

A sepia-toned portrait of a man with glasses, wearing a suit and tie, looking slightly to the right. The portrait is the background for the top half of the cover.

XL.

**MODERNÍ
ELEKTROCHEMICKÉ
METODY**

**SBORNÍK PŘEDNÁŠEK
Listopad 2021**



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

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

Katedra analytické chemie,
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha



**Sborník přednášek
mezinárodní odborné konference**

XL. Moderní Elektrochemické Metody

Jetřichovice, 8. – 12. Listopadu 2021

Uspořádali:

Tomáš Navrátil, Miroslav Fojta a Karolína Schwarzová

ISBN 978-80-905221-8-3

Tato publikace je určena pro účastníky konference a členy pořadajících 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: XL. Moderní Elektrochemické Metody
Vydal: Srsenová Lenka - Best servis Ústí nad Labem
Autor: kolektiv autorů
Počet stran: 288
Náklad: 90
Vydání: 1.
Formát: A5
ISBN: 978-80-905221-8-3

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



Proceedings of the International Conference

Modern Electrochemical Methods

XL

Jetřichovice, Czech Republic

November 8th - November 12th, 2021

Editors:

Tomáš Navrátil, Miroslav Fojta, and Karolina Schwarzová

ISBN 978-80-905221-8-3

Poděkování partnerům konference
XL. Moderní Elektrochemické Metody



PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova



INTERTEC

ECO-TREND PLUS s.r.o.

Obsah	Str.
<i>Simona Baluchová, Michaela Pejzlová, Anna Eremina, Blanka Horká, Andrew Taylor, Jan Fischer, Jan Krůšek, and Karolina Schwarzová-Pecková</i>	9
Oxidation of Neurotransmitters on Boron-Doped Diamond Electrode in Physiological Media	
<i>Simona Baluchová, Michal Zelenský, Andrew Taylor, Ladislav Fekete, Jan Fischer, Luděk Mika, Soumen Mandal, Oliver Williams, and Karolina Schwarzová-Pecková</i>	14
Electrochemical Properties of Flat Boron-Doped Diamond Surfaces	
<i>Martin Baroch, Šárka Sládková, and Hana Dejmková</i>	18
Determination of Pesticide Chlortoluron by HPLC-ED with Carbon Felt Working Electrode	
<i>Kateřina Bártová, Ishaq Kovač, and Jana Jaklová Dyrtrtová</i>	21
Gas Phase Oxidation of Terconazole	
<i>Michaela Benkšová, Ján Hiveš, and Emilia Mališová</i>	26
Measuring of the Electromotive Force of Al+TiB ₂ and Al-Al Cell	
<i>Mariola Brycht, Andrzej Leniart, and Sławomira Skrzypek</i>	31
Voltammetric Determination of Forchlorfenuron at Carbon-based Electrodes	
<i>Andrea Červenková, Emilia Mališová, and Ján Hiveš</i>	36
Electrical Conductivity of Low-Temperature Cryolite Electrolytes for Innovation Process in Aluminium Production	
<i>Martina Čierna, Lucia Birošová, Ján Krahulec, and Miroslav Gál</i>	41
Electrochemical Research of Disruption of E.coli Membranes	
<i>Olivia Dakošová, Eva Melniková, and Miroslav Gál</i>	44
Design and Utilization of 3D Printed Electrochemical Flow Cell	
<i>Aleš Daňhel and Miroslav Fojta</i>	47
Electrochemical Behaviour of Oligonucleotides Adsorbed on Pyrolytic Graphite Electrode	
<i>Hana Dejmková and Dominika Giampaglia</i>	51
Application of Pulsed Techniques in Order to Decrease the Passivation in Amperometric Detection	
<i>Juraj Dian, Jana Hodačová, and Ivan Jelínek</i>	54
Electrophoretic Study of Mono- and Bis-Triazamacrocyclic Derivatives	
<i>Daniel Dobrovodský, Aleš Daňhel, and Miroslav Fojta</i>	58
Use of Electrochemical Probes in DNA Structure Recognition in Adsorbed State at Hanging Mercury Drop Electrode	
<i>Jan Fischer, Šárka Sládková, Hana Dejmková, Andrew Taylor, and Karolina Schwarzová-Pecková</i>	63
Effect of Boron-Doping Level on Electrochemical Properties of Boron-Doped Diamond Electrodes	
<i>Lukáš Fojt, Luděk Havran, and Bohumír Grüner</i>	66
Electrochemistry of Boron Cluster Compounds Containing Bridging Ligands in Phosphate Buffers	
<i>Miroslav Fojta, Aleš Daňhel, Daniel Dobrovodský, Vlastimil Dorčák, Stanislav Hasoň, Luděk Havran, Monika Hermanová, Martina Outlů, Veronika Ostatná, Hana Pivoňková, Zuzana Soldánová, and Jan Špaček</i>	71
Recent Findings Indicate Paradigm Shift in Nucleic Acids Electrochemistry	
<i>Luděk Havran, Bohumír Grüner, and Lukáš Fojt</i>	74
Redox Active Labelling of DNA by Boron Cluster Compounds	

<u>Monika Hermanová, Zuzana Bábková, Luděk Havran, Hana Pivoňková, and Miroslav Fojta</u>	77
Influence of Flanking Sequences and Secondary DNA Structure on Electrochemical (In)Activity of Guanine in dG _n Blobs	
<u>Vojtěch Hrdlička, and Tomáš Navrátil</u>	81
The use of Boron Doped Diamond Electrode for Determination of 5-hydroxyindoleacetic Acid	
<u>Lucia Hojová, Erika Mordačiková, Martin Vrška, Marian Vojs, Marian Marton, and Andrea Vojs Staňová</u>	85
Electrochemical Oxidation of Sartans with Boron Doped Diamond Electrodes	
<u>Marta Chojňská, Vojtěch Hrdlička, and Tomáš Navrátil</u>	89
Determination of Selected Drugs using 3D Printed Electrodes	
<u>Jaromíra Chýlková, Alona Usenko, Renáta Šelešovská, Jiří Váňa, Miloš Sedlák, and Jan Bartáček</u>	94
Simultaneous Determination of the Plant Growth Regulator Daminozide and its Degradation Product 1,1-Dimethylhydrazine	
<u>Granit Jashari, Milan Sýs, Tomáš Mikysek, Radovan Metelka, and Ivan Švancara</u>	98
Electrochemical Behaviour of β -Carotene at Different Working Electrodes	
<u>Kristýna Jelšíková, Jan Klouda, and Karolína Schwarzová-Pecková</u>	102
The Development of Electroanalytical Methods for Detection of Bile Acids Possessing 7 α Hydroxyl Group	
<u>Leon Jenner, Dzmityr Pruchkouski, and Eva Sýkorová</u>	105
Protein Interactors of Arabidopsis thaliana Telomerase RNA	
<u>Radek Jerga, Petr Barták, and Jana Skopalová</u>	108
Voltammetric Determination of Fentanyl and its Analogues	
<u>Eliška Jiroušková, Radomir Čabala, and Romana Sokolová</u>	112
Electrochemistry of 3-fluorophenmetrazine and 4-methylpentedrone	
<u>Bohdan Josypčuk, Jan Langmaier and Sofiia Tvorynska</u>	117
<u>Preparation, Testing and Application of Amalgam Screen-Printed Electrodes</u>	
<u>Gyölgöze Kastrati, Granit Jashari, Milan Sýs, Blanka Švecová, Tahir Arbneshi, Radovan Metelka, Zuzana Bilková, and Lucie Korecká</u>	122
Simultaneous Adsorptive Stripping Square-Wave Voltammetric Determination of Vitamin E and Vitamin K in Food Supplements	
<u>Lucie Koláčná, Alan Liška, and Jiří Ludvík</u>	126
Electrochemistry of Phospholes	
<u>Lucie Koláčná, Peter Polák, Jiří Klíma, Tomáš Tobrman, and Jiří Ludvík</u>	130
EPR-Electrochemical Study of Reduction Mechanism of Pyrene-Cyclobutene Conjugates	
<u>Roman Košťár and Matilda Zemanová</u>	135
EIS for Protective Layers on Iron Characterization and Development over Time	
<u>Zuzana Kramplová, Andrea Purdešová, and Jozef Sokol</u>	139
Use of Bare Boron Doped Diamond Electrode for Electrochemical Analysis of Pesticides in Water Samples as an Alternative or Complement to Conventional Methods	
<u>Jan Langmaier and Zdeněk Samec</u>	143
Ion Transfer Voltammetry across the Polarized Ionic Liquid/Water Interface: Base for Electrochemical Sensors	
<u>Alan Liška, Philipp Frühwirth, Michael Haas, Jiří Ludvík, and Georg Gescheidt-Demner</u>	147
Differences in Electrochemical Reduction of Mono- and Polynuclear Acylgermanes	

<i>Karol Lušpai, Peter Rapta, Michal Zaližbera, Denisa Darvasiová, and Vladimír Lukeš</i> EPR/UV-VIS-NIR Spectroelectrochemical Examination of The Association Properties of Thienoacene-Bridged Tetrathiafulvalenes Supported by DFT Calculations	151
<i>Barbora Martinková, Gylxhane Kastrati, Iveta Brožková, Tomáš Mikysek, Zuzana Bilková, and Lucie Korecká</i> Square-wave Voltammetric Detection of Ergosterol as an Indicator of Fungal Contamination of Foodstuff	155
<i>Oleksandr Matvieiev, Renáta Šelešovská, Marian Vojs, Marián Marton, and Jaromíra Chýlková</i> The First Study of the Electrochemical Behavior of Mephenoxalone and its Determination using Screen-Printed Sensors with Chemically Deposited Boron Doped Diamond Electrode	159
<i>Eva Melniková, Tatiana Galicová, Miroslav Gál, and Veronika Ostatná</i> Changes in Catalytic Response of Histones at Mercury Surface	164
<i>Radovan Metelka and Nela Halašková</i> Electrochemical Detection of Arsenic Using Screen-Printed Carbon Electrodes Modified with Gold	167
<i>Pavol Michniak, Marián Marton, Michal Hatala, Vlastimil Řeháček, Martin Vrška, Miroslav Behl, and Marian Vojs</i> Boron Doped Diamond Electrodes Modified with Gold Nanoparticles for Melatonin Detection	171
<i>Tomáš Mikysek, Milan Sýs, and Miroslav Novák</i> Selected Copper (II) Complexes and their Catalytic Activity	176
<i>Erika Mordačiková, Marian Vojs, Marián Marton, Pavol Michniak, Adam Bořik, Roman Grabic, and Andrea Vojs Staňová</i> BDD Electrodes for Electrochemical Degradation of Iodinated Contrast Media	179
<i>Tomáš Navrátil, Marta Choinška, Ivana Šestáková, and Vojtěch Hrdlička</i> Voltammetric Determination of Heavy Metals in Honeybee Venom using Hanging Mercury Drop Electrode and Carbon Conductive Filaments for 3D Printer	183
<i>Štěpánka Nováková Lachmanová, František Vavrek, Táňa Sebechlebská, Jakub Šebera, Viliam Koliwoška, Jan Lukášek, Nico Balzer, Michal Valášek, Marcel Mayor, and Magdaléna Hromadová</i> Electrochemical Characterization of Molecular Conductors Containing Redox Switching Element	188
<i>Anna Ondráčková, Monika Hermanová, Hana Pivoňková, and Miroslav Fojta</i> Voltammetric Detection of Selected Unnatural Bases in DNA Oligonucleotides	193
<i>František Opekar and Petr Tůma</i> Dialysis in Microliter Sample Volume Connected via Flow-gating Interface with Rapid Capillary Electrophoresis	196
<i>Eva Pospíšilová and Tatiana V. Shishkanova</i> Electrochemical Detection of 2-aminoindane	201
<i>Francesca Sabatini, Romana Sokolova, and Ilaria Degano</i> Looking into the Photo-stability of Eosin by Electrochemical Methods	206
<i>Jana Škopalová, Radek Jerga, Dana Štolbová, Monika Zajacová Cechová, Petr Cankař, and Petr Barták</i> Electrochemical Oxidation of Fentanyl and its Analogues	210

<i>Romana Sokolova, Michaela Oblukova, Milan Sys, Tomas Mikysek, Jakub Wantulok, Jacek Nycz, and Ilaria Degano</i>	214
UV-Vis and IR Spectroelectrochemistry of Copper Complexes and Bioactive Compounds	
<i>Vit Skoták, Božena Hosnedlová, Marta Kepinska, Milan Jakubek, Tomáš Parák, and René Kizek</i>	218
The Brdička Reaction for the Study of Thermostable Proteins, especially Metallothionein in Urine	
<i>Milan Sys, Tomáš Mikysek, and Miroslav Novák</i>	221
Catalytic Oxidation of Dopamine: Mushroom Tyrosinase vs. Dinuclear Copper(II) Complex	
<i>Renáta Šelešovská, Oleksandr Matvieiev, Marian Vojs, Martin Vrška, and Jaromira Chýlková</i>	225
New Screen-Printed Sensors with Chemically Deposited Boron Doped Diamond Electrode – Electrochemical Properties and Application	
<i>Ivana Šestáková, Daniela Křivská, and Tomáš Navrátil</i>	230
Metallothioneins as Biomarker of Environmental Pollution	
<i>Ludmila Šimková, David Dunlop, Alan Liška, and Jiří Ludvík</i>	234
Electrochemical Study of Titanocen Difluoride and Difluoride Derivatives	
<i>Libuše Trnková, Iveta Třísková, Alan Liška, and Jiří Ludvík</i>	239
Oxidation Processes of <i>N</i> -methylguanines	
<i>Petr Tůma and Dušan Koval</i>	243
Monitoring of Ketamine Metabolism using Capillary Electrophoresis in PAMAPTAC Coated Capillaries	
<i>Sofia Tvorynska, Jiří Barek, and Bohdan Josypčuk</i>	248
Comparison of the Covalent Laccase Immobilization at Amino- and Carboxyl-functionalized Mesoporous Silica, Glassy Carbon, and Graphite Powders Using Different Coupling Agents for Optimal Biosensor Preparation	
<i>Alona Usenko, Jaromira Chýlková, Jiří Váňa, Lenka Janíková, and Renáta Šelešovská</i>	253
Application of Boron Doped Diamond Electrode for Voltammetric Monitoring of Quality of Phytostimulation Preparations	
<i>Eva Vaněčková, Milan Bouša, Violetta Shestivska, Jiří Kubišta, Jiří Rathouský, Táňa Sebechlebská, and Viliam Kolivoška</i>	257
Electroplating of 3D Printed Electrodes for Selective Electrochemical Reduction of CO ₂	
<i>František Vavrek, Jakub Šebera, Olena Butsyk, Viliam Kolivoška, Gábor Mészáros, and Magdaléna Hromadová</i>	262
Theoretical Interpretation of Single Molecule Conductance and Thermopower of Selected Model Molecules	
<i>Marian Vojs, Pavol Michniak, Michal Hatala, Vlastimil Řeháček, Miroslav Behül, Martin Vrška, and Marián Marton</i>	267
Boron Doped Diamond Electrodes on Alumina Substrates	
<i>Jana Záchenská and Matilda Zemanová</i>	272
Electrochemical Preparation and Characterization of Polymetallic Catalysts for Hydrogen Economy	
Rejstřík autorů	277

Oxidation of Neurotransmitters on Boron-Doped Diamond Electrode in Physiological Media

(Oxidácia nervových prenášačov na bórom dopovanej diamantovej elektróde vo fyziologických médiách)

Simona Baluchová^a, Michaela Pejzlová^a, Anna Eremina^a, Blanka Horká^a, Andrew Taylor^b, Jan Fischer^a, Jan Krůšek^c, and Karolina Schwarzová-Pecková^a

^a Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 00 Prague 2, Czech Republic, E-mail: simona.baluchova@natur.cuni.cz

^c Institute of Physics of the Czech Academy of Sciences, Na Slovance 2, 182 21 Prague 8, Czech Republic

^e Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Viděnská 1083, 142 20, Prague 4, Czech Republic

Abstract

The electrochemical behaviour of two structurally different neurotransmitters, dopamine and serotonin, in pH 7.4 common biomimicking and tissue culture media, namely in phosphate buffered saline, HEPES buffered saline and complex Neurobasal media, was studied using an anodically activated (oxygen-terminated) boron doped diamond electrode. Moreover, the influence of human serum albumin on the anodic potential limits evaluated in buffered physiological solutions and on the voltammetric behaviour of dopamine and serotonin was thoroughly investigated.

Key Words: Albumin, Boron doped diamond electrode, Buffered physiological media, Dopamine, Serotonin, Surface termination, Voltammetry.

Úvod

Bórom dopovaný diamant (BDD)¹ oplýva množstvom výborných vlastností, vrátane chemickej inertnosti, ktorá vedie k zníženej náchylnosti voči adsorpcii analytov a interferentov a pasivácii povrchu², biokompatibiliti³ a dostatočne širokým potenciálovým oknom, predovšetkým v anodickej oblasti. Vďaka týmto charakteristikám je BDD s obľubou využívaný i v oblasti neurovied, a to ako elektródový materiál k citlivej elektrochemickej detekcii a stanoveniu nervových prenášačov a ich metabolitov, ale zároveň i ako substrát pre kultiváciu neurónov⁴.

Rast neurónov na BDD je možný v prostredí, ktoré mimikuje fyziologické podmienky. K napodobneniu týchto biologických podmienok a pufrovacej aktivity ľudského tela sa používajú roztoky o fyziologickom pH (7,4) obsahujúce pufrovaciu zložku a kationy o vhodnej koncentrácii pre rast a správnu funkciu nervových buniek. Medzi často používané roztoky patria fosfátom pufrovaný fyziologický roztok (*phosphate buffered saline*, PBS) a HEPES pufrovaný fyziologický roztok (*HEPES buffered saline*, HBS)⁵. HBS obsahuje anorganické chloridy (NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂) a D-glukózu, avšak hlavná zložka zodpovedná za pufrovacie vlastnosti je štruktúrne komplexná zlúčenina HEPES (2-[4-(2-hydroxyetyl) piperazin-1-yl]etansulfónová kyselina), ktorá obsahuje oxidovateľný piperazínový kruh⁶. Naopak, PBS obsahuje len dihydrogénfosforečnan sodný a jeho bázu, hydrogénfosforečnan sodný, NaCl a KCl. Použitie PBS v biologických systémoch má však niekoľko nevýhod. Fosfáty inhibujú niektoré enzýmy (napr. karboxypeptidázu, fumarázu, ureázu, niektoré kinázy a dehydrogenázy), ktoré sú využívané v biochemických reakciách a / alebo tvoria komplexy s kationmi kovov. To môže tiež viesť k inhibícii biochemických reakcií, ktoré tieto kationy vyžadujú^{5,7}. Oproti tomu, zwitterionové *N*-substituované aminosulfónové kyseliny,

vrátane HEPES, vykazujú výrazne lepšie vlastnosti oproti konvenčným pufrum vďaka ich stabilite, neschopnosti komplexovať kovové ióny a veľmi obmedzenej permeabilite skrz membránu buniek⁵. Okrem týchto fyziologických pufrů sa predovšetkým k dlhodobej kultivácii neuronových kultúr využívajú i komerčne dostupné médiá Neurobasal⁸⁻¹⁰. Súčasťou týchto komplexných roztoků sú nielen anorganické soli a pufróvacia zložka, ktorú predstavuje taktiež HEPES, ale i proteínogénne aminokyseliny, vitamíny a ďalšie zlúčeniny ako D-glukóza, pyruvát a fenolová červieň, ktoré môžu významným spôsobom ovplyvňovať elektroanalytické merania.

Terminácia povrchu je jedným z hlavných faktorů, ktorý má významný vplyv na finálne vlastnosti a elektrochemické správanie BDD elektród pri elektroanalýze biomolekul, keďže ovplyvňuje kinetiku prenosu elektrónů a náchylnosť k adsorpcii. H-terminácia vedie k nepolárnym, hydrofóbnym BDD povrchom s významnou povrchovou vodivosťou a negatívnu elektrónovú afinitou. Naopak, O-terminované BDD elektródy (O-BDD) majú hydrofilné, polárne povrchy so zníženou vodivosťou a pozitívnu elektrónovú afinitu^{11,12}. Konverziu z H- na O-terminovaný BDD povrch je možné previesť pomocou anodickéj elektrochemickej aktivácie^{13,14}, pri ktorej dochádza k anodickému rozkladu vody za vzniku reaktívnych hydroxylových radikálov. Tie reagujú s BDD povrchom a zavádzajú naň rôzne kyslíkové funkčné skupiny (napr. C-OH, C-O-C, C=O, COOH)^{13,15}.

Cieľom tejto práce bolo elektrochemické štúdium dvoch štruktúrne odlišných nervových prenášačov, dopamínu a serotonínu, v pufrovaných fyziologických roztokoch (pH 7,4) o rôzne komplexnom zložení (PBS vs. HBS vs. Neurobasalové médiá) na anodickéj aktivovanej (O-terminovanej) bôrom dopovanej diamantovej elektróde, a to v neprítomnosti i prítomnosti ľudského sérového albumínu (*human serum albumin*, HSA).

Experimentálna časť

Všetky chemikálie boli kvality p.a. a boli použité bez akéhokoľvek ďalšieho čistenia: albumín, dopamín, serotónin, chlorid hexaaminruthenitý, HEPES, PBS tablety, Neurobasal médium, Neurobasal médium bez fenolovej červene (všetko Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemecko), chlorid sodný, hexahydrát chloridu horečnatého, hexahydrát chloridu vápenatého (všetko Lach-Ner, Neratovice, ČR), chlorid draselný, trihydrát hexakvanoželeznatenu draselného, D-glukóza (všetko Lachema, Brno, ČR), kyselina sírová, hydroxid sodný (obe Penta, Chrudim, ČR), Deionizovaná voda (Millipore Milí plus Q systém, Billerica, USA), ktorej rezistivita nebola menšia než 18,2 M Ω cm, bola použitá k príprave všetkých vodných roztoků.

Štúdium oxidácie dopamínu a serotonínu prebehlo v štyroch pufrovaných fyziologických roztokoch: (1) PBS - rozpustením PBS tablety v 200 ml deionizovanej vody vznikol roztok o pH $7,4 \pm 0,2$, ktorý okrem 10 mmol l⁻¹ fosfátového pufru obsahoval i soľnú zložku v podobe 137 mmol l⁻¹ NaCl a 2,7 mmol l⁻¹ KCl. (2) HBS - obsahoval tieto zložky: 20 mmol l⁻¹ HEPES, 150 mmol l⁻¹ NaCl, 5 mmol l⁻¹ KCl, 1,2 mmol l⁻¹ MgCl₂, 2 mmol l⁻¹ CaCl₂ a 5 mmol l⁻¹ D-glukózu, pH tohto roztoku bolo upravené na hodnotu 7,4 prídavkom 0,5 mol l⁻¹ NaOH. (3) Neurobasal médium (zložené z 38 zlúčenín)⁸ a (4) Neurobasal médium bez fenolovej červene⁹.

Voltametrické merania boli prevedené na prístroji Eco-Tribo Polarograf, ktorý bol ovládaný programom PolarPro 5.1 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Bolo využívané konvenčné trojelektrodové usporiadanie, s referenčnou argentchloridovou elektródou (Ag/AgCl/3 mol l⁻¹ KCl), pomocnou platinovou elektródou (obe Elektrochemické detektory, Turnov, ČR), a ako pracovná elektróda bola použitá buď (i) komerčne dostupná BDD elektróda o priemere 3 mm

a ploche $7,1 \text{ mm}^2$ (BioLogic, Seyssinet-Pariset, Francúzsko) s úrovňou B/C pri depozícii 500 - 1000 ppm alebo (ii) BDD dosťička vyrobená na Fyzikálnom ústave AV ČR s úrovňou B/C pri depozícii 4000 ppm⁶. Povrch BDD elektród bol vždy O-terminovaný (O-BDD) v dôsledku elektrochemickej anodickej aktivácie, ktorá bola prevedená v $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ vkladanim kladného potenciálu v oblasti anodického rozkladu vody $E_{\text{AKT}} = +2,4 \text{ V}$ po dobu $t = 20 \text{ min}$.

K voltametrickým experimentom boli využívané metódy cyklickej voltametrie (CV) s rýchlosťou polarizácie povrchu elektródy $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, a diferenčnej pulznej voltametrie (DPV) s $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, u ktorej parametre vkladaneho pulzu nadobúdali hodnôt $+50 \text{ mV}$ pre výšku a 80 ms pre šírku pulzu. Medzi jednotlivými DPV skenmi bol povrch O-BDD elektródy elektrochemicky reaktivovaný priamo v analyzovanom roztoku ($E_{\text{AKT}} = +2,4 \text{ V}$, $t = 60 - 300 \text{ s}$).

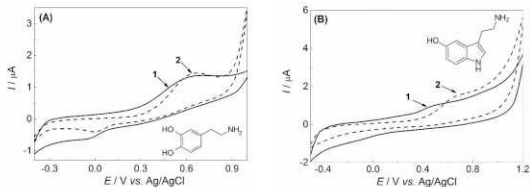
Výsledky a diskusia

Elektrochemická charakterizácia O-BDD elektródy bola prevedená využitím CV redoxných markerov $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (oba o $c = 1 \text{ mmol l}^{-1}$) v $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$, $10 \text{ mmol l}^{-1} \text{ PBS}$ o pH 7,4 a $20 \text{ mmol l}^{-1} \text{ HBS}$ o pH 7,4. Elektrochemické správanie $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ bolo vo všetkých troch prostrediach rovnaké. Experimentálne určené hodnoty rozdielu potenciálu anodického a katodického piky ΔE_p sa pohybovali v rozsahu 55-60 mV, čím sa prakticky stotožňovali s hodnotou 59 mV pre reverzibilné systémy vymieňajúce jeden elektrón, a tým potvrdili vysokú rýchlosť prenosu elektrónu. Elektrochemické správanie $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, markeru citlivého k stavu povrchu uhlíkových elektród, vrátane BDD, bolo odlišné¹⁶. Vo všetkých troch prostrediach došlo k nárastu ΔE_p (380-830 mV), čo indikuje výrazne pomalší prenos elektrónov a kvazireverzibilný charakter deja. Jedným z dôvodov môže byť to, že povrch O-BDD elektródy nesie čiastočne záporný náboj v dôsledku prítomnosti kyslíkových skupín a dochádza tak k elektrostatickej repulzii aniónu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ od povrchu O-BDD¹³.

Štúdium šírky potenciálových okien pufovaných fyziologických médií na O-BDD odhalilo, že v prípade PBS je šírka okna v anodickej oblasti limitovaná rozkladom vody pri pomerne vysokom kladnom potenciáli $+1,7 \text{ V}$, čo je dôsledok heterogénneho charakteru O-BDD povrchu^{13, 17}. U HBS je pracovné okno elektródy kratšie o 0,2 V, pretože je limitované elektrooxidáciou vlastnej pufovanej zložky, HEPES (pri potenciáli $+1,5 \text{ V}$), ktorá je v HBS prítomná vo vysokej koncentrácii (20 mmol l^{-1}). V prípade oboch Neurobasalových roztokov (bez a s fenolovou čerňou) dochádzalo k nárastu prúdu pozadia, ktoré vymedzovalo použiteľné pracovné okno elektródy, už pri potenciáli okolo $+1,1 \text{ V}$, a v nameraných cyklických voltogramoch bol pozorovaný pik pri potenciáli $\sim +0,85 \text{ V}$. U všetkých médií spôsobil prídavok HSA posun anodických potenciálových limitov k vyšším hodnotám, pričom najdramatickejší posun bol zaznamenaný v Neurobasaloch, zrejme v dôsledku adsorpcie a zablokovania elektroaktívnych miest na povrchu O-BDD elektródy¹⁸.

Elektrochemické správanie dopamínu a sérotonínu vo fyziologických roztokoch o pH 7,4 (PBS, HBS a v oboch Neurobasalových médiách) bolo skúmané pomocou CV (viď Obr. 1) a DPV. Dopamín sa na O-BDD elektróde oxiduje kvázi-reverzibilne a môže poskytovať až dva oxidáčene signály (v závislosti na študovanom rozsahu potenciálov v anodickej oblasti), pričom prvý pik predstavuje oxidáciu dopamínu na dopamínchinón, ktorý podlieha spontánnej intramolekulárnej cyklizácii za vzniku leukodopamínchromu, ktorý je následne oxidovaný za vzniku dopamínchromu (druhý pik)¹⁹. Naopak, oxidácia sérotonínu prebieha ireverzibilne, a to predovšetkým z dôvodu dimerizácie jeho oxidáčeneho produktu²⁰, pričom tieto vzniknuté diméry sa už späť neredukujú a nie je tak možné v cyklických voltogramoch pozorovať žiadne katodické piky. Pri opakovaných meraniach bol s každým ďalším skenom pozorovaný

pokles signálov oboch študovaných neurotransmiterov, čo bolo spôsobené vznikajúcimi reaktívnymi oxidačnými (mezi)produktmi^{19,20}, ktoré zanášali a znečisťovali povrch O-BDD elektródy. Pre zaistenie stabilných prúdových hodnôt dopamínu bolo dostatočné mechanické premiešavanie roztoku medzi jednotlivými skenmi, avšak v prípade sérotonínu bolo nevyhnutné elektródu anodicky reaktivovať ($E_{AKT} = +2,4$ V), pričom dĺžka reaktívácie závisela od typu študovaného fyziologického prostredia ($t = 60 - 300$ s).



Obr. 1. Cyklické voltamogramy (A) dopamínu a (B) sérotonínu (obe o $c = 0,1$ mmol l^{-1}) namerané v prostredí (1) 10 mmol l^{-1} PBS a (2) 20 mmol l^{-1} HBS (obe o $pH = 7,4$) na anodicky aktivovanej O-BDD elektróde.

Následne bol študovaný i vplyv prítomnosti albumínu na voltametrické signály nervových prenášačov v prostredí PBS a HBS (obe o pH 7,4). Po prídavku albumínu došlo v prípade dopamínu k miernemu posunu oxidačných potenciálov, o 80 mV, k pozitívnejším hodnotám. U sérotonínu bol pozorovaný dramatickejší vplyv albumínu na jeho voltametrické odozvy, keďže došlo nielen k významnému posunu potenciálov (o 455 mV v PBS a 216 mV v HBS) ku kladnejším hodnotám, ale i k výraznému poklesu prúdov signálov, čo sťažovalo ich kvantifikáciu. Príčinou týchto pozorovaných javov je adsorpcia albumínu na povrch O-BDD, ktorá bráni difúzii molekúl dopamínu a sérotonínu k elektroaktívnym miestam na povrchu elektródy a spomaľuje tak kinetiku prenosu elektrónov^{21,22}.

Záver

V rámci tejto práce bolo preskúmané elektrochemické správanie dvoch nervových prenášačov, dopamínu a sérotonínu, v pufovaných fyziologických roztokoch s rôznou komplexnosťou zloženia, ktoré sa využívajú i ku kultivácii neurónov. Voltametrické chovanie neurotransmiterov bolo študované pomocou elektródy na báze bórom dopovaného diamantu, ktorý sa vďaka svojim unikátnym vlastnostiam používa nielen k elektrochemickej detekcii, ale je taktiež i vhodným kandidátom pre samotný rast neurónov. Táto štúdia odhalila, že voľba fyziologického média má výrazný vplyv na voltametrické odozvy dopamínu a sérotonínu a musí byť preto starostlivo zvažovaná. Získané výsledky tak prispievajú k výskumu biokompatibilných BDD povrchov a ich *in-vitro* a *in-vivo* aplikačných možností nielen v elektroanalýze, ale i v neurovedách.

Acknowledgments

This research was performed within the framework of Specific University Research (SVV 260560). Financial supports provided by the Grant Agency of Charles University (project 390119) and by the Czech Science Foundation (project 20-03187S) are gratefully acknowledged.

References

1. Baluchova S., Danhel A., Dejmekova H., Ostatna V., Fojta M., Schwarzova-Peckova K.: *Anal. Chim. Acta* *1077*, 30 (2019).
2. Trouillon R., O'Hare D.: *Electrochim. Acta* *55*, 6586 (2010).
3. Alcaide M., Taylor A., Fjorback M., Zachar V., Pennisi C. P.: *Front. Neurosci.* *10*, 87 (2016).
4. Garrett D. J., Tong W., Simpson D. A., Meffin H.: *Carbon* *102*, 437 (2016).
5. Ferreira C. M. H., Pinto I. S. S., Soares E. V., Soares H.: *RSC Adv.* *5*, 30989 (2015).
6. Brycht M., Baluchová S., Taylor A., Mortet V., Sedláková S., Klimša L., Kopeček J., Schwarzová-Pecková K.: *Bioelectrochemistry* *137*, 107646 (2021).
7. Vasconcelos M., Azenha M., Lage O. M.: *Anal. Biochem.* *241*, 248 (1996).
8. <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/technical-resources/media-formulation.251.html> [downloaded 12/09/2021].
9. <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/technical-resources/media-formulation.255.html> [downloaded 12/09/2021].
10. Brewer G. J., Torricelli J. R., Evege E. K., Price P. J.: *J. Neurosci. Res.* *35*, 567 (1993).
11. Duo I., Levy-Clement C., Fujishima A., Comminellis C.: *J. Appl. Electrochem.* *34*, 935 (2004).
12. Liu F. B., Wang J. D., Liu B., Li X. M., Chen D. R.: *Diam. Relat. Mat.* *16*, 454 (2007).
13. Hutton L. A., Iacobini J. G., Bitziou E., Channon R. B., Newton M. E., Macpherson J. V.: *Anal. Chem.* *85*, 7230 (2013).
14. Schwarzova-Peckova K., Vosahlova J., Berek J., Sloufova L., Pavlova E., Petrak V., Zavazalova J.: *Electrochim. Acta* *243*, 170 (2017).
15. Chaplin B. P., Hubler D. K., Farrell J.: *Electrochim. Acta* *89*, 122 (2013).
16. McCreery R. L.: *Chem. Rev.* *108*, 2646 (2008).
17. Macpherson J. V.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* *17*, 2935 (2015).
18. Chiku M., Ivandini T. A., Kamiya A., Fujishima A., Einaga Y.: *J. Electroanal. Chem.* *612*, 201 (2008).
19. Vatrál J., Boča R., Linert W.: *Mon. Chem.* *146*, 1799 (2015).
20. Patel A. N., Unwin P. R., Macpherson J. V.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* *15*, 18085 (2013).
21. Trouillon R., O'Hare D., Einaga Y.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* *13*, 5422 (2011).
22. Fagan-Murphy A., Watt F., Morgan K. A., Patel B. A.: *J. Electroanal. Chem.* *684*, 1 (2012).

Electrochemical Properties of Flat Boron Doped Diamond Surfaces (Elektrochemické vlastnosti borem dopovaných diamantů s hladkými povrchy)

Simona Baluchová^a, Michal Zelenský^a, Andrew Taylor^b, Ladislav Fekete^b, Jan Fischer^a,
Luděk Mika^c, Soumen Mandal^d, Oliver Williams^d, and Karolína Schwarzová-Pecková^a

^aCharles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO
Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 00 Prague 2, Czech Republic,
E-mail: karolina.schwarzova@natur.cuni.cz

^bFZU - Institute of Physics of the Czech Academy of Sciences, Na Slovance 2, 182 21 Prague
8, Czech Republic

^cCharles University, Faculty of Science, Department of Teaching and Didactics of Chemistry,
Albertov 6, 128 00 Prague 2, Czech Republic

^dCardiff University, School of Physics and Astronomy, Queen's Buildings, The Parade,
Cardiff, CF24 3AA, United Kingdom

Abstract

Conventionally used boron-doped diamond (BDD) possesses polycrystalline structure, resulting from the BDD deposition on diamond nanoparticles serving as growth centres. In this contribution, electrochemical properties of rough polycrystalline BDD were compared with flat BDD surfaces. The latter were attained by (i) BDD deposition on diamond monocrystals and (ii) chem-mechanical polishing of polycrystalline BDD. The electron transfer (ET) kinetics was studied using cyclic voltammetry and various redox markers. Clearly, ET is dependent on the doping level, and in the case of (i), another factor influencing ET is the diamond crystal orientation. In general, obtained results indicate that the studied flat BDD surfaces exhibit enhanced ET kinetics, compared to rough polycrystalline diamond surfaces.

Key Words: Boron doped diamond electrode, Cyclic voltammetry, Electron transfer kinetics, Hydrogen-terminated surface, Redox markers, Surface roughness.

Úvod

Borem dopovaný diamant (BDD) se po třiceti letech studia a používání v elektroanalytických laboratořích zařadil mezi oblíbené elektrodové materiály, což je podmíněno i jeho komerční dostupností^{1,2}. Nicméně mnohé aspekty vztahu mezi podmínkami depozice, morfologií BDD povrchu a jeho terminací a fyzikálními a elektrochemickými vlastnostmi jsou stále neobjasněny. Toto vyplývá z heterogenního charakteru jeho struktury, který je dán inkorporací boru, polykrystalickým charakterem s množstvím krystalických rovin a hran a strukturálními defekty vznikajícími při přípravě jednou z variant chemické depozice par (CVD) na vhodný substrát². Další komplikací je variabilita terminace BDD povrchu, kdy klasický H-terminovaný povrch získaný při depozici vykazuje nestabilitu na vzduchu³. Je sice možno jej lehcce přeměnit anodickou oxidací na O-terminaci vykazující přítomnost kyslíkatých funkčních skupin (-C-OH, -C-O-C, -C=O, -COOH)^{4,5}, H-terminované povrchy získané zpětnou konverzí vložením negativního potenciálu či proudů však často vykazují zvýšenou nestabilitu a tuto aktivaci je potřeba provádět opakovaně¹. Třetím přístupem k úpravě BDD povrchu zůstává jednoduché leštění na alumině či jiném materiálu měkčím než diamant, kdy z principu musí docházet k odstranění sp² uhlíku a navázaných funkčních skupin přítomných na povrchu BDD. Tento proces může vést ke zrychlení kinetiky přenosu elektronů⁶, jak bylo prokázáno pro redoxní markery citlivé na přítomnost kyslíkatých skupin obsahujících π-elektrony ([Fe(CN)₆]^{3-/4-}) (ref. ⁷). Limitací při studiu chemického složení BDD povrchů jsou omezené možnosti instrumentálních technik, kdy přesná identifikace a lokalizace přítomnosti sp³ a sp²

uhlíku, boru, jejich vzájemných vazeb a vazeb s kyslíkem je zatím neproveditelná a interpretace výsledků často závisí na správném nastavení vstupních parametrů (např. určení vazebné energie pro určení typu vzájemných vazeb mezi uhlíky a kyslíky při použití XPS, omezené možnosti určení koncentrace boru po depozici metodami SIMS a neutronové aktivační analýzy). Nejčastějším přístupem tak zůstává studium elektrochemických (šířka potenciálového okna, rozdíl potenciálů oxidace/redukce redoxních markerů při cyklické voltametii a výpočet příslušné konstanty elektronového přenosu, kapacita elektrodové dvojvrstvy) a fyzikálních vlastností (vodivost) BDD filmů a jejich porovnávání pro různé modifikace depozičních podmínek a povrchových úprav.

V tomto příspěvku budou představeny dva nové typy BDD elektrod: Monokrystalické (single-crystal) BDD filmy (SC BDD) připravené depozicí na nedopované monokrystalu diamantu a polykrystalické BDD vyleštěné kombinací chemického a mechanického působení⁸ (chem-mechanical polishing; CM BDD). Oba typy vykazují v porovnání s polykrystalickými filmy relativně hladký povrch a studium jejich elektrochemických vlastností lze posuzovat vliv morfologie a chemického složení povrchu na kinetiku elektronového přenosu.

Experimentální část

Všechny chemikálie byly kvality p.a.: chlorid hexaaminruthenitý, dopamin, hexachloroiridičitan draselný (Aldrich, Darmstadt, Německo), chlorid draselný, trihydrát hexakvanoželeznanu draselného, dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR). K přípravě všech roztoků byla použita deionizovaná voda (Millipore Milil plus Q systém, Billerica, USA) o rezistivitě 18,2 MΩ cm.

Voltametrická měření byla provedena na potenciostatu Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro 5.1 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR) v tříelektrodovém uspořádání s referenční argentchloridovou elektrodou ($\text{Ag}/\text{AgCl} \mid 3 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$) a pomocnou platinovou elektrodou (obě Elektrochemické detektory, Turnov, ČR). Jako pracovní elektrody byly použity: (i) SC BDD elektrody (celkem 12 ks), připravené depozicí na monokrystalu diamantu, které se lišily krystalovou orientací (roviny (113), (115) a (118)) a úrovní dopování borem (poměr B/C v plynné fázi při depozici (ppm): 250, 500, 1000 a 2000). Tyto elektrody byly pro měření kontaktovány ze shora ve speciálním držáku připraveném 3D tiskem. (ii) Polykrystalické BDD elektrody (celkem 5 ks) deponované na p-Si připravené metodou CVD s použitím poměru B/C (ppm) 500, 1000, 2000, 4000 a 8000 a (iii) CM BDD elektrody (celkem 5 ks) připravené vyleštěním setu polykrystalických BDD elektrod pomocí smíšeného chemického a mechanického leštění na polyuretanové/polyesterové leštící látku a leštící kapalině na bázi alkalického koloidního oxidu křemičitého⁸. Povrch BDD elektrod byl H-terminovaný; měření probíhala v rámci potenciálových oken studovaných elektrod bez expozice potenciálům způsobujících rozklad vodního roztoku základního elektrolytu. Cyklická voltametrie (CV) byla aplikována s rychlostí polarizace $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Výsledky a diskuze

Spektrální charakterizace všech studovaných BDD elektrod s různou úrovní dopování borem (B/C poměr v plynné fázi během chemické depozice par: 500, 1000, 2000, 4000, 8000 ppm) pro polykrystalické a CM BDD a 250, 500, 1000 a 2000 ppm pro SC BDD byla provedena pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) a Ramanovou spektroskopii. Naměřená Ramanova spektra ve většině případů neprokázala přítomnost sp^2 uhlíku ve studovaných filmech. Rozdílnosti v morfologii povrchu těchto elektrod jsou zřejmé z Obr. 1. Zobrazené AFM snímky vykazují výrazně menší hrubost povrchu pro oba filmy s potenciálně hladkým povrchem (SC BDD a CM BDD) než pro polykrystalický BDD. Pro SC BDD byly obdobné výsledky získány

pro všechny kombinace krystalických rovin matečního monokrystalu diamantu použitého pro depozici (roviny (113), (115) a (118)) a koncentrace boru při depozici (250, 500, 1000 a 2000 ppm) s výjimkou filmu (113 – 2000 ppm), který také vykazoval přítomnost sp^2 uhlíku. Hrubost všech ostatních SC BDD filmů byla menší než 1,5 nm („RMS roughness“) a nebyla ovlivněna koncentrací boru ve výsledném filmu, která byla odhadnuta z Ramanovy spektroskopie. Povrch vyleštěných CM BDD taktéž vykazuje uniformitu pro všechny úrovně dopování borem, jeho hrubost nepřesahuje 10 nm.

Elektrochemická charakterizace byla provedena pomocí CV redoxních markerů vnější sféry ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$, $[\text{Ir}(\text{Cl})_6]^{2-/3-}$) a vnitřní sféry ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a dopamin). Významné rozdíly, které byly pozorovány mezi všemi třemi studovanými typy elektrod, jsou demonstrovány na Obr. 1 pomocí CV dopaminu. Pro polykrystalické BDD před a po CM leštění byla u markerů vnější sféry zjištěna rychlá kinetika elektronového přenosu na obou setech elektrod, nicméně pro markery vnitřní sféry docházelo na neleštěných elektrodách k významnému zpomalení přenosu v porovnání s CM leštěnými elektrodami. Leštěné elektrody tedy poskytovaly menší a relativně stále hodnoty rozdílu potenciálu anodického a katodického piku ΔE_p a vyšší signály např. pro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a dopamin pro všechny úrovně dopování. Neleštěné elektrody vykazují velké rozdíly v kinetice elektronového přenosu, a to hlavně mezi elektrodami připravenými při nízkém a vysokém poměru B/C při depozici.

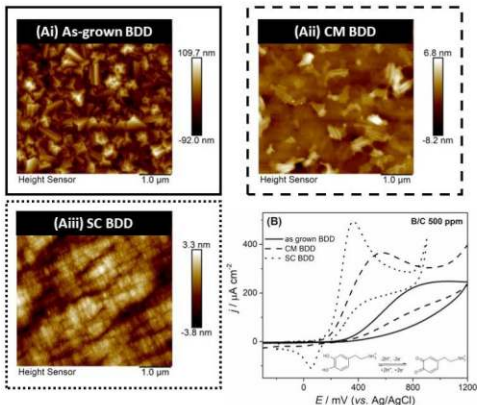
SC BDD elektrody obecně vykazují rychlejší kinetiku elektronového přenosu než polykrystalické a CM BDD filmy, jak je zřejmé i z Obr. 1 pro dopamin. Tento rozdíl je obzvláště významný pro SC BDD deponované na (113) a (115) krystalových rovinách. Tyto filmy také vykazují vyšší míru inkorporace boru do své struktury v porovnání s orientací (118).

Závěr

Tato studie prokázala významný vliv struktury BDD povrchu na kinetiku elektronového přenosu pro relativně hladké povrchy získané buď speciálním postupem umožňujícím vyleštění diamantu nebo přímo depozicí BDD na monokrystal diamantu. V obou případech lze očekávat relativně malý podíl funkčních skupin obsahujících kyslík na povrchu a lze pozorovat významné zrychlení kinetiky v porovnání s polykrystalickými filmy, obzvláště pro filmy s nižší koncentrací boru. Další studie budou zaměřeny na porovnání vlastností těchto povrchů po oxidaci a určení chemického složení povrchů studovaných H- a O-terminovaných povrchů pomocí XPS včetně odhadu přítomnosti funkčních skupin na povrchu BDD.

Acknowledgments

This research was performed within the framework of Specific University Research (SVV 260560). Financial supports provided by the Grant Agency of Charles University (project 390119) and by the Czech Science Foundation (project 20-03187S) are gratefully acknowledged.



Obr. 1. (A) Snímky z AFM pro BDD filmy deponované při B/C 2000 ppm: (Ai) polykrystalický BDD film po depozici (as-grown), (Aii) BDD podrobený leštění kombinací chemického a mechanického působení (CM BDD) a (Aiii) monokrystalický SC BDD (rovina (115)). (B) Cyklické voltamogramy dopaminu ($c = 0,1 \text{ mmol l}^{-1}$) naměřené v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ fosfátového pufru pH 7,4 na výše uvedených typech BDD elektrod (B/C 500 ppm, krystalová rovina substrátu (115) pro SC BDD).

References

- Baluchova S., Danhel A., Dejmekova H., Ostatna V., Fojta M., Schwarzova-Peckova K.: *Anal. Chim. Acta* **1077**, 30 (2019).
- 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).
- Salazar-Banda G.R., Andrade L.S., Nascente P.A.P., Pizani P.S., Rocha-Filho R.C., Avaca L.A.: *Electrochim. Acta* **51**, 4612 (2006).
- Hutton L. A., Iacobini J. G., Bitziou E., Channon R. B., Newton M. E., Macpherson J. V.: *Anal. Chem.* **85**, 7230 (2013).
- Schwarzova-Peckova K., Vosahlova J., Barek J., Sloufova I., Pavlova E., Petrak V., Zavazalova J.: *Electrochim. Acta* **243**, 170 (2017).
- Zavazalova J., Prochazkova K., Schwarzova-Peckova K.: *Anal. Lett.* **49**, 80 (2016).
- McCreery R. L.: *Chem. Rev.* **108**, 2646 (2008).
- Thomas E.L.H., Nelson G.W., Mandal S., Foord J.S., Williams O.A.: *Carbon* **68**, 473 (2014).

Determination of Pesticide Chlortoluron by HPLC-ED with Carbon Felt Working Electrode

Martin Baroch, Šárka Sládková, and Hana Dejmková

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

Abstract

Electrochemical detection on carbon felt flow-through working electrode in combination with HPLC separation was used for determination of pesticide chlortoluron in deionized water and in real matrices, e.g. soil and river water. Concentration dependence was observed in range over four orders. Limits of detection were determined to be $0.13 \mu\text{mol L}^{-1}$ in deionized water, $0.17 \mu\text{mol L}^{-1}$ in river water and $0.14 \mu\text{g g}^{-1}$ in soil. Reproducibility of the measurement was estimated as a relative standard deviation of 0.5 %.

Key Words: Carbon Felt, HPLC, Amperometry, Chlortoluron, Pesticide.

Introduction

Soil and surface water contamination by pesticides is a global environmental problem. For the control of agricultural chemicals by authorities, there is still a lack of fast and inexpensive methods of determination. One of those compounds is chlortoluron – phenylurea herbicide which is slowly biodegradable and easy to accumulate in environment¹. Commonly used methods for detection of chlortoluron are TLC with fluorescence detection or HPLC with UV detection².

Carbon felt consist of carbon fibers with orderless 3D structure. Due to its structure, carbon felt has many advantageous properties, which make it an interesting electrode material, such as chemical and mechanical stability, high conductivity, high porosity, and high electroactive surface, allowing a higher degree of analyte conversion³.

Aim of this work was to test the carbon felt working electrode on analyte with more complex structure and in combination with ordinary matrices – soil and surface water.

Experimental

Stock solution of chlortoluron (Sigma–Aldrich, Germany) with concentration of 1.0 mmol L^{-1} was prepared by dissolving the appropriate amount of the substance in methanol (HPLC grade, Lach-Ner, Czech Republic). Solutions for measurements were then prepared by dilution of the stock solution with methanol. Phosphate-acetate buffer (0.05 mol L^{-1} , pH 4) was prepared from phosphoric and acetic acid (both Lach-Ner, Czech Republic) and sodium hydroxide (Fluka Analytica, Germany).

HPLC separation was carried on column Purospher® RP-18 ($125 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) with mobile phase consisting of methanol and phosphate-acetate buffer in volume ratio of 60:40 and of flow rate 1.0 mL min^{-1} . Flow of the mobile phase was ensured by high pressure pump HPP 5001 (Laboratomi přístroje Praha, Czech Republic) with six-way sample injector with $20 \mu\text{L}$ loop (ECOM, Czech Republic), detection was used performed using amperometric detector ADLC 2 (Laboratomi přístroje Praha, Czech Republic) with carbon felt working electrode, auxiliary platinum wire electrode and reference silver chloride (3M KCl) electrode (both Monokrystaly Turnov, Czech Republic). Schematic picture of the cell is shown in ref.⁴.

Model samples of river water were prepared by dilution of chlortoluron stock solution with the river water.

Samples of soil were prepared by adding 0.5 mL of methanol diluted chlortoluron solution to 1.0 g of the sample, so the final concentration in soil was in range from 0.2 to 100 $\mu\text{g g}^{-1}$. Spiked samples were then dried at ambient temperature and chlortoluron was extracted by 1.0 mL of methanol.

Results and Discussion

The first two observed parameters were pH and detection potential, which were observed in range from 0.9 V to 1.8 V with step 0.1 V in case of potential and at pH values from 3.0 to 7.0. Optimal detection conditions, value where maximum peak height was obtained, were selected as a pH 4.0 and detection potential 1.4 V vs. saturated argentochloride electrode.

