance. Characteristics of composite filaments treated by the optimized procedure approach those of classical metallic electrodes.

**Key words:** 3D printed electrodes, Fused deposition modeling, Polylactic acid, Carbon black, Conductive polymers, Electrochemical activation, Electric conductance, Electroactive probe.

### Introduction

3D printing is a family of approaches that manufacture solid objects in a layer-by-layer fashion<sup>1</sup>. Recent advancements in the field have allowed building objects from domains with tunable mechanical<sup>2</sup> and electrical<sup>3</sup> properties. Technologies of 3D printing have found scientific applications involving medicine<sup>5</sup>, aerospace<sup>5</sup>, and sensing<sup>6</sup>. First attempts to use 3D printing in electrochemical applications have focused on prototyping reaction vessels to be used as less expensive and more adaptable alternatives to conventionally used glass electrochemical cells. Proposed designs involve cells for electrolysis<sup>7</sup>, electrosynthesis<sup>8</sup>, spectroelectrochemistry<sup>9</sup>, electroanalysis<sup>10</sup>, and photoelectrocatalysis<sup>11</sup>. The introduction of selective laser melting (SLM) and sintering (SLS) 3D printing techniques, in which metallic objects are formed by fusing fine powder particles locally melted or sintered by a laser beam, enabled direct manufacture of metallic electrodes. Such fabricated stainless steel electrodes found applications in water electrolysis<sup>12</sup>, construction of complex flow reactors<sup>13</sup> and electroanalytical sensing of phenols<sup>14</sup>, heavy metal ions<sup>15</sup>, biomarkers<sup>16</sup>, and nucleic acids<sup>17</sup>. As SLM and SLS techniques are expensive and experimentally challenging, alternative approaches to manufacture conductive electrodes via 3D printing have been searched for. Fused deposition modeling (FDM) is the cheapest and most widespread 3D printing technology based on the extrusion of a molten thermoplastic material through a nozzle<sup>1</sup>. Blending thermoplastic materials with sufficient amount of conductive phases has recently allowed functional electrodes to be printed by the FDM technique<sup>3</sup>. Commercially available polylactic acid (PLA)/graphene composites have been employed to print electrodes for applications involving electroanalytical sensing<sup>18-21</sup>, flow cells<sup>22</sup>, lithium ion batteries<sup>23</sup>, and supercapacitors<sup>24</sup>. Electrodes were inspected by cyclic voltammetry employing reversible one-electron couples as electroactive probes. Obtained peak-to-peak separation of faradaic maxima served as a signature of the kinetic hindrance for the charge transfer between the composite electrode and the electroactive probe. Cardoso et al.<sup>19</sup> obtained the value of 120 mV for unmodified PLA/graphene composites employing  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  couple as the

electroactive probe. Dos Santos et al.<sup>21</sup> employed the same probe to inspect the effect of the electrochemical reductive pretreatment of electrodes and obtained values between 180 and 220 mV. Browne et al.<sup>18</sup> employed  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  couple to evaluate the performance of electrodes upon their electrochemical oxidative pretreatment and achieved the best value of 170 mV. O'Neil et al.<sup>22</sup> employed  $\text{FcCH}_2\text{OH}/\text{FcCH}_2\text{OH}^+$  (Fc = ferrocene) couple to obtain so far the best value of 110 mV for untreated electrodes. All abovementioned values are higher than that characteristic for metallic and pure carbon electrodes (60 mV) indicating that PLA/graphene composites show kinetic hindrance which is most likely related to limited exposure of the graphene phase to the electrode/electrolyte interface.

In this work, we investigate properties of electrodes fabricated from commercially available conductive filaments based on the PLA/carbon black composite as an alternative to PLA/graphene filaments with the aim of achieving superior electrochemical performance. We devise and optimize a simple pretreatment based on the electrochemical oxidation of the PLA/carbon black filament and inspect such modified electrodes by cyclic voltammetric measurements in electrolytes containing  $\text{Ru}(\text{acac})_3^{0/1+}$  as the electroactive probe. The peak-to-peak separation of faradaic maxima of 80 to 90 mV was obtained upon optimizing the pretreatment, which is close to the value characteristic for metals. We further demonstrate that the suggested pretreatment leads to the enhancement of the faradaic response magnitude.

### Experimental part

MilliQ deionized water (Millipore, France, minimum electric resistivity 18.2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ , maximum 3 ppb total organic carbon) was used throughout all experiments.

PLA/carbon black composite filament (Proto-Pasta, 1.75 mm in diameter) was purchased from Protoplant Inc., USA. Its intrinsic electric resistance was determined by impedance spectroscopy measurements (Metrohm potentiostat, Autolab) under ambient conditions as follows. One end of the Proto-Pasta filament was connected to the potentiostat as working electrode (WE), while the other end was connected as interlinked reference (RE) and counter (CE) electrode. The distance between connections was varied from 10 cm to 50 cm in increments of 10 cm. For each distance, an impedance spectrum was obtained in the frequency range from  $10^5$  Hz to  $10^0$  Hz employing the AC amplitude of 5 mV with no DC offset between the WE and the RE. The resistance values were extracted graphically from respective Nyquist impedance plots.

Electrodes to be characterized by cyclic voltammetric measurements were formed by cutting the Proto-Pasta filament into pieces of length amounting to 4.0 cm. They were either inspected directly without modification or were pretreated by the electrochemical oxidation as follows. The respective piece of the filament was immersed by 2.0 cm into aqueous  $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Suprapure, 99.99 %, Merck) electrolyte as the anode in one arm of the glass U-tube cell (Figure 1A), while a gold wire was placed in the other arm served as the cathode. The electrodes were connected to a DC power supply (Aritma, Czech Republic) and constant voltage of 4.5 V (the value corrected for Ohmic voltage drop determined ex post by electrochemical impedance spectroscopy measurements) was applied to the cell for varied time. Such modified electrodes were briefly rinsed with de-ionized water and immediately inspected as WEs by cyclic voltammetry.

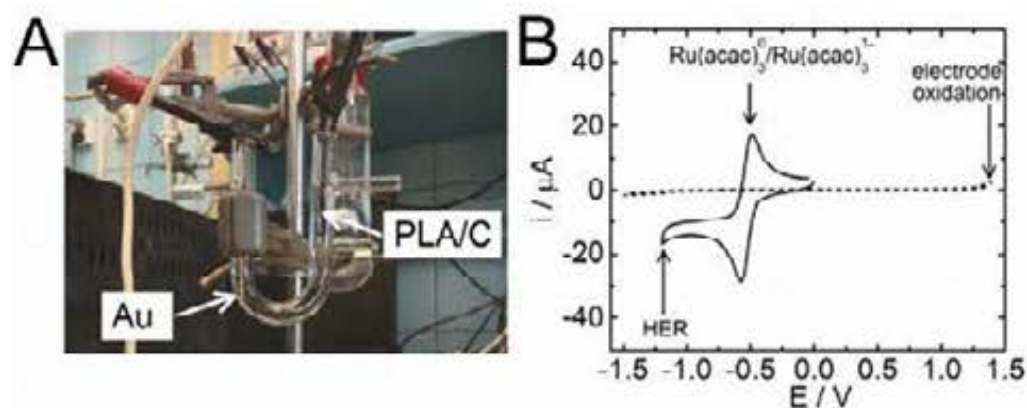
All cyclic voltammetric measurements were performed in an all-glass three-electrode air-tight cell filled with deaerated aqueous  $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SO}_4$  solution serving as the supporting electrolyte. In selected experiments,  $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  of  $\text{Ru}(\text{acac})_3$  (97 %, Aldrich) was

introduced to the system as the electroactive probe. The WE was immersed to the electrolyte by height of 1.2 cm (geometric area of 0.66 cm<sup>2</sup>). A gold wire served as the CE and the (quasi) RE. The CE was placed behind a glass frit to avoid interferences caused by electrogenerated reaction products<sup>25</sup>. All cyclic voltammetric measurements were performed in the true analog linear potential scan regime (Metrohm potentiostat, Autolab) employing positive feedback electronics to compensate for ohmic voltage losses due to the electrolyte resistance and the intrinsic resistance of the WE.

## Results and discussion

The measured electric resistance of the PLA/carbon black composite filament was found to be perfectly proportional to the distance between contacts (results not shown). The regression analysis leads to the specific resistance value of 260 Ω cm<sup>-1</sup> (for the filament of 1.75 mm diameter), which falls into the range of values stated by the manufacturer (200 to 300 Ω cm<sup>-1</sup>). The cyclic voltammogram obtained at the interface of unmodified composite electrode and deaerated 0.3 mol.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> supporting electrolyte shows no faradaic features in the potential region between -1.1 V and + 1.3 V (dashed line in Figure 1B). At the anodic side, this range is limited by the onset of the electrode oxidation, while the hydrogen evolution reaction (HER) sets in beyond the cathodic limit. Electrodes subjected to the electrochemical oxidative pretreatment show an additional broad feature centered at ≈ -1 V in the first cathodic potential scan (cyclic voltammogram not shown) that pertains to the reduction of oxidized carbon black electrogenerated in the course of the anodic pretreatment. All subsequent potential scans show voltammetric responses possessing features similar to those obtained for untreated electrodes (dashed line).

Upon introducing the Ru(acac)<sub>3</sub> as electroactive probe into the electrolyte bulk, cyclic voltammograms of both untreated and electrochemically oxidized electrodes show a distinct pair of faradaic maxima. As an example, a cyclic voltammogram obtained for the electrode oxidized for t = 10 s is depicted by the solid line in Figure 1B.

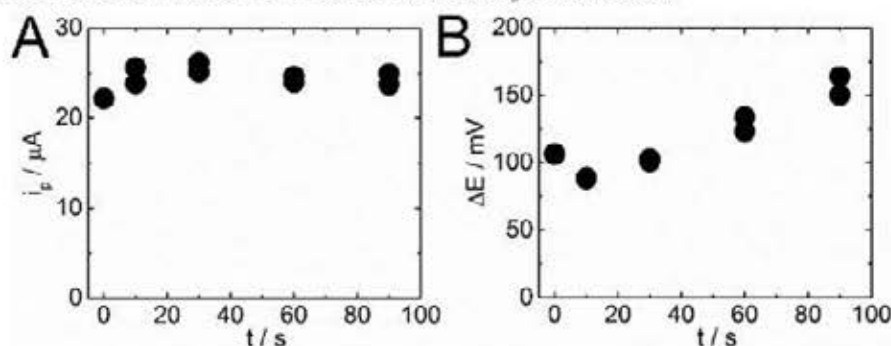


**Fig. 1.** A photograph of the apparatus used for the pretreatment of PLA/carbon black filaments (A). (B) Cyclic voltammograms obtained at the interface of untreated electrode and deaerated 0.3 mol.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> electrolyte (dashed line) and electrochemically oxidized electrode (t = 10 s) upon introducing 5.0 × 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> Ru(acac)<sub>3</sub> as the electroactive probe.

Figure 2A shows the average of cathodic and anodic faradaic peak currents (total peak currents corrected for their respective capacitance contributions) obtained from cyclic voltammograms as a function of the pretreatment time. Figure 2B shows the peak-to-peak separation obtained as the potential difference of anodic and cathodic peak currents. Importantly, the magnitude of the total resistance between the WE and the RE was determined

by the electrochemical impedance spectroscopy before each cyclic voltammetric run and was further used as an input parameter for feedback electronics to compensate for ohmic voltage drop. The obtained peak-to-peak separation thus reflects only the kinetic hindrance for the charge transfer between the electrode and the electroactive probe.

The faradaic response magnitude of electrochemically pretreated electrodes is higher compared to that of unmodified electrodes. This suggests that the electrochemical oxidation pretreatment increases the exposure of the conductive carbon black phase to the electrode/electrolyte interface. Values of the peak-to-peak separation obtained for pretreatment time 10 s to 30 s are lower than that obtained for the unmodified electrode. This suggests that the pretreatment step not only increases the effective interfacial area, but also suppresses the kinetic hindrance for the charge transfer. On the other hand, longer pretreatment times lead to an increase of the kinetic hindrance accompanied with a slight decrease in the faradaic response magnitude. This indicates that a prolonged exposure of electrodes to anodic potentials causes that the carbon black phase is either oxidatively decomposed or detached from the electrode/electrolyte interface.



**Fig. 2.** The average of cathodic and anodic faradaic peak currents (A) and peak-to-peak separation of faradaic maxima (B) as a function of the pretreatment time.

### Conclusion

We investigated cyclic voltammetric response of untreated and electrochemically oxidized electrodes fabricated from commercially available conductive filaments based on the PLA/carbon black composite. The electrochemical pretreatment proposed in this work was found to increase the faradaic response magnitude, which was ascribed to an increased exposure of the conductive carbon black phase to the electrode/electrolyte interface. The pretreatment further decreased the peak-to-peak separation of faradaic maxima suppressing thus the kinetic hindrance for the charge transfer between the electrode and the electroactive probe. The peak-to-peak separation of 80 to 90 mV was achieved upon optimizing the pretreatment. This value is closer to the value characteristic for metals and pure carbon electrodes (60 mV) than values for PLA/graphene composites reported in the literature (110 to 220 mV). Both untreated and electrochemically oxidized electrodes will be further inspected by conductive probe atomic force microscopy<sup>26, 27</sup> to explore their morphology at the nanoscale. Electrodes will be subsequently modified with copper by electroplating to serve as electrocatalytical surfaces for the electrochemical reduction of ambient carbon dioxide.

### Acknowledgements

Support from Czech Science Foundation (18-09848S) is gratefully acknowledged.

## References

1. Ngo T. D., Kashani A., Imbalzano G., Nguyen K. T. Q., Hui D.: *Compos. Part B-Eng.* **143**, 172 (2018).
2. Lopes L. R., Silva A. F., Carneiro O. S.: *Addit. Manuf.* **23**, 45 (2018).
3. Kwok S. W., Goh K. H. H., Tan Z. D., Tan S. T. M., Tjiu W. W., Soh J. Y., Ng Z. J. G., Chan Y. Z., Hui H. K., Goh K. E. J.: *Appl. Mater. Today* **9**, 167 (2017).
4. Liaw C. Y., Guvendiren M.: *Biofabrication*, **9**, 024102 (2017).
5. Liu R., Wang Z., Sparks T., Liou F., Newkirk J.: *Laser Additive Manufacturing*. Elsevier Science & Technology, Cambridge 2017.
6. Ni Y., Ji R., Long K., Bu T., Chen K., Zhuang S.: *Appl. Spectrosc. Rev.* **52**, 623 (2017).
7. Chisholm G., Kitson P. J., Kirkaldy N. D., Bloor L. G., Cronin L.: *Energy Environ. Sci.* **7**, 3026 (2014).
8. Guima K.-E., Alencar L. M., da Silva G. C., Trindade M. A. G., Martins C. A.: *ACS Sustainable Chem. Eng.* **6**, 1202 (2018).
9. Achilli E., Minguzzi A., Visibile A., Locatelli C., Vertova A., Naldoni A., Rondinini S., Auricchio F., Marconi S., Fracchia M., Ghigna P.: *J. Synchrotron Rad.* **23**, 622 (2016).
10. Bishop G. W., Satterwhite J. E., Bhakta S., Kadimisetty K., Gillette K. M., Chen E., Rusling J. F.: *Anal. Chem.* **87**, 5437 (2015).
11. Mousset E., Weiqi V. H., Kai B. F. Y., Koh J. S., Tng J. W., Wang Z., Lefebvre O.: *J. Mater. Chem. A* **5**, 24951 (2017).
12. Ambrosi A., Pumera M.: *ACS Sustainable Chem. Eng.* **6**, 16968 (2018).
13. Arenas L. F., Ponce de León C., Walsh F. C.: *Electrochem. Commun.* **77**, 133 (2017).
14. Cheng T. S., Nasir M. Z. M., Ambrosi A., Pumera M.: *Appl. Mater. Today* **9**, 212 (2017).
15. Lee K. Y., Ambrosi A., Pumera M.: *Electroanalysis* **29**, 2444 (2017).
16. Ho E. H. Z., Ambrosi A., Pumera M.: *Appl. Mater. Today* **12**, 43 (2018).
17. Loo A. H., Chua C. K., Pumera M.: *Analyst.* **142**, 279 (2017).
18. Browne M. P., Novotný F., Sofer Z., Pumera M.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 40294 (2018).
19. Cardoso R. M., Mendonça D. M. H., Silva W. P., Silva M. N. T., Nossol E., da Silva R. A. B., Richter E. M., Muñoz R. A. A.: *Anal. Chim. Acta*, **1033**, 49 (2018).
20. Palenzuela C. L. M., Novotný F., Krupička P., Sofer Z., Pumera M.: *Anal. Chem.* **90**, 5753 (2018).
21. dos Santos P. L., Katic V., Loureiro H. C., dos Santos M. F., dos Santos D. P., Formiga A. L. B., Bonacin J. A.: *Sens. Actuator. B-Chem.* **281**, 837 (2019).
22. O'Neil G. D., Ahmed S., Halloran K., Janusz J. N., Rodriguez A., Rodriguez I. M. T.: *Electrochem. Commun.* **99**, 56 (2019).
23. Foster C. W., Down M. P., Zhang Y., Ji X., Rowley-Neale S. J., Smith G. C., Kelly P. J., Banks C. E.: *Sci. Rep.* **7**, 42233 (2017).
24. Foo C. Y., Lim H. N., Mahdi M. A., Wahid M. H., Huang N. M.: *Sci. Rep.* **8**, 7399 (2018).
25. Kolivoška V., Mohos M., Pobelov I. V., Rohrbach S., Yoshida K., Hong W. J., Fu Y. C., Moreno-Garcia P., Mészáros G., Broekmann P., Hromadová M., Sokolová R., Valášek M., Wandlowski T.: *Chem. Commun.* **50**, 11757 (2014).
26. Mohos M., Pobelov I. V., Kolivoška V., Mészáros G., Broekmann P., Wandlowski T.: *J. Phys. Chem. Lett.* **5**, 3560 (2014).
27. Pobelov I. V., Mohos M., Yoshida K., Kolivoška V., Avdic A., Lugstein A., Bertagnolli E., Leonhardt K., Denuault G., Gollas B., Wandlowski T.: *Nanotechnology* **24**, 115501 (2013).

# Voltammetric Determination of Chili Peppers Pungency using Phospholipid Modified Glassy Carbon Electrode (Voltametrické stanovení pálivosti chilli paprik na elektrodě ze skelného uhlíku modifikované fosfolipidy)

Jana Skopalová <sup>a</sup>, Andrea Rajcová <sup>a</sup>, Šárka Vokounová <sup>b</sup>, and Tomáš Navrátil <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Palacky University, Faculty of Science, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic.

<sup>b</sup> Charles University, Faculty of Physical Education and Sport, José Martího 31, 162 52 Prague 6, Czech Republic

<sup>c</sup> J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: navratil@jh-inst.cas.cz

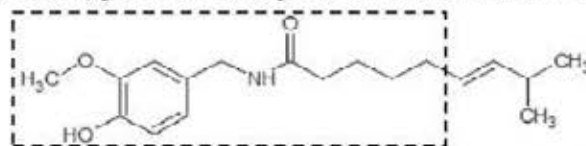
## Abstract

The aim of this study was to develop a simple method for evaluation of the pungency in chili peppers with a glassy carbon electrode modified using phospholipid membrane prepared from asolectin. For these purposes cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) have been used. A few different methods have been tested: direct method, transfer method on unmodified and modified electrode, using standard addition method as well as calibration curve method. A statistically significant correlations with the results of the reference HPLC method have been found in case of voltammetric methods, especially in DPV with asolectin modified electrode.

**Key words:** Capsaicin, Glassy carbon electrode, Asolectin-modified electrode, Voltammetry, Electrochemistry, Chili peppers.

## Úvod

Kapsaicin je přírodní alkaloid vyskytující se v plodech chilli paprik, které patří k nejdůležitějším a nejrozšířenějším kořením. Za jejich popularitou stojí významné organoleptické vlastnosti (typická pálivá chuť), antioxidační či antimikrobiální účinky. Pálivost chilli paprik je hlavním důvodem jejich konzumace a z pohledu konzumenta představuje jednu z jejich nejdůležitějších charakteristik. Od toho se proto odvozuje potřeba tuto charakteristiku kvantifikovat. Míra pálivosti přímo souvisí s obsahem kapsaicinu a jemu podobných látek (kapsaicinoidů) v paprikách. Kromě potravinářství nachází kapsaicin své užití i v lesnictví (zemědělství) jako ochrana před okusem stromů zvěří <sup>1</sup>.



**Schéma 1:** Struktura kapsaicinu. Čárkovaná část: Společná pro všechny kapsaicinoidy.

Nejčastěji využívanou metodou pro stanovení jejich obsahu je vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) <sup>2-4</sup> nebo průtoková injekční analýza <sup>5</sup>. Ve většině případů je detekce prováděna elektrochemicky na modifikovaných <sup>6,7</sup> či nemodifikovaných elektrodách <sup>8</sup>.

Základem pro elektrochemické stanovení je v kapsaicinoidech přítomné oxidovatelné *o*-metoxyfenylové jádro. Z hlediska struktury se jedná o amidy vznikající enzymatickou kondenzací mastných kyselin (C9 - C11) a vanilylamínu. Strukturní rozdíly mezi jednotlivými kapsaicinoidy vyplývají z různé délky alkylového řetězce a z přítomnosti resp. nepřítomnosti

dvojnásobné vazby. Mezi nejvýznamnější přírodně se vyskytující kapsaicinoidy patří kapsaicin, dihydrokapsaicin, nordihydrokapsaicin, homodihydrokapsaicin a homokapsaicin, přičemž největší procentuální zastoupení mají kapsaicin 69% a dihydrokapsaicin 22%<sup>7</sup>.

Základní vlastností, která umožnila akumulaci kapsaicinoidů na asolectinem modifikované elektrodě, byla jejich rozpustnost ve fosfolipidech (PL). Transport látek přes PL membránu (PLM) hraje významnou roli v životě všech buněk<sup>9-16</sup> a v našem případě umožnil akumulaci analytu, obdobně, jak tomu bylo v případě extrakce pomocí micel<sup>17</sup>. Výsledky realizovaných měření byly využity pro stanovení kapsaicinu a jeho analogů v chilli paprikách a aromatických přípravcích obsahujících jejich extrakty.

## Experimentální část

### *Přístroje*

Elektrochemická měření metodou stejnosměrné voltametrie (DCV) nebo diferenční pulsní voltametrie (DPV) byla realizována na přístrojích Eco-Tribo polarograf (Polar-Sensors, ČR) se softwarem Polar 4.1 a Autolab PGSTAT128N (Metrohm Autolab, Nizozemsko) se softwarem NOVA 1.10 a 1.11. Pro elektrochemické experimenty bylo použito tříelektrodové zapojení se elektrodou na bázi skelného uhlíku (GCE, Bioanalytical Systems, USA) jako pracovní elektrodou, Ag/AgCl/1M KCl (Monokrystaly, ČR) jako referenční elektrodou a platinovým drátkem (resp. platinovým plíškem, 1 cm<sup>2</sup>) jako pomocnou elektrodou. Při úpravě pH Brittonova-Robinsonova (BR) pufru byl využit pH metr inoLab 720 s kombinovanou skleněnou elektrodou SenTix 41 (vše WTW, Německo).

### *Chemikálie a roztoky*

Standardní roztok kapsaicinu 10<sup>-3</sup> mol/l (resp. 10<sup>-2</sup> mol/l) byl připraven z kapsaicinu rozpuštěním alikvótní navážky kapsaicinu (≥ 95% from *Capsicum sp.*, Sigma – Aldrich, USA) v methanolu (Penta-Švec, ČR). Fosfolipidová membrána byla připravována z asolectinu (fosfatidylcholin ~25 %, Fluka, Švýcarsko).

Byly testovány následující vzorky obsahující kapsaicin: Madras chilli (prášek, mleté chilli); sušený koží roh; Habanero (výtažek z chilli Habanero žluté); Naga Jolokia (výtažek z chilli Naga Jolokia); Carolina Reaper (prášek, mleté chilli) a Habanero (prášek, mleté chilli).

### *Příprava nemodifikované elektrody na měření*

GCE byla před každým měřením opláchnuta destilovanou vodou a následně mechanicky vyleštěna na lešticí tkanině pomocí suspenze aluminu (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, <50 nm, Sigma-Aldrich, ČR) v destilované vodě. Takto vyčištěná elektroda byla sonikována po dobu 1 minuty v destilované vodě a pak znovu opláchnuta destilovanou vodou.

### *Příprava fosfolipidové membrány na povrchu GCE a její odstraňování*

Nejprve byla mechanicky očištěná GCE elektrochemicky aktivována. Voltametrická cela se naplnila roztokem chloridu sodného (9 g/l) a na pracovní GCE bylo po dobu 3 minut vkládáno napětí 1,5 V. Následně byla elektroda opláchnuta destilovanou vodou a vysušena proudem dusíku. Na takto připravenou elektrodu bylo nanášeno 5 μl roztoku asolectinu v hexanu (3 mg/ml) a elektroda byla ponořena do roztoku chloridu sodného na dobu 30 min<sup>18</sup>. Kvalita pokrytí PLM byla testována pomocí cyklické voltametrie v roztoku ferrokyanidu draselného (10<sup>-3</sup> mol/l) s těmito parametry: Počáteční potenciál  $E_{in} = -400$  mV, konečný potenciál  $E_{fin} = +700$  mV, rychlost scanu  $v = 50$  mV/s. Důkazem kompletního pokrytí PLM elektrody byla absence signálů odpovídajících ferro/ferrikyanidu.

Odstraňování PLM z povrchu GCE bylo prováděno postupným sonikováním v hexanu, methanolu a vodě, vždy po dobu 5 minut. Pak byl povrch GCE vyleštěn na lešticí tkanině se suspenzí aluminy, opláchnut vodou a GCE byla sonikována ve zkumavce s destilovanou vodou v ultrazvukové lázni po dobu 1 minuty.

#### *Akumulace kapsaicinu na povrchu GCE*

Před akumulací byla GCE elektroda, ať už nemodifikovaná nebo modifikovaná PLM, jemně opláchnuta ponořením do destilované vody. Následně byla na 1 minutu ponořena do extraktu chilli papriky míchaného na magnetické míchače. Po akumulaci byla elektroda opět jemně opláchnuta ponořením do destilované vody a byla připravena k měření.

#### *Voltametrické metody stanovení kapsaicinu*

Všechna voltametrická měření probíhala v dvoudílné nádobce, kde ve vnější části byl BR pufr (pH 2) a vlastní měření probíhalo v nádobce s vycorovou fritou (měření v malých objemech). Vzorby byly analyzovány pomocí DCV a DPV. Pro účely měření byly aplikovány 3 metody <sup>7</sup>:

**A. Přímá metoda:** K navážce 100 mg vzorku chilli papriky byly přidány 2 ml ethanolu, následovala 30minutová macerace a 15minutová sonikace při teplotě 40 °C <sup>19</sup>. Extrakty byly zfiltrány přes teflonový filtr. Do malé měrné nádoby bylo odměřeno 500 µl BR pufru o pH 2 a 450 µl ethanolu (základní elektrolyt) a do něj bylo přidáno 50 µl extraktu papriky. Stanovení bylo provedeno metodou standardního přidavku (20 µl standardního roztoku 10<sup>-3</sup> mol/l kapsaicinu). Parametry DPV metody:  $E_{in}=+100$  mV,  $E_{fin}=+1000$  mV,  $v = 20$  mV/s, výška pulzu 50 mV, šířka pulzu 80 ms.

**B. Transferová metoda na nemodifikované elektrodě:** Do vialky bylo naváženo 20 mg vzorku chilli papriky, přidán 1 ml ethanolu, následovala macerace (30 minut) a sonikace (15 min při teplotě 40 °C). Nakonec byly přidány 4 ml destilované vody. Do tohoto extraktu byla na 1 minutu ponořena čistá pracovní elektroda ze skelného uhlíku. Po akumulaci byla opláchnuta ponořením do destilované vody a vložena do malé voltametrické nádoby a provedeno měření. Parametry DPC metody:  $E_{in}=+300$  mV,  $E_{fin}=+1000$  mV,  $v = 100$  mV/s. Parametry DPV metody byly stejné jako v případě A. Po každém měření se GCE očistila na lešticí tkanině se suspenzí aluminy a vyměnil se elektrolyt v malé nádobce s fritou.

**C. Transferová metoda na modifikované elektrodě:** Postup byl analogický s bodem B) s tím rozdílem, že do míchaného extraktu byla na 1 minutu ponořena GCE modifikovaná PLM. Po akumulaci následovalo jemné opláchnutí elektrody ponořením do destilované vody tak, aby se nepoškodila fosfolipidová membrána. Po měření bylo potřeba vyměnit elektrolyt v malé nádobce a vyčistit PLM od naakumulovaného kapsaicinu ponořením elektrody na 10 min do destilované vody.

#### *Extrakce kapsaicinu pro HPLC stanovení*

K navážce 100 mg vzorku chilli papriky byly přidány 2 ml ethanolu, následovala macerace po dobu 30 min. a 15minutová sonikace při teplotě 40 °C <sup>19</sup>. Extrakt se zfiltroval přes teflonový filtr. K 600 µl zfiltrovaného extraktu se přidalo 400 µl ethanolu a 1 ml mobilní fáze. K dalšímu podílu 600 µl extraktu se přidalo 350 µl ethanolu, 50 µl roztoku standardu kapsaicinu (10<sup>-3</sup> mol/l) a 1 ml mobilní fáze. Takto připravené roztoky byly použity pro srovnávací HPLC stanovení obsahu kapsaicinu metodou standardního přidavku <sup>7</sup>. HPLC analýza byla provedena na přístroji ECOM s UV detektorem Sapphire 800 při vlnové délce 222 nm. K separaci byla použita kolona Kinetex C18 (2,6 µm, 100 Å). Mobilní fáze obsahovala 40 % acetonitrilu a 60 % vody s 0,1% kyselinou mravenčí a analýza probíhala při izokratické eluci. Objem nástřiku byl 20 µl a rychlost průtoku byla nastavena na 0,4 ml/min <sup>7</sup>.



## Výsledky a diskuse

Výsledky získané voltametričným měřením byly porovnány s výsledky získanými HPLC. (v Tab. I - metoda kalibrační křivky, v Tab. 2 metoda standardního přídatku).

### Tabulka I.

Koncentrace kapsaicinu [g/kg] zjištěné voltametričným a HPLC metodou kalibrační křivky v různých vzorcích paprik (ND – pod mezi detekce)

	HPLC	Metoda B (DPV)	Metoda C (DPV)	Metoda B (DCV)	Metoda C (DCV)
Naga Jolokia (výtažek)	1.3	4.3	7.6	3.6	5.7
Habanero (výtažek)	0.3	1.4	1.9	0.6	1.4
Sušený kozí roh	1.6	3.3	8.5	4.5	13.2
Madras Chilli (prášek)	0.1	ND	ND	ND	ND
Habanero (prášek)	2.9	1.1	8.5	2.7	10.9
Carolina Reaper (prášek)	8.6	7.4	27.0	17.1	48.2

### Tabulka II.

Koncentrace kapsaicinu [g/kg] zjištěné voltametričným a HPLC metodou standardního přídatku v různých vzorcích paprik (ND – pod mezi detekce)

	HPLC	Metoda A (DPV)	Metoda B (DPV)	Metoda C (DPV)	Metoda B (DCV)	Metoda C (DCV)
Naga Jolokia (výtažek)	3.5	2.8	7.5	2.7	6.9	5.7
Habanero (výtažek)	1.0	8.2	1.3	0.7	0.2	0.8
Sušený kozí roh	4.5	1.9	44.6	3.0	88.2	1.1
Madras Chilli (prášek)	0.2	ND	ND	ND	ND	ND
Habanero (prášek)	11.9	7.6	0.9	7.7	27.9	5.2
Carolina Reaper (prášek)	12.8	31.3	11.1	18.1	60.4	58.4

V důsledku velké biodiverzity se obsah kapsaicinu liší v rámci různých odrůd, ale i jediné odrůdy, a stejně je obsah kapsaicinu odlišný v různých částech jednoho plodu. To je jeden z faktorů, který způsobil velké rozdíly v zjištěných koncentracích kapsaicinu. Dalším významným faktorem je rozdílný princip používaných metod, jak extrakčních, tak analytických. Zatímco HPLC metodou lze oddělit kapsaicin od jiných kapsaicinoidů, pomocí voltametričným metod lze určit sumu všech kapsaicinových analogů. Nejvyšší hodnoty kapsaicinu byly všemi použitými metodami zjištěny ve vzorku chilli papriky Carolina Reaper, která patří k nejpálivějším odrůdám chilli papriky na světě. Pro stanovení nízké koncentrace kapsaicinu nejsou tyto metody vhodné. Vztah mezi výsledky naměřenými metodou HPLC a jednotlivými voltametričným metodami byl vyhodnocen pomocí srovnávací analýzy v programu QC Expert. Výsledky korelační analýzy jsou uvedeny v Tabulce III. Statisticky významné hodnoty korelačních koeficientů jsou vyznačeny tučně. Korelační analýza ukázala statisticky významné korelace mezi metodou HPLC a metodami voltametričným analýzy tam, kde byly výsledky vyhodnocovány metodou kalibrační křivky. Především výsledky měření transferovou metodou na GCE modifikované PLM vykazují silnou korelaci s HPLC ať již při metodě standardního přídatku či kalibrační křivky.

### Tabulka III.

Hodnoty korelačních koeficientů pro výsledky získané voltametričnými metodami (standardního přídatku – MSP a kalibrační křivky – MKK) v porovnání s HPLC. Statisticky významné hodnoty korelačních koeficientů jsou vyznačeny tučně.

Porovnávací metoda	Porovnávaná metoda	Spearmanova korelace MKK	Párová korelace MKK	Spearmanova korelace MSP	Párová korelace MSP
	A (DPV)			0.600	0.717
	B (DPV)	0.600	<b>0.816</b>	0.543	0.028
HPLC	C (DPV)	<b>1.000</b>	<b>0.982</b>	<b>1.000</b>	<b>0.894</b>
	B (DCV)	<b>0.829</b>	<b>0.970</b>	0.498	<b>0.829</b>
	C (DCV)	<b>0.943</b>	<b>0.986</b>	<b>0.829</b>	0.696

### Závěr

Pro stanovení kapsaicinu resp. sumy kapsaicinoidů jako měřítka pálivosti v chilli paprikách a v přípravcích obsahujících extrakty chilli paprik bylo navrženo a testováno několik metod s využitím DPV a DCV na nemodifikované a asolectinem modifikované elektrodě ze skelného uhlíku. Koncentrační hladiny zjištěné transferovou metodou na asolectinem modifikované elektrodě metodou standardního přídatku i kalibrační křivky statisticky významně korelovaly s koncentracemi kapsaicinu stanovenými pomocí HPLC.

### Acknowledgements

J.S. thanks the project of Czech Science Foundation (GAČR No. 17-05387S) and T.N. thanks the project of Czech Science Foundation (GAČR No. 17-03868S) for financial support.

### References

1. Jakl M., Vecková E., Száková J.: *Water, Air, Soil Pollut.* **227**, 399 (2016).
2. Henderson D. E., Slickman A. M., Henderson S. K.: *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2563 (1999).
3. Kachoosangi R. T., Wildgoose G. G., Compton R. G.: *Analyst* **133**, 888 (2008).
4. Zhou Q., Zhu Y. X., Hwa C. A., Yagiz K., Morre D. J., Morre D. A., Janle E., Kissinger P. T.: *Phytochem. Anal.* **15**, 117 (2004).
5. Dejmková H., Morozova K., Scampicchio M.: *J. Electroanal. Chem.* **821**, 82 (2018).
6. Supalkova V., Stavelikova H., Krizkova S., Adam V., Horna A., Havel L., Ryant P., Babula P., Kizek R.: *Acta Chim. Slov.* **54**, 55 (2007).
7. Rajcova A.: MSc. Thesis, Palacký University, Olomouc, 2018.
8. Ziyatdinova G., Kozlova E., Budnikov H., Davletshin R.: *Electroanalysis* **31**, 222 (2019).
9. Sestakova I., Skalova S., Navratil T.: *J. Electroanal. Chem.* **821**, 92 (2018).
10. Sestakova I., Navratil T., Josypcuk B.: *Electroanalysis* **28**, 2754 (2016).
11. Parisova M., Navratil T., Sestakova I., Jaklova Dyrtrtova J., Marecek V.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **8**, 27 (2013).
12. Navratil T., Sestakova I., Marecek V.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **6**, 6032 (2011).
13. Navratil T., Sestakova I., Stulik K., Marecek V.: *Electroanalysis* **22**, 2043 (2010).
14. Novakova K., Navratil T., Jaklova Dyrtrtova J., Chylkova J.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **8**, 1 (2013).
15. Gal M., Sokolova R., Naumowicz M., Hives J., Krahulec J.: *J. Electroanal. Chem.* **821**, 40 (2018).
16. Kocabova J., Kolivoska V., Gal M., Sokolova R.: *J. Electroanal. Chem.* **821**, 67 (2018).
17. Ziyatdinova G. K., Ziganshina E. R., Cong P. N., Budnikov H. C.: *J. Anal. Chem.* **71**, 573 (2016).
18. Svecova H., Souckova J., Pyszkova M., Svitkova J., Labuda J., Skopalova J., Bartak P.: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **116**, 1247 (2014).
19. Benicka S.: RNDr. Thesis, Palacky University, Olomouc, 2018.

## Indirect Detection of DNA Damage at Silver Solid Amalgam Electrodes

Veronika Svitková<sup>a</sup>, Ján Labuda<sup>a</sup>, and Vlastimil Vyskočil<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: veronika.svitkova@stuba.sk

<sup>b</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic, E-mail: vlastimil.vyskocil@natur.cuni.cz

### Abstract

Cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry together with electrochemical impedance spectroscopy were used for an electrochemical study of methylene blue at bare and DNA-modified silver solid amalgam electrode. Methylene blue gave a specific cathodic signal, and this signal is significantly higher at DNA-modified than at unmodified amalgam electrode, which is in correspondence with the changes of charge resistance transfer values obtained from Nyquist plots. The integrity of dsDNA layer was tested indirectly using differential pulse voltammetry of intercalated methylene blue after the previous UV irradiation of the biosensor surface at two different wavelengths. Individual electrochemical signals depend on the time of biosensor incubation in methylene blue, time of the exposure to UV radiation, and selected wavelengths.

**Key words:** Amalgam electrodes, Methylene blue, DNA damage, Electrochemistry.

### Introduction

A variety of different electrochemical strategies have been employed to detect DNA lesion, based on either direct electrochemical response of guanine bases in DNA, or the redox signal of electroactive indicators having specific interactions with DNA<sup>1</sup>. For characterization of the DNA structure, indicators that bind to DNA non-covalently (via intercalation of planar aromatic molecules between base pairs in the DNA duplex<sup>2</sup>) are of special interest.

Methylene blue (MB) can intercalate into dsDNA based on strong electrostatic interaction between MB and the phosphate backbone of dsDNA and possesses a very clear reduction signal at the electrochemical detection, which makes this organic dye one of the first choice as an indicator for the construction of electrochemical DNA sensors<sup>3</sup>.

Amalgam electrodes are being considered as non-toxic alternative analytical tools to traditional mercury electrodes, offering broad negative potential window, high hydrogen overpotential, good mechanical stability, and sufficient sensitivity in determination of various electrochemically active organic compounds<sup>4</sup>.

In this study, the use of MB as the redox active molecule and representative of DNA intercalators provides a highly sensitive way to detect electrochemical changes – increase of the signal after MB intercalation into dsDNA and gradual decrease of the signal with the time of the biosensor irradiation – at a mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode (m-AgSAE). Complex sensor response is based on the cyclic voltammetric (CV) response of MB at a bare electrode, differential pulse voltammetric (DPV) signal of the intercalative indicator MB, and electrochemical impedance spectroscopic (EIS) detection.

The main aim of this study was to develop a sensitive and fast strategy for indirect detection of DNA damage utilizing MB as a signalling molecule and the m-AgSAE as a transducer of the DNA biosensor. Later, the m-AgSAE was used for the first time for the detection of UV-induced DNA damage.

### Experimental

The stock solution of MB ( $c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) was prepared in deionized water and stored in the fridge. The Britton-Robinson buffers (BR;  $0.04 \text{ mol L}^{-1}$ ) and phosphate buffer (PB;  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7.0) were used as supporting electrolytes. A  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  potassium chloride solution (KCl) was used for the activation of the working electrode surface. Low molecular weight salmon sperm double stranded DNA was prepared in PB and stored in the fridge. Deionized water was used to prepare all solutions. All reagents were of p.a. purity grade and were stored in glass vessels at ambient temperature, unless stated otherwise.

Voltammetric and impedimetric measurements were performed with a potentiostat  $\mu$ Autolab III/FRA2 driven by NOVA 1.11 software (Metrohm Autolab, Switzerland). The measurements were carried out using a three-electrode system with a mercury meniscus modified silver solid amalgam working electrode (m-AgSAE), a silver/silver chloride reference electrode ( $\text{Ag/AgCl}$ ,  $3 \text{ mol L}^{-1}$ ), and a platinum auxiliary electrode, all contained in an electrochemical cell with a volume of 10 mL at ambient temperature. UV lamp (P-LAB, Czech Republic) with working wavelengths of 254 nm (UV-C) and 365 nm (UV-A) and radiation power of 15 W was used for the UV irradiation.

The m-AgSAE was prepared by immersing the surface of a polished silver solid amalgam electrode into liquid mercury while stirring and rinsed with deionized water. The surface of the working electrode was activated electrochemically in the KCl solution. Then, an electrochemical regeneration based on switching of the electrode potential between an initial and final regeneration potential took place. The DNA-modified m-AgSAE was prepared by dipping of its surface into DNA solution in PB under stirring. After it, the sensor was washed with deionized water and then used. Surface of the DNA biosensor was exposed to UV radiation for various periods of time from the 1 cm light source distance. Before starting measurements, oxygen was removed from the measured solution by purging with nitrogen.

The electrochemical measurements were carried out in MB solution of a given concentration under conditions as follows: (i) CV using the scan rate of  $20 \text{ mV s}^{-1}$  and the step potential of  $-3 \text{ mV}$ ; (ii) DPV using the modulation amplitude of  $50 \text{ mV}$ , the modulation time of  $100 \text{ ms}$ , the interval time of  $150 \text{ ms}$ , the step potential of  $-3 \text{ mV}$ , and the scan rate of  $20 \text{ mV s}^{-1}$ ; (iii) EIS using the polarization potential of  $-200 \text{ mV}$ , the frequency range from  $0.1$  to  $5000 \text{ Hz}$  ( $51$  frequency steps), and the amplitude of  $10 \text{ mV}$ .

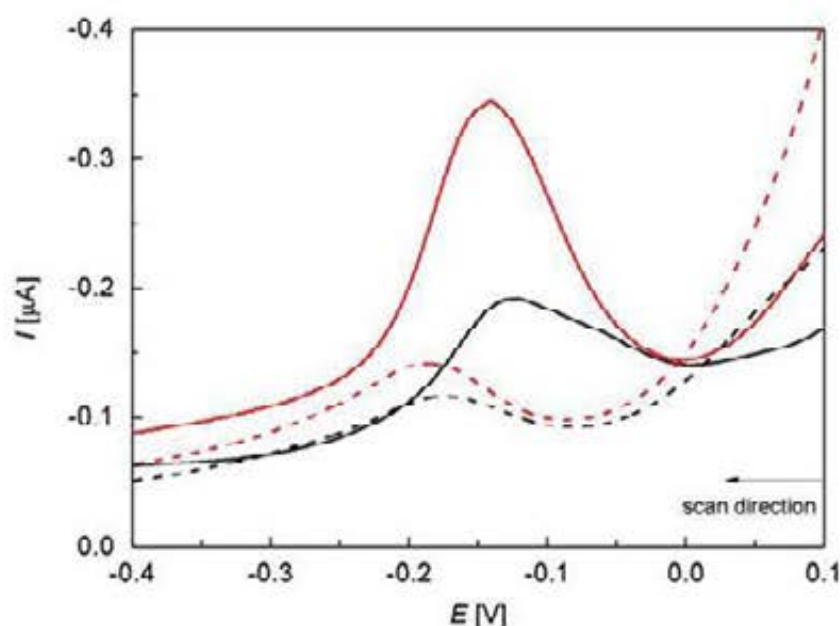
### Results and Discussion

The electrochemical behaviour of MB was investigated by means of CV and DPV firstly at the bare m-AgSAE. The influence of the pH was tested in the BR buffers of pH values varying from 2.0 to 13.0. In the negative potential region, MB gave one well-developed cathodic voltammetric peak over the whole pH region. The cathodic peak potential ( $E_p$ ) was shifted towards more negative values with the pH increasing over the whole pH region. The dependence of the cathodic peak height ( $I_p$ ) of MB varied with pH over the whole pH region but these changes were not so significant. The BR buffer of pH 7.0 was chosen with the respect to the further DNA-MB host-guest interaction study.

Repeated measurements can cause a passivation of the electrode surface. Therefore, appropriate regeneration steps were sought. Various combinations of regeneration potentials, together with values obtained without any regenerating treatment, were tested. In this case, simple purging of the working solution with nitrogen took place in order to overcome a passivation of the electrode surface.

The optimal conditions were used for measuring the calibration dependence in the concentration range of MB from  $1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> to  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> using DPV. The calibration dependence was not fully linear, probably due to the fact that MB was strongly absorbed on the surface of the m-AgSAE.

Electrochemical behaviour of MB at the DNA-modified amalgam electrode was investigated by means of DPV. The measurement was carried out at the DNA/m-AgSAE sensor in the PB (after previous adsorption of MB at the electrode surface) or in the solution of MB itself, to monitor the changes in the intensity of the MB reduction signal (Fig. 1). The sensor was incubated for various times and various concentrations of DNA. The DNA concentration of 0.1 mg mL<sup>-1</sup> and incubation time of 1 min, and the MB concentration of  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> and incubation time of 1 min were found as optimal for the preparation of the DNA-based sensor. Further, EIS measurements took place in order to verify and observe the changes at the electrode surface. The Nyquist plots of MB recorded at the bare and DNA-modified electrode confirmed that the resistance to the electron transfer is significantly higher at the DNA/m-AgSAE compared to the unmodified electrode. This can be in correspondence with the fact that MB is intercalated into the base pairs of dsDNA.



**Fig. 1.** DP voltammograms of MB at the bare (black) and DNA-modified (red) m-AgSAE, recorded in PB in the presence of MB ( $c = 1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) (solid line) or recorded in PB in the absence of MB after previous adsorption of MB on the working electrode surface (dashed line)

Further, DPV and EIS of MB were used to detect and evaluate changes in the DNA layer induced by UV radiation at the DNA/m-AgSAE. Exposure of the DNA biosensor to the day light was used as a control test. The relative change of the MB cathodic peak current and the

relative change of the Nyquist plot indicated damage to DNA represented as a progressive release of the degraded DNA from the biosensor surface. This degradation (DNA damage) became deeper with the time of the exposure of the biosensor surface to UV radiation and was evidently greater for the wavelength of 254 nm than for 365 nm.

### **Conclusions**

Various approaches have been employed to study the interaction between MB and DNA, which usually required chemically modified DNA sequences, highly specialized equipment and, in general, high adsorption time. In the case of amalgam electrodes, there is no need for further electrode surface modification or long times of the DNA adsorption and, therefore, this type of electrode material opens the doors to the development of biosensors for the detection of intercalative processes with a simple, reproducible, and fast methodology.

### **Acknowledgement**

This work was supported by the Scientific Grant Agency VEGA of the Slovak Republic (Project No. 1/0489/16). The financial support from STU Grant Scheme for Support of Young Researchers and STU Grant Scheme for Support of Excellent Teams of Young Researchers is highly acknowledged.

### **References**

1. Paleček E., Bartošik M.: *Chem. Rev.* *112*, 3427 (2012).
2. Fojta M., Daňhel A., Havran L., Vyskočil V.: *TrAC – Trends Anal. Chem.* *79*, 160 (2016).
3. Hua H., Liu Y., Guan X., Li Y.: *Microchim. Acta* *185*, 152 (2018).
4. Bobrowski A., Królicka A., Bobrowski R.: *J. Solid State Electrochem.* *20*, 3217 (2016).

## Effect of Immobilization Methods on Service Life of Tyrosinase Biosensors Developed for Dopamine Monitoring

Milan Šýs, Aneta Hartmanová, and Tomáš Mikysek

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 53210 Pardubice, Czech Republic, E-mail: Milan.Sys@upce.cz

### Abstract

An effect of immobilization methods on service life of tyrosinase amperometric biosensors was studied where dopamine was selected as a model analyte. Three different immobilization methods were tested such as incorporation of enzyme into the electrode material, immobilization using perfluorosulfonic acid polymer Nafion<sup>®</sup> and immobilization of enzyme by covalent bonding with the assistance of cross-linking agent glutaraldehyde. All prepared amperometric tyrosinase biosensors were stored dry in refrigerator at 5°C. Finally, the effect of used immobilization was discussed in details.

**Key words:** Amperometry; Dopamine; Immobilization methods; Storage conditions; Operational stability; Tyrosinase.

### Introduction

Amperometric tyrosinase biosensors as bioanalytical devices can find a wide range of applications in clinical analysis, especially in the diagnosis of serious illnesses. The diagnosis is usually based on monitoring of specific biomarkers in body fluids. Among these biomarkers belong organic compounds of low molecular weight (e.g. neurotransmitters), proteins (hormones, enzymes) and even whole cells (microbial pathogens)<sup>1</sup>. The main question remains why tyrosinase biosensors are not used in the clinical practice and still remain an academic subject of interest. An explanation could be found in their short service life which is usually not longer than several weeks<sup>2-8</sup>. It can be considered that the decrease in catalytic activity is probably caused by several factors such as selection of electrochemical transducer (material of working electrode), biorecognition layer (immobilization method used), storing conditions, presence of oxygen etc. An effect of immobilization methods on service life of tyrosinase amperometric biosensors was studied and discussed.

### Experimental

#### Chemicals

Dopamine hydrochloride, 25% glutaraldehyde (GTA), 5% Nafion<sup>®</sup> in 55% ethanol, lyophilized powder of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase (EC 1.14.18.1), ≥97% and 98% 2-aminoethanethiol hydrochloride (AET) were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Highly purified water (resistivity >18 MΩ cm) was prepared using purification Milli-Q system from Merck Millipore (Darmstadt, Germany) and phosphate salts needed for preparation of 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer solution (PB) were from Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Czech Republic).

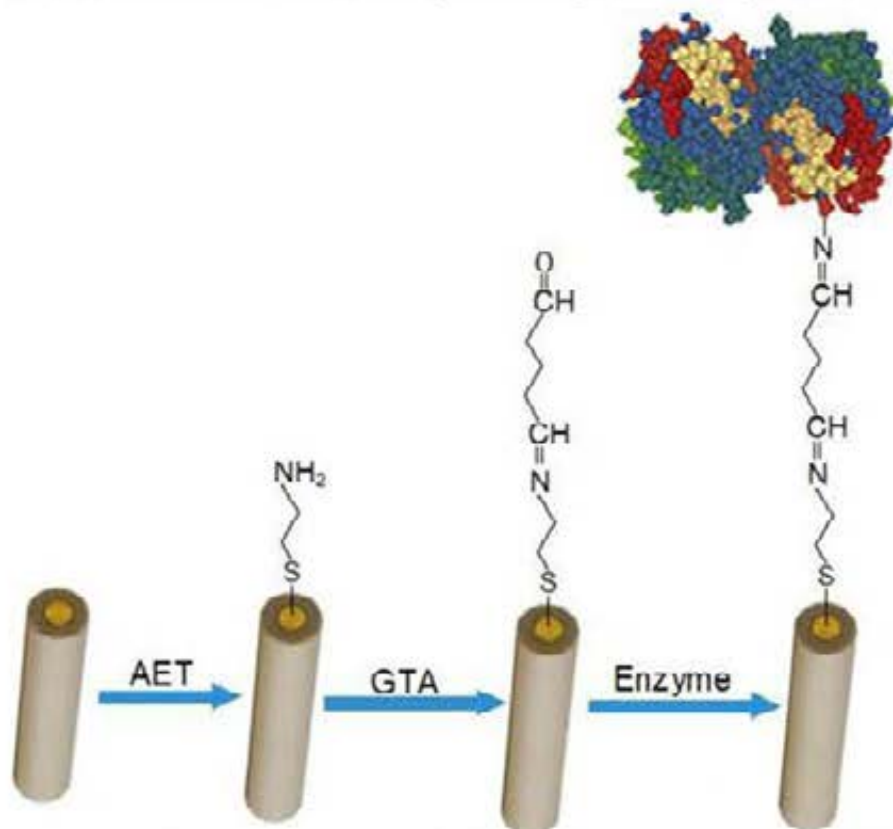
#### Enzyme immobilization

Three different types of immobilization methods were tested. Conventional carbon paste electrode modified with 5% (w/w) tyrosinase enzyme (CPE/Tyr) represents the direct embedding into the electrode material. In this case, 0.4 g graphite powder (particle size >2 μm) from Graphite Týn, spol. s. r. o. (Týn nad Vltavou, Czech Republic), 0.1 g paraffin oil from Merck (Darmstadt, Germany) and 25 mg tyrosinase were homogenized in a ceramic mortar for 20 min. Resultant paste was pressed into cavity (diameter 3 mm) of Teflon<sup>®</sup>

electrode holder. Electrode surface was renovated by polishing with dry paper after each analysis.

The second strategy for immobilization was the enzyme incorporation into Nafion<sup>®</sup> membrane (SPCE/Tyr-GTA/Nafion<sup>®</sup>). A volume of 5  $\mu\text{L}$  of enzyme solution (2.0  $\text{mg mL}^{-1}$ ) in PB was applied onto surface (diameter 2 mm) screen-printed carbon electrode (SPCE) type C-110 from Metrohm DropSens (Llanera, Spain) and allowed to dry under laboratory conditions. Then, individual enzyme molecules were cross-linked by 10  $\mu\text{L}$  addition of 1% GTA. After 20 min, a volume of 15  $\mu\text{L}$  1% Nafion<sup>®</sup> (neutralized by 8 % ammonia solution) was applied directly and allowed to dry under laboratory conditions.

A covalent attachment using cross-linker GTA was used as the last type of immobilization. The gold disk electrode (AuE) of diameter 2 mm was dipped in 10 mM AET solution for 6 hours at 5°C. The modified AuE was washed with deionized water and dried at laboratory conditions. Then, it was immersed into 1% GTA for three hours. Obtained AuE-AET-GTA electrode was transferred into the enzyme solution for one hour (see Fig. 1). Finally, the resulting biosensor (AuE-AET-GTA-Tyr) was washed with redistilled water. Freshly prepared tyrosinase biosensors were stored dry in a refrigerator at temperature 5°C.



**Fig. 1.** Individual steps for the covalent cross-linking of tyrosinase on gold disk electrode.

#### *Instrumentation*

All amperometric measurements were performed in a typical three electrode configuration consisting one type of tyrosinase biosensors (working) Ag/AgCl/3.0  $\text{mol L}^{-1}$  KCl (reference) and Pt wire (auxiliary) electrodes. Resultant setup was always connected to the AUTOLAB PGSTAT101 potentiostat/galvanostat from Metrohm (Prague, Czech Republic), which was operated through Metrohm's NOVA 1.11 software.



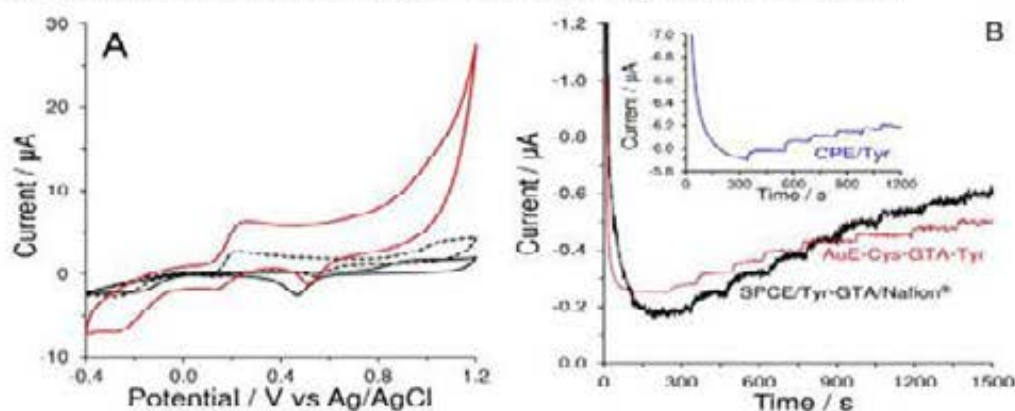
## Methods

As a supporting electrolyte, non-aerated  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7.0 PBS was used for each electrochemical measurement due to optimum tyrosinase biocatalytic activity<sup>2</sup>. To characterize the developed biosensor, cyclic voltammetry of  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  dopamine was carried out under following conditions: potential window from  $-0.4 \text{ V}$  to  $+0.8 \text{ V}$ , potential step of  $2.5 \text{ mV}$ , and scan rate of  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . Amperometric detection (batch configuration) was performed in a conventional glass cell from International Chemistry Co., LTD. (Matsudo-shi, Japan) was usually performed at  $-0.2 \text{ V}$  vs Ag/AgCl/ $3.0 \text{ mol L}^{-1}$  and speed of stirring 400 rpm. Otherwise, any change in the working conditions is described in the legends of the corresponding figures.

## Results and discussion

Each of prepared tyrosinase biosensors was characterized using cyclic voltammetry at scan rate  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . Thus, the low rate of scan rate was intentionally set to monitor biocatalysis. For demonstration purposes, Fig. 2A shows typical cyclic voltammograms of  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  dopamine at bare AuE and AuE-AET-GTA-Tyr biosensor respectively. A reduction peak (at  $+0.1 \text{ V}$ ) of formed dopamine o-quinone (oxidation product) is more intensive in the presence of enzyme than at bare electrode.

In this work, a working potential of amperometric detection was not optimized. A value of  $-0.2 \text{ V}$  was applied in accordance with the literature<sup>2-4</sup>. Calibration measurements from 10 to  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  dopamine (Fig. 2B) were done at tested biosensors always after three days of storage dry in refrigerator at  $5^\circ\text{C}$  to determine the effect of immobilization method used on service life of tyrosinase biosensor. It was found that biosensors based on covalent bonding had a much shorter lifetime than all others<sup>8</sup>. In contrast to this, an immobilization of tyrosinase enzyme using an incorporation in polymer structure have been able to monitor dopamine concentration for time duration longer than two weeks<sup>4,6,7</sup>. A comparison of electrochemical tyrosinase biosensors developed for dopamine monitoring is shown in Tab. I.



**Fig. 2.** Cyclic voltammograms of  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  PB (pH 7.0) (blank; solid black), with  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  dopamine obtained at AuE (dashed black) and at AuE-AET-GTA-Tyr (red) using potential step of  $2.5 \text{ mV}$  and scan rate of  $10 \text{ mV s}^{-1}$  (A) Typical amperograms (batch configuration) obtained at fresh CPE/Tyr (blue), SPCE/Tyr-GTA/Nafion<sup>®</sup> (black) and AuE-AET-GTA-Tyr (red) for several additions of  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  dopamine in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  PB (pH 7.0) at working potential  $-0.2 \text{ V}$  and speed of stirring 400 rpm (B).

In 2013, Vicentini et al., compared the stability of their developed tyrosinase biosensor for monitoring of catechol with the previously reported ones<sup>9</sup>. Surprisingly, they found in

literature that an amperometric tyrosinase biosensor utilizing a polyaniline membrane provided stable current response for 120 days<sup>10</sup>.