Under optimal conditions, calibration dependence in deionized water was measured from 0.25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ to 100.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; nevertheless, it was linear only in the range from 0.25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ to 5.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ as can be seen in Figure 1. Limit of detection, estimated as the concentration corresponding to the peak height three times the noise value, was 0.13 $\mu\text{mol L}^{-1}$. In the model sample, repeatability of the measurement was evaluated. The relative standard deviation of peak height was 0.5 % during twenty consecutive measurements at concentration value of 0.1 mmol L^{-1} .

The next step was the determination of the method applicability in real matrices (i.e. soil and surface water). It was investigated by spiking blank matrix by known amount of chlortoluron. Calibration curves of chlortoluron in surface water and in deionized water show minor differences, as can be seen in Figure 1 and in Table I. The slopes of both lines are in agreement, with difference approximately 6 %. Linear ranges of calibration dependences of chlortoluron in surface and in deionized water are the same, i.e. from 0.10 to 5.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Although calibration curves of soil and waters cannot be directly compared because of their different units, trend in dependencies of surface water and soil imply greater influence of the matrix higher concentrations, where signals obtained namely for surface water are approximately five times lower than in deionized water (see Figure 1B).

The last step was estimation of detection limits for real matrices. Those were calculated in the same manner as in deionized water. Obtained values were than 0.14 $\mu\text{g g}^{-1}$ for soil and 0.17 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for surface water.

Table I.

Parameters of linear parts of calibration curves for chlortoluron in different matrices and them belonging limits of detection.

Matrix	Parameters of calibration curves			LOD
	Slope	Intercept	Correlation coefficient	
Deionized water	1.80 $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$	0.17 μA	0.9836	0.13 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Surface water	1.70 $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$	-0.02 μA	0.9983	0.17 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Soil	0.92 $\mu\text{A } \mu\text{g}^{-1} \text{ g}$	0.33 μA	0.9952	0.14 $\mu\text{g g}^{-1}$

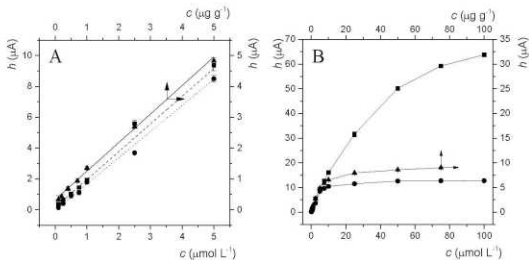


Fig. 1. Calibration dependencies (A – linear part, B – whole range) of chlortoluron in deionized water (■), surface water (●) and soil (▲). Parameters of lines interspersed in part A are shown in Table I. Column Purospher® RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm); mobile phase phosphate-acetate buffer (pH 4); methanol – 40:60; $E_{DET} = 1.4$ V; flow rate = 1.0 mL min⁻¹; loop volume = 20 µL.

Conclusion

Carbon felt working electrode was successfully used in combination with HPLC for determination of pesticide chlortoluron. Method was tested in ordinary matrices (soil, surface water, deionized water); in lower concentration range, matrix influence was almost negligible. In deionized water, calculated repeatability of measurement was under one percent in twenty consecutive measurements. Detection limits reach submicromolar and submicrogram per gram concentrations in waters resp. in soil. All these parameters show great usability of the electrode in this method.

Acknowledgments

This research has been supported by Czech Science Foundation (GACR) (Grant number: 20-01589S).

References

1. World Health Organization: Guidelines for drinking-water quality (2017).
2. Nollet L. M., Rathore H. S., *Handbook of pesticides: methods of pesticide residues analysis*. CRC Press (2016).
3. Smith R. E., Davies T. J., Baynes N. d. B., Nichols R. J.: *J. Electroanal. Chem.* 747, 29 (2015).
4. Dejmková H., Baroch M., Krejčová M., Barek J., Zima J.: *Appl. Mater. Today* 9, 482 (2017).

Gas Phase Oxidation of Terconazole

Kateřina Bártov^a, Iřhak Kovac^{a,b}, and Jana Jakov Dytřtov^{a,c}

^a Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry Albertov 2038/6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

^b Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo nm. 542/2, 160 10 Prague 6, Czech Republic,
E-mail: ishak.kovac@uochb.cas.cz

^c Charles University in Prague, Faculty of Physical Education and Sport, Department of Physiology and Biochemistry, Jos Martiřho 269/31, 162 52 Prague 6, Czech Republic

Abstract

Terconazole is a widely used antimycotic. Terconazole belongs to the second generation of triazole fungicide with a 1,2,4-triazole ring, which is known to block ergosterol biosynthesis of fungi. On the other hand, its effect in the presence of potentially interfering compounds is not explored. In the gas phase experiments, we provide the reaction simulation between terconazole and copper (II) using ESI-MS. Terconazole in presence of copper(II) became oxidized. The direct oxidation of a triazole in the gas phase wasn't observed before. This result indicates that terconazole is potentially highly reactive (even electrochemically) and therefore its reaction has to be further investigated.

Key Words: Terconazole, Copper, Gas phase, ESI-MS, Triazole, Antimycotic.

Introduction

The azole derivatives are one of the most utilized categories of antimycotic drugs^{1,2} due to their protective power against the wide range of fungal infections. Based on their group structure they are divided into imidazoles and triazoles whether they have two or three nitrogen atoms in the five-membered ring, respectively. Terconazole (**Ter**) belongs to the group of triazoles with the 1,2,4-triazole ring Chyba! Nenalezen zdroj odkaz., where N¹ binds to variable hydrophobic chains³. The mechanism of action is correlated with inhibition of *CYP51* – lanosterol 14 α -demethylase – a key enzyme for biosynthesis of ergosterol in fungi⁴. The ergosterol depletion and accumulation of lanosterol interfere with the function of ergosterol as a membrane component⁵. Higher doses in humans can affect reproducible organs, fertility and disturb the balance of estrogens and androgens⁶. In laboratory animal testing, some of the azoles showed embryotoxic potential, congenital malformation and limb defect⁷.

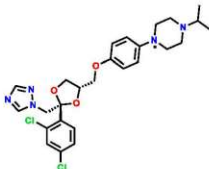


Fig. 1. Triazole fungicide, **Ter**.

We found that the reactivity of triazoles is strongly affected by the presence of other chemicals; for the most part with highly reactive antioxidants (e.g. resveratrol⁷) or essential elements (e.g.

copper, zinc⁸⁻¹¹). Therefore, there is a high experimental appeal to investigate triazole interaction with reactive chemicals e.g. copper cations. Moreover, it was recently discovered that **Ter** belongs to several triazoles with redox behaviour¹².

Copper is one of eleven biologically important trace elements in humans. It has the ability to adopt two oxidative states, nevertheless, in the organism, it is present in mostly 2+ oxidation state. It serves as an important cofactor in protein redox chemistry, organism growth and development. A multifunctional role in the organism involves the regulation of certain physiological pathways¹³. There is also a significant risk under reduction conditions (e.g. in presence of triazoles⁹) to produce Cu⁺, which is typical by the initiation of Fenton like reaction. The aim of this research was to observe the gas phase behaviour of **Ter** in reaction with Cu²⁺ ions.

Experimental

The experiments were performed using a quadrupole ion-trap mass spectrometer (LCQ Advantage, Thermo Finnigan, USA) in positive mode. The stock solutions of terconazole and copper (II) chloride (CuCl₂) in the concentration of 1×10⁻² mol L⁻¹ were prepared from solid standards (Sigma Aldrich, Czech Republic) and stored in a fridge (4°C) until analysis. The samples were prepared from the stock solutions mixing the two solutions in different ratios (Table I). The copper solution is prepared in deionized water (>18.2 MΩ) and terconazole solutions in absolute ethanol. The absolute ethanol was purchased from Penta s.r.o. (Czech Republic).

Table I.

The summary of Cu:Ter concentration ratios and their effect on the Ter oxidation.

Ratio CuCl ₂ :Ter	Concentration of CuCl ₂ (mol L ⁻¹)	Intensity (Ter) ⁺ m/z 531 ⁺	Intensity (HTer) ⁺ m/z 532 ⁺	Ratio Ter ⁺ /(HTer) ⁺ (%)	Standard deviation
20: 1	1×10 ⁻³	1.16×10 ⁶	3.29×10 ⁶	35,25	3,63
10: 1	5×10 ⁻⁴	5.40×10 ⁵	3.69×10 ⁶	14,64	1,14
4: 1	2×10 ⁻⁴	3.83×10 ⁵	4.15×10 ⁶	9,24	0,82
2:1	1×10 ⁻⁴	9.03×10 ⁴	2.15×10 ⁶	4,21	0,21
1:1	5×10 ⁻⁵	2.45×10 ⁴	1.05×10 ⁶	2,33	0,42
2:5	2×10 ⁻⁵	4.62×10 ³	6.10×10 ⁵	0,76	0,10
1:5	1×10 ⁻⁵	1.53×10 ⁴	8.34×10 ⁵	1,84	0,30

Ter-terconazole, (HTer)⁺-protonated terconazole, (Ter)⁺-oxidized terconazole

The sample solutions were continuously fed into an ion source at 0.5 mL h⁻¹ through a silica capillary. As nebulizer and sweep gas nitrogen was used (15 to 20 arbitrary units), helium was used as the collision gas. Other conditions of ion source were set as follows: spray voltage: 4.50 kV, capillary temperature: 180°C, capillary voltage 2 V, tube lens offset 10 V. Mass spectra were recorded in m/z 50-2000 range, appearance and fragmentation of species which appeared in the gas phase were influenced by set capillary temperature, capillary voltage and tube lens offset.

Results and discussion

In the spectra, we observed **Ter** coordination species with copper in Cu⁺² and Cu⁺¹ oxidation states due to the reduction of copper in the gas phase^{10,11}. **Ter** is observable as oxidized form

m/z 531.1⁺ and protonated form m/z 532.1⁺. The ratio between the oxidized and protonated forms depends on the amount of CuCl₂ in the solution (Table I, Fig 2.).

There is a problem with the interpretation of the isotope pattern. The experimental pattern includes two signals coming from the oxidized Ter ((Ter)⁺) and protonated Ter ((HTer)⁺). The pattern of these two signals differs only about one m/z unit (Fig. 3.). Therefore, the experimental signal pattern is created by the apposition of two signals (Fig. 2.). The intensity of Ter⁺ depends on the Cu²⁺ concentration (with increasing Cu²⁺ the intensity of Ter⁺ is exponentially increasing). Therefore, the peak m/z 530.1⁺ directly refers to the Ter⁺ (the lightest isotopes), however, the peak m/z 532.1⁺ includes the signal coming from the (HTer)⁺ (its lightest isotopes) as well as the signal from the second lightest isotopes of (Ter)⁺. Therefore, the intensity of (HTer)⁺ (the lightest isotopes) was simulated and calculated using the Xcalibur program (Table I, Fig. 3.).

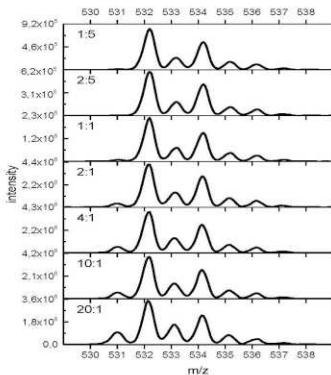


Fig. 2. Comparison of (HTer)⁺ intensity of in positive mode ESI-MS spectra in the different mixture ratios of CuCl₂ and Ter. The ratio of CuCl₂ and Ter used in the experiment from the top graph are as follows 1:5, 2:5, 1:1, 2:1, 4:1, 10:1, and 20:1.

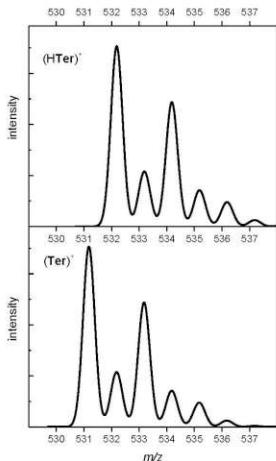


Fig. 3. Peak pattern simulation of $(\text{Ter})^+$ and $(\text{HTer})^+$.

The electrochemical activity of **Ter** in the electrochemical system was proved¹². The oxidation in the piperazine ring is expected (**Fig. 1**). From our results, it can be seen that **Ter** is electrochemically active also in the gas phase, which is not primarily considered as the electrochemically active system. The evaluation of the reactivity of **Ter** has to be further considered from a broader perspective.

Conclusion

The azoles are one of the three groups of compounds used in the treatment of systematic fungal infections. Therefore, azoles are readily used antimycotic and exposure to them is not uncommon. Terconazole belongs to the group triazoles, where the backbone is the 1,2,4-triazole ring, prone to the formation of coordination species and redox interaction with copper cations. Experimentally, It was observed that **Ter** in presence of Cu^{2+} became oxidized. The extension of the oxidation is jet to assess including its influence on possible Fenton like reactions in live systems. The experiments revealed that oxidation exponentially increases with the increased concentration of Cu^{2+} ions in the reaction mixture. This behaviour of **Ter** wasn't observed in the gas phase so far. These results also indicate the potential high reactivity of terconazole in real systems, therefore further investigation of possible reaction is required.

References

1. Shafiei M., Peyton L., Hashemzadeh M., Foroumadi A.: *Bioorg. Chem.* *104*, 104240 (2020).
2. Giavini E., Menegola E.: *Toxicol. Lett.* *198*, 106 (2010).
3. Wu Y. S., Lee H. K., Li S. F.: *J. Chromatogr. A* *912*, 171 (2001).
4. Norková R., Dyrtrtová J. J., Jakl M., Schröder D.: *Water, Air, Soil Pollut.* *223*, 2633 (2012).
5. Mazu T. K., Bricker B. A., Flores-Rozas H., Ablordeppey S. Y.: *Mini Rev. Med. Chem.* *16*, 555 (2016).
6. Zam J. A., Brüscheweiler B. J., Schlatter J. R.: *Environ. Health Perspect.* *111*, 255 (2003).
7. Jaklová Dyrtrtová J., Straka M., Bělonožníková K., Jakl M., Ryšlavá H.: *Food Chem.* *262*, 221 (2018).
8. Jaklová Dyrtrtová J., Bělonožníková K., Jakl M., Ryšlavá H.: *Environ. Pollut.* *266*, 115201 (2020).
9. Kovač I., Jakl M., Fanfrlik J., Andrushchenko V., Jaklová Dyrtrtová J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, e8714 (2019).
10. Dyrtrtová J. J., Jakl M., Schröder D., Čadková E., Komárek M. J. R. C. i. M. S.: *25*, 1037 (2011).
11. Jaklová Dyrtrtová J., Fanfrlik J., Norková R., Jakl M., Hobza P.: *Int. J. Mass spectrom.* *359*, 38 (2014).
12. Fischer J., González-Martín J., Lochyňski P., Dejmková H., Schwarzová-Pecková K., Vega M.: *J. Electroanal. Chem.* *863*, 114054 (2020).
13. Altarelli M., Ben-Hamouda N., Schneider A., Berger M. M.: *Nutr. Clin. Pract.* *34*, 504 (2019).
14. Jaklová Dyrtrtová J., Jakl M., Schröder D., Norková R.: *Int. J. Mass spectrom.* *338*, 45 (2013).

Measuring of the Electromotive Force of Al+TiB₂ and Al-Al Cell

Michaela Benkőová, Ján Hiveš, and Emília Mališová

Institute of Inorganic Chemistry, Technology and Materials, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: michaela.benkoova@stuba.sk

Abstract

Measuring of the electromotive force in molten system is used to characterize of the thermodynamic properties at equilibrium. Values of the electromotive force are very important for the determination of activity and standard electrode potential. This work is focused on the measuring of electromotive force of Al+TiB₂ and Al-Al cell. The measurements were realized by the molten aluminium electrode. The electromotive force of cell was investigated in electrolytes at various bath compositions at equilibrium. The thermodynamic properties for all experiments were measured in acid cryolite melts and three different temperatures 800 °C, 900 °C, and 1000 °C were defined.

Key Words: Standard electrode potential, Electromotive force, Molar ratio, Acid cryolite melts.

Introduction

Measurement of electromotive force is used to describe thermodynamic properties in melt systems. Among the most interesting melt systems due to their possible industrial use in aluminium production are melts based on trisodium hexafluoroaluminate, Na₃AlF₆ (also called cryolite).

In recent years, several scientific groups have studied the electromotive force in melt systems. These measurements determined the thermodynamic properties of the solid and liquid phases. Further studies have focused on determining the activity of oxygen in graphitic cast iron by measuring the electromotive force¹⁻³.

This work is focused on the measuring of electromotive force of cells Al+TiB₂, Al-Al to characterize the thermodynamic properties of acidic cryolite systems. Changes in electromotive voltage in different sodium fluoride melts were measured, gradually changing the molar ratio NaF/AlF₃. The measurements were performed in the temperature range from 800°C to 1000°C.

Experimental part

Experimental equipment consisted of a vertical furnace with a water-cooled jacket and an alumina pot. (Fig. 1) An alumina pot contained the measured system with a reference electrode. A TiB₂ tablet (2) was placed at the bottom of the alumina pot (1). On this tablet there was a layer of molten aluminium (3) covering its entire surface and surroundings. Above the aluminium layer was a layer of molten fluoride melt. A reference aluminium electrode (5) and a tungsten wire (6) were placed in the melt-aluminium layer (6). A tungsten wire was insulated from the fluoride melt by an alumina tube (7). Feeding alumina tube (8) was placed above the melt to adding AlF₃. During the entire measurement, 99.96 % pure argon flowed through the furnace, providing an inert atmosphere.

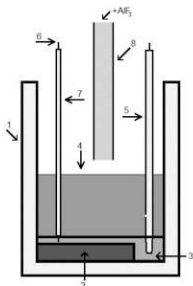


Fig. 1. Measuring equipment: alumina pot (1), TiB_2 tablet (2), molten aluminium (3), fluoride melt (4), aluminium reference electrode (5), tungsten wire (6), alumina insulating tube (7), alumina tube for adding AlF_3 (8).

The reference aluminium electrode (Fig. 2) was a tungsten wire placed in an alumina tube with an outer diameter of 0.8 cm. On the bottom of the capillary there was aluminium, the height of which after melting reached 1 cm. Above the molten aluminium was an electrolyte containing 2 wt. % Al_2O_3 , 5 wt. % CaF_2 , and NaF and AlF_3 in the appropriate molar ratio with respect to the measured temperature. The height of the melt after melting was 3 cm. The tungsten wire was insulated from the melt by an alumina tube with an outer diameter of 0.3 cm. This tube was ended up in a layer of molten aluminium to prevent contact between the molten fluoride melt and the tungsten. At a height of 3 cm, there was a small hole in the outer alumina tube. This tube served to allow the melt to flow into the alumina pot before the measurement and then to measure the change in electromotive force (EMN). EMN was measured between the reference melt in the reference electrode and the melt in the measuring pot to which AlF_3 was added during the measurement.

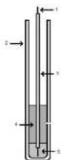


Fig. 2. Reference electrode: tungsten wire (1), outer alumina tube (2), insulating alumina tube (3), molten fluoride melt (4), molten aluminium (5).

The experimental work was based on the phase diagram of the system NaF - AlF_3 . The aim was to keep the temperature range of primary crystallization within the studied range of molar ratios (MR) NaF / AlF_3 . Based on this study, MR in the range of 1.5 to 1.2 was selected for 800 °C, at 900 °C it was MR = (1.9 – 1.6) and at 1000 °C it was MR in values from 2.6 to 2.0. We reduced the molar ratio in the given interval from the highest selected value of MR by adding the calculated amount of AlF_3 during the experiment at these three temperatures. The change of MR was studied in steps of 0.1 at all three temperatures. The total weight of the electrolyte was 60 g. The electrolyte contained constant additions of 2 wt. % Al_2O_3 and 5 wt. % CaF_2 for all studied systems.

Results and Discussion

At all three temperatures, 800 °C, 900 °C and 1000 °C, two parallel measurements of the change in electromotive force of a TiB_2 cell with the same reference electrode were performed. A new alumina pot and electrolyte were used. For comparison, the measurement of the EMN cell without TiB_2 with a new reference electrode was performed. The main aim was to express the standard electrode potential in the presence of TiB_2 from these measurements. The derivation was based on measurements without TiB_2 . It was assumed that activity of AlF_3 in the melt was initially the same as in the reference electrode. The activity ratio calculated from the data without TiB_2 was further used to calculate the standard electrode potential in the presence of TiB_2 for a given composition. The dependences of the calculated standard electrode potentials on the molar ratio for the first and second measurements at 800 °C are shown in Fig. 3 and Fig. 4.

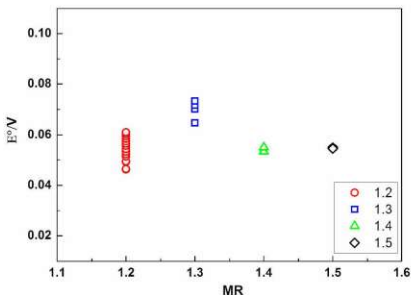


Fig. 3. Plot of the dependence of the standard electrode potential on the molar ratio for the first measurement at 800 °C.

In the second measurement, the dependence of the standard electrode potential is exponential. This is because in the first measurement, an aluminium reference electrode was used in which the tungsten wire was immersed as a conductor. On repeated measurements, it was a reference electrode where there was aluminium, and a certain proportion of dissolved tungsten was already present. The activities of the contaminated aluminium could not be expressed and therefore could not be considered. It can be said that the activity changes because the tungsten

slowly dissolves here and thus the electrode potential of reference electrode is not completely stable. It changes with each subsequent measurement. A quasi-linear relationship was observed in the first measurement at 1000 °C and a quasi-constant in the second measurement. This behavior is explained based on performed EDS analyzes. It can be assumed that at higher temperature (1000 °C) the dissolution of tungsten in aluminium was more intense than at the first two temperatures. In the second measurement, when the given results are essentially constant, maximum dissolution rate of tungsten in aluminium.

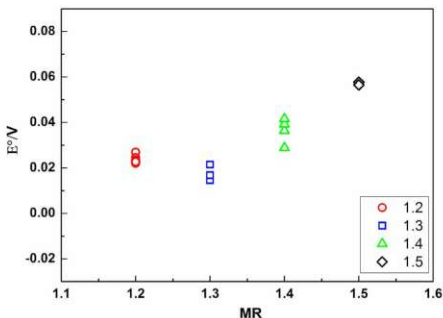


Fig. 4. Plot of the dependence of the standard electrode potential on the molar ratio for the second measurement at 800 °C.

At the end of the experiments, the melts from alumina pot were characterized also by X-ray powder diffraction (X-ray) analysis. X-ray analysis was used to determine the extent to which the melt composition changed after the addition of AlF_3 in repeated experiments. Also, the difference in melt composition after solidification between systems measured at different temperatures was determined. The rate of penetration of tungsten into the reference aluminium electrode was studied by EDS analysis.

X-ray recordings for repeated measurements within one temperature looked similar. Based on the results, it can be said that the electrolyte composition was the same at the end of the measurement not only for repeated experiments but also at all three temperatures even if the system overheated.

The results from the EDS are shown in Table 1. Based on the values, it can be said that the tungsten content in aluminium at 800 °C is about 1.3 wt. % and at the edge of the sample only 0.9 wt. %. At a temperature of 900 °C, the dissolution rate of tungsten increased, the tungsten content at the edge is 5.4 wt. % and increased to about 12.1 wt. %. This analysis shows the presence of a temperature dependence of the dissolution of tungsten in aluminium. At 800 °C, tungsten is dissolved very slowly in aluminium.

Table I.

Quantities of tungsten in quasi-reference aluminium electrodes at the measured edge / center at temperatures of 800 °C, 900 °C and 1000 °C.

Temperature / °C	Measured edge/centre	Quantity of W /wt. %
800	edge	0.9±0.1
	centre	1.3±0.2
900	edge	5.4±0.2
	centre	12.1±0.2
1000	edge	15.6±0.2
	centre	31.8±0.2

Conclusion

This work deals with measuring the electromotive force of the cell Al+TiB₂, Al-Al to characterize the thermodynamic properties of acidic cryolite systems. The aim of this work was to measure changes of electromotive force of cell Al + TiB₂, Al-Al in different types of sodium fluoride melts with a gradual change of MR in a wide temperature range area (from 800 °C to 1000 °C). Based on the electromotive force data of the cell without TiB₂ was determined the ratio of activities AlF₃ in the melt to activity in the reference electrode. The standard electrode potential of the system in the presence of TiB₂ for the composition of acidic cryolite electrolytes for temperatures of 800 °C, 900 °C and 1000 °C was determined based on obtained ratio of activities.

At a temperature of 800 °C, the standard electrode potential deviation was calculated on average for a first measurement of 57 mV with a standard deviation of 7 mV and for a second measurement of 26 mV with a standard deviation of 16 mV. In the second measurement, the values were higher because the tungsten wire was partially dissolved in a relatively small volume of molten aluminium, which was the reference electrode, as part of the electrode reuse in the reference electrode. In the second system at 900 °C, the standard electrode potential deviation was found to be 52 mV on average and the standard deviation was 17 mV. On repeated measurements, the value was 37 mV with a standard deviation of 21 mV. The value of the standard deviation in the second measurement was larger because tungsten slowly dissolved in the wire serving as a conductor in the reference electrode. At the last temperature of 1000 °C, after the addition of all additions of aluminium fluoride, the deviation of the standard electrode potential for the first measurement was found to be 35 mV and its standard deviation is 6 mV. In the second measurement, the standard potential deviation value was 14 mV, and the standard deviation was 5 mV. This temperature was the highest, and therefore there was a much more intense dissolution of tungsten in the aluminium electrode.

Acknowledgments

This work was supported by Ministry of Education, Science, Research and Sport of the SR: VEGA 1/0343/19; Slovak Research and Development Agency: APVV-17-0183 and the STU Grant scheme for Support of Excellent Teams of Young Researchers (ElCapFe).

References

1. Plambeck J. A.: *J. Chem. Eng. Data* 12, 77 (1967).
2. Kara S.: *In book: Electromotive force and measurements in several systems* (Jendrzeczyk-Handzlik, D., Fitzner, K., eds.), Chapter 7, p. 125, 2011.
3. Konečný L., Havel M., Jelínek M., Hájek M.: *Solidif. Metal. Alloys* 33, 29 (1997).

Voltammetric Determination of Forchlorfenuron at Carbon-based Electrodes

Mariola Brycht^a, Andrzej Leniart^a, and Sławomira Skrzypek^a

University of Lodz, Faculty of Chemistry, Department of Inorganic and Analytical Chemistry,
Tamka 12, 91-403 Lodz, Poland, E-mail: mariola.brycht@chemia.uni.lodz.pl

Abstract

In this study, quantitative determination of a plant growth regulator forchlorfenuron (CPPU) was performed using square-wave voltammetry on two types of carbon-based electrodes, namely glassy carbon electrode (GCE) and boron-doped diamond electrode (BDDE). Optimal conditions for CPPU quantification on GCE and BDDE were found in 0.04 mol L⁻¹ Britton-Robinson buffer at pH 3.0 and pH 2.0, respectively. The corresponding CPPU current at *ca.* +1.2 V on GCE and *ca.* +1.35 V on BDDE increased linearly with the CPPU concentration within linear dynamic ranges of 8.0–80.0 μmol L⁻¹ and 3.0–80.0 μmol L⁻¹, respectively.

Key Words: forchlorfenuron, glassy carbon electrode, boron-doped diamond electrode, square-wave voltammetry.

Introduction

The use of agrochemicals has been critically important in increasing the yield of agricultural crops. However, their intensive use may lead to the presence of residues in foodstuffs when commodities reach the market. Accordingly, the use of agrochemicals in different crops is strictly regulated by international organizations and national governments. With the aim of protecting public health and the environment, maximum residue limits (MRLs) fixing the highest acceptable amount of a particular chemical in a certain crop have been established.

Forchlorfenuron (Fig. 1), also referred to as CPPU (1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-phenylurea), is a highly effective synthetic phenyl urea cytokinin which acts synergistically with natural auxins to promote plant cell division and lateral growth^{1,2}. CPPU has been registered in many countries around the world, including EU and the USA, for the treatment of kiwifruits and table grapes. This relatively new plant growth regulator is extensively applied to improve berry/fruit size, fruit set, cluster weight, and cold storage¹. Due to the increasing demand for high-quality fruits in the international market, CPPU has been widely used and it is possible that the residues of this pesticide could eventually reach the consumers. Several studies have shown that CPPU may interfere with the endocrine system and could be harmful to human genes³, and long-term exposure to CPPU could cause the body protein metabolism disorder and mild emphysema⁴. In this respect, CPPU residues in foodstuffs should be monitored and controlled. The MRL proposed by EU is set at 0.01 mg kg⁻¹ for grapes and kiwifruit⁵, while the U.S. Environmental Protection Agency (US EPA) establishes MRLs of 0.03 and 0.04 mg kg⁻¹, respectively⁶. Since the MRLs for CPPU in fruits are strictly controlled, there is an urgent need to develop sensitive analytical methods to detect trace level of this compound.

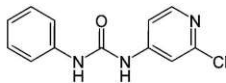


Fig. 1. Chemical structure of forchlorfenuron (CPPU).

To date, a number of methods have been developed for CPPU determination in foodstuffs such as the liquid chromatography with UV detection^{1,7-11}, the liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry¹², the liquid chromatography with tandem mass spectrometry^{9,13-17}, the ion mobility spectrometry¹⁸, the surface-enhanced Raman spectroscopy¹⁹, the enzyme-linked immunosorbent assay²⁰, the lateral flow immunoassay², and the catalase-based biosensor²¹.

Within this study, new and rapid square-wave voltammetric procedures for the determination of CPPU were developed. For that purpose, representative sp^2 and sp^3 carbon-based electrodes were used, namely glassy carbon electrode and boron-doped diamond electrode, respectively.

Experimental

A stock solution of 1.0 mmol L⁻¹ forchlorfenuron (CPPU, CAS number: 68157-60-8, Merck, Germany) was prepared by dissolving the substance in acetone (Avantor, Poland) due to low aqueous CPPU solubility (solubility of CPPU in water and acetone at 20°C is 39 mg L⁻¹ and 127 mg L⁻¹, respectively). All chemicals for the preparation of Britton–Robinson buffer solutions (BRBS, 0.04 mol L⁻¹, pH 2.0–12.0) as a supporting electrolyte were from Polish local producers and of analytical grade (if not specified otherwise). All solutions were prepared with triply distilled water.

Voltammetric experiments were performed using computer controlled potentiostat/galvanostat AUTOLAB PGSTAT101 (Metrohm, the Netherlands) operated by NOVA 1.11 software. All measurements were performed in three-electrode setup with silver chloride electrode (Ag/AgCl|3 mol L⁻¹ KCl) as a reference electrode and platinum wire as an auxiliary electrode. The working electrodes were GCE (BASi, USA) and BDDE (B/C = 1000 ppm, BioLogic, France) (both of 3 mm diameter). Before each series of measurements daily, the working electrodes were subject to electrochemical cleaning in 0.1 mol L⁻¹ sulfuric acid (H₂SO₄) solution by using repetitive cyclic voltammetry. Before each measurement, GCE and BDDE surfaces were washed with acetone and polished with 0.05 μm alumina suspension (Al₂O₃).

CPPU quantification on both electrodes was carried out by square-wave voltammetry (SWV) using the following optimized parameters: amplitude of 40 mV, frequency of 50 Hz, and step potential of 4 mV. Limits of detections (LODs) and limits of quantifications (LOQs) have been calculated from the calibration curves according to IUPAC recommendations using the following equations: $LOD = 3.3 \times SDA \times b^{-1}$ and $LOQ = 10 \times SDA \times b^{-1}$ (SDA – a standard deviation calculated from the intercept ($n = 4$), and b is the slope of the calibration line).

Results and discussion

Square-wave voltammetry was chosen for the quantitative determination of CPPU on GCE and BDDE. Extensive studies were performed to identify the optimal experimental conditions for SWV determination of CPPU on both working electrodes.

The influence of the Britton–Robinson buffer solutions in the pH range of pH 2.0–12.0 as the supporting electrolyte on the oxidation signal of CPPU (50.0 μmol L⁻¹) was investigated by SWV on both working electrodes (Fig. 2). With regard to GCE, CPPU gave one peak in the studied pH range, and the highest and best-shaped CPPU signal was obtained at pH 3.0 of BRBS, therefore, this medium was chosen as the supporting electrolyte in further studies on GCE. In the case of BDDE, one oxidation peak of CPPU was recorded in the pH range from 2.0 to 6.0; at pH values higher than 6.0, no CPPU peak was recorded. A tendency towards a decrease in the peak heights of CPPU with increasing of pH value of BRBS in the pH range of 2.0–6.0 was observed. As the best results were obtained in pH 2.0 of BRBS, this medium was

consequently selected for further analytical studies on BDDE. In addition, the peak potentials were shifted linearly toward more negative values with an increase in pH in the range of 2.0–12.0 on GCE and 2.0–6.0 on BDDE. The slopes of 60.5 mV pH⁻¹ and 55.0 mV pH⁻¹ on GCE and BDDE, respectively, are close to the ideal Nernstian value of 59 mV pH⁻¹ which indicate that the equivalent number of protons and electrons participates in the electrochemical reaction.

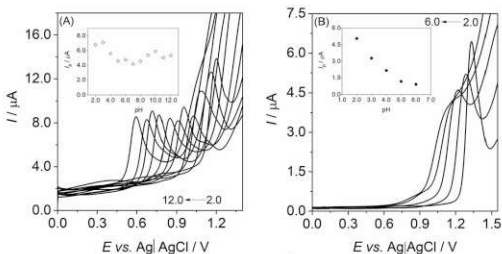


Fig. 2. SW voltammograms of CPPU ($50.0 \mu\text{mol L}^{-1}$) recorded in BRBS on (A) GCE and (B) BDDE. Insets: the corresponding dependences of SWV peak currents (I_p) vs. pH.

As the SWV parameters are interrelated and have a combined effect on the peak current, the influence of the potential modulation parameters such as amplitude, frequency, and step potential in the range of 10–100 mV, 10–150 Hz, and 1–10 mV, respectively, was investigated at both electrodes. The following SWV parameters were found to give the best results with respect to shape and height of CPPU peak on both working electrodes: amplitude of 40 mV, frequency of 50 Hz, and step potential of 4 mV.

Further, in order to determine linear dynamic ranges (LDRs), the wide CPPU concentration range from 1.0 to 100.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ was measured. It was found that the CPPU current increased linearly with the CPPU concentration within LDRs of 8.0–80.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ on GCE and 3.0–80.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ on BDDE, respectively. The corresponding SW voltammograms and concentration dependences on both electrodes are depicted in Fig. 3. The analytical parameters determined from calibration curves are summarized in Table I. As it can be seen, slightly better sensitivity, wider LDR with the lower linear response limit as well as lower LOD and LOQ values were achieved on BDDE.

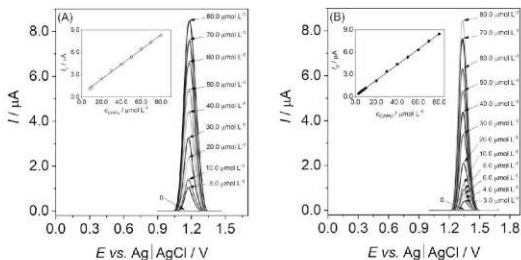


Fig. 3. SW voltammograms of CPPU on (A) GCE in BRBS, pH 3.0, with concentration of 8.0–80.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and (B) BDDE in BRBS, pH 2.0, with concentration of 3.0–80.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Insets: the calibration graphs.

Table I.

Parameters of CPPU calibration straight lines measured by SWV at GCE and BDDE in BRBS, pH 3.0 and pH 2.0, respectively ($n = 4$).

Parameter	GCE	BDDE
Peak potential (E_p vs. Ag AgCl), V	+1.2	+1.35
Linear dynamic range (LDR), $\mu\text{mol L}^{-1}$	8.0–80.0	3.0–80.0
Coefficient of determination (R^2)	0.9986	0.9995
Slope (b), $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$	0.0997	0.104
Intercept (a), μA	0.389	0.118
Limit of detection (LOD), $\mu\text{mol L}^{-1}$	2.2	0.75
Limit of quantification (LOQ), $\mu\text{mol L}^{-1}$	6.8	2.3

Conclusions

This study presents the newly developed SWV procedures for the direct CPPU determination at GCE and BDDE. The proposed methodologies are simple, rapid, and cheap, and can be a good analytical alternative to complex and expensive ones published so far.

References

- Hu J.-Y., Li J.-Z.: *J. AOAC Int.* 89, 1635 (2006).
- Suarez-Pantaleon C., Wichers J., Abad-Somovilla A., van Amerongen A., Abad-Fuentes A.: *Biosens. Bioelectron.* 42, 170 (2013).
- Tixier C., Sancelme M., Sancelme M., Bonnemoy F., Cuer A., Veschambre H.: *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1381 (2001).
- Hu Q., Nelson W. J., T. Spiliotis E.: *J. Biol. Chem.* 283, 29563 (2008).
- Commission Regulation (EU) No 398/2014 of 22 April 2014 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for benthiavalicarb, cyazofamid, cyhalofop-butyl, forchlorfenuron, pymetrozine and silthiofam in or on certain products. *Off. J. Eur. Union L* 23.4.2014 119/3.

6. U.S. Code of Federal Regulations, Title 40—protection of environment, part 180—tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food, 180.569 forchlorfenuron; tolerances for residues.
7. Li P., Lu Y., Cao J., Li M., Yang C., Yan H.: *J. Chromatogr. A.* 1623, 461192 (2020).
8. Wang F., Zhang W., Chen Y., Xu G., Deng Z., Du H., Zhao W., Zhang S., Zhao W.: *Anal. Methods* 7, 6365(2015).
9. Negre M., Passarella I., Vindrola D.: *J. AOAC Int.* 97, 938 (2014).
10. Kobayashi M., Takano I., Tamura Y., Tomizawa S., Tateishi Y., Sakai N., Kamijo K., Ibe A., Nagayama T.: *J. Food Hyg. Soc. Japan* 48, 148 (2007).
11. Sharma D., Awasthi M. D., *Chemosphere* 50, 589 (2003).
12. Valverde A., Aguilera A., Ferrer C., Camacho F., Cammarano A.: *J. Agric. Food Chem.* 58, 2818 (2010).
13. Pu C. H., Lin S. K., Chuang W. C., Shyu T. H.: *J. Food Drug Anal.* 26, 637 (2018).
14. Yan Z., Nie J. Y., Xu G. F., Li H. F., Li J., Li Z. X., Wu Y. L., Kuang L.: *Hortic Plat J.* 2, 203 (2016).
15. Liu S., He H., Huang X., Jin Q., Zhu G.: *J. Sep. Sci.* 38, 3525 (2015).
16. Shi X., Jin F., Huang Y., Du X., Li C., Wang M., Shao H., Jin M., Wang J.: *J. Agric. Food Chem.* 60, 60 (2012).
17. Valverde A., Piedra L., Aguilera A., Boulaid M., Camacho F.: *J. Environ. Sci. Health B* 42, 801 (2007).
18. Orellana-Silla A., Armenta S., de la Guardia M., Mercader J. V., Esteve-Turrillas F. A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 410, 5961 (2018).
19. Chen X., Yan K., Xiao X., Li G.: *J. Sep. Sci.* 39, 2340 (2016).
20. Suárez-Pantaleón C., Esteve-Turrillas F. A., Mercader J. V., Agulló C., Abad-Somovilla A., Abad-Fuentes A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 2019 (2012).
21. Xu Q., Cai L., Zhao H., Tang J., Shen Y., Hu X., Zeng H.: *Biosens. Bioelectron.* 63, 294 (2015).

Electrical Conductivity of Low-Temperature Cryolite Electrolytes for Innovation Process in Aluminium Production

Andrea Červenková, Emília Mališová, and Ján Hivěš

Faculty of Chemical and Food Technology STU in Bratislava, Institute of Inorganic Chemistry, Technology and Materials, Radlinského 9, 812 37 Bratislava 1,
E-mail: andrea.cervenkova@stuba.sk

Abstract

Innovations of aluminium production are focused on using inert electrodes and new low-melting types of electrolytes. The benefits are multiple; the most important are environmental, economic and energetic aspects. The NaF-KF- AlF_3 system appears to be one of the most promising low-temperature electrolytes suitable for aluminum production. Electrical conductivity, as one of the most important properties of electrolytes, has been studied. The melts with different molar ratios MR ($n(\text{NaF}+\text{KF})/n(\text{AlF}_3)$) and with different ratios between sodium fluoride and potassium fluoride were studied at various temperatures. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was used as a suitable method for electrical conductivity investigation.

Key Words: Aluminium electrolysis, Low-temperature electrolytes, Electrical conductivity.

Introduction

Aluminium has been produced by the Hall-Héroult electrolytic process for more than 130 years. This technology uses carbon electrodes to decompose alumina (Al_2O_3) dissolved in molten sodium cryolite based electrolyte. This process is operated at high temperatures ($t > 950^\circ\text{C}$) which makes it a high energy consumption and harmful. Furthermore, aluminium production using carbon electrodes produces greenhouse gases.

A long-term objective of aluminium production is to replace carbon anodes with inert materials and to lower the operating temperature of the electrolytic process ($t < 900^\circ\text{C}$). There are a number of environmental and economic benefits associated with aluminium production using inert anodes and low-temperature electrolytes. Two options to reduce the operating temperature can be applied. The first one uses the traditional sodium cryolite electrolyte with a high AlF_3 addition. However, AlF_3 also reduces the alumina solubility and the electrical conductivity. The second option suggests finding new types of electrolytes. The KF- AlF_3 based electrolytes provides better alumina solubility at a low temperature. However, due to sodium accumulation (fed into the system with alumina) this system changes to multicomponent NaF-KF- AlF_3 system.

Electrical conductivity is a very important property of aluminium production because it is associated with energy consumption. In this work, electrical conductivity of three-component low-temperature NaF-KF- AlF_3 melts was measured for various MR and different NaF additions¹.

Experimental

The apparatus for electrical conductivity measurement (Fig. 1) consisted of a conductance tube-type cell and a measured electrode. A thermocouple (2) (insulated with a corundum tube (3)) was placed in the graphite crucible (1). Furthermore, a steel contact rod (6) (also insulated by a corundum tube (3)) was screwed into the crucible. A tungsten electrode (4) was located in a stainless-steel tube (5). It was also insulated by a corundum tube. The stainless-steel tube was

screwed into the cell body of hot-pressed pyrolytic boron nitride (BN) (7). There were also an BN insulating ring (8) and a terminative stainless-steel ring (9). At the bottom of the electrode, a pyrolytic BN tube (10) was firmly inserted into the BN cell body. Apart from the tungsten electrode, it was the only part in direct contact with the molten electrolyte (11).

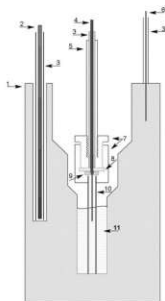


Fig. 1. Conductivity cell.

The whole conductivity cell was constructed with the electrodes in fixed position, i. e. between the end of the tungsten rod and the bottom of the graphite crucible. This fixed position was ensured by a tungsten rod with gradually reducing diameter from 3 mm to 2 mm. The two-electrode connection was used, the tungsten rod served as a working electrode (WE) and the graphite crucible served as a counter electrode (CE).

The crucible containing 10 g of the salt mixture was immersed into a vertical laboratory furnace with a cooling jacket and controlled argon atmosphere (99.996 %). It was heated up to the required temperature, which was monitored by a Pt-Pt10-Rh thermocouple with the uncertainty within ± 0.3 °C. The temperature of primary crystallization (TPC) was taken from the phase diagram of NaF-KF-AlF₃ system².

EIS was used to determine the electrical properties of the system. AC-techniques with sine wave signal and small amplitude (5-10) mV were used. The high frequency range from 100 Hz to 100 kHz was set and 61 readings were taken within this range. A Solartron Impedance/Gain Phase Analyzer 126 and Solartron ECHI 1287 were used to measure the impedance. Obtained Nyquist diagrams were evaluated by the nonlinear regression analysis according to the proposed equivalent circuit (Fig. 2). Values of the electrical resistance of melts (R_d) were obtained with the uncertainty up to 0.5 %. The electrical conductivities were calculated from Eq. 1, where R is the electrolyte resistance (Ω), and C is the known conductivity cell constant (cm^{-1}), which was determined by calibration against sodium chloride(s.p.) with known values of electrical conductivity³.

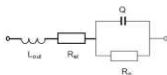


Fig. 2. Equivalent circuit for Nyquist diagrams evaluation.

$$\kappa = \frac{C}{R} \quad (1)$$

Results and discussion

The effect of different molar ratios

Electrical conductivity of the three-component NaF-KF-AlF₃ system was measured in a low-temperature area. In the first part the effect of different AlF₃ additions (different MR at a constant ratio of NaF: KF = 25:75) was studied. For four different studied MRs (1.2-1.5) the working temperature was in the range (678-902) °C. Measurements at given MRs were always performed from the highest temperature to the lowest, with a gradual decrease of 20 °C, until the temperature about 10 °C higher than the TPC (Temperature of Primary Crystallization) was reached. For each temperature, 5-8 EIS spectra were measured, and the average values were determined.

The results are shown in Fig. 3(a). At MR = 1.2, the melting point of aluminium (660 °C) was almost reached. It is clearly seen that electrical conductivity decreased with decreasing temperature and decreasing MR. For MR = 1.2-1.4, the conductivity decline is quite similar with minimal deviations. The effect of AlF₃ addition in systems with a small NaF content seems to be negligible.

The obtained data were compared with the pure potassium system KF-AlF₃ (Fig. 3(b)). The lines in Fig. 3(b) are calculated from literature data⁴. This comparison implies that NaF addition caused electrical conductivity increase. In studied systems, electrical conductivity increased on average by 0.060 S.cm⁻¹ compared to KF-AlF₃ system. Moreover, one can see that electrical conductivity increase depended on MR, the effect was more significant at higher MR. At MR = 1.2 conductivity increased by 0,035 S.cm⁻¹, at MR = 1.5 it was by 0,100 S.cm⁻¹.

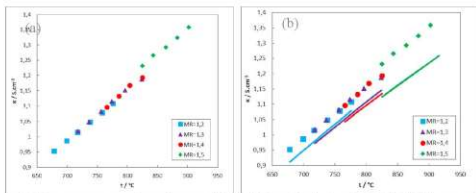


Fig. 3. (a) The temperature dependence of electrical conductivity of NaF-KF-AlF₃ system with different MR at a constant ratio of NaF: KF = 25:75. (b) Electrical conductivity comparison of NaF-KF-AlF₃ (experimental data – symbols) and KF-AlF₃ (calculated data⁴ – full lines) systems.

The effect of NaF addition

In this part electrical conductivity of systems with the same MR (1.5) and different NaF additions were investigated. For four studied systems with different NaF additions ((15-50) mol % the working temperature was in the range (792-902) °C. The measurements were carried out in the same way as in the previous chapter.

As the results in Fig. 4 (a) indicate electrical conductivity increased with increasing NaF addition. Using the highest NaF addition (50 mol %), conductivity increased by 0.168 S.cm⁻¹ compared to the lowest NaF addition (15 mol %).

Obtained experimental data of NaF-KF-AlF₃ system with various NaF additions were compared with literature data ^{1,4} [1,4]. The differences can be seen in Fig. 4 (b). System with 15 mol % NaF addition was compared with pure potassium system. The line was calculated from equation for KF-AlF₃ system in temperature range (810-910) °C cit. ⁴. Compared to this system electrical conductivity of NaF-KF-AlF₃ system increased by 0.100 S.cm⁻¹. On the other side system with 50 mol % NaF addition was compared with pure sodium system. The line was calculated using equation for NaF-AlF₃ system in temperature range (790-880) °C ¹. Using the highest NaF addition in the multicomponent system the conductivity decreased by 0.164 S.cm⁻¹ in comparison with the NaF-AlF₃ system.

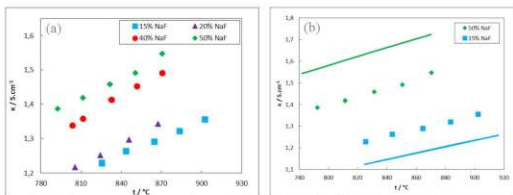


Fig. 4. (a) The temperature dependence of electrical conductivity of NaF-KF-AlF₃ system with MR = 1.5. (b) Electrical conductivity comparison of NaF-KF-AlF₃ system with pure NaF-AlF₃ (blue full line) and KF-AlF₃ (green full line) systems.

Conclusion

Electrical conductivity of multicomponent NaF-KF-AlF₃ system in low-temperature area was investigated. At first the influence of different MR (different AlF₃ additions) on electrical conductivity was studied. As MR and temperature decreased the conductivity also decreased. Furthermore, the effect of various NaF additions to the multicomponent melt with constant MR was examined. Increasing NaF content caused the conductivity increase. It was also possible to reduce the TPC up to 660 °C in these multicomponent melts. In conclusion we can say that AlF₃ addition significantly reduces the conductivity compared to currently used industrial melts. The KF addition also causes conductivity decrease, but it leads to Al₂O₃ solubility improvement. The NaF addition increases the conductivity values. Using a suitably MR set and suitably mutual NaF-KF ratio, it is possible to use NaF-KF-AlF₃ electrolytes in the aluminium electrolytic production, especially in connection with inert electrodes setup and a possible electrolysis cell design change.

Acknowledgments

This work was supported by Ministry of Education, Science, Research and Sport of the SR: VEGA 1/0343/19; Slovak Research and Development Agency: APVV-17-0183 and the STU Grant scheme for Support of Excellent Teams of Young Researchers (EICapFe).

References

1. Kubiňáková E., Danielik V., Hivěš J.: *Electrochim. Acta* *265*, 474 (2018).
2. Danielik V., Gabčová J.: *J. Therm. Anal. Calorim.* *76*, 763 (2004).
3. Janz, G. J.: *J. Phys. Chem. Ref. Data* *17*, 232 (1988).
4. Kubiňáková E., Danielik V., Hivěš J.: *J. Electrochem. Soc.* *165*, 274 (2018).

Electrochemical Research of Disruption of *E. coli* Membranes

Martina Čierna ^a, Lucia Birošová ^b, Ján Krahulec ^c, Miroslav Gál ^d, and Olivia Dakošová ^d

^aInstitute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University, Kateřinská 32, 12108 Praha 2, Czech Republic

^bInstitute of Biochemistry, microbiology and health protection, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia

^cFaculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Department of Molecular biology, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovakia

^dDepartment of Inorganic Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia,
E-mail: miroslav.gal@stuba.sk

Abstract

In this study, selected physico-chemical methods for the determination of possible membrane permeabilization of *Escherichia coli* (*E. coli*) were examined. *E. coli*, a gram-negative rod-shaped bacterium, is an important component of the mammalian intestinal microflora. Partial aim of this work was to identify β -galactosidase enzyme as one of the possible factors characterizing disintegration of bacterial membrane. To permeabilize the bacterial membrane, cathelicidin LL-37 and microwave radiation were used. In the investigation of structural changes in the bacterial membrane, square-wave voltammetry and chronopotentiometric analysis at mercury electrode were used. UV/VIS spectrophotometry was used to indirectly track changes in bacterial cell structure.

Key Words: *Escherichia coli*, Permeabilization, UV/VIS spectrophotometry, Square-wave Voltamperometry, Chronopotentiometric stripping analysis.