**Table I**

Comparison of electrochemical tyrosinase biosensors for dopamine monitoring. Activated carbon (AC); 2-aminoethanethiol (AET);  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD); carbonfiber (CF); cobalt

Biosensors	Storage conditions	Service life	References
Incorporation of tyrosinase into the electrode material (composites)			
CPE/Tyr	dry in refrigerator at 5°C	27.4% after 2 weeks	This work
Immobilization of tyrosinase using polymers			
GCE/Tyr-SWCNTs-Ppy	—	—	[2]
GCE/RGO/ $\beta$ -CD/Tyr/PEI	—	—	[3]
CF-Chit/Tyr/CeO <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub>	in PB of pH 6.5 at 4°C	75.0% after 2 weeks	[4]
AuE/PEDOT-Tyr	in PB of pH 7.5 at 4°C	35.0% after 5 days	[5]
GCE/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Chit-Tyr	dry in refrigerator at 4°C	95.0% after one week	[6]
GCE/AC/Tyr/Nafion <sup>®</sup>	dry in refrigerator at 4°C	80.9% after 15 days	[7]
SPCE/Tyr-GTA/Nafion <sup>®</sup>	dry in refrigerator at 5°C	79.5% after 8 days	This work
Immobilization of tyrosinase by covalent bonding			
AuE/CoP-Tyr	PB in refrigerator at 4°C	50.0% after 9 days	[8]
AuE-AET-GTA-Tyr	dry in refrigerator at 5°C	61.3% after one week	This work

(II)-porphyrin film (CoP); glutaraldehyde (GTA); chitosan (Chit) poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT); polyethylenimine (PEI); polypyrrole (Ppy); reduced graphene oxide (RGO); single-walled carbon nanotubes (SWNTs); tyrosinase (Tyr).

## Conclusion

Comparison of results obtained with three different amperometric tyrosinase biosensors showed the fact that type of immobilization procedure represents one of decisive factors which determine the service life of tyrosinase biosensors.

## Acknowledgments

The support received from the Czech Science Foundation (Project No. 19-03160S) and Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice (Project No. SGS-2019-003) are gratefully acknowledged.

## References

1. Sýs M., Vytřas K.: *Curr. Med. Chem.* **25**, 3988 (2018).
2. Min K., Yoo Y. J.: *Talanta* **80**, 1007 (2009).
3. Fritea L., Tertiş M., Cosnier S., Cristea C., Săndulescu R.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **10**, 7292 (2015).
4. Njagi J., Chernov M. M., Leiter J. C., Andreescu S.: *Anal. Chem.* **82**, 989 (2010).
5. Lupu S., Lete C., Balaure P. C., Caval D. I., Mihailciuc C., Lakarş B., Hîhn J. Y., del Campo F. J.: *Sensors* **13**, 6759 (2013).
6. Wang Y., Zhang X., Chen Y., Xu H., Tan Y., Wang S.: *Am. J. Biomed. Sci.* **2**, 209 (2010).
7. Rahman S. F., Min K., Park S. H., Park J. H., Yoo J. Ch., Park D. H.: *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **21**, 627 (2016).
8. Florescu M., David M.: *Sensors* **17**, 1314 (2017).
9. Vicentini F. C., Janegitza B. C., Brett Ch. M. A., Fatibello-Filho O.: *Sens. Actuators B Chem.* **188**, 1101 (2013).
10. Tan Y., Kan J., Li S.: *Sens. Actuators B Chem.* **152**, 285 (2011).

## Voltammetric Behavior of Triazole Fungicides on Boron Doped Diamond Electrode (Voltametrické chování triazolových fungicidů na borem dopované diamantové elektrodě)

Renáta Šelešovská <sup>a</sup>, Kateřina Krejčová <sup>a</sup>, Karolina Schwarzová-Pecková <sup>b</sup>, Lenka Janíková <sup>a</sup>,  
and Jaromira Chýlková <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Environmental and Chemical Engineering, University of Pardubice, Studentská 95, Pardubice, Czech Republic, E-mail: renata.selesovska@upce.cz

<sup>b</sup> Department of Analytical Chemistry, Charles University, Faculty of Science, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

### Abstract

Voltammetric behavior of azole fungicides difenoconazole, tebuconazole, and triticonazole was investigated for the first time using boron doped diamond electrode. Oxidation mechanism was also solved. The obtained oxidation signals of particular compounds were utilized for the development of voltammetric methods for their determination. Proposed methods were applied for analysis of real samples, e.g., spiked drinking and natural water, pesticide preparations.

**Key words:** Azole fungicides, Difenoconazole, Tebuconazole, Triticonazole, Oxidation, Boron doped diamond electrode.

### Úvod

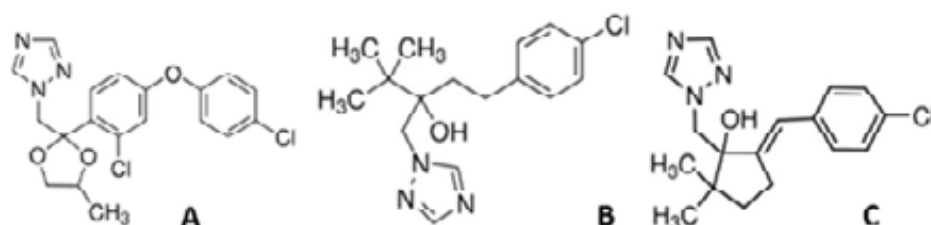
Triazolové fungicidy patří mezi systémové širokospektrální fungicidy, které se používají k ochraně různých plodin proti plísňovým chorobám a k léčbě plísňových infekcí. Často jsou rovněž součástí prostředků na ochranu dřeva, textilií, kůže, lepidel, antivegetačních prostředků a barev <sup>1</sup>. Vzhledem k širokému využití mohou mít triazolové fungicidy negativní dopady na zdraví lidí i jiných organismů. Různé studie prokázaly vznik rakoviny jater, hepatotoxické účinky, negativní vliv na reprodukci a další <sup>2-6</sup>. Proto je třeba mít k dispozici citlivé analytické metody pro stanovení těchto látek. V současnosti se stanovují zejména pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním <sup>7,8</sup> nebo DAD detektorem <sup>9</sup>. Popsáno bylo i použití plynové chromatografie s hmotnostním detektorem <sup>10, 11</sup> nebo kapilární elektroforézy <sup>12</sup>. Voltametrické metody, jež mohou být často levnější, jednodušší a rychlejší alternativou k uvedeným poměrně komplikovaným a instrumentálně náročným metodám, nebyly doposud pro stanovení triazolových fungicidů použity. Výjimkou je stanovení tebuconazolu pomocí rtuťovým meniskem modifikované měděné pevné amalgámové elektrody (m-CuSAE), kde autoři využili tvorbu komplexu analytu s mědí <sup>13,14</sup>.

V rámci této práce bylo poprvé studováno oxidační chování vybraných triazolových fungicidů, konkrétně difenoconazolu (DFC), tebuconazolu (TBC) a triticonazolu (TTC), s využitím borem dopované diamantové elektrody (BDDE) a byly navrženy metody jejich stanovení. Chemické struktury studovaných látek jsou znázorněny na Obr. 1. BDDE byla vybrána pro své výjimečné elektrochemické vlastnosti <sup>15-17</sup>, zejm. široké potenciálové okno umožňující sledovat anodické signály při značně pozitivních potenciálech.

### Experimentální část

Brittonův-Robinsonův pufr (BRB, pH 2-12) byl připravován mícháním kyselé a alkalické složky pod pH-metrem. Kyselou složku tvořil 0,04M roztok H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> a CH<sub>3</sub>COOH a alkalickou byl 0,2M NaOH. 0,1M HNO<sub>3</sub> byla ředěna z koncentrované 65% HNO<sub>3</sub> (Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o., Praha). 1×10<sup>-3</sup>M roztoky DFC, TBC a TTC (Sigma-Aldrich) byly

připraveny rozpuštěním příslušné navážky v acetonitrilu (Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o., Praha) a uchovávány v lednici. Roztoky s nižší koncentrací byly připravovány jejich ředěním BRB denně čerstvě. Pro interferenční studii byly připraveny roztoky dalších pesticidních látek o koncentraci  $1 \times 10^{-3}$  M (Sigma-Aldrich), a to rozpuštěním ve vhodném rozpouštědle dle rozpustnosti (destilovaná voda, metanol, acetonitril). Analyzovány byly pesticidní přípravky s obsahem DFC – SCORE 250 EC (250 g/l) a ASCON (125 g/l, oba Syngenta Crop Protection AG, Švýcarsko), TBC – HORIZON 250 EW (250 g/l, Bayer CorpScience AG, Německo) a TTC – SAPROL (10 g/l, Scotts Cetaflor Handelsgesellschaft m.b.H., Rakousko).



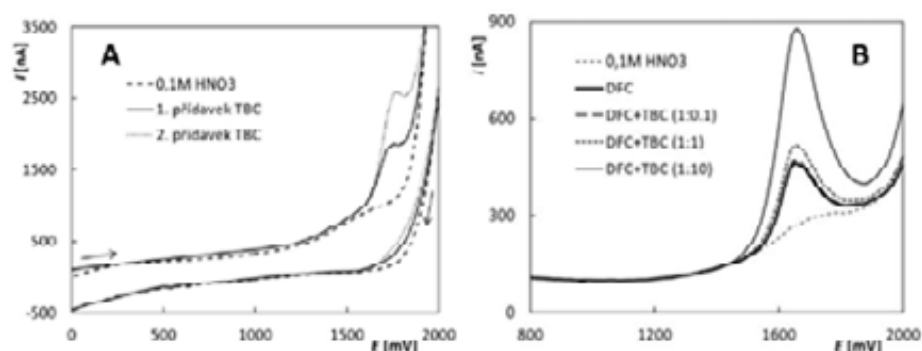
**Obr. 1.** Strukturní vzorec difenoconazolu (A), tebuconazolu (B) a triticonazolu (C).

Pro voltametrická měření byl používán Eco-Tribo Polarograph (Polaro-Sensors, Praha) vybavený softwarem POLAR.PRO (verze 5.1) a AUTOLAB PGSTAT 12 (Metrohm Autolab, Nizozemí) se softwarem NOVA 1.11. Měření probíhala v tříelektrodovém uspořádání, kdy jako pracovní elektroda sloužila BDDE s poměrem B/C během depozice 1000 ppm (Windsor Scientific, Velká Británie). Referenční byla nasycená argentchloridová elektroda a pomocnou tvořil platinový drátek (obě Monokrystaly, Turnov). BDDE byla aktivována na začátku práce změřením 20 cyklických voltamogramů v rozsahu potenciálů od  $-1000$  do  $+2000$  mV v prostředí základního elektrolytu. Mezi jednotlivými měřeními nebyla BDDE nijak regenerována. Při studiu voltametrického chování vybraných fungicidů byla použita cyklická voltametrie (CV) a pro vývoj metod jejich stanovení sloužila diferenčně pulzní voltametrie (DPV), resp. square wave voltametrie (SWV).

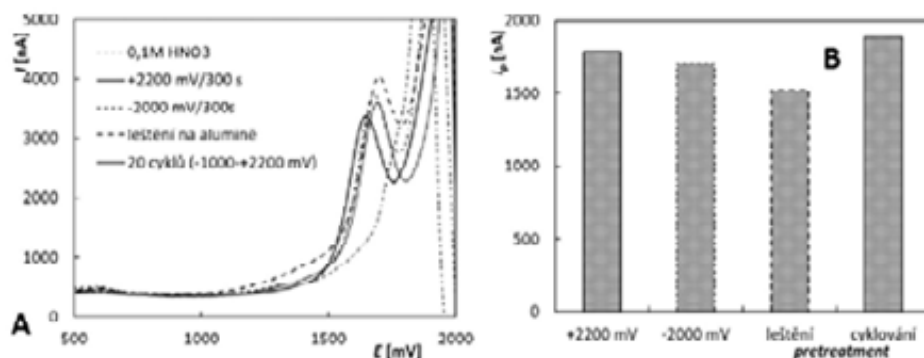
### Výsledky a diskuse

Voltametrické chování DFC, TBC a TTC bylo studováno pomocí BDDE. Bylo zjištěno, že tyto fungicidy poskytují oxidační signály při velmi pozitivních potenciálech. Na Obr. 2A je uveden příklad cyklického voltamogramu TBC v prostředí 0,1M  $\text{HNO}_3$ . Analyt poskytuje jeden oxidační signál kolem potenciálu  $+1700$  mV. Odpovídající katodický signál pozorován nebyl, což svědčí o ireverzibilní reakci. Velmi podobné výsledky byly získány rovněž pro DFC. Opět byl pozorován jeden oxidační pík, a jak je vidět z Obr. 2B, jeho potenciál byl shodný s TBC. Pouze intenzita píku odpovídajícího oxidaci DFC je mnohem vyšší než v případě TBC. Třetí studovanou látkou byl TTC, který poskytoval 2 oxidační signály, jeden kolem potenciálu  $+1450$  mV a druhý  $+1800$  mV. Ze závislosti výšky píku ( $I_p$ ) na pH prostředí (0,1M  $\text{HNO}_3$  a BRB (pH 2-12)) vyplynulo, že nejlepším prostředím pro stanovení těchto látek je 0,1M  $\text{HNO}_3$  pro DFC a TBC a BRB (pH 3) pro TTC. Ze závislosti  $I_p$  na rychlosti polarizace ( $v$ ) vyplynulo, že se ve všech případech jedná o difuzně řízenou reakci. Poté byla pozornost věnována možným mechanismům oxidace jednotlivých azolů. V další fázi práce byla pro všechny studované fungicidy vyvinuta metoda jejich stanovení s využitím modelových roztoků. Byly optimalizovány parametry DPV (DFC, TBC) jako rychlost polarizace, výška a šířka pulzu, nebo SWV (TTC) jako potenciálový krok, amplituda a frekvence. Poté byl vždy testován vliv pretreatmentu BDDE na tvar a intenzitu sledovaných signálů. Elektroda byla upravována anodicky při potenciálu  $+2200$  mV, katodicky při potenciálu  $-1000$  mV, cyklováním v rozsahu potenciálů  $-1000$  až  $+2200$  mV a leštěním. Poté byl vždy změřen signál analytu. Výsledky pro TBC jsou uvedeny na obrázku 3. Ukázalo se,

že pro všechny 3 látky je nejvhodnější zařazení cyklování na začátku práce s elektrodou. Další regenerace nebo úprava povrchu BDDE mezi jednotlivými měřeními již nebyla nutná.



**Obr. 2.** A – Cyklické voltamogramy TBC v prostředí 0,1M HNO<sub>3</sub> získaný na BDDE;  $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $c_{\text{TBC}} = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ . B – DP voltamogramy po přidavku DFC a TBC v prostředí 0,1M HNO<sub>3</sub>;  $c_{\text{DFC}} = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $c_{\text{TBC}} = 0, 1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-6} \text{ a } 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ .

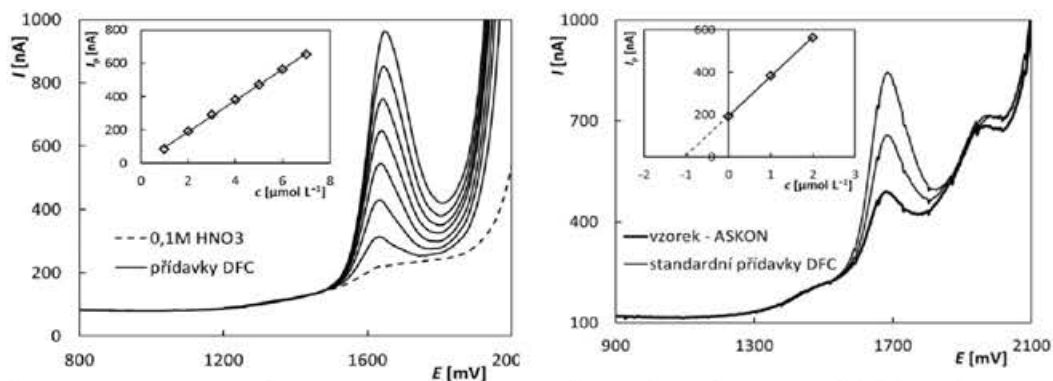


**Obr. 3.** A – DP voltamogramy TBC v prostředí 0,1M HNO<sub>3</sub> získané na BDDE po různém postupu předúpravy elektrody;  $c_{\text{TBC}} = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ . B – závislost výšky piku TBC na postupu předúpravy povrchu BDDE.

Vyvinuté analytické metody byly nejprve aplikovány při analýze modelových roztoků. Byla proměřena řada koncentračních závislostí (Obr. 4A) a pro jednotlivé látky byly stanoveny základní statistické parametry jako lineární dynamický rozsah (*LDR*), limit detekce (*LOD*) a mez stanovitelnosti (*LOQ*). Opakovatelnost měření byla ověřena výpočtem relativní směrodatné odchylky (*RSD*) z 11 opakovaných měření stejné koncentrace analytu a opakovatelnost stanovení výpočtem *RSD* z 5 opakovaných stanovení fungicidů v modelových roztocích o známých koncentracích. Poté byly metody aplikovány při analýze reálných vzorků. Nejprve se jednalo o pitné a přírodní vody, které neobsahovaly detekovatelné množství fungicidů, a proto byly obohaceny přidavkem standardních roztoků na vhodné koncentrace. Dalšími vzorky pak byly pesticidní přípravky s obsahem zkoumaných analytů jak samostatně, tak ve směsi s dalšími účinnými látkami. Příklad stanovení DFC v pesticidním přípravku ASKON je znázorněna na obrázku 4B. Výsledky těchto analýz byly velmi dobré a potvrdily, že vyvinuté metody jsou použitelné v praxi, např. při kontrole složení pesticidních přípravků.

### Závěr

V rámci této práce bylo studováno voltametrické chování 3 azolových fungicidů. Bylo zjištěno, že DFC a TBC poskytují jeden a TTC dva oxidační signály na BDDE. Byly vyvinuty metody stanovení uvedených látek, které byly úspěšně aplikovány při analýze pitných a přírodních vod i pesticidních přípravků.



**Obr. 4.** A – DP voltamogramy DFC v závislosti na koncentraci získané na BDDE;  $c_{DFC} = 1 \times 10^{-6}$ – $7 \times 10^{-6}$  M. Vložená závislost výšky píku DFC na koncentraci. B – Stanovení DFC v pesticidním přípravku ASKON metodou standardního přídávku.

### Acknowledgments

Tato práce byla financována z prostředků Grantové agentury České republiky (projekt č. 17-03868S) a Univerzity Pardubice (projekt č. SGS\_2019\_001).

### References

1. Mazur C. S., Kenneke J. F.: *Environ. Sci. Technol.* **42**, 947 (2008).
2. Hester S. D., Wolf D. C., Nesnow S., Thai S. F.: *Toxicol. Pathol.* **34**, 879 (2006).
3. Hester S., Moore T., Padgett W. T., Murphy L., Wood C. E., Nesnow S.: *Toxicol. Sci.* **127**, 54 (2012).
4. Zhuang S. L., Bao L. L., Wang H. F., Zhang M., Yang C., Zhou X. Y., Wu Y., Rehman K., Naranmandura H.: *Toxicol. Res.* **4**, 1195 (2015).
5. Goetz A. K., Dix D. J.: *Toxicol. Sci.* **110**, 449 (2009).
6. Mu X. Y., Chai T. T., Wang K., Zhu L. Z., Huang Y., Shen G. M., Li Y. R., Li X. F., Wang C. J.: *Environ. Pollut.* **212**, 18 (2016).
7. Ye X., Ma S. P., Zhang L. J., Zhao P. F., Hou X. H., Zhao L. S., Liang N.: *J. Food. Compos. Anal.* **74**, 62 (2018).
8. Zhao W. T., Zhao J. Z., Zhao H. Q., Cao Y. Y., Liu W. T.: *Chirality* **30**, 302 (2018).
9. Liu C., Liao Y. M., Huang X. J.: *J. Chromatogr. A* **1524**, 13 (2017).
10. Wang P., Zhao Y. P., Wang X. J., Yu G. W., Wang J., Li Z. G., Lee M. R.: *J. Sep. Sci.* **41**, 4498 (2018).
11. Wei Q. Z., Song Z. Y., Nie J., Xia H. L., Chen F. J., Li Z. G., Lee M.: *J. Sep. Sci.* **39**, 4603 (2016).
12. Konasova R., Dyrtrtova J.J., Kasicka V.: *J. Chromatogr. A* **1408**, 243 (2015).
13. Novakova K., Navratil T., Jaklova Dyrtrtova J., Chylkova J.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **8**, 1 (2013).
14. Novakova K., Navratil T., Jaklova Dyrtrtova J., Chylkova J.: *32nd International Conference on Modern Electrochemical Methods, Jetrichovice, May 21<sup>st</sup> – 25<sup>th</sup>, 2012, XXXII. Moderní Elektrochemické Metody (Modern Electrochemical Methods XXXII), Book of Abstract (Navratil T., Fojta M., eds.), p. 87.*
15. Swain G. M., Ramesham R.: *Anal. Chem.* **65**, 345 (1993).
16. Pecková K., Musilová J., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* **39**, 148 (2009).
17. Šelešovská R., Kránková B., Štěpánková M., Martinková P., Janíková L., Chýlková J., Vojs M.: *J. Electroanal. Chem.* **821**, 2 (2018).

## Voltammetry at Silica Gel-Modified Carbon Paste Electrode (Voltametric na uhlíkové pastové elektrodě modifikované silikagelem)

Ivana Šestáková and Tomáš Navrátil

J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences,  
Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: sestakov@jh-inst.cas.cz

### Abstract

Voltammetry using silica gel modified carbon paste electrode (SiO<sub>2</sub>-CPE) for oxidation of selected flavonoid showed better sensitivity and reproducibility than oxidation using glassy carbon or unmodified carbon paste electrode. Only SiO<sub>2</sub>-CPE is useful for study of cadmium complexation with cysteine containing ligand as phytochelatin or metallothionein. Voltammetry on boron doped diamond electrode showed only peak of sulfur compound oxidation, which decreased with the addition of cadmium ions.

**Key words:** Flavonoids, Cysteine, Cadmium, Silica gel carbon paste, Diamond electrode.

### Úvod

Kompozitní uhlíkové elektrody s obsahem silikagelu<sup>1,2</sup> se začaly používat již v 90. letech minulého století, a to ve variantě pevné (s obsahem ceresinu) nebo pastové (s parafinovým olejem). Přítomnost silikagelu v uhlíkové pastě vede ke zlepšené amperometrické detekce látek, které lze na povrchu modifikovaném silikagelem nahromadit, a to jak látek organických, tak iontů kovů<sup>3</sup>. Reprodukovatelnost povrchu a tím i vlastního stanovení je nejlépe zabezpečena použitím pastové elektrody se speciálně vyvinutým teflonovým držákem s pohyblivým pístem<sup>4</sup>. Možnosti charakterizace uhlíkových pastových elektrod byly dále popsány v přehledném článku<sup>5</sup>.

Vlastnosti uhlíkové pasty modifikované silikagelem byly dokumentovány při oxidaci flavonoidů a oxidaci kadmia v přítomnosti cysteinu a fytochelatinu PC<sub>2</sub>.

Flavonoidy jsou skupinou fenolických sloučenin vyskytujících se v rostlinách. Tyto látky se řadí mezi přírodní antioxidanty, schopné zachytávat volné radikály a vykazující často protizánětlivou a protinádorovou aktivitu. Vzhledem k přítomnosti většího počtu hydroxylových skupin na aromatickém jádře jsou flavonoidy dobře oxidovatelné na uhlíkových elektrodách. V posledních letech byly studovány jak jednotlivé látky, tak přírodní vzorky s využitím elektrody ze skelného uhlíku<sup>6,7</sup> či uhlíkové pastové elektrody s různými pastovými kapalinami (nujol, difenylether, tri-*p*-kresylfosfát)<sup>8-10</sup>.

Fytochelatiny jsou polypeptidy o struktuře nejčastěji (γ-Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly, které vznikají v rostlinách, řasách a houbách jako odezva na přítomnost některých kovů, zejména Cd, Cu, Hg a As. Na rozdíl od metalothioneinů jsou fytochelatiny syntetizovány enzymaticky a to díky enzymu γ-glutamylcystein dipeptidyl transpeptidasa (EC 2.2.2.15). Účinek kadmia je nejsilnější a fytochelatiny jej váží ve formě komplexů, které jsou ukládány nejprve ve vakuolách kořenových buněk. Pro fytochelatin (γGlu-Cys)<sub>2</sub>-Gly -PC<sub>2</sub> byla metodou EXAFS prokázána tvorba tetrakoordinovaného komplexu kadmia<sup>11</sup>, obdobně jako u savčích metalothioneinů. S použitím HMDE lze odlišit redukci tetrakoordinovaného Cd- komplexu, existujícího při nadbytku peptidu od komplexů kde se na koordinaci podílejí dva atomy síry jako např. v cysteinu<sup>12</sup>.

## Experimentální část

Měření bylo prováděno metodou cyklické nebo diferenční pulsní voltametrie s využitím přístroje PC-ETP (Polaro-Sensors, Praha) se softwarem Polar 5.1. Pracovní elektrodou byla uhlíková elektroda, referentní Ag/AgCl/KCl<sub>nas</sub> a pomocnou elektroda platinová. Uhlíková pastová elektroda modifikovaná silikagelem (30 μm) byla připravována z uhlíkového prášku (extra pure, Merck) s 10% SiO<sub>2</sub> a lékařského parafinového oleje. Pasta byla homogenizována v achátové misce a plněna do teflonového držáku s pohyblivým pístem, umožňujícím obnovu povrchu vytlačení příslušného množství pasty. Nový povrch byl upraven leštěním na hladkém tvrdém papíru. Dále byly použity nemodifikovaná pastová elektroda (připravená obdobně, pouze bez SiO<sub>2</sub>) a elektroda ze skelného uhlíku typ SESV 12 (Elektrochemické Detektory, Turnov). Borem dotovaná diamantová elektroda byla od Windorscientific Ltd, UK. Obě pevné elektrody byly před měřením čištěny suspenzí aluminy, diamantová elektroda byla navíc aktivována aplikací potenciálu -2200 mV ve 3 M KCl po dobu 20 minut<sup>13</sup>.

## Chemikálie a roztoky

Flavonoidy a L-cystein byly od firmy Sigma-Aldrich, fytochelatin PC<sub>2</sub> [(γ-Glu-Cys)<sub>2</sub>-Gly] byl od firmy Genosphere Biotechnologies, Francie.

Pro přípravu roztoků byla používána deionizovaná voda z Milli-Q-systému (Milli-Q-Gradient, Milipore). The AAS standardní roztok Cd<sup>2+</sup> (1000 mg L<sup>-1</sup> in 2% HNO<sub>3</sub>) byl od firmy Analytica, Česká republika. Základním elektrolytem pro stanovení flavonoidů byl Britton-Robinsonův pufr pH 5.0, pro ostatní měření borátový pufr pH 8-8.5, připravený z tetraboritanu sodného (Suprapur, Merck).

## Výsledky a diskuse

Rutin (quercetin-3-O-rutinoso) (Schéma 1) byl vybrán pro srovnání jednotlivých uhlíkových elektrod. Pro stanovení byl zvolen pik s E<sub>p</sub> +0,38 V, který odpovídá oxidaci dvou OH skupin v *ortho* poloze<sup>6</sup>.

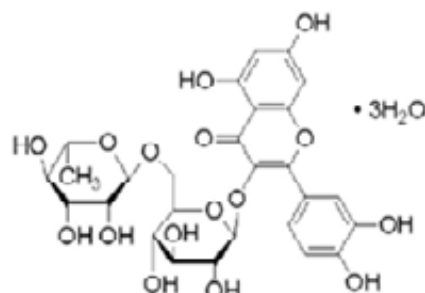


Schéma 1. Rutin

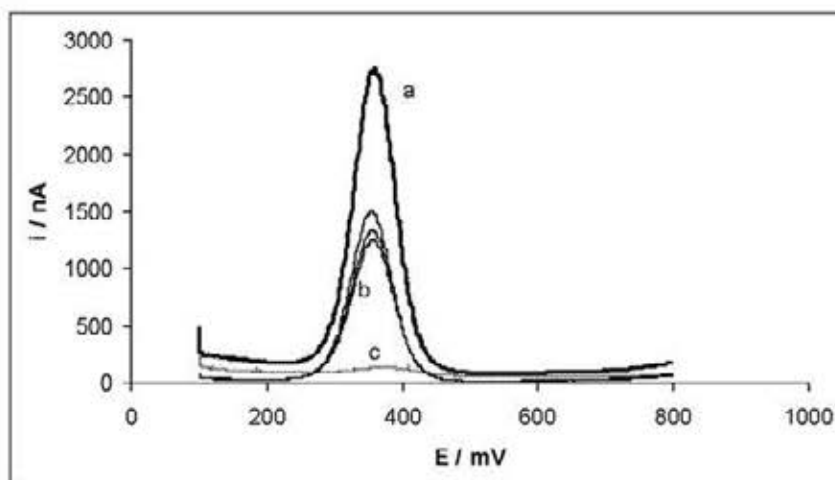
Po optimalizaci podmínek stanovení (aktivace a čištění povrchu u +800 mV, akumulace u +200 mV) bylo provedeno srovnání piku oxidace rutinu na různých typech uhlíkových elektrod. Jak se patrné z obrázku 1, nejlepší signál byl získán na SiO<sub>2</sub>-CPE. Obdobné výsledky byly získány pro hesperidin, rhamnetin a quercetin, potenciály piků oxidace se nelišily od hodnot publikovaných pro pastovou elektrodu<sup>9</sup>.

## Komplexy fytochelatinu s kadmíem

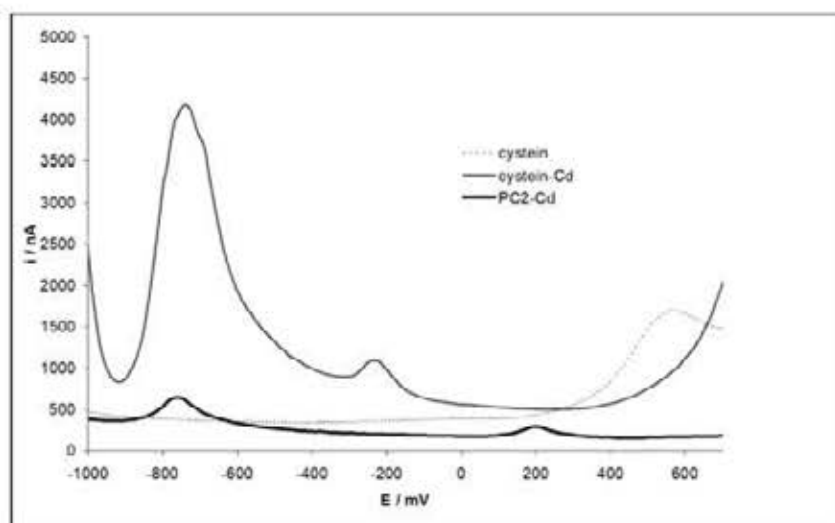
Na základě studie MCR-ALS byl srovnáván pik oxidace Cd v přítomnosti cysteinu a v nadbytku fytochelatinu PC<sub>2</sub> v borátovém pufru pH 8.5. Jak ukazuje Obr. 2, pik oxidace Cd na Cd<sup>2+</sup> je v obou případech kolem -800 mV, zatímco pik vzniku komplexu Cd-2S je kolem -200 mV a Cd-4S kolem +200 mV. To je ve shodě s chováním savčího metalothioneinu



CdMT, kde jsou po elektrolyze negativního potenciálu pozorovány oba píky v obdobné oblasti potenciálů<sup>14 15</sup>.