Introduction

Bacteria are microorganisms that are present in every corner of our planet. They form large group of prokaryotic organisms. Their size ranges from 0.3 to 5 μm and they have a number of shapes, such as spirals, spheres, and rods. They have a tendency to form larger active complex. This feature is typical for *cocci* as they can form diplococci, staphylococci, or streptococci ¹. *Escherichia coli* (*E. coli*), rod-shaped bacterium, is an important component of the mammalian intestinal microflora. However, some strains of this bacterium are pathogenic and can cause a variety of diseases. These microorganisms are gram-negative bacilli that exist singly or in pairs. *E. coli* is one of the most frequent causes of many common bacterial infections, such as cholecystitis, bacteremia, cholangitis, urinary tract infection, and other clinical infections, e.g. neonatal meningitis and pneumonia ².

The main disadvantage of commonly used methods for the determination of antimicrobial effect of various agents is that the results are usually visible next day. Changes in the physico-chemical properties between a native and damaged bacterial membrane can be used for the rapid determination of the deterioration of bacterial membrane. The aim of this contribution is to study the permeabilization of bacterial membrane by physico-chemical techniques. Specifically, we report the use of electrochemical methods for the study of membrane disintegration in two of *Escherichia coli*. Selected electrochemical methods such as cyclic voltammetry, square-wave voltammetry (SWV), and chronopotentiometric stripping analysis were used in order to examine the possible membrane permeabilization of two *E. coli* bacterial strains by antimicrobial peptide and microwave irradiation. Partial aim of this work was to identify β -galactosidase enzyme as one of the possible factors characterizing

disintegration of bacterial membrane. To permeabilize the bacterial membrane, cathelicidin LL-37, the body's own antimicrobial peptide, and membrane degradation by microwave radiation were used. UV/VIS spectrophotometry was also used to indirectly track changes in bacterial cell structure.

Experimental

To determine the permeabilization of bacterial membrane two bacterial strains, *Escherichia coli* CCM3988 and *Escherichia coli* ML-35p, were studied. The cultivation process and β -galactosidase detection are in more details described in our previous reports ^{3,4}.

All electrochemical measurements were performed under semi-sterile conditions in a 6 ml degassed phosphate buffer solution. A platinum wire electrode and a 3M KCl solution saturated Ag/AgCl electrode were used as an auxiliary electrode (AE) and a reference electrode (RE), respectively. Two types of working electrodes (WE) were used, a hanging mercury drop electrode (HMDE WK2) and a glassy carbon electrode (GCE 5 mm diameter). The surface of the graphite electrode needs to be at first pretreated by polishing with polycrystalline diamond suspension and with finer alumina suspension on the polishing pads and then electrochemically and chemically activated. Chronoamperometry served as a tool for electrochemical activation of the polished electrode, which was immersed in the supporting electrolyte of degassed phosphate buffer solution. Stepped potential of 1.7 V was applied to the graphite electrode for 90 s and the current was monitored as a function of time ⁴.

Chemical activation of graphite electrode was based on the application of the mixture of 0.05 M *N*-hydroxysuccinimide and 0.2 M 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide in a ratio of 1:1 on the surface of the electrode for 12 min. Subsequently, an inoculum of the different volumes was added into the supporting electrolyte and accumulated on the electrode surface. The square-wave voltammogram and chronopotentiogram were obtained.

Results and discussion

In order to prove permeabilization effect of cathelicidine LL-37 or microwave irradiation, respectively, squarewave voltammetry and chronopotentiometric stripping analysis, as very sensitive methods, were used.

In the Fig. 1 squarewave voltammogram of *E. coli* strain before and after exposure to cathelicidine LL-37 is shown ⁴.

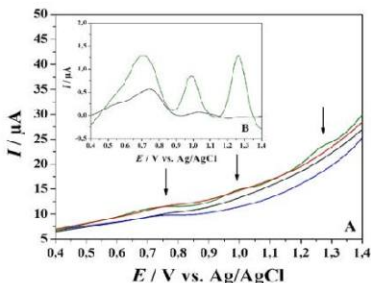


Fig. 1. A) SWV of *E. coli* strain before and after exposure to LL-37. (B) SWV after subtracting the baseline. Blue curve (PB) and red curve (LL-37) represent baselines. Green curve demonstrates accumulated bacterial cells on the surface of the graphite electrode. Black curve represents bacterial cells treated by LL-37⁴.

Based on the information in Fig. 1, it can be deduced that cathelicidin LL-37 has a strong impact on *E. coli* membrane. After addition of this antimicrobial peptide to the solution with *E. coli* strains clear differences on SW voltammograms observed. Very similar observation can be made after microwave irradiation³⁴.

Conclusion

It can be concluded that the cathelicidin LL-37 and microwave radiation have a significant effect on the electrochemical signal provided. In SWV, the curves representing the native form of the *E. coli* bacteria, in addition to the background peaks, exhibit two other peaks in the area of high positive potentials versus RE probably corresponding to oxidation of OH groups on bacterial membrane structures. The disappearance of these peaks in bacteria that have been exposed to the antimicrobial effect of cathelicidin or microwave radiation could be a result of a change in membrane structure. Differences observed on graphite electrodes between intact bacteria cells and cells with disrupted bacterial membrane due to microwave radiation are of different nature than due to LL-37 exposure³⁴.

Acknowledgments

This research was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-17-0149, by the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic under the contract No. VEGA 1/0343/19.

References

1. Kayser F. H., Bienz K. A., Eckert J., Zinkernagel R. M.: *Medical Microbiology*, 1st ed., Thieme 2004.
2. Nataro J. P., Kaper J. B., *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142 (1998).
3. Čierna M.: *Diploma Thesis*. Slovak University of Technology, Bratislava 2019.
4. Čierna, M., Naumowicz, M., Bírošová, L., Krahulec, J., Sokolová, R., Kolivoška, V., Sebechlebská, T., Kielar, F., Gál, M., *J. Electroanal. Chem.* 857, 113761 (2020).

Design and Utilization of 3D Printed Electrochemical Flow Cell (Návrh a využitie 3D tlačenej prietokovej elektrochemickej nádoby)

Olivia Dakošová^a, Eva Melníková^a, and Miroslav Gál^a

^aSlovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology,
Department of Inorganic Technologies and Materials, Radlinského 9, 812 37 Bratislava,
Slovak Republic

Abstract

In recent years a significant advance in the utilization of 3D technology in different areas of science was made. This work aims to determine the content of micropollutants through an electrochemical flow cell using a screen-printed electrode. The electrochemical flow cell was designed as a 3D model and printed with the help of an FDM-based 3D printer. We used various electrochemical methods to determine the effect of concentration, polarization rate, and flow rate on the solution's electrochemical behavior.

Key Words: 3D printing, Flow cell, Electrochemistry, Screen-printed electrode.

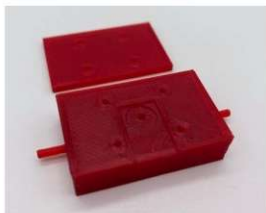
Úvod

3D tlač je spôsob, ktorým sa na základe predpripraveného 3D modelu vytvára trojdimenzionálny objekt. Ten vzniká opakovaným nanášaním jednotlivých vrstiev materiálu prostredníctvom 3D tlačiarne¹. Najjednoduchší variant 3D tlačiarnie spočíva v technike FDM (z ang. fused deposition modeling), ktorá je vďaka jednoduchej tlačovej mechanike, všestrannosti tlačiteľných materiálov a nízkym nákladom najrozšírenejším typom 3D tlačiarnie. Využitie 3D tlače v elektrochémií sa posledné roky dostáva do popredia, buď na výrobu zariadenia na analýzu analytických vzoriek alebo aj na samotnú tlač funkčných elektród^{2,3}.

Experimentálna časť

Počas merania sme použili 0,1 M chlorid draselný (Sigma-Aldrich, Nemecko) a roztoky s rôznym obsahom hexakvanoželezitanu draselného (Sigma-Aldrich, Nemecko) a to 0,07 mM, 0,15 mM, 0,29 mM, 0,58 mM a 1,16 mM. Na uskutočnenie merania sa používala tzv. sieťotlačená elektróda (SPE, z angl. screen printed electrode), ktorá v sebe zahŕňa pracovnú, referenčnú a pomocnú elektrodu. Materiál pracovnej a protielektrody bol grafit a referenčná elektróda bola argentochloridová elektróda Ag|AgCl|3M KCl. Samotné meranie prebiehalo v elektrochemickej prietokovej celi, ktorá bola poskytnutá Dr. V. Kolivoškom z Ústavu fyzikálnej chémie J. Heyrovského, České akadémie vied, Praha. K elektrochemickej cele bolo zapojené peristaltické čerpadlo Helago PCD1031 pomocou hadice s vonkajším priemerom 4 mm a vnútorným priemerom 2 mm.

Na základe experimentov realizovaných v už spomenutej prietokovej cele, sme navrhli novú vlastnú nádobku. Návrh 3D modelu prebiehal pomocou programu SketchUp Pro 2021, elektrochemická cela bola navrhnutá tak, aby obsahovala komoru pre SPE v presných rozmeroch: šírka 10,2 mm, hrúbka 34 mm, dĺžka 0,5 mm. Miesto kde sa dochádza ku kontaktu elektrolytu a aktívnej časti elektródy je utesené O-krúžkom. Samotná nádobka má rozmery: šírka 25 mm, výška 10 mm, dĺžka 40 mm. Stred trúbky prítoku a odtoku je umiestnený 7,5 mm odspodu cely. Celá nádobka je upevnená pomocou základnej dosky. Tlač sa uskutočnila pomocou tlačiarne Evnovo (Artillery3D) Sidewinder X1, používali sa tlačové filamenty materiálu PETG s priemerom 1,75 mm. Parametre, ktoré sme nastavili pri tlači: hrúbka 1 vrstvy: 0,1 mm, priemer trysky: 0,2 mm, teplota trysky: 205 °C, teplota vyhrievacej podložky: 60°C. Celková doba tlače trvalo 140 minút a spotrebovalo sa 3131 mm filamentu.

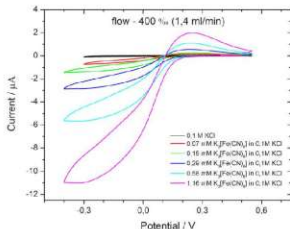


Obr. 1. Finálna verzia prietokovej elektrochemickej cely požadovaných rozmerov.

Elektrochemické merania boli prevedené na prístroji Potentiostat PGSTAT 301N (Metrohm, Švajčiarsko), získané údaje boli vyhodnotené softvérom NOVA 2.1 (Metrohm, Švajčiarsko) a do konečnej grafickej podoby sa spracovali pomocou programu OriginPro 8.6 (OriginLab, USA).

Výsledky a diskusia

Pozorovali sme vplyv koncentrácie na cyklické voltampérogramy. Na Obr. 2 sledujeme závislosť prúdu voči aplikovanému potenciálu pri prietoku 1,4 mL/min. Čierna krivka predstavuje základný elektrolyt 0,1 M KCl. Farebné krivky prislúchajú roztokom s rôznym podielom látky $K_3[Fe(CN)_6]$. Z voltampérogramu je zrejmé, že sa potenciál anodového a katodového piku výrazne nemení v závislosti od obsahu hexakyanoželezitanu draselného na rozdiel od prúdovej odozvy, ktorá sa s rastúcim podielom $K_3[Fe(CN)_6]$ zvyšuje.

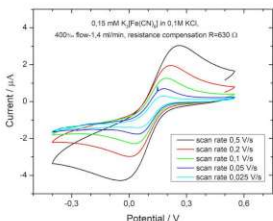


Obr. 2. Vplyv koncentrácie roztokov s rôznym obsahom $K_3[Fe(CN)_6]$ pri prietoku 1,4 mL/min.

V ďalších meraniach sme sledovali vplyv rýchlosti prietoku (od 0 mL/min až po 3,5 mL/min) roztoku. Zo získaných voltampérogramov bolo zrejmé, že sa potenciál anodového a katodového piku mení v závislosti od rýchlosti prietoku roztoku a posúva sa k zápornejším potenciálom.

Menia sa približne rovnomerne, preto potenciálový rozdiel môžeme považovať za konštantný. Prúdová odozva sa s narastajúcim podielom hexakynoželezitanu draselného menila výraznejšie. Anódové a katódové piky sa pre jednotlivé rýchlosti prietoku líšia. Pri nižších prietokoch sme zaznamenali vyššie anodové a katódové piky. Výška katódového a anodového prúdového píku klesá s rastúcou rýchlosťou prietoku.

Na záver sme sledovali vplyv rôznych polarizačných rýchlostí na cyklický voltampérogram roztoku s obsahom 0,15 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ (viď Obr. 3). Krivky predstavujú rôzne polarizačné rýchlosti od 0,025 V/s až po 0,5 V/s. Znížením polarizačnej rýchlosti sa potenciál katódového píku bude zvyšovať, kým potenciál anodového píku sa bude znižovať. Z toho vyplýva, že potenciálový rozdiel nebude konštantný, ale zvýšením polarizačnej rýchlosti sa bude zvyšovať, rovnako ako aj prúd katódového a anodového píku.



Obr. 3. Vplyv rôznych polarizačných rýchlostí pri prietoku roztoku 1,4 mL/min.

Záver

Cieľom tejto práce bolo sledovať elektrochemické správanie sa roztoku v prietokovom systéme na povrchu SPE v závislosti od koncentrácie roztoku, rýchlosti prietoku a polarizačnej rýchlosti. Na základe týchto meraní sme navrhli našu vlastnú prietokovú celu, ktorú sme následne vytlačili pomocou 3D tlačiarne, ktorá využíva technológiu FDM. Informácie, ktoré sme vďaka týmto meraniam získali predstavujú základ pre ďalšie merania, a to na stanovenie mikropolutantov v prietokovom systéme.

Acknowledgments

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contracts no. APVV-17-0149 and PP-COVID-20-0019.

References

1. Agrawaal H., Thompson J. E.: *Talanta Open* 3, 2021.
2. Erkal L., Selimovic A., Gross B. C., Lockwood S. Y., Walton E. L., McNamara S., Martin R. S., Spence D. M.: *Lab Chip* 14, 2023, 2014.
3. Munshi A. S., Chen C., Townsend A. D., Martin R. S.: *Anal. Methods* 10, 3364, 2018.

Electrochemical Behaviour of Oligonucleotides Adsorbed on Pyrolytic Graphite Electrode

Aleš Daňhel and Miroslav Fojta

Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, 612 00 Brno, Czech Republic, E-mail: danhel@ibp.cz

Abstract

An understanding of electrochemical behavior of specific sequences of the oligonucleotides (ODNs) at basal plane pyrolytic graphite electrode (bPGE) is crucial for its further application in direct DNA electroanalysis. This work is focused on electrochemical behaviour of guanine reach ODN sequences adsorbed on bPGE, which are able to fold into the guanine quadruplexes (G4) in presence of K^+ or remain single stranded (ss-) in the presence of Li^+ . Thus, following factors: ionic strength, sequence, secondary structure, adsorption time, and ODN's concentration affecting ODNs' adsorption and resulting current responses have been observed in this work. Thanks to this study, suitable conditions allowing to distinguish between the ss- and G4 forms of ODNs were found. These results may be prospectively used in further research of G4 structures, stability, and interaction with solid surfaces or with G4 ligands, the prospective cancer therapeutics.

Key Words: DNA, electrochemistry, guanine quadruplex, pyrolytic graphite electrode, secondary structure, voltammetry.

Introduction

Next to the canonical DNA secondary structure (B-form), DNA may also form the non-canonical structures (parallel, folded slipped structures, cruciforms, hairpins, triplexes *etc.*).¹ Suitable guanine reach sequences may fold into a guanine quadruplexes (G4), which are stabilized by presence of univalent cations such as K^+ , Na^+ or NH_4^+ . Cytosine reach sequences may fold into the so called i-motives under the suitable conditions (pH). Both non-canonical DNA forms play significant role in biological processes of the *eukaryotic* and *prokaryotic* cells (regulation, transcription and translation).² Electrochemical analysis of the G4 either direct^{3,4} or indirect⁵ is still scarce.

We have already showed, that specific electrochemical signals related to individual DNA bases could be obtained at the bPGE, due either to irreversible reduction or oxidation of the parent bases or due to oxidation or reduction (respectively) of the products of the former primary electrochemical transformations.⁶ Nevertheless, further studies are needed to clarify the mechanisms of nucleobase redox processes on the bPGE and observed possibilities of the bPGE in DNA electroanalysis. Broad applicable potential window together with extensive ODN signal response at bPGE represent promising tool for G4 electroanalysis.

In this work, we have studied the ODN adsorption on bPGE by adsorptive transfer stripping voltammetry in cathodic potential range, and moreover optimized the adsorption and electrochemical conditions with the aim to distinguish G4 from ssODN structures using cyclic voltammetry at bPGE.

Experimental

Oligonucleotides (sequences see in Tab. 1) were purchased from Merck, other chemicals were at least p.a. purity and purchased from Sigma-Aldrich. All the solutions and electrolytes were

prepared from double distilled water (ddH₂O) produced by distilled apparatus (type 2004, GFL).

Table 1. Studied ODNs.

ODN	Length	Sequence (5'-3')	M, g/mol	CA	GT
4BAS-com	15	GTA CCC GCC GTA CCC	4473.9	10	5
HUT-com	22	CCC T(AA CCC T) ₃	6504.2	18	4
HUT-T2	22	(AGG GTT) ₃ AGG G	6966.5	4	18
dsHUT	2x22	CCC T(AA CCC T) ₃ GGG A(TT GGG A) ₃	13470.7	22	22
F-26	26	6-FAM-TT(T TAG GG) ₄	8721	4	22
F-26-T	26	6-FAM-TT(T TAG GG) ₄ -TAMRA	9344	4	22

Electrochemical measurements were carried out by potentiostat Autolab 302N (Metrohm-Autolab) connected with VA Stand 663 in three electrode setup including: bPGE (geometric surface area 7.07 mm²) as working electrode, Ag/AgCl/3M KCl as reference electrode and platinum rod as counter electrode (both Metrohm-Autolab). The bPGE (Momentive, USA) electrode was home made by sealing the bPGE cylinders (o.d. 3 mm, length 5 mm) into an epoxy resin (Torr Seal, Varian) and contacted by copper cable. The electrode was briefly polished by twisting it on a paper towel and peeling off 5–7-times using adhesive tape (Tesa). Immediately afterwards, ODNs were adsorbed at the PGE surface from 3 μ L aliquots of ODN containing specific amount of the salt (K⁺ or Li⁺) during adsorption time (*t*_{ads}) 0–300 s. The electrode was then rinsed in ddH₂O (if not stated otherwise) and placed into the electrochemical cell containing blank background electrolyte (0.2M acetate buffer pH 5.0). Oxygen was removed from the solution by 5 min passing a stream of argon (5.0 grade, SIAD) saturated with vapors of double distilled water in all voltammetric experiments. All the measurements were carried out at room temperature 25°C. I-E curves were registered by multiple linear scan voltammetry (LSV). LSV setting: scan rate 1 V/s, potential step 2.4 mV. Several successive LSV scans were combined to produce cyclic voltammograms (CV). A moving average (window size 1) was used for baseline correction.⁶

Results and Discussion

At the beginning, we have studied electrochemical responses of the selected ODNs (20 μ M HUT-T2, HUT-com and their 1:1 molar mixture forming double strand (dsHUT)) adsorbed (*t*_{ads} = 60 s) on bPGE from 0.3M KCl, washed in ddH₂O, and analysed in 0.2M sodium or ammonium acetate buffer pH 5.0. Selection of these conditions resulted from the previously optimized methods providing saturation of the electrode surface by ODN and high CA and GT peak current responses.⁶ The selection of 0.3M KCl caused folding of the HUT-T2 into G4, HUT-com probably formed i-motives, dsHUT remained double stranded, and 4BAS-com single stranded. Observed differences in the CA and GT peak currents of individual ODNs obviously resulted from different content of the individual bases available for the reduction at the bPGE and total number of adsorbed ODN molecules. To resolve G4 from ss- structure, the only HUT-T2 has been adsorbed (*t*_{ads} = 60 s) from 0.3M KCl or 0.3M LiCl where G4 or ss-forms were confirmed by CD spectra, respectively. Unfortunately, no signal difference was observed using CA and GT peak currents within the standard deviation of the measurement. This could be caused by: i) G4 unfolding during its adsorption from 0.3M KCl solution either by effect of high ionic strength or prevailing adsorption over the G4 stability resulting in the only ss- form adsorbed on bPGE, or ii) HUT-T2 adsorption in ss- form (from Li⁺) on bPGE and

its folding to G4 after the transfer into the electrolyte containing high concentration of Na^+ (allowing formation of antiparallel G4) and/or NH_4^+ (parallel + antiparallel G4), respectively. No significant changes have also been observed during measurements of the dependences of t_{ads} or ODN concentration using 0.3M KCl or LiCl and measured in Na^+ or NH_4^+ based electrolytes.

Since CD spectra confirmed that ssHUT-T2 (in Li^+) folds into the G4 in the excess of K^+ , Na^+ or NH_4^+ , and that once folded G4 keeps its structure even if it is placed into the excess of Li^+ , 0.2M lithium acetate buffer pH 5.0 has been selected as the electrolyte to eliminate post-folding of the ssODN adsorbed on bPGE, and not significantly affecting already folded G4. Additionally, the stock solutions of all the ODNs were prepared in 1mM lithium phosphate buffer+0.5mM EDTA pH 7.0, to keep constant pH and thus stabilize ODN in ss- structure. An addition of certain concentration of Li^+ or K^+ determined an ionic strength of the ODN stock solution influencing the ODN adsorption efficiency on bPGE and secondary structure of the ODN. Gradual addition of 1 to 50mM K^+ induced the folding of HUT-T2 into the G4 what was confirmed by increasing CD signal at 290 nm. No changes of the signal was observed for Li^+ addition. Following voltammetric measurements of the ODN samples with increasing ionic strength induced by K^+ or Li^+ revealed the possibility to distinguished between ss- and G4 forms (Fig. 1). Differences of the CA and GT peak currents of 1 μM HUT-T2 ($t_{\text{ads}} = 60$ s) during increasing ionic strength induced by K^+ or Li^+ were caused by changes in the accessibility of the reducible bases.⁷ Unfortunately these experiments were loaded down with high RSD of the measurement sometime exceeding 40%. To minimize effect of the low reproducibility, fluorescein (F-) and tetramethylrhodamine (-T) labelled ODNs were electrochemically studied and CA or GT peak currents divided by the peak current of F- or -T, which have also been evaluated and correlated with other ODN redox peaks, when concentration and t_{ads} dependences were studied.



Fig 1. Scheme of the adsorptive transfer stripping voltammetry representing stabilization of guanine reach ODN sequence into the guanine quadruplex (G4) by K^+ in the solution, transfer of the ODN aliquot on the bPGE surface with representing SEM image (magnification 10.000x) and schematic arrangement of the folded G4 and unfolded single stranded (ss-) ODN adsorbed on bPGE together with following I - E curves representing differences in CA and GT peak currents in presence of 25mM K^+ or Li^+ in the solution from which ODN has been adsorbed.

Interestingly, one would suggest that CA and GT peak currents will be higher when adsorbed from Li^+ than K^+ , due to the direct accessibility of the bases (four A and twelve G of HUT-T2 in ss- form) to the electrode surface. However lower GT signal when adsorbed from Li^+ than K^+ is in good agreement with lower guanine reduction efficiency in the sequences with low

content of A and/or C significantly contributing in G reduction.⁸ While lower signal CA of HUT-T2 adsorbed from 25mM KCl corresponds to our conception of worst accessibility for reduction when it occurs in G4, depicted on Fig. 1, together with higher GT signal obviously influenced by more efficient reduction (charge transfer) of the π - π stacked G quartets in G4 keeping its G4 structure even in adsorbed state on bPGE.

Conclusion

Direct electroanalysis of the ODNs is very fast, cheap and simple experiment, but very complex process influenced by the sequences of studied ODN (each should be studied individually the accessibility of the bases in the secondary structures may significantly influenced signal responses), concentration, ionic strength, composition of the solution from which is ODN being adsorbed and also by the utilized electrolyte. Thank to high stability of the G4s, they maintain folded after the adsorption on bPGE and the washing step in ddH₂O. Thanks to their high stability, G4s may be electrochemically studied in proper media not affecting or purposefully inducing the secondary structure of the ODN. Electrochemical reduction or oxidation of the ODN bases apparently disrupts G4 structures, what has to be taken into consideration and the products should also be studied more in detail.

Acknowledgment

This work has been supported by the SYMBIT project reg. no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000477 financed from the ERDF. This work has been carried out in the cooperation with the students Ondřej Chytrý, Jana Tesařová, and Lenka Miková (all from the Higher School of Chemistry in Brno) during their student practical works, which received financial support from JCMIM.

References

1. Smith G.R.: *Genes Dev.* 22, 2612 (2008).
2. Spiegel J., Adhikari S., Balasubramanian S.: *Trends Chem.* 2, 123 (2020).
3. Chiorcea-Paquim A.-M., Oliveira-Brett A.M.: *Electrochim. Acta.* 126, 162 (2014).
4. Vidláková P., Pivoňková H., Kejnovská I., Trmková L., Vorlíčková M., Fojta M., Havran L.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 5817 (2015).
5. De Rache A., Doneux T., Buess-Herman C.: *Anal. Chem.* 86, 8057 (2014).
6. Spacek J., Danhel A., Hason S., Fojta M.: *Electrochem. Commun.* 82, 34 (2017).
7. Chytrý O.: *Studium elektrochemického chování sekundárních struktur oligonukleotidů adsorbovaných na povrchu elektrody z pyrolytického grafitu. Středoškolská odborná činnost, Střední průmyslová škola chemická, Brno, 2021.*
8. Řimanková L., Ostatná V., Bartošik M.: *Electroanalysis.* 31, 1895 (2019).

Application of Pulsed Techniques in Order to Decrease the Passivation in Amperometric Detection

(Využití pulsních technik ke snížení pasivace při amperometrické detekci)

Hana Dejmková and Dominika Giampaglia

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

Abstract

Possibility to prevent passivation of the working electrode was tested using sulfamethizole as a test compound, due to its high passivating power. It was found out that pulse amperometry decreases the passivation in comparison with classical amperometry with stable inserted potential. Zero potential pulses and the decrease of the pulse time helped with the resistance towards the passivation.

Key Words: Pulsed amperometry, Passivation, Sulfamethizole.

Úvod

Problém udržení stabilního povrchu pracovních elektrod je odvěká bolest mnoha elektrochemických technik. V organické elektrochemii je obvykle zásadní otázka pasivace, způsobené ukládáním produktů chemických reakcí na povrch elektrody; postupně vede k zablokování aktivní plochy a tím snížení signálu, za některých okolností i k jeho vymizení. K podobnému chování mají sklon zejména aromatičké aminy a fenoly, protože jejich produkty jsou často polymerní, a tedy špatně rozpustné¹. Pasivovaná elektroda při vsádkových měřeních je obvykle s vhodnou frekvencí čistěna, ať již mechanicky nebo chemicky, případně kombinací obou metod. Průtokové techniky pasivaci trpí méně, protože v jejich případě bývá povrch pracovní elektrody omýván pracovním roztokem; na druhou stranu, pokud k pasivaci přesto dochází, je pracovní elektroda obvykle obtížněji přístupná pro efektivní čištění. Jako možné řešení se nabízí pulsní amperometrie, která může zkrácením doby, kdy probíhá reakce, pasivaci omezit². Cílem této práce tedy je otestovat efektivitu tohoto přístupu s použitím sulfamethizolu, sulfonamidového antibiotika a látky silně pasivující elektrodu³, jako testovací látky.

Experimentální část

Pro voltametrická měření byla použita aparatura Eco-Tribo Polarograph (PolaroSensors, ČR). Pro amperometrická měření v uspořádání průtokové injekční analýzy (FIA) byla použita pumpa High Pressure pump HPP 5001, jako detektor byl použit Autolab PGSTAT101 (Metrohm Autolab, Nizozemsko), dávkováno bylo 100 µl vzorku a průtoková rychlost dosahovala 0,5 ml min⁻¹. V obou případech bylo použito tříelektrodové zapojení s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku (průměr 3 mm, Metrohm), referenční argentchloridovou elektrodou (PolaroSensors, ČR) a s pomocnou platínovou elektrodou (PolaroSensors, ČR).

Zásobní roztok sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹ byl připraven rozpustěním přesně odváženého množství látky v destilované vodě. Jako základní elektrolyt, resp. nosný roztok byl použit Brittonův-Robinsonův pufr.

Cyklická voltametrie byla měřena rychlostí skenu 100 mV s⁻¹. Kromě klasické amperometrické detekce s trvale vloženým potenciálem byly použity tři typy pulsních technik – střídání měřícího pulsu s pulsem s nulovým potenciálem (pracovně nazvaný Hradby), vložení několika měřících pulsů s postupně rostoucími potenciály (pracovně nazvaný Schody) a vložení několika měřících pulsů s postupně rostoucími potenciály, kde mezi každým měřícím pulsem byl

vložený puls s nulovým potenciálem (pracovně nazvaný Mrakodrapy). Trvání každého pulsu bylo 100 ms, pokud není uvedeno jinak.

Výsledky a diskuse

Pro srovnání pasivace vsádkového a průtokového uspořádání byla jako první změřena série patnácti opakovaných cyklických voltamogramů roztoku sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹ v prostředí o pH 2, 6 a 12. Ukázalo se, že výsledek je obtížně numericky vyhodnotit; během patnácti následujících měření pik prakticky vymizí, je ale obtížně rozhodnout, jestli je to způsobené poklesem jeho výšky nebo jeho vysunutím mimo potenciálové okno – posun piku k vyšším potenciálům je nicméně rovněž charakteristický pro pasivovanou elektrodu.

Ze čtyř typů amperometrické detekce, popsáné v Experimentální části, poskytuje typ Schody a typ Mrakodrapy amperometrický záznam pro sérii více detekčních potenciálů a umožňuje tak na základě jednoho měření i volbu vhodného detekčního potenciálu. Měření s těmito typy detekce bylo provedeno v rozsahu 0,8 V až 1,5 V při pH 2, 4, 6, 8, 10, a 12. Zvolené hodnoty sledovaných potenciálů byly 1,3 V pro pH 2 až 8, 1,2 V pro pH 10 a 1,1 V pro pH 12; stejné hodnoty detekčního potenciálu byly použity i pro měření klasickou amperometrií a technikou Hradby. Ve všech případech bylo provedeno deset následujících nástřiků bez očištění elektrody a vypočítána relativní směrodatná odchylka výšky piku a relativní pokles výšky piku mezi prvním a desátým nástřikem. Získané hodnoty jsou shrnuty v Tabulce I.

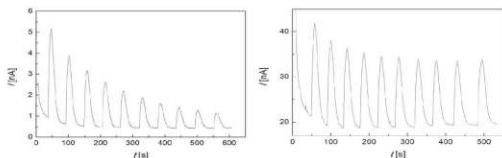
Tabulka I.

Relativní pokles signálu a relativní směrodatná odchylka deseti následujících měření pro různé typy amperometrické detekce.

pH	Hradby			Mrakodrapy			Schody			Klasická amperometrie		
	E, V	Relativní pokles, %	RSD, %	Relativní pokles, %	RSD, %	Relativní pokles, %	RSD, %	Relativní pokles, %	RSD, %	Relativní pokles, %	RSD, %	
2	1,3	7,6	3,5	13,3	5,7	43,7	16,3	94,0	122,4			
4	1,3	32,7	13,2	28,3	10,6	85,5	5,0	91,1	80,0			
6	1,3	11,3	4,4	10,7	4,3	59,5	33,9	81,9	59,2			
8	1,3	7,7	2,8	21,5	3,4	36,8	15,2	65,5	42,1			
10	1,2	14,7	6,7	28,3	11,7	28,8	10,5	51,4	20,8			
12	1,1	20,4	7,3	26,5	10,4	28,8	11,5	-12,3	5,3			

Vidíme, že s výjimkou silně zásaditých pH je pokles signálu při klasické amperometrii velmi výrazný, desátý pik má v některých případech méně než deset procent výšky prvního piku. Situace se zlepši zavedením jakéhokoliv pulsního programu. Program Schody je relativně nejméně účinný, zřejmě kvůli tomu, že i zde je ve většině případů vložen téměř trvale potenciál, při kterém probíhá elektrochemická reakce. Naopak nejlepší výsledek poskytuje typ Hradby; zde jsou hodnoty téměř stabilní, s RSD okolo tři procent.

Vybrané křivky z obou krajních případů jsou zobrazeny na Obr. 1. Kromě poklesu výšky piku si zde můžeme všimnout ještě jednoho prvku, souvisejícího s pulsním programem – v pulsním programu stoupá absolutní výška piku, spolu s ní však také proudové pozadí, přičemž poměr signál/šum se zhoršuje. Tento faktor je možné ovlivnit délkou pulsu; v této práci byly testovány hodnoty od 25 ms do 900 ms. Zatímco výška piku se v tomto rozmezí příliš nemění, s rostoucí délkou pulsu klesá proudové pozadí, na druhou stranu však narůstá míra pasivace.



Obr. 1. FIA záznamy opakovaných nástřiků roztoku sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (A) klasickou amperometrií, $E_{\text{DET}} = +1,3 \text{ V}$ a (B) pulsní amperometrií střídající detekční puls ($E = +1,3 \text{ V}$, 100 ms) a klidový puls ($E = 0 \text{ V}$, 100 ms). Nosný roztok B-R pufr pH 6, pracovní elektroda ze skelného uhlíku.

Závěr

Bylo potvrzeno, že pulsní techniky mohou být velmi efektivní v potlačení pasivace; cenou za to je zvýšení proudu pozadí a tím poměru signál/šum. Z použitých typů potenciálových programů nejlépe potlačuje pasivaci jednoduché střídání měřičiho a klidového pulsu (typ Hradby); ostatní potenciálové programy přináší další výhodu ve skenování širšího rozsahu potenciálů a tím získání rozsáhlejších informací o vzorku, cenou za to ovšem je menší hustota měřicích bodů, v některých případech už na úrovni, která by mohla ovlivnit získané výsledky.

Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation (project No. 20-01589S).

References

1. Ferreira M., Varela H., Torresi R. M., Tremiliosi-Filho G.: *Electrochim. Acta* 52, 434 (2006).
2. Islam M. A., Mahbub P., Nesterenko P. N., Paull B., Macka M.: *Anal. Chim. Acta* 1052, 10 (2019).
3. Dejmekova H., Mikes M., Barek J., Zima J.: *Electroanalysis* 25, 189 (2013).

Electrophoretic Study of Mono- and Bis-Triazamacrocyclic Derivatives (Elektroforetická studie mono- a bis-triazamakrocyklických derivátů)

Juraj Dian^{ab}, Jana Hodačová^c, and Ivan Jelinek^b

^a Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, Department of Chemical Physics and Optics, Ke Karlovu 3, CZ-121 16 Prague 2, Czech Republic

^b Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Hlavova 8, CZ-128 43 Prague 2, Czech Republic

^c University of Chemistry and Technology, Prague, Faculty of Chemical Technology, Department of Organic Chemistry, Technická 5, CZ-166 28 Prague 6, Czech Republic

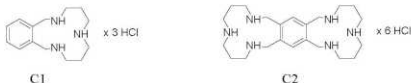
Abstract

Capillary electrophoresis study of mono- and bis-triazamacrocycles with benzene was performed under various *pH* conditions between 2.86 – 10.45. Acidobasic equilibria between only three charged forms (LH_3^{3+})_x, (LH_2^{2+})_x, (LH^+)_x (*x*=1, 2) were observed for both the compounds. The effective mobility is higher for bis-triazamacrocycle according to the higher charge of the compound whereas protolytic behavior of both macrocycles corresponds to the three acid-base equilibria. The experimental data were fitted with a model equation for a three base system and values $pK_{C1,a1}^{mix} = 3.84$, $pK_{C1,a2}^{mix} = 8.42$, and $pK_{C2,a1}^{mix} = 4.11$, $pK_{C2,a2}^{mix} = 8.40$ were determined for the mono- and bis-triazamacrocyclic benzene derivatives, respectively.

Key Words: triazamacrocycles, capillary electrophoresis, effective mobility, acid-base equilibria, dissociation constant.

Úvod

Mono- a bis-triazamakrocykly C1 a C2 jsou nově připravené látky ze skupiny aromatických derivátů 1,5,9 – triazacyklotridekanu, s výraznou a stericky podmíněnou schopností komplexovat malé organické anionty (viz obr. 1). Látky byly syntetizovány jako potenciální nosiče léčiv a makrocyklické ligandy v syntetických modelech metaloenzymů¹.



Obr. 1. Struktura studovaných látek

V makrocyklech sloučenin C1 a C2 se nachází tři nebo šest NH skupin, které se ve vodním prostředí relativně snadno protonizují. Tyto nabitě formy lze s výhodou studovat pomocí kapilární elektroforézy.

Experimentální část

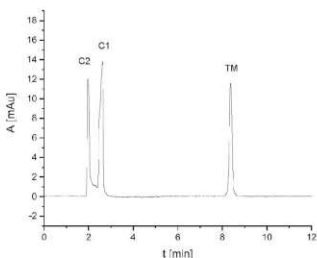
Syntéza triazamakrocyklických derivátů benzenu byla již dříve publikována¹. Elektroforetická měření byla provedena přístrojem CE-7100 (Agilent Technologies, SRN) s integrovaným absorpčním fotometrickým detektorem s diodovým polem. Základní parametry měření: separační napětí 25 (-25) kV, hydrodynamické dávkování 30 (-30) mbar po dobu 10 s, teplota termostatu 25°C, fotometrická detekce $\lambda_{max} = 200, 230$ nm. Pro měření *pH* a vodivosti nosných elektrolytů byl použit *pH*/konduktometr Jenway 3540 (Jenway, SRN).

Pevné látky byly navažovány na analytických vahách Sartorius 2004 MP (Sartorius GmbH, SRN). Pro přípravu a následné ředění všech roztoků byla použita deionizovaná voda Milli-Q ($\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ m}$) (MilliporeSigma, USA).

Složení nosných elektrolytů (NE) bylo voleno s ohledem na jejich dostatečně nízkou specifickou vodivost, zajišťující minimální generované Joulovo teplo a dostatečně vysokou pufrací kapacitu. Při jejich přípravě byly použity pouze uni-univalentní elektrolyty. Pro zajištění optimální symetrie piků C1 a C2 byly vybrány jako pufrující složky koionty Na^+ a NH_4^+ . Konkrétní složení jednotlivých roztoků NE, které byly připraveny definovaným ředěním 100 mM zásobních vodných roztoků kyseliny mravenčí, kyseliny octové, hydroxidu sodného a hydroxidu amonného deionizovanou vodou, je uvedeno v Tabulce I. Hodnoty pH a měrné vodivosti byly určeny experimentálně, pro výpočet iontové síly byl použit program Peakmaster 5.3. Křemennou separační kapilárou o vnitřním průměru $50 \mu\text{m}$ a celkové délce $53,6 \text{ cm}$ procházel při vloženém napětí 25 kV proud $6 \mu\text{A}$.

Výsledky a diskuse

Byla studována závislost rychlosti migrace látek C1 a C2 na pH . Pro měření byla čerstvě připravena série nosných elektrolytů v intervalu pH 2,86 – 10,45 (Tabulka I). Ukázkový elektroferogram dokumentující separaci směsi studovaných látek C1 a C2 ($c = 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) s přidanou thiomocovinou (TM; $c = 0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) v nosném elektrolytu o pH 4,71 je uveden na Obr. 2².



Obr. 2. Záznam separace směsi studovaných sloučenin C1 a C2 s přidanou thiomocovinou (TM) v nosném elektrolytu o pH 4,71.

Ze všech pořízených elektroferogramů byly odečteny migrační časy látek C1 a C2 a čas elektroosmotického toku. Výsledky opakovaných měření, vyjádřené jako průměrné hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí jsou souhrnně uvedeny v Tabulce I.

Tabulka I.

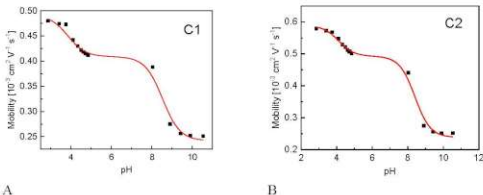
Charakteristiky nosných elektrolytů (NE) použitých pro měření iontových mobilit studovaných komplexotvorných látek C1, C2 a odpovídající hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí m_{C1} , m_{C2} ve studovaném rozmezí pH 2,86 – 10,45.

Koncentrace složek NE*, mM	σ , S m ⁻¹	I, mmol dm ⁻³	pH	m_{C1}^{**} , cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	m_{C2}^{**} , cm ² V ⁻¹ s ⁻¹
12,0 A	5,69 · 10 ⁻²	1,430	2,86	4,80 · 10 ⁻⁴	5,83 · 10 ⁻⁴
13,5 A; 4,1 C	5,68 · 10 ⁻²	4,398	3,41	4,74 · 10 ⁻⁴	5,73 · 10 ⁻⁴
10,0 A; 5,0 C	5,70 · 10 ⁻²	5,191	3,74	4,73 · 10 ⁻⁴	5,68 · 10 ⁻⁴
8,0 A; 5,4 C	5,71 · 10 ⁻²	5,494	4,10	4,42 · 10 ⁻⁴	5,48 · 10 ⁻⁴
22,0 B; 6,5 C	5,72 · 10 ⁻²	6,549	4,32	4,30 · 10 ⁻⁴	5,29 · 10 ⁻⁴
18,0 B; 6,5 C	5,68 · 10 ⁻²	6,536	4,49	4,22 · 10 ⁻⁴	5,21 · 10 ⁻⁴
15,0 B; 6,5 C	5,65 · 10 ⁻²	6,527	4,61	4,18 · 10 ⁻⁴	5,12 · 10 ⁻⁴
13,0 B; 6,4 C	5,59 · 10 ⁻²	6,421	4,71	4,15 · 10 ⁻⁴	5,07 · 10 ⁻⁴
13,0 B; 6,6 C	5,69 · 10 ⁻²	6,620	4,75	4,15 · 10 ⁻⁴	5,08 · 10 ⁻⁴
12,0 B; 6,6 C	5,68 · 10 ⁻²	6,617	4,84	4,12 · 10 ⁻⁴	5,01 · 10 ⁻⁴
4,6 A; 4,9 D	5,64 · 10 ⁻²	4,601	8,03	3,88 · 10 ⁻⁴	4,41 · 10 ⁻⁴
4,6 A; 7,0 D	5,68 · 10 ⁻²	4,611	8,90	2,75 · 10 ⁻⁴	2,75 · 10 ⁻⁴
4,5 A; 12,0 D	5,63 · 10 ⁻²	4,534	9,45	2,56 · 10 ⁻⁴	2,56 · 10 ⁻⁴
4,4 A; 24,0 D	5,64 · 10 ⁻²	4,489	9,90	2,52 · 10 ⁻⁴	2,52 · 10 ⁻⁴
4,1 A; 55,0 D	5,67 · 10 ⁻²	4,339	10,45	2,51 · 10 ⁻⁴	2,51 · 10 ⁻⁴

*A – kyselina mravenčí; B – kyselina octová; C – hydroxid sodný; D – hydroxid amoný.

**aritmetický průměr ze čtyř po sobě jdoucích měření.

Průměrné hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí byly použity jako vstupní data pro proložení zvolenou funkcí závislosti.



Obř. 3. Závislost efektivní mobility látky C1 (A) a látky C2 (B) na pH nosného elektrolytu. Data jsou proložena závislostí uvedenou v rovnici (1).

Z průběhu křivek se dvěma výraznými inflexními body je zřejmé, že obě látky C1, C2 podléhají ve studovaném rozmezí pH dvěma protolytickým rovnováhám za tvorby kationtů $(LH_3^{3+})_x$, $(LH_2^{2+})_x$, $(LH^+)_x$ ($x = 1, 2$). Z průběhu závislosti vyplývá, že obě studované sloučeniny jsou do prvního stupně protonována již v silně bazické oblasti a mají tedy charakter silného elektrolytu s nenulovou efektivní elektroforetickou pohyblivostí. Současně ze srovnání závislosti pro obě sloučeniny plyne, že i pro bis-triazamakrocyclický komplex existují pouze tři a nikoliv šest rovnováh mezi nabitými částicemi, přičemž ve studované oblasti pH jsou pozorovány pouze rovnováhy dvě. Tuto hypotézu potvrzuje existence dominantního dvojnásobně nabitého

molekulárního kationtu u látky C2 v ESI/MS spektru ². Pro vysvětlení pozorovaných mobilních závislostí byly obě sloučeniny C1 a C2 uvažovány jako trojsytné báze a závislost efektivní pohyblivosti na pH byla proložena funkcí ³:

$$m_{eff} = \frac{m_{LH_3^3+} \cdot 10^{-3pH} + m_{LH_2^2+} \cdot 10^{-pK_{a3}^{mix}} \cdot 10^{-2pH} + m_{LH^+} \cdot 10^{-pK_{a1}^{mix} - K_{a2}^{mix}} \cdot 10^{-pH}}{10^{-3pH} + 10^{-pK_{a1}^{mix}} \cdot 10^{-2pH} + 10^{-pK_{a1}^{mix} - K_{a2}^{mix}} \cdot 10^{-pH} + 10^{-pK_{a1}^{mix} - K_{a2}^{mix} - K_{a3}^{mix}}} \quad (1)$$

Hodnoty m_i dílčích zdánlivých iontových pohyblivostí látek C1 a C2 do jednotlivých disociačních stupňů a odpovídající hodnoty pK_a^{mix} smíšených dílčích disociačních konstant jsou uvedeny v Tabulce II. Hodnoty pK_{a3}^{mix} představují extrapolaci funkce do oblasti mimo pozorovanou rovnováhu a nesou chemickou informaci.

Tabulka II.

Vybrané parametry proložení experimentálních bodů závislosti efektivní iontové pohyblivosti pro funkci odpovídající trojsytné bázi – zdánlivé iontové pohyblivosti m_i , hodnoty smíšených disociačních konstant pK_{a1}^{mix} a Pearsonův R koeficient.

Parametr	C1	C2
$m_1, \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	$4,91 \cdot 10^{-4} \pm 7,9 \cdot 10^{-6}$	$5,89 \cdot 10^{-4} \pm 1,3 \cdot 10^{-5}$
$m_2, \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	$4,09 \cdot 10^{-4} \pm 4,3 \cdot 10^{-6}$	$4,93 \cdot 10^{-4} \pm 1,7 \cdot 10^{-5}$
$m_3, \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$	$2,42 \cdot 10^{-4} \pm 6,2 \cdot 10^{-6}$	$2,39 \cdot 10^{-4} \pm 9,1 \cdot 10^{-6}$
pK_{a1}^{mix}	$3,84 \pm 0,13$	$4,11 \pm 0,04$
pK_{a2}^{mix}	$8,52 \pm 0,08$	$8,40 \pm 0,09$
pK_{a3}^{mix}	$(26,25)^*$	$(27,36)^*$
R^2	0,9907	0,9929

* Extrapolovaná hodnota

Ze získaných hodnot mobilit a disociačních konstant mono- a bis-triazamakrocyclických benzenoderivátů plyne, že benzenové jádro dostatečně odlišuje vzájemně působení dvou triazamakrocycklů při acidobazických rovnováhách.

Závěr

Byla provedena elektroforetická studie triazamakrocyclických derivátů benzenu. Byly stanoveny dílčí zdánlivé iontové pohyblivosti studovaných látek v rozmezí $pH = 2,86 - 10,45$. Z pozorovaných závislostí bylo zjištěno, že pohyblivost bis-triazamakrocyclické sloučeniny je vyšší ve srovnání s mono-triazamakrocycklem, zatímco acidobazické chování obou sloučenin je ve vodném prostředí téměř totožné a naznačuje, že protolytické rovnováhy triazamakrocycklů vázaných na benzenovém jádře jsou v případě bis-triazamakrocyclického komplexu vzájemně nezávislé.

References

1. Bím D., Svobodová E., Eigner V., Rulišek L., Hodačová J.: Chem. Eur. J. 22, 10426 (2016).
2. Málková N.: *Diplomová práce*, Univerzita Karlova, Praha 2020.
3. Poole S. K., Patel S., Dehring K., Workman H., Poole C. F.: J. Chromatography A 1037, 445 (2004).

Use of Electrochemical Probes in DNA Structure Recognition in Adsorbed State at Hanging Mercury Drop Electrode

Daniel Dobrovodský^{a,b}, Aleš Daňhel^a, and Miroslav Fojta^{a,b}

^aInstitute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic, E-mail: daniel.d@ibp.cz

^bNational Centre for Biomolecular Research, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic.

Abstract

Alternative structures of DNA, such as guanine-quadruplexes (G4), can be potentially targeted in cancer therapy. A method for their study by cyclic voltammetry at hanging mercury drop electrode is presented. Application of the porphyrin *meso*-5,10,15,20-tetrakis(4-(*N*-methylpyridinium-4-yl)phenyl)porphyrinato copper(II) and the nucleotide 7-(3-nitrophenyl)-7-deazaguanosine triphosphate as electrochemical probes revealed different behaviour of oligodeoxynucleotides after the application of potential cycling that is related to their structure. This approach was shown to be able to discriminate between linear DNA molecules and G4. Surprisingly, homo-thymine 30-mer exhibits behaviour similar to G4, possibly due to formation of an undefined structure upon interaction with electrode surface.

Key Words: G-quadruplex, Electrochemical probes, Cyclic voltammetry, Hanging mercury drop electrode, DNA structure

Introduction

The nucleobase guanine is known to self-associate into square planar structures stabilised by Hoogsteen hydrogen bonds known as guanine-quartets (Fig. 1a). In nucleic acids containing tracts of guanines, individual guanine-quartets can stack onto one another forming a stable non-canonical structure called guanine-quadruplex (G4). G4s exhibit large topological diversity in terms of the number of associated strands, their relative polarity, N-glycosidic bond orientation, and position of the loops connecting individual guanine stretches, which is mostly dictated by sequence and buffer conditions¹. The strongest factor contributing to G4 stability is the presence of a cation compensating the built-up negative charge density in the central cavity of G4 from the keto groups of guanines². G4 have been found to be formed in living cells³. Furthermore, putative G4-forming sequences are often abundantly presented in regions of genome relevant for cancer development, namely promoters of oncogenes and telomeres.

Due to the growing interest in G4 as well as other non-canonical DNA structures⁴, the development of analytical tools for their recognition and study is of relevance. Even though electrochemistry has been proven to be effective in the monitoring of conformational changes of double-stranded DNA, studies of short G4-forming oligodeoxynucleotides (ODNs) in adsorbed state suggest more complicated electrode processes^{5,6}. Thus, electrochemical application of G4 is often limited to their use as electrochemical switches⁷ or aptamers for the recognition of G4-binding molecules^{8,9}. In this contribution, a methodological approach is developed using cyclic voltammetry (CV) of selected electrochemical probes for the discernment of different structure of ODNs adsorbed on the surface of hanging mercury drop electrode (HMDE) based on their relative strength of adsorption. The compounds used as probes were the cationic metalloporphyrin *meso*-5,10,15,20-tetrakis(4-(*N*-methylpyridinium-4-yl)phenyl)porphyrinato copper(II) (Cu-TMPy2PP, Fig. 1b) which binds strongly to DNA and is suspected to be selective for G4, and the modified nucleoside 7-(3-nitrophenyl)-7-deazaguanosine triphosphate (dG^{N8}TP, Fig. 1c) which does not interact with DNA.