**Obr. 1.** Voltametrické stanovení  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$  rutinu na (a) uhlíkové pastové elektrodě modifikované silikagelem, (b) nemodifikované pastové elektrodě a na (c) elektrodě ze skelného uhlíku. Aktivace 30 s při  $E_{\text{act}} + 800 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{acc}} 45 \text{ s}$  při  $E_{\text{acc}} + 200 \text{ mV}$ , DPV od  $E_{\text{in}} + 100$  do  $E_{\text{fin}} + 800 \text{ mV}$ , rychlost scanu  $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , 3 opakování na každé z elektrod.



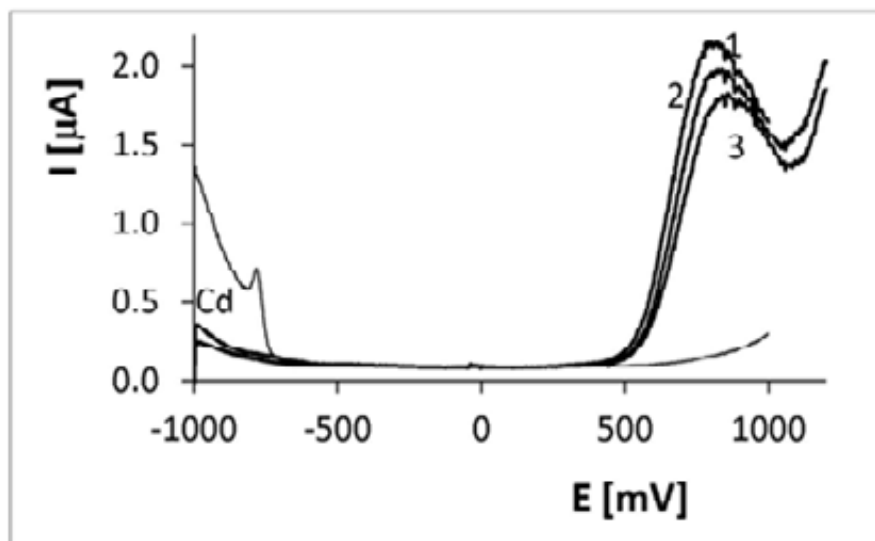
**Obr. 2.** DPV v borátovém pufru pH 8.5 po  $t_{\text{acc}} 120 \text{ s}$  při  $E_{\text{acc}} - 1400 \text{ mV}$  a)  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  cystein; b)  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  cystein a  $1 \times 10^{-6} \text{ M Cd}^{2+}$ ; c)  $2 \times 10^{-5} \text{ M PC}_2$ ,  $2 \times 10^{-6} \text{ M Cd}^{2+}$ .

Voltametrie na borem dopované diamantové elektrodě je odlišná od chování na  $\text{SiO}_2\text{-CPE}$ . Jak je patrné z obr. 3, pík příslušející oxidaci  $\text{Cd-Cd}^{2+}$  ( $-800 \text{ mV}$ ) je možné zaznamenat pouze v nepřítomnosti cysteinu. Pík příslušející oxidaci cysteinu (v oblasti  $+ 800 \text{ mV}$ ) s přidavky iontů  $\text{Cd}^{2+}$  (nebo s prodlužováním doby akumulace při  $-1200 \text{ mV}$ ) klesá. Žádný další pík se v oblasti potenciálů  $-1000 \text{ mV}$  až  $+ 1000 \text{ mV}$  neobjevuje. Obdobně se chová i systém  $\text{Cd}^{2+}\text{-PC}_2$ .

### Závěr

Oxidace flavonoidů na silikagelem modifikované uhlíkové pastové elektrodě probíhá u stejných potenciálů jako na nemodifikované pastové elektrodě či elektrodě ze skelného uhlíku. Díky možnosti nahromadění analytu při potenciálu  $+ 200 \text{ mV}$  se při použití  $\text{SiO}_2\text{-CPE}$

dosahuje podstatně vyšší citlivosti a lepší reprodukovatelnosti. Perspektivní je využití této elektrody pro analýzu přírodních materiálů. Voltametrie na SiO<sub>2</sub>-CPE, díky přítomnosti silikagelu a organické pastovací kapaliny umožňuje rozlišit píky oxidace kadmia v přítomnosti cysteinu (koordinace 2 S-atomy) nebo fytochelatinu PC<sub>2</sub> (koordinace 4 S-atomy). S použitím borem dopované diamantové elektrody však obdobný záznam nezískáme, přítomnost kadmia pouze snižuje signál příslušející oxidaci sírné sloučeniny.



**Obr. 3.** Oxidace Cd a cysteinu na borem dopované diamantové elektrodě. DPV v borátu pH 8,0,  $E_{acc}$  -1200 mV,  $t_{acc}$  120 s, výška pulsu 50 mV,  $E_{in}$  -1000mV, rychlost scanu 20 mV.s<sup>-1</sup>, křivka Cd - 2x10<sup>-6</sup> M Cd<sup>2+</sup>, křivka 1 - 1x10<sup>-3</sup>M cystein a 2x10<sup>-6</sup>M Cd<sup>2+</sup>, křivka 2 - 1x10<sup>-3</sup>M cystein a 4x10<sup>-6</sup>M Cd<sup>2+</sup>, Křivka 3 - 1x10<sup>-3</sup> M cystein a 8x10<sup>-6</sup> M Cd<sup>2+</sup>.

### Acknowledgments

Autoři práce děkují za finanční podporu projektu GAČR 17-03868S.

### References

1. Stará V., Kopanica M.: *Electroanalysis* 1, 251 (1989).
2. Stará V., Kopanica M.: *Electroanalysis* 3, 13 (1991).
3. Walcarius A.: *Electroanalysis* 10, 1217 (1998).
4. Švancara I., Metelka R., Vytřas K.: *Sensing in Electroanalysis* (Vytřas K., Kalcher K., Eds.), Universita Pardubice, Pardubice 2005.
5. Mikysek T., Stočes M., Švancara I., Vytřas K.: *Chem. Listy* 108, 513 (2014).
6. Ghica M.E., Brett A.M.O.: *Electroanalysis* 17, 313 (2005).
7. Corduneanu O., Janeiro P., Brett A.M.O.: *Electroanalysis* 18, 757 (2006).
8. Zoulis N.E., Efstathiou C.E.: *Anal. Chim. Acta* 320, 255 (1996).
9. Volikakis G. J., Efstathiou C.E.: *Talanta* 51, 775 (2000).
10. Volikakis G. J., Efstathiou C.E.: *Anal. Chim. Acta* 551, 124 (2005).
11. Strasdeit H., Duhme A.K., Kneer R., Zenk M.R., Hermes Ch., Nolting H.F.: *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* 1129 (1991).
12. Cruz B.H., Diaz-Cruz J.M., Šestáková I., Velek J., Arino Ch, Esteban M.: *J. Electroanal.Chem.* 520,111 (2002).
13. Suffredini H.B., Pedrosa V.A., Cocognot L., Machado S., Rocha-Filho R.C., Avaca L.A.: *Electrochim. Acta* 49, 402 (2004).
14. Šestáková I., Mader P.: *Cell. Mol. Biol.* 46, 257 (2000).
15. Šestáková I., Navrátil T.: *Bioinorg. Chem. Appl.* 3, 43 (2005).

## Electrochemical and Spectral Analysis of Cytosine-rich Nonamers

Iveta Trísková<sup>a</sup>, Libuše Trnková<sup>a</sup>, Iva Kejnovská<sup>b</sup>, and Michaela Vorlíčková<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Masaryk University Brno, Faculty of Science, Department of Chemistry, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic, E-mail: 175126@mail.muni.cz, libuse@chemi.muni.cz

<sup>b</sup>Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic

### Abstract

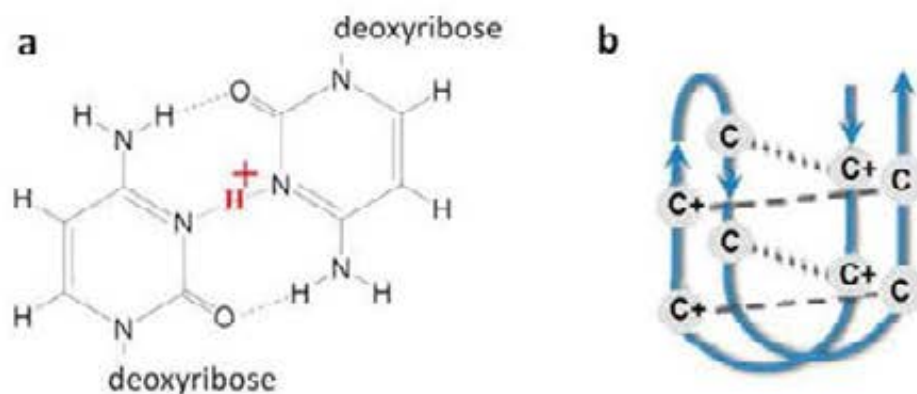
Conformational transitions of nucleic acid fragments are strongly dependent on nucleotide sequences. The C-rich ODNs can adopt different secondary structures which are held together by hemiprotonated and intercalated cytosine base pairs (C:C<sup>+</sup>). These structures, so called i-motifs, were investigated in DNA nonamers with 6C by both electrochemical (voltammetry and electrophoresis) and spectral (absorption UV-Vis spectra and circular dichroism) methods. The application EVLS (elimination voltammetry with linear scan) procedure to the reduction signals of cytosine (C) and adenine (A) on a hanging mercury drop electrode revealed different conformations of studied nonamers.

**Key words:** C-rich ODN, i-motif, Linear sweep voltammetry, Elimination voltammetry with linear scan, CD spectra, Polyacrylamide electrophoresis.

### Introduction

Electrochemical research of DNA fragments, oligonucleotides (ODNs) is often supplemented by other non-electrochemical methods<sup>1,2</sup> for both reasons: to better interpret electrochemical data and to investigate the effect of charged interface on their structure. In other words, an integral part of this approach is verification of ideas that arise during electroanalysis and which are very useful for research and development of biosensors.

To monitor i-motif structures (C:C<sup>+</sup>)<sup>3,4,5</sup> in nonamers with the different cytosine and adenine sequences, their reduction signals can be studied by using linear sweep voltammetry (LSV), completed by elimination voltammetry (EVLS). It is known that the protonated cytosine-cytosine base pair (Fig. 1) formation depends on various factors, in addition to the crucial nucleotide sequences also on environmental conditions such as pH, temperature, the solution composition, the ionic strength and, in the case of electroanalysis, also on the charged electrode surface.



**Fig. 1.** (a) A hemiprotonated cytosine-cytosine base pair (C:C<sup>+</sup>) which intercalate to form the i-motif. (b) A schematic representation of i-motif structure in C-rich ODN.

## Experimental

### Chemicals

The lyophilized samples of DNA nonamers HX were purchased from Sigma – Aldrich Company. The nonamers were diluted in distilled MILI Q water (18.2 M $\Omega$ ·cm at 25 °C) and their concentrations were determined by using UV-VIS spectroscopy. The phosphate-acetate buffer was prepared as the mixture of acetic acid (0.4 mol·L<sup>-1</sup>; glacial; Sigma Aldrich; ACS reagent), phosphoric acid (0.4 mol·L<sup>-1</sup>; 84 %; p.a.; Penta Chrudim), and 2 mol·L<sup>-1</sup> sodium hydroxide (Sigma Aldrich; 97 %; p.a.). All stock solutions were prepared in distilled MILI Q water.

**Table I.**

Sequence of DNA nonamers

Nonamers (C <sub>6</sub> A <sub>3</sub> )	Sequence
H2	CCCAAACCC
H4	CACCACCAC
H9	ACCCACCCA

### Methods

#### Linear sweep voltammetry (LSV)

The electrochemical behavior of DNA nonamers HX (H2, H4 and H9) were investigated by linear sweep voltammetry (LSV) combined with elimination voltammetric procedure. The voltammetric experiment was carried out by using electrochemical analyzer PGSTAT 20 (EcoChemie, Utrecht, The Netherlands). The samples of nonamers studied with concentration of 7·10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup> and prepared in phosphate - acetate buffer (pH 5.17) were dosed into the voltammetric cell equipped with three electrodes, the hanging mercury electrode (HMDE) with the effective area of 0.4mm<sup>2</sup> as the working electrode, Ag/AgCl/3M KCl and Pt wire as the reference and counter electrodes, respectively. The experimental conditions were as follows: scan rate 50, 100, 200, 400, 800 mV/s, start potential -1 V; end potential -1.7 V; accumulation potential -0.1 V, accumulation time  $t_a$  90 s, inert argon atmosphere ((99.999 %), room temperature. The obtained voltammetric curves were smoothed (Savitzky-Golay filter; level 2) and the elimination function  $E^4 - 6 \cdot E^3 (I_k \text{ and } I_c = 0; I_d \neq 0)$  according the equation:  $f(I) = 17.485 I - 11.657 I_{1/2} - 5.8584 I_2$  was calculated (scan rates 200, 400 and 800 mV/s). The voltammetric experiment was completed with circular dichroic spectroscopy (CD) and native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

#### Circular dichroic spectroscopy

The CD spectra of studied DNA nonamers were performed by using Jasco J-810 spectrometer (Tokyo, Japan) under the following experimental conditions:  $c_{ODN} = 2.37 \cdot 10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup>; phosphate-acetate buffer (pH 8.17 – 4.43), wavelength range from 200 to 330 nm (rate 100 nm/min), 0.1 cm quartz cuvette; room temperature 23 °C.

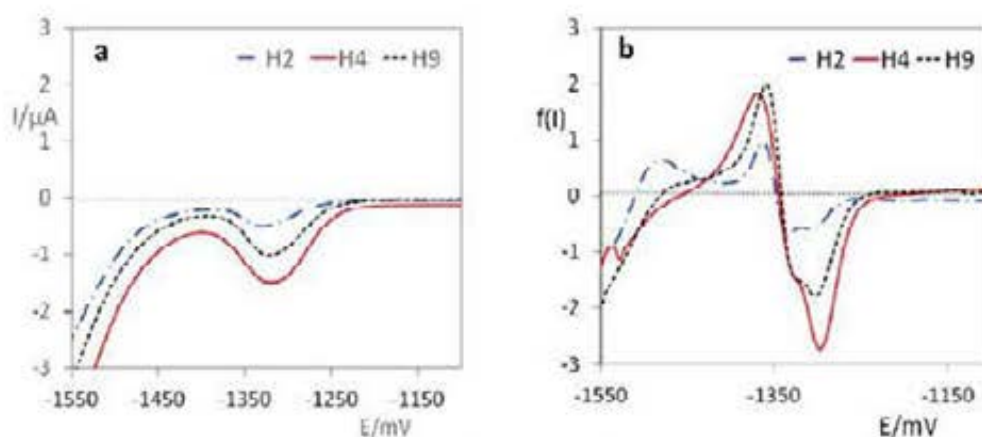
#### Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

The DNA nonamer structure was verified by native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), performed in a thermostated submersible apparatus SE – 600, Hoefer Scientific (San Francisco, CA). Gels (16 %), 14 x 16 x 0.1 cm in size, were run for 17 h at 60 V and 8 °C in phosphate – acetate buffer (pH 5.0). The gels were stained by Stains–All (Sigma).

## Results and discussion

The building i-motif block is based on one neutral and one protonated C (Fig. 1) and therefore acidic or slightly acidic solutions are required. There are different approaches to study the formation and stability of i-motif structures. Among the most commonly used methods such as spectroscopy (NMR, fluorescence and CD), diffraction (X-ray) and electrophoresis (PAGE)<sup>4</sup>, electrochemistry is looking its own place in this research field<sup>9,10</sup>. In this respect, elimination voltammetry (EVLS) can help because it is capable, unlike pulse methods, of reflecting structural changes of ODNs on the electrode surface.

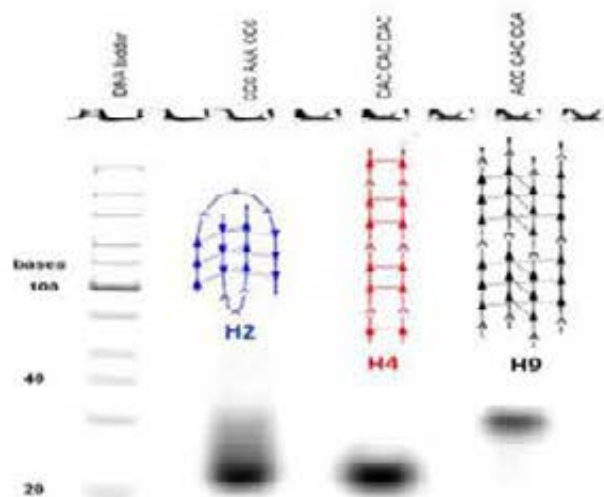
It is known that on mercury electrodes adenines (A) and cytosines (C) in ODNs provide common reduction signals<sup>11</sup>. We performed linear sweep voltammetric experiment with a hanging mercury drop electrode (HMDE), and in the adsorptive stripping mode we measured reduction AC peaks at different scan rates. For the totally adsorbed electroactive substance, the elimination function, which eliminates charging and kinetic current components ( $I_c$  and  $I_k$ ) and conserves the diffusion component  $I_d$ , provides a special peak-counterpeak signal. As an example, the difference of the reduction signals of three nonamers, containing the same number of A and C (3:6) and having a different sequence, is shown in Fig.2.



**Fig. 2.** Linear sweep voltammograms for the reference scan rate 200 mV/s (a) and corresponding elimination voltammograms (b) of DNA nonamers **H2** (CCC AAA CCC; the dash dotted line), **H4** (CAC CAC CAC; the full line), and **H9** (ACC CAC CCA; the dashed line). Phosphate – acetate buffer (pH 5.17). The scan rates for EVLS were 200, 400 and 800 mV/s.

The maximum coverage of the electrode surface by nonamers was achieved by the adsorptive stripping procedure with the accumulation time of 90 s and the accumulation potential of -0.1V. The adsorption layer of the corresponding nonamer is perturbed by increasing negative potential that ensures electrons for the reduction processes of both nucleobases, A and C.

The EVLS curves indicate different structures of nonamers; the nonamer **H2** with the A triplet in the center of ODN chain ( $C_3A_3C_3$ ) has the most organized structure in which A and C are poorly accessible for the HMDE surface and thus its reduction signal is small. Vice versa, the nonamer **H4** with alternating A and C sequence ( $CAC$ )<sub>3</sub> possesses structure where i-motif is demonstrated by the less stable bimolecular duplex. The nonamers **H9** with A on the ends of ODN chain forms an organized structure (tetramolecular tetraplex) without any support of loops and interacts with electrode surface probably as a block A and C. Our assumptions were verified by results obtained by native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) – Fig. 3.



**Fig. 3.** The native PAGE in phosphate – acetate buffer (pH 5.0)

### Conclusions

Our contribution deals with the investigation of i-motifs in cytosine-rich DNA nonamers ( $C_nA_m$ ) with the same number of cytosine ( $n=6$ ) and adenine ( $m=3$ ), but with their different sequences in the ODN chain. The electroanalytical outputs, obtained by means of LSV and EVLS, are compared with results achieved by CD spectra and electrophoresis (PAGE). This comparative study gives the opportunity to critically evaluate differences of i-motif structures in solutions and at charged phase interfaces.

### Acknowledgements

This research has been supported by Project 19-17063S of the GACR.

### References

1. Dvorakova, Z.; Renciuik, D.; Kejnovska, I.; Skolakova, P.; Bednarova, K.; Sagi, J.; Vorlickova, M.: *Nucleic Acids Res.* **46**, 1624 (2018).
2. Vorlickova, M.; Kejnovska, I.; Bednarova, K.; Renciuik, D.; Kypr, J.: *Chirality.* **24**, 691 (2012).
3. Dembska, A.: *Anal. Chim. Acta.* **930**, 1 (2016).
4. Benabou, S.; Avino, A.; Eritja, R.; Gonzalez, C.; Gargallo, R.: *Rsc. Adv.* **4**, 26956 (2014).
5. Ahmed, S.; Kaushik, M.; Chaudhary, S.; Kukreti, S.: *Int. J. Biol. Macromol.* **111**, 455 (2018).
6. Trnkova, L.; Jelen, F.; Postbicglova, I.: *Electroanal.* **15**, 1529 (2003).
7. Trnkova, L.; Jelen, F.; Postbicglova, I.: *Electroanal.* **18**, 662 (2006).
8. Trnkova, L.; Friml, J.; Dracka, O.: *Bioelectrochemistry* **54**, 131 (2001).
9. Alba, J. J.; Sadurni, A.; Gargallo, R.: *Crit Rev. Anal. Chem.* **46**, 443 (2016).
10. Gao, X. Y.; Li, X. H.; Xiong, W. M.; Huang, H. M.; Lin, Z. Y.; Qiu, B.; Chen, G. N.: *Electrochem. Commun.* **24**, 9 (2012).
11. Palecek, E.: *Biochim. Biophys. Acta.* **51**, 1 (1961).

**Determination of Different Kinds of Pharmaceuticals in Blood Plasma by Capillary Electrophoresis and Acetonitrile-Based Sample Stacking**  
**(Stanovení léčiv v krevní plasmě pomocí kapilární elektroforézy a acetonitrilového zaostření)**

Petr Tůma

Charles University, Third Faculty of Medicine, Department of Hygiene, Ruská 87, 100 00  
Prague 10, Czech Republic, E-mail: petr.tuma@lf3.cuni.cz

**Abstract**

Four completely new electrophoretic methods were developed for the sensitive determination of commonly used pharmaceuticals in human or rat plasma. All determinations are coupled with the novel kind of acetonitrile based sample stacking. All methods are characterised by a low limit of detection and simple sample pretreatment: i) the antiepileptic drug perampanel is determined in the background electrolyte 50 mM chloroacetic acid (pH 2.15), LOD 0.008  $\mu\text{M}$ ; ii) the antibiotic ceftazimide is determined in 50 mM chloroacetic acid dissolved in 20% MeOH (pH 2.32), LOD 0.08  $\mu\text{M}$ ; iii) the antimicrobial agent pentamidine is determined in 100 mM acetic acid/Tris (pH 4.7), LOD 0.03  $\mu\text{M}$ ; iv) the antidiabetic drug metformin is determined in 2.0 M acetic acid (pH 2.15), LOD 0.03  $\mu\text{M}$ .

**Key words:** Acetonitrile, Blood plasma, Capillary electrophoresis, Pharmaceuticals, Stacking.

**Úvod**

Pro kvantitativní stanovení léčiv v malých objemech vzorků získaných z živých organismů je nutné použít mikroanalytické techniky, které jsou schopné reprodukovatelně pracovat s několika  $\mu\text{L}$  tělní tekutiny sekvenčně odebírané ze studovaného objektu. Tělní tekutiny navíc představují velice komplexní matrice, pro jejichž analýzu je před vlastní detekcí sledovaného farmaka nutné ve většině případů použít účinnou separaci a látku oddělit od ostatních komponent biologického vzorku<sup>1</sup>. Všechny tyto předpoklady zajišťuje kapilární elektroforéza (CE). Hlavní nevýhodou CE, která limituje její širší využití v bioanalýze, je nízká koncentrační citlivost v kombinaci s nejběžnější UV-Vis nebo bezkontaktní vodivostní detekcí ( $\text{C}^4\text{D}$ ), která se pohybuje na koncentrační hladině  $10^{-5} - 10^{-6}$  M. Ovšem pro farmakologické účely je potřebné monitorovat hladiny léčiv na submikromolárních hladinách. Tento problém lze snadno překonat zavedením elektroforetických prekoncentračních technik. Velký význam má především on-line prekoncentrace prováděná přímo v separační kapiláře jako součást sekvence celého separačního procesu tzv. stacking. V tomto případě stačí provést pouze jednoduchou laboratorní úpravu klinického vzorku a celý proces prekoncentrace včetně separace je již plně automatizovaný a nezávislý na lidském faktoru.

**Experimentální část**

Veškerá elektroforetická měření byla provedena na přístroji kapilární elektroforézy Agilent 7100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) vybaveném třemi nezávislými detektory, jejichž detekční cely jsou zabudované do kazety termostátované na 25 °C. CE separace jsou prováděny v křemenných kapilárách (Composite Metal Services, UK) o vnějším průměru 363  $\mu\text{m}$  a minimální délce 31,5 cm (35 cm pro kombinaci s fluorescenčním detektorem). Elektroosmotický tok je v kapilárách potlačen použitím i) dynamického pokrytí pomocí INST pokrývacího roztoku<sup>2</sup>, nebo ii) permanentního pokrytí vnitřního povrchu kapiláry hydroxypropylcelulózou. Všechny použité chemikálie dosahovaly analytického stupně čistoty a pro přípravu základních elektrolytů (BGE) a dalších roztoků byla použita deionizovaná voda. Zde jsou v krátkosti popsány optimalizované experimentální podmínky pro stanovení

čtyř rozdílných léčiv a detaily jsou shrnuty v citovaných původních člancích:

- i) Stanovení antiepileptika perampanelu bylo provedeno v BGE o složení 50 mM kyselina chloroctová s přídavkem 0,5% *m/v* polyvinylalkoholu (pH 2,15) <sup>3</sup>. Separace se odehrává v 50  $\mu$ m kapiláře (vnitřní průměr, id) a je řízena napětím +30 kV. Vzorky lidské plasmy (25  $\mu$ L) upravené přídavkem okyseleného acetonitrilu (ACN) v poměru 1:3 *v/v* jsou dávkovány do kapiláry tlakem 50 mbar po dobu 120 s, což odpovídá délce nadávkované zóny vzorku 129 mm. Perampanel vykazující přirozenou fluorescenci byl detegován fluorescenčním detectorem ARGOS 250 B (Flux Instrument, Švýcarsko) se širokopásmovým excitačním filtrem 240 - 400 nm a emisním filtrem 495 nm.
- ii) Monitorování antibiotika ceftazidimu v lidské plasmě bylo provedeno v 50 mM kyselině chloroctové + 20% *v/v* metanol + 0,5% *v/v* INST pokrývací roztok jako BGE <sup>4</sup>. Separace probíhaly v 25  $\mu$ m kapiláře při napětí + 30 kV a za současné aplikace hydrodynamického tlaku 50 mbar na vstupní elektroforetickou nádobku. 33,3  $\mu$ L plasmy bylo deproteinizováno přídavkem 100  $\mu$ L ACN okyseleného 0,01 M HCl. Takto upravený vzorek byl dávkován do kapiláry tlakem 100 mbar po dobu 30 s (odpovídá zóně 5,4% z délky kapiláry). UV absorbující ceftazimid byl vizualizován pomocí diod-array detektoru při selektivní vlnové délce 260 nm.
- iii) Antimikrobiální prostředek pentamidin byl separován v 50  $\mu$ m kapiláře kovalentně pokryté hydroxypropylcelulózou, v BGE o složení 100 mM kyselina octová/Tris o pH 4,7, napětí +15 kV <sup>5</sup>. 12,5  $\mu$ L plasmy upravené přídavkem ACN v poměru 1:3 *v/v* bylo dávkováno hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 120 s, což odpovídá zóně 28,3 % z délky kapiláry. Pentamidin absorbující v UV oblasti spektra byl detegován diod-array detektorem při selektivní vlnové délce 260 nm.
- iv) Stanovení metforminu, který je rutinně používán pro léčbu diabetes mellitus druhého typu, bylo provedeno v 50  $\mu$ m INST-pokryté kapiláře a separace probíhala v 2,0 M kyselině octové (pH 2,15) při napětí +20 kV <sup>6</sup>. Ke 100  $\mu$ L lidské plasmy bylo přidáno 300  $\mu$ L ACN okyseleného 0,01 M HCl a vzorek byl dávkován do kapiláry tlakem 50 mbar po dobu 20 s (odpovídá délce zóny 22,9 mm). V UV-Vis oblasti neabsorbující metformin byl detegován pomocí C<sup>13</sup>D pracujícím s budícím sinusovým signálem o frekvenci 1 MHz <sup>7</sup>.

### Výsledky a diskuze

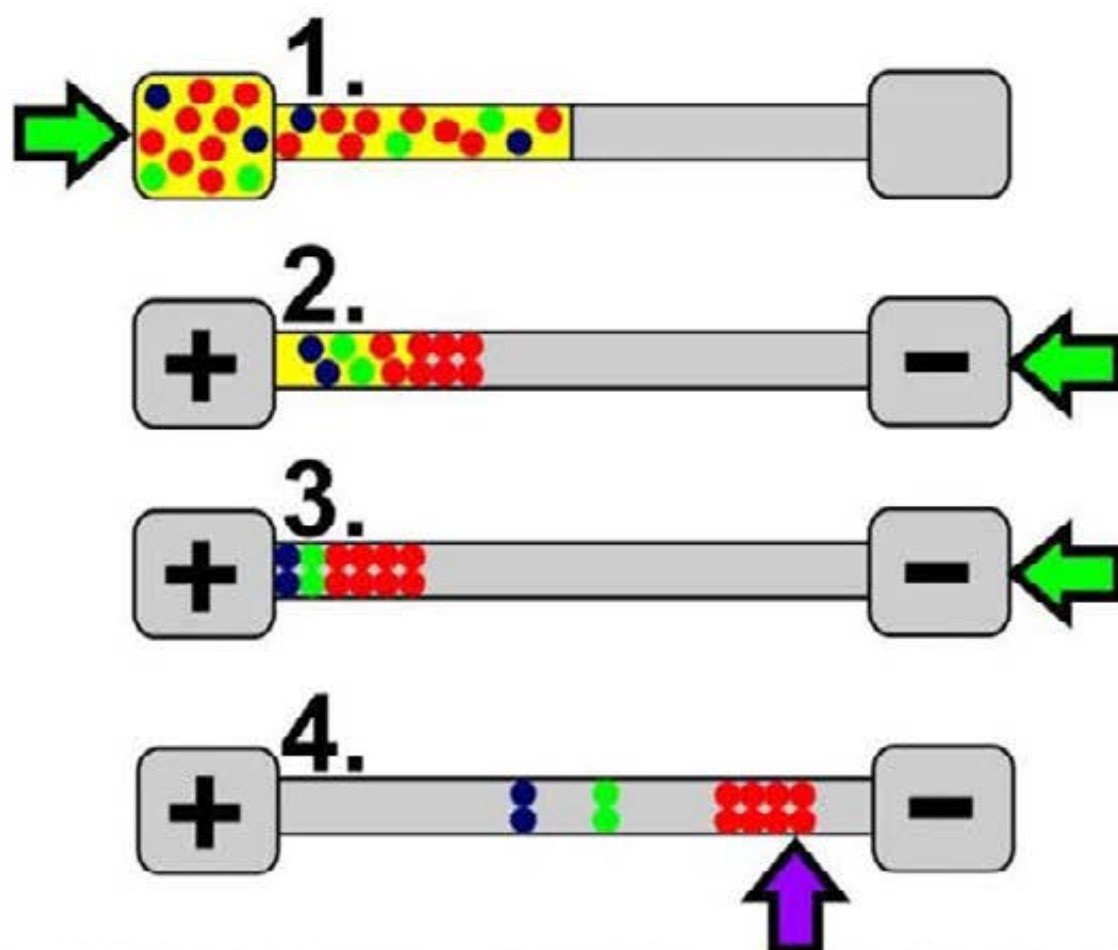
Následuje podrobný popis zaostřovací elektroforetické techniky, jejíž využití není vázáno pouze na stanovení léčiv, ale má obecné použití, jak bylo ukázáno při stanovení neurotransmiterů <sup>8</sup> nebo aminokyselin s větveným postranním řetězcem <sup>9</sup>.