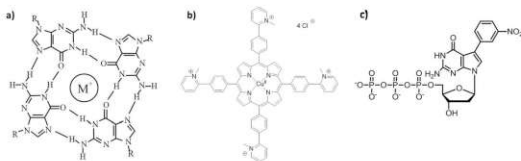


Fig. 1. Structure of a G-quartet with a monovalent cation M^+ (a) and the used electrochemical probes: Cu-TMPy2PP (b) and dG^{NTP} (c).

Experimental

Cu-TMPy2PP was provided by the research group of Dr. Genevieve Pratviel (LCC CNRS, Toulouse, France) and stored as $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ stock solution in DMSO. The nucleoside dG^{NTP} was obtained from Prof. Michal Hocke (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the CAS, Prague, Czech Republic). The following synthetic ODNs were purchased from Eurofins Genomics (Germany): hut-T2 (AG_3T_2)₃AG₃, hut-com (C_3TA_2)₃C₃T, odn15 ($G_3TACG_2CG_3TAC$), odn15-com ($GTAC_3GC_2GTAC_3$), T30 (T₃₀). All other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich. For electrochemical measurements, 0.3 mol l^{-1} ammonium formate/ 0.05 mol l^{-1} phosphate (AFP) buffer pH 6.9 was used as the base electrolyte. Before measurement, the ODNs were denatured at 95°C for 5 min prior to the addition of KCl to the final concentration of 0.3 mol l^{-1} and then allowed to slowly cool to the room temperature overnight.

For electrochemical measurements potentiostat PGSTAT 128N controlled by software Nova 2.1 (both Metrohm Autolab) was used, in a standard three electrode system using hanging mercury drop electrode (HMDE) as working electrode, Ag/AgCl/3M KCl reference electrode and platinum auxiliary electrode. CV was performed in the potential window (0.00 V; -1.85 V) at scan rate 1 V s^{-1} . For adsorption transfer stripping (AdTS) method, ODNs were adsorbed from $3 \mu\text{l}$ of $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ODNs solution in 0.3 mol l^{-1} KCl for 60 s, resulting in full HMDE surface coverage.

Results and Discussion

Cu-TMPy2PP produces under present conditions two cathodic peaks; peak I at -0.95 V and peak III at -1.21 V . When HMDE is first covered in ODNs using the AdTS technique and CV measurement is then performed in the solution of Cu-TMPy2PP after 60s incubation period, peak I gets shifted by approximately 0.2 V towards more negative potentials. This shift reflects the interaction between adsorbed ODN and Cu-TMPy2PP and is observed in the same extent for all ODNs, regardless of their structure in solution. While the height of peak I differs for individual ODNs, the differences do not seem to be straight-forwardly related to structure. However, when HMDE modified with G4-forming ODNs is subjected to increasing number of potential cycles from 0.00 V to -1.85 V in clean AFP buffer prior to transfer to Cu-TMPy2PP solution and CV measurement, the peak I gradually shifts to the position corresponding to absence of DNA (Fig. 2a, b). This effect is not observed for single-stranded ODNs or for double-stranded ODN prepared by mixing equimolar amounts of the complementary strands hut-T2 and hut-com (Fig. 2c), with the surprising exception of T30 (Fig. 2d) which acts similarly to G4. Because G4 are most likely adsorbed by the single-stranded regions in loops

and overhangs, their adsorption is notably weaker compared to single-stranded ODNs and are therefore more susceptible to partial repulsion due to the highly negative potentials present during the potential cycling. Consequently, more free space is exposed on the HMDE surface for direct reduction of Cu-TMPy2PP.

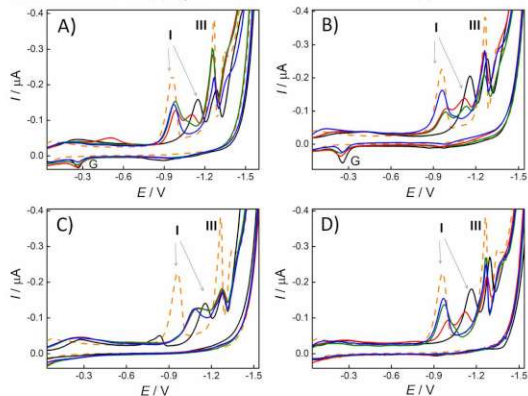


Fig. 2. Cyclic voltammograms of $0.4 \mu\text{M}$ Cu-TMPy2PP in AFP buffer measured at HMDE with adsorbed: hut-T2 (a), odnI5 (b), hut-com (c) and T30 (d) after: 0 (black line), 0.5 (red line), 1 (green line) and 3 (blue line) potential cycles from 0.0 V to -1.85 V performed in clean AFP buffer before measurement; and CV of sole $0.4 \mu\text{M}$ Cu-TMPy2PP in AFP buffer at bare HMDE (orange dash line). G - oxidation peak of guanine reduction product.

The ODN-modified surface of HMDE was further studied using dG^{NPT} as a probe due to its smaller size and minimal interaction with adsorbed ODNs, which can provide higher sensitivity to surface changes. This compound offers a single reduction peak at -0.47 V . Coverage of HMDE with ODNs hinders the access of dG^{NPT} to the electrode and causes a decrease of its signal compared to bare HMDE. This effect is more significant for single-stranded ODNs than for G4 and T30, suggesting denser surface coverage. Exposure to potential cycling with increasing vertex potential from -1.30 V to -1.85 V causes gradual increase of the signal for single-stranded ODNs and a sharp increase for G4-forming ODNs and T30 between vertex potentials -1.70 V and -1.80 V . Further elongation of the window for the potential cycling to -1.90 V , where all ODNs are expected to partially desorb, caused additional increase of the signal for single-stranded ODNs and no change in the signal for G4-forming ODNs and T30. To explain why T30 consistently behaves similar to G4-forming ODNs, the possibility of secondary structure formation in T30 was examined. For this purpose, circular dichroism spectroscopy experiments with T30 in various ionic environments were performed. Inconclusive results of these experiments along with thorough literature research point towards the possibility of stable folded conformers of T30 in solution being very unlikely. However,

these might be conceivably formed upon interaction with the electrode surface. Even though thymines do not form stable mutual hydrogen bonds, they are able to form covalent T-T base pairs mediated by Hg^{2+} cations¹⁰, which are present during ODN adsorption at open circuit potential due to spontaneous oxidation of HMDE. Formation of such pairs might be involved in the observed behaviour of T30.

Application of selective desorption detected by electrochemical probes as described above provides a simple method to distinguish G4 from double- and single-stranded DNA. Even though thymine homo-ODN may behave like the G4-forming ODNs, it can be easily ruled out because of the absence of anodic peak G native to guanine-containing DNA.

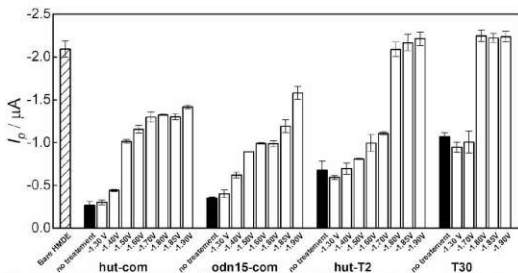


Fig. 3. Peak height of 50 μM dG^{NTP} measured with bare HMDE (diagonal stripes), with HMDE modified with individual ODNs with no treatment (black) or after three potential cycles with vertex potentials labelled on the x-axis (white) performed in clean AFP buffer before measurement.

Conclusions

In this work, a method was developed for the study of ODN structures in the adsorbed state at HMDE based on the relative strength of their adsorption and monitoring using electrochemical response of selected probes: Cu-TMPy2PP and dG^{NTP} . It was shown, that the interfacial behaviour of G4 forming ODNs at highly negative potentials significantly differs from other structural types. Additionally, particular behaviour of homo-ODN T30 similar to the G4-forming ODNs was observed. The obtained results might indicate the existence of folded G4 structures in adsorbed state at electrode surface and describe the difference in their behaviour at negative potentials, which can be utilised in the future development of analytical tools for study of DNA structures.

Acknowledgments

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 (ERFD). The authors thank the research group of Dr. Genevieve Pratviel for providing us with the porphyrin Cu-TMPy2PP and the group of Prof. Michal Hocek for the modified nucleotide dG^{NTP} .

References

1. Neidle S., Balasubramanian S. (ed.): *Quadruplex Nucleic Acids*. RCS, Cambridge 2006.
2. Bhattacharyya D., Mirihana Arachchilage G., Basu S.: *Front. Chem.*, *4*, 38 (2016).
3. Liu L.-Y., Liu W., Wang K.-N., Zhu B.-C., Xia X.-Y., Ji L.-N., Mao Z.-W.: *Angew. Chemie Int. Ed.*, *59*, 9719 (2020).
4. Tateishi-Karimata H., Sugimoto N.: *ChemComm.*, *56*, 23710 (2020).
5. Vidlakova P., Pivonkova H., Kejnovska I., Trnkova L., Vorlickova M., Fojta M., Havran L.: *Anal. Bioanal. Chem.*, *407*, 5817 (2015).
6. Rodrigues Pontinha A. D., Chiorcea-Paquim A. M., Eritja R., Oliveira-Bret A.-M.: *Anal. Chem.*, *86*, 5851 (2014).
7. Ge B., Huang Y., Sen D., Hua Zhong Y.: *Angew. Chemie Int. Ed.*, *49*, 9965 (2010).
8. Li L., Huang X., Guo L.: *Rare Met.*, *32*, 369 (2013).
9. Fan Q., Li C., Tao Y., Mao X., Li G.: *Talanta*, *160*, 144 (2016).
10. Miyachi H., Matsui T., Shigeta Y., Hirao K.: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *12*, 909 (2010).

Effect of Boron Doping Level on Electrochemical Properties of Boron Doped Diamond Electrodes
(Vliv úrovně dopování bórem na elektrochemické vlastnosti elektrod z bórem dopovaného diamantu)

Jan Fischer^a, Šárka Sládková^a, Hana Dejmková^a, Andrew Taylor^b, and Karolina Schwarzová-Pecková^a

^a Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 00 Prague 2, Czech Republic, E-mail: jan.fischer@natur.cuni.cz

^b FZU - Institute of Physics of the Czech Academy of Sciences, Na Slovance 2, 182 21 Prague 8, Czech Republic

Abstract

The electrochemical properties of boron doped diamond (BDD) electrodes were studied using voltammetric techniques. Electrodes with different boron doping level ranging from 500 ppm to 8000 ppm (B/C ratio during BDD deposition) were characterized by cyclic voltammetry of inner- and outer-sphere redox markers. Furthermore, attention was paid to the influence of boron content on the voltammetric responses of phenol derivatives on BDD electrodes activated by anodic oxidation of the surface. In general, the peak potential of oxidation of phenolic compounds shifts towards more positive potential with decreasing boron content.

Key Words: Boron doped diamond electrode, Cyclic voltammetry, Phenol derivatives, Redox markers

Úvod

Borem dopovaný diamant (BDD) je atraktivním elektrodovým materiálem, který má řadu praktických vlastností, jako je široké potenciálové okno v katodické i anodické oblasti, využitelnost ve vodných i nevodných roztocích, mechanická odolnost, odolnost proti znečištění, necitlivost na rozpustěný kyslík a stabilita proti korozi i při použití v agresivních mediích^{1,2}. BDD elektrody se připravují metodou chemické deposice par pomocí směsi uhlovodíkových plynů a vodíku. Tato metoda se dá rozdělit podle způsobu dodávání energie do systému na chemickou deposici par pomocí žhaveného vlákna a chemickou deposici par pomocí mikrovlnné plasmy³. Koncentrace boru ve výsledném BDD filmu je jeden z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují povrchovou strukturu a elektrochemické vlastnosti filmu. Obsah boru je určen poměrem B/C v plynné fázi a metodou deposice⁴. Méně dopované elektrody na úrovni 500 ppm nebo 1000 ppm vykazují polovodivý charakter, zatímco elektrody 2000 ppm a více mají povahu kovového vodiče.

Elektrochemická oxidace fenolu je velmi komplexní proces, který je závislý na mnoha faktorech, jako je například koncentrace a pH měřeného roztoku, materiál vyrobené elektrody a potenciál či proudová hustota vložená na elektrodu⁵. Proto se tato skupina látek jeví jako vhodná pro charakterizaci vlastností BDD elektrod, které se kromě koncentrace boru mohou lišit např. i terminací povrchu^{6,7}. Dalším zavedeným nástrojem pro elektrochemickou charakterizaci je studium voltametrické odezvy redoxních markerů vnitřní a vnější sféry ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$, kdy kinetika přenosu elektronu prvního typu markerů je zpomalena přítomností kyslíkatých skupin na povrchu BDD^{6,7}. Redoxní signály dalších markerů mohou být ovlivněny jejich adsorpcí na povrch elektrody, jak bylo pozorováno pro methyl viologen⁸.

Experimentální část

Všechny používané chemikálie měly čistotu p.a., roztoky byly přednostně připravovány přímo v základním elektrolytu. Brittonův-Robinsonův pufr byl připravován za začátku každého pracovního dne smícháním kyselé a zásadité složky, tak aby bylo dosaženo požadovaného pH. Přesná hodnota pH byla stanovována pomocí digitálního pH metru s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, Essen, UK). Kyselá složka Brittonova-Robinsonova pufru byla připravena smísením tří kyselin (kyselina fosforečná, kyselina boritá a kyselina octová). Všechny kyseliny byly zastoupeny v koncentraci $0,04 \text{ mol dm}^{-3}$. Zásaditá složka byla tvořena $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH.

Měření byla prováděna na přístroji Eco-Tribo polarograf řízeném počítačovým programem PolarPro 5.1. (Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Při samotném měření bylo využíváno tříelektrodové uspořádání – referenční argentchloridová elektroda ($\text{Ag}/\text{AgCl}/3 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$), pomocná platinová elektroda (obě Monokrystaly Turnov, ČR) a pracovní BDD elektroda, přičemž tělo bylo od společnosti NeoCoat (Švýcarsko). BDD destičky s různým obsahem boru byly připraveny ve Fyzikálním ústavu Akademie věd České republiky metodou chemické depozice par pomocí mikrovlnné plasmy⁸. Průměr aktivní plochy elektrody byl 3,7 mm, geometrická plocha elektrod byla $10,7 \text{ mm}^2$. Tloušťka diamantového filmu byla 1 μm .

Látky byly studovány na anodicky aktivovaném povrchu (O-BDD). Povrch byl připraven v samostatné měřicí cele v roztoku $0,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ vložení vysokého aktivčního potenciálu $E_{\text{akt}} = +2400 \text{ mV}$ za nepřetržitého míchání po dobu 20 min. Pro obnovu elektrodového povrchu byla elektroda aktivována 2–5 minut v závislosti na látce opět v roztoku $0,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$ za neustálého míchání a vložení vysokého kladného aktivčního potenciálu $E_{\text{akt}} +2400 \text{ mV}$. Při přetrvávající pasivaci byla elektroda na 20 minut ponořena do ultrazvuku v roztoku 2-propanolu.

Výsledky a diskuse

BDD filmy s různou úrovní dopace borem (poměr B:C při depozici byl 500, 1000, 2000, 8000 ppm) byly studovány pomocí cyklické voltametrie $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ redoxních markerů hexakynoželeznatanu draselného ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) a chloridu hexaaminruthenitého ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$) v $1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$ a methylviologenu v $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$.

U $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ se hodnoty poměrů proudů katodického a anodického piku vždy velmi blíží hodnotě jedna, nejsou však splněna kritéria reverzibility a systém je kvazireverzibilní, přestože se s rostoucím obsahem boru k sobě potenciály těchto piků přibližují. Pro $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ byly voltametričtě odezvy obdobné pro všechny studované úrovně dopování borem. Methylviologen poskytuje dva quasireverzibilní signály v záporné části potenciálového okna, poměry oxidačních a redukčních piků jsou vzdáleny od jedné a s rostoucí úrovní dopování se k jedné přibližují, což souvisí s různou adsorpcí meziproductů na povrchu elektrody.

Následně byly zkoumány $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ fenolické látky (fenol, *m*-kresol, 3-nitrofenol, 3-methoxyfenol, 3-hydroxybenzoová kyselina, 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina, 3-(trifluormethyl)fenol, 3-chlorfenol) v prostředí pH 2 a 11 metodou DC voltametrie. Fenoly patří mezi aromatické látky pasivující při elektrochemické oxidaci povrch pevných elektrod. Bylo zjištěno, že při opakovaných voltametričtých měřeních docházelo ke snižování odezvy, což souvisí s tvorbou polymerních pasivačních filmů na povrchu elektrody v důsledku reakcí fenoxyl radikálů, prvotních produktů jednoelektronové oxidace fenolu^{5,9}. Bylo tedy nutné elektrodu před každým skenem anodicky očistit vložení kladného potenciálu v oblasti rozkladu vody, kdy dochází k její oxidaci a vzniku hydroxylových radikálů oxidujících povrch

elektrody včetně naadsorbovaných (mezi)produktů oxidace. Obecným trendem je také posun pík k nižším potenciálům s rostoucí úrovní dopování bórem.

Závěr

Redoxní markery různě reagují na změnu úrovně dopování bórem dopované diamantové elektrody, a proto jejich kombinace může dobře posloužit k charakterizaci vlastností daného povrchu. Všeobecně pozorovaným trendem je zhoršená opakovatelnost vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou pro méně dopované elektrody. Z toho lze usoudit, že při experimentálním elektroanalytickém měření je lepší používat více dopované elektrody, které poskytují opakovatelnější výsledky.

Acknowledgments

This research was performed within the framework of Specific University Research (SVV 260560) and has been supported by the Czech Science Foundation (project No. 20-03187S).

References

1. Schwarzova-Peckova K., Vosahlova J., Barek J., Sloufova L., Pavlova E., Petrak V., Zavazalova J.: *Electrochim. Acta* 243, 170 (2017).
2. Vosahlova J., Kolacna L., Danhel A., Fischer J., Balintova J., Hocek M., Schwarzova-Peckova K., Fojta M.: *J. Electroanal. Chem.* 821, 111 (2018).
3. Schwander M., Partes K.: *Diam. Relat. Mater.* 20, 287 (2011).
4. Watanabe T., Shimizu T. K., Tateyama Y., Kim Y., Kawai M., Einaga Y.: *Diam. Relat. Mater.* 19, 772 (2010).
5. Ferreira M., Varela H., Torresi R. M., Tremiliosi-Filho G.: *Electrochim. Acta* 52, 434 (2006).
6. Baluchova S., Danhel A., Dejmekova H., Ostatna V., Fojta M., Schwarzova-Peckova K.: *Anal. Chim. Acta* 1077, 30 (2019).
7. 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).
8. Shpilevaya I., Foord J. S.: *Electroanalysis* 26, 2088 (2014).
9. Enache T. A., Oliveira-Brett A. M.: *J. Electroanal. Chem.* 655, 9 (2011).
10. Baluchova S., Taylor A., Mortet V., Sedlakova S., Klimsa L., Kopecek J., Hak O., Schwarzova-Peckova K.: *Electrochim. Acta* 327, 135025 (2019).

Electrochemistry of Boron Cluster Compounds Containing Bridging Ligands in Phosphate Buffers

Lukáš Fojtík^a, Luděk Havran^a, and Bohumír Grüner^b

^a The Czech Academy of Sciences, Institute of Biophysics, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic, E-mail: fojtik@ibp.cz

^b Institute of Inorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Hlavní 1001, 250 68 Řež, Czech Republic

Abstract

Boron cluster compounds (BCCs) belongs to one of the promising substances used in biotechnology. Their use for such purposes is often adherent to use of aqueous solutions. The BCCs were mainly characterized in non-aqueous milieu in the past. In our present study we concur to our previous studies on sandwich structure icosahedral cobalt bis(dicarbollide) ions in phosphate buffers. We have studied samples containing 16 different bridging ligands connecting the two 1,2-C₂B₉ building blocks of the sandwich structure. Almost all structures provide electrochemical signals in different potential regions. This could imply their possible use as biomarkers with tunable electrochemical response.

Key Words: Boron cluster compounds, Glassy carbon electrode, DPV, Sandwich structures.

Introduction

Boron cluster compounds (BBCs) are synthetic species developed during last century in a small number of boron laboratories spread all over the world. Commonly occurring compounds (and their synthetic analogues) are predominantly based on electron rich, exact two-center two-electron bonds. The BCCs architecture is based on three-center two-electron bonds¹. Presence of this type of bonding originates from electron deficiency of boron that leads to sharing two available electrons within three orbitals. The current number of skeletal archetypes is rather rich and offers a broad scale of properties, which are often unattainable in naturally occurring compounds. Investigation of BCCs revealed that BCCs possess unique, enormous thermal, radiation, chemical, surface, solution stability, and also electrochemical properties. These characteristics leads to use of BCCs in different fields, such as Neutron Capture Therapy (NCT), drug design, low coordinating cations in catalysis, highly resistant polymers and luminescent and non-linear optical materials, among many others².

Electrochemistry of newly synthesized BCCs was mainly used as complimentary method to other analytical techniques in the past. Due to solubility limits of neutral carboranes, polar organic solvents or their mixtures with water have been therefore used in majority of BCCs electrochemical experiments³. Therefore, studies in aqueous media have been almost untouched. Nevertheless, some BBCs and mainly the ionic species offer a reasonably high solubility in water. This is governed by the charge of the cluster and a counter-cation present in the salts. Studies oriented into biology, biochemistry, biophysics and medicine are mostly connected with working in aqueous solutions. The emerging potential of BCCs^{2,4,5} to be used in these areas generates demand for techniques applicable in aqueous media. Our previous studies on electrochemical properties of several series of BCCs derivatives revealed that the sandwich structure icosahedral cobalt bis(dicarbollide) ions containing bridging ligands produce one of the highest electrochemical responses among other ones⁶⁻¹⁰. Such result lead us to choice of the samples for the current study. We have selected different bridging ligands, from the simplest ones (only one atom) to more complex ones. Some of these ligands may be used for the bioconjugation experiments (as the NH₂ group, oxygen containing groups etc.).

Experimental

The conventional electrochemical cell with three-electrode system connected to an Autolab 302 potentiostat (Ecochemie, The Netherlands) was used for electrochemical measurements. An Ag|AgCl|3 M KCl reference electrode and a platinum wire (of 1 mm diameter) counter electrode were used. The measurements were performed at the room temperature. The differential pulse voltammetry (DPV) was applied with the pulse amplitude of 0.025 V, pulse width of 50 ms, and scan rate of 0.008 V.s⁻¹. Glassy carbon electrode (GCE, 2 mm diameter, Metrohm, Switzerland) was used as the working electrode. GCE was prepared by mechanical polishing on SiC polishing papers (Struers, Denmark) and the polishing was finalized by the 1 μm diamond particles in spray on Lecloth B polishing pad (Leco, USA). GCE was sonicated for 30 s just before use to remove the rest of impurities from the mechanical polishing. The electrochemical measurements were done in phosphate buffers (PB) of various pH values. The PB was mixed from NaH₂PO₄ and Na₂HPO₄. The concentration of phosphate anions was kept at 0.2 M in all solutions. Current values were normalized to the geometrical surface area of used electrodes.

Table I summarized the salts of boron cluster anions investigated in this study. The samples originated from the B. Gruner (co-author of this paper) laboratory. Cations in the salts specified in Table I, which served for the precipitation of the anions in the last synthesis step, were exchanged for sodium cation using Amberlite CG-120 (Fluka) to increase their solubility in water. BCCs used in his study were prepared as 1 mM solutions according to weighting (in some cases, the solubility in water was lower – Tab. I). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and were of the highest available purity.

Table I.

Systematic formulas of used BCCs, samples with * have maximal concentration of 500 μM.

Systematic formula	BCC charge	Label in the text	Cobaltaborate MW
<i>closo</i> -[(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₁) ₂ -3,3'-Co]Cs	1-	<i>CoSAN</i>	323.74
* <i>closo</i> -[8,8'-μ-OCH ₂ -(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -3,3'-Co]K	1-	<i>μ-OCH₂-CoSAN</i>	351.74
<i>xloso</i> -[8,8'-μ-O-(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -3,3'-Co]Na.nH ₂ O	1-	<i>μ-O-CoSAN</i>	337.72
<i>closo</i> -[8,8'-μ-(C ₆ H ₄)-(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -3,3'-Co]Cs	1-	<i>μ-pho-CoSAN</i>	397.82
[8,8'-μ-S-(<i>ortho</i> -1,2- <i>closo</i> -C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -3,3'-Co]Me ₄ N	1-	<i>μ-S-CoSAN</i>	353.76
8,8'-μ-S ₂ -(<i>ortho</i> -1,2- <i>closo</i> -C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -3,3'-Co]Cs	1-	<i>μ-S-S-CoSAN</i>	385.85
*[8,8'-μ-NH ₂ -(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -3,3'-Co]	1-	<i>μ-NH₂-CoSAN</i>	337.72
[8,8'-μ-(CH ₂ C ₆ H ₃)-(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -3,3'-Co]Cs	1-	<i>μ-tolylene-CoSAN</i>	411.85
[8,8'-μ-(ClC ₆ H ₄)-(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -3,3'-Co]Cs	1-	<i>μ-chlorophenylene-CoSAN</i>	432.18
[8,8'-μ-(C ₂ H ₅ C ₆ H ₃)-(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -3,3'-Co]Cs	1-	<i>μ-et.phenylene-CoSAN</i>	425.87
[8,8'-μ-[(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃]-](1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -3,3'-Co]Cs	1-	<i>μ-o-xylylene-CoSAN</i>	425.87
[8,8'-μ-[(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃]-](1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -3,3'-Co]Cs	1-	<i>μ-p-xylylene-CoSAN</i>	425.87
[8,8'-μ-(C ₆ H ₄ -C ₆ H ₅)-(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -3,3'-Co]Cs	1-	<i>μ-biphenylene-CoSAN</i>	473.92
[4,8',8,4'-(Ph) ₂ -(<i>closo</i> -1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -3-Co] Cs	1-	<i>μ-(phenylene)₂-CoSAN</i>	469.74
[8,8'-μ-(Cl-P(O)O ₂)-(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -3-Co] Cs	1-	<i>μ-ClP(O)O₂-CoSAN</i>	436.12
[8,8'-μ-(Et ₂ N-P(O)O ₂)-(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -3-Co] Cs	1-	<i>μ-et₂N-P(O)O₂-CoSAN</i>	458.75
[8,8'-μ-(OH) ₂ -P-O ₂ -(1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀) ₂ -3-Co] Cs	1-	<i>μ-(HO)₂-PO₂-CoSAN</i>	418.68

Results and discussion

All samples are sandwich structures consisting of cobalt central atom coordinated by η^5 manner between two 1,2-C₂B₉ heteroborate ligands; each of them possessing a formal charge 2-. The cage of the compounds is perturbed by selected substitution with *exo*-skeletal substituents connecting the two heteroborate ligands. The anions can be divided into the following groups depending on the type of *exo*-skeletal substituents (see Figure 1 for some of the schematic structural formulas of the icosahedral cobalt bis(dicarbollide) ions):

1. Simple atom(s), μ -O-CoS_{AN}; μ -S-CoS_{AN}; μ -S-S-CoS_{AN}.
2. Simple groups, μ -NH₂-CoS_{AN}; μ -OCH₂-CoS_{AN}.
3. Ligands based on *exo*-skeletonally modified benzene, μ -tolylene-CoS_{AN}; μ -chlorophenylene-CoS_{AN}; μ -*et*-phenylene-CoS_{AN}; μ -*o*-xylylene-CoS_{AN}; μ -*p*-xylylene-CoS_{AN}; μ -biphenylene-CoS_{AN}; μ -(phenylene)₂-CoS_{AN}.
4. Ligands with P(O)O₂ group, μ -ClP(O)O₂-CoS_{AN}; μ -*et*₂N-P(O)O₂-CoS_{AN}; μ -(HO)₂-PO₂-CoS_{AN}.

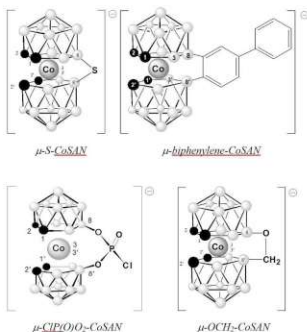


Fig. 1. The schematic structural formulas of selected icosahedral cobalt bis(dicarbollide) ions (one from each group) used in this study.

The results obtained at the GCE for pH = 8 (which have been evaluated in our previous works as the most fitting one⁶) are displayed on Figure 2. We can see, that almost all sandwich bridge structure BCCs give a voltammetric response at positive potentials (except the μ -NH₂-CoS_{AN}). This signal is ascribed to the boron cage oxidation. This electrochemical process is strictly irreversible and thus successful attempts to explain the origin of the reaction mechanism are very difficult to be done. At the negative part of the voltammogram we can distinguish well developed peaks for all electroactive BCCs from this study (thus except the μ -NH₂-CoS_{AN}), but with smaller peak heights at ca. $E = -1.3V$ (see Fig. 3, here we show only the BCCs from group 1 – the situation does not alter much for other samples, only the peak position slightly shifts). From our previous results⁶⁻¹⁰ we assume, that the negative voltammetric signals is the Co(III/II) redox process.

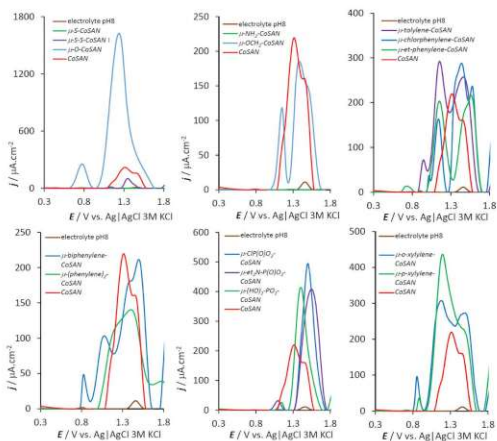


Fig. 2. DPV of all used BCCs, phosphate buffer, pH = 8, 500 μM concentrations of all samples, GCE. See caption in the panel for samples identification.

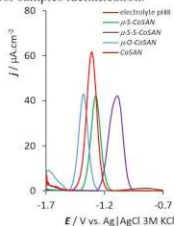


Fig. 3. DPV of BCCs from group 1 in the negative potential region, phosphate buffer, pH = 8, 500 μM concentrations of all samples, GCE. See caption in the panel for samples identification.

The voltammetric signals originating from the core cage oxidation are in case of these BCC sandwich structures limited to potential around 1.3V. The situation and peak characteristics do

alter according to the ligand attached to the boron cages. For comparative reasons, we add the *CoSAN* (as the basic building block) to each figure. Unfortunately, great enhancement of the DPV signal does occur only for the μ -*O-CoSAN* (around 8x higher peak current density), only about 2x enhancement we can observe for μ -*p-xylylene-CoSAN* and all BCCs from group 4. As we have observed before, the bridging ligand type supports peak splitting and/or enhancement of the original *CoSAN* sample.

In overall, different bridging ligands (and their properties, as one of most important hydrophilicity – which can increase the solubility of the BCCs in aqueous media) plays important role in BCCs electrochemistry and enables to tune their electrochemical properties.

Conclusions

In this work we present electrochemical study of different bis(icosahedral) heteroborate sandwich ions with a central coordination Co atom and different bridging ligands. The electrochemical response is divided in two parts – at negative potentials (around $E = -1.2$ V), there takes place already known reversible electrode process of the central Co atom. The irreversible process of boron cage oxidation is located at quite high potentials at a range around $E = 0.6$ V to $E = 1.7$ V. This electrochemical process takes place for all studied samples, except the μ - $NH_2-CoSAN$.

Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation, project No. 19-04630S.

References

1. Williams R.E.: Chem. Rev. 92, 177 (1992).
2. Plešek J.: Chem. Rev. 92, 269 (1992).
3. Morris J.H., Gysling H.J., Reed D.: Chem. Rev. 85, 51 (1985).
4. Issa F., Kassiou M., Rendina M.: Chem. Rev. 111, 5701 (2011).
5. Scholz M., Hey-Hawkins E.: Chem. Rev. 111, 7035 (2011).
6. Fojt L., Fojta M., Grüner B., Vespalec R.: J. Electroanal. Chem. 707, 38 (2013).
7. Fojt L., Fojta M., Grüner B., Vespalec R.: J. Electroanal. Chem. 730, 16 (2014).
8. Fojt L., Fojta M., Holub, J., Grüner B., Vespalec R.: Electrochim. Acta 205, 8 (2016).
9. Fojt L., Grüner B., Šícha V., Někviinda J., Vespalec R., Fojta M.: Electrochim. Acta 342, 136112 (2020).
10. Fojt L., Někviinda J., El Anwar S., Grüner B., Havran L., Fojta M.: Electroanalysis 32, 1859 (2020).

Recent Findings Indicate Paradigm Shift in Nucleic Acids Electrochemistry (Nová zjištění naznačují změnu paradigmatu v elektrochemii nukleových kyselin)

Miroslav Fojta^{a,b}, Aleš Daňhel^a, Daniel Dobrovodský^a, Vlastimil Dorčák^a,
Stanislav Hason^{a,b}, Luděk Havran^a, Monika Hermanová^{a,b}, Martina Outlá^a,
Veronika Ostatná^a, Hana Pivoňková^{a,b}, Zuzana Soldánová^a, and Jan Špaček^a

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

^b CEITEC Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

Abstract

For decades, electroactivity of nucleic acids has been utilized for their detection at mercury- or carbon-based electrodes, exploiting various signals. Recently, several observations have been made, which complete and expand the current knowledge on electrochemistry of nucleic acids, including (a) the possibility to use pyrolytic graphite electrode for detection of nucleobase reduction in the cathodic region, (b) description of electrocatalytic properties of unmodified nucleic acids, (c) a complex mechanism of guanine reduction at mercury electrodes encompassing catalytic hydrogen evolution and/or influence of other bases, and (d) studies of specific interfacial behavior of homo-oligonucleotides at the mercury electrode surface.

Key Words: electrochemistry, nucleic acids, mercury electrode, carbon electrode, reduction, oxidation, adsorption, 2D condensation, catalytic hydrogen evolution, deuterated nucleic acids.

Úvod

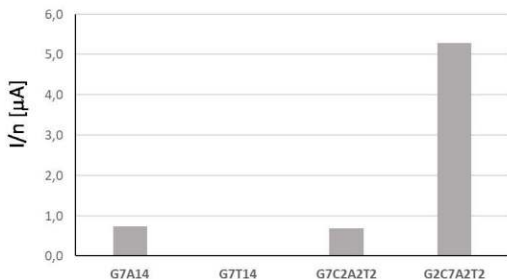
Nukleové kyseliny jsou elektrochemicky aktivní díky tomu, že jednotlivé nukleobáze mohou podstoupit katodickou redukcí nebo anodickou oxidací¹. Již dlouho je známo, že u adeninu (A) a cytosinu (C) dochází k ireverzibilní elektrochemické redukcí, kterou lze pozorovat díky (většinou společnému) katodickému signálu na rtuťových nebo stříbrných amalgámových elektrodách (tj. elektrodách s dostatečně širokým negativním potenciálovým oknem ve vodném prostředí díky vysokému přepětí vodíku). Redukci guaninu (G) na rtuťových elektrodách lze pozorovat pouze nepřímo díky reoxidaci redukčního produktu guaninu – 7,8-dihydroguaninu (GH₂). Všechny standardní báze v DNA, a kromě nich i uracil (U) a 5-methylcytosin (5-mC), poskytují při oxidaci anodické signály na uhlíkových elektrodách, neméně potenciál oxidace C je velmi podobný oxidačnímu potenciálu U, a to stejné platí i pro dvojici thymin (T) – 5-mC, což znemožňuje jejich rozlišení pouze na základě přímé oxidace.

Je všeobecně známo, že elektrochemické signály DNA jsou ovlivněny její strukturou. To je tradičně vysvětlováno rozdíly mezi přístupností zbytků nukleobází, které se nachází ve strukturovaných, spárovaných úsecích DNA (např. ve dvoušroubovici) a těch, které jsou v nestrukturovaných (nеспárovaných, denaturovaných) oblastech¹. Sekundární struktura DNA je tedy považována za primární faktor ovlivňující chování DNA na elektrodách (obzvláště na rtuťových elektrodách v oblasti negativních potenciálů, kde dochází k „přetahování“ mezi elektrostatickou repulzí polyanionické eukr-fosfátové páteře DNA z povrchu elektrody a silnou adsorpcí hydrofobních bází DNA). Naše nedávná pozorování však naznačují, že toto schéma je nekompletní a/nebo zastaralé v několika ohledech, což bude nastíněno v tomto příspěvku:

- (1) Nejen rtuťové (nebo amalgámové) elektrody jsou vhodné pro sledování redukce nukleobází v katodické oblasti. Elektroda z pyrolytického grafitu (PGE) o bazální orientaci byla úspěšně použita pro detekci oxidace i redukce kanonických bází DNA, U a 5-mC

v syntetických oligonukleotidech² a nukleosidech³. Za povšimnutí stojí fakt, že na rozdíl od rtuťových elektrod bylo na PGE možno pozorovat specifické redukční signály G, U a T. Také bylo možné detekovat produkty primární ireverzibilní redukce/oxidace většiny bází prostřednictvím jejich oxidace/redukce. Tento přístup tak umožnil rozlišení všech nukleobází.

- (2) Na rozdíl od proteinů, při jejichž elektrochemické analýze na rtuťových elektrodách je již dlouho úspěšně využíván katalytický vývoj vodíku (CHE z angl. „catalytic hydrogen evolution“)⁴, byly elektrokatalytické vlastnosti nemodifikovaných nukleových kyselin až donedávna opomíjeny. Tuto skutečnost lze přičítat jednak tomu, že za podmínek běžně používaných pro elektrochemickou analýzu DNA nebo RNA nebyl detekován žádný odlišitelný signál způsobený CHE v přítomnosti nemodifikované DNA, a jednak tomu, že absence vlastních signálů CHE byla a je využívána pro citlivou detekci modifikace DNA cizorodými katalyticky aktivními skupinami. Nedávno ale bylo ukázáno⁵, že za vhodných podmínek poskytují DNA i RNA signály analogické „píku H“ proteinů, což může být využito pro citlivou detekci nukleových kyselin nebo pro sledování jejich strukturálních změn. Navíc byla na základě katalytických reakcí poprvé detekována vodík-deuteriová výměna pomocí elektrochemických metod⁶. Nedávno byly jako báze zodpovědné za CHE v DNA nebo RNA identifikovány A a C (nebo přesněji řečeno produkty jejich redukce)⁷.



Obr. 1. Porovnání relativních výšek piků G získaných pro čtyři oligonukleotidy lišící se zastoupením jednotlivých bází (viz popisky na vodorovné ose) po přepočtu na jeden guaninový zbytek (n = počet guaninů). Experimentální podmínky: viz příspěvek M. Hermanová a kol. v tomto sborníku.

- (3) Naše předchozí pozorování naznačují, že redukce G na GH_2 na rtuťových a amalgámových elektrodách zahrnuje chemický krok, pravděpodobně redukci G nascentním vodíkem⁸, což je ve shodě s pozorovaným pozitivním vlivem CHE v přítomnosti komplexů platiny na redukci G. Nedávno jsme navíc pozorovali pozitivní efekt⁷, který měla přítomnost adeninových a/nebo cytosinových zbytků (tj. bází, které jsou zodpovědné za CHE na rtuťových elektrodách, viz výše), na redukci G. V nepřítomnosti A a C (jako např.

v oligonukleotidech skládajících se pouze z G a T) byla redukce G potlačena, což bylo patrné z téměř nepozorovatelného píku G odpovídajícího oxidaci GH_2 . Z porovnání výsledků pro vybrané čtyři vybrané oligonukleotidy (obr. 1) je patrný silný vliv přítomnosti A a C zbytků na relativní výšku píku G (po přepočtu na jeden guaninový zbytek). Tato pozorování naznačují, že nejen sekundární struktura, ale také zastoupení jednotlivých bází (a/nebo sekvence DNA) silně ovlivňují elektrochemické chování DNA prostřednictvím vzájemného působení jednotlivých bází na příslušné elektrodové procesy.

- (4) Homo-oligonukleotidy vykazují specifické chování na povrchu rtuťových elektrod⁹. Především homopyrimidinové úseky jsou v tomto ohledu velmi specifické, jelikož u nich na negativně nabitěm povrchu dochází ke 2D kondenzačním procesům. Homopurinové bloky naopak kondenzované filmy netvoří a jejich chování je tak kvalitativně srovnatelné s DNA s náhodnou sekvencí. Homonukleotidové bloky se také liší v adsorpční afinitě k povrchu rtuťové elektrody, přičemž úseky dC_n se adsorbují nejsilněji. Kromě jejich charakteristické povrchové aktivity byl pozorován i vliv délky dC_n na účinnost redukce cytosinových zbytků přítomných v těchto blocích.

Závěr

Naše nová pozorování naznačují, že elektrochemické a povrchové procesy nukleových kyselin jsou mnohem komplexnější, než bylo až donedávna uvažováno. To na jedné straně rozšiřuje možnosti aplikace elektrochemie nukleových kyselin. Na druhé straně by však měly být výše zmíněné jevy vždy pečlivě analyzovány, obzvláště při studiu struktury DNA.

Acknowledgments

This work has been supported by the SYMBIT project reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000477 financed from the ERDF and by Czech Science Foundation project No. 20-03187S.

References

1. Paleček E., Bartošik M.: *Chem. Rev.* *112*, 3427 (2012).
2. Špaček J., Daňhel A., Hason S., Fojta M.: *Electrochem. Commun.* *82*, 34 (2017).
3. Špaček J., Fojta M., Wang J.: *Electroanalysis* *31*, 2057 (2019).
4. Paleček E., Tkáč J., Bartošik M., Bertók T., Ostatná V., Paleček J.: *Chem. Rev.* *115*, 2045 (2015).
5. Řimánková L., Ostatná V., Bartošik M.: *Electroanalysis* *31*, 1895 (2019).
6. Dorčák V., Paleček E.: *Chemelectrochem* *6*, 1032 (2019).
7. Řimánková L., Hason S., Fojta M., Ostatná V.: *J. Electroanal. Chem.* *858*, 10 (2020).
8. Daňhel A., Havran L., Trnková L., Fojta M.: *Electroanalysis* *28*, 2785 (2016).
9. Hason S., Pivoňková H., Fojta M.: *J. Electroanal. Chem.* *849* (2019).

Redox Active Labelling of DNA by Boron Cluster Compounds

Luděk Havran^a, Bohumír Grüner^b, and Lukáš Fojt^a

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

^bInstitute of Inorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Hlavní 1001, 250 68 Řež, Czech Republic

Abstract

Application of redox active labels is one of approaches how to increase selectivity and sensitivity of DNA electrochemical analysis. One from such labels can be the boron cluster compounds (BCCs). Some of them are electroactive substances and in dependence on their structure and used working electrodes, they give analytically useful voltammetric signals. One of methods commonly used for DNA labelling are based on incorporation of chemically modified nucleosides by DNA polymerases. Results acquired with different BCCs as DNA electroactive tags will be presented in this contribution.

Key Words: Chemically modified DNA, Electroanalytical methods, Boron cluster compounds.

Introduction

DNA due to its naturally electroactivity provide various 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 surface¹. 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 to apply labelling of DNA by electroactive tags². There are some methods for DNA redox functionalization.

Several methods found application in preparation of chemically modified DNA nowadays. The simplest one is the direct chemical modification of DNA molecules. In the case of introduction of boron cluster compounds (BBCs) moieties into DNA molecules more complicated two-step approach was applied. In the first step are incorporated into DNA nucleobases bearing reactive group suitable for Cu(I) catalyzed Huisgen azide-alkyne cycloaddition (CuAAC, click) reaction³. Such nucleobases are incorporated using DNA polymerases² enzymes. Primer extension method (PEX) was 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. In the second step, CuAAC reaction is conducted in water medium (see Fig. 1).

BCCs are synthetic species, which architecture is contrary to naturally occurring compounds (electron rich, exact two-center two-electron bonds), based on three-center two-electron bonds⁴. Research on BCCs revealed that these compounds possess unique chemical, surface, solution, stability, and also electrochemical properties, which all substantially differ from naturally occurring compounds⁵⁻⁷. Their biocompatibility and electroactivity makes them candidates for new type of DNA electroactive tags.

In this contribution will be presented results obtained with DNA functionalized by different types of BCC.

Experimental

Synthetic oligonucleotides were purchased from Generi Biotech (Czech Republic). TdT and T4 Polynucleotide kinase were purchased from New England Biolabs, KOD XL DNA polymerase (Novagen, USA). CuAAC reaction was done in water at 37 °C. Reaction was promoted by Cu(I) stabilizing ligand 2-[4-{{bis[(1-tert-butyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amino)-methyl}-1H-1,2,3-triazol-1-yl]ethyl hydrogen sulfate (BTTEs)⁸. Cu(I) was prepared in situ by reduction of cupric sulfate by ascorbic acid. Products of click reaction were purified by using a QIAquick Nucleotide removal kit (Qiagen, Germany). 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). Pyrolytic graphite electrode in basal orientation (PGE) was used as a working electrode. Instruments settings: AdTS SWV: $E_i = -1.0$ 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).

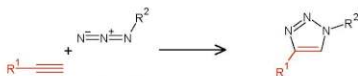


Fig. 1. Huisgen azide-alkyne cycloaddition reaction

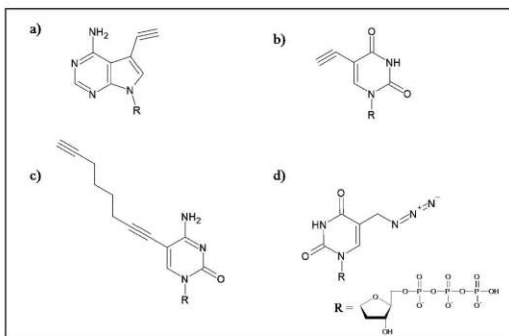


Fig. 2. Structures of dA^ETP (a), dU^ETP (b), dC^ETP (c), and dU^{N3}TP (d).

Results and discussion

DNAs samples containing dA, dU, and dC bearing reactive groups were prepared by incorporation of corresponding nucleoside triphosphates (Fig. 2).

TdT tailing and PEX reaction were used for this purpose. BCC bearing reactive groups (Fig. 3) were conjugated to ethynyl or azide decorated ss or ds DNA by CuAAC. Electrochemical

properties of prepared functionalised DNA were studied at PGE. Both signals, due to oxidations of BCC skeleton and due to reduction of presented metal atom were examined by square wave voltammetry. Extensive optimisation of CuAAC reaction was done, because chemical properties of reactive groups bound to boron cluster are considerably different in comparison with fully carbon substances (predominantly due to its electron deficient cage architecture). Preliminary electrochemical results suggest that these efforts were partially successes, but conditions CuAAC reaction and electrochemical measurement are not fully optimal yet.

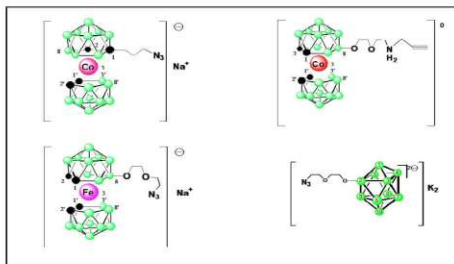


Fig. 3. Structures of selected the boron cluster compounds.

Conclusions

Single or double strand DNAs decorated by BCC were prepared by two-step methodology including incorporation of nucleobase bearing ethynyl or azide groups by DNA polymerases following by CuAAC reaction with BCC. Reaction conditions were optimized. Electrochemical behavior such DNAs was studied at PGE by AdTS SWV.

Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation (project no. 19-04630S).

References

1. Paleček E., Bartošik M.: *Chem. Rev.* *112*, 3427 (2012).
2. Hocek M., Fojta M.: *Chem. Soc. Rev.* *40*, 5802 (2011).
3. Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B.: *Angew. Chem., Int. Ed.* *40*, 2004 (2001).
4. Williams R.E.: *Chem. Rev.* *92*, 177 (1992).
5. Fojt L., Fojta M., Grüner B., Vespalec R.: *J. Electroanal. Chem.* *707*, 38 (2013).
6. Fojt L., Fojta M., Grüner B., Vespalec R.: *J. Electroanal. Chem.* *730*, 16 (2014).
7. Fojt L., Grüner B., Šicha V., Někviinda J., Vespalec R., Fojta M.: *Electrochim. Acta* *342*, 136112 (2020).
8. del Amo D. S., Wang W., Jiang H., Besanceney C., Yan A. C., Levy A. C., Liu Y., Marlow F. L., Wu P.: *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 16893 (2010).

**Influence of Flanking Sequences and Secondary DNA Structure on Electrochemical
(In)Activity of Guanine in dG_n Blocs
(Vliv okolních sekvencí a sekundární struktury DNA na elektrochemickou (in)aktivitu
guaninu v dG_n blocích)**

Monika Hermanová^{a,b}, Zuzana Bábková^a, Luděk Havran^a, Hana Pivoňková^{a,b}, and Miroslav Fojta^{a,b}

^a Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic, e-mail: hermanova@ibp.cz

^b CEITEC Masaryk University, Kamenice 5, 625 00, Brno, Czech Republic

Abstract

Recent studies indicate that chemical mechanisms involving hydrogen radicals electrochemically or electrocatalytically generated at mercury electrode contribute to guanine (G) reduction, and since adenine (A) and cytosine (C) have been determined as the bases responsible for the catalytic hydrogen evolution (CHE) in DNA, the G reduction is facilitated by the presence of A or C in the DNA sequence. Following these recent findings, we show that oligonucleotides containing dG_n blocks exhibit complex behavior at mercury electrode, with oligonucleotides containing A or C producing markedly higher G peak than oligonucleotides composed only of G and T. Moreover, electrochemical behavior of these oligonucleotides is influenced by its structure as dG_n blocks tend to form G4-quadruplexes.

Key Words: Guanine, Reduction, Catalytic Hydrogen Evolution, G4-Quadruplexes, Cyclic Voltammetry.

Úvod

Nukleové kyseliny jsou elektrochemicky aktivní¹. V oblasti negativních potenciálů dochází k ireverzibilní elektrochemické redukci adeninu (A) a cytosinu (C) a díky tomu můžeme pozorovat katodický signál – píky CA (tradičně na rtuťových a stříbrných amalgámových elektrodách). Anodický píky G je způsoben elektrochemickou re-oxidací redukčního produktu guaninu (G), 7,8-dihydroguaninu, který vzniká při velmi negativních potenciálech. Elektrochemické signály DNA jsou ovlivněny její strukturou, jelikož přístupnost nukleobází k elektrodoým reakcím například v dvoušroubovicové DNA je odlišná od jejich přístupnosti v nestrukturovaných, jednošroubovicových úsecích¹. Kromě rozdílů mezi duplexem a jednošroubovicovou DNA lze vliv struktury DNA pozorovat také např. u oligonukleotidů, které tvoří tetramolekulární paralelní G4-kvadruplexy². Sekundární struktura DNA je tedy považována za významný faktor ovlivňující chování DNA na povrchu elektrody. Kromě sekundární struktury jsou interakce DNA s elektricky nabitými povrchy ovlivněny také zastoupením jednotlivých typů bází a primární strukturou. Konkrétně homo-oligonukleotidy se na povrchu rtuťových elektrod chovají velice specificky, zejména homopyrimidinové úseky, u kterých dochází na negativně nabitěm povrchu elektrody k 2D kondenzačním procesům. Naopak homopurinové bloky nevykazují tendenci k tvorbě kondenzovaných filmů a jejich chování je podobné jako chování DNA s náhodnou sekvencí³.

Naše předchozí výsledky naznačují, že redukce guaninu na 7,8-dihydroguanin zahrnuje chemický krok, pravděpodobně redukci N7=C8 vazby guaninu elektrochemicky generovaným atomárním vodíkem. To bylo patrné např. z pozitivního vlivu katalytického vylučování vodíku (CHE) v přítomnosti platinových komplexů nebo jejich aduktů s DNA⁴. CHE doprovází nebo následuje i redukci přirozených složek DNA. Zatímco elektrokatalytické vlastnosti proteinů jsou známým a studovaným jevem⁵, obdobné chování bylo u nukleových kyselin popsáno

teprve nedávno ⁶. Za vhodných podmínek poskytují RNA i DNA signály analogické piku „H“ proteinů, což může být využito pro citlivou detekci nukleových kyselin nebo pro sledování jejich strukturálních změn. Jako báze zodpovědné za CHE v DNA nebo RNA byly identifikovány adenin a cytosin (nebo spíše produkty jejich redukce). Nedávno byl zjištěn pozitivní vliv přítomnosti A a/nebo C ve fragmentech DNA na redukci guaninu ⁷; v nepřítomnosti A a C, jako např. v oligonukleotidech obsahujících pouze báze guanin a thymin, byla redukce guaninu potlačena, což bylo patrné z velmi malé intenzity piku G (způsobené oxidací 7,8-dihydroguaninu). Tyto výsledky tedy naznačují, že kromě sekundární struktury jsou významným faktorem ovlivňujícím elektrochemické chování DNA i zastoupení jednotlivých bází a/nebo sekvence DNA.

V této práci se zabýváme elektroaktivitou guaninových zbytků v dG_n blocích obklopených různými kombinacemi bází – jak homopurinovými (A₇G₇A₇) nebo homopyrimidinovými (T₇G₇T₇), (CAT)G₇(CAT), (ATG)C₇(ATG) (Generi Biotech) nebo jejich duplexy vytvořené hybridizací ekvimolárních množství jednotlivých ODN. Koncentrace ODN byla 25 μg.ml⁻¹, vzorky, ze kterých byly ODN adsorbovány na povrch elektrody, obsahovaly 0,2 M NaCl.

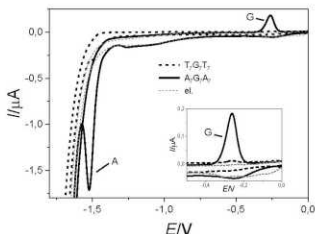
Experimentální část

Pro měření byly použity následující jednořetězcové oligodeoxynukleotidy (ODN): A₇G₇A₇, T₇G₇T₇, (CAT)G₇(CAT), (ATG)C₇(ATG) (Generi Biotech) nebo jejich duplexy vytvořené hybridizací ekvimolárních množství jednotlivých ODN. Koncentrace ODN byla 25 μg.ml⁻¹, vzorky, ze kterých byly ODN adsorbovány na povrch elektrody, obsahovaly 0,2 M NaCl.

Všechna elektrochemická měření byla prováděna při laboratorní teplotě v tříelektrodovém 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 voltmetrií (AdTS). DNA byla akumulována na povrchu elektrody ze 3 μl alikvotů po dobu 60 s, poté byla elektroda opláchnuta v deionizované vodě a umístěna do elektrochemické cely obsahující čistý elektrolyt. Cyklická voltmetrie (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 voltmetrii byla následující: počáteční potenciál 0 V, potenciál bodu obratu -1,85 V, koncový potenciál 0 V, rychlost polarizace 1 V.s⁻¹.

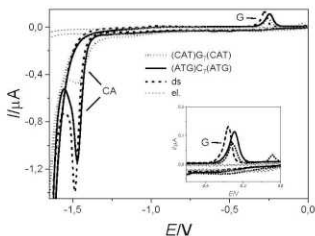
Výsledky a diskuse

Při redukci a následné oxidaci oligonukleotidu A₇G₇A₇ lze na cyklickém voltogramu pozorovat dva dobře vyvinuté piky – katodický pik CA (v tomto případě pouze pik „A“) a anodický pik G odpovídající re-oxidaci 7,8-dihydroguaninu, redukčního produktu guaninu (Obr. 1). Naproti tomu u oligonukleotidu T₇G₇T₇ je pik G zanedbatelný, přestože počet guaninových zbytků je v obou oligonukleotidech stejný. Z toho lze usuzovat, že o tom, jestli je možné detekovat pik G při cyklické voltmetrii, rozhodují v tomto případě kromě přítomnosti guaninů (a struktury guaninového úseku potenciálně tvořícího tetramolekulární paralelní G4-kvadruplexy) i další báze v oligonukleotidech – tedy zda je guaninový úsek obklopen adeninovými či thyminovými zbytky. Přítomnost adeninových zbytků v sousedství guaninů tedy podporuje redukci guaninu, kterou můžeme pozorovat díky oxidačnímu piku G, což je v souladu s již publikovanými výsledky ⁷.



Obr. 1. Cyklické voltamogramy oligonukleotidů T₇G₇T₇ a A₇G₇A₇ adsorbovaných na HMDE.

U oligonukleotidů (CAT)G₇(CAT) a (ATG)C₇(ATG) dochází k zajímavému jevu, kdy na cyklickém voltamogramu můžeme pozorovat větší pik G u oligonukleotidu (ATG)C₇(ATG), který obsahuje pouze dva guaninové zbytky, než u oligonukleotidu (CAT)G₇(CAT) se sedmi guaninovými zbytky uspořádanými v bloku. To může být způsobeno jednak tím, že na rozdíl od (CAT)G₇(CAT), oligonukleotid (ATG)C₇(ATG) nemůže tvořit kvadruplexy a guaninové zbytky v DNA jsou tak přístupné k povrchu elektrody, a jednak vyšším počtem C a A v daném oligonukleotidu, které – pravděpodobně prostřednictvím CHE – podporují redukcí guaninu. Dvouřetězcová DNA vytvořená z komplementárních sekvencí (CAT)G₇(CAT) a (ATG)C₇(ATG) poskytuje oproti oběma jednořetězcovým oligonukleotidům větší pik G, což může souviset jednak s tím, že vznik duplexu potlačí tvorbu G4-kvadruplexu v (CAT)G₇(CAT) a jednak s vyšším relativním zastoupením G (oproti (ATG)C₇(ATG)) při plném pokrytí elektrody.



Obr. 2. Cyklické voltamogramy oligonukleotidů (CAT)G₇(CAT), (ATG)C₇(ATG) a jejich duplexu, adsorbovaných na HMDE.

Závěr

V této práci ukazujeme, že elektrochemická redukce guaninu na rtuťové elektrodě je závislá jak na sekundární struktuře DNA, tak na zastoupení jednotlivých bází, kdy u oligonukleotidů neobsahujících adenin ani cytosin téměř nedochází k redukci guaninu, na což lze usuzovat z absence anodického píku G. Elektrochemické chování guaninových úseků v DNA je tak komplexní záležitostí a má na něj vliv mnoho aspektů, které je potřeba při studiu těchto sekvencí zvážit.

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 a projektu GAČR č. 20-03187S.

References

1. Paleček E., Bartošik M.: *Chem. Rev.* *112*, 3427 (2012).
2. Vidláková P., Pivoňková H., Kejnovská I., Trnková L., Vorličková M., Fojta M., Havran L.: *Anal. Bioanal. Chem.* *407*, 5817 (2015).
3. Hasoň S., Pivoňková H., Fojta M.: *J. Electroanal. Chem.* *849* (2019).
4. Daňhel A., Havran L., Trnková L., Fojta M.: *Electroanalysis* *28*, 2785 (2016).
5. Paleček E., Tkáč J., Bartošik M., Bertók T., Ostatná V., Paleček J.: *Chem. Rev.* *115*, 2045 (2015).
6. Řimánková L., Ostatná V., Bartošik M.: *Electroanalysis* *31*, 1895 (2019).
7. Řimánková L., Hasoň S., Fojta M., Ostatná V.: *J. Electroanal. Chem.* *858*, 10 (2020).

The use of Boron Doped Diamond Electrode for Determination of 5-hydroxyindoleacetic Acid

Vojtěch Hrdlička, 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: navratil@jh-inst.cas.cz

Abstract

A new method for voltammetric determination of clinical biomarker 5-hydroxyindoleacetic acid (HIAA) at the boron-doped diamond electrode (BDDE) was developed. Anodically and cathodically pretreated BDDEs were tested in the pH ranges from 1 to 12, pre-treatment at +2.0V/60 s, and pH 3 was found to be the optimum.

The optimum square wave voltammetry (SWV) parameters were: $f = 12$ Hz, amplitude 60 mV, and potential step 4 mV. SWV concentration dependency was constructed in the range from 0.1 to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, limits of determination and detection were 0.3 and 0.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. HIAA oxidation electrode process at BDDE was diffusion-controlled, as uncovered by cyclic voltammetry. Interestingly, HIAA peak potential was constant in various ranges of pH, indicating a non-Nernstian behavior at the BDDE, in contrast to a previously published electrooxidation mechanism consisting of a coupled H^+/e^- transfer.

Key Words:

Boron-doped diamond electrode, 5-hydroxyindoleacetic acid, Square wave voltammetry, Catecholamine metabolites.

Introduction

5-hydroxyindoleacetic acid (HIAA, Fig. 1) is a major serotonin metabolite in the human body and a clinical biomarker of various diseases, including depression, schizophrenia, carcinoid tumor, and pheochromocytoma^{1,2}. In addition, HIAA serves as a marker of serotonin activity in humans and rats. The determination of HIAA in biological fluids^{3,4} is relevant for diagnostics, pre-emptive screening tests, and monitoring of disease progression, in addition to suicide prediction in psychiatric patients⁴. The reported normal concentration of urinary HIAA ranges from 17.8 to 58.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ⁵. HIAA levels in cerebrospinal fluid, another body fluid of interest, are approximately three orders lower⁴.

HIAA is electrochemically oxidizable on various electrode materials, however, no study dealing with HIAA electroanalysis at the boron-doped diamond electrode (BDDE) has been published^{6,7}. The BDDEs are especially suitable for trace analysis of organic compounds due to their sensitivity, wide potential window, low background currents, chemical and mechanical stability, resistance to fouling, and the possibility to modify its properties with the use of a suitable electrochemical pre-treatment⁸⁻¹⁰. Pre-treatment of BDDEs by mechanical polishing or by application by negative or positive potentials affect the termination of the electrode surface, and consequently on its electrochemical properties, including electron transfer kinetics, potential window, and even selectivity towards particular electrochemically active species^{9,11}.

This work aims to study the electrochemical behavior of HIAA at BDDE and the development of a new voltammetric method for the determination of HIAA. Due to notoriously difficult direct electroanalysis in urine samples, a possible combination of the method with a sample preparation step consisting of hollow-fiber-based microextraction¹²⁻¹⁴.

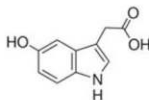


Fig. 1 Structure of 5-HIAA.

Experimental

The stock solution of HIAA ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) was prepared by dissolving of the proper amount of 5-hydroxyindole-3-acetic acid ($\geq 98\%$, Sigma Aldrich, Czech Republic) into deionized water (Milli-Q System, Millipore, Czech Republic). Britton-Robinson buffer (BRB) was prepared by mixing proper amounts of its acidic and basic parts and used for pH 2-12. The acidic part was comprised of 0.04 mol L^{-1} acetic acid, 0.04 mol L^{-1} boric acid, and 0.04 mol L^{-1} phosphoric acid (all Penta Švec, Czech Republic). The basic part was 0.2 mol L^{-1} sodium hydroxide (Penta Švec, Czech Republic), 0.1 mol L^{-1} hydrochloric acid (p.a., Penta Švec, Czech Republic) was used as an electrolyte for pH 1. Voltammetric experiments were executed with computer-controlled electrochemical interface PalmSens4 (PalmSens BV, Netherlands) with PSTrace 5.6 software.

The conventional 3-electrode system was used with a working BDDE electrode (diameter 3.0 mm, Windsor Scientific, UK), platinum wire counter electrode (Monokrystal, Czech Republic), and Ag|AgCl|(3 mol L⁻¹ KCl) reference electrode (type "RAE111" Monokrystal, Czech Republic). Mechanical pre-treatment of BDDE was carried out by polishing on a polishing pad with 0.2 μm alumina particles (Elektrochemické detektory, Czech Republic).

The coverage intervals were calculated on the significance level $\alpha = 0.05$. Detection limits (LODs) and quantification limits (LOQs) were calculated according to Meloun^{15,16}.

Results and discussion

Voltammetric behavior of HIAA at mechanically, cathodically, and anodically pretreated BDDE was investigated in the pH range from 1 to 12 using cyclic voltammetry. HIAA provided a single, well-developed anodic peak in the whole range of pH at all tested pre-treatments. At the mechanically activated BDDE (60 s of polishing), HIAA provided relatively highest peak currents, however with low repeatability. Strong fouling effects were observed, with peak height decreasing to half of the original value within seven consecutive scans. Polishing after each experiment led to relative standard error RSD $\sim 10\text{-}40\%$ ($n = 7$). Cathodic pre-treatment was carried out at -1.0 V for 60 s to avoid the undesirable rise of the background. The HIAA peak potential ranged from 0.8 V under acidic conditions to 0.6 V under basic conditions, similarly for both mechanical and cathodic pre-treatment (Fig. 2). The repeatability with the use of cathodical pre-treatment was better with RSDs $< 4\%$. Anodic pretreatment ($+2.0 \text{ V}$, 60 s) shifted the HIAA peak potentials towards more positive values of 1.5 V to 0.8 V under acidic or basic conditions, respectively. Peak currents and repeatability is comparable to the cathodic pre-treatment with lower background and RSDs $= > 3\%$.

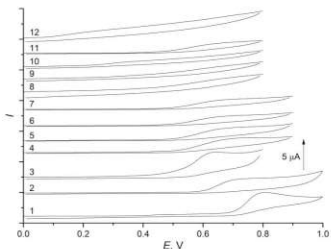


Fig. 2. Cyclic voltammograms of $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ HIAA at BDDE. Numbers next to curves correspond to the pH of the used electrolyte: BRB for pH 2-12 and 0.1 mol L^{-1} HCl for pH 1.

The optimum conditions for HIAA determination were anodic pre-treatment at $+2.0 \text{ V}$ for 60 s and pH 3. The electrode processes were diffusion-controlled at both anodically and cathodically pretreated BDDE with directly proportional $I_p^{1/2}$ to v . No HIAA accumulation on the electrode surface for the use of adsorptive stripping voltammetry was observed in times up to 10 minutes. SWV voltammetry parameters were optimized one factor at a time, f in the range from 5 to 100 Hz, amplitude 10 to 100 mV, and potential step from 1 to 10 mV. The optimum SWV parameters were: $f = 12 \text{ Hz}$, amplitude 60 mV, and potential step 4 mV. Frequency larger than 15 Hz led to significant periodic noise, and amplitudes over 60 mV resulted in an undesirable broadening of peaks. HIAA SWV concentration dependency was obtained, under the optimum conditions, in the concentration range from 0.1 to $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ with LOQ and LOD being 0.3 and $0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively (Fig. 3). For the use of this method in combination with hollow-fiber liquid microextraction, concentration dependency was also obtained at pH 7 with LOQ and LOD 0.5 and $1.5 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively.

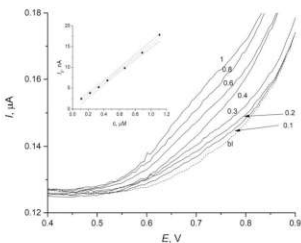


Fig. 3. SW voltammograms of 0.1 - $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ HIAA at BDDE in BRB pH 3. Numbers next to curves correspond to the concentration in $\mu\text{mol L}^{-1}$. BDDE pretreated at -2.0 V for 60 s. Inset: calibration dependency.

Conclusion

The newly developed method provides a suitable framework for the determination of HIAA in complicated biological matrices, i.e. human urine. The sensitivity is more than adequate for this purpose, whilst the selectivity can be supposedly improved by a hollow-fiber liquid microextraction, as was previously shown in the studies on the determination of urinary homovanillic and vanillylmandelic acid^{12,14}.

Acknowledgments

This research has been supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Czech Science Foundation, GACR project No. 20-01589S) and Specific University Research of the Charles University (SVV260560).

References

1. Buchanan-Hughes A., Pashley A., Feuilly M., Marteau F., Pritchard D. M., Singh S.: *Neuroendocrinology* (2020).
2. Ewang-Emukowhate M., Nair D., Caplin M.: *Int. J. Endocr. Oncol.* 6 (2019).
3. Liu Y., Jiang Y. X., Song W. B., Lu N., Zou M. Z., Xu H. D., Yu Z. X.: *Talanta* 50, 1261 (2000).
4. Nordstrom P., Samuelsson M., Asberg M., Traskman-Bendz L., Aberg-Wistedt A., Nordin C., Bertilsson L.: *Suicide Life Threat. Behav.* 24, 1 (1994).
5. Garcia A., Heinanen M., Jimenez L. M., Barbas C.: *J. Chromatogr. A* 871, 341 (2000).
6. Makrlikova A., Berek J., Vyskocil V., Navratil T.: *Chem. Listy* 112, 605 (2018).
7. Makrlikova A., Ktena E., Economou A., Fischer J., Navratil T., Berek J., Vyskocil V.: *Electroanalysis* 29, 146 (2017).
8. Peckova K., Musilova J., Berek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 148 (2009).
9. Lourenco B. C., Brocenschi R. F., Medeiros R. A., Fatibello O., Rocha R. C.: *Chemelectrochem* 7, 1291 (2020).
10. Baluchova S., Danhel A., Dejmekova H., Ostatna V., Fojta M., Schwarzova-Peckova K.: *Anal. Chim. Acta.* 1077, 30 (2019).
11. Kasahara S., Natsui K., Watanabe T., Yokota Y., Kim Y., Iizuka S., Tateyama Y., Einaga Y.: *Anal Chem* 89, 11341 (2017).
12. Hrdlicka V., Navratil T., Berek J.: *J. Electroanal. Chem.* 835, 130 (2019).
13. Saraji M., Farajmand B., Ensafi A. A., Allafchian A. R., Zare Z. M.: *Talanta* 82, 1588 (2010).
14. Hrdlicka V., Berek J., Navratil T.: *Talanta* (2020).
15. Meloun M., Milityk J., Hill M., Brereton R. G.: *Analyst* 127, 433 (2002).
16. Meloun M., Milityk J.: *Statistická analýza experimentálních dat*. Academia, Prague 2004.

Electrochemical Oxidation of Sartans with Boron Doped Diamond Electrodes (Elektrochemická oxidácia sartanov na bórom dopovaných diamantových elektródach)

Lucia Hojová^a, Erika Mordačíková^a, Martin Vrška^b, Marian Vojs^b, Marian Marton^b, and Andrea Vojs Staňová^{b,c}

^aComenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Analytical Chemistry, Mlynská Dolina, Ilkovičova 6, 84215, Bratislava, Slovak Republic,

E-mail: hojova4@uniba.sk

^bSlovak University of Technology in Bratislava, Faculty of electrical engineering and information technology, Institute of Electronics and Photonics, Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava, Slovak Republic

^cUniversity 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, CZ-389 25 Vodnany, Czech Republic

Abstract

Wastewater treatment plants using the conventional cleaning procedures are not able to degrade most of pharmaceutically active ingredients with a sufficient removal efficiency. Advanced oxidation processes are a promising technology for the removal of a wide range of micropollutants, including pharmaceuticals. The present work was focused on comparison of the removal efficiencies reached after electrochemical oxidation of sartans (irbesartan, telmisartan, valsartan) on different types of BDD electrodes (structured, non-structured silicon substrate and porous ceramics) with an addition of salts (NaCl, Na₂SO₄) into a working electrolyte. For evaluation of removal efficiency of sartans HPLC-MS/MS was used. Degradation and transformation products of sartans were identified by HPLC-IT-TOF-HRMS.

Key Words: Sartans, BDDE, HPLC-HRMS, Degradation and Transformation products, Safety.

Úvod

V poslednom desaťročí výrazne vzrástol záujem skúmať nielen prítomnosť farmaceutík vo všetkých vodných útvaroch, ale aj ich možný vplyv na ekosystém. Zo štatistických údajov vyplýva, že práve sartany patria k veľmi užívaným liečivám¹. V odpadových vodách sa nachádzajú na koncentračných úrovniach jednotiek až desiatok µg/L^{2,3} a v prípade povrchových vôd v intervale stoviek ng/L až jednotiek µg/L⁴. V súčasnosti existuje niekoľko spôsobov, ktorými reziduá liečiv vstupujú do vodného prostredia, no najznámejším bodovým znečistením sú čistiare odpadových vôd (ČOV). Miera odbúrania liečiv v ČOV závisí od viacerých faktorov, pričom medzi najdôležitejšie patria fyzikálno-chemické vlastnosti liečiv, typ aplikovaných technológií úpravy a klimatické podmienky⁵.

Pokročilé oxidačné procesy (AOPs) sa javia ako vynikajúca možnosť v modernizácii ČOV a minimalizácii vypúšťania reziduí liečiv do vodných útvarov. AOPs sú technologické postupy, ktoré sú schopné s vysokou účinnosťou odstraňovať široký rozsah organických zlúčenín⁷. Patria sem procesy založené na produkcii OH-radikálov, kam zaraďujeme aj elektrochemickú oxidáciu s využitím bórom dopovaných diamantových elektród (BDDE). Tieto radikály sú vysoko reaktívne a silné oxidačné látky ($E^{\circ} = 2,80$ V) a mohli by zabezpečiť chemickú oxidáciu znečisťujúcich látok, v ideálnom prípade ich úplnú mineralizáciu^{6,7}. V porovnaní s anódami

ako Pt, RuO₂, IrO₂, SnO₂, PbO₂ a TiO₂ sú diamantové anódy vhodnejšou alternatívou na degradáciu mikropolutantov. Elektrochemické vlastnosti BDDE závisia od obsahu bóru, povaha použitých substrátov, pomere sp³/sp² hybridizovaného uhlíka a hrúbky filmu. Všeobecne BDDE disponujú niekoľkými výhodami ako nízky kapacitný prúd, široké potenciálové okno, mechanická robustnosť, biokompatibilita a nízka miera korózie či pasivácie s možnosťou miniaturizácie^{8,9}. Všetky AOPs sú prevažne založené na sekvencii oxidačno-radikálových reakcií. Tvorba degradačných produktov sa však líši v závislosti od typu radikálu a tiež štruktúry pôvodnej molekuly polutantu¹⁰. Degradácia pomocou AOPs je riadená mierou tvorby reaktívnych častíc ako aj konkurenčnými reakciami. Konkurenčné reakcie sa podieľajú na odbúrání cieľových zlúčenín, ale k degradačnému procesu prispievajú aj ióny pochádzajúce z elektrolytu alebo matrice¹¹.

Pri AOPs sa sleduje nielen účinnosť odbúrání, ale aj novovzniknutý degradačný produkt, ktorý môže v environmente vykazovať nežiaducu sekundárnu kontamináciu a môže pôsobiť ekotoxicky¹⁰⁻¹². Vďaka unikátnemu spojeniu dvoch analytických techník, a to vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s vysokorozlišovacou hmotnostnou spektrometriou, ktoré vyniká vysokou citlivosťou a selektivitou je možné vo vzorkách z degradačných experimentov spoľahlivo identifikovať vznikajúce degradačné a transformačné produkty¹³.

Práca sa venovala možnostiam elektrochemickej oxidácie najviac užívaných liečiv zo skupiny sartanov (irbesartan, valsartan a telmisartan) pomocou rôzne pripravených BDDE a následnej identifikácii vzniknutých degradačných a transformačných produktov s využitím kombinácie vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie - vysokorozlišovacia hmotnostná spektrometria (HPLC-HRMS).

Experimentálna časť

Na prípravu roztokov sa použili analytické štandardy irbesartanu, telmisartanu a valsartanu od Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemecko). Na prípravu mobilných fáz sa využila kyselina mravčia (≥98 %), kyselina octová (≥99,88 %), octan amónny (≥99,99 %), mravčan amónny (≥ 99,995 %) a acetonitril (LC-MS Chromasolv®) (všetky Sigma-Aldrich). Všetky roztoky boli pripravené z dvojstupňovo čistenej vody systémami Labconco a Millipore Simplicity (Lambda Life, Bratislava, Slovensko).

Na elektrochemickú oxidáciu boli použité rôzne typy BDD elektród. BDD film (2,5% CH₃/H₂ 10 000 ppm B/C) bol nanosený na štruktúrovaný a neštruktúrovaný kremikový substrát a na poréznu keramiku (40ppi). Na zhodnotenie účinnosti použitých BDDE boli vzorky z degradačných experimentov analyzované pomocou HPLC-MS/MS(Thermo Fisher Scientific San Jose, CA, USA). Identifikácia degradačných a transformačných produktov sa uskutočnila prostredníctvom HPLC-HRMS na prístroji LC-MS-IT-TOF™ (Shimadzu, Kyoto, Japonsko).

Výsledky a diskusia

Hlavným cieľom práce bolo sledovanie vplyvu použitej BDD elektródy a typu soli, ktorá tvorí reakčný elektrolyt na účinnosť elektrochemickej oxidácie. Pre tento účel boli na degradačné experimenty využité rôzne elektródy (Si, sSi, 3D BDDE) a prídavkami rozdielnych solí (NaCl, Na₂SO₄). Elektrochemická oxidácia sartanov prebiehala v destilovanej vode s prídavkom soli a štandardu liečiva o známej koncentrácii. Vzorky boli odoberané v časových intervaloch 0 min; 30 min; 60 min; 120 min a 240 min.

Z Tabuľky I vyplýva, že účinnosť elektrochemickej oxidácie je ovplyvnená použitou BDDE, ale najmä zložením pracovného elektrolytu. S prídavkom NaCl sú dosiahnuté vyššie účinnosti

odbúraniu pre všetky sledované liečivá, čo môže byť spôsobené generovaním aktívnych Cl častíc s vysokou reaktivitou Cl⁻ (a tvorby Cl₂; HClO; HClO₂; HClO₃; HClO₄)¹¹, ktorý výrazným spôsobom prispieva k degradácii sartanových liečiv. Prídavok Na₂SO₄ v porovnaní s NaCl vykazuje nižšiu mieru eliminácie pri všetkých liečivách bez ohľadu na použitú BDD elektródu. Zo získaných výsledkov vyplýva, že pre účinnú degradáciu IRBE a TELMI je najvhodnejšie použiť BDDE s neštruktúrovaným kremikovým substrátom. V prípade VAL bola najvyššia účinnosť eliminácie dosiahnutá s využitím BDDE na poréznej keramike.

Tabuľka I.

Dosiahnuté účinnosti po 240 minútach elektrochemickej oxidácie.

Elektróda	Soľ	Účinnosť [%]		
		IRBE	TELMi	VAL
sSi	NaCl	98,8	33,3	59,7
Si		99,1	98,1	63,5
3D		93,3	89,1	79,1
sSi	Na ₂ SO ₄	25,0	43,8	41,2
Si		70,6	61,4	31,0
3D		71,5	74,0	66,4

Pri konvenčnom biologickom čistení na ČOV sa štandardne dosahuje len čiastočné odbúrание sartanových liečiv [IRBE (0±25 %), TELMI (-7±18 %), VAL (93 %)]¹⁴. Hoci bola v našich experimentoch zaznamenaná nižšia účinnosť odstránenia VAL (79 %) v porovnaní s ČOV, pri odbúrání IRBE a TELMI na neštruktúrovanej BDDE v prostredí NaCl sa miera odbúrání blížila k 99%.

Dôležitou súčasťou zavedenia pokročilých oxidačných procesov do praxe je zhodnotenie bezpečnosti procesu z hľadiska novovznikajúcich degradačných produktov a posúdenie prínosov a rizík integrácie terciárneho čistenia. Uskutočnili sme HPLC-HRMS analýzy, ktorých cieľom bolo identifikovať degradačné produkty vznikajúce počas elektrochemickej oxidácie. S využitím prístupu necielenej analýzy a analýzy očakávaných bolo identifikovaných niekoľko degradačných produktov sartanov.

Záver

V práci bola porovnaná účinnosť elektrochemickej oxidácie vybraných liečiv zo skupiny sartanov na odlišných typoch BDD elektród. Sledovali sme vplyv prídavku NaCl resp. Na₂SO₄ do pracovného elektrolytu na účinnosť odstránenia vybraných sartanov. Výsledky preukázali, že najúčinnější eliminácia IRBE a TELMI (98-99 %) sa dosiahla pri použití BDDE nanesenej na neštruktúrovanom kremikovom substráte a v prípade VAL (79%) na poréznej keramike s NaCl. Podarilo sa nám dosiahnuť vyššiu účinnosť odstránenia IRBE a TELMI v porovnaní s postupmi zavedenými v rámci klasickej ČOV. Vďaka spojeniu technik HPLC-HRMS bolo umožnené získať potrebné dáta k tvorbe degradačných a transformačných produktov, na základe ktorých bola zostavená možná schéma elektrochemického odbúrání sartanových liečiv s využitím BDD elektród.

Acknowledgments

Predmetná práca vznikla za finančnej podpory Agentúry na podporu výskumu a vývoja (APVV-19-0250 a APVV-16-0124) a VEGA grantu 1/0554/20. Práca vznikla aj za finančnej podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky - projekt „CENAKVA“ (LM2018099).

References

1. Berkner S., Thierbach C.: *Environ Sci Pollut. Res.* 21, 9461 (2014).
2. Bodik I., Mackuľák T., Fáberová M., Ivanová L.: *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 21098 (2016).
3. Gurke R., Rossmann J., Schubert S., Sandmann T., Röbler M., Oertel R., Fauler J.: *J. Chromatogr B.* 990, 23 (2015).
4. Zhang H., Ihara O. M., Nakada N., Tanaka H., Ihara M.: *Environ. Sci. Technol.* 54, S(1), 1720 (2020).
5. Kosek K., Luczkiewicz A., Fudala-Książeka S., Jankowska K., Szopińska M., Svahn O., Tranckner J., Kaiser A., Langas V., Bjorklund E.: *Environ. Sci. Policy.* 112, 213 (2020).
6. Martínez-Pachón D., Espinosa-Barrera P., Rincón-Ortiz J., Moncayo-Lasso A.: *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 4426 (2019).
7. Mackuľák T., a kol. *Environmentálne vedy - výskyt a možnosti degradácie polutantov*. Bratislava: FCHPT STU, 2016.
8. Nidheesh V. P., Divyapriya G., Oturan N., Trelu C., Oturan A. M.: *ChemElectroChem* 6, 2124 (2019).
9. Cinková K., Švore I.: *Chem. Listy.* 109, 463 (2015).
10. Miklos D. B., Remy Ch., Jekel M., Linden K. G., Drewes J. E., Hubner U.: *Water Res.* 139, 118 (2018).
11. Fang C., Megharaj M., Naidu R.: *J. Adv. Oxid. Technol.* 20170014 (2017).
12. Pérez-Fernández V., Rocca M. L., Tomai P., Fanali S., Gentili A.: *Anal. Chim. Acta.* 983, 9 (2017).
13. Pourchet M., a 17 spoluautorov: *Environ Int.* 139, 105545 (2020).
14. Bourgin M., Beck B., Boehler M., Borowska E., Fleiner J., Sahli E., Teichler R., Von Gunten U., Siegrist H., Mc Ardell S., Ch.: *Water Res.* 129, 486 (2018).

Determination of Selected Drugs using 3D Printed Electrodes

Marta Choínska^{ab}, Vojtěch Hrdlička^a, and Tomáš Navrátil^a

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

^b 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

The main aim of this research was to develop a new method for voltammetric determination of popular antidepressants, analgesics, and illicit drugs using a laboratory-made 3D printed electrode and to compare the achieved results with those registered using a commercially available glassy carbon electrode. These experiments represent the first step in the development of a method applicable in clinical and forensic praxis for the rapid and inexpensive determination of commonly misused groups of biologically active compounds.

Key Words: Analgesics, Antidepressants, Biologically active compounds, Differential pulse voltammetry, Illicit drugs, 3D printing materials

Introduction

Biologically active compounds (BACs) are characterized as chemical compounds that affect important biological functions of living organisms. They can affect the environment and a wide spectrum of organisms: humans, animals, and plants¹⁻⁸. Antidepressants and painkillers are among the most frequently used active compounds of medicinal importance. However, they may be abused or misused, cause side effects, and can be either intentional or accidental overdose^{9,10}.

Another strictly controlled group is the group of illicit drugs. They have been used for their relaxing, psychotic, and hallucinogenic properties and many of them are related to the "subculture" of daily routine¹¹ and social interactions¹². Unfortunately, the use of illicit drugs or their mixtures can lead to health problems or even death¹³.

In the last years, a growing number of dangerous overdosing starts to be the global problem^{10,14}. Therefore, new methods of identification and determination of these drugs are necessary for patient monitoring as well as for forensic purposes. Moreover, the massive excretion of antidepressants, painkillers, or illicit drugs into wastewater or even into drink water (in the case of improper treatment) can be a danger for plants, animals, and finally for humans. Therefore, environmental monitoring is also important¹⁵.

3D printing materials offer many advantages for electrochemistry, and their popularity has been growing steadily. The designing and manufacturing processes are easy, fast, and relatively inexpensive. It allows preparing electrodes, cells, and even complicated reactors for special electrochemical applications. Moreover, the manufacturing process is precise and repeatable. In addition, the surfaces of the prepared electrodes can be modified and treated in many ways to improve their properties¹⁶⁻²⁰.

Our study focuses on the development of a new electrode made of 3D printing material applicable for the determination of selected BACs. We would like to design and construct an electrochemical sensor that can be characterized by fast, inexpensive, and easy production as

well as by reliability, selectivity, and repeatability of measurements realized in biological matrices.

Experimental

We decided to investigate three groups of BACs in our pilot experiments using the 3D printed electrode:

- 1) Antidepressants: sertraline (Asentra, KRKA, Slovakia) and venlafaxine (Velaxin, Egis Pharmaceuticals PLC, Hungary).
- 2) Analgesic: fentanyl (Lipomed, Switzerland).
- 3) Illicit drug: lysergic acid diethylamide (LSD, Lipomed, Switzerland).

Stock solutions of drugs were prepared in distilled water in the concentration: $c_{\text{venlafaxine}} = 1.8 \text{ mmol L}^{-1}$, $c_{\text{sertraline}} = 1.6 \text{ mmol L}^{-1}$, $c_{\text{fentanyl}} = 0.1 \text{ mmol L}^{-1}$, $c_{\text{LSD}} = 0.021 \text{ mmol L}^{-1}$.

Britton-Robinson buffer solutions were prepared in the range from pH 2 to pH 12, by mixing the proper amounts of the acidic components (0.04 M H_3BO_3 , 0.04 M H_3PO_4 , and 0.04 M CH_3COOH) and alkaline component (0.2 M NaOH), all Lachema, Czech Republic. The LSD stock solution was prepared by its dissolving in 0.1 M lithium perchlorate (Sigma Aldrich, USA). Deionized water from Milli-Q-Gradient (Millipore, Czech Republic, conductivity $< 0.05 \mu\text{S cm}^{-1}$) was used for all described measurements.

Our lab-made 3D printed electrode was performed from conductive carbon fiber PLA (CF-PLA) filament, brand name ProtoPasta (ProtoPlant, USA). A lab-made glassy carbon electrode (GCE, Ø 3mm) was used for comparison.

Results and Discussion

1. Optimization of used parameters

We decided to use differential pulse voltammetry (DPV) to determine the above-mentioned BACs. Firstly, the following parameters were optimized: pH of supporting electrolyte, accumulation time (t_{acc}), accumulation potential (E_{acc}), and electrode surface pretreatment (time (t_{treat}) and potential (E_{treat}) of the electrochemical pretreatment). Optimized parameters are summarized in Table I.

2. Determination of selected investigated compounds

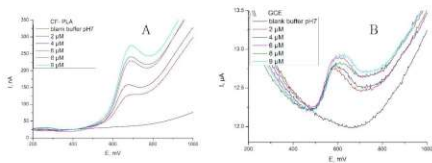
Pilot experiments were performed with model solutions of LSD, fentanyl, sertraline, and venlafaxine using parameters summarized in Table I. DPV was used to investigate the dependences of the registered signals on analyte concentrations.

Comparison of signals registered using CF-PLA and GCE showed that the LSD signals at CF-PLA are shifted by about +50 mV to more positive potential values compared to those obtained at GCE (Fig. 1). Similarly, the sertraline signals at CF-PLA are shifted by about +100 mV to more positive potential values compared to those at GCE. (Fig. 2). Similarly, this phenomenon was observed in the case of other BACs studied.

Table I.

Optimized parameters used for determination of selected BACs.

Analyte	Parameter	Glassy Carbon Electrode	Carbon-Fiber PLA electrode
	Pretreatment	Polished on alumina (GCE), 10x CV, $E_{ini} = -1200$ mV, $E_{fin} = +1400$ mV, $\nu = 100$ mV/s	Polished on sandpaper 400Q (CF-PLA), 10x CV, $E_{ini} = -1000$ mV, $E_{fin} = +1400$ mV, $\nu = 100$ mV/s
Venlafaxine	pH	8	8
	E_{acc}	100 mV	400 mV
	t_{acc}	300 s	60 s
	ν	20 mV s ⁻¹	20 mV s ⁻¹
Sertraline	pH	7	7
	E_{acc}	100 mV	400 mV
	t_{acc}	300 s	60 s
	ν	20 mV s ⁻¹	20 mV s ⁻¹
LSD	E_{acc}	7	7
	t_{acc}	100 mV	100 mV
	ν	300 s	300 s
	E_{acc}	20 mV s ⁻¹	20 mV s ⁻¹
Fentanyl	E_{acc}	9	9
	t_{acc}	400 mV	400 mV
	ν	60 s	60 s
	E_{acc}	20 mV s ⁻¹	20 mV s ⁻¹

**Fig. 1.** DP voltammograms registered in LSD solutions, LSD concentrations: 2–9 $\mu\text{mol L}^{-1}$, BRB of pH 7, used electrodes: (A) laboratory-made CF-PLA electrode and (B) GCE.

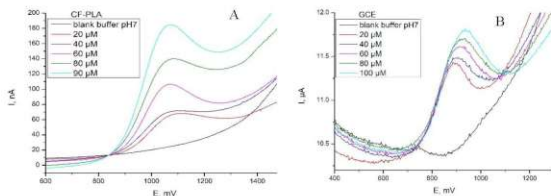


Fig. 2. DP voltammograms registered in sertraline solutions. Sertraline concentrations: 20–100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, BRB of pH7, Used electrodes: (A) laboratory-made CF-PLA electrode and (B) GCE.

Moreover, the background currents registered using the lab-made 3D printed electrode are lower and less noisy than those obtained using GCE. The registered signals were relatively well-developed and of similar shapes in the case of both electrodes. The linear dynamic ranges of concentration dependences registered using the CF-PLA electrode were a bit broader. Therefore, it can be supposed that the CF-PLA electrode can represent a promising tool for easy, fast, inexpensive, selective, and sensitive determination of drugs as well as other BACs.

Conclusion

Our research proved that 3D printing materials can be used as an attractive alternative material suitable for the construction of electrodes applicable for the determination of selected groups of BACs. Their utilization represents the new modern approach in the electrochemical investigation of compounds that play an important role in human life and need to be systematically monitored. Research in model samples is the first step to further development of the new, laboratory-made sensors for BACs.

Acknowledgments

The authors thank the project of Czech Science Foundation (GA ČR) No. 20-01589S, Specific University Research (SVV260560) (M.C.), and Grant Agency of the Charles University No. 373521 (M.C.) for financial support.

References

1. Cabalkova D., Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B.: *Chem. Listy* **103**, 236 (2009).
2. Barek J., Cabalkova D., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B.: *Environ. Chem. Lett.* **9**, 83 (2011).
3. Sebkova S., Navratil T., Kopanica M.: *Anal. Lett.* **38**, 1747 (2005).
4. Barek J., Dodova E., Navratil T., Yosypchuk B., Novotny L., Zima J.: *Electroanalysis* **15**, 1778 (2003).
5. Sebkova S., Navratil T., Kopanica M.: *Anal. Lett.* **36**, 2767 (2003).
6. Sebkova S., Navratil T., Kopanica M.: *Anal. Lett.* **37**, 603 (2004).
7. Navratil T., Kopanica M., Krista J.: *Chem. Anal.-Warsaw* **48**, 265 (2003).
8. Skopalova J., Navratil T.: *Chem. Anal.-Warsaw* **52**, 961 (2007).

9. Jones C. M., Guy G. P., Board A.: *Drug Alcohol Depend.* 219 (2021).
10. Weedn V. W., Zaney M. E., McCord B., Lurie I., Baker A.: *J. Forensic Sci.* (2021).
11. Brandt S. D., Kavanagh P. V., Westphal F., Stratford A., Odland A. U., Klein A. K., Dowling G., Dempster N. M., Wallach J., Passie T., Halberstadt A. L.: *Drug Test. Anal.* 12, 812 (2020).
12. Manthey J., Kilian C., Carr S., Bartak M., Bloomfield K., Braddick F., Gual A., Neufeld M., O'Donnell A., Petruzella B., Rogalewicz V., Rossow I., Schulte B., Rehm J.: *Subst. Abuse. Treatment Prev. Pol.* 16 (2021).
13. Pergolizzi J. V., Dahan A., LeQuang J. A., Raffa R. B.: *J. Clin. Pharm. Ther.* (2021).
14. Niles J. K., Gudin J., Radcliff J., Kaufman H. W.: *Popul. Health Manag.* 24, S43 (2021).
15. Tajik S., Beitollahi H., Dourandish Z., Zhang K. Q., Le Q. V., Nguyen T. P., Kim S. Y., Shokouhimehr M.: *Sensors-Basel* 20 (2020).
16. Escobar J. G., Vaneckova E., Lachmanova S. N., Vivaldi F., Heyda J., Kubista J., Shestivska V., Spanel P., Schwarzova-Peckova K., Rathousky J., Sebechlebska T., Kolivoska V.: *Electrochim. Acta* 360, 136984 (2020).
17. Hamzah H. H., Shafiee S. A., Abdalla A., Patel B. A.: *Electrochem. Commun.* 96, 27 (2018).
18. Choinska M., Hrdlicka V., Sestakova I., Navratil T.: *Monatsh. Chem.* 152, 35 (2021).
19. Vaneckova E., Bousa M., Lachmanova S. N., Rathousky J., Gal M., Sebechlebska T., Kolivoska V.: *J. Electroanal. Chem.* 857, 113745 (2020).
20. Vaneckova E., Bousa M., Sokolova R., Moreno-Garcia P., Broekmann P., Shestivska V., Rathousky J., Gal M., Sebechlebska T., Kolivoska V.: *J. Electroanal. Chem.* 858, 113763 (2020).

**Simultaneous Determination of the Plant Growth Regulator Daminozide and its
Degradation Product 1,1-Dimethylhydrazine
(Simultánní stanovení rostlinného regulátoru růstu daminozidu a jeho rozkladného
produktu 1,1-dimethylhydrazinu)**

Jaromíra Chýlková^a, Alona Usenko^a, Renáta Šešelsková^a, Jiří Váňa^b, Miloš Sedlák^b, and
Jan Bartáček^b

^aInstitute of Environmental and Chemical Engineering, Faculty of Chemical Technology,
University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail:
jaromira.chyilkova@upce.cz

^bInstitute of Organic Chemistry and Technology, Faculty of Chemical Technology,
University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic

Abstract

The simultaneous determination of daminozide and its degradation product 1,1-dimethylhydrazine via their direct electrochemical oxidation was investigated. A boron doped diamond electrode was used as the working electrode and Britton-Robinson buffer of pH 9 was applied as the suitable supporting electrolyte. The differential pulse voltammetric method for DMZ determination was developed, which provided a very low detection limit (LOD = 4.56×10^{-7} mol L⁻¹). DMH could also be determined under the same experimental conditions (LOD = 2.16×10^{-7} mol L⁻¹). The developed new extraction technique then allowed the determination of concentrations up to 50 times lower.

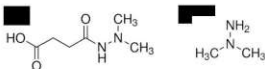
Key Words: Plant growth regulator, Daminozide, 1,1-dimethylhydrazine, Voltammetry, Boron doped diamond electrode.

Úvod

Při pěstování ovoce, zeleniny, popřípadě okrasných rostlin se často aplikují látky, které mají za cíl snížit ztráty produkce, zvyšovat její kvalitu a prodloužit potřebnou jakost a trvanlivost těchto komodit po sklizni¹. Mezi takové látky patří daminozid (DMZ, 4-(2,2-dimethylhydrazinyl)-4-oxobutanová kyselina, Obr. 1A), který je jedním z nejdéle používaných regulátorů růstu.

V řadě zemí, mezi něž patří i Česká republika, se DMZ aplikuje výhradně k formování kompaktního tvaru okrasných rostlin, ke zvýšení počtu jejich květů a také k usnadnění opylení semenářských porostů jetele červeného. Využívá se ve formě postřiku na listy. V rostlinách blokuje biosyntézu růstových hormonů gibberelinů. Ošetřené rostliny vytváří menší kompaktnější buňky, čímž se zkracují internodia a rostliny jsou menší a kompaktnější. Zároveň roste počet buněk na plochu rostlin, což vede ke zvýšení koncentrace chlorofylu a rostliny jsou tmavší. Vlivem DMZ mají rostliny také více rozvětvený kořenový systém, takže lépe využívají vodu a živiny a jsou odolnější proti stresu. Od roku 1963 se používá také pro zlepšení sklizně ovocných stromů (zejména jabloní) nebo zeleniny (např. rajčat). DMZ 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 jabloní podporuje růst květů, předchází předčasnému opadávání plodů a zlepšuje velikost, barvu a skladovací vlastnosti jablek^{2,4}. Bylo potvrzeno, že rezidua DMZ mohou být v jablkách detekována až rok po jeho aplikaci⁵.

Během tepelného zpracování se v jablečných produktech objevuje degradační produkt DMZ, konkrétně 1,1-dimethylhydrazin (DMH, Obr. 1B)⁶, který je nebezpečný z hlediska lidského zdraví. Vzhledem k jeho toxicitě byl stejně jako DMZ klasifikován jako pravděpodobný lidský karcinogen (třída B2, EPA)⁷.



Obr. 1. Strukturní vzorce daminozidu (A), (B) 1,1-dimethylhydrazinu

Ke stanovení DMZ, popřípadě jeho hydrolytického produktu, se převážně využívá kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí⁸⁻¹¹. Tento přístup je však velmi nákladný a vyžaduje kvalifikovanou obsluhu. Tato práce řeší možnost přímého voltametrického stanovení daminozidu pomocí anodické oxidace na BDDE. Zároveň je zde uvedeno i stanovení jeho degradačního produktu DMH a analýza směsi těchto dvou látek.

Experimentální část

Ke stanovení výše diskutovaných látek byl využíván potenciostat PGSTAT 128N (AUTOLAB, Metrohm Autolab B.V., Utrecht, The Netherlands) ovládaný softwarem NOVA 1.11. Měřicí článek se skládal s pracovní BDDE (Windsor Scientific Ltd., Velká Británie), referenční argentchloridové elektrody a pomocné platinové elektrody (obě Monokrystaly, Turnov, Česká republika). Stanovení studovaných látek probíhalo pomocí elektrochemické oxidace s využitím diferenční pulzní voltametrie (DPV). Pracovní elektroda byla před každým měřením ošetřena vložením potenciálů +2200 mV, -200 mV a +2200 mV vždy po dobu 10 sekund. Při vlastní analýze byla polarizována v rozsahu potenciálů +500 až +2100 mV při rychlosti polarizace 40 mV s⁻¹.

V případě analýzy směsi DMZ a DMH, kdy se rozkladný produkt nachází ve značném nadbytku, je třeba tuto látku eliminovat několikaminutovým povařením směsi v prostředí roztoku NaOH (1 mol L⁻¹).

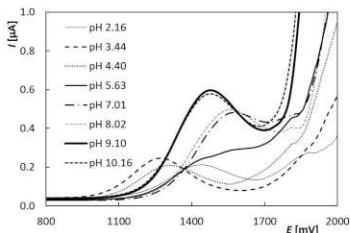
Reálný přípravek rostlinného stimulantu B-NINE, s obsahem DMZ deklarovaným výrobcem 850 g/1000 g preparátu, byl rozpuštěn ve 25 ml destilované vody v množství 58,1 mg. K analýze bylo dávkováno 100 µl tohoto roztoku. Z říční vody, která byla obohacena definovaným množstvím DMZ a která byla zbavena kationtů 50 mg KIII za míchání po dobu 10 min, byl analyt izolován z objemu 250 ml pomocí 1 g katexu Amberlite® IRC120 H v H⁺ cyklu. Záchyt probíhal při laboratorní teplotě 1 hodinu za míchání rychlostí 700 ot/min. Poté byl ionex separován a následně extrahován 5 ml 1 mol L⁻¹ NaOH při teplotě 70 °C za míchání 500 ot/min po dobu 20 min. Vzniklý roztok byl podroben voltametrické analýze. Stejný postup lze užít i pro nakoncentrování DMZ ze vzorku získaného oplachem ovoce.

Při zpracování reálných vzorků vod byl k izolaci a nakoncentrování DMH z vodných roztoků zvolen rovněž katex Amberlite® IRC120 H v H⁺ cyklu. V případě zpracování 250 ml vody trvala adsorpce 30 min. Po separaci ionexu byl analyt vytěsněn ve statickém uspořádání 10 ml 2 mol L⁻¹ NaOH za míchání po dobu 8 min při laboratorní teplotě.

Výsledky a diskuse

Z cyklické voltametrie roztoku DMZ v prostředí Brittonova-Robinsonova (BR) pufru o pH 9.0 vyplynulo, že látka poskytuje dvě anodické vlny v rozsahu potenciálů +1.2 až +1.68 a +1.9 až +2.08 V. Oxidační proces je ireversibilní. Ze studie vlivu pH základního elektrolytu vyplynulo, že nejvyšší citlivosti bylo dosaženo okolo hodnot pH 9-10. Zde se nachází maximum prvního píku DMZ u potenciálu +1.5 V. Druhý pík DMZ, se superponuje na křivku základního

elektrolytu a se zvyšujícím se pH se stává zřetelnější. Na základě zjištěných skutečností byl k analytickým účelům vybrán I. pík (Obr. 2) a hodnota pH 9.



Obr. 2. DP voltamogramy DMZ pro různé hodnoty pH základního elektrolytu ($c_{DMZ} = 8,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, elektrolyt – BR pufr (pH 2,16-10,16), $E_{poč} = +800 \text{ mV}$, $E_{kon} = +2200 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$, amplituda pulzu = +50 mV, šířka pulzu 80 ms).

Ve zvoleném základním elektrolytu dává stabilní proudovou odezvu jak DMZ, tak DMH, což dokumentuje Obr. 3. Kvantitativní stanovení DMH lze provádět přímo ze záznamu, píky DMZ jsou však předešlou látkou deformovány, a proto je třeba rušivou složku po jejím stanovení vytěsnit z roztoku krátkým varem po zalkalizování směsi.