- i) Plasma nebo jiná tělní tekutina s vysokým obsahem NaCl se zředí ACN v poměru 1:3 až 1:5 *v/v*. Přídavek ACN nejen deproteinizuje biologický vzorek, ale zároveň sníží jeho elektrickou vodivost pro elektroforetický stacking. Takto upravený vzorek je hydrodynamicky nadávkován do kapiláry v délce zóny od 1 až 100% z celkové délky kapiláry.
- ii) Poté je spuštěn elektroforetický stacking aplikací separačního napětí ovšem za současného vytlačování zóny ACN z kapiláry. Napětí je zvyšováno postupným lineárním nárůstem, za dobu rovnou 90% času použitého pro nadávkování vzorku. Zóna ACN je z kapiláry vytlačována konstantním záporným tlakem o stejné velikosti jako je dávkovací tlak, pouze s opačným znaménkem, -50 mbar. Doba použitá pro vypuzování ACN je



rovna 110% z dávkovacího času. Aplikace vypuzovacího tlaku vyššího než 50 mbar již není vhodná v kapiláře o  $id \geq 50 \mu m$ , protože dochází k hydrodynamickému rozmývání zóny vzorku a ke ztrátě separační účinnosti. O 10% delší tlakový impuls použitý pro vytlačení ACN z kapiláry v porovnání s impulsem pro nadávkování vzorku je záměrný a zajistí úplné vytlačení veškerého ACN z kapiláry; zóna vzorku se v kapiláře rozšiřuje vlivem difuze. Strmější nárůst separačního napětí, za dobu o 10% kratší než dávkovací čas, zajistí rychlé vymigrování analytu ze zóny vzorku a zamezí jeho ztrátám při vypuzování ACN.

- iii) Vlastní stacking lze vysvětlit tak, že v zóně vzorku s potlačenou vodivostí migruje analyt rychleji než v zóně BGE a dochází k jeho zaostření na rozhraní ACN/BGE. Vedle toho jsou splněny podmínky přechodné izotachofórey způsobené přítomností sodných iontů z biologického vzorku: sodné ionty přebírají roli vedoucího elektrolytu a na jejich zadní hraně se zaostřuje pomaleji migrující analyt. Vhodné podmínky pro přechodnou izotachofóru nastávají velice často, protože většina kationogenních analytů má nižší mobilitu ve srovnání se sodnými ionty. Celý proces je znázorněn na obr. 1.



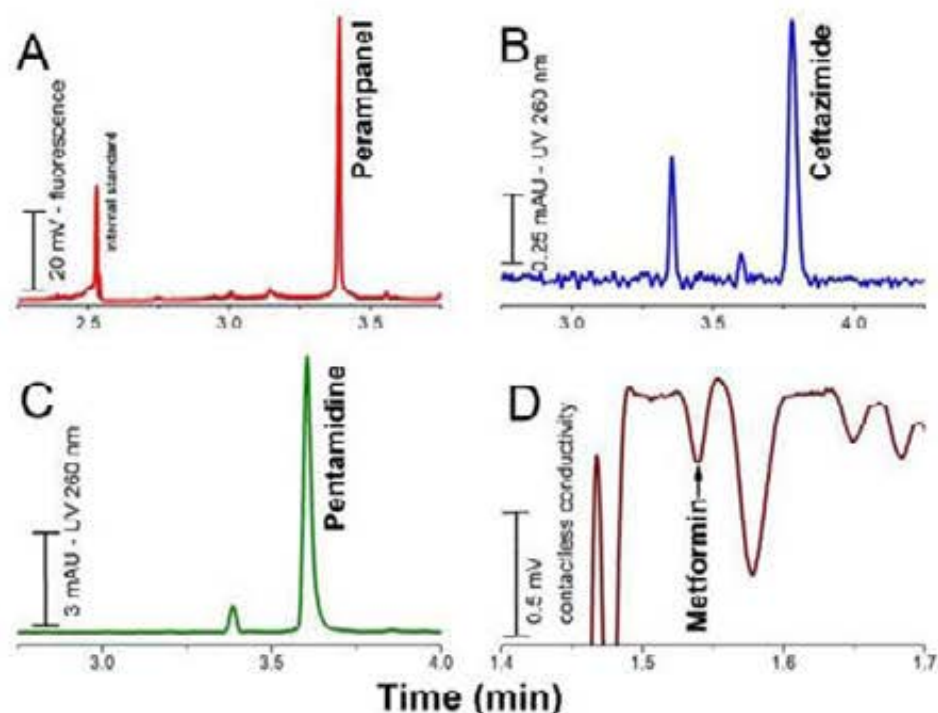
**Obr. 1.** ACN stacking klinických vzorků: 1. Hydrodynamické dávkování velkého objemu vzorku do kapiláry; 2. Zaostření iontů léčiva do úzké zóny vlivem elektrického pole se současným vypuzováním zbytkového ACN z kapiláry aplikací tlaku; 3. Zaostřené zóny léčiva; 4. Separace v módu kapilární zónové elektroforézy. Identifikace: analyty (modrá a zelená), sodné ionty (červeně), ACN (žlutě), BGE (šedě), tlak (zelená šipka), pozice detektoru (fialová šipka).

V Tabulce I jsou shrnuty hlavní experimentální parametry vyvinutých CE metod a příslušné reprezentativní elektroferogramy jsou zobrazeny na obr. 2.

**Tabulka I.**

Experimentální parametry CE stanovení léčiv.

Analyt	BGE	Kapilára délka, cm/ id, $\mu\text{m}$	Délka vzorku, mm	Detekce	LOD, $\mu\text{M}$
Perampanel	50 mM kyselina chloroctová, pH 2,15	35/50	129	fluorescence	0,008
Ceftazimid	50 mM kyselina chloroctová + 20% MeOH, pH 2,32	31,5/25	86	UV	0,8
Pentamidin	100 mM kyselina octová/Tris, pH 4,7	31,5/50	89	UV	0,03
Metformin	2,0 M kyselina octová, pH 2,15	31,5/50	23	C <sup>4</sup> D	0,03



**Obr. 2.** Ilustrativní elektroferogramy, A – CE/fluorescenční stanovení antiepileptika perampanelu v lidské krevní plasmě (stanovená koncentrace 241 ng/mL); B – CE/UV stanovení antibiotika ceftazidimu v lidské krevní plasmě (6  $\mu\text{g/mL}$ ); C – CE/UV stanovení antimikrobiálního prostředku pentamidinu v plasmě laboratorních potkanů (14,2  $\mu\text{M}$ ); D – CE/C<sup>4</sup>D stanovení antidiabetika metforminu v lidské krevní plasmě (4,4  $\mu\text{M}$ ).

### Závěr

Kapilární elektroforéza představuje velmi silný nástroj pro monitorování farmakokinetiky léčiva po desetivteřinových časových intervalech. Nízké požadavky na množství klinického vzorku a jeho snadná úprava navíc umožňují provádět farmakologické experimenty na malých laboratorních organismech. Vysoké citlivosti stanovení charakterizované LOD na

koncentrační úrovní  $10^{-6}$  až  $10^{-8}$  mol/L lze dosáhnout pomocí acetonitrilového stackingu. Tento stacking vyžaduje potlačení vodivosti klinického vzorku přidavkem acetonitrilu, současnou aplikaci separačního pole a hydrodynamického tlaku v průběhu separace a účinné potlačení elektroosmotického toku.

#### **Acknowledgments**

Autoři děkují za finanční podporu GAČR, grant 18-04902S.

#### **References**

1. Nandi P., Lunte S.M.: *Anal. Chim. Acta* *651*, 1 (2009).
2. Tůma P.: *J. Sep. Sci.* *37*, 1026 (2014).
3. Tůma P., Bursová M., Sommerová B., Horsley R., Čabala R., Hložek T.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* *160*, 368 (2018).
4. Tůma P., Jaček M., Fejfarová V., Polák J.: *Anal. Chim. Acta* *942*, 139 (2016).
5. Tůma P., Heneberg P., Vaculín S., Koval D.: *Electrophoresis* *39*, 2605 (2018).
6. Tůma P.: *J. Chromatogr. A* *1345*, 207 (2014).
7. Tůma P.: *J. Sep. Sci.* *40*, 940 (2017).
8. Tůma P., Šustková-Fišerová M., Opekar F., Pavlíček V., Málková K.: *J. Chromatogr. A* *1303*, 94 (2013).
9. Tůma P., Gojda J.: *Electrophoresis* *36*, 1969 (2015).

## Construction and Application of Flow Amperometric Biosensor Based on Enzymatic Reactor for Determination of Choline

Sofia Tvorynska <sup>a,b</sup>, Jiří Barek <sup>b</sup>, and Bohdan Josypčuk <sup>a</sup>

<sup>a</sup>J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: sofia.tvorynska@jh-inst.cas.cz

<sup>b</sup>Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

### Abstract

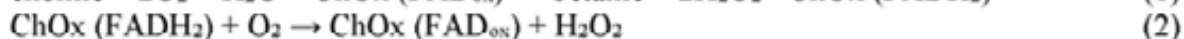
In this contribution, a novel fast, simple and stable biosensor with the enzymatic reactor based on choline oxidase (ChOx) was developed and applied for the determination of choline using flow injection analysis with amperometric detection. The preparation of the reactor is based on the covalent immobilization of ChOx with glutaraldehyde to mesoporous silica powder (SBA-15) previously covered by NH<sub>2</sub>-groups. The experimental parameters affecting the sensitivity and stability of the biosensor were optimized. The proposed biosensor with the newly developed ChOx-based reactor possesses good repeatability, reproducibility, long-term stability, and reusability. It was successfully applied for the determination of choline in commercial pharmaceuticals.

**Key words:** Choline, Choline oxidase, Enzymatic reactor, Amperometric biosensor, Flow injection analysis.

### Introduction

Choline (Ch) plays a key role in human health as a precursor to neurotransmitter acetylcholine. The reducing of this neurotransmitter amount in human body leads to various neurological disorders, including Parkinson's disease <sup>1</sup>, Alzheimer's disease <sup>2</sup>, and schizophrenia. Moreover, it is a quite important for healthy function of liver and in woman's health during the pregnancy. Therefore, there is an ever increasing demand for methods of its detection in biological samples and pharmaceutical products.

Among the different methods available for Ch detection <sup>3-5</sup>, amperometric biosensors based on choline oxidase (ChOx) exhibit many advantages (selectivity, simplicity, reliability, cost-effectiveness, possibility of miniaturization, and reproducibility). The application of the enzyme-based biosensors with the classic construction for Ch monitoring is summarized in review <sup>6</sup>. The principle of Ch detection with the amperometric enzymatic biosensor is based on the catalytic process of four-electron Ch oxidation by ChOx generating hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (equation 1). The electrochemical measurements can be based on the detection of either produced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or consumed of oxygen (O<sub>2</sub>).



where FAD – flavin adenine dinucleotide.

The flow amperometric biosensors with the enzymatic reactors based on the separated enzymatic and detection parts (instead of the classic biosensors with enzyme placed at a surface of solid detection electrodes) possess the distinctive advantage of much larger amount of the immobilized enzyme resulting in the higher long-time stability of the biosensor and lower enzyme consumption in general. An increasing number of amperometric biosensors with enzyme-based reactors in flow injection analysis (FIA) has been recently reported <sup>7-15</sup>.

The key idea of this paper is to develop and apply a novel type of simple, rapid and long-time functional amperometric biosensor based on the separated enzymatic (ChOx) and detection parts for the sensitive and selective FIA determination of Ch. Moreover, the application of two arrangements of the electrolytic cell in FIA, namely a wall-jet arrangement with silver solid amalgam electrode (AgSAE) covered by mercury film (MF-AgSAE) as a working electrode and a flow-through system with tubular detector of polished silver solid amalgam (TD-p-AgSA) has been compared.

### Experimental

All chemicals were of p. a. or better grade. Choline oxidase from *Alcaligenes sp.* (ChOx, EC 1.1.3.17, 13.8 U mg<sup>-1</sup>), choline chloride ( $\geq 98\%$ ), glutaraldehyde (GA), (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES), disodium ethylenediaminetetraacetate (Na<sub>2</sub>EDTA), mesoporous silica powder SBA-15 (Sigma, product No 777242, particle size 2 – 6  $\mu\text{m}$ , pore size  $\approx 7$  nm, surface area  $\approx 600$  m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>), mesoporous silica powder MCM-41 (Sigma, product No 643645, pore size 2.1 – 2.7 nm, surface area  $\approx 1000$  m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>) were purchased from Sigma Aldrich.

Amperometric measurements were carried out at room temperature using computer-controlled electrochemical stand (Polaro-Sensors, Czech Republic) with MultiEleclem v. 3.1 software (J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences). FIA with two types of the three-electrode laboratory-made electrolytic cell were used: flow-through cell with tubular detector of polished silver solid amalgam (TD-p-AgSA, laboratory-made, inner diameter 0.5 mm, the amalgam tube length 6.0 mm<sup>16</sup>) and the wall-jet arrangement with working silver solid amalgam electrode covered by mercury film (MF-AgSAE, laboratory-made, inner diameter 0.50 mm). The reproducible mercury film was formed at the beginning of each working day by dipping the end of AgSAE into a small glass tube with about 1 mL liquid mercury and intensively agitating for 15 seconds. An electrochemical activation of MF-AgSAE was carried out by imposition of  $-2200$  mV for 300 s in 0.20 mol L<sup>-1</sup> KCl. A miniaturized saturated calomel electrode based on silver paste amalgam (laboratory-made<sup>13</sup>, it has the same potential as classical saturated calomel electrode) was used as a reference electrode. The auxiliary electrode was platinum wire (diameter 1.0 mm, length 10 mm).

The procedure of the preparation of the reactor based on the mesoporous silica powder covalently covered by enzyme is simple, relatively fast, and universal (independently of enzyme used). A detailed protocol of the preparation procedure was described in our previous paper<sup>14</sup>. The reactors based on the mesoporous silica SBA-15 or MCM-41 as filling material covalently bounded with enzyme ChOx have been prepared. Basically, the preparation of these enzyme-based reactors consists of three steps: **I.** Silica powders were covered by APTES with the purpose to form NH<sub>2</sub>-groups on the silica surface. **II.** GA was covalently bounded by one of its aldehyde group with NH<sub>2</sub>-group of APTES on the silica surface. **III.** Enzyme was covalently immobilized with the second aldehyde group of GA.

### Results and discussion

*Principle of the amperometric detection.* The principle of Ch detection is based on the amperometric measurement of the reduction peak current of the consumed oxygen, dissolved in the mobile phase (MP), during the enzymatic reaction using the biosensor with ChOx–SBA15 reactor in FIA with the wall-jet arrangement with MF-AgSAE as a working electrode. The decrease of oxygen concentration, shown on the amperometric curve as a downward peak, is directly proportional to Ch concentration. Oxygen reduction occurs in two consecutive well-separated two-electron steps with the half-wave potentials ca  $-100$  mV and ca  $-900$  mV on liquid mercury electrodes<sup>17</sup>. To reach better sensitivity, highly negative

potential of the detection for four-electron oxygen reduction was used. The wide range of working potentials and high negative potential of hydrogen evolution on AgSAE<sup>18</sup> enable its application as the detector in FIA.

*Optimization of the biosensor response.* The key parameters, which directly influence on the properties of the biosensor, have been investigated. First of all, the type of the filling materials for the enzymatic reactor has been optimized. Based on our previously experiments with the comparison of six different types of mesoporous silica powder<sup>15</sup>, SBA-15 and MCMC-41 were found to be the most suitable fillings of the enzymatic reactors. The properties of the amperometric biosensors with two enzymatic reactors ChOx-SBA15 and ChOx-MCM41 were compared. The biosensor with the enzymatic reactor filled by MCM-41 showed approximately the same amperometric signal and good repeatability ( $690 \pm 10$  nA,  $RSD_n = 11 = 3.12$  %) as the biosensor with ChOx-SBA15 reactor ( $636 \pm 7$  nA,  $RSD_n = 11 = 1.74$  %), confirming that both fillings can be used. The ChOx-SBA-15 reactor was selected for further experiments due to the better repeatability of the parallel amperometric measurements.

To investigate the influence of the immobilized amount of ChOx on the peak response, obtained amperometric signals using two developed biosensors with two independently prepared reactors based on the enzyme immobilization from  $13.8 \text{ U mL}^{-1}$  ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) and  $44.0 \text{ U mL}^{-1}$  ( $3.2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) ChOx solutions have been compared. It was found that the ChOx solution  $\geq 13.8 \text{ U mL}^{-1}$  (for 50 mg of the filling powder SBA-15) must be used to achieve maximum capacity of immobilized enzyme. Moreover, the ChOx solution of  $44.0 \text{ U mL}^{-1}$  can be used twice (for the preparation of two 50 mg enzymatic fillings) without the deterioration of the biosensor properties. Recovery time of the enzyme activity after each substrate measurement had also to be taken into account. It was found that 240 s is sufficient time for complete recovery of ChOx activity. Based on the obtained results, the recording time 300 s was used for the reliable peak registration at  $v_{\text{flow}} = 0.2 \text{ mL min}^{-1}$ .

In order to investigate the effect of the volume of the enzymatic reactor ( $V_{\text{reactor}}$ ), the reactors with the following  $V_{\text{reactor}}$  were tested: 21.4  $\mu\text{L}$ , 41.4  $\mu\text{L}$ , 66.6  $\mu\text{L}$ , 91.7  $\mu\text{L}$ , and 106.8  $\mu\text{L}$ . It was found that with the increase of  $V_{\text{reactor}}$  up to 66.6  $\mu\text{L}$ , the current response of the biosensor increased as well. Further increase of  $V_{\text{reactor}}$  had no influence on the amperometric signal. Therefore,  $V_{\text{reactor}} \geq 66.6 \mu\text{L}$  (the tube ID 4 mm) is optimal to provide the best sensitivity, good reproducibility and large enzymatic capacity ensuring better stability of the reactor. The obtained results were taken into account for the construction of the reactor for the further measurements.

Optimal pH of MP for amperometric enzyme-based biosensor is a compromise between optimal pH for enzymatic reaction and optimal pH for the electrochemical reaction. The effect of pH of MP [ $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer (PB),  $0.001 \text{ mol L}^{-1}$  Na<sub>2</sub>EDTA] on the peak response of the biosensor with ChOx-SBA15 to  $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  Ch was studied over the pH range 5.6 – 9.5. Amperometric signal reached its maximum at pH 7.2, which was chosen as optimal for the further measurements. Heavy metal cations (e.g. cobalt, copper, silver, mercury cations) are inhibitors of ChOx. Thus, the solution of Na<sub>2</sub>EDTA, which forms strong complexes with these metals, was added into MP to avoid possible inhibition. Based to the obtained results, the optimal MP with the composition [ $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  PB;  $0.001 \text{ mol L}^{-1}$  Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.2] was used for the further measurements.

The flow rate ( $v_{\text{flow}}$ ) significantly influences on the efficiency of the enzymatic reactor and the height of the detector response. With the increase of  $v_{\text{flow}}$  in the range of 0.05 – 0.4  $\text{mL min}^{-1}$ ,

the peak height significantly increased. In order to provide the best compromise in terms of analysis time, sensitivity and the consumption of MP,  $v_{\text{flow}}$  0.2 mL min<sup>-1</sup> was selected for further experiments.

The detection potential ( $E_{\text{det}}$ ) is one of the most important parameters in amperometry, which influences on the sensitivity and selectivity of the analysis. The effect of  $E_{\text{det}}$  on the amperometric signal was studied in the wide range (from -200 mV to -1600 mV) using the flow-through cell with tubular detector (working surface was polished silver amalgam), the wall-jet arrangement (the working electrode was MF-AgSAE), and, additionally, the wall-jet arrangement with working polished silver solid amalgam electrode (p-AgSAE). As expected, the peak current increased with the increasing negative potential to -1350 mV, and then it remained practically unchanged up to -1500 mV. Moreover, with changing  $E_{\text{det}}$  to more negative values, the baseline current increased. However, it had no negatively influence on the sensitivity of the biosensor. Detection potential of -1400 mV was chosen as the optimum for maximum sensitivity and for the best repeatability of Ch determination using both FIA arrangement cells.

The construction of the apparatus and automatization program enable to change the injection volume of the substrate ( $V_{\text{inj}}$ ), which can influence on peak shape, linear dynamic range, and limit of detection ( $LOD$ ). The dependence of the amperometric signal on  $V_{\text{inj}}$  of Ch was investigated in the range of 20 – 200  $\mu\text{L}$  with step 20  $\mu\text{L}$ . The amperometric signal proportionally increased only at low  $V_{\text{inj}}$ , whereas at  $V_{\text{inj}} > 120 \mu\text{L}$  the peak current is not increasing anymore. As a compromise among the consumption of the substrate and MP, recording time, and the registration of well-defined and sharp peak,  $V_{\text{inj}}$  of Ch 60  $\mu\text{L}$  was chosen as optimal. However, it is recommended using  $V_{\text{inj}} = 120 \mu\text{L}$  if there is a need for higher sensitivity.

*Concentration dependence.* The linear range and  $LOD$  were studied and compared using two arrangements of the electrolytic cell in FIA, namely the wall-jet with working MF-AgSAE and flow-through cell with TD-p-AgSA under the optimized conditions. The calibration curve parameters are summarized in Table I. Wider linear range and lower  $LOD$  were obviously obtained by using wall-jet arrangement with working MF-AgSAE. The similar result was also observed in the previously published paper<sup>19</sup> based on the comparison of working p-AgSAE and AgSAE covered by mercury meniscus for the voltammetric determination. As expected, higher sensitivity was reached with higher values of  $v_{\text{flow}}$  and  $V_{\text{inj}}$ .

**Table I.**

Parameters of the concentration dependences for the determination of Ch with the newly developed amperometric biosensor based on the ChOx-SBA15 reactor. *Experimental conditions:*  $E_{\text{det}} = -1400$  mV, MP: [0.1 mol L<sup>-1</sup> PB; 0.001 mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.2].

$v_{\text{flow}}$ , mL min <sup>-1</sup>	$V_{\text{inj}}$ , $\mu\text{L}$	Equations	Linear range, $\mu\text{mol L}^{-1}$	$LOD$ , $\mu\text{mol L}^{-1}$
Wall-jet arrangement (MF-AgSAE)				
0.2	60	$I_p$ (nA) = -48.03 - 1.32 × 10 <sup>6</sup> × $c_{\text{Ch}}$ ; (R <sup>2</sup> = 0.9964)	40 – 500	13.0
0.3	120	$I_p$ (nA) = -25.44 - 3.46 × 10 <sup>6</sup> × $c_{\text{Ch}}$ ; (R <sup>2</sup> = 0.9912)	20 – 300	9.0
Flow-through arrangement (TD-p-AgSA)				
0.2	60	$I_p$ (nA) = 27.38 - 1.37 × 10 <sup>7</sup> × $c_{\text{Ch}}$ ; (R <sup>2</sup> = 0.9982)	80 – 700	22.0

The biosensor with the elaborated ChOx-SBA15 reactor lost 50 % of its initial response after its 700 uses over an investigated period of 100 days, indicating its high stability.

**Practical application.** In order to confirm practical applicability of the newly developed amperometric biosensor based on ChOx–SBA15 reactor, it was used for the determination of choline in two commercial pharmaceuticals (*Lipovitan*® DUO, Herbacos Recordati Ltd., Czech Republic and *Otic solution*®, Neofytspol Ltd, Czech Republic) using the wall-jet arrangement with working MF-AgSAE in FIA. The determination of Ch was evaluated using the comparison method with the choline standard solution ( $3.0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>). The amount of choline bitartrate in one tablet of *Lipovitan*® DUO was found to be  $254.0 \pm 8.7$  mg (RSD<sub>n-7</sub> = 3.8 %), which is in good correlation with the manufacturer's data (255 mg). The amount of choline salicylate in 1000 mg of *Otic solution*® was found to be  $142.8 \pm 2.3$  mg (RSD<sub>n-7</sub> = 1.74 %), which also well correlates with the amount declared by the manufacturer (140 mg).

### Conclusions

In this work, the development of the perspective type of the selective and stable flow amperometric biosensor based on ChOx, which consists of the separated enzymatic (reactor) and detection (working electrode) parts, has been presented. The obtained results demonstrated the applicability of the amperometric biosensor with the enzymatic ChOx – SBA15 reactor for the selective, fast and reliable determination of choline in the pharmaceuticals with complex matrix.

### Acknowledgements

This work was financially supported by Grant Agency of the Czech Republic (Project 17-05387S) and it was carried out within the framework of Specific Charles University Research (SVV 260440). We thank to Metrohm CZ (<https://www.metrohm.com/cs-cz>) for efficient technical, material, and intellectual support.

### References

1. Bohnena N. I., Albin R. L.: *Behav. Brain Res.* **221**, 564 (2011).
2. Lombardo S., Maskos U.: *NeuroPharm.* **96 (B)**, 255 (2015).
3. Zhang L., Liu Y., Chen G.: *J. Chromatogr. A* **1043**, 317 (2004).
4. Liu J., Zhao M., Zhou J., Liu C., Zheng L., Yin Y.: *J. Chromatogr. B* **1035**, 42 (2016).
5. Phillips M. M.: *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 2103 (2012).
6. Rahimi P., Joseph Y.: *Trends Anal. Chem.* **110**, 367 (2019).
7. Bori Z., Csiffary G., Virag D., Toth-Markus M., Kiss A., Adanyi N.: *Electroanalysis* **24**, 158 (2010).
8. Marzouk S., Sayour H., Ragab A., Cascio W., Hasan S.: *Electroanalysis* **12**, 1304 (2000).
9. Majer-Baranyi K., Adanyi N., Varadi M.: *Eur. Food Technol.* **228**, 139 (2008).
10. Pati S., Quinto M., Palmisano F.: *Anal. Chim. Acta* **594**, 234 (2007).
11. Josypčuk B., Barek J., Josypčuk O.: *Anal. Chim. Acta* **778**, 24 (2013).
12. Josypčuk O., Barek J., Josypčuk B.: *Electroanalysis* **26**, 1729 (2014).
13. Josypčuk O., Barek J., Josypčuk B.: *Electroanalysis* **30**, 1163 (2018).
14. Josypčuk O., Barek J., Josypčuk B.: *Electroanalysis* **28**, 3028 (2016).
15. Moraes F. C., Cesarino I., Colinelli D. L. C., Machado S. A. S.: *Sens. Lett.* **10**, 1031 (2012).
16. Yosypchuk O., Barek J., Yosypchuk B.: *Electroanalysis* **24**, 2230 (2012).
17. Kolthoff I. M. Miller C. S.: *J. Am. Chem. Soc.* **63**, 1013 (1941).
18. Yosypchuk B., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* **39**, 189 (2009).
19. Tvorynska S., Josypčuk O., Barek J., Dubenska L.: *Food Anal. Meth.* **12**, 409 (2019).



## Solid Electrolyte Interphase Formation on Lithium Metal Anode in Polymer Electrolytes

Elena Ushakova<sup>a,b,c</sup>, Daniil Itkis<sup>a,b</sup>, Vladimir Sergeev<sup>a</sup>, Evgenij Karpushkin<sup>a</sup>, Lada Jashina<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gori, 1, 119234, Moscow, Russian Federation, E-mail: ushelen1171@gmail.com

<sup>b</sup> Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russian Federation

<sup>c</sup> Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 4, Kosygin str., Moscow, 117977, Russian Federation

### Abstract

In the present study the possibility of Solid electrolyte interphase (SEI) stabilization formed on Li-metal anode in contact with polymer electrolytes (PEs) based on **polyacrylonitrile (PAN)** – and **poly(ethylene oxide) (PEO)** polymers has been investigated. The integrated approach was proposed to study the composition and properties of Li/polymer SEI layers including electrochemical methods and X-ray photoelectron spectroscopy. The reaction mechanism of Li/polymer SEI formation was proposed; the influence of electrolyte composition on SEI properties and stability was evaluated.

**Key words:** Solid electrolyte Interphase (SEI), Polymer electrolytes (PEs), Polymer battery systems, Lithium metal batteries.

### Introduction

Main reason preventing successful deployment of rechargeable Lithium metal batteries is connected with the formation of inhomogeneous and electrochemically unstable Solid electrolyte interphase (SEI) formation on lithium metal surface<sup>1-6</sup>. On the one hand, this layer provides transport of lithium ions to the electrode surface and at the same time prevents further interaction of the electrolyte with lithium metal<sup>1, 2, 4, 5</sup>. On the other hand, SEI can be easily destroyed during cycling. The process is accompanied by further reaction of electrolyte with fresh lithium causing inhomogeneous lithium precipitation and leads to a short battery life<sup>3</sup>. At present the application of polymer electrolytes is one of the promising approaches to SEI stabilization<sup>6-9</sup>.