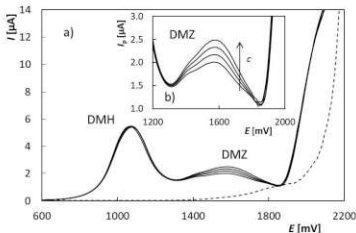
Vypracovaná metoda voltametrického stanovení DMZ byla aplikována na tři typy reálných vzorků, kdy byl analyzován komerční přípravek na ochranu rostlin B-NINE[®]-SG, oplachová voda z jablek a povrchová voda z řeky Chrudimky, obě obohacené přídatkem standardního roztoku DMZ na známou koncentraci. Doprovodná látka DMH byla stanovována v oplachové vodě z jablek opět po přidavku známého množství analytu. Výsledky byly kvantitativně vyhodnoceny metodou standardního přídatku a jsou uvedeny v tabulce I. Je zřejmé, že v oboru analyzovaných koncentrací jsou výsledky dostatečně spolehlivé a správné, a tedy lze metodu využít v praxi.

Tabulka I

Výsledky stanovení obsahu DMZ a DMH v reálných vzorcích

Specifikace vzorku	Stanovováno DMZ	Stanoveno DMZ
Přípravek B-NINE [®] -SG	850* mg/kg	826.35±30,77 mg/kg
Říční voda	$4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$(4,2 \pm 0,21) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
Oplachová voda	$2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$(1,9 \pm 0,08) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
	Stanovováno DMH	Stanoveno DMH
Oplachová voda	$1,96 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$(1,93 \pm 0,05) \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

*deklarovaná hodnota



Obr. 3. DP voltamogramy při stanovení DMZ v přítomnosti nadbytku DMH (směs: $c_{DMH} = 5,56 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c_{DMZ} = 2,08 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, přídavky DMZ: $3,33 \mu\text{g mL}^{-1}$, elektrolyt – BR pufr (pH 9,1), $E_{\text{poč}} = +500 \text{ mV}$, $E_{\text{kon}} = +2200 \text{ mV}$, $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$, amplituda pulzu = $+50 \text{ mV}$, šířka pulzu 80 ms).

Závěr

V rámci této práce se podařilo vyvinout metodu přímého voltametrického stanovení směsi daminozidu a jeho rozkladného produktu 1,1-dimethylhydrazinu. Byla použita metoda DPV a jako indikační sloužila borem dopovaný diamantová elektroda. Základním elektrolytem byl Brittonův-Robinsonův pufr o pH 9. Byl také vypracován izolační a koncentrační postup pro oba analyty ze zředěných roztoků s využitím silně kyselého katexu Amberlite® IRC120 H. Nová metoda je využitelná v praxi pro analýzu reálných vzorků.

Acknowledgments

This work was supported by the grant project of The Czech Science Foundation (project No. 20-01589S), and by The University of Pardubice (projects No. SGSFChT_2021_003).

References

1. Al-Nasir F.M., Jiries A.G., Al-Rabadi G.J., Alu'datt M. H., Tranchant C.C., Al-Dalain S.A., Alrabadi N., Madanat O.Y., Al-Dmour R.S.: *LWT* *123*, 109005 (2020).
2. Fan A.M., Jackson R.J.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* *9*, 158 (1989).
3. Brinkman J.H.W., van Dijk A.G., Wagenaar R., Quirijns J.K.: *J. Chromatogr. A* *723*, 355 (1996).
4. Mol H.G.J., van Dam R.C.J., Vreeken R.J., Steijger O.M.: *J. Chromatogr. A* *833*, 53 (1999).
5. Drake S.R., Eisele T.A., Baranowski J.D.: *J. Food Saf.* *11*, 247 (1991).
6. Newsome W.H.: *J. Agric. Food Chem.* *28*, 319 (1980).
7. Pohanish R.P.: *Sittigs Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*, 7th Edition, vol. 1: A-D, William Andrew: Applied Science Publishers (2017).
8. Zhao X., Mu Y., Yang M.: *Chemosphere* *207*, 329 (2018).
9. Danezis G.P., Anagnostopoulos C.J., Liapis K., Koupparis M.A.: *Anal. Chim. Acta* *942*, 121 (2016).
10. Picó Y., Font G., Moltó J.C., Manés J.: *J. Chromatogr. A* *882*, 153 (2000).
11. Atapattu S.N., Johnson K.R.D.: *J. Chromatogr. A* *1612*, 460656 (2020).

Electrochemical Behaviour of β -Carotene at Different Working Electrodes

Granit Jashari, Milan Sýs, Tomáš Mikysek, 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

This work has been focused on clarification of the electrochemical behaviour of β -carotene (BCA) in different non-aqueous media at conventional solid working electrodes; namely, glassy carbon, platinum, and gold electrode. A probable reaction pathway of the electrochemical oxidation BCA was proposed. BCA undergoes an irreversible electrochemical oxidation in several steps corresponding to anodic hydroxylation and oxidation reactions of double bonds. According to the calculation of molecular electron density, it can be assumed that a double bond on the fifteenth carbon (C15) is involved in the mentioned processes, having provided the first anodic peak applicable to analytical purposes.

Key Words: Acetonitrile; Acetone; Cyclic voltammetry; β -Carotene; Methyl-tert-butyl ether; Toluene.

Introduction

The β -Carotene (BCA), known as the most biologically active carotenoid, generally occurs in plants, algae, and few fungi. Being a precursor of vitamin A (all-trans-retinol), BCA is considered to be its dominant source in the human diet. BCA has an important role in the limitation of toxic radicals (protection of tissues from damage) including reactive oxygen species (singlet oxygen and oxygen free radicals)¹⁻⁴. Consequently, one cannot be wondered that BCA and other carotenoids have become a fascinating field for the interdisciplinary research in chemistry, biochemistry, medicine, biology, and other branches of science⁵⁻⁷. These important nutrients are soluble in fats and are responsible for the colour of a wide variety of foods⁸. BCA represents a natural organic dye that consists of a polyene system with 11 conjugated double bonds and a β -ring at each end of the chain^{9,10}. The characteristic conjugated double-bond system of BCA and other carotenoids offers some suitable properties; among others, absorption at the violet end of the visible spectrum and electrochemical activity⁵⁻⁷.

Despite several earlier scientific studies focused on BCA cathodic voltammetric determination at a mercury electrode^{11,12}, recent voltammetric methods are based on the anodic oxidation of BCA at common solid electrodes in various media. From recent publications, it seems that the main attention is paid to the analytical characterization for the determination of BCA with differently modified glassy carbon electrodes¹³⁻¹⁵. However, only a few papers had been dealing with the study of BCA and its electrode oxidation pathway(s). This motivated us to investigate the electrochemical behaviour of BCA in more detail with a hope that the results obtained could help us to confirm or reject the previously proposed reaction scheme(s).

Experimental

The analytical standard of BCA, 99.99% lithium perchlorate and 99.9% acetonitrile (MeCN) as the constituents of the supporting electrolyte were purchased from Merck KGaA (Germany). Other organic solvents, such as 99.9% acetone, 99.9% methyl-tert-butyl ether (MTBE), and 99.7% toluene, were obtained from Lach-Ner (Czech Republic). Pure MeCN, a mixture of MeCN + toluene (1:1), mixture MeCN + MTBE (1:1), and pure acetone containing 0.1 mol L⁻¹ LiClO₄ were used as the working media.

All electrochemical measurements were performed with a conventional three-electrode system consisting one of the working electrodes employed or tested (glassy carbon electrode, GCE; gold electrode, AuE; and Pt-electrode, PtE; all three with a disc diameter of 3 mm (Metrohm Česká republika s.r.o., Czech Republic). The voltammetric glass was then completed with saturated calomel electrode (SCE) as the reference and a Pt-plate as the counter electrode. All the electrodes were connected to a potentiostat PGSTAT101 operated via the Nova software (version 1.11) from already mentioned Metrohm company.

Results and discussion

Electrochemical behaviour of β -carotene

The electrochemical oxidation of BCA was investigated at the GCE in acetone containing $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ using cyclic voltammetry (CV), as shown in Fig. 1, capturing repetitive cycling. At first glance, it is evident that the BCA is most likely irreversibly oxidized, which has already been reported¹¹. The BCA usually provides two anodic peaks at +0.50 and +0.85 V regardless of the choice of organic solvent. Since the second peak is quite broad and deformed, it is highly probable that this signal is a "combined" peak hiding several oxidation signals merged together.

In general, electrochemically controlled polymerization reaction is manifested by an increase in the baseline due to the enhanced capacity current. The repetitive CV (see again Fig. 1) showed that no change in cyclic voltammograms shape and only negligible baseline currents. Hence, the polymerization reactions of β -carotene oxidation products do not seem the case. From chemical point of view, the BCA can be considered as chain of eleven conjugated double bonds. Because its molecular structure does not contain any functional groups that could participate in the electrode reaction, it can be assumed that the radical oxidation of some of the double bonds has led to the formation of a cation radical¹⁶. If the organic solvents are not completely water-free, even traces of wetness may be involved in the nucleophilic addition of the resulting cation (as a hydroxylation reaction¹⁴). According to the calculation of molecular electron density, it can be assumed that a double bond on the fifteenth carbon (C15) is probably involved in the mentioned processes.

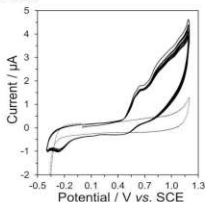


Fig. 1. Repetitive cyclic voltammograms (3 cycles) of $0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (dash line) BCA, (10 cycles) of $180 \mu\text{mol L}^{-1}$ BCA (solid line), in acetone with $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ recorded at the GCE at scan rate of 50 mV s^{-1} .

Kinetic study

In this part of our study, cyclic voltammograms of $186 \mu\text{mol L}^{-1}$ BCA at the GCE in four different working media (Fig. 2) at a scan rate (v) from 25 to 500 mV s^{-1} were recorded to find out the type of studied electrode reaction. For this purpose, a dependence of peak current response of the first oxidation peak upon the scan rate was evaluated and a linear relation of the peak height (I_p^3) versus square root of scan rate ($v^{1/2}$) was ascertained for all organic solvents used characterized by the correlation coefficients (R^2) of 0.9912, 0.9957, 0.9929, and 0.9879 for MeCN, MeCN with MTBE (1:1), MeCN with toluene (1:1), and acetone, respectively. From the individual linear plots of $\log I_p$ vs $\log v$, we could calculate the slopes (k) being as follows: 0.7537, 0.4878, 0.4581, and $0.5024 \mu\text{A mV}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$ (in the same order as for R^2 listed above). Values of calculated slopes, which are close to the theoretical value 0.500, indicate diffusion-controlled electrochemical oxidation reaction.

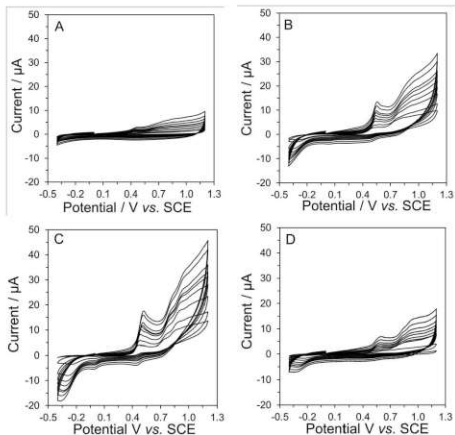


Fig. 2. Cyclic voltammograms of $180 \mu\text{mol L}^{-1}$ BCA recorded on the GCE in MeCN (A), MeCN with MTBE (1:1) (B), MeCN with toluene (1:1) (C), and acetone (D) all containing $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ at scan rates of 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 and 500 mV s^{-1} .

Effect of the electrode material

Three different types of electrode materials (glassy carbon, gold, and platinum) were tested to choose the optimum for intended electroanalytical purposes. It was evident that the highest current yield could be recorded at the GCE if one compares this response with those at the other two working electrodes. At scan rates higher than 150 mV s^{-1} , two separated oxidation peaks at $+0.60$ and $+0.85 \text{ V}$ were obtained at AuE in acetone containing $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ LiClO}_4$. Broad — apparently overlapped — oxidation peak was observed for PtE.

Conclusion

This paper has described electrochemical oxidations of β -carotene at three different working electrodes in selected organic solvents and their mixtures. The results obtained suggest us that the respective electrode process represents sequential irreversible reactions involving anodic hydroxylation and oxidation of double bonds, where the π -bond on the fifteenth carbon (C15) is more easily attacked in oxidation process, thus providing the first anodic peak applicable to analytical purposes.

Acknowledgments

Financial support from the Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice (project No. SGS-2021-001) is gratefully acknowledged.

References

1. Zakyntinos G., Varzakas T.: *Curr. Res. Nutr. Food Sci.* **4**, 38 (2016).
2. Del Campo J.A., Garcia-González M., Guerrero M.G.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 1163 (2007).
3. Gamage-Chandrika U.: (Eds.), John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, p. 221 (2009).
4. Lin C.H., Chen B.H.: *J. Chromatogr. A* **1012**, 103 (2003).
5. Careri M., Furlattini L., Mangia A., Musci M., Anklam E., Theobald A., von Holst C.: *J. Chromatogr. A* **912**, 61 (2001).
6. Mueller L., Boehm V.: *Molecules* **16**, 1055 (2011).
7. Steenson D.F., Min D.B.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **77**, 1153 (2000).
8. Amorim-Carrilho K.T., Cepeda A., Fente C., Regal P.: *Trac-Trend. Anal. Chem.* **56**, 49 (2014).
9. Chen L., Bai G., Yang R., Zang J., Zhou T., Zhao G.: *Food Chem.* **149**, 307 (2014).
10. Knockaert G., Pulissery S.K., Lemmens L., Buggenhout S.V., Hendrickx M., Loey A.V.: *J. Agric. Food Chem.* **60**, 10312 (2012).
11. Takahashi R., Tachi I.: *Agric. Biol. Chem.* **26**, 771 (1962).
12. Mairanovsky V.G., Engovatov A.A., Ioffe N.T., Samokhvalov G.I.: *J. Electroanal. Chem.* **66**, 123 (1975).
13. Masek A., Chrzescijanska E., Diakowska K., Zaborski M.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **10**, 3372 (2015).
14. Čížmek L., Komorsky-Lovrić Š.: *Electroanalysis* **31**, 83 (2019).
15. Ziyatdinova G., Ziganshina E., Budnikov H.: *Talanta* **99**, 1024 (2012).
16. Shono T., Kashimura S., Kise N.: *PATAI's Chemistry of Functional Groups* (2009).

The Development of Electroanalytical Methods for Detection of Bile Acids Possessing 7 α Hydroxyl Group
(Vývoj elektroanalytických metod pro detekci žlučových kyselin obsahujících 7 α hydroxylovou skupinu)

Kristýna Jelsíková, Jan Klouda, and Karolina Schwarzová-Pecková
Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO
Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, CZ-128 43 Prague 2, Czech
Republic, E-mail: kristyna.jelsikova@natur.cuni.cz

Abstract

The electrochemical behaviour of selected primary bile acids (cholic acid, chenodeoxycholic acid and α -muricholic acid) in acetonitrile–perchloric acid media with minimal water content was studied using cyclic voltammetry. They possess 7 α hydroxyl group on the steroid core and provide an anodic voltammetric signal. However, in this study conditions necessary for the formation of the cathodic signal of these bile acids possessing 7 α hydroxyl group in the region of negative potentials were studied. It has been recognized that signal development is dependent on the presence of oxygen in the measured solution and the value of positive potential applied prior the cathodic scan leading to bile acid oxidation. The study was performed on a boron doped diamond electrode.

Key Words: Bile acids, Boron-doped diamond electrode, Dehydration, Oxidation, Reduction, Cyclic voltammetry.

Úvod

Základem struktury žlučových kyselin je steroidní jádro, které je nasycené, a tudíž elektrochemicky neaktivní. Elektrochemická aktivita žlučových kyselin tak závisí na dvojných vazbách přítomných v této steroidní struktuře a také na přítomných funkčních skupinách¹. Právě z důvodu jejich nízké elektrochemické aktivity neexistuje v dnešní době mnoho publikací, které by se touto problematikou zabývaly. Elektrochemické oxidaci žlučových kyselin se ve své práci věnoval Klouda *et al.*². Redukce žlučových kyselin byly zkoumány na rtuťové kapající elektrodě pomocí diferenční pulsní polarografie³, na elektrodě ze skelného uhlíku a elektrodě ze skelného uhlíku modifikované mnohostěnnými uhlíkovými nanotrubičkami⁴. Samotnému analytickému stanovení žlučových kyselin za využití elektrochemických metod se věnuje jen několik málo studií. V studiích, kde byla jako pracovní elektroda použita zlatá elektroda, probíhala analýza žlučových kyselin pomocí propojení HPLC a pulsní amperometrické detekce. Použity byly v obou studiích tři pulsy $E_1 = +0,03$ V, $E_2 = +0,60$ V a $E_3 = -0,80$ V ($LOD = 0,6 \mu\text{mol l}^{-1}$)⁵, resp. $E_1 = +0,05$ V, $E_2 = +0,60$ V a $E_3 = -0,60$ V ($LOD = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$)⁶. Další studie se věnovala stanovení ursodeoxycholové kyseliny ve farmaceutických preparátech. Stanovení probíhalo propojením HPLC s UV detekcí a elektrochemickým detektorem (coulometrická cela), který tvořily dvě grafitové porézní elektrody v in-line zapojení, ty pracovaly při +0,60 V a +1,40 V⁷. Novým přístupem je elektrochemická oxidace žlučových kyselin po chemické aktivaci^{1,2,8}. Po použití dehydratačního kroku oxidací je možné detegovat cholovou a chenodeoxycholovou kyselinu (po extrakci na pevné fázi) v umělém séru ($LOD = 80 \mu\text{mol l}^{-1}$)⁸.

Experimentální část

Studovanými žlučovými kyselinami byly cholová, chenodeoxycholová a α -muricholová kyselina (všechny od Sigma–Aldrich). Dalšími použitými chemikáliemi byl acetonitril pro HPLC (Sigma–Aldrich), 70% kyselina chloristá (Lach–Ner, Neratovice, ČR) a alumina

o velikosti částic 0,5 μm (Elektrochemické detektory, Turnov). Všechny chemikálie byly analytické čistoty.

Měření byla prováděna metodou cyklické voltametrie (CV). K měření byl používán potenciostat Autolab se softwarem Nova 1.1/2.0/2.1.3. Používáno bylo tříelektrodové zapojení. Jako pracovní elektroda byla používána borem dopovaná diamantová elektroda o průměru 3 mm (Windsor Scientific, Slough, Velká Británie). Referenční elektrodou byla Pleskovova nevodná elektroda (stříbrný drátek v roztoku $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3$ v $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$ v acetonitrilu). Jako pomocná elektroda byl použit platinový drátek. Rychlost polarizace pracovní elektrody byla $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$. Před každým měřením byl povrch BDD elektrody leštěn suspenzí aluminu s destilovanou vodou po dobu 15 s.

Výsledky a diskuse

Tato studie se zabývala vznikem odezvy vybraných žlučových kyselin v oblasti záporných potenciálů. Vybranými žlučovými kyselinami byly cholová, chenodeoxycholová a α -muricholová kyselina, všechny obsahují 7 α hydroxylovou skupinu na steroidním skeletu, který v prostředí acetonitril – kyselina chloristá podléhá dehydrataci⁸. Byly studovány dvě podmínky vzniku katodické odezvy. Při studiu vlivu vloženého kladného potenciálu na odezvu žlučových kyselin v oblasti záporných potenciálů, bylo zjištěno, že pro vznik odezvy není dostatečné, pokud proběhne pouze elektrochemická oxidace žlučové kyseliny, potažmo jejího dehydratačního produktu, jak je zřejmé z Obr. 1A. Pokud byl maximální potenciál dosažený v anodickém skenu CV vyšší než potenciál oxidace žlučové kyseliny, avšak stále v oblasti potenciálového okna BDD elektrody (+1.5 V), nebylo možné pozorovat žádnou katodickou odezvu. Ta vznikala až tehdy, pokud bylo při anodickém skenu CV dosaženo vysokého kladného potenciálu *ca* +2,0 V. Při tomto potenciálu dochází na BDD elektrodě k rozkladu vody (rovnice 1)⁹. Na povrchu BDD elektrody vznikají HO^\bullet radikály, díky kterým zřejmě vznikají oxidační produkty žlučových kyselin, které je následně možné redukovat.

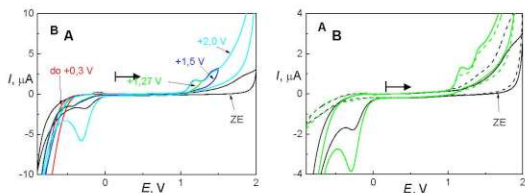


Při studiu vlivu přítomnosti kyslíku na vývoj signálu (Obr. 1B) bylo zjištěno, že pokud byl kyslík z měřeného roztoku odstraněn, není možné pro cholovou a α -muricholovou kyselinu pozorovat žádnou odezvu v oblasti záporných potenciálů. U chenodeoxycholové kyseliny docházelo k vývoji signálu i v případě, že byl kyslík z roztoku odstraněn, ale jeho výška byla rovna *ca* 14 % výšky píku, který byl pozorován v přítomnosti kyslíku. Je možné, že zde probíhá podobný mechanismus, který byl již popsán pro doxorubicin¹⁰. V této studii docházelo k redukci chinonu přítomného ve struktuře doxorubicinu na hydrochinon. Tento hydrochinon byl pak zpětně regenerován kyslíkem přítomným v roztoku. U žlučových kyselin by podobným mechanismem mohla probíhat redukce produktu elektrochemické oxidace těchto kyselin (např. diketon), který by byl redukován na dihydroxy derivát. Ten by byl zpětně regenerován kyslíkem.

Závěr

Předmětem studia tohoto projektu bylo elektrochemické chování vybraných žlučových kyselin: cholové, chenodeoxycholové a α -muricholové kyseliny v prostředí acetonitrilu a kyseliny chloristé s minimálním obsahem vody. Byly studovány podmínky vzniku odezvy těchto žlučových kyselin v oblasti záporných potenciálů. Měření probíhala na BDD elektrodě. Bylo zjištěno, že pro vznik odezvy v oblasti záporných potenciálů není dostatečná pouze oxidace žlučové kyseliny, ale je nutné vložení vysokého napětí +2,0 V, při kterém dochází na BDD elektrodě k rozkladu vody a tvorbě HO^\bullet radikálů. Dále z provedených měření vyplynulo, že

pro vznik redukčního signálu je důležitá přítomnost kyslíku v měřeném roztoku. Dalším předmětem studia bude objasnění mechanismu vzniku pozorovaných katodických signálů a jejich využití v elektroanalytických metodách pro detekci studovaných zlučových kyselin.



Obr. 1. Cyklické voltamogramy chenodeoxycholové kyseliny ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v prostředí kyseliny chloristé ($c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$) a acetonitrilu (obsah vody 0,43 %) na BDD elektrodě. A) Vliv vloženého kladného napětí (bod obratu CV křivky) na vývoj katodického signálu kyseliny chenodeoxycholové. B) Vliv přítomnosti kyslíku: roztok, ve kterém je přítomen kyslík, je znázorněn plnou čarou, roztok, ve kterém kyslík přítomen není, je znázorněn přerušovanou čarou.

Acknowledgments

This research was supported by the Czech Science Foundation (project 19-11268S), the Specific University Research (SVV260560) and the Grant Agency of Charles University (project GAUK 362621).

References

1. Klouda J., Barek J., Nesmerak K., Schwarzova-Peckova K.: *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **47**, 384 (2017).
2. Klouda J., Barek J., Kočovský P., Herl T., Matisyk F.-M., Nesměrāk K., Schwarzová-Pecková K.: *Electrochem. Commun.*, **86**, 99 (2018).
3. Ferri T., Campanella L., Deangelis G.: *Analyst*, **109**, 923 (1984).
4. Liu X., Wang L., Zhang S., Deng X., Tang X., Huang X.: *Electroanalysis*, **18**, 2385 (2006).
5. Dekker R., Vandermeer R., Olieman C.: *Chromatographia*, **31**, 549 (1991).
6. Chaplin M.: *J. Chromatogr. B-Biomed. Appl.*, **664**, 431 (1995).
7. Scalfia S., Tirendi S., Pazzi P., Bousquet E.: *Int. J. Pharm.*, **115**, 249 (1995).
8. Klouda J., Nesměrāk K., Kočovský P., Barek J., Schwarzová-Pecková K.: *Bioelectrochemistry*, **134**, 107539 (2020).
9. Enache T.A., Chiorcea-Paquim A.-M., Fatibello-Filho O., Oliveira-Brett A.M.: *Electrochem. Commun.*, **11**, 1342 (2009).
10. Vacek J., Havran L., Fojta M.: *Electroanalysis*, **21**, 2139 (2009).

Protein Interactors of *Arabidopsis thaliana* Telomerase RNA

Leon Jenner, Dzmityr Pruchkouski, and Eva Sýkorová

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

Abstract

Telomerases are ribonucleoproteins that moderate the loss of chromosome ends during cell replication. They are part of a multi-protein cellular machinery that is highly variant between organisms. In particular, plant telomerases are poorly-characterised in comparison to those of humans and yeast. The RNA subunit of *Arabidopsis thaliana* telomerase was recently identified allowing the search for protein interactors to begin. The classical EMSA method was used to screen *A.thaliana* candidate proteins as a first step towards developing more sensitive and informative methods such as the perturbation of the native electrochemistry of RNA bases.

Key Words: Telomerase, Telomere, RNA-protein interactions.

Introduction

The ends of linear chromosomes in eukaryotes are capped by specific repetitive nucleotide sequences called telomeres that are part of the cellular machinery that controls cell senescence. Telomerase is a ribonucleoprotein that replaces nucleotides lost during replication in cells where it is active and consists of a protein subunit TERT (telomerase reverse transcriptase) and a RNA subunit (TR). Telomerase transiently associates with many proteins that ensure transport of its subunits and correct assembly of the catalytically active complex when required. This process is not conserved and substantially differs between model organisms^{1,2}. Much work has gone into the characterisation of human and yeast telomerase³ but much less is known about plant telomerases which show considerable variation between species⁴. *A.thaliana* telomerase AtTERT has been known for two decades⁵, but the RNA subunit of *Arabidopsis thaliana* was mis-identified adding considerable confusion to an already complex problem. Now the true AtTR subunit has been identified⁴ allowing work to start on identifying the proteins that interact with it. A classic *in vitro* methodology to identify protein-RNA interactions is using electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) which have already been used to identify dyskerin as an AtTR interactor⁶. Once this traditional technique has identified proteins of interest and clear positive interactions, more informative techniques can be used to explore these interactions further to ascertain their biological relevance. One potential route might be to examine if there is any clear change in the electrochemical signals of RNA bases on pyrolytic graphite or mercury electrodes⁷ in the presence or absence of prospective binding proteins.

Methods

Protein-encoding sequences were introduced into pDEST 15 vectors using the gateway cloning method (Invitrogen). These vectors introduce a glutathione synthase transferase (GST) fusion to the resulting protein, increasing mass and therefore the shift possible in later EMSAs and also improve protein solubility. Plasmid vectors were then transformed into *Escherichia coli* BL 21 pLys S and successful transformations were selected for by Ampicillin and

Chloramphenicol resistance and grown in antibiotic-infused LB at 37 °C with 180 rpm shaking to an OD₆₀₀ ≈ 1 before induction with 1 mM isopropylthio-β-galactoside. After a further 3 hours in the same conditions, cell cultures were harvested by centrifugation and frozen at -80 °C until needed. Frozen pellets were resuspended in 2 mL of 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.2% polyethyleneimine pH 8 with wide-spectrum EDTA-free protease inhibitors (Roche). This resuspension was then lysed by sonication and clarified by centrifugation at 20000g for 10 minutes. Soluble cell extracts were then bound to centrifugal GST columns (Cytiva) and protein was eluted with 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 80 mM glutathione and frozen at -80 °C until needed.

AtTR was synthesised using a plasmid-encoded DNA sequence using PCR amplification to produce a complementary DNA template which was transcribed using a T7 RNA polymerase kit (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions. This RNA transcript was then purified using SPRI magnetic beads according to the manufacturer's protocol, eluted in water and frozen at -80 °C until needed.

Samples were prepared for EMSAs by incubating 0.2 μM AtTR with the desired protein in 18 μL binding buffer for 30 minutes on ice. Samples then had 2 μL RNA loading dye added and were loaded into lanes of a 2% agarose gel in Tris acetic acid (TAE) buffer with ethidium bromide in the gel. Gels were then run at 80 V and imaged after 20 min increments using a gel documentation system (Clinx). The image shown in Fig. 1 was taken after 40 minutes.

Results and discussion

The majority of AtTR in the absence of protein migrates through an agarose gel in a manner consistent with its size of ~250 bp (160 kDa) giving rise to a single clear band when stained with ethidium bromide (Fig. 1, far left and far right lanes). Also visible is a smaller population with approximately double the size that could result from the association of two molecules and is consistent with the appearance of the human telomerase subunit in EMSAs.

When incubated with a 3x molar excess of a fusion protein of the AtTERT binding domain (BD) and glutathione synthase transferase (GST) there is a clear shift in the band indicating a greater mass, consistent with binding a ~60 kDa species (Fig. 1, red labels). As molar excess of AtTERT BD increases, so does the shift, consistent with multiple protein monomers binding to each AtTR. The appearance of the band also becomes less well resolved, suggesting some heterogeneity in the species present that may reflect incomplete binding or association/dissociation of the RNA-protein complex during gel migration.

GST fusions of a variety of *A.thaliana* proteins many of which are homologues of TR binding proteins in other organisms were also screened. Fig. 1 shows examples of two common types of behaviour observed in such experiments. For the group designated 'protein X' no concentration-dependent shift is visible and the appearance of the AtTR band is unchanged (Fig. 1, grey labels). Interestingly, a second group 'protein Y' causes precipitation of AtTR such that no RNA enters the gel (Fig. 1, green labels). It remains to be seen whether this is an artefact of protein or protein-RNA complex stability, co-purification of RNase or whether there

is physiological relevance to this.

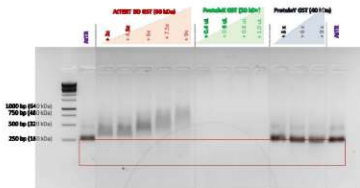


Fig. 1. RNA electrophoretic mobility shift assay. Ethidium bromide-stained AtTR (0.2 μ M) incubated with AtTERT binding domain or illustrative candidate RNA binding proteins fused to glutathione synthase transferase (GST) as indicated, with concentrations given as an x-fold molar excess.

Conclusions

EMSA were performed that illustrated the effectiveness of this technique by confirming the known interaction of the AtTERT binding domain and telomeric RNA. This interaction can be used as a positive control in further RNA-protein interaction experiments. Several *A. thaliana* proteins were screened and showed no interaction, consistent with control experiments with bovine serum albumin (data not shown). Some proteins instead precipitated AtTR, necessitating follow-up work to determine this is an artefact of the experimental conditions or an interaction with physiological relevance.

Acknowledgments

Research was supported by the Czech Science Foundation, project no. 20-01331X.

References

1. Chan H., Wang Y., Feigon J.: *Annul. Rev. Biophys.* **46**, 199 (2017).
2. Schmidt J. C., Cech T. R.: *Genes. Dev.* **29**, 1095 (2015).
3. Armstrong C. A., Tomita K. *Open Biol.* **7**, 160338 (2017).
4. Fajkus P., Peška V., Závodník M., Fojtová M., Fulnečková J., Dobias Š., Kilar A., Dvořáčková M., Zachová D., Nečasová L., Sims J., Sýkorová E., Fajkus J.: *Nucleic Acids Res.* **47**, 9842 (2019).
5. Fitzgerald M. S., Řiha K., Gao F., Ren S., McKnight T. D., Shippen D. E.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96**, 14813 (1999).
6. Song J., Castillo-González C., Ma Z., Shippen D. E.: *Nucleic Acids Res.* **49**, 9496 (2021).
7. Špaček J., Daňhel A., Hasoň S., Fojta M.: *Electrochem. Commun.* **82**, 34 (2017).

Voltammetric Determination of Fentanyl and its Analogues

Radek Jerga, Petr Barták, and Jana Skopalová

Department of Analytical Chemistry, Palacky University, Faculty of Science, 17. Listopadu 1192/12, 779 00 Olomouc, Czech Republic, E-mail: radek.jerga01@upol.cz

Abstract

Fentanyl and its analogues are synthetic opioids developed for use in anaesthesiology and treatment of chronic pain. Recently, they have been increasingly abused, e.g. in mixture with heroin. Due to their low therapeutic index, there is often a fatal overdose of illicit drugs with fentanyls. The aim of this work was to develop a rapid method for voltammetric analysis of fentanyls. The *ex-situ* adsorptive voltammetry method uses the adsorption of the drug on the surface of glassy carbon electrode, its oxidation after transferring the electrode into a pure electrolyte solution and square-wave voltammetric detection of the adsorbed oxidation product.

Key Words: Fentanyl, Glassy Carbon Electrode, Adsorptive Cyclic Square-wave Voltammetry.

Introduction

Fentanyl is a synthetic opioid, and together with its analogues, is used in anaesthesiology and as a painkiller. It was first synthesized in 1960 as a possible substitute for morphine, because of its higher potency and receptor specificity. Fentanyl has long been used mainly in clinical practice, however its illegal production and abuse has increased recently. It is often used as a cutting agent for heroin to increase the profit of dealers. This is dangerous because of the different effectiveness between heroin and fentanyl, which can lead to a quick overdose¹.

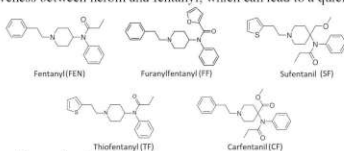


Fig. 1. Structure of fentanyl and its analogues.

The increase in fentanyl overdose cases leads to the development of new analytical methods for its identification and determination. Most of these methods are based on separation techniques²⁻⁴, but the need of demanding instrumentation is a reason for finding alternative methods. Electrochemistry is one of the possibilities with various carbon based electrode types and their modifications, like single-walled carbon nanotubes⁵, glassy carbon electrode with multi-walled carbon nanotubes as catalysator⁶, or screen-printed carbon electrode modified with ionic liquid⁷.

Fentanyl and its analogues are often determined in urine which represents a complex matrix. This is a reason why it is necessary to either do a sample pre-treatment and extract the analyte or use a suitable electrode modification for analysis in the original sample⁸. Simple unmodified electrode might be used for fentanyl detection if connected with adsorptive voltammetry. This method is based on accumulation of the analyte onto the electrode surface, which is then transferred to a clean supporting electrolyte where the measurement is carried out. Glassy

carbon electrode (GCE) might be used for this method, because of the hydrophobic character of fentanyl⁹.

Experimental

Apparatus

Electrochemical measurements were performed on the Autolab PGSTAT128N (Metrohm Autolab, The Netherlands) controlled with software NOVA 1.12. All experiments were carried out in three-electrode system with GCE as working electrode (Bioanalytical Systems, USA), reference SCE electrode (Monokrystal, Czech Republic) and platinum auxiliary electrode. An inoLab 720 pH meter with combined glass electrode SenTix 41 (WTW, Germany) was used to adjust pH of the Britton-Robinson (BR) buffer solutions.

Chemicals, solutions and samples

Standard solutions of fentanyl, furanylfentanyl, sufentanil (Lipomed, Switzerland), thiofentanyl and carfentanyl (Chiron, Norway) were prepared in concentration 10^{-3} mol/L by dissolving a weighed amount of solid compound in methanol. Urine sample was donated by a healthy man aged 25.

Voltammetric measurements

The GCE surface was polished with alumina slurry (50 nm) in deionized water and then carefully rinsed with deionized water before each measurement. Cyclic voltammetry experiments were performed in potential range -0.4 to +1.2 V at scan rate 50 mV/s. Direct differential pulse voltammetry (DPV) was carried out in BR buffer solution of pH 8.5 in the potential range 0 to +1.0 V at scan rate 10 mV/s, pulse amplitude 100 mV and pulse width 50 ms. The *ex-situ* adsorptive cyclic square-wave voltammetry (CSWV) was based on accumulation of fentanyl from a solution for a defined time (10 s for fentanyl, sufentanil and carfentanyl, 5 s for furanylfentanyl and thiofentanyl). Electrode was then carefully rinsed with deionized water and transferred to a voltametric cell with clean supporting electrolyte (BR buffer solution of pH 8.5). CSWV started with 5 s pre-electrolysis of the analyte at oxidation potential of respective fentanyl. This was followed by cathodic scan from the initial oxidation potential to -0.4 V and back to the initial potential at scan rate 100 mV/s, pulse amplitude -50 mV (for cathodic scan), +50 mV (for anodic scan) and frequency 25 Hz.

Results and discussion

Cyclic voltammogram in Figure 2 shows the main oxidation double peak A of fentanyl (0.5 mmol/L) with two current maxima, one at the potential of 0.8 V, the second at 0.93 V. The occurrence of a pair of peaks B1 (at potential -0.06 V) and B2 (at -0.01 V) on the cathodic and anodic branches of the cyclic voltammogram indicates the formation of an electroactive product during the oxidation of fentanyl at the potential of peak A. These two peaks provide an alternative for the detection and determination of fentanyl after its preliminary electrolysis at the potential of the main anodic current peak A. Similar voltammetric behaviour with typical formation of the couple of peaks B1/B2 was observed for all studied derivatives of fentanyl.

A CSWV method based on the reduction and subsequent oxidation of the adsorbed oxidation product was developed for the analysis of fentanyl and its analogues. For best efficiency of this method, the appropriate pH of the supporting electrolyte was tested, as well as the optimal time and potential of the pre-electrolysis step. These parameters were tested on fentanyl with results showing that the optimal pH of BR buffer is 8.5 and 5 s of pre-electrolysis is sufficient to obtain an analytically usable current signal. Optimal pre-electrolysis potential was different for each

fenentanyl: 950 mV for fentanyl and furanylfentanyl, 900 mV for sufentanil, 800 mV for thiofentanyl and 850 mV for carfentanyl.

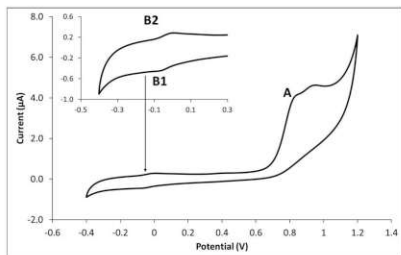


Fig. 2. Cyclic voltammogram of fentanyl ($c = 0.5 \text{ mmol/L}$) in BR buffer pH 8.5. Potential range -0.4 to $+1.2 \text{ V}$, scan rate 50 mV/s .

Table I.

Regression parameters of calibration dependencies of all fentanyls measured with *ex-situ* adsorption CSWV and direct DPV; r – correlation coefficient, LOD – limit of detection, LDR – linear dynamic range, cat – cathodic scan, ano – anodic scan. *Calculated using IUPAC direct signal method. **Omitted on the level of significance $\alpha = 0.05$.

Method	Analyte	Slope (nA/L· μmol)	Intercept (nA)	r	LOD^* ($\mu\text{mol/L}$)	LDR ($\mu\text{mol/L}$)
DPV	FEN	70.4 ± 2.3	-**	0.9984	0.20	0.25–4
CSWV cat		107.3 ± 1.9	-**	0.9994	0.32	1–10
CSWV ano		102.1 ± 1.7	31 ± 11	0.9994	0.31	1–10
DPV	FF	70.8 ± 1.5	-**	0.9987	0.33	0.25–10
CSWV cat		36.04 ± 0.29	48.7 ± 1.8	0.9999	0.15	1–10
CSWV ano		33.50 ± 0.11	87.10 ± 0.66	0.9999	0.06	1–10
DPV	SF	160.1 ± 2.7	-**	0.9996	0.11	0.25–4
CSWV cat		96.5 ± 2.3	82 ± 14	0.9989	0.43	1–10
CSWV ano		104.8 ± 2.5	122 ± 15	0.9988	0.44	1–10
DPV	TF	69.3 ± 1.7	-**	0.9985	0.42	0.5–10
CSWV cat		44.3 ± 1.1	135.6 ± 7.3	0.9991	0.49	2–10
CSWV ano		41.0 ± 1.4	194.5 ± 9.2	0.9983	0.67	2–10
DPV	CF	151.7 ± 1.3	20.5 ± 4.3	0.9999	0.08	0.5–6
CSWV cat		97.3 ± 4.8	-**	0.9976	0.56	1–6
CSWV ano		107.8 ± 2.0	106.9 ± 7.5	0.9997	0.21	1–6

The developed CSWV method was used with the *ex-situ* adsorptive technique to measure calibration dependencies of each fentanyl. Analyte was accumulated from solution (2 mL) of respective fentanyl in BR buffer of pH 8.5. Regression parameters obtained using the adsorptive CSWV method and the parameters resulting from the direct DPV measurement are presented

in Table 1. Both methods are comparable in terms of limits of detection (*LOD*), with only sufentanil and carfentanil having higher *LOD* values in the CSWV than in the DPV method.

The applicability of use the *ex-situ* adsorptive CSWV method for the analysis of samples with more complex matrix was tested with urine samples. The human urine sample was spiked with 2 $\mu\text{mol/L}$ of fentanyl and pH was adjusted to 11 using NaOH (1 mol/L) in order to convert fentanyl to its uncharged form. *Ex-situ* adsorptive CSWV was then used for the determination of fentanyl using the standard addition method. After baseline correction, fentanyl concentration of 1.69 $\mu\text{mol/L}$ was found using the cathodic scans, while the concentration of 2.07 $\mu\text{mol/L}$ was obtained from anodic scans. This represents -15.5% bias for cathodic scans and +3.5% bias for anodic scans. Direct DPV determination of fentanyl in urine sample was not possible because of dominant peaks of impurities from the sample occurring at the potential of the analyte. Fentanyl was undetectable even in concentration of 6 $\mu\text{mol/L}$.

Conclusion

New *ex-situ* adsorptive cyclic square-wave voltammetric method for determination of fentanyls was developed. The method is based on pre-electrolysis of the analyte followed with both cathodic reduction and anodic oxidation of the product formed during the pre-electrolysis step. The advantage of this *ex-situ* method is the possibility to accumulate fentanyl onto the electrode surface from a sample with no to little need of pretreatment. For the determination of fentanyl from urine sample, only alkalization of the sample to pH 11 is required.

Acknowledgments

Authors thank the Czech Science Foundation (project GAČR No. 20-07350S) and Palacky University Olomouc (project IGA_PrF_2021_021) for financial support.

References

1. Comer S. D., Cahill C. M.: *Neurosci. Biobehav. Rev.* 106, 49 (2019).
2. Shoff E. N., Zaney M. E., Kahl J. H., Hime G. W., Boland D. M.: *J. Anal. Toxicol.* 41, 484 (2017).
3. Strayer K. E., Antonides H. M., Juhascik M. P., Daniulaityte R., Sizemore I. E.: *ACS Omega* 3, 514 (2018).
4. López-Guarnido O., Taberner M. J., Hernández A. F., Rodrigo L., Bermejo A. M.: *J. Appl. Toxicol.* 34, 1104 (2014).
5. Wester N. a 12 spoluautorů: *ACS Appl. Nano Mater.* 3, 1203 (2020).
6. Najafi M., Sohoul E., Mousavi F.: *J. Anal. Chem.* 75, 1209 (2020).
7. Goodchild S. A., Hubble L. J., Mishra R. K., Li Z., Goud K. Y., Barfidokht A., Shah R., Bagot K. S., McIntosh A. J. S., Wang J.: *Anal. Chem.* 91, 3747 (2019).
8. Naghian E., Khosrowshahi E. M., Sohoul E., Ahmadi F., Rahimi-Nasrabadi M., Safarifard V.: *New J. Chem.* 44, 9271 (2020).
9. Langmaier J., Maier V., Samec Z.: *ChemElectroChem* 8, 2519 (2021).

Electrochemistry of 3-fluorophenmetrazine and 4-methylpentredone (Elektrochemie 3-fluorofenmetrazinu a 4-methylpentredonu)

Eliska Jiroušková^{ab}, Radomír Čabala^c, and Romana Sokolová^a

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

^b Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

^c Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine, Kateřinská 1660/32, 12108 Prague 2, Czech Republic

Abstract

In recent years many new psychoactive substances have appeared in the drug market, they are used as a legal alternative to classical drugs. It is not easy to identify these compounds in organism, because there are lots of derivatives. 3-fluorophenmetrazine (2-(3-fluorophenyl)-3-methylmorpholine, 3-FPM) and 4-methylpentredone (4-methyl- α -methylamino-valerophenone, 4-MPD) can be bought over the Internet. This study is focused on electrochemical investigation of oxidation and reduction of both compounds. The report is based on cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry and UV-Vis spectrophotometry.

Key Words: 3-fluorophenmetrazine, 4-methylpentredone, Drugs, Voltammetry, Oxidation, Reduction.

Úvod

3-fluorofenmetrazin (3-FPM) a 4-methylpentredon (4-MPD) jsou nové psychoaktivní látky, které se v posledních letech objevují na trhu. Tyto látky, také nazývané jako „designer drugs“ nebo „legal highs“, jsou alternativou ke klasickým drogám. Dají se snadno sehnat online, protože nebývají regulovány zákonem. 3-fluorofenmetrazin je derivát fenmetrazinu, který se v 50. letech prodával pod komerčním názvem Preludin. Tento léčivý přípravek se využíval na léčbu obezity. Po sléze byl stažen z trhu zejména z důvodu jeho návykovosti a vedlejšími účinkům. Fenmetrazin se stal oblíbeným v 70. letech jako náhražka amfetaminu. Na své popularitě získal zejména díky The Beatles, kteří tuto látku užívali. Fluorovaný derivát fenmetrazinu má podobné projevy, dochází k uvolňování dopaminu a noradrenalinu. Uživatelům navozuje euforii, stimuluje, zvyšuje libido a koncentraci. Může ale také způsobovat úzkost a nadměrné pocení. 3-FPM se na evropském trhu začal objevovat v roce 2014, a to nejčastěji ve formě prášku nebo krystalu. V některých zemích jako například ve Švédsku, Velké Británii, Maďarsku a Finsku je již zákonem regulován^{1,2,3}.

4-methylpentredon (4-MPD) je jedním ze syntetických katinonů, které se řadí k největším skupinám nových psychoaktivních látek. Může způsobovat zvýšení aktivity, neklid a tachykardii⁴. Katinony bývají využívány jako alternativa k extázi a kokainu. Zejména v USA a UK jsou rozšířeny jako drogy využívané během sexuálních aktivit. Tyto látky totiž zvyšují sexuální apetit a výkon, také navozují euforii. Kromě vedlejších účinků, může docházet i například k přenosu HIV způsobenému rizikovým chováním⁵. Stejně jako 3-FPM byl také 4-MPD objeven na trhu v roce 2014, byl zachycen v České republice Evropským monitorovacím centrem pro drogy a drogovou závislost (EMCDDA)⁶.

Nové psychoaktivní látky není snadné detekovat v organismu, protože existuje spousta různých derivátů. Současné screeningové metody nemusí být účinné, proto jsou tyto látky studovány.

Klíčové je určení jejich biotransformace v lidském organismu. V první fázi biotransformace dochází k oxidaci, případně redukcí látek ⁷. Z tohoto důvodu byly studovány elektrochemické vlastnosti těchto látek. Mardal M. a spol. ⁸. ve své studii uvádí, že během metabolismu 3-FPM může docházet ke celé řadě chemických reakcí například N-oxidaci, aryl-hydroxylaci, O-methylaci, alkyl-hydroxylaci, oxidaci a degradaci ethylového mostu za vzniku O/N-bis-dealkylovaného metabolitu. Při metabolismu 4-MPD může docházet ke vzniku karboxylové kyseliny, hydroxylaci na alkylovém řetězci nebo tvorbě hydroxylaminu ⁴. Cílem práce je objasnit tyto procesy. Elektrochemické metody v kombinaci s analytickými separačními metodami jsou pro určení redox mechanismu bioaktivních látek s výhodou v literatuře využívány ⁹⁻¹¹.

Experimentální část

Teoretické výpočty

Pro výpočet prostorového rozložení HOMO a LUMO orbitalů v molekule ve vakuu byla použita B3LYP funkce/6-31G* v softwaru Spartan'14, Wavefunction, inc.

UVVis Spektrofotometrie

Spektrofotometrie byla využita pro měření stability látky v prostředí 0,004 mol.l⁻¹ KOH, měřena na přístroji Agilent 8453 Spektrometr v kyvetě o optické délce 1,0 cm.

Elektrochemické vlastnosti

Pro metody cyklické voltametrie (CV) a diferenční pulsní voltametrie (DPV) byla využívána tříelektrodová elektrochemická cela, jako pracovní elektroda byla využita skelná uhlíková elektroda o průměru 1 mm pro CV a 3 mm pro DPV. Referenční elektrodou byla argentchloridová elektroda Ag|AgCl|1 M LiCl a pomocná elektroda byla tvořena platinovým drátkem.

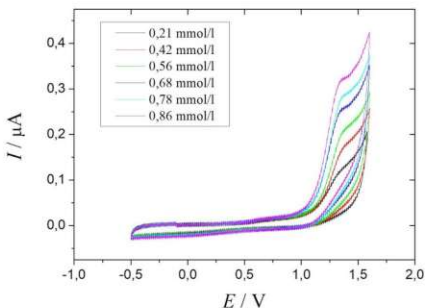
Výsledky a diskuse

Teoretickým výpočtem bylo zjištěno prostorové rozložení nejnižšího obsazeného molekulového orbitalu (HOMO), k oxidaci tedy pravděpodobně může docházet na kruhu s dusíkem. Jako nejnižší neobsazený molekulový orbital (LUMO) se jeví benzenové jádro substituované fluorem.

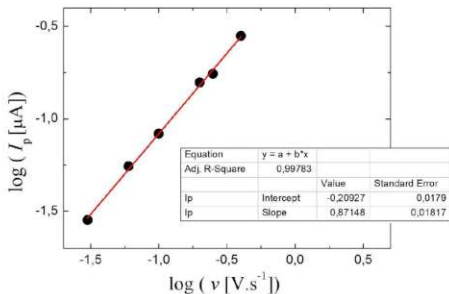
Spektrofotometrie posloužila k určení stability 3-FPM a 4-MPD v roztoku 0,004 mol.l⁻¹ KOH. Látky jsou stabilní minimálně po dobu 4,6 hodiny.

Cyklická voltametrie v roztoku o pH = 6,2 byla měřena v rozsahu koncentrací od 0,21 mM do 0,86 mM. Výška oxidační vlny při potenciálu cca 1,2 V se s koncentrací lineárně zvyšovala (Obr. 1).

Dále byla měřena CV při různých pH, kdy bylo zjištěno, že potenciál piky E_p klesá s rostoucím pH k nižším hodnotám až do pH = 9, kdy se již nemění. V této oblasti dochází při oxidaci pravděpodobně k účasti protonů, jelikož látka se nachází v protonované formě. Při vyšších pH se molekula nachází ve formě neutrální. Cyklické voltamogramy byly měřeny při různých rychlostech skenu. Závislost výšky piky I_p na rychlosti skenu byla použita pro určení průběhu oxidace, kdy na elektrodě docházelo částečně k adsorpci, proces nebyl řízen difuzí (Obr. 2). To dokazuje hodnota směrnice 0,87, která je vyšší než teoretická hodnota 0,5 pro proces řízený difuzí. Vzhledem k podílu adsorpcie, není v této fázi možné určit reakční schéma.



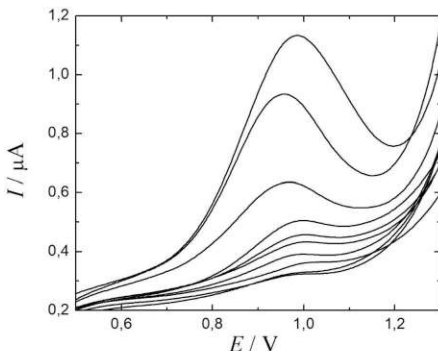
Obr. 1. Cyklické voltamogramy při různých koncentracích 3-FPM při pH = 6,2. Rychlost skanu byla 0,1 V/s.



Obr. 2. Logaritmičká závislost výšky píku na rychlosti skenu pro 3-FPM.

Byla vyvinuta analytická metoda stanovení 3-FPM pomocí diferenčně pulsní voltametrie. Metoda byla optimalizována. Výška pulsu byla nastavena na 60 mV, šířka pulzu 80 ms, počáteční potenciál 0,5 V, čas akumulace 40 s, rychlost skanu 3 mV/s. Jako nejvhodnější pH

bylo vybráno pH 9. Za těchto podmínek byly měřeny DPV pro různé koncentrace 3-FPM (Obr. 3). Došlo ke statistickému vyhodnocení dle Melouna a spol.¹².



Obr. 3. DPV voltamogramy při různých koncentracích látky 3-FPM ve fosfátovém pufru.

Kalibrační přímka:

$$I_p [\mu\text{A}] = (0,00379 \pm 0,00017) [\mu\text{A.l}/\mu\text{mol}] c [\mu\text{mol/l}] + (0,0165 \pm 0,0067) [\mu\text{A}]$$

Jako lineární se jeví koncentrační oblast od 7,0 do 107,0 $\mu\text{mol/l}$ s korelačním koeficientem $r = 0,9988$.

Stanovení 3-FPM pomocí diferenční pulsní voltametrie má limit detekce 4,7 $\mu\text{mol/l}$ a limit kvantifikace 7,0 $\mu\text{mol/l}$ ve fosfátovém pufru o pH = 9.

Závěr

V rámci tohoto výzkumu byly obě studované látky zkoumány elektrochemicky, byla provedena cyklická voltametrie k určení mechanismu oxidace či redukce. Dále byla vyvinuta metoda stanovení 3-FPM a 4-MPD pomocí diferenční pulsní voltametrie.

Acknowledgments

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

References

1. Mayer F. P. a 10 spoluautorů: *Neuropharmacology* 134, 149 (2018).
2. Adamowicz P., Gieron J.: *Problems of Forensic Sciences* 105, 418 (2016).

3. McLaughlin G., Morris N., Kavanagh P. V., Dowling G., Power J. D., Twamley B., O'Brien J., Talbot B., Sitte H. H., Brandt S. D.: *Drug Test. Anal.* 9, 369 (2017).
4. Manier S. K., Schwermer F., Wagmann L., Eckstein N., Meyer M. R.: *Metabolites* 11, 3 (2021).
5. Cartiser N., Sahya A., Adveniera A., Franchia A., Revelutb K., Bottinellib Ch., Bévaloth F., Fanton L.: *Forensic Sci. Int.* 319, 110659 (2021).
6. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Europol. EMCDDA–Europol 2014 Annual Report on the Implementation of Council Decision 2005/387/JHA. 2015 Jul.
7. Meyer M. R.: *Arch. Toxicol.* 90, 2421 (2016).
8. Mardal M., Misereze B., Bade R., Portolés T., Bischoff M., Hernández F., Meyer M. R.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 128, 485 (2016).
9. Wantulok, J., Sokolova R., Degano I., Kolivoska, V., Nycz, J. E.: *Electrochim. Acta* 370, 137674 (2021).
10. Sokolová R., Ramešová Š., Kocábová J., Kolivoška V., Degano I., Pitzalis E.: *Monatshefte für Chemie - Chem Mon.* 147, 1375 (2016).
11. Ramešová Š., Sokolová R., Degano I.: *Electrochim Acta* 182, 544 (2015).
12. Meloun M., Mílitký J., Kočmidová H.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. Praha: Plus, 1994.

Preparation, Testing and Application of Amalgam Screen-Printed Electrodes

Bohdan Josypčuk^a, Jan Langmaier^a, and Sofia Tvorynska^{a,b}

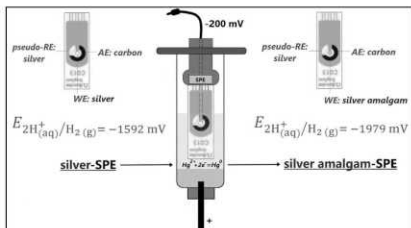
^aJ. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 23 Prague, Czech Republic, E-mail: josypcuk@jh-inst.cas.cz

^bCharles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Hlavova 2030/8, 128 43 Prague, Czech Republic

Abstract

Silver amalgam screen-printed electrodes (AgA-SPEs) were designed, prepared, and tested for the first time as perspective representatives among SPEs for measuring at high negative potentials. The precise coulometric preparation procedure for mercury deposition at the working electrode surface of the commercial silver-SPE was developed. An optimal electrolyzer construction for the mercury deposition, electrolyte composition, and electrolysis conditions were proposed. The maximum value of hydrogen overvoltage (-1979 ± 4 mV) was found on AgA-SPE with 50% (w/w) of Hg content in 0.1 mol L^{-1} NaOH, which is more negative than with the original silver-SPE for 387 mV (-1592 ± 12 mV).

Key Words: Electrochemistry, Screen-printed electrodes, Silver amalgam, Iodine determination.



Scheme 1. Preparation of silver amalgam SPE.

Introduction

Screen-printed electrodes (SPEs) have become a quite widespread substitute for classic electrodes in electrochemical analytical measurements, where results of the analysis may not have high accuracy. Several factors can contribute to a larger error of the repeated measurements: i) the non-uniformity of individual SPEs; ii) in 3-electrode SPEs, pseudo-reference electrode which potential is dependent on properties and composition of the measured solution; iii) short distance between electrodes, where the products of electrochemical reactions on one electrode can affect the properties of another electrode; iv) not entirely suitable area ratio of working and auxiliary (reference) electrodes, etc. Thousands of articles dedicated to SPEs applications have so far been published. Here are only some examples of their use in the development of analytical methods for determining many analytes such as pharmaceuticals, biomolecules, clinical samples and diagnosis, environmental samples, heavy metal ions, foods and beverages, security applications and many others¹⁻⁶. The bound bioreceptor to the surface

of the working electrode of SPEs makes them a suitable base for biosensors preparation^{1, 5, 7, 11}. Measurements with SPEs can be carried out in batch^{1, 5, 6, 11, 12} and flow systems^{1, 3-6, 12}. In addition, SPEs are often adapted for measurement in a small volume of solution (e.g., 50 μL) which is placed at SPE.

All of commercially available SPEs are suitable for measurements in a positive and/or moderate negative range of working potentials, precluding their application in aqueous solutions at high negative potentials due to the low hydrogen overvoltage. On the contrary, solid amalgam electrodes (MeSAE, where Me is Ag, Au, Cu, etc.) in polished form without liquid mercury (e.g., p-AgSAE) have a high potential of hydrogen evolution (PHE), comparable to pure mercury electrodes. Therefore, amalgam electrodes allow to measure and study substances and processes unavailable with other solid electrodes¹³⁻²⁵.

The aim of this work was to find a reliable, reproducible and simple method of preparing amalgam-SPEs suitable for both bath and flow arrangement of the electrochemical cell.

Experimental

All voltammetric and amperometric measurements were carried out at room temperature using computer-controlled analyzer with MultiElechem v. 3.1 software (J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of AS CR) and the electrochemical stand (Polaro-Sensors, Czech Republic). Silver screen-printed electrodes (Ag-SPE) (Metrohm DropSens Co., Spain, type DRP-C013, diameter of silver working disc 1.6 mm, carbon auxiliary electrode and silver pseudo-reference electrode²⁶) were used as a basis for preparation of silver amalgam SPEs (AgA-SPE). The three-electrode batch system consisted of a working electrode of Ag-SPE or of AgA-SPE, a saturated calomel reference electrode in which metallic mercury was replaced by silver paste amalgam (AgA-SCE, laboratory-made, having the same potential as a saturated calomel electrode²⁷) and of the auxiliary Pt wire electrode (diameter 1.0 mm, length 10 mm).

All chemicals used were of p.a. purity. Commercial table salt (Solne mlyny, Czech Republic) containing potassium iodate KIO_3 (27 ± 7 mg iodine in 1 kg salt), served as the sample for testing analysis.

Results and discussion

Since the electrochemical and mechanical properties of the amalgam electrodes are dependent on the metal: mercury ratio^{19, 28}, the content of silver in the disk of the working electrode (WE) was determined by differential pulse voltammetry (DPV) on glassy carbon electrode (56.3 ± 3.5 μg (SD = 3.6 μg , RSD = 6.4%, $N = 7$)).

Electrochemical deposition of mercury at silver screen-printed electrode. The electrochemical methods represent the best way for deposition of exact amount of mercury on silver surface. For this purpose, an analyzer adapted to a work with SPEs was fabricated¹². The procedure can be fully automated in most of modern analyzers. Data for the analyzer used in this work, i.e., the deposition potential and the number of coulombs required for deposition of calculated weight of mercury were loaded to the panel of the electrolysis parameters in the control software. In calculating the charge (number of micro-coulombs) required for deposition of precise weight of mercury on SPE, the current yield is assumed to be practically 100%. The program enables to stop the electrolysis after passage of a given number of micro-coulombs assuring thus the preparation of the silver amalgam with the exactly predetermined mercury (silver) content. Deposited on Ag-SPE, mercury slowly dissolves silver, creates amalgam and the shiny electrode surface gradually becomes matte. If a larger amount of mercury (the

calculated amalgam composition would correspond to >70% (w/w) Hg) is formed on the electrode surface, the mirror mercury film visually does not change during the day. The described method of amalgam-SPEs preparation was preliminarily tested on other commercially available metal-SPEs (Pt-SPE, Pd-SPE) and should be considered as an universal and convenient way for each one in which metal of the working electrode is „wettable“ by mercury. It should be remembered that amalgam forming metal (or metal dissolved in mercury at the electrode surface) can significantly affect the electrochemical properties of the working electrode against some analytes^{18-20, 29, 30}.

Optimization of plating electrolyte composition and mercury deposition potential. Deposition (electrolysis) of mercury on Ag-SPE took place in a two-electrode system, where the anode was a large area of silver paste amalgam (12% (w/w) Ag) and the silver disk of the working electrode at SPE served as the cathode. Solution of 0.1 mol L⁻¹ HgO in 2 mol L⁻¹ KI was chosen as an optimal plating electrolyte for Ag-SPE. Current values were measured after 60 s from the beginning of electrolysis in the range of potentials from -10 to -500 mV. The current grows rapidly when the negative deposition potential increases from -10 mV to -25 mV and then is quite stable up to -500 mV ($I = -435.5 \pm 5.3 \mu\text{A}$; RSD = 1.2%; $N = 6$). The deposition time of a certain amount of mercury depends on the electrolysis current and therefore the optimum potential $E_{\text{electr}} = -200 \text{ mV}$ (vs. AgA-SCE) of this process were selected and applied in all other experiments.

Influence of mercury content in amalgam on hydrogen overvoltage on AgA-SPE. The previous research¹⁹ has indicated that the hydrogen overvoltage on mercury and amalgam electrodes are practically the same in solution of 0.1 mol L⁻¹ NaOH. Therefore, this supporting electrolyte was picked up to determine the potential of hydrogen evolution on amalgam-SPEs with the different Ag : Hg ratio. Silver-SPE was immersed in solution inside the classical electrochemical cell where the experiment was carried out in a three-electrode batch arrangement and where only the working electrode of SPE was connected. The saturated calomel electrode based on silver paste amalgam as the reference and a platinum wire as auxiliary electrodes were used. Direct current voltammetry (DCV) was performed and voltammograms were recorded from -500 mV towards negative potentials to reach the current of about -20 μA at scan rate of 20 mV s⁻¹ and the current 10 μA was used for the PHE assessment ($E_{10\mu\text{A}}$). The first measurements were carried out with the original Ag-SPE ($E_{10\mu\text{A}} = -1592 \pm 12 \text{ mV}$; SD = 11 mV; RSD = 0.69%; $N = 5$). The gradual increase in mercury content up to 30% (w/w) almost linearly increases the PHE. The subsequent addition of mercury slowly changes the monitored potential and the PHE reaches maximum at 50% (w/w) Hg ($E_{10\mu\text{A}} = -1979 \pm 4 \text{ mV}$; SD = 3 mV; RSD = 0.17%; $N = 5$). A small change in the PHE among AgA-SPEs with a mercury content from 50 to 80% (w/w) can be probably explained by the fact that a consistent layer of solid amalgam is first formed on the surface of the silver particles. This layer determines electrochemical properties of the working electrode, and with the increase of the mercury content, solid amalgam becomes only thicker. At high content of mercury in amalgam (>70% (w/w)), the working electrode disk becomes fragile or paste and can be peeled off from the ceramic support. The amalgamation of Ag-SPE moves the potential of hydrogen evolution by 387 mV towards negative potentials and allows to perform such reduction processes that are not possible on the bare silver-SPE itself. AgA-SPEs with the mercury content 50% (w/w) were used in all further experiments and in this procedure, 56.3 μg mercury (charge 54161 μC) was deposited on the silver disk of the SPE. The mercury electrolysis was performed with the potential -200 mV for about 96 s, the current slightly changed during this deposition and its value was around -550 μA at the end of the process.

Determination of iodine in table salt: measurements in 50 μL of solution placed at the AgA-SPE surface. Iodine is essential for life functions of an organism and its lack can cause serious illnesses, mainly of the thyroid gland. In many, especially continental states, iodine is added to the table salt, mostly in the form of KIO_3 . Practical testing of prepared amalgam electrodes was performed in determining of an iodine content in a table salt where iodine was added by manufacturer in the form of KIO_3 (27 ± 7 mg iodine in 1 kg of salt). This analysis is based on an electrochemical reduction of iodates (IO_3^-) to iodides (I^-) at high negative potentials. The whole analysis is very simple and does not require any sophisticated operations: 1 g of the analyzed table salt (precision at least 1 mg) was completely dissolved in 9.0 mL of the deionized water and then 1.0 mL of 1 mol L^{-1} NaOH was added. This solution [0.1 mol L^{-1} NaOH; $\sim 1.7 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl; $3.4 - 5.7 \text{ mg L}^{-1}$ KIO_3] was then used for electrochemical measurements. Dependence of the peak current on the iodates concentration in the range from 1 to 10 mg L^{-1} was linear and analysis results can be calculated by comparing with the standard solution. Differential pulse voltammetry was used for measuring of the iodate reduction. Voltammetric scan was recorded from -800 to -1600 mV (vs. AgA-SCE), pulse height was -50 mV and scan rate 20 mV s^{-1} . To ensure the reproducibility of analysis, the working electrode of SPE was electrochemically regenerated before each measurement under following conditions: 60 jumps between -200 and -1500 mV and each potential was maintained 0.3 s. Every solution was measured seven-times and the last five measurements were taken for the calculation. The salt sample solution and the standard solution were measured consecutively. The solutions from five sample weights of table salt were analyzed with one AgA-SPE within one day and obtained results of their statistical processing (25.3 ± 1.9 mg iodine in 1 kg of table salt; SD = 1.6 mg kg^{-1} ; RSD = 6.3%; $N = 5$) showed a good congruence with the producer value ($27 \pm 7 \text{ mg kg}^{-1}$). Peak potential of iodate reduction in these determinations was $E_p = -1072 \pm 32$ mV; SD = 27 mV; RSD = 2.5%; $N = 5$. Statistical processing of five salt samples analyses that were carried out within a few days with five AgA-SPEs (27.3 ± 1.0 mg iodine in 1 kg of table salt; SD = 2.6 mg kg^{-1} ; RSD = 9.6%; $N = 25$) confirms that the preparation of amalgam-SPEs and the measurements themselves are quite reproducible and that for the most cases the AgA-SPE ensures sufficient precision of the iodine determination in the table salt.

Conclusions

In this work, design of silver amalgam-SPEs based on the mercury electrodeposition on the commercially available silver-SPEs has been described. Electrolyzer for computer controlled electrochemical deposition of the exact amount of mercury at silver-SPEs has been proposed and tested. The procedure for the preparation of silver amalgam-SPEs is fast, easy, reproducible and actually universal, since the metal parts of metal-SPEs, (where metal is represented by Au, Pt, Pd, etc.) can be covered by mercury using the same technique, as well. Electrochemical and mechanical properties of proposed silver amalgam-SPEs were explored with respect to composition of the silver amalgam (Ag:Hg ratio). Most importantly, the newly prepared silver amalgam-SPEs with the mercury content 50 % (w/w) have the significantly higher potential of hydrogen evolution (-1979 ± 4 mV mV) than the original silver-SPEs (-1592 ± 12 mV mV) and allow to perform electrochemical measurements at high negative potentials. The practical applicability of the novel detection system has been tested on voltammetric determination of iodine in a table salt. All results of analyses agreed well with the iodine content declared by the manufacturer. Moreover, the fact that no peak of iodate reduction has been recorded on bare silver-SPE, confirms the practical significance of amalgam-SPEs application for the reduction processes at high negative potentials. In addition, amalgam-SPEs may be a suitable basis for the preparation of biosensors.

Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation (Project 20-07350S), the Grant Agency of Charles University in Prague (Project 1356120)) and it was carried out within the framework of Specific Charles University Research (SVV 260560).

References

1. Squizzato A. L., Munoz R. A. A., Banks C. E., Richter E. M.: *Chemelectrochem* 7, 2211 (2020).
2. Ozeclikay G., Karadurmus L., Kaya S. I., Bakirhan N. K., Ozkan S. A.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 50, 212 (2020).
3. Dvorak P., Vyskocil V.: *Chem. Listy* 113, 703 (2019).
4. de Araujo W. R., Cardoso T. M. G., da Rocha R. G., Santana M. H. P., Munoz R. A. A., Richter E. M., Paixao T., Coltro W. K. T.: *Anal. Chim. Acta* 1034, 1 (2018).
5. Trojanowicz M.: *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 84, 22 (2016).
6. Hart J. P., Wring S. A.: *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 16, 89 (1997).
7. Campuzano S., Pedrero M., Gonzalez-Cortes A., Yanez-Sedeno P., Pingarron J. M.: *Analytical Methods* 11, 871 (2019).
8. Kudr J., Zitka O., Klimanek M., Vrba R., Adam V.: *Sensors and Actuators B-Chemical* 246, 578 (2017).
9. Cadkova M., Dvorakova V., Metelka R., Bilkova Z., Korecka L.: *Electrochem. Commun.* 59, 1 (2015).
10. Cadkova M., Metelka R., Holubova L., Horak D., Dvorakova V., Bilkova Z., Korecka L.: *Analytical Biochemistry* 484, 4 (2015).
11. Cadkova M., Kovarova A., Dvorakova V., Metelka R., Bilkova Z., Korecka L.: *Talanta* 182, 111 (2018).
12. Josypcuk B., Langmaier J., Tvorynska S.: *Sensors and Actuators B: Chemical* 347, 130583 (2021).
13. Tvorynska S., Barek J., Josypcuk B.: *J. Electroanal. Chem.* 860, 113883 (2020).
14. Tvorynska S., Barek J., Josypcuk B.: *Electroanalysis* 31, 1901 (2019).
15. Tvorynska S., Josypcuk B., Barek J., Dubenska L.: *Food Analytical Methods* 12, 409 (2019).
16. Josypcuk B., Barek J., Josypcuk O.: *Anal. Chim. Acta* 778, 24 (2013).
17. Yosypchuk O., Barek J., Yosypchuk B.: *Electroanalysis* 24, 2230 (2012).
18. Yosypchuk B., Marecek V.: *J. Electroanal. Chem.* 653, 7 (2011).
19. Yosypchuk B., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 189 (2009).
20. Yosypchuk B., Novotný L.: *Electroanalysis* 15, 121 (2003).
21. Yosypchuk B., Novotný L.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32, 141 (2002).
22. Yosypchuk B., Novotný L.: *Chem. Listy* 96, 756 (2002).
23. Tvorynska S., Barek J., Josypcuk B.: *Sensors and Actuators B: Chemical* 344, 130252 (2021).
24. Josypcuk O., Barek J., Josypcuk B.: *Electroanalysis* 27, 2559 (2015).
25. Josypcuk O., Barek J., Josypcuk B.: *Electroanalysis* 30, 1163 (2018).
26. <http://www.dropsens.com/en/home.html>
27. Yosypchuk B., Barek J., Yosypchuk O.: *Electroanalysis* 23, 2226 (2011).
28. Yosypchuk B., Fojta M., Barek J.: *Electroanalysis* 22, 1967 (2010).
29. Josypcuk B., Fojta M., Yosypchuk O.: *J. Electroanal. Chem.* 694, 84 (2013).
30. Yosypchuk B., Barek J.: *Chem. Listy* 103, 284 (2009).

Simultaneous Adsorptive Stripping Square-Wave Voltammetric Determination of Vitamin E and Vitamin K in Food Supplements

Gylixhane Kastrati ^{a,b}, Granit Jashari ^c, Milan Sýs ^c, Blanka Švecová ^c, Tahir Arbnesi ^b,
Radovan Metelka ^c, Zuzana Bílková ^a, and Lucie Korecká ^a

^a Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology,
University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic;

E-mail: gylixhane.kastrati@student.upce.cz

^b Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of
Prishtina, Str. Mother Teresa, 10000 Prishtina, Kosovo

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

Abstract

The new voltammetric method has been developed for the simultaneous determination of α -tocopherol and phyloquinone. Adsorptive stripping square wave voltammetry is based on the accumulation of these biologically active compounds onto the freshly polished surface of solid glassy carbon electrode from an aqueous-organic mixture (50 % acetonitrile) and a subsequent voltammetric detection of both vitamins in 0.01 mol L⁻¹ HNO₃ containing 0.1 mol L⁻¹ KCl of pH 2.08. Obtained results have shown high sensitivity and short linear range due to self-interaction of vitamins during of adsorption onto surface of the electrode. This electroanalytical method shows that is simple and low-cost in quality control of food supplements.

Key Words: vitamin E; vitamin K; adsorptive stripping voltammetry; glassy carbon electrode; food supplements

Introduction

Vitamin E and K are fat-soluble vitamins ¹⁻⁴, known as non-polar organic compounds ⁵. Vitamin E as one of the most popular food ingredients ⁶, part of vegetable oil and fats ^{7,8}, comprises various tocopherols and tocotrienols isomers ^{3-4,9-10}. On the other side, vitamin K mostly found in green plants and formed by bacteria ¹¹, it is widely used in the diets for its anti-hemorrhagic properties ¹², made up of a group of three organic compounds: phyloquinone (VK1), menaquinone (VK2) and menadione (VK3) ¹³. Vitamin E is an antioxidant in the immune system, especially important for the protection of cytoplasmic membranes from peroxidation by the reduction of fatty acids ^{3,4,8} and damage of oxidative DNA ¹⁴, where its deficiency may cause fertility disorder ^{15,16}, circulatory disorder ¹, fast-aging by free radicals, Alzheimer ^{4,6,7}, kidney disease ¹², cancer, tumor, arthritis ⁴; while vitamin K is an oxidizing agent that is essential in the carboxylation of glutamic acid that is known as the precursor of blood-clotting factors ^{11,17,18}, where the deficiency affects deactivation of prothrombin, hemorrhage ¹¹, prosthetic valve failure ¹⁹, the disorder in bone formation ¹⁷.

The studies show the highest biologically active form are α -tocopherol (one of the eight isoforms of vitamin E) and phyloquinone (vitamin K1) ^{3,20}, thus they were selected to provide information about the simultaneous determination by using adsorptive stripping voltammetry (AdSV). So, we propose a simple, fast and inexpensive method of simultaneous detection of tocopherols and vitamin K that is applicable to quality control analysis in pharmaceutical products by application of square wave voltammetry (SWV) at a solid glassy carbon electrode (GCE).

Experimental

α -Tocopherol and phylloquinone, acetonitrile (ACN) of HPLC purity, were purchased from Sigma-Aldrich, while hexane used for cleaning surface of the electrode, 65 % nitric acid and KCl for preparation of detection aqueous medium from Lach-Ner (Neratovice, Czech Republic). Ultrapure water with resistivity 18.3 M Ω cm was obtained by Milli-Q system (Darmstadt, Germany) and used for the preparation of all solution.

Pretreatment of glassy carbon electrode

The solid glassy carbon electrode (GCE) (type 6.1204.300, Metrohm, Herrisau, Switzerland) with 3 mm diameter, was polished for 30 sec with a suspension of Al₂O₃ powder (0.3 μ m) before each measurement, then immersed in 95 % hexane in an ultrasonic bath for 5 min. All this procedure was necessary since it was known that targeted analytes remain in the surface of the electrode, because of their abilities to be adsorbed^{1,2}. After this treatment, the electrode was dried and ready for the physical binding of vitamin E and vitamin K in the surface of the glassy carbon electrode, as a pre-concentration stage and then to perform electrochemistry. Before each electrochemical detection, baseline measurement was checked after all conditions of pretreatment were done.

Instrumentation

Measurements carried in a glass 10 mL at 25 °C, were conducted in potentiostat/galvanostat (Autolab/PGSTAT101) from Metrohm (Herrisau, Switzerland) controlled by Nova 1.11 as a software, at a system of three-electrodes consisting GCE (working), Pt wire (auxiliary) and Ag/AgCl with 3.0 M KCl salt bridge (reference).

Results and Discussion

Pre-concentration of analytes was placed onto the surface of GCE at open-circuit, by immersing electrode into a continuously stirred (400 rpm) 10 mL of 50% ACN for 300 s. As the analytical technique, square wave voltammetry was employed to determine the optimal conditions where anodic mode with following parameters shows the most satisfying results: (E_{begin}) -0.1V, (E_{end}) +0.8V, ($E_{deposition}$) -0.1V, ($t_{deposition}$) the 60 sec, (E_{step}) 5 mV, frequency (f) 80 Hz and amplitude (E_{amp}) 30 mV and all the datas were recorded in supporting electrolyte containing 0.01M HNO₃ and 0.1M KCl, pH 2.08. Characteristic oxidation peaks were provided for α -tocopherol (-0.45 V) and phylloquinone (-0.15 V) after they were accumulated onto the surface of GCE and the best indicator for that is current, where the latter was increased with the addition of the targeted analytes.

Analytical performance of developed voltammetric method

VK1 and α -TOH provide almost the same peak current responses (I_p) for equal concentration (c) even if they are determined separately. However, when they were determined simultaneously, they showed different behavior, as it is shown in Fig. 1. It seems that α -TOH provided significantly higher peak current response than VK1. This fact suggested that the TOH is adsorbed preferably onto the surface of GCE from 50% ACN.

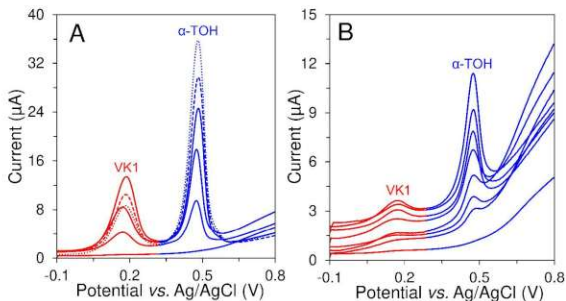


Fig. 1. SWAdSV voltammograms of calibration curves of VK1 and α -TOH at optimized working conditions: (A) 0 (blank), 2, 4, 6, 8 (dashed), and 10 (dotted line); (B) 0 (blank), 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ VK1 and α -TOH.

Conclusions

The study shows that the simultaneous determination of vitamin E and K in food supplements it is possible. Through this voltammetric method is able only determination of targeted vitamins sums, expressed as the concentration equivalents of the most biologically active forms (α -tocopherol and phylloquinone), because of similar electrochemical properties of their individual forms. Even so, short linear calibration ranges were achieved due to the limited size of the working electrode surface.

Acknowledgments

Financial supports from the Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice (projects No. SGS-2020-002 and No. SGS-2020-005), The Czech Science Foundation (project No. 20-01589S) and CEEPUS Network CHII-CZ-0212-12-1819 network for mobility funding are gratefully acknowledged.

References

1. Sýs M., Švecová B., Švancara I., Metelka R.: *Food Chem.* **229**, 621–627 (2017).
2. Sýs M., Jashari G., Švecová B., Arbnesi T., Metelka R.: *J. Anal. Chem.* **821**, 10–15 (2018).
3. Harsij M., Kanani H.G., Adineh H.: *Aquaculture* **521**, 1–6 (2020).
4. AL-Eitan L.N., Alzoubi K.H., Al-Smadi L.I., Khabour O.F.: *Toxicol. in Vitro* **62**, 1–6 (2020).
5. Sýs M., Žabčiková S., Červenka L., Vytras K.: *S. J. F. Sci.* **10**, 260–264 (2016).
6. Ly S.Y.: *J. Sci.* **88**, 1272–1276 (2008).
7. Robledo S.N., Tesiob A.Y., Ceballos C.D., Zon M.A.: *Sensor Actuat B-Chem.* **192**, 467–473 (2014).
8. Sánchez-Pérez A., Delgado-Zamarreño M.M., Bustamante-Rangel M. Hernández-Méndez J.: *J. Chromatogr. A* **881**, 229–241 (2000).
9. Parvin M.H., Arjomandi J., Lee J.Y.: *Catal.* **110**, 59–63, (2018).

10. Lang J.K., Packer L.: *J. Chromatogr. A.* *385*, 109-117 (1987).
11. Fauler G., Leis H.J., Schalamon J., Muntean W., Gleispach H.: *Int. J. Mass Spectrom.* *31*, 655-660 (1996).
12. de Oliveira R.B., Stingham A.E.M., Massy Z.A.: *Clin. Chim. Acta* *502*, 66-72 (2020).
13. Takeda K., Morita A., Ikenaka Y., Nakayama Sh.M.M. Ishizuka M.: *Vet. Anim. Sci.* *9*, in press (2020).
14. Sezer Z., Yilmaz T.E., Gungor Z.B., Kalay F., Guzel E.: *Reprod. Biol.* *20*, 63-74 (2020).
15. Brigelius-Flohe R., Traber M.G.: *The FASEB J.* *13*, 1145-1155 (1999).
16. Zamarrefio M.M.D., Pérez A.S., Pérez C.G., MCndez J.H.: *J. Chromatogr. A.* *623*, 69-74 (1992).
17. Yoshimura H., Hirota Y., Soda S., Okazeri M., Takagi Y., Takeuchi A., Tode C., Kamao M., Osakabe N., Suhara Y.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *30* (2020).
18. Torkashvand M., Gholivand M.B., Taherpour A.A., Boochani A., Akhtar A.: *J Pharm. Biomed.* *139*, 156-164 (2017).
19. Chetot T., Taufana S., Benoit E., Lattard V.: *Reprod. Toxicol.* *93*, 131-136 (2020).
20. Webster R.D.: *Chem. Rec.* *12*, 188-200 (2011).

Electrochemistry of Phospholes

Lucie Koláčková, Alan Liška, and Jiří Ludvík

Department of Molecular Electrochemistry and Catalysis, J. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: jiri.ludvik@jh-inst.cas.cz

Abstract

Seventeen pentasubstituted phospholes with expected application in organic electronics were synthesized and characterized electrochemically and by UV-vis spectra. Quantum chemical calculations of redox potentials and HOMO-LUMO energies were performed and experimental and theoretical data were successfully correlated. Tuning of redox properties can be achieved by combination of induction and resonance effects of substituents, extension / diminution of the π -delocalized system and by steric changes which affect intramolecular electron communication

Key Words: Pentasubstituted phospholes, Electrochemistry, UV-vis spectra, DFT, Structure-properties relationship.

Introduction

This contribution is devoted to pentasubstituted phospholes bearing extended π -conjugated arms. Phospholes are five-membered heterocycles, non planar, having tri-coordinated phosphorus atom which has a non-bonding electron pair. In the series of five-membered heterocycles like pyrrol, thiophene and furan, phosphole exhibits lowest aromaticity and behaves like a diene^{1,2}. Phospholes have a specific sterical and chemical properties enabling their application as promising material for organic electronics e.g. in solar cells, organic light-emitting diodes (OLEDs) or as fluorescent probes^{3,4}.

The presented molecules have aryl substituents in positions 1, 2 (the same – R1) and 5 (R2), whereas methyls are in positions 3 and 4 (Fig. 1a). The front view (Fig. 1b) shows that the aryl in the position 1 is perfectly perpendicular to the plane of the heterocycle, therefore this substituent is completely electronically isolated. On the other hand, the two aromates in the positions 2 and 5 are partly twisted, therefore some π -overlap with the heterocycle is preserved. The side view illustrating the geometry is on the Fig 1c.

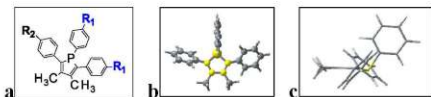


Fig 1. a) manner of substitution within the series; b), c) – geometry of the basic derivative 5a.

For this project 17 new compounds (Fig. 2) were synthesized using new procedure⁵ and investigated using electrochemical methods, spectroscopies and their *in-situ* combinations. Besides that, quantum chemical calculations were performed and correlated with experimental data for better understanding and more reliable interpretation of the structure – properties relationship because the main aim was to predict and tune the abilities of the new material.

Results

In the frame of detailed electrochemical investigation, in this contribution we focus on the first oxidation and the first reduction potentials and their difference, which we call "electrochemical gap". This value is related to electron delocalization and also to the push-pull abilities of substituents and, in this way, electrochemistry can be interconnected with photochemistry and light absorption or emission.

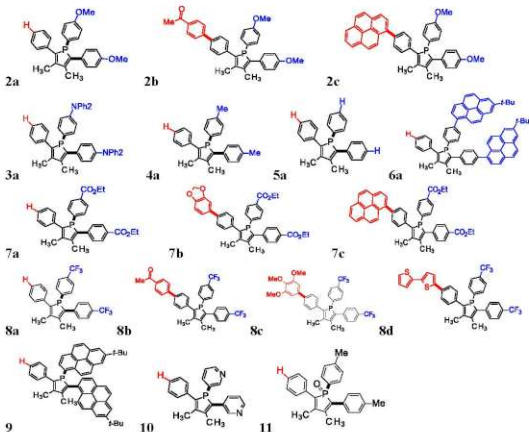


Fig. 2. Studied compounds.

It is necessary to stress, that using cyclic voltammetry, all first reduction and oxidation potentials are reversible or quasi-reversible, therefore they are thermodynamically relevant and thus suitable for correlations with calculated, theoretical data.

The derivatives that are most easily and most difficultly oxidized are **3a** and **8a**, respectively, most easily and most difficultly reduced are **8b** and **2a**, respectively. The lowest electrochemical gap (2.85 V) have the substances **2b, 7c** and **8d**, whereas the highest gap and therefore the most limited delocalization has the basic phosphole derivative **5a**.

Besides electrochemical experiments the UV-vis spectra were also recorded and according to expectations, the compounds with the lambda max at longest wavelengths, have also the smallest "electrochemical gap". And because "electrochemical gap" is analogous to the photophysical HOMO-LUMO gap (their correlation is presented in the Fig. 3), this potential difference reflects also the wavelength of absorbed and emitted light.

Quantum chemical calculations of theoretical first oxidation and reduction potentials were performed and their good fit with experimental values confirm the reliability of the experiments as well as the suitability of the selected calculation method. Similarly, the reasonable correlation of the electrochemical gap with the energy of lambda max and with the HOMO-LUMO gap (Fig. 3) shows close relationship between electrochemistry and photophysics.

Very important is also calculation of molecular geometry and of the HOMO-LUMO maps of our compounds in order to locate the oxidation and reduction centers. Generally, in 2,5-diarylphospholes, e.g. in the basic compound **5a** and many others, the oxidation as well as the reduction center is the π -delocalized system involving the diene part of the heterocycle and both attached aryls (Fig. 4). Upon substitution of strong electron donors or acceptors, however, possible change of location of redox centers may occur, resulting in different potentials and in a change of oxidation or reduction mechanism.

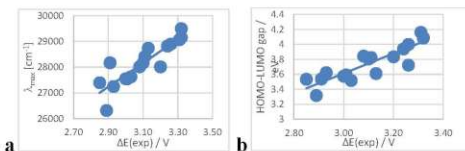


Fig. 3. Correlation of a) $\Delta E(\text{exp})$ and λ_{max} ; b) $\Delta E(\text{exp})$ and calculated HOMO-LUMO gap.

After their fundamental electrochemical, spectroscopic and computational characterization, the new compounds were arranged into several individual homologous „series“, where influence of substituents and their position on a) reduction / oxidation potentials; b) changes and extent of electron delocalization; c) absorption / emission of light was followed and evaluated.

In the series **2a**, **3a**, **4a**, **5a**, **6a**, **7a**, **8a** where the phenyl in the position 5 remains unsubstituted, the number of various groups R1 is sufficiently large to be applied the Hammett's approach (Linear Free Energy Relationship, LFER) where the individual electron donating or electron withdrawing substituent effects (described by the parameter sigma-para) are related to the respective first oxidation or reduction potential. The molecules whose data fit in the respective Hammett's plot (potential vs. σ_p) are oxidized (reduced) according to the same mechanism and have their oxidation (reduction) center in the same position, that means at the diene part of the heterocycle and both attached aryls. On the other hand, in the molecules bearing substituents with more easily oxidizable or reducible center, the location of HOMO and/or LUMO is shifted to the substituent, their redox mechanism (and product) is different, the respective potential is substantially changed and, therefore, their potential values are outlying the Hammett's plot. As a result, the redox abilities could be changed either systematically selecting substituents with various electron donating/withdrawing properties in the frame of LFER, or introducing strong oxidation or reduction centers as substituents.

Among the studied phospholes, diphenylamine (in **2c**, **6a**, **7c**, **9**) substituents are easily oxidizable centers representing in their molecules HOMOs. Analogously reducible center representing LUMO could be for example nitro group, but such derivative is not among our studied phospholes. Generally, large delocalized systems exhibit also easy reduction,

therefore pyrene (in **2c**, **6a**, **9**) or also dithiophene (in **8d**) substituents can serve also as the LUMO (some examples are at the Fig. 4).

Quite interesting is the case of the derivative where the ester, ketone or aldehyde (generally carbonyl) function is attached on the phenyl ring (**2b**, **7a**, **7b**, **7c**, **8b**). Here the carbonyl function enforces the quinoid resonance form on the phenylene which represents well delocalized enlarged planar system⁶ (see the LUMO maps at the Fig. 4) which is easily reducible and represents the first reduction center instead of the core diene system.

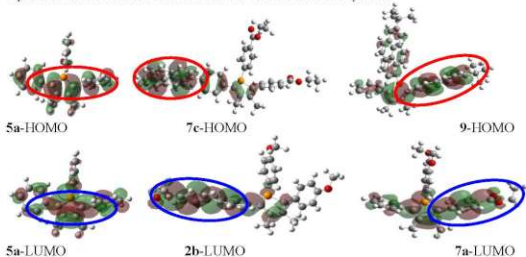


Fig. 4. Examples of various locations of HOMOs and LUMOs.

In the series **7a**, **7b**, **7c** and analogously in **8a**, **8b**, **8c**, **8d**, the increasing π -system shifts the first oxidation potential to less positive values and thus the electrochemical gap $\Delta E(\text{exp})$ decreases with all photophysical consequences.

In derivatives **6a** and **9**, large pyrene π -systems in positions 1 and 2 have degenerated LUMO energy – according to the calculations, the first reduction could occur either on the isolated pyrene in position 1 or on the pyrene in the position 2. On the other hand, in both cases the HOMOs are placed at the pyrene substituent in the position 2 only. And, finally, phosphole oxide (**11**) in contrast to its homologous phosphole (**4a**) shifts substantially reduction as well as oxidation potentials to less negative (more positive) values by approx. 400-500 mV according to expectations.

Acknowledgement: The authors are grateful to the grant support from GAČR No. 18-12150 S and to the institutional support RVO 61388955.

References

1. Szűcs R., Bouit P.-A., Hissler M., Nyulászi L.: *Struct. Chem.* **26**, 1351 (2015).
2. Charrier C., Bonnard H., De Lauzon G., Mathy F.: *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 6871 (1983).
3. Shameem M. A., Orthaber A.: *Chem. Eur. J.* **22**, 10718 (2016).
4. Duffý M. P., Delaunay W., Bouit P. A., Hissler M.: *Chem. Soc. Rev.* **45**, 5296 (2016).
5. Polák P., Čejka J., Tobrman T.: *Org. Lett.* **22**, 2187 (2020).
6. Hoskovicová I., Zvěřinová R., Roháčová J., Dvořák D., Zálíš S., Ludvík J.: *Electrochim. Acta* **56**, 6853 (2011).

EPR-Electrochemical Study of Reduction Mechanism of Pyrene-Cyclobutene Conjugates (EPR-elektrochemická studie redukčního mechanismu konjugátů pyrenu a cyklobutenu)

Lucie Koláčná^a, Peter Polák^b, Jiří Klíma^a, Tomáš Tobrman^b, and Jiří Ludvík^a

^a Department of Molecular Electrochemistry and Catalysis, J. Heyrovsky 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

^b Department of Organic Chemistry, University of Chemistry and Technology Prague, Technická 5, 160 00 Prague 6, Czech Republic

Abstract

Reduction mechanism of pyrene-cyclobutene conjugates were studied electrochemically and spectro-electrochemically. Analysis and interpretation of spectro-electrochemical data of conjugates revealed intramolecular communication of electrons and enabled determination of redox mechanism of conjugates. This knowledge is fundamental for tuning the required redox properties of molecules just by chemical modification. Studied molecules represent promising material for organic semiconductor materials.

Key Words: Pyrene, Cyclobutene, Electrochemical Reduction, Polarography, Cyclic voltammetry, *In situ* EPR spectro-electrochemistry.

Úvod

Čistě organické konjugované systémy nacházejí v současné době široké uplatnění v materiálové chemii¹. Jsou často využívány také pro přípravu organických polovodičů, na které je zaměřen náš projekt. „Green smart molecules“ jsou biodegradovatelné látky, které neobsahují žádné kovy. Velkou výhodou je možnost úpravy jejich vlastností změnou struktury pomocí prosté chemické modifikace.

Naše studie se věnuje konjugátům pyrenu a cyklobutenu. Spojení cyklobutenového můstku – jádra představujícího v podstatě čtyřikrát substituovanou dvojnou vazbu – a aromatického systému umožňuje rozšíření delokalizovaného systému. Elektrochemické vlastnosti těchto látek jsme v dřívějších studiích sledovali na různých elektrodách pomocí redukce v nevodném prostředí^{2,3}. Interpretací zjištěných redukčních potenciálů byly určeny podíly jednotlivých částí těchto složitých molekul na celkových redoxních vlastnostech systémů. Pro určení mechanismu redukce bylo nezbytné naše předchozí poznatky rozšířit o EPR spektro-elektrochemickou studii, jejíž výsledky shrnuje tato práce. Detailní znalost vztahu mezi strukturou a redoxními vlastnostmi těchto konjugovaných systémů umožní cíleně nastavení potřebných parametrů finálních sloučenin použitelných v molekulární elektronice.

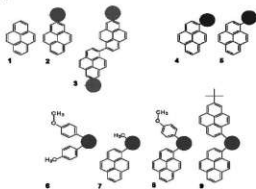
Experimentální část

Elektrochemická měření probíhala v tříelektrodovém uspořádání v nedělené cele v bezvodém dimethylformamidu (DMF), přečištěném azeotropní destilací s benzenem⁴. Pro měření byl jako základní elektrolyt použit 0,1 M tetrabutylammonium hexafluorofosfát. Kyslík byl ze vzorků odstraněn probubláváním argonem. Koncentrace studovaných látek byla přibližně 10⁻³ M. Pracovní elektrodou pro DC polarografii (DC-P) byla kapající rtuťová elektroda s dobou kapky 1 s, pro cyklickou voltametrii (CV) to byla visící rtuťová kapka (HMDE). DC-P byla měřena při rychlosti polarizace 10 mV s⁻¹, pro CV byly použity rychlosti 0,05–5,0 V s⁻¹. Referentní elektrodou byla standardní kalomelová elektroda oddělená solným můstkem naplněným základním elektrolytem, pomocnou elektrodou platinový plíšek. Primární a sekundární radikálové meziprodukty byly generovány elektrochemicky *in situ* elektrolýzou v rezonátoru

spektrometru⁵ na rtuťové a/nebo platinové pracovní elektrodě a byly detegovány elektronovou paramagnetickou rezonancí (EPR); koncentrace látek byla přibližně $5 \cdot 10^{-4}$ M.

Výsledky a diskuse

Cílem studie bylo zjištění vlivu jednotlivých částí molekul na jejich celkové chování při pochopení různých typů mechanismu elektrochemické redukce studovaných látek (Obr. 1).

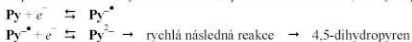


Obr. 1. Studované látky

Již dříve^{2,3} jsme ukázali, že elektrochemická redukce derivátů pyrenu prakticky nezávisí na materiálu elektrody (Hg, Pt, GC). Co se týče rozpouštědel, hodnoty potenciálů na rtuťových elektrodách v DMF jsou systematicky posunuté k méně negativním hodnotám oproti acetonitrilu. V DMF, který patří mezi slabě zásaditá protofilní rozpouštědla, dochází ke zvýšení reverzibility, protože následná protonace produktů je obtížnější a primární radikálové anionty jsou v tomto prostředí stabilnější. Proto byl DMF použit i pro EPR spektroskopii. Hodnoty redukčních potenciálů v DMF a výsledky EPR spektroskopie jsou shrnuty v Tabulce I. Studované látky je možné rozdělit na základě redukčních mechanismů do tří skupin: I. látky obsahující jako redoxní centrum pouze pyren, II. látky obsahující kromě pyrenového jádra další izolované redoxní centrum, III. látky obsahující rozšířený delokalizovaný systém.

I. Látky obsahující jako redoxní centrum pouze pyren

Pyren (1) je redukován ve dvou jednoelektronových reverzibilních krocích na radikálový aniont a poté na dianiont s rychlou následnou protonací za vzniku 4,5-dihydropyrenu⁶.



Radikálový aniont tvořící se v prvním redukčním stupni je stabilní i při nízkých rychlostech polarizace CV (50 mV/s). EPR spektrum radikálového aniontu pyrenu vykazovalo rozlišenou hyperjemnou strukturu se štěpením typu (2H, 4H, 4H) se štěpicími konstantami $a^1_{\text{H}} = 1,05$ G (2H), $a^2_{\text{H}} = 2,15$ G (4H), $a^3_{\text{H}} = 4,8$ G (4H), šířka jedné čáry $\Delta H_{\text{pp}} < 0,3$ G. Druhý jednoelektronový redukční krok probíhá při potenciálu o 600 mV negativnějším a nevykazuje na CV známky reverzibility, spektrum EPR zaniká. To svědčí o tvorbě nestabilního dianiontu.

2-*tert*-butylpyren (2) je redukován stejně jako pyren (1) ve dvou jednoelektronových krocích, díky substituci *tert*-butylem s elektrondonorovým vlivem jsou oba redukční kroky posunuty k negativnějším potenciálům. U EPR spektra produktu prvního redukčního kroku bylo patrné hyperjemné štěpení (HFS), při zvýšení potenciálu na druhý redukční stupeň signál zanikl.

Tabulka I.

Přehled potenciálů [V] a signálů EPR pro jednotlivé redukční kroky

	DC-P, ($E_{1/2}$)	CV-HMDE (E^0 , E_{pc})	Poměr lim. proudů	EPR
1	-2,07 ~-2,64	-2,07 -2,69	1:1	HFS -
2	-2,11 -2,68	-2,14 > -2,74	1:1	HFS -
3	-1,94 -2,13 -2,25 -2,88	-1,94 -2,12 -2,25 -2,87	1:1:1:1	HFS HFS HFS -
4	-1,70 -2,05 -2,65	-1,74 -2,05 -2,69	2:1:(1)	- HFS -
5	-1,80 -2,26 ~-2,67	-1,80 -2,35 -2,70	1:3:1	slabý - -
6	-2,44 > -2,78	-2,48 * > -2,80	1:(1)	- -
7	-1,96 -2,38 -2,61	-1,97 -2,45 -2,66	1:2:1	HFS - -
8	-1,89 -2,11 -2,63	-1,88 -2,11 ** -2,69	1:2:1	slabý, HFS - -
9	-1,70 -1,86 -2,00 -2,13 ~-2,73	-1,71 -1,87 * -2,02 * -2,11 -2,8	1:1:1:1:2	slabý slabý slabý - -

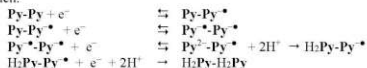
E_{pc} – potenciál katodického peaku; E^0 – potenciál reverzibilního kroku ($E^0 = (E_{pa} + E_{pc}) / 2$); $E_{1/2}$ půlvlnový potenciál;

* reverzibilní pouze při vyšších rychlostech polarizace (cca $v > 1 \text{ V s}^{-1}$);

** posun peaku k negativním hodnotám se zvyšující se rychlostí polarizace;

HFS – hyperjemná struktura EPR signálu

1,1'-bis-(7-terc-butylpyren) (3) je složen ze dvou molekul 2-terc-butylpyrenů (**2**) propojených jednoduchou vazbou. Molekula je redukována ve čtyřech jednoelektronových reverzibilních krocích:

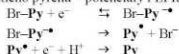


Rozdíl potenciálů prvních tří redukčních kroků je malý, což je způsobené omezením elektronové delokalizace obou pyrenů spojených jednoduchou vazbou, která způsobuje vzájemné stočení jejich rovin. EPR spektra vykazují HFS, její rozlišení se s jednotlivými kroky zlepšuje. V prvním stupni dochází k přenosu elektronu na jeden z pyrenů za vzniku radikál-aniontu $\text{Py}^{\bullet -}\text{-Py}^{\bullet -}$. Ve druhém kroku je elektron přenesen na druhý pyren a vzhledem ke vzájemnému natočení rovin pyrenů vzniká biradikáloid $\text{Py}^{\bullet -}\text{-Py}^{\bullet -}$. Třetí elektron se páruje s jedním z elektronů a díky rychlé následné hydrogenaci vzniká 4,5-dihydropyren, který je

substituentem druhého pyrenu ve formě radikálového aniontu ($\text{H}_2\text{Pyr}-\text{Pyr}^{\bullet-}$). Poslední redukční krok s potenciálem o cca 600 mV negativnějším odpovídá druhému redukčnímu stupni druhého pyrenu za vzniku předpokládaného 1,1'-bis-(7-*terc*-butyl)-4,5dihydropyrenu. EPR spektrum je bez signálu.

II. Látky obsahující kromě pyrenového jádra další redoxní centrum

1-bromopyren (4) obsahuje dvě nezávislá redukovatelná centra – brom a pyren. V prvním kroku dochází k odštěpení bromidového aniontu dvouelektronovým ireverzibilním ECE mechanismem, vzniklý radikál pyrenu je okamžitě redukován dalším elektronem a stabilizován protonací; EPR spektrum nevykazuje signál. V dalších krocích dochází k dvoustupňové redukci vzniklého pyrenu – potenciály i EPR spektra odpovídají redukci pyrenu (1) popsané výše.