As for the liquid electrolytes, SEI layer has been already investigated, it consists from the inner inorganic part with a high degree of crystallinity and the outer porous organic part<sup>2, 4, 5</sup>. SEI composition and properties are still poorly studied for Polymer electrolytes<sup>1, 3, 6-9</sup>. According to some previous works<sup>3, 6-9</sup> polymer electrolytes are characterized with the high Young modulus, wide electrochemical stability window and are expected to form homogeneous stable SEI layers in contact with Li-metal, providing a uniform smooth lithium plating/stripping. As the result it was assumed PEs to be a perspective and safe material for next generation lithium metal batteries<sup>7-9</sup>.

PAN (-CN) and PEO (-O-) are the most common types of polymers used for electrolyte synthesis since they contain polar groups such as -O- and -C≡N providing the solvation of lithium ions and formation of polymer-salt complexes that meets the basic requirements for polymer electrolytes<sup>6-9</sup>.

In the current work the possibility of SEI stabilization formed on Li-metal anode in contact with polyacrylonitrile (PAN) – and poly(ethylene oxide) (PEO) – based polymer electrolytes

containing various salts (bis(trifluoromethane)sulfonimide lithium (LiTFSI), lithium perchlorate (LiClO<sub>4</sub>)) and plasticizers (DMF, EC and PC) has been investigated.

### Experimental

The influence of polymer electrolyte ending groups  $-C\equiv N$  (PAN) and  $P-O-$  (PEO) on lithium solid electrolyte interphase formation was investigated using electrochemical tools: chronopotentiometry and impedance spectroscopy and physical methods: X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), scanning electron microscope (SEM), dynamical mechanical analysis (DMA) and differential thermal analysis (DTA).

The conductivity of polymer films, soaked with 1M Li-salt/PC solutions was measured by chemical impedance spectroscopy in a two-electrode Ni/Ni symmetric cell with embedded micrometer for PE thickness measurements. Lithium cation transference numbers  $t_{Li^+}$  for both types of electrolytes were defined by means of DC polarization and AC impedance methods in two-electrode coin type Li/Li symmetric cell.

Impedance spectroscopy technique in two-electrode coin type Li/Li and Ni/Ni symmetric cells was used to evaluate the resistance of the formed SEI films during time evolution or under polarization.

The method of XPS was used to obtain information on the chemical composition, bonding and homogeneity of polymer/lithium metal interphase. The spectra were collected using monochromatic Al K $\alpha$  X-rays. For the accurate estimation of SEI chemical composition formed in contact with the lithium metal few lithium monolayers (with estimated thickness 4,8 and 10 Å) were deposited on the surface of specially fabricated PAN – and PEO – polymer membranes using PVD process. The *quartz crystal microbalance* (QCM) technique was used for the *in situ* control of the mass change during Li deposition process.

### Results and discussion

The conductivity of polymer films soaked with Li-salt and plasticizer appeared to be the highest in 1M LiClO<sub>4</sub>/PC solution. The average conductivity was estimated to be  $1.18 \cdot 10^{-4}$  S/cm for PEO PE and  $1.45 \cdot 10^{-6}$  S/cm for PAN PE (Fig. 1).

Lithium cation transference numbers  $t_{Li^+}$  for both PEO ( $t_{Li^+} = 0.25$ ) and PAN ( $t_{Li^+} = 0.21$ ) types of PEs were defined to evaluate the contribution of the cationic species to the overall conductivity of the polymer films. As a result, it can be concluded that PEO polymer is characterized by the highest Li-ion conductivity  $2.95 \cdot 10^{-5}$  S/cm in comparison with PAN  $3.04 \cdot 10^{-7}$  S/cm.

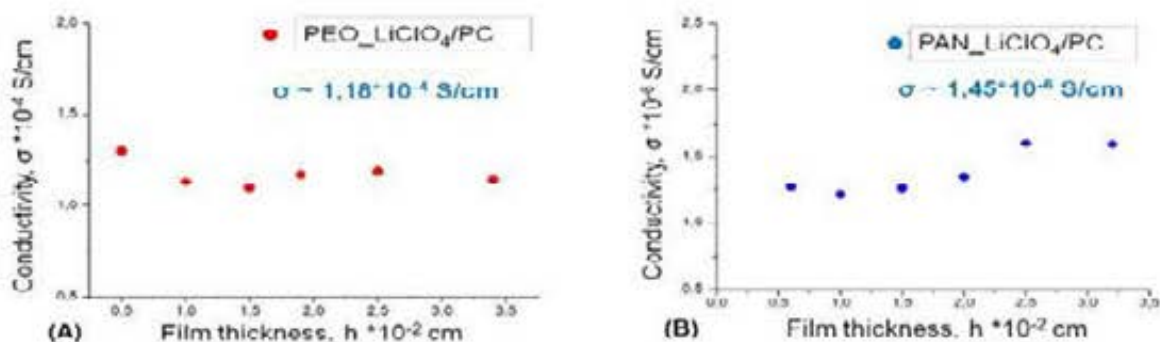
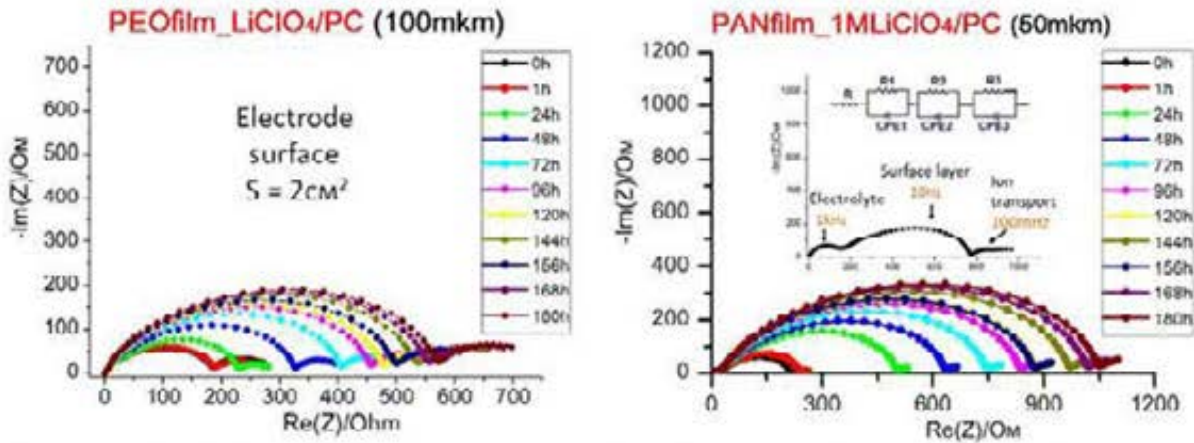
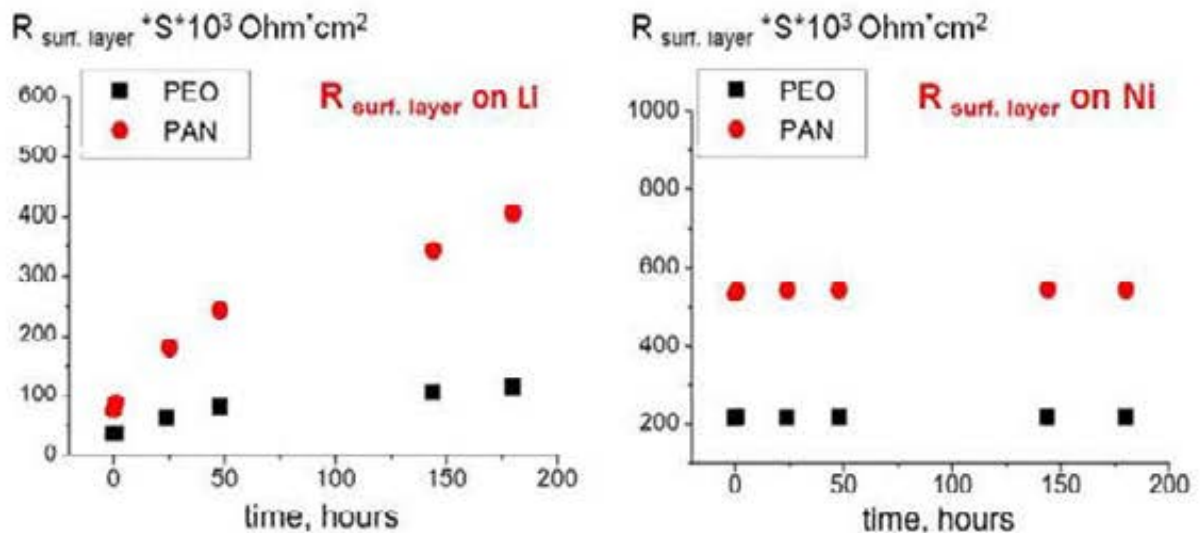


Fig. 1. PAN and PEO polymer electrolytes conductivity.

According to the Nyquist plots obtained for PEO and PAN PEs (Fig.2) it can be concluded that a highly resistive film grows on lithium metal surface during time-storage, on the contrary SEI film remains stable in contact to inert nickel electrode for both types of PEs (Fig. 3).



**Fig. 2.** Nyquist plots for PEO and PAN PEs. Electrode surface  $S=2\text{cm}^2$ . The equivalent circuit for both plot types is shown in the right picture.



**Fig. 3.** Surface layer time-evolution given for PEO and PAN PEs in contact to Li and Ni electrodes.

Along with this, Li-metal/PEO interphase stability has been studied during time-evolution for solid  $\text{PEO}(\text{LiClO}_4)_{20}$  PE at a temperature above the glass phase transition ( $T_g$ ) at  $60^\circ\text{C}$ . As for the solid PEO the semicircle related to the surface layer resistance (on the Nyquist plot) increased over time and accessed to the plateau after more than 48 hours, indicating the SEI growth and its time stabilization.

As observed from the XPS spectra of C1s and O1s for PEO/Li surface it can be assumed that the process of PEO polymer reduction during lithium metal PVD occurs. The interaction of lithium with PEO produces lithium oxide  $\text{Li}_2\text{O}$ , thus destroying the C–O bond in the PEO polymer; the formation of a large number of C=C bonds in  $\text{sp}^2$  hybridization is possibly related to groups relating to ethylene  $\text{C}_2\text{H}_4$  compound.

According to the C1s and N1s XPS spectra for PAN/Li surface, polymer degradation products have been detected. In C1s there is the C–C peak growing along with lithium deposition; on the N1s spectrum there are both lithium – nitrogen Li–N bond component and a wide peak, most likely related to a large number of different nitrogen compounds that might be associated with PAN polymer degradation.

### Conclusions

Complete analysis of the obtained dataset shows that combination of above mentioned electrochemical techniques with *in situ* XPS allows to obtain information about the composition and properties of *in situ* formed polymer/lithium surface layers. Furthermore we can assess how SEI composition effects on its transport properties, chemical stability during storage and electrochemical stability under polarization potential. All this can help to develop new perspective polymer electrolytes for lithium-metal battery sources in future.

### References

1. Peled E., Menkin S.: *J. Electrochem. Soc.* *164*, A1703 (2017).
2. Bieker G., Winter M., Bieker P.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* *17*, 8670 (2015).
3. Xu W., Wang J. L., Ding F., Chen X. L., Nasybutin E., Zhang Y. H., Zhang J. G.: *Energ. Environ. Sci.* *7*, 513 (2014).
4. Aurbach D.: *J. Power. Sources* *89*, 206 (2000).
5. Cheng X. B., Zhang R., Zhao C. Z., Wei F., Zhang J. G., Zhang Q.: *Adv. Sci.* *3* (2016).
6. Peled E., Golodnitsky D., Ardel G., Eshkenazy V.: *Electrochim. Acta* *40*, 2197 (1995).
7. Stephan A. M.: *Eur. Polym. J* *42*, 21 (2006).
8. Zhang Q. Q., Liu K., Ding F., Liu X. J.: *Nano Res.* *10*, 4139 (2017).
9. Varzi A., Raccichini R., Passerini S., Scrosati B.: *J. Mater. Chem. A* *4*, 17251 (2016).

## Manufacture of Patterned Copper Foam Electrodes Employing 3D Printed Masks

Eva Vaněčková <sup>a</sup>, Táňa Sebechlebská <sup>a,b</sup>, Violetta Shestivska <sup>a</sup>, and Viliam Kolivoška <sup>a</sup>

<sup>a</sup> J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: viliam.kolivoska@jh-inst.cas.cz

<sup>b</sup> Department of Physical and Theoretical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská Dolina, Ilkovičova 6, 84215 Bratislava 4, Slovakia

### Abstract

Copper foams fabricated by hydrogen template-assisted electroplating were recently used as electrodes for the electrochemical reduction of carbon dioxide to selectively form C<sub>2</sub> products. So far, copper foams were generated on planar copper surfaces and copper meshes. In this work, we employ fused deposition modeling 3D printing to form polylactic acid based microstructures to serve as masks to form patterned copper foams. We demonstrate that masks are stable and lead to the formation of copper foam microarrays of tunable dimensions. Such structures may potentially lead to large-area working electrodes in reactors designed for the electrochemical reduction of carbon dioxide.

**Key words:** 3D printing, Fused deposition modeling, Electroplating, Copper electrodes.

### Introduction

Rapidly increasing level of atmospheric carbon dioxide calls for the development of technologies aimed at its capture and conversion to reusable organic compounds, allowing the carbon cycle to be closed. Electrochemical reduction of carbon dioxide, especially when powered by electricity generated from renewable sources, is an environmentally friendly process enabling the production of organic fuels and feedstock chemical under ambient conditions. Copper foams fabricated by hydrogen template-assisted electroplating combine virtues of high electrocatalytic selectivity of copper towards organic products with large surface to volume ratio due to their porous structure <sup>1</sup>.

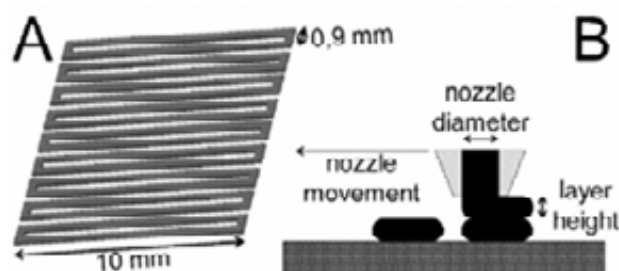
3D printing refers to approaches that form solid objects of tunable shape and dimensions in a layer-by-layer manner <sup>2</sup>. First applications of 3D printing technologies in electrochemical research involve prototyping reaction vessels as inexpensive and easy-to-make alternatives to conventional glass cells. Proposed designs aimed at applications involving electrolysis <sup>3</sup> electrosynthesis <sup>4</sup>, spectroelectrochemistry <sup>5</sup>, electroanalysis <sup>6</sup> and photoelectrocatalysis <sup>7</sup>. Fused deposition modeling (FDM, Figure 1B) is the most common 3D printing technique based on the extrusion of a molten plastic material through a nozzle. Recent advancements have allowed electrodes from conductive polymer/carbon composites to be manufactured by FDM <sup>8-12</sup>. It was demonstrated that such electrodes may be selectively modified with metals by the process of electroplating <sup>13-14</sup> and potentially serve as alternative to conventional metallic electrodes.

In this work, we explore an idea of employing FDM 3D printing technology to manufacture polymer microstructures to be used as masks for the hydrogen template-assisted electroplating to achieve patterned copper foams as substrates for electrochemical reduction of carbon dioxide. We optimize printing conditions and show that fabricated microstructures are stable and result in the formation of copper foam microarrays of predictable dimensions and shapes.

### Experimental part

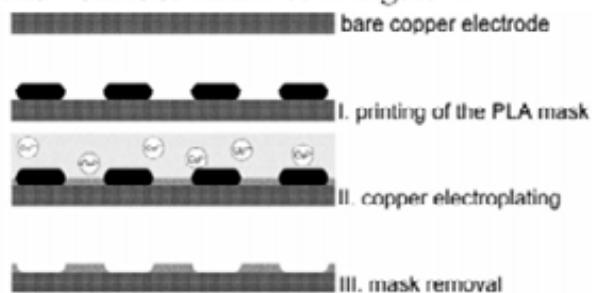
MilliQ deionized water (Millipore, France, minimum electric resistivity 18.2 M $\Omega$ .cm, maximum 3 ppb TOC) was used throughout all measurements.

Shapes of polymer masks to be fabricated by the FDM 3D printing were sketched in the Fusion 360 computer assisted design (CAD) software. All designs involved a single printed layer. Mathematical models created by CAD (Figure 1A) were subsequently exported to Slic3e Prusa Edition software which converts models to actual instructions for the 3D printer (Prusa I3MK3, Prusa Research, Czech Republic). All masks were printed from the polylactic acid (PLA) filament (diameter of 1.75 mm, purchased from Gembird, The Netherlands) employing nozzle with diameter of 250  $\mu$ m (Prusa Research, Czech Republic) and layer height of 100  $\mu$ m.



**Fig. 1.** (A) Geometry of the microstructure serving as the mask for copper foam electroplating (CAD drawing). (B) Schematics of FDM 3D printing technique.

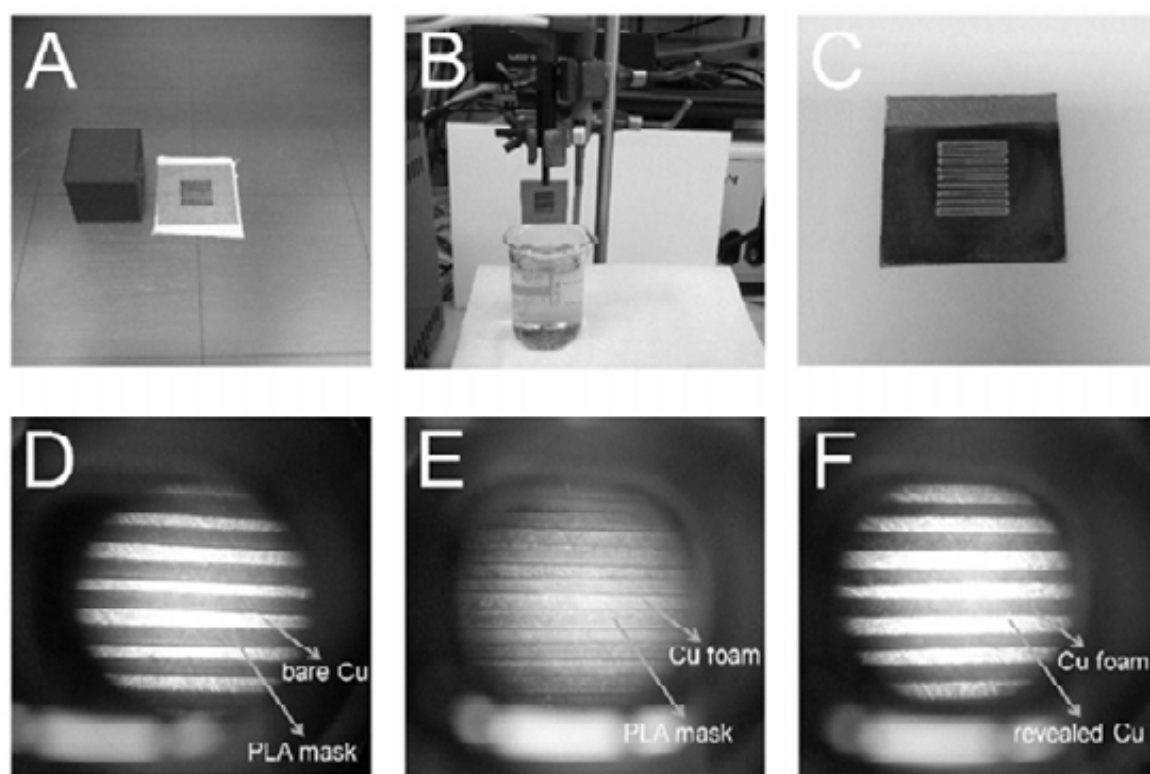
Substrates to be modified with PLA masks by 3D printing were prepared by mechanical cutting of copper sheets (Sigma Aldrich, 99.98 %, thickness 0.5 mm). All substrates possessed dimensions of 2.0 cm x 2.0 cm. They were rinsed with de-ionized water, dried in the air and mounted to the heatbed (heated platform) of the 3D printer by a double-side adhesive tape. During the printing procedure, the nozzle temperature was kept at 210  $^{\circ}$ C in accordance with default settings for PLA filaments. The heatbed temperature of 60  $^{\circ}$ C routinely employed for PLA filaments was applied, but such printed masks were found to detach from the copper substrate. By further optimization of the printing procedure it was discovered that masks adhere sufficiently to the copper substrate when the heated temperature is elevated to 90  $^{\circ}$ C. This temperature was further applied throughout all printing procedures. The copper substrate patterned with the PLA mask was immersed into aqueous 0.1 M copper sulfate solution serving as the electroplating bath. Interfacial air cavities were removed by the ultrasound. The substrate was then connected as cathode to the DC power supply (Aritma, Czech Republic) with a copper rod served as an anode. The voltage of 6.0 V was applied to the circuit for 10 s. Such modified substrate was then taken out from the electroplating bath, copiously rinsed with de-ionized water and dried in the air. The PLA mask was removed from the copper substrate by a scalpel blade. The entire experimental procedure used in this work is summarized in Figure 2.



**Fig. 2.** Schematics of the procedure to manufacture patterned copper foam electrodes.

## Results and discussion

The extrusion of the PLA filament employing the nozzle and the heat-bed temperature of 210 °C and 90 °C, respectively was found to reproducibly generate mechanically stable PLA masks with sufficient adhesion to the copper substrate. Figure 3 shows large scale photographs and optical micrographs of modified copper substrates corresponding to manufacturing steps I to III delineated in Figure 2. Figure 3A depicts the copper substrate upon printing the PLA mask. Detailed inspection of the modified substrate by optical microscopy (Figure 3D) demonstrates that extruded stripes of PLA (appearing as dark) are uniform and evenly spaced. Bare regions of the copper surface appear as shiny domains. Upon subjecting such modified substrate to the electroplating procedure (Figure 3B) followed by rinsing and drying, bare regions of copper are covered by copper foam and appear as opaque in the optical micrograph (Figure 3E). Upon removing the PLA mask, exposed bare regions and areas modified by the copper foam may easily be distinguished (Figure 3C and F). Results of experiments with varied geometrical arrangement of PLA masks (photographs and micrographs not shown) lead to the conclusion that bordelines between bare and electroplated regions precisely copy the geometry of mask.



**Fig. 3.** Large scale photographs (A,B,C) and optical micrographs (D,E,F) of the copper substrate upon 3D printing of the PLA mask (A,D), upon performing the electroplating procedure (B,E) and upon removing the PLA mask (C,F).

## Conclusions

In this work, we devised and optimized the fused deposition modeling 3D printing procedure to manufacture polylactic acid based microstructures to be used as masks for the hydrogen template-assisted electrodeposition of copper foams. We demonstrate that fabricated microstructures are stable and result in the formation of patterned copper foam microarrays of desired dimensions. Formed copper foams will be further examined by conductive probe atomic force microscopy<sup>15,16</sup> to explore their morphology and electrical properties at the

nanoscale. Subsequently they will be used as working electrodes to reduce carbon dioxide dissolved in aqueous media. The height of the copper foam ridges will be tuned with the goal of achieving large scale working electrodes to further enhance the area of the electrode/electrolyte interface.

### Acknowledgements

Support from Czech Science Foundation (18-09848S) is gratefully acknowledged.

### References

1. Dutta A., Ramahan M., Luedi N. C., Mohos M., Broekmann P.: *ACS Catal.* **6**, 3804 (2016).
2. Ngo T. D., Kashani A., Imbalzano G., Nguyen K. T. Q., Hui D.: *Compos. Part B-Eng.* **143**, 172 (2018).
3. Chisholm G., Kitson P. J., Kirkaldy N. D., Bloor L. G., Cronin L.: *Energy Environ. Sci.* **7**, 3026 (2014).
4. Guima K.-E., Alencar L. M., da Silva G. C., Trindade M. A. G., Martins C. A.: *ACS Sustainable Chem. Eng.* **6**, 1202 (2018).
5. Achilli E., Minguzzi A., Visibile A., Locatelli C., Vertova A., Naldoni A., Rondinini S., Auricchio F., Marconi S., Fracchia M., Ghigna P.: *J. Synchrotron Rad.* **23**, 622 (2016).
6. Bishop G. W., Satterwhite J. E., Bhakta S., Kadimisetty K., Gillette K. M., Chen E., Rusling J. F.: *Anal. Chem.* **87**, 5437 (2015).
7. Mousset E., Weiqi V. H., Kai B. F. Y., Koh J. S., Tng J. W., Wang Z., Lefebvre O.: *J. Mater. Chem. A* **5**, 24951 (2017).
8. Kwok S. W., Goh K. H. H., Tan Z. D., Tan S. T. M., Tjiu W. W., Soh J. Y., Ng Z. J. G., Chan Y. Z., Hui H. K., Goh K. E. J.: *Appl. Mater. Today* **9**, 167 (2017).
9. Browne M. P., Novotný F., Sofer Z., Pumera M.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 40294 (2018).
10. Cardoso R. M., Mendonça D. M. H., Silva W. P., Silva M. N. T., Nossol E., da Silva R. A. B., Richter E. M., Muñoz R. A. A.: *Anal. Chim. Acta*, **1033**, 49 (2018).
11. Palenzuela C. L. M., Novotný F., Krupička P., Sofer Z., Pumera M.: *Anal. Chem.* **90**, 5753 (2018).
12. dos Santos P. L., Katie V., Loureiro H. C., dos Santos M. F., dos Santos D. P., Formiga A. L. B., Bonacin J. A.: *Sens. Actuator. B-Chem.* **281**, 837 (2019).
13. O'Neil G. D., Ahmed S., Halloran K., Janusz J. N., Rodriguez A., Rodriguez I. M. T.: *Electrochem. Commun.* **99**, 56 (2019).
14. Hudkins J.R., Wheeler D.G., Pena B., Berlinguette C.P.: *Energy Environ. Sci.* **9**, 3417 (2016).
15. Mohos M., Pobelov I. V., Kolivoška V., Mészáros G., Broekmann P., Wandlowski T.: *J. Phys. Chem. Lett.* **5**, 3560 (2014).
16. Pobelov I. V., Mohos M., Yoshida K., Kolivoška V., Avdic A., Lugstein A., Bertagnolli E., Leonhardt K., Denuault G., Gollas B., Wandlowski T.: *Nanotechnology* **24**, 115501 (2013).



## Simultaneous Measurement of Single Molecule Conductance and Thermopower (Simultánne meranie elektrickej vodivosti a Seebeckovho koeficientu jednotlivých molekúl)

František Vavrek <sup>a</sup>, Olena Butsyk <sup>a,b</sup>, Viliam Kolivoška <sup>a</sup>, Štěpánka Nováková Lachmanová <sup>a</sup>,  
Táňa Sebechlebská <sup>a,c</sup>, and Magdaléna Hromádová <sup>a</sup>

<sup>a</sup> J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova  
3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: frantisek.vavrek@jh-inst.cas.cz

<sup>b</sup> Institute of Physics of the Czech Academy of Sciences, Na Slovance 2, 182 21 Prague 8,  
Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Physical and Theoretical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius  
University in Bratislava, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava 4, Slovakia

### Abstract

The results of conductance and thermopower measurements of single molecule junctions of selected species of organic molecules are presented. The contribution of this work is to introduce a novel experimental setup built on a scanning tunneling microscope-based break-junction technique being able to perform accurate and reproducible measurements of both conductance and thermopower simultaneously within a single experiment. We demonstrate that values of measured parameters of single molecule junctions obtained by this technique are in good agreement with results previously reported in the literature.

**Key words:** Molecular electronics, Single molecule conductance, Single molecule thermopower, Scanning tunneling microscope break-junction technique.

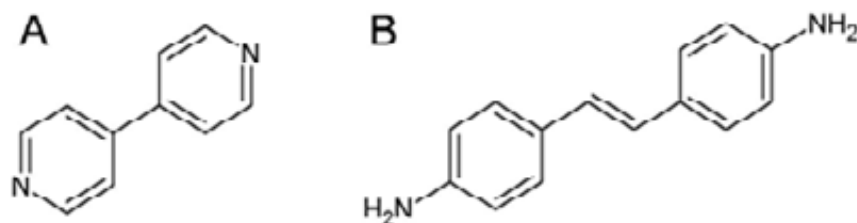
### Úvod

Celosvetový trend vo vývoji modernej výpočtovej techniky neustále smeruje ku zmenšovaniu (miniaturizácii) v nich používaných elektronických súčiastok, najmä v prípade integrovaných obvodov. Možnosť vtesnať väčší počet prvkov integrovaného obvodu na postupne menšiu plochu má za následok nielen zníženie príkonu obvodu, ale aj možnosť dosiahnuť vyššiu operačnú frekvenciu, a teda rýchlosť. Na druhú stranu, pokusy o neustálu miniaturizáciu integrovaných obvodov začínajú narážať nielen na rozmerové limity v súčasnosti najpoužívanejšej výrobnéj technológii CMOS, ale aj na problém chladenia takto vyrobených obvodov, čo má výrazný vplyv na ich funkčnosť a spoľahlivosť. Tieto, ale aj iné dôvody majú za následok hľadanie nových, alternatívnych výrobných technológií. Jednou z možných ponúkaných alternatív je molekulárna elektronika, teda použitie molekúl vhodných vlastností ako pasívnych alebo aktívnych prvkov elektronických súčiastok, pričom jedna z jej podoblastí – organická elektronika – sústreďuje svoju pozornosť na použitie organických molekúl.

Pri hľadaní potenciálne vhodných organických molekúl na konkrétne aplikácie je nevyhnutné štúdium ich elektrických vlastností. Uvedené vlastnosti vieme v kombinácii s teoretickými modelmi študovať pomocou fyzikálnych veličín elektrickej vodivosti  $G$  a Seebeckovho koeficientu  $S$  <sup>1</sup>. Za účelom určenia hodnôt týchto veličín boli vykonané experimentálne merania, realizované prostredníctvom upravenej metódy merania elektrickej vodivosti jednotlivých molekúl založenej na tzv. "break-junction" technike merania pomocou skenovacieho tunelového mikroskopu (STM-BJ) <sup>2</sup>, modifikovanej o schopnosť simultánneho merania Seebeckovho koeficientu molekúl v rámci jedného experimentu.

Cieľom tohto príspevku je bližšie predstavenie spomenutej techniky merania, demonštrácia jej presnosti a reprodukovateľnosti získaných experimentálnych výsledkov. Za týmto účelom boli pomocou STM-BJ techniky vykonané merania hodnôt elektrickej vodivosti a

Seebeckovho koeficientu molekulových štruktúr 4,4'-bipyridínu a 4,4'-diaminostilbénu (Obr. 1). Dané molekulové štruktúry boli zvolené z dôvodu nenáročnej prípravy meracích vzoriek a relatívne jednoduchého priebehu merania vzoriek. V oboch prípadoch je známa a dobre určená hodnota elektrickej vodivosti<sup>3-9</sup> a Seebeckovho koeficientu<sup>6,7,9,10</sup>.



**Obr. 1** Chemická štruktúra 4,4'-bipyridínu (**A**) a 4,4'-diaminostilbénu (**B**).

### Experimentálna časť

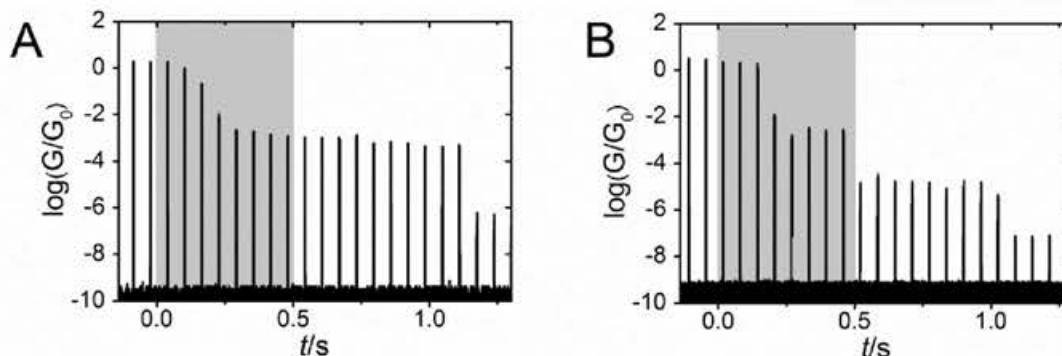
Laboratórne sklo na prípravu vzoriek, ako aj zlatá polykryštalická podložka (rozmery  $10 \times 10 \times 1$  mm, 99,95 %, Goodfellow, Veľká Británia) s prítaveným zlatým drôtom slúžiaca ako substrát, teflónové meracie cely vlastnej výroby a tesniace O-krúžky Kalrez (Dupont, USA), používané počas STM-BJ experimentov, boli vyčistené vyvarením v kyseline dusičnej (65 % p.a., Lach-Ner, ČR) nariadenej do koncentrácie 25 % ultra čistou vodou (merný elektrický odpor min.  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ , obsah organického uhlíka max. 3 ppb, Milli-Q Integral 5, Merck Millipore, Francúzsko). Laboratórne sklo, teflónové cely a tesniace O-krúžky boli následne opakovane vyvarené v ultra čistej vode a cez noc vysušené pri teplote  $120^\circ\text{C}$ . Zlatý substrát bol dôkladne opláchnutý ultra čistou vodou a až do okamihu použitia v experimente uskladnený vo vhodnej kadičke, ponorený v ultra čistej vode. Na prípravu meracích vzoriek molekúl **A** a **B** boli použité komerčne dostupné chemikálie (**A**: 4,4'-bipyridín, purum, >99 %, Fluka AG, Švajčiarsko; **B**: 4,4'-diaminostilbén dihydrochlorid, 95 %, Sigma Aldrich, USA). Roztok látok **A** alebo **B** s koncentráciou  $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  v etanole (absolútny p.a., Penta, ČR) bol nanosený metódou "drop-casting" na čerstvo vyžihnaný substrát. Následne bol substrát vysušený prúdom plynného dusíka (99,996 %, Messer) a umiestnený do STM-BJ prístroja.

Merania vzoriek boli vykonané pomocou metódy STM-BJ s využitím prístroja Agilent 5500 SPM (Agilent Technologies, USA) s implementovaným bipolárnym logaritmickým I-U prevodníkom so širokým prúdovým dynamickým rozsahom<sup>11</sup>, modifikovaným do podoby pulzného napäťového zdroja, schopného vysokorýchlostného prepínania medzi stavom uzavretého a rozpojeného obvodu na časovej škále rádovo jednotiek ms. Aparatúra bola doplnená o prítokový systém, umožňujúci prítoku ohrevnej/chladiacej kvapaliny cez podložku pod substrátom k dosiahnutiu požadovanej teploty substrátu. Ako pracovná elektróda bol použitý zlatý elektrochemicky leptaný hrot vyrobený z drôtu s priemerom 0,25 mm (99,999 %, Goodfellow, Veľká Británia), pričom druhú elektródu tvoril zlatý substrát s nanosenou vzorkou. Počas experimentu bola pracovná elektróda udržiavaná na izbovej teplote, ktorá bola stotožnená s teplotou vo vnútri experimentálnej aparatúry a meraná skleneným liehovým teplomerom. Teplota substrátu bola určovaná bezprostredne po ukončení experimentu pomocou mobilnej termokamery ThermApp (Opgal Optonic Industries, Izrael). Meranie prebiehalo v pulznom režime s periódou pulzov zdroja napätia 60 ms a šírkou pulzu 3 ms, pričom hodnota napätia  $U_{bias}$  dodávaná zdrojom do obvodu v uzavretom stave bola rovná  $U_{bias} = 130 \text{ mV}$  po dobu 3 ms. Počas 60 ms napätie  $U_{bias}$  bolo vypnuté a následne generované termoelektrické napätie  $V_{th}$  bolo monitorované. Týmto spôsobom bolo možné simultánne merať prúd v širokom dynamickom rozsahu v uzavretom elektrickom obvode pri vložení napätia  $U_{bias}$  a tiež  $V_{th}$  v podmienkach odpojeného zdroja napätia. Vzhľadom na

relatívne nízku hodnotu  $U_{bias}$ , namerané hodnoty elektrického prúdu boli prepočítané na hodnoty elektrickej vodivosti  $G$  s využitím Ohmovho zákona podľa vzťahu  $I = GU_{bias}$ .

### Výsledky a diskusia

Obrázok 2 znázorňuje hodnoty  $\log(G/G_0)$  namerané počas tvorby spojenia elektróda-molekula-elektroda pre molekuly **A** a **B**, kde  $G_0$  predstavuje kvantum vodivosti zlata s hodnotou  $77,5 \mu\text{S}$ . Pre oba systémy v Obr. 2 je pozorovaný vznik atomárneho spojenia zlata, pre ktoré je hodnota  $\log(G/G_0) \approx 0$ . V prípade oboch molekúl boli pozorované dve platá s konštantnou vodivosťou, ktoré predstavujú dva rôzne stavy spojenia elektróda-molekula-elektroda. V prípade simultánneho merania vodivosti molekúl **A** a **B** a Seebeckovho koeficientu sme sa v tejto práci zamerali na stav s vyššou hodnotou vodivosti  $G$ .



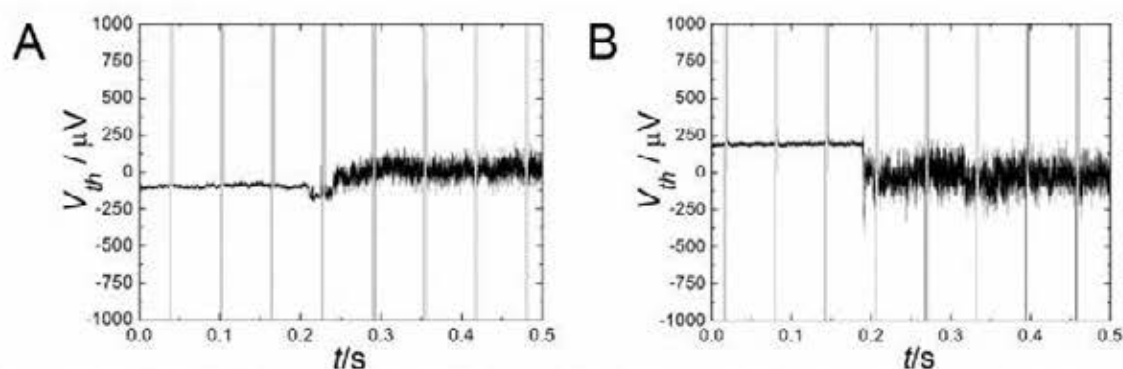
**Obr. 2** Graf hodnôt elektrickej vodivosti  $G$  v závislosti na čase, znázornené ako dekadický logaritmus podielu  $G/G_0$ , kde  $G_0 = 77,5 \mu\text{S}$  je kvantum elektrickej vodivosti. Oblasti zvýraznené šedou farbou znázorňujú prechod z atomárneho zlatého kontaktu, reprezentovaného hodnotou  $\log(G/G_0) \approx 0$ , k tvorbe spojenia elektróda-molekula-elektroda pre molekulu **A** (vľavo) a **B** (vpravo).

Experimentálne sa dá z hodnôt nameraných termoelektrických napätí  $V_{th}$  určiť hodnota Seebeckovho koeficientu  $S$  podľa vzťahu<sup>12</sup>

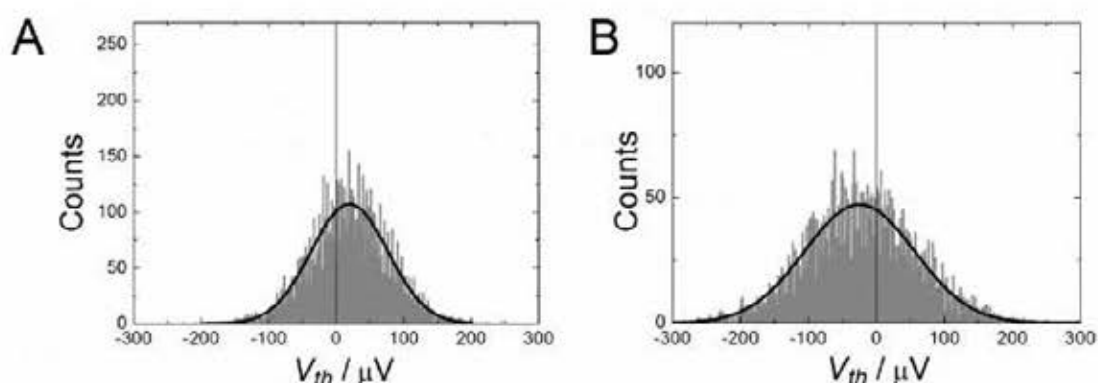
$$S = S_{Au} - \frac{V_{th}}{\Delta T}$$

kde  $S_{Au} = 1,94 \mu\text{V K}^{-1}$  je Seebeckov koeficient zlata a  $\Delta T$  je teplotný rozdiel medzi substrátom a zlatým hrotom. V obrázku Obr. 3 sú zaznamenané hodnoty termoelektrického napätia, odpovedajúce simultánnemu meraniu  $\log(G/G_0)$  spojenia elektróda-molekula-elektroda a jeho časovému vývoju zobrazenému v šedom poli na Obr. 2.

Hodnoty termoelektrických napätí  $V_{th}$ , odpovedajúce premosteniu molekuly medzi dvomi zlatými elektródami, boli štatisticky spracované a histogramy najpravdepodobnejších hodnôt sú na Obr. 4. V oboch prípadoch boli spracované hodnoty  $V_{th}$  pre stav spojenia elektróda-molekula-elektroda dávajúci vyššiu hodnotu vodivosti. Podobným spôsobom sa dá analyzovať  $V_{th}$  pre stav s nižšou vodivosťou v jednom súbore meraní a tiež pre atomárny zlatý kontakt.



**Obr. 3** Graf hodnôt termoelektrického napätia  $V_{th}$  v závislosti na čase v priebehu tvorby spojenia elektróda-molekula-elektroda pre molekulu **A** pri  $\Delta T = 310,5 \text{ K} - 301 \text{ K} = 9,5 \text{ K}$  (vľavo) a molekulu **B** pri  $\Delta T = 308 \text{ K} - 299,5 \text{ K} = 8,5 \text{ K}$  (vpravo).



**Obr. 4** Histogram hodnôt termoelektrického napätia  $V_{th}$  meraných počas doby existencie spojenia elektróda-molekula-elektroda z Obr. 3 pre molekulu **A** (vľavo) a **B** (vpravo). Čierne línie predstavujú fit experimentálnych dát Gaussovou rozdeľovacou funkciou.

Pre molekulu **A** bola nameraná pozitívna hodnota  $V_{th} = 19,5 \mu\text{V}$  a pre molekulu **B** hodnota negatívna  $V_{th} = -24,9 \mu\text{V}$ . Z týchto hodnôt je zjavné, že 4,4'-bipyridín (**A**) má negatívny Seebeckov koeficient, pričom molekula 4,4'-diaminostilbénu (**B**) vykazuje pozitívny Seebeckov koeficient. Pravdaže, pre určenie najpravdepodobnejšej hodnoty Seebeckovho koeficientu pre dané molekuly by bolo treba uvedeným spôsobom vyhodnotiť hodnoty termoelektrického napätia  $V_{th}$  zo štatisticky významného súboru individuálnych meraní uvedených v Obr. 2 a 3 pri rôznych hodnotách teplotného rozdielu  $\Delta T$ .

### Záver

Cieľom tejto práce bolo ukázať novú techniku simultánneho merania vodivosti jednotlivých molekúl a Seebeckovho koeficientu. Podľa dostupnej literatúry<sup>6,7</sup> má molekula **A** negatívnu hodnotu Seebeckovho koeficientu a molekula **B** hodnotu pozitívnu. Pre reprezentatívne spojenie elektróda-molekula-elektroda pre molekulu **A** bola získaná pozitívna hodnota termoelektrického napätia  $V_{th}$  a pre molekulu **B** hodnota negatívna. Toto meranie teda ukazuje, že uvedená metóda je schopná určiť hodnotu Seebeckovho koeficientu. Upresnená číselná hodnota by mala byť určená pri niekoľkých hodnotách  $\Delta T$  a po analýze väčšieho počtu experimentálnych hodnôt termoelektrického napätia. Navrhnutá metóda sa dá jednoduchým spôsobom automatizovať a predstavuje nový inovatívny spôsob simultánneho merania vodivosti jednotlivých molekúl  $G$  a ich Seebeckovho koeficientu  $S$ .

## Acknowledgements

Táto práca vznikla s podporou projektu GAČR číslo 18-04682S.

## References

1. Hromadová M., Kolivoška V., In: *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry* (Wandelt K., ed.), Vol. 5, p. 271. Elsevier, New York 2018.
2. Xu B., Tao N. J.: *Science* *301*, 1221 (2003).
3. Quek S. Y., Kamenetska M., Steigerwald M. L., Choi H. J., Louie S. G., Hybertsen M. S., Neaton J. B., Venkataraman L.: *Nat. Nanotechnol.* *4*, 230 (2009).
4. Widawsky J. R., Kamenetska M., Klare J., Nuckolls C., Steigerwald M. L., Hybertsen M. S., Venkataraman L.: *Nanotechnology* *20*, 434009 (2009).
5. Makk P., Tomaszewski D., Martinek J., Balogh Z., Szabolcs C., Wawrzyniak M., Frci M., Venkataraman L., Halbritter A.: *ACS Nano* *6*, 3411 (2012).
6. Widawsky J. R., Darancet P., Neaton J. B., Venkataraman L.: *Nano Lett.* *12*, 254 (2012).
7. Kim T., Darancet P., Widawsky J. R., Kotiuga M., Quek S. Y., Neaton J. B., Venkataraman L.: *Nano Lett.* *14*, 794 (2014).
8. Brooke R. J., Jin C. J., Szumski D. S., Nichols R. J., Mao B.-W., Thygesen K. S., Swartzacher W.: *Nano Lett.* *15*, 275 (2015).
9. Rincón-García L., Evangeli C., Rubio-Bollinger G., *Agarwal* N.: *Chem. Soc. Rev.* *45*, 4285 (2016).
10. Kim T.: *J. Korean Phys. Soc.* *67*, 1553 (2015).
11. Mészáros G., Li Ch., Pobelov I. V., Wandlowski T.: *Nanotechnology* *18*, 424004 (2007).
12. Baheti K., Malen J. A., Doak P., Reddy P., Jang S.-Y., Tilley T. D., Majumdar A., Segalman R. A.: *Nano Lett.* *8*, 715 (2008).

## Boron Doped Diamond Electrodes: the Effect of Hierarchical Nanostructuring

Marian Vojs<sup>a</sup>, Vlastimil Řeháček<sup>a</sup>, Andrea Vojs Staňová<sup>b,c</sup>, Erika Medvecká<sup>b</sup>, Miroslav Behúl<sup>a</sup>, Pavol Michniak<sup>a</sup>, Pavel Škvára<sup>b</sup>, and Marián Marton<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Slovak University of Technology, Faculty of Electrical Engineering and Information Technology, Institute of Electronics and Photonics, Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava, Slovakia

<sup>b</sup> Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Analytical Chemistry, Mlynská Dolina - Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak Republic

<sup>c</sup> University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Zatisi 728/II, 389 25 Vodňany, Czech Republic

### Abstract

In this study, the electrochemical properties of hierarchically nanostructured boron-doped diamond (BDD) electrodes (BDDE) were investigated. Wet etching and plasma technique was used to etch silicon substrate and surface of BDD to produce nanostructures with dimensions ranging from tenths to hundreds of nm in width and height, located on pyramids with micrometres dimensions. The obtained nanostructured surface influenced the electrochemical potential window and current density of electrodes. Voltammetric behavior of structured BDD was studied for determination of potential window and redox reaction  $K_4[Fe(CN)_6]$ .

**Key words:** Boron doped diamond (BDD), Nanostructuring, Waste water treatment

### Úvod

Voda, ako zdroj života, je nevyhnutná nielen pre ľudský organizmus, ale aj životný cyklus organizmov v prírode. Z pohľadu využitia vody v priemysle, v poľnohospodárstve, v rybárstve, v domácnosti a podobne sa kladú nielen na kvalitu vody viaceré požiadavky, ale aj na samotný zdroj vody. Vplyvom vonkajších vplyvov (odvodnenie, priehrady, rozvoj miest, priemyselné znečistenia, pesticidy používané v poľnohospodárstve a pod.) sa kvalita vody z pohľadu znečistenia mení. Preto sa na vodné hospodárstvo budú v blízkej budúcnosti klást' extrémne požiadavky.

Hlavný problém v odpadových vodách, je že v priemysle vzniká množstvo syntetických produktov (farbivá, chemikálie, pesticidy, legálne či ilegálne drogy, liečivá, a pod.)<sup>1</sup>. Problém v odstraňovaní týchto látok je zakorenený v princípe odstraňovania látok v klasických čistiarňach odpadových vôd. Ich princíp činnosti postavený na mechanickom a následnom biologickom rozklade znečistenia si nevie poradiť s týmito umelými látkami<sup>2</sup>.

Bórom dopovaný diamant je využívaný nielen v elektroanalytickej chémii, ale aj pri čistení odpadových vôd vďaka vlastnostiam ako: a) široké elektrochemické potenciálové okno vo vodných elektrolytoch - charakteristická vlastnosť, ktorá umožňuje bórom dopované elektródy (BDDE) využiť na priamu oxidáciu pri vysokých potenciáloch (+1,5 až 1,8 V vs. Ag/AgCl), kvôli nízkej katalytickej aktivite BDDE a pre oblasti generovania pokročilých oxidačných produktov ( $OH^\cdot$ ,  $O_3$ ,  $O$ ), b) vysoká chemická stabilita pre dlhodobé používanie, c) morfológická a mikroštruktúrna stabilita pri extrémnych anodických a katodických potenciáloch pri vysokých prúdových hustotách vďaka vysokej stabilite  $sp^3$ -viazaného uhlíka. Povrchová morfológia a pomer  $CH_4/H_2$  a B/C v plynnej fáze sú jedny zo základných parametrov rastu BDD vrstiev, ktoré vplyvajú na vodivosť a šírku potenciálového okna<sup>3</sup>. Štúdium prípravy vysoko-dopovaných BDDE pomocou veľkoplošnej ( $20 \times 30 \text{ cm}^2$ ) depozičnej

techniky využívajúcej mikrovlnné budenie plazmy pomocou lineárnych antén (LA MWCVD) a modifikácii povrchu BDD je preto nevyhnutné v záujme dosiahnutia vyššej efektivity degradácie polutantov.

V rámci tohto príspevku sme sa venovali vplyvu hierarchického štruktúrovania povrchu pozostávajúceho zo štruktúrovania Si substrátu a nano-štruktúrovania BDD vrstiev ako nástroja na zväčšenie potenciálového okna s možnosťou zvýšenia prídovej zaťažiteľnosti elektródy. Vplyv leptania na morfológiu BDD sme sledovali SEM mikroskopom a elektrochemické vlastnosti elektród cyklickou voltampérometriou.

### Experimentálna časť

Na štúdium vplyvu štruktúrovania BDD sme pripravili štyri typy Si(100) substrátov ( $10 \times 10 \text{ mm}^2$ ) s dvoma povrchovým úpravami a ich kombináciou. Prvá sada substrátov (ozn. sSi) pozostávala vytvorením pyramídálneho charakteru Si substrátu leptaním povrchu v roztoku KOH, izopropylaloholu (IPA) a demineralizovanej vody v pomere 1:6:30 (5g, 30ml, 275ml) za stáleho miešania počas 45 minút pri teplote  $90^\circ\text{C}$ . Druhá sada substrátov (ozn. sBDD) pozostávala z nanoštruktúrovania narastenej BDD vrstvy plazmatickým leptaním v kyslíkovej plazme ( $\text{O}_2=100 \text{ sccm}$ ,  $P=200 \text{ W}$ ) RIE RF plazmatickom systéme (PE-200, Plasma etch, USA) 30 min. pri 6 Pa.

Proces prípravy BDD vrstiev pozostával z troch krokov: *I. Čistenie substrátov:* Čistenie prebiehalo 10s v HF, následne v acetóne a IPA v ultrazvukovom kúpeli 10 min a následným oplachom v demineralizovanej vode s osušením v  $\text{N}_2$  plyne. *II. Nukleácia,* Proces nukleácie prebehol v roztoku demineralizovanej vody s nano-diamantovým práškom s veľkosťou diamantových kryštálov do 5 nm 40 min v ultrazvukovom kúpeli. *III. Rast BDD:* Na rast diamantovej polykryštalickej vrstvy bol využitý lineárny plazmatický systém s mikrovlnne budenou plazmou (LA MWPCVD, SCIA cube 300, Nemecko). Rast cca. 700 nm prebiehal 30 hod. s impulzným výkonom 6 kW v zmesi plynov  $\text{H}_2/(\text{H}_2+\text{TMB}(\text{trimetylborán}))/\text{CH}_4$ , kde pomer  $\text{CH}_4 / (\text{H}_2/\text{H}_2+\text{TMB}) = 0,5 \%$  a pomer B/C v plynnej fáze na 4% pri 25 Pa a teplote substrátu  $700^\circ\text{C}$ . Vzdialenosť substrátov a antén bol 6 cm. Diamantové vrstvy boli analyzované elektrónovým rastrovacím mikroskopom (SEM, JEOL 7500f).

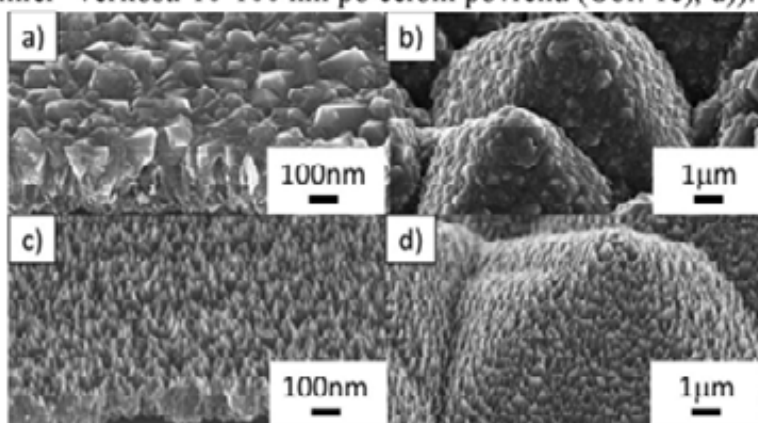
Elektródy na meranie elektrochemických vlastností boli vytvarované izolačným materiálom (piceín) s plochou  $2 \times 2 \text{ mm}^2$  a elektricky pripojené na potenciostat PalmSens (Palm Instruments BV) s kombináciou magnetického miešadla a PC. Ako merací systém sa použilo trojelektrodové zapojenie: referenčná elektróda  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-(3 \text{ M})$  a pomocná Pt ( $10 \times 10 \text{ mm}^2$ ) elektróda.

Všetky chemikálie použité pre prípravu roztokov a základných elektrolytov boli čistoty p. a. s demineralizovanou vodou (Millipore). Zásobné roztoky KCl a  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (Sigma-Aldrich) boli pripravené rozpustením vhodnej navážky v demineralizovanej vode.

### Výsledky a diskusia

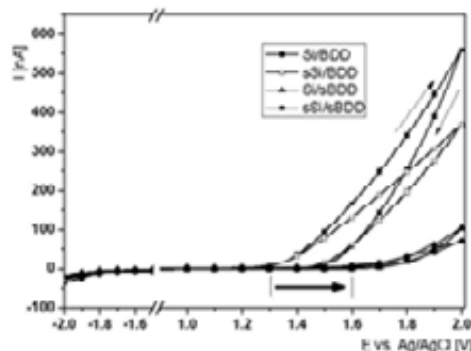
Na Obr. 1. je znázornená povrchová štruktúra vrstiev rôznych pripravených typov štruktúrovania BDD. Prvým krokom bolo porovnanie BDD rasteného na leštenom (Obr. 1a a b) a na mikro-štruktúrovanom Si substráte. Z Obr. 1b) je jasne vidieť, že BDD vrstva homogénne pokrýva Si pyramídy s 5-10  $\mu\text{m}$  základňou s totožnou štruktúrou kryštálov v rozmere cca. 100 nm (NCD (nano-kryštálický diamant)). Výsledkom bolo dosiahnutie niekoľko násobne zvýšeného povrchu (cca. 3x). Následným nano-štruktúrovaním BDD vrstvy

v kyslíkovej RIE plazme bolo na oboch typoch substrátov dosiahnuté vytvorenie diamantových „ihiel“ veľkosti 10-100 nm po celom povrchu (Obr. 1c, d).



**Obr. 1.** SEM obrázky z povrchu BDD: a) Si/BDD, b) sSi/BDD, c) Si/sBDD, d) sSi/sBDD.

Z predchádzajúcich štúdií<sup>3-5</sup> sme zistili, že vplyvom zvyšovania B/C sa sice zvyšuje vodivosť vrstiev, ale aj zásadným spôsobom znižuje potenciálové okno (B/C 2%,  $E_a=+1,55$  V,  $E_c=-1,1$  V). Na určenie potenciálového okna vysoko dopovaných pracovných elektród v závislosti od štruktúrovania sme využili CV záznam v 0,1M KCl ( $v=50$  mV/s), kde šírku okna sme určili ako 10-násobok priemerného signálu pozadia (200 nA) v rozsahu  $\pm 1$ V (Obr. 2.). Zásadný vplyv a šírku potenciálového okna má nano-štruktúrovanie povrchu elektródy. Posun o 0,3 V ku kladnejším hodnotám v anodickej oblasti (z 1,3 na 1,6 V) je výrazný, oproti katodickej oblasti, ktorá je bezo zmeny na hodnote -1,8 V voči Ag/AgCl. Vplyv štruktúrovania Si substrátu má za následok zvýšenie prúdu o 45 % pri 2V pre elektródy s neštruktúrovaným BDD a 30% pre štruktúrovaný BDD. Pri nano-štruktúrovanom BDD sa zníži prúd pri 2V z 550nA na 110nA, čo je zapríčinené pomalou výmenou náboja na vysoko potenciálne exponovanom povrchu diamantovej „ihly“.

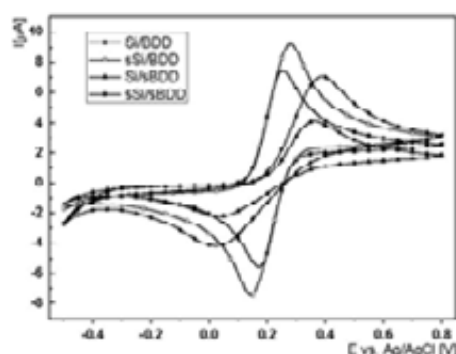


**Obr. 2.** CV voltampérogramy štruktúrovaných BDD vrstiev v roztoku 0,1 M KCl.

Na štúdium elektrochemických vlastností BDDE s rôznym štruktúrovaním bola použitá metóda CV reverzibilného redoxného systému. Na Obr. 3 sú zobrazené cyklické voltampérogramy  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  získané na štruktúrovaných elektródach. Zo záznamov vyplýva, že anodický ( $I_{pa}$ ) i katodický ( $I_{pk}$ ) signál vzrástol o 30% pri porovnaní bez štruktúrovania Si (Si/BDD), resp. so štruktúrovaným Si substrátom (sSi/BDD), ako dôsledok 3-násobného zväčšenia aktívnej plochy. Z lineárneho priebehu  $I_{pa}$  a  $v^{1/2}$  (nezobrazeného tu), vyplýva že sa jedná o difúzne riadenú elektrónovú reakciu ( $\Delta E_p= 135$  mV (Si/BDD), resp. 85 mV (sSi/BDD)).



Vplyv nanoštruktúrovania má za následok spomalenie prenosu náboja a následne aj zväčšenie  $E_p$  o 130 mV (Si/BDD), resp. 340 mV (sSi/BDD). Elektrónová reakcia je riadená rýchlosťou prenosu náboja na heterogénnom rozhraní BDD/elektrolyt.



**Obr. 3.** CV voltampérogramy štruktúrovaných BDD vrstiev v  $1 \times 10^{-3} \text{M } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-3-}$  v roztoku 0,1 M KCl.

### Záver

Cieľom experimentálnej práce bolo štúdium povrchu BDD vrstiev pre prípravu diamantových elektród pre vysokoúčinné degradovanie polutantov. Hlavný dôraz bol kladený na vplyv hierarchického štruktúrovania pozostávajúceho z leptania Si substrátu a vytvorenia Si pyramíd a nano-štruktúrovania BDD na úroveň niekoľko nm s cieľom zväčšenia aktívneho povrchu. Z elektrochemických meraní sa ukázalo, že hlavný vplyv na šírku potenciálového okna (-1,8 až 1,6 V vs. Ag/AgCl) má nano-štruktúrovanie BDD vrstvy pomocou RF RIE leptania v kyslíkovej atmosfére. Zvýšenie prúdového zaťaženia elektródy až o 45 % je možné dosiahnuť štruktúrovaním Si substrátu, a tým získaním väčšej aktívnej plochy. V tomto prípade nano-štruktúrovania nemá pozitívny vplyv na zvýšenie zaťaženia. Štúdiom redoxných procesov na elektróde sa zistil dominantný difúzny prenos náboja pri štruktúrovanom Si substráte a neštruktúrovanom povrchu BDD. Ďalšie štúdium využitia takýchto vrstiev pre proces degradovania polutantov môže mať zásadný vplyv na efektivitu odstraňovania a v neposlednom rade spotrebu elektrickej energie.

### PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená projektami slovenskej Agentúry na podporu výskumu a vývoja (APVV-16-0124, APVV-16-0319), MŠVVaŠ SR VEGA 1/0558/17 a MŠVVaŠ CZ projektami „CENAKVA“(LM2018099), „CENAKVA Center Development“ (No. CZ.1.05/2.1.00/19.0380).

### Literatúra

1. Mackul'ak T., Marton M., Radicova M., Stanova A. V., Grabic R., Birosova L., Nagyova K., Vojs M., Bodik I., Brandeburova P., Gal M.: *Monatsh. Chem.* **148**, 539 (2017).
2. Kondo T., Yajima K., Kato T., Okano M., Terashima C., Aikawa T., Hayase M., Yuasa M.: *Diam. Relat. Mater.* **72**, 13 (2017).
3. Selesovska R., Stepankova M., Janikova L., Novakova K., Vojs M., Marton M., Behul M.: *Monatsh. Chem.* **147**, 1353 (2016).
4. Svorc L., Jambrec D., Vojs M., Barwe S., Clausmeyer J., Michniak P., Marton M., Schuhmann W.: *ACS Appl. Mater. Inter.* **7**, 18949 (2015).
5. Vojs M., Kromka A., Izak T., Skriniarova J., Novotny I., Valent P., Michalka M., Kovacik T., Vesely M.: *J. Phys. Conf. Ser.* **100** (2008).

## Oxidation and Reduction of Selected 1,10-Phenanthrolines

Jakub Wantulok<sup>a</sup>, Romana Sokolova<sup>b</sup>, Jacek Nycz<sup>a</sup>, and Ilaria Degano<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Institute of Chemistry, University of Silesia in Katowice, Szkolna 9, PL-40007 Katowice, Poland, E-mail: jakub.wantulok1@gmail.com

<sup>b</sup> J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic,

<sup>c</sup> University of Pisa, Department of Chemistry and Industrial Chemistry, Via Moruzzi 13, 56124 Pisa, Italy

### Abstract

Derivatives of 1,10-phenanthroline (Phen) are well-known bident ligands which had a lot of interesting applications thanks to their coordination abilities. Selected 1,10-phenanthroline compounds were studied by electrochemical methods. Depending on their different substituents were observed several oxidation and reduction voltammetric peaks. The study involves also *in situ* spectroelectrochemistry, infrared spectroscopy and identification of products by HPLC-DAD and HPLC-ESI MS/MS.

**Key words:** 1,10-Phenanthroline, Electrochemistry, Oxidation mechanism, Reduction mechanism.

### Introduction

The 4,7-dichloro-1,10-phenanthroline derivatives are an interesting group of compounds. Derivatives of 1,10-phenanthroline or their complexes are used in many fields, such as stabilizing agent in the synthesis of nanoparticles, catalysts in homogeneous catalysis and as a semiconductor in organic light-emitting diodes (OLED)<sup>1-3</sup>. Derivatives of 4,7-dichloro-1,10-phenanthroline or their complexes also find their application. Thanks to the built-in chlorine atoms in the 1,10-phenanthroline heterocyclic rings, it is possible to substitute them with various biologically active groups. In the case of the rhenium complex, they exhibit very good luminescence properties<sup>4</sup>.

Electrochemical methods are increasingly used to study oxidation and reduction products of new compounds<sup>5</sup>. It allows to predict the possible processes of their oxidation or reduction and to indicate further possible paths of their functionalization. The aim of this contribution was to investigate the role of substituted fluorine at position C5 and how it affects the potential of the reduction and oxidation peaks.

### Experimental

#### Reagents

Derivatives of 4,7-dichloro-1,10-phenanthroline: 4,7-dichloro-1,10-phenanthroline (**4a**), 5-fluoro-4,7-dichloro-1,10-phenanthroline (**4b**) were synthesized through procedure described in literature<sup>6</sup>. Acetonitrile (anhydrous, 99.8%), and 1,10-phenanthroline (**Phen**) were purchased from Sigma Aldrich, Germany. Tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF<sub>6</sub>), which was used as supporting electrolyte for electrochemical measurements in acetonitrile, was obtained from Sigma Aldrich and was dried before its use.

#### Electrochemical setup

Electrochemical measurements were carried out in 0.1 M TBAPF<sub>6</sub> in acetonitrile. Cyclic voltammetry as well as the exhaustive electrolysis were performed using a PGSTAT 12 AUTOLAB potentiostat (Metrohm, Czech Republic). A three electrode electrochemical cell

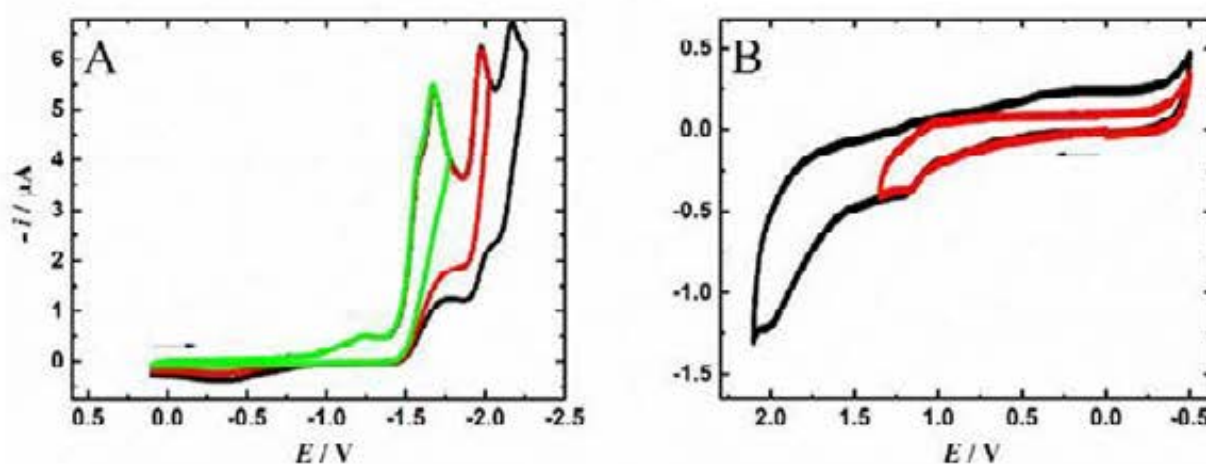
was used with an Ag|AgCl|1M LiCl reference electrode separated from the test solution by a salt bridge (0.44 V against Fc/Fc<sup>+</sup>). The working electrode was a glassy carbon electrode with diameter 0.7 mm. The auxiliary electrode was the platinum net. Oxygen was removed from the solution by passing a stream of argon (99.998%, Messer).

### Results and discussion

Cyclic voltammetry of 4,7-dichloro-1,10-phenanthroline (**4a**) yields four reduction peak at potential range from 0.2 V to -2.3V on glassy carbon electrode. The first irreversible reduction wave occurred at -1.57 V, the peak potential of the second irreversible reduction peak was -1.68 V and two others reduction peaks were obtained at -1.97 V and -2.17 V, respectively (Fig. 1A).

For compound containing fluorine atom at position C5, 5-fluoro-4,7-dichloro-1,10-phenanthroline (**4b**), cyclic voltammetry yields the same number of reduction peaks at potentials to -2.4 V on glassy carbon (Fig. 2A). We can observe developing of two additional reduction peaks in the potential range from -1.2 V to -1.6 V for both compounds, **4a** and **4b**, compare to cyclic voltammetry of **Phen** (Fig. 3). The first irreversible reduction wave for **4b** occurred at -1.47 V. The other reduction peak potentials are -1.63 V, -1.89 V and -2.11 V, respectively (Fig 2A). Cyclic voltammogram of **4b** has a better peak resolution compare to **4a** probably due to the change in the symmetry of the structure and a pronounced inductive effect of fluorine substituent. During a cleavage of chloride<sup>7,8</sup>, a radical Phen• is formed as a precursor to the second electron transfer and its reduction is facilitated for compound **4b**. Two last reduction peaks of **4a** and **4b** correspond to active sites on the 1,10-phenanthroline<sup>9</sup>.

Oxidation properties of studied compounds are similar, both compounds **4a** and **4b** yield one quasireversible one-electron wave at 1.18 V and 1.31 V, respectively. Oxidation of 1,10-phenanthroline ring occurs at 2.0 V (Fig. 1B, 2B, 3B). The latter finding is in the agreement with literature, where oxidation potentials of aromatic hydrocarbons are correlated with their chemical structure. The ease of oxidation increases when  $\pi$  system becomes more extended.



**Fig. 1.** Cyclic voltammograms showing A) reduction and B) oxidation of 0.63 mM **4a**, in 0.1M TBAPF<sub>6</sub> in acetonitrile. Scan rate was 0.1 V/s.

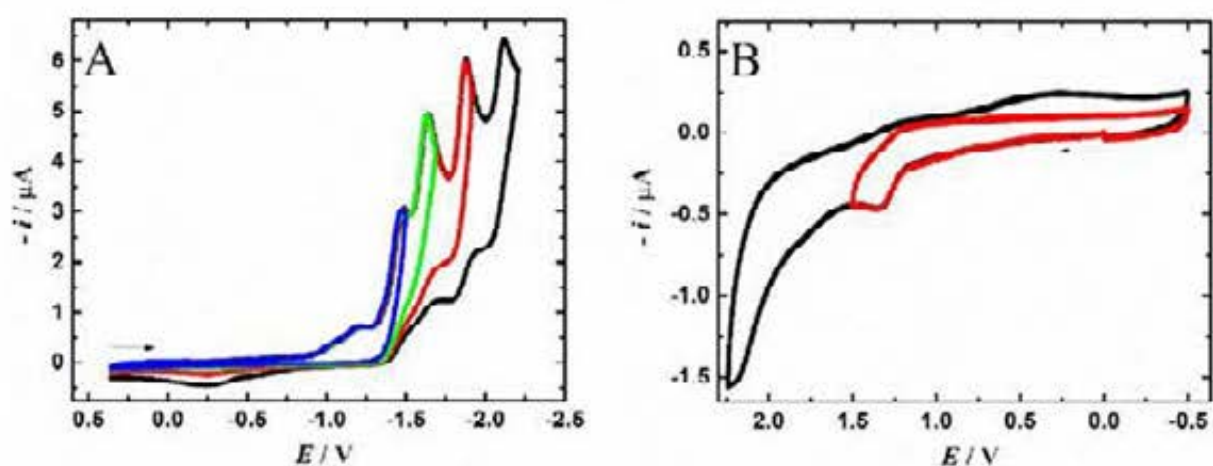


Fig. 2. Cyclic voltammograms showing A) reduction and B) oxidation of 0.55 mM **4b**, in 0.1M TBAPF<sub>6</sub> in acetonitrile. Scan rate was 0.1 V/s.

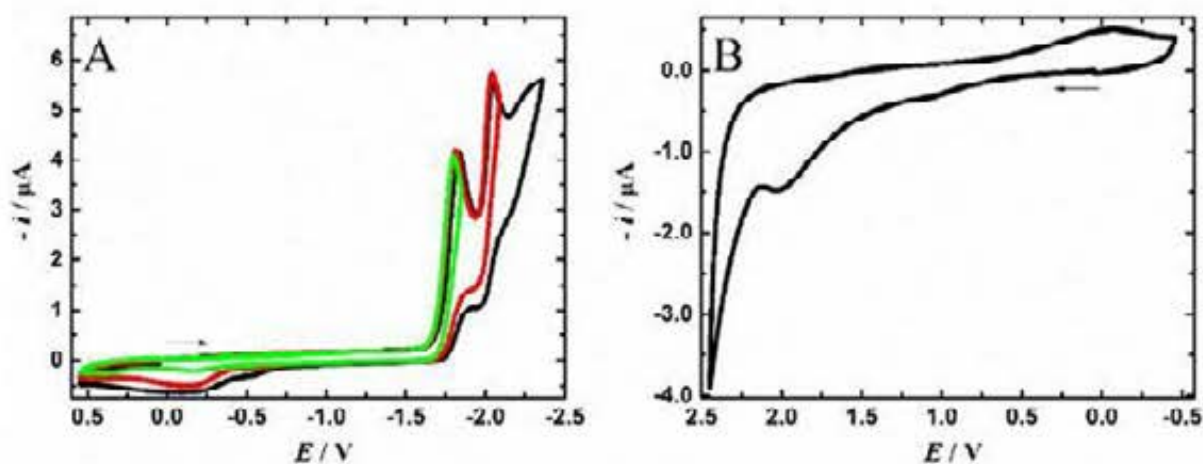


Fig. 3. Cyclic voltammograms showing A) reduction and B) oxidation of 0.63 Phen in 0.1M TBAPF<sub>6</sub> in acetonitrile. Scan rate was 0.1 V/s.

### Conclusions

Obtained electrochemical result will lead to determination of the reduction and oxidation mechanism of selected 4,7-dichloro-1,10-phenantroline derivatives. Concerning compound **4b**, the influence of the presence of fluorine atom at the position C5 is important for both, reduction and oxidation potentials. During reduction, the inductive effect of this substituent facilitates the uptake of the second electron by formed aryl radical as an intermediate during the ECE reduction process. In the contrary, oxidation of compound **4b** occurs at higher potentials than oxidation of compound **4a**. It means, that compound **4b** is due to the presence of fluorine substituent more stable against oxidation than compound **4a**. UV-Vis and IR spectroelectrochemistry and exhaustive electrolysis accompanied with the analytical chromatographic techniques are planned in other stage of the research.

### Acknowledgements

This work has been supported by the Czech Science (RVO 61388955).

## References

1. Toshima N., Shiraishi Y., Teranishi T., Miyake M., Tominaga T., Watanabe H., Brijoux W., Bonnemann H., Schmid G.: *Appl. Organometal. Chem.* **15**, 178 (2001).
2. Tong L., Duan L., Xu Y., Privalov T., Sun L.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 445 (2011).
3. Zhanga H.-G., Taao X.-T., Chenb K.-S., Yuana C.-X., Jianga M.-H.: *Synthetic Met.* **161**, 354 (2011).
4. Swietlicka A., Klemens T., Machura B., Schab-Balcerzak E., Laba K., Lapkowski M., Grucela M., Nycz J., Szala M., Kania M.: *RSC Adv.* **6**, 112908 (2016).
5. Sokolova R., Nycz J. E., Ramesova S., Fiedler J., Degano I., Szala M., Kolivoska V., Gal. M.: *J. Phys. Chem. B* **119**, 6074 (2015).
6. Larsen A.F., Ulven T., *Org. Lett.* **13**, 3546 (2011).
7. Saveant J.-M.: *Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry. An Electrochemical Approach to Electron Transfer Chemistry.* John Wiley and Sons, Inc., New Jersey, 2006.
8. Sokolova R., Hromadova M., Ludvik J., Pospisil L., Giannarelli S.: *Electrochim. Acta* **55**, 8336 (2010).
9. Gayathri P., Kumar A.S.: *Langmuir* **30**, 10513 (2014).

### Author index

- Alexanderova Anastasiia, 27  
Apostolopoulou Adamantia, 61  
Bábková Zuzana, 70, 85  
Baluchová Simona, 9  
Bandarenka Aliaksandr S., 139  
Barek Jiří, 61, 70, 125, 135, 218  
Bartáček Jan, 100  
Behúl Miroslav, 14, 236  
Benešová Lenka, 18  
Brázdová Marie, 70  
Brycht Mariola, 22  
Bund Andreas, 14  
Butsyk Olena, 231  
Bystron Tomas, 27  
Castano Andrea Gregorio, 31  
Csoklich Christoph, 139  
Daňhel Aleš, 36, 47, 81  
Degano Ilaria, 31, 240  
Dejmková Hana, 41  
Devadas Balamurungan, 27  
Dian Juraj, 44  
Dittert Ivan, 22  
Dixit, Ambesh, 104  
Dobrovodský Daniel, 47  
Dunajová Aneta Anna, 74  
Dušek Libor, 51, 143  
Economou Anastasios, 61  
Farak Amir Shaaban, 57  
Fischer Jan, 61, 70  
Fojt Lukáš, 77, 81  
Fojta Miroslav, 47, 70, 77, 81, 85, 170  
Gajdár Július, 70  
Gál Miroslav, 74  
Gasior Jindřich, 96  
Goněc Tomáš, 70  
Grabic Roman, 157  
Gridina, Nelly A., 104  
Haid W. Richard, 139  
Hartmanová Aneta, 197  
Havran Luděk, 77, 170  
Havranová Pavlina, 77, 81  
Hermanová Monika, 77, 85  
Holub Karel, 88  
Honig Hauke-Lars, 14  
Horák Michal, 36  
Hraniček Jakub, 174  
Hrbáč Jan, 93  
Hromadová Magdaléna, 96, 167, 231  
Chýlková Jaromíra, 100, 201  
Itkis Daniil, 223  
Ivanishchev, Aleksander V., 104  
Ivanishcheva, Irina A., 104  
Jabl Michal, 109, 113, 152  
Jaklová Dyrtrtová Jana, 109, 113, 152  
Jampilek Josef, 70  
Janíková Lenka, 100, 201  
Jashari Granit, 117  
Jashina Lada, 223  
Jelínek Ivan, 44  
Jelšíková Kristýna, 121  
Jindřich Jindřich, 44  
Josypčuk Bohdan, 125, 218  
Josypčuk Oksana, 125  
Kamenická Barbora, 130  
Karásková Aneta, 143  
Karpushkin Evgenij, 223  
Kejik Lukáš, 36  
Kejnovská Iva, 209  
Klikarová Jitka, 57  
Klimša Ladislav, 22  
Klouda Jan, 135  
Kluge Regina M., 139  
Knaf Manuel, 41  
Kočanová Veronika, 143  
Koláčná Lucie, 147  
Kolivoška Viliam, 96, 183, 227, 231  
Kopeček Jaromír, 22  
Kovač Ishak, 152  
Krejčová Kateřina, 201  
Krůšek Jan, 22  
Kuchtová Gabriela, 51  
Kurniawan Mario, 14  
Labuda Ján, 163, 193  
Liang Yunchang, 139  
Ligmajer Filip, 36  
Lindner Marcin, 96  
Ludvík Jiří, 147  
Malíková Jana, 47  
Mareček Vladimír, 88  
Marton Marián, 14, 157, 236  
Mayor Marcel, 96  
McLaughlin David, 139  
Medvecká Erika, 157, 236  
Mészáros Gábor, 96  
Metelka Radovan, 117  
Michniak Pavol, 14, 157, 236  
Mikysek Tomáš, 160, 197  
Mortet Vincent, 9

Mosinger Jiří, 44  
 Navrátil Tomáš, 188, 205  
 Nedvěd Michal, 9  
 Nemčková Katarína, 163  
 Nesměrák Karel, 135  
 Nováková Lachmanová Štěpánka, 96, 167, 231  
 Novotný Ladislav, 143  
 Nycz Jacek, 240  
 Obluková Michaela, 160  
 Ondráčková Anna, 170  
 Opekar František, 174  
 Pfisterer Jonas H. K., 139  
 Pivoňková Hana, 85  
 Polák Peter, 147  
 Pospíšil Lubomír, 167  
 Prodromidis Mamas I., 93  
 Rajcová Andrea, 188  
 Ramirez Manuel Oliva, 14  
 Riman Daniel, 93  
 Rybakov, Kirill S., 104  
 Řeháček Vlastimil, 236  
 Salmain Michèle, 167  
 Samec Zdeněk, 88  
 Sarahman Olha, 178  
 Sebechlebská Táňa, 96, 183, 227, 231  
 Sedlák Miloš, 100  
 Sergeev Vladimír, 223  
 Shestivska Violetta, 183, 227  
 Schneider Oliver, 139  
 Schwarzová-Pecková Karolina, 9, 18, 22, 121, 135, 170, 201  
 Skopalová Jana, 188  
 Sochr Jozef, 163  
 Sokolova Romana, 31, 160, 240  
 Svitková Veronika, 193  
 Sýs Milan, 57, 117, 160, 197  
 Šebra Jakub, 96  
 Šebest Peter, 36  
 Šelešovská Renáta, 100, 201  
 Šestáková Ivana, 205  
 Škvára Pavel, 236  
 Švancara Ivan, 117, 130  
 Švore Lubomír, 178  
 Talbi Barisa, 167  
 Taylor Andrew, 9, 22  
 Tobrman Tomáš, 147  
 Tomčíková Kornélia, 74  
 Trachioti Maria G., 93  
 Trefulka Mojmir, 77  
 Trnková Libuše, 209  
 Třísková Iveta, 209  
 Tůma Petr, 174, 213  
 Tvorynska Sofiiia, 218  
 Tzianni Eleni I., 93  
 Ushakov, Arseni V., 104  
 Ushakova Elena, 223  
 Valášek Michal, 96  
 Váňa Jiří, 100  
 Vaněčková Eva, 183, 227  
 Vavrek František, 231  
 Vojs Marian, 14, 157, 236  
 Vojs Staňová Andrea, 157, 236  
 Vokounová Šárka, 188  
 Vorlíčková Michaela, 209  
 Vosáhlová Jana, 9, 22  
 Vyskočil Vlastimil, 193  
 Vytřas Karel, 57  
 Wantulok Jakub, 240  
 Weidlich Tomáš, 130  
 Yershova Polina, 18  
 Zelenský Michal, 121  
 Zyabkin Dmitry, 14

# Get to Know Metrohm



**Titration**



**Ion Chromatography**



**Electrochemistry**



**Spectroscopy**



**Laboratory**



**Process**







## Bezpečný svět kolem nás

Mira DS je nový Metrohm přenosný systém pro identifikaci chemických látek. Můžete identifikovat chemické látky, drogy i výbušniny během pár sekund!



- **Efektivní** - Získejte výsledky rychleji a bezpečněji než kdy dříve
- **Rychlý** - Analýza trvající pár sekund
- **Flexibilní** - Buďte připraveni na každou situaci
- **Robustní** - Certifikace MIL-STD-810G a IP67

Shlédněte naše demo na [www.metrohm.com/Mira-DS](http://www.metrohm.com/Mira-DS) 

Požádejte o bezplatné demo přístroje na vašem pracovišti na [office@metrohm.cz](mailto:office@metrohm.cz)

# ECO-TREND PLUS s.r.o.

E-mail: ecotrendplus@seznam.cz tel. 266 053 877 tel./fax 286 890 502

## DETEKČNÍ SYSTÉM ÚNIKU ROPNÝCH LÁTEK

### AS-DETECTOIL

Detekční zařízení určené ke zjišťování a monitorování přítomnosti ropných látek, olejů, apod. na hladině vody. Zařízení je certifikováno. Zařízení je využitelné zejm. v průmyslu (energetika, čističky odpadních vod, ap.), v odlučovačích ropných látek, v životním prostředí aj. – jako kontrolní a bezpečnostní systém.



### POPIS ZAŘÍZENÍ

Systém sestává ze sondy o rozměrech 70 x 70 x 30 mm, z vyhodnocovacího přístroje o rozměrech 220 x 50 x 150 mm (napájeného napětím 12 V – akumulátor, trafo) a z výstupu pro instalaci signalizačního zařízení (zvonek, světlo) či pro napojení regulačního, záznamového a jiného systému.

Zařízení umožňuje dlouhodobý, spolehlivý a bezúdržbový provoz, i v prostředí s nebezpečím výbuchu. Díky rozměrům sondy lze detektor instalovat např. i do vrtů nebo na odbočky z potrubí.

### TECHNICKÉ ÚDAJE

připojením na síť 220/50 Hz; 3,5 mA; akumulátor nebo trafo; váha 1,9 kg



**ISE sponsored Meeting**

# ECO-TREND PLUS s.r.o.

E-mail: ecotrendplus@seznam.cz tel. 266 053 877 tel./fax 286 890 502

Osvědčený analyzátor do každé laboratoře, provozu i terénu, výzkumu i škol moderní, citlivý a široce využitelný s vlastními originálními US patenty, certifikovaný přístroj

## PC ECO - TRIBO voltametrický/POLAROGRAFický analyzátor

---

- vysoká citlivost • snadná automatizace • ideální pro speciaci
- stolní nebo přenosná verze (připojení na stolní PC, laptop či notebook)
  - verze pro DOS, Win 3.x, 9x, Me, 2000, XP

### Metody

- DC a diferenční pulzní voltametrie (DCV a DPV), Cyklická voltametrie, DP a Tlust polarografie
- Chronopotenciometrie s konstantním proudem
- Možnost návrhu vlastních metod podle potřeby uživatele

### Elektrody

- Miniaturní tužková rtuťová
- Zlatá, uhlíková (pastová i filmová), stříbrná, měděná
- Pevné amalgamové
- stříbrná, zlatá, měděná (menisková, leštěná, filmová)

### Použití

#### Pro ekoanalýzu (polarografii a voltametrii)

ve vodách, v roztocích a v různých materiálech (podle ČSN, DIN apod.),

v běžných podmínkách pro vysoké obsahy i pro stopové koncentrace

$10^{-10}$  až  $10^{-11}$  mol/l

- **stanovení kovů** (Pb, Cd, Zn, Cu, Fe, Ni, Al, Cr, Hg, As, Mn, Mo, Be), resp. většiny prvků Mendělejevovy tabulky
- **stanovení aniontů** (*dusičnanů, dusitanů*, Cl<sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, J<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, S<sup>2-</sup>)
- **sledování velkého množství org. látek a škodlivin** (saponátů, herbicidů, pesticidů, insekticidů, nitrolátek, barviv, biologicky aktivních látek, surfaktantů atd.)

#### Hodnocení stavu a stupně opotřebení motorů, ropných olejů a maziv

v běžných podmínkách, bez demontáže

#### Oblasti aplikací - dosud nejširší laboratorní, provozní, dílenská i terénní praxe

vodohospodářství, ekologie, hygiena, zemědělství a potravinářství, medicína, farmacie, geologie, hutnictví, chemické a jiné průmyslové závody, výzkum, školství atd.

Analýza všech druhů vod a vodných roztoků; odpadních vod, vod z galvanizoven, průsaků, skládek odpadů, vyluhů půd; geologických vzorků; rud; popílků a prachu; zemědělských, chemických a farmaceutických vzorků; pokrytí ČSN a vyhl. na vody z asi 80 % atd.

**Samozřejmostí je bezplatná konzultace a předvedení systému. Poskytujeme komplexní, odborný i pogaanční servis, odbornou pomoc a vývoj analytických metodik. Celý systém je, pro svou jednoduchou obsluhu, vhodný pro výukové účely.**



# COMARR PARDUBICE



*Jsmo ryze česká společnost pracující v oboru výpočetní techniky, programování aplikací, projektů a realizaci slaboproudých systémů.*

## Správa IT

*Chcete poradit s IT ? Realizovat nové serverové řešení ? Koupit Hardware. nebo Software ? Neváhejte a kontaktujte nás !*

IT konzultace a poradenství, serverová řešení, realizace sítí, cloudové služby, outsourcing, prodej hardware a software

## Docházkový systém ComArr

Elektronicky docházkový systém ComArr nabízí všestranné řešení v okruhu docházky zaměstnanců, rezervací prostředků a řízení přístupu do objektu.

## Inteligentní slaboproudé instalace

*Chcete zabezpečit své okolí ? Rodinu, zaměstnance, kolegy, firmu, nebo školu ? Nebo pomoc se strukturovanou kabeláží ?*

Konzultujte své potřeby s našimi odborníky.:

- Požární a zabezpečovací signalizace
- kamerové a video systémy,
- inteligentní elektroinstalace, programovatelné systémy

## Projektový a helpdeskový systém TASKPOOL

TaskPool je moderní helpdeskový webový systém pro výrazné zefektivnění správy požadavků a řízení firemních procesů.

### Výhody helpdesk systému TaskPool:

- Šetří firemní náklady
- Přizpůsobeno pro použití z mobilních telefonů
- Plně nastavitelný helpdesk na Vašich webových stránkách
- Správa požadavků přes webové rozhraní, přístup odkudkoli
- Uchovávání kompletní historie komunikace (nelze mazat)
- Mapování a optimalizace firemních procesů



*Za 26 let své působnosti na trhu jsme získali cenné zkušenosti a stali se silným partnerem pro tisíce spokojených zákazníků.*

## Kontakty:

ComArr, spol. s r. o.

Tolarova 291

533 51 Pardubice

ič: 15050084

dič: CZ15050084

www.comarr.cz

Tel.: +420 466 889 111

E-mail: info@comarr.cz

# 2 THETA

Analytical standards and equipment

**CHEMAGAZÍN**

## Pro svou práci volte kvalitu!

Firma Fisher Scientific, spol. s r. o. je českou pobočkou mezinárodní společnosti Thermo Fisher Scientific, která je největším světovým dodavatelem laboratorní techniky a vybavení laboratoří

SELEN

heidolph

Julabo

Fisherbrand

thermo scientific

gibco

invitrogen

applied biosystems

Honeywell

GE Healthcare

HAMILTON

3M

- laboratorní přístroje a zařízení
- laboratorní sklo, plasty, spotřební materiál
- laboratorní chemikálie, rozpouštědla, speciální chemikálie
- přístroje a spotřební materiál pro molekulární biologii, biochemii, mikrobiologii
- pomůcky pro ochranu zdraví a bezpečnost práce v laboratoři
- laboratorní nábytek, digestoře



[www.thermofisher.cz](http://www.thermofisher.cz)

## 875 KF Gas Analyzer




Straightforward determination of water content  
in liquefied and permanent gases

 **Metrohm**







© Best servis Ústí nad Labem

ISBN 978-80-905221-7-6