1-ethynylpyren (5) také obsahuje dvě redukovatelná centra – pyren a ethynyl. V prvním jednoelektronovém reverzibilním kroku dochází k redukci celé molekuly na nestabilní radikálový anion. Koncentrace vznikajícího radikálového aniontu je nízká, slabý signál neumožňuje podrobnou interpretaci EPR spektra. Vzhledem k tomu, že spektrum je o 2 G širší, nejedná se o radikálový anion čistého pyrenu. Usnadnění redukce (potenciál méně záporný než u radikálového aniontu pyrenu), i rozšíření EPR spektra svědčí o konjugaci trojné vazby ethynylu s aromatickým systémem pyrenu a o rozšíření delokalizovaného systému. Následuje redukce trojné vazby – multielektronový ireverzibilní proces, který probíhá mechanismem prosté redukce trojné vazby a/nebo intermolekulárním procesem s dimerickým produktem. Poslední jednoelektronový děj přísluší druhému redukčnímu stupni pyrenu, který je substituován redukovaným ethynylem.

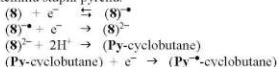
III. Látky obsahující rozšířený delokalizovaný systém.

1-(*p*-methoxyfeny)-2-tolylcyklobuten (6) obsahuje cyklobutenové jádro, na které jsou navázané dva neredukovatelné aromatické substituenty. Kvantově chemické výpočty ukazují na zapojení obou aromátů do delokalizovaného systému spolu s cyklobutenem. V prvním jednoelektronovém redukčním kroku vzniká nestabilní radikálový anion. Indukční efekt methylové a methoxy-skupiny na přilehlých aromátech posouvá potenciál k negativnějším hodnotám. Následuje redukce dvojné vazby cyklobutenu s protonizací za vzniku cyklobutanu. V literatuře (v roztoku THF/NaBPh₄) je popisováno reduktivní otvírání cyklobutenového kruhu^{7,8}. Naše výsledky preparativní elektrolyzy s následnou detekcí produktů pomocí NMR-MS však prokázaly redukci na cyklobutan. V oblasti potenciálů rozkladu elektrolytu je patrný ještě další redukční děj. EPR spektroskopie této látky neposkytla žádný signál.

1-(1-pyrenyl)-2-methylcyklobuten (7) obsahuje cyklobutenové jádro s navázaným pyrenem. Při prvním jednoelektronovém reverzibilním redukčním ději získáváme EPR signál s HFS strukturou. K tomuto ději, odpovídajícímu tvorbě radikálového aniontu v prvním redukčním kroku pyrenu, dochází v důsledku rozšíření delokalizovaného systému pyrenového jádra o cyklobuten při méně negativním potenciálu než u samotného pyrenu. Další ireverzibilní krok je spojen s redukcí cyklobutenového kruhu (viz výše). V oblasti potenciálů rozkladu elektrolytu se objevuje druhý redukční stupeň pyrenu. Tyto redukční kroky neposkytly žádný EPR signál.

1-(1-pyrenyl)-2-(*p*-methoxyfeny)cyklobuten (8) je redukován v prvním jednoelektronovém reverzibilním kroku na nestabilní radikálový anion, který je lokalizovaný na pyrenu. EPR signál s HFS strukturou byl patrný pouze v tomto stupni redukce, měl však slabou intenzitu. Následující multielektronová redukce (dva až tři elektrony), složená ze dvou dějů s blízkými

potenciály, vykazuje neobvyklý jev: CV při nižších rychlostech polarizace vykazuje vyšší reverzibilitu. To lze vysvětlit tak, že delokalizovaný systém s jedním nepárovým elektronem z předchozího kroku přijímá druhý elektron, následuje rychlá protonace způsobující pomalou transformaci na pyren substituovaný cyklobutanem. Ten se po přijetí dalšího elektronu redukuje reverzibilně na stabilní radikálový aniont a poslední redukční krok odpovídá druhému redukčnímu stupni pyrenu.



1-(1-pyrenyl)-2-(7-*tert*-butylpyren-1-yl)cyclobuten (9) představuje nejrozsáhlejší delokalizovaný systém složený ze dvou pyrenů propojených cyklobutenem. Redukce začíná u méně negativních potenciálů než v předchozích případech a je složená ze čtyř jednoelektronových dějů. Nejprve dochází k redukci jednoho z pyrenů na 4,5-dihydropyren. (první dva jednoelektronové procesy). Následuje redukce cyklobutenu (další dva jednoelektronové procesy). Nezapomnějí potenciál přísluší redukci druhého pyrenu. EPR spektroskopie poskytla slabý signál v prvních třech jednoelektronových reverzibilních krocích.

Závěr

Pyren je samostatně i ve studovaných konjugovaných systémech redukován ve dvou jednoelektronových krocích, nejprve na stabilní radikálový aniont a při potenciálech negativnějších o 600 mV na 4,5-dihydropyren. Cyklobutenové jádro rozšiřuje planární delokalizovaný systém, což bylo prokázáno částečnou reverzibilitou prvního redukčního kroku konjugátů. Naopak při přímém propojení dvou pyrenů jednoduchou vazbou nedochází v důsledku vzájemného natočení rovin obou π -systémů k výraznější delokalizaci. Vhodnou substitucí konjugátu cyklobutenu a pyrenu je možné získat látky požadovaných vlastností (redox potenciály a míra delokalizace) vhodné pro přípravu organických polovodičů.

Acknowledgments

Tato práce vznikla v rámci grantu GAČR 18-12150 S a s institucionální podporou RVO 61388955.

References

1. Figueira-Duarte T. M., Mullen K.: *Chem. Rev.* *111*, 7260 (2011).
2. Koláčková L., Tobman T., Ludvík J.: *Proceedings of the International Conference Modern Electrochemical Methods XXXVIII*, 128 (2018).
3. Koláčková L., Polák P., Tobman T., Ludvík J.: *Proceedings of the International Conference Modern Electrochemical Methods XXXVIII*, 147 (2019).
4. Liska A., Vojtisek P., Fry A. J., Ludvík J.: *J. Org. Chem.* *78*, 10651 (2013).
5. Klíma J., Volke J., Urban J.: *Electrochim. Acta* *36*, 73 (1991).
6. Casas-Solvas J. M., Howgogo J. D., Davis A. P.: *Org. Biomol. Chem.* *12*, 212 (2014).
7. Bauld N. L., Cessac J., Chang C. S., Farr F. R., Holloway R.: *J. Am. Chem. Soc.* *98*, 4561 (1976).
8. Bohm A., Meerholz K., Heinze J., Mullen K.: *J. Am. Chem. Soc.* *114*, 688 (1992).

EIS for Protective Layers on Iron Characterization and Development over Time

Roman Košťur and Matilda Zemanová

STU in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Inorganic
Technology and Materials, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia,

E-mail: roman.kostur@stuba.sk

Abstract

Surface treatments on iron based on zinc silicates were performed to improve corrosion resistance. The reason is to find proper conservation methods for historical iron artefacts. Micro-Raman spectroscopy was used to identify corrosion products on iron. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was applied to study corrosion layers. The aim of the project was to compare development of corrosion products over time and to study differences of corrosion resistance for long-term exposed samples. Formed protective layers contribute to increase of corrosion resistance. Corrosion products demonstrate the development of corrosion layers over time.

Key Words: Corrosion products, Micro-Raman spectroscopy, EIS, Magnetite.

Introduction and research aim

Application of iron in these days intervenes in many branches of industry. Beside the industry, an iron also occurs in museums, depositaries or overall included in cultural heritage. It's generally known that iron is susceptible to corrosion deterioration and should be protected. During corrosion reaction, many corrosion products are formed on its surface. These corrosion products may have different chemical composition and colour, which is influenced by type of corrosive environment with the presence of corrosive agents. Corrosion products can vary over the time. Bright-orange akaganeite - Aka (β - $\text{FeO}(\text{OH})$), that is formed in presence of chloride ions, is sequentially changed to G - goethite (α - $\text{FeO}(\text{OH})$)¹. By M. Veneranda² it is known that G and M - magnetite (Fe_3O_4) are considered as stable compounds, which help the preservation of historical iron objects, whereas akaganeite and L - lepidocrocite (γ - $\text{FeO}(\text{OH})$) can be considered as corrosion accelerators.

Iron historical objects need to be sufficiently protected against corrosion attack. Conservation and restoration represent important tools during effort to retrieve and sustain iron historical object in the form, where the corrosion is limited to minimum. There are many ways, how to protect iron surface of historical object against corrosion: cathode and anode protection, corrosion inhibitors or adaptation of parameters influencing corrosion.

This work is focused on zinc silicates surface treatment as type of protection against corrosion. Comparison of corrosion deterioration on samples from different period with surface treatment by micro - Raman spectroscopy should bring idea of corrosion products development. Another objective of the work is EIS measurements of samples with surface treatment in standard corrosive electrolyte to find corrosive resistance of the formed layers.

Experimental

Three types of iron samples with surface treatment were evaluated, each sample come from different time and different corrosivity category. The oldest sample, artefact from Bratislava castle was aged to 300 years (personal communication with Dr. P. Bednár, AÚ SAV, Slovakia) and there was revealed residues of previous surface treatment - bluing at surface. This sample (BC) was identified as a historical ironwork with various corrosion products on surface. Next

one was long-term exposed samples (EXP) from Prague and Kopisty (13-15 years) with surface treatment based on zinc-silicate coating. The surface of sample was corroded to a great extent. Same type of surface treatment as on the second set of samples were made in our laboratory following the procedure from manual³ and corrosion deterioration was evaluated after 1.5 year. The sample was considered as the standard (STD). Atmospheric corrosivity category focused on carbon steel for Bratislava castle and Prague was estimated to be C-2 and for Kopisty and laboratory samples as C-3⁴.

The chemical analysis of the corrosion layers was realized by micro-Raman spectroscopy measurements (Raman microscope DXR IMA4476 ThermoFischerScientific, USA) performed on the different corroded areas. Raman excitation was provided by laser operating at 532 nm with a power 0.1-1mW and with exposure time 5 s. For samples from Bratislava castle and long-term exposition were chosen two analysed areas with characteristic colour. Sample from laboratory showing only one characteristic colour, which was chosen to analyse. Micro – Raman spectra were compared to database of iron phases.

Electrochemical experiment was designed as follows. Electrolyte, the corrosive medium was the ASTM D1384-87 solution with the following composition: 148 mg l⁻¹ Na₂SO₄, 138 mg l⁻¹ NaHCO₃ and 165 mg l⁻¹ NaCl at pH=8.5⁵. Electrochemical tests were performed, in aerated conditions, with a three-electrode electrochemical cell. Whole system had to be connected to a potentiostat- electrochemical interface (Solartron SI1287) and Impedance/Gain phase analyser (Solartron SI1260), driven by a computer. The working electrode surface was vertically oriented close to the graphite counter electrode. The reference electrode was a KCl-saturated calomel electrode (Hg₂Cl₂/Hg, E = +0.242V/SHE) and the working electrode potential was obtained versus this reference. EIS spectra were recorded in accordance with these conditions: open-circuit potential 10⁶ and 5.10⁻² Hz, amplitude 50 mV, 10 points per frequency decade after immersion. The immersion at open-circuit potential was 30 min.

For electrochemical experiment wasn't selected sample from Bratislava castle, because of possible damage of the sample. So, it was selected the sample from laboratory as a standard and other two samples from 13- and 15-years outdoor exposition in atmosphere.

Results and discussion

Analysing Raman spectra, these corrosion products were identified:

- M – laboratory sample = STD (1.5year)
- M, L, Aka – long-term exposed sample = EXP (15years)
- M, L, G – Bratislava castle artefact = BC (300 years)

Each sample contains magnetite. Magnetite represents black layer of corrosion products of iron that forms on iron surface. Magnetite is usually located under layer of orange to red oxo-hydroxides of iron⁶. Fig.1 shows example of micro – Raman spectrum of magnetite. Akaganeite gradually changes to more stable goethite and it could be seen in Fig. 2.

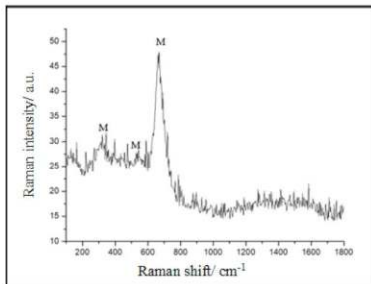


Fig. 1. Micro-Raman spectrum of magnetite.

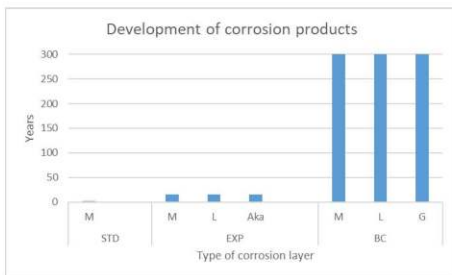


Fig. 2. Development of corrosion products over time.

From EIS measurement, applying equivalent circuits (EC), it was found that the samples can be described by two EC: first one belongs to corrosion products, second one protective layer (Table I). R1 corresponds to resistance of corrosion products, R2 is resistance of protective layer. Resistance of protective layer is decreasing in time and resistance of corrosion products was decreased.

Table I.
Comparison of resistance over time.

Sample	Years of exposition	R1 / $\Omega \text{ cm}^2$	R2 / $\Omega \text{ cm}^2$
STD	1.5	4203	113 380

Conclusion

Corrosion attack of surface treatments corresponds to corrosivity category and exposure time. Corrosion products identified on a surface of the studied samples are mainly composed of magnetite as an internal layer close to the metal. As the outer layers of corrosion products lepidocrocite, akaganeite and goethite were identified. Based on a comparison of the exposure time, it's clearly seen, that akaganeite was transforming to more stable goethite. Based on results from EIS, it was found, that long-term exposed samples with surface treatment provided lower corrosion resistance of protective layer compared to the samples exposed 1.5 year.

Acknowledgments

This research has been supported by a grant from the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences (VEGA) under the contract number VEGA 1/0747/21.

References

1. Kolektiv autorů: *Konzervování a restaurování kovů. Ochrana předmětů kulturního dědictví z kovů a jejich slitin*. Technické museum v Brně. Brno 2011.
2. Veneranda M., Aramendia J., Bellot-Gurlet L., Colombari P., Castro K., Madaragia J.M.: *Corros. Sci.* 133, 68 (2018).
3. PRAGOCHEMA spol.s.r.o.: *Pragokor Metal Antik, BS – aplikační návod*. Praha 2015
4. STN EN ISO 9223:2012 *Korózia kovov a zliatin. Korózná agresivita atmosféry – Klasifikácia, stanovenie a odhad*. (2012).
5. Rocca E., Faiz H., Dillmann P., Neff D., Mirambet F.: *Electrochim. Acta* 316, 219 (2019).
6. Neff D., Bellot-Gurlet L., Dillmann P., Reguer S., Legrand L.: *J. Raman Spectrosc.* 37, 1228 (2005).

**Use of Bare Boron Doped Diamond Electrode for Electrochemical Analysis of Pesticides in Water Samples as an Alternative or Complement to Conventional Methods
(Použití holé bórem dotované diamantové elektrody pro elektrochemickou analýzu pesticidů ve vzorcích vody jako alternativa nebo doplněk konvenčních metod)**

Zuzana Kramplová, Andrea Purdešová, and Jozef Sokol

Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences,

University of Ss. Cyril and Methodius in Trnava, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovak

Republic, E-mail: zuzana.kramplova@fpvucm.sk

Abstract

To prevent possible intoxications, the amount of pesticides in the water must be carefully monitored. By using current conventional methods, such as chromatographic methods with mass spectrometry, it is not possible to avoid accidental exposure, thus the process from manual sampling through sample pretreatment to laboratory analysis is a too long to reflects the real situation. Among the electrochemical sensors that could compete or compete with conventional methods, the unique position belongs to environmentally acceptable carbon material – a boron-doped diamond. Its technological preparation can be key for the sensitive detection of pesticides.

Key Words: Pesticide, Boron-doped diamond electrode, Voltammetry.

Úvod

Monitoring kontaminácie pitnej vody pesticidmi je absolútne nevyhnutný pre zabránenie expozícii škodlivým pesticidom. V dôsledku náhodných expozícií pesticidmi sú v súčasnosti zaznamenané milióny intoxikácií¹. Rada Európskej únie stanovila maximálnu prípustnú koncentráciu celkových pesticidov vo vodách na 0,5 µg L⁻¹. Najvyššia medzná hodnota koncentrácie každého stanoveného pesticidu (MRL – maximálny limit rezíduí) je 0,1 µg L⁻¹ (cit. 2).

Monitoring pesticidov v súčasnosti pozostáva z ručného vzorkovania v teréne, po ktorom nasleduje použitie chromatografických metód³. Tieto metódy využívané v spojení s hmotnostnou spektrometriou sú síce veľmi citlivé, presné a selektívne, no neumožňujú monitoring v reálnom čase, preto často poskytujú len zlomkový obraz skutočnej situácie⁴.

Monitoring pomocou elektrochemických senzorov

Vhodným riešením problémov monitoringu pesticidov prostredníctvom konvenčných metód by malo byť kontinuálne automatické meranie na mieste, ktoré by poskytovalo dôkladnejší obraz o skutočnej situácii. Technológia, ktorá sa stáva sľubnou alternatívou vhodnou pre takéto merania je detekcia pomocou elektrochemických senzorov, ktoré sú zaujímavé vďaka svojej vysokej citlivosti, selektivitě, nízkym nákladom či portabilitě. Týmito zariadeniami je možné získať dostatočne presné informácie v reálnom čase, a preto sú vhodné pre analýzu v teréne či online detekciu mimo pracoviska. Táto možnosť monitorovania je obzvlášť významná pre detekciu pesticidov, ktoré prenikajú do pôdy, povrchových aj podzemných vôd, kedy vzhľadom na rýchly pohyb kontaminácie môže jej odhalenie pomocou konvenčných metód trvať niekoľko rokov⁵.

Návrhy elektrochemických senzorov na stanovenie pesticidov vo vodách neustále pribúdajú, pričom sú skúmané rôzne materiály pracovných elektród, modifikácie ich povrchov rôznymi novými materiálmi či využitie biologických zložiek za účelom zvýšenia citlivosti a selektivity

detekcie. Štúdie sa tiež zameriavajú na minimálnu predúpravu vzorky a dlhodobú stabilitu elektródy. Výhodou navrhovaných zariadení by mala byť aj jednoduchá obsluha bez potreby odborného personálu, čím by sa tiež znížili náklady na prevádzku a časovo zefektívnil monitoring.

Bórom dopované diamantové elektródy

V porovnaní s inými obvykle používanými elektródovými materiálmi je použitie bórom-dopovaného diamantu (BDD) výhodné z niekoľkých dôvodov – počas merania udržiavajú nízky a stabilný prúd pozadia v širokom rozmedzí potenciálov (vodné roztoky do 3 V), sú odolné voči korózii, vysoko tepelne vodivé a zabezpečujú vysokú hustotu prúdu, pri meraniach nie je častokrát potrebné ich mechanické či elektrochemické ošetrovanie, a to vďaka nízkej afinitě pasívnych činidiel k diamantu, keďže je relatívne hydrofóbny. Výhodou je aj nízka citlivosť na rozpustený kyslík vo vzorkách. V oblasti analýz vôd nachádzajú BDDE uplatnenie aj vďaka environmentálne prijateľnej povahe, keďže môžu nahrádzať ortuťové elektródy v mnohých analýzách⁶. V súčasnosti neustále pribúdajú štúdie, ktoré tento materiál prešetrujú voči takým pesticídom, ktoré sú voči BDD elektrochemicky aktívne (Tabuľka 1). Takéto postupy detekcie síce zatiaľ nedosiahli medze stanovenia pod hodnotami danými európskou legislatívou, no mohli by doplniť informácie o aktuálnej situácii vo vodách v čase aplikácie pesticídov, a tak môžu pomáhať predchádzať intoxikáciám a náhodným expozíciám.

Tabuľka 1.

Nedávno navrhnuté BDD senzory, metóda analýzy, pikový potenciál pre vyhodnotenie analytických parametrov a medza detekcie (LOD).

Pesticíd	Metóda	Potenciál	LOD	Ref
Azametifos	SWV	1,70 V vs Ag/AgCl 3 M	0,45 μM	7
Bentazón	DPV	1,00 V vs Ag/AgCl 1 M KCl	0,50 μM	8
Difenokonazol	DPV	1,75 V vs Ag/AgCl sat. KCl	0,05 μM	9
Klomazón	SWV	1,60 V vs Ag/AgCl 3 M KCl	0,21 μM	10
Dinoterb	SWV	1,22 V vs Ag/AgCl 3 M NaCl	0,01 μM	11
Formetanát	SWV	1,10 V vs Ag/AgCl sat. KCl	0,37 μM	12
Diurón	DPV	1,24 V vs Ag/AgCl 3 M KCl	0,04 μM	13
Kys. 2,4-fenoxyoctová	DPV	1,49 V vs Ag/AgCl 3 M KCl	0,12 μM	13
Tebutiurón	DPV	1,74 V vs Ag/AgCl 3 M KCl	0,34 μM	13
Maneb	DPV	0,63 V vs Ag/AgCl 3 M KCl	0,02 μM	14
Metiokarb	DPV	1,40 V vs Ag/AgCl 3 M KCl	0,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$	15
Metomyl	DPV	1,60 V vs Ag/AgCl 3 M KCl	1,20 μM	16
Pikloram	SWV	1,62 V vs Ag/AgCl 3 M KCl	0,39 μM	17
Pirimikarb	DPV	1,0 V vs Ag/AgCl 3 M KCl	1,24 μM	18
Tiabendazol	SWV	1,3 V vs Ag/AgCl sat. KCl	0,13 μM	19

Elektrochemické vlastnosti BDD elektród závisia od niekoľkých faktorov, ako je koncentrácia dopantu, štruktúrne defekty diamantového filmu, terminácia povrchu, obsah iných uhlíkových nečistôt (napr. inklúzie sp^2), kryštalografická orientácia a od frakcií hraníc zrn²⁰. Dopovanie diamantu bórom robí diamant vodivým materiálom, no zvyšovaním dopingu sa zvyšuje aj množstvo sp^2 miest, kvôli čomu dochádza k neželanej adsorpcii organických látok a zvyšovaniu prúdu pozadia, a tiež k zúženiu potenciálneho okna¹⁸. Neželané nečistoty sp^2 je možné odstrániť napríklad pomocou chemickej (alkalickej alebo acidickej) predúpravy, čo môže zvýšiť citlivosť signálu²¹.

S cieľom dosiahnuť celkový potenciálny výkon BDD je potrebné optimalizovať spomínané faktory pre rôzne elektrochemické aplikácie, čo vyžaduje spoluprácu technológov a elektrochemikov. Pre konkrétne aplikácie môže byť prínosné napr. vzorovanie povrchu BDD do mikroarrayových geometrií, či vlákien s priemerom menej ako 10 μm . Chemicko-modifikáciou povrchu BDD možno kontrolovať adsorpciu a kinetiku prenosu elektrónov. Pre online monitoring by mohlo v niektorých aplikáciách pomôcť nájsť vhodné roztoky proti zanášaniu elektród. Rozšírenie potenciálového okna v katodicknej oblasti by zas umožnilo detekciu elektrochemicky redukovateľných pesticídov a iných organických molekúl ²².

Záver

Súčasný stav monitorovania pesticídov vo vodách pomocou chromatografických metód v spojení s hmotnostnou spektrometriou neumožňuje lacnú online detekciu. Ako citlivá alternatíva sa javia elektrochemické senzory využívajúce rôzne materiály a modifikácie pracovnej elektródy. Jedným z najstabilnejších materiálov, ktorý umožňuje detekciu ako v katodickej, tak aj v anodickej oblasti potenciálového okna je BDD. Navrhované senzory síce zatiaľ nedosahujú medze stanovenia pod MRL hodnotami určenými európskou legislatívou, no zmenou niektorých výrobných parametrov či vzorkovaním povrchu BDD by mohlo byť v budúcnosti možné zvýšiť citlivosť detekcie skúmaných pesticídov.

Acknowledgments

This research has been supported Cultural and Educational Grant Agency of the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic (KEGA No. 025UCM-4/2021).

References

1. Ravasová J.: <https://www.unilabs.sk/casopis-invito/chemicke-latky-paralyzujuce-svaly>, staženo 27.9.2021.
2. Smernica Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) 2020/2184 zo 16. decembra 2020 o kvalite vody určenej na ľudskú spotrebu (prepracované znenie) (Text s významom pre EHP)
3. Ballesteros-Gomez A., Rubio S.: *Anal. Chem.* **83**, 4579 (2011).
4. Zheng Q., Chen Y., Fan K., Wu J., Ying Y.: *Anal. Chim. Acta* **982**, 78 (2017).
5. Wang J.: *Acc. Chem. Res.* **35**, 811 (2002).
6. Švorc L., Rievaj M., Bustin D.: *Sensors Actuators B* **181**, 294 (2013).
7. Vukojević V., Djurdjić S., Jevtić S., Pergal M. V., Marković A., Mutić J., Petković B. B., Stanković D. M.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **98**, 1175 (2018).
8. Jevtić S., Stefanović A., Stanković D. M., Pergal M. V., Ivanović A. T., Jokić A., Petković B. B.: *Diamond Relat. Mat.* **81**, 133 (2018).
9. Šelešovská R., Peckova K., Sokolová R., Krejčová K., Martinková-Kelišková P.: *Electrochim. Acta* **381**, 138260 (2021).
10. Djurdjić S.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **2791** (2018).
11. Pinar P. T., Allahverdiyeva S., Yardim Y., Şentürk Z.: *Microchem. J.* **155**, 104772 (2020).
12. Ribeiro F. W. P., Sousa C. P., Morais S., de Lima-Neto P., Correia A. N.: *Microchem. J.* **142**, 24 (2018).
13. Duarte E. H., Casarin J., Sartori E. R., Tarley C. R. T.: *Sensors Actuators B* **255**, 166 (2018).
14. Stanković D. M.: *Electroanalysis* **29**, 352 (2017).
15. Chýlková J., Tomášková M., Švancara I., Janíková L., Šelešovská R.: *Anal. Met.* **7**, 4671 (2015).
16. Costa D. J. E., Santos J. C. S., Sanches-Brandão F. A. C., Ribeiro W. F., Salazar-Banda G. R., Araújo M. C. U.: *J. Electroanal. Chem.* **789**, 100 (2017).

17. da Silva J. I. L., dos Santos V. B., Neves C. A., de Souza J. P. I.: *Chem. Papers* 75, 1055 (2020).
18. Selva T. M. G., de Araujo W. R., Bacil R. P., Paixão T. R. L. C.: *Electrochim. Acta* 246, 588 (2017).
19. Ribeiro F. W. P., de Oliveira R. C., de Oliveira A. G., Nascimento R. F., Becker H., de Lima-Neto P., Correia A. N.: *J. Electroanal. Chem.* 866, 114179 (2020).
20. Svore L., Jambrec D., Vojs M., Barwe S., Clausmeyer J., Michniak P., Marton M., Schuhmann W.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 18949 (2015).
21. Rehacek V., Hotovy I., Marton M., Mikolasek M., Michniak P., Vincze A., Kromka A., Vojs M.: *J. Electroanal. Chem.* 862, 114020 (2020).
22. Muzyka K., Sun J., Fereja T. H., Lan Y., Zhang W., Xu G.: *Anal. Met.* 11, 397 (2019).

Ion Transfer Voltammetry across the Polarized Ionic Liquid/Water Interface: Base for Electrochemical Sensors

Jan Langmaier and Zdeněk Samec

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

Abstract

Some electrochemical techniques such as voltammetry at the polarized interfaces between two immiscible electrolyte solutions (ITIES) represent interesting alternatives to classical electrochemistry. The benefit of the ion transfer voltammetry lies in the possibility of detection of ionic species which are not otherwise redox active. The methodology enables apart of direct determination of ionic samples (including pharmaceutical and clinical ones) also to monitor reaction processes (acido-basic, enzymatic, etc.), determination of reaction substrates and products in one experimental step, evaluation of reaction and transport kinetics, and estimation of lipophilicity of involved species.

Key Words: Ion transfer voltammetry, Ionic liquid, Liquid-liquid interface, Electrochemical detection.

Introduction

In the past two decades, electrochemistry at ITIES, alternatively referred to as the polarized liquid-liquid or water-organic solvent interfaces, has proved to be exceptionally useful tool for electrochemical investigations from both theoretical and practical points of view¹⁻³. Lately, organic solvents such as nitrobenzene, 1,2-dichloroethane or 2-nitrophenyl octyl ether were replaced by room-temperature ionic liquids (RTILs) composed of highly hydrophobic cations and anions, which served as both the solvent and the electrolyte⁴. Compared to the classical molecular solvents, RTILs are extremely stable in a wide range of experimental conditions including elevated temperature, pH range 2-13; they are also non-volatile and environmentally friendly.

Experiment part

RTIL is composed of tetrakis[3,5-bis(trifluoro-methyl)phenyl]borate (TFPB⁻) or tetrakis(pentafluoro phenyl)borate (TPFPB⁻) and tridodecylmethyl ammonium (TDMA⁺)⁶, shown in Fig. 1.

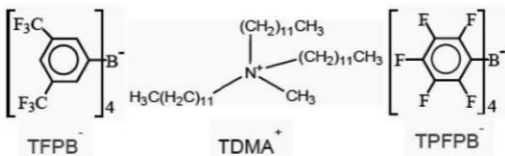
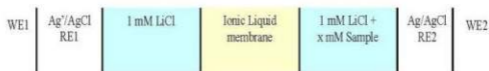


Fig. 1. Examples of hydrophobic components of RTIL components including fluorinated anions and quaternary ammonium cations.

The experimental setup involves a polyvinylidene fluoride microporous membrane impregnated by RTIL separating two aqueous electrolyte solutions ⁷. Measurements are carried out in a four-electrode homemade cell schematically depicted in Scheme 1.



Scheme 1. Four-electrode cell layout, RE1, RE2 and WE1, WE2 stand for reference and working electrodes, respectively.

This arrangement enables to perform the classical electrochemical and electroanalytical experiments, in particular cyclic voltammetry, (differential) pulse voltammetry and impedance spectroscopy, and to obtain analytical and physico-chemical data needed for the model considerations, or analytical applications. Ionic compounds of interest are detected and determined directly, and their concentration profile is monitored *in situ*, i.e., in the reaction mixtures, or separately in batch or flow-through style.

Results and Discussion

ITV is used to investigate the transfer of alkali metal cations, protons, and ammonium ions facilitated by the complex formation with valinomycin at the interface between an aqueous electrolyte solution and RTIL, and enables to evaluate the stability constants of their 1:1 complex with valinomycin ⁶. Based on these results, an amperometric ion-selective electrode for alkali metal cations is designed and the addition of water-soluble crown ethers allows to distinguish the voltammetric responses of alkali and alkaline earth metal cations ⁷.

ITV approach is next used for elucidation of kinetics and mechanism of methylglyoxal reaction with biguanides metformin, phenformin and 1-phenylbiguanide under the physiological conditions ⁸. Kinetic analysis is based on the time profiles of concentrations of the protonated biguanides by measured by ITV, which further enables an evaluation of the acid dissociation constants of these biguanides ⁹.

Evaluation of the lipophilicity of ionic and neutral drug forms, estimation of distribution coefficients (log D), partition coefficients (log P) and dissociation constant (pK_a) using ITV contribute to the deeper understanding of the behavior of drugs during their controlled releases from the non- or semi-polar drug carriers. ITV at RTIL membrane makes it possible to compare the lipophilicity of several biologically active ions such as neurotransmitter acetylcholine and several related ions including choline, muscarine, protonated atropine, protonated scopolamine ¹⁰.

In a related experiment ¹¹, ITV is used for an evaluation of the diffusion coefficients and the standard Gibbs energies of ion transfer of the protonated antimuscarinic agents tolterodine, fesoterodine, and their common metabolite 5-hydroxymethyl tolterodine, as well as for their determination in the aqueous samples and urine. An analysis of the pH effect provides the parameters characterizing their lipophilicity both in their ionic and neutral forms. The application of ITV for a monitoring of the enzymatic hydrolysis of fesoterodine is demonstrated. Differential pulse mode of ITV provides linear concentration dependences of the peak current for all these protonated drugs with detection limits below $\mu\text{mol L}^{-1}$ and the flow-

through injection arrangement makes the limit significantly lower. Fig. 2 presents some examples of the amperometric detection offered by ITV at the polarized RTIL membrane.

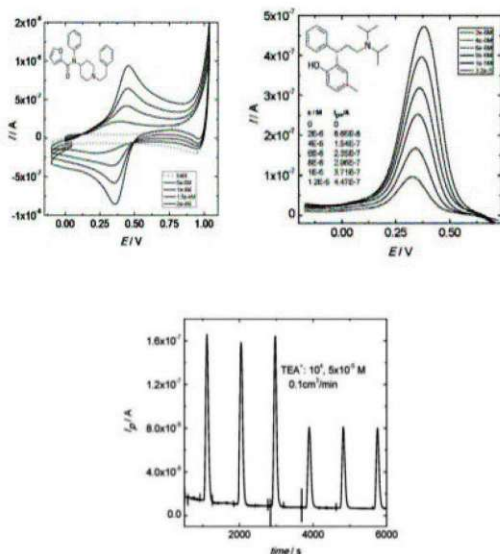


Fig. 2. Cyclic voltammery of furanylfentanyl⁺, differential pulse voltammery of tolterodine⁺ and flow-injection amperometry of TEA⁺.

Conclusions

ITV enables to perform both the classical electrochemical and electroanalytical experiments, such as cyclic voltammery, (differential) pulse voltammery and impedance spectroscopy, and to obtain analytical and physico-chemical data. Ionic compounds of interest are detected directly, and/or their concentration profile is monitored *in situ*, i.e., in the reaction mixtures, or separately in batch or flow-through style.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support by Czech Science Foundation project No. 20-07350S.

References

1. Marecek V., Samec Z., Koryta J.: *Adv. Colloid. Interface Sci.* **29**, 1 (1988).
2. Senda M., Kakiuchi T., Osakai T.: *Electrochim. Acta* **36**, 253 (1991).
3. Shirai O., Kihara S., Suzuki M., Ogura K., Matsui M.: *Anal. Sci.* **7**, 607 (1991).
4. Samec Z., Langmaier J., Kakiuchi T.: *Pure Appl. Chem.* **81**, 1473 (2009).
5. Langmaier J., Samec Z.: *Electrochem. Commun.* **9**, 2633 (2007).
6. Langmaier J., Samec Z.: *Anal. Chem.* **81**, 6382 (2009).
7. Langmaier J., Trojanek A., Samec Z.: *Electroanalysis* **21**, 1977 (2009).
8. Langmaier J., Samec Z., Samcova E., Tuma P.: *J. Electroanal. Chem.* **777**, 26 (2016).
9. Langmaier J., Pizl M., Samec Z., Zalis S.: *J. Phys. Chem. A* **120**, 7344 (2016).
10. Langmaier J., Zalis S., Samec Z.: *J. Electroanal. Chem.* **815**, 183 (2018).
11. Langmaier J., Skopalová J., Navrátil T., Samec Z.: *Electrochim. Acta* **304**, 54 (2019).

Differences in Electrochemical Reduction of Mono- and Polynuclear Acylgermanes (Rozdíly v elektrochemické redukci jedno- a vícejaderných acylgermanů)

Alan Liška^a, Philipp Frühwirt^b, Michael Haas^c, Jiří Ludvík^a, and Georg Gescheidt-Demner^b

^aJ. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences,
Dolejškova 3/2155, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: alan.liška@jh-inst.cas.cz

^bInstitute of Physical and Theoretical Chemistry, Technische Universität Graz,
Stremayrgasse 9, A-8010 Graz, Austria

^cInstitute of Inorganic Chemistry, Technische Universität Graz, Stremayrgasse 9, A-8010
Graz, Austria

Abstract

All the studied compounds accept first electron under formation a stable anion radical. The corresponding reduction potentials in aprotic media depend on electronic (inductive, mesomeric) properties of the substituents, their number, and position. Here, aromatic acyl group (benzoyl group with various substitution on aromatic ring) is the principal substituent. The redox properties of presented organoelement compounds with central heteroatom Ge (Si, Sn) are controlled by peripheral carbonyl groups (in role of redox centers), their number, and aromatic ring substitution. The measured first reduction potentials E_1 values are found in wide range (> 900 mV) due to the fact that the redox centers are carbonyl groups connected through heteroatom in case of acylgermanes, while for di- and trinuclear derivatives (which are molecules with multiple redox centers) the easiest reducible center is the bridging aromatic unit influenced by the closest carbonyl groups. Thus, it is possible to distinguish both groups of non-equivalent carbonyl substituents.

Key Words: Acylgermanes, Electrochemistry, Voltammetry, Polarography, Reduction, Photoinitiators, Ivocerin.

Úvod

Acylgermany představují pestrou třídu organoprvkových sloučenin, které se vyznačují pozoruhodnými fotochemickými vlastnostmi, laditelnými zavedením různých typů periferních substituentů, jejich počtem, polohou, případně způsobem přemostění. Většina známých derivátů podléhá vlivem UV-záření nebo dokonce krátkovlnějšího viditelného světla homolytickému štěpení vazby C–Ge za vzniku radikálů. Některé (např. Ivocerin[®]) se proto již delší dobu používají v zubní medicíně jako fotoiniciátory polymerizace při přípravě bílých netoxických zubních výplní. Příslušné mechanismy reakcí uplatňujících se v praxi jsou v literatuře dobře dokumentovány¹. Vzhledem k tomu, že penetrační hloubka elektromagnetického záření je nepřímo úměrná jeho energii, existuje snaha nalézt další deriváty, které budou efektivně štěpeny světlem o co největší vlnové délce. Kromě absorpčních spektr^{2,3} a teoretických výpočtů molekulových vlastností (ionizační energie, elektronové afinity) se při hledání nových látek s výhodou uplatňují elektrochemické metody, protože poloha prvního redukčního potenciálu (resp. rozdíl mezi prvním redukčním a prvním oxidačním potenciálem) koreluje se schopností molekuly absorbovat světlo a zaujmát vyšší excitované stavy, což se projeví jako poloha dlouhovlnného pásu UV-vis spekter⁴.

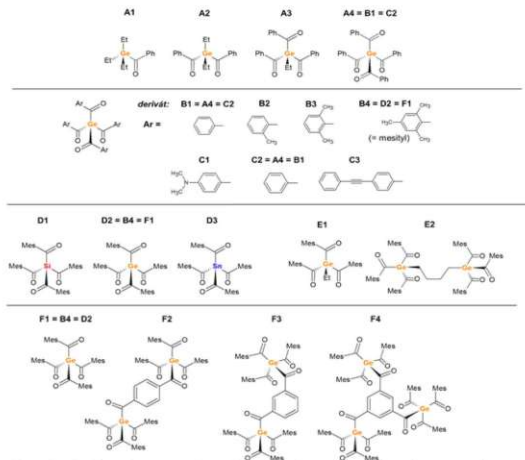
Experimentální část

Mono- a diacylgermany v této studii byly laskavě poskytnuty společností Ivoclar Vivadent AG (Lichtenštejnsko). Ostatní látky byly syntetizovány v anorganické pracovní skupině institutu. Všechny prezentované látky byly měřeny pomocí DC-polarografie a cyklické voltametrie s využitím potenciostatu Autolab PGSTAT12 (Eco Chemie BV, Nizozemsko) a obsluhujícího

software Nova 2.1.4 (Metrohm, Nizozemsko). Jako rozpouštědlo byl použit komerční bezvodý *N,N*-dimethylformamid (99,8%, AcroSeal), základní elektrolyt byl hexafluorofosforečnan tetrabutylamonný (>98,0%, TCI) v koncentraci 0,1 mol.dm⁻³. Pro veškerá voltametrická měření byl využit tříelektroodový systém (W: Hg kapající elektroda pro DC-polarografii, Pt a stříbrná amalgamová elektroda pro CV; R: SCE, A: Pt drát), rychlost polarizace v CV byla 100 mV/s.

Výsledky a diskuse

Současných více než 25 studovaných derivátů lze rozdělit dle strukturálních typů do několika kategorií.



Obř. 1. Strukturní typy studovaných derivátů: mono-, di-, tri-, tetraacylgermany; tetraacylsilany, -germany a -stannany, dvojjaderné a trojjaderné acylgermany (Mes = mesityl, Ph = fenyl, Et = ethyl).

Při srovnání řady mono- až tetraacylsubstituovaných germanů **A1**–**A4** je zřejmé, že větší počet elektronakceptorních acylových skupin na úkor elektronodonorních ethylových substituentů vede k posunu prvního redukčního potenciálu k méně negativním hodnotám (Tab. I.A).

Potenciál redukce samozřejmě ovlivňují i substituenty na acylových fenylech. To je patrné například u série tetraacylgermanů **B1**(=A4) – **B4**. Nahrazujeme-li postupně vodíky v *o*- a *p*-polohách na fenylu metyly, každý přidávaný methyl způsobuje posun E_1 o zhruba konstantní

hodnotu cca 70 mV. Postupný posun potenciálu k negativnějším hodnotám je uveden v Tab. 1B pro čtyři tetraacylgermany: fenyl (**B1**) ($E_1 = -1,40$ V) monomethyl- (**B2**) ($E_1 = -1,46$ V), dimethyl- (**B3**) ($E_1 = -1,53$ V) a trimethylderivátu (mesityl) (**B4 = D2**) ($E_1 = -1,61$ V).

K podobnému závěru dojdeme při porovnání tří tetraacylgermanů, kde na acylových fenylech je v *p*-poloze jednak elektronodonorní *p*-Me₂N-, který se redukuje při $-1,81$ V (**C1**), jednak referenční *p*-H- ($E_1 = -1,36$ V) (**C2 = B1 = A4**) a elektronakceptorní *p*-C₆H₅-C≡C- jehož redukce probíhá již při $-1,12$ V (**C3**) (Tab. 1C). Obě tato pozorování jsou ve shodě s Hammettovou korelací potenciálů redukce s indukivními a mezomerními efekty substituentů, získané potenciály jsou tedy podle očekávání.

Další sérii látek představují jednojaderné tetraacylderiváty **D1–D3** kde se mění centrální heteroatom: Ukázalo se, že jejich redukční potenciál se výrazně nemění, pouze se mírně posouvá k negativnějším hodnotám v pořadí křemík, germanium, cín (Tab. 1D). K podrobnější diskusi zde chybí dostatek podkladů.

Toto předvídatelné chování již zmíněných různých jednojaderných derivátů poukazuje na shodný redukční mechanismus v rámci celé série látek, který zahajuje jednoelektronový reverzibilní krok přenosu elektronu na celou molekulu tvořící spolu s centrálním heteroatomem jeden π -systém za vzniku stabilního radikálového aniontu. Jeho identita byla potvrzena též *ex-situ* pomocí EPR spektroskopie ⁴.

Tabulka I.

Demonstrace vlivu počtu acylových substituentů, jejich substituce, centrálního atomu, typu můstkových skupin a polohy jejich připojení na zjištěné první redukční potenciály.

Látka	E_1 / V vs. SCE	Látka	E_1 / V vs. SCE
PhCOGeEt ₃ (A1)	-1,86	(MesCO) ₂ Si (D1)	-1,50
(PhCO) ₂ GeEt ₂ (A2)	-1,64	(MesCO) ₂ Ge	-1,57
(PhCO) ₃ GeEt (A3)	není k dispozici	(D2 = B4 = F1)	
(PhCO) ₄ Ge (A4)	-1,36	(MesCO) ₂ Sn (D3)	-1,58
B1 = A4 = C2	-1,36	(MesCO) ₂ GeEt (E1)	-1,82
B2	-1,46	E2	-1,81
B3	-1,53		
B4 = D2 = F1	-1,61	(MesCO) ₂ Ge	-1,57
C1	-1,81	(F1 = B4 = D2)	
C2 = A4 = B1	-1,36	F2	-0,89
C3	-1,12	F3	-1,33
		F4	-1,16

U vícejaderných (dvoj-, troj-) acylgermanů záleží zásadně na způsobu jejich připojení. Nejjednodušší je dvojjaderný triacylgerman **E2** kde propojovací – můstkovou skupinou je 1,4-butylen, vázaný přímo na centrální atom germania. Tato dvojjaderná sloučenina se redukuje u stejného potenciálu jako její "monomér" **E1**, (který se od analogického derivátu **A3** liší pouze tím, že namísto fenylů má mesityly). Tato shoda potenciálů ukazuje, že obě triacylgermanová redox centra jsou zcela elektronově izolovaná a redukují se nezávisle na sobě při téměř stejném potenciálu.

Zcela jiná situace je ale u dvoj- a trojjaderných derivátů **F2-F4**, kde propojovacím můstkem je přímo acylový aromát ovlivněný přilehlými karbonyly. Z pozorovaných redukčních potenciálů posunutých k méně negativním hodnotám oproti např. jednojadernému derivátu **F1 = B4** plyne, že je zde kromě acylgermanových redox center ještě další část molekuly, která se redukuje výrazně pozitivněji. Tyto látky jsou tedy molekulami s více redox centry, kde nejspíše redukovatelným centrem je můstkový aromát ovlivněný nejbližšími karbonyly.

Podíváme-li se ještě blíže na toto nové redukční centrum, je zřejmé, že záleží silně na vzájemném postavení karbonylů na můstkovém aromátu a na jejich počtu: Karbonyly, které jsou vůči sobě v *meta*-poloze (**F3 a F4**) se ovlivňují hlavně induktivním efektem, nikoli mezomérním, neboť nejsou společně zapojeny do konjugovaného systému. Jejich elektronakceptorní vliv posouvá potenciál redukce k méně negativním hodnotám, přičemž jejich účinek se sčítá – viz hodnoty potenciálů látek **F3 a F4** v Tab. I.F.

Mimořádná situace ale nastává u látky **F2**, kde karbonyly propojující oba tetraacylgermany jsou vůči sobě v poloze *para*. Kromě induktivního se zde výrazně projeví nejen i mezomérní efekt, ale interakcí těchto dvou karbonylů přes fenyl dojde ke změně struktury celého můstku na chinoidní, což ještě prohloubí elektronovou delokalizaci a tím i výrazně usnadní redukci. Oproti látce **F3**, která má také dva karbonyly, ale v *meta*-poloze, je posun potenciálu o 440 mV! Tento efekt jsme pozorovali u Fischerových aminokarbenových komplexů a jeho interpretace byla potvrzena kvantovými výpočty⁵.

Závěr

Z uvedeného vyplývá důležitost vhodné struktury můstku u dvojjaderných acylgermanů (a nejen u nich). Na rozdíl od látky **E2**, v níž jsou centra redukce (vzájemně se ovlivňující karbonylové skupiny) jednoznačně lokalizována na "vnější" periferii gemylových skupin a můstek neumožňuje konjugaci, v látkách **F2, F3 a F4** hlavní roli hrají "vnitřní" karbonylové skupiny připojené na centrální benzenové jádro. Právě synergie induktivního a mezomérního vlivu vedoucí až ke změně struktury vysvětluje značný rozdíl v hodnotě E_1 (téměř 0,9 V) mezi oběma typy látek a ukazuje na vzájemně neekvivalentní karbonylové skupiny.

Acknowledgement

The authors are grateful for financial support from projects GAČR 21-23261S, NAWI Graz, and institutional support RVO 61388955.

References

1. Hirt T., Moszner N., Burtscher P., Vogel K., Todd J.-C., Heintze S., Peschke A.: Report – Aus der Forschung und Entwicklung der Ivoclar Vivadent AG, 9494 Schaan / Liechtenstein 19, 2 (2013).
2. Haas M., Radebner J., Eibel A., Gescheidt G., Stueger H.: Chemistry–A European Journal 24, 8258 (2018).
3. Radebner J., Leybold M., Eibel A., Maier J., Shuh L., Torvisco A., Fischer R., Moszner N., Gescheidt G., Stueger H., Haas M.: Organometallics 36, 3624 (2017).
4. Frühwirt P., Liška A., Wasdinyl P.T., Kelterer A.-M., Haas M., Ludvík J., Gescheidt G.: Organometallics 39, 2257 (2020).
5. Hoskocová, I., Zvěřinová, R., Roháčová, J., Dvořák, D., Tobrman, T., Zálšíš, S., Ludvík, J.: Electrochimica Acta 56, 6583 (2011).

EPR/UV-VIS-NIR Spectroelectrochemical Examination of the Association Properties of Thienoacene-Bridged Tetrathiafulvalenes Supported by DFT Calculations

Karol Lušpai ^{a,b}, Peter Rapta ^a, Michal Zalibera ^a, Denisa Darvasiová ^a, and Vladimír Lukeš ^a

^a Institute of Physical Chemistry and Chemical Physics, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic,

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

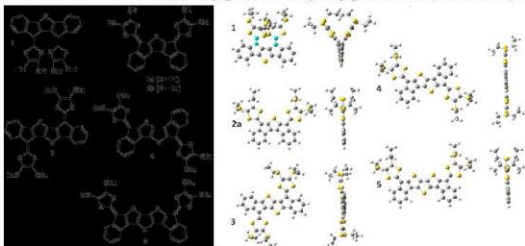
Abstract

This work was focused on the EPR/UV-VIS-NIR spectroelectrochemical examination of association properties of radical cations electrochemically produced from tetrathiafulvalene (TTF) derivatives, in relation to the molecular structure, mainly the number and orientation of thiophene rings in the spacer between fulvalene redox centers. Results from EPR/UV-VIS-NIR spectroelectrochemistry were supported by DFT calculations.

Key Words: Tetrathiafulvalene, EPR/UV-VIS-NIR spectroelectrochemistry, Cyclic voltammetry, Self-assembly, π -Dimerization, Mixed-valence, Multiple redox centers.

Introduction

Tetrathiafulvalene (TTF) is an effective π -electron-donating molecule that displays unique electrochemical behavior ¹⁻³. A characteristic feature of TTF is that, upon stepwise oxidation, it gives rise to two sequentially oxidized species, namely, the TTF radical cation (TTF^{•+}) and the TTF dication (TTF²⁺). π -Dimerization of tetrathiafulvalene (TTF) radical cations has become an important tool in supramolecular chemistry owing to the ability to turn on and off this association by reversible oxidation of TTF. In situ EPR/UV-Vis-NIR spectroelectrochemical studies were performed to obtain a more detailed description of the influence exerted by one or more central thiophene rings and the influence of connecting the two dithiafulvene units in a cross-conjugated or linearly conjugated manner (see Scheme 1) ⁴.



Scheme 1. Investigated extended TTF (1-5) (left) and their geometries of in the neutral state calculated at the B3LYP/cc-pVDZ level of theory using Gaussian09 (right).

Experimental

In situ EPR/UV-Vis-NIR spectroelectrochemical experiments were performed in an optical EPR cavity (ER 4104OR, Bruker Germany) of an X-band CW spectrometer EMX (Bruker, Germany). UV-Vis-NIR spectra were recorded using the diode-array spectrometer Avantes AvaSpec controlled by the AvaSoft 7.5 software. Electrochemical part was performed using HEKA potentiostat PG 390 operated by the PotMaster v2x93 (HEKA Elektronik, Germany) software package, that also triggered both spectral measurements. EPR flat cell with laminated platinum mesh as working electrode, a silver wire as the pseudoreference electrode, and a platinum wire as the counter electrode, was used in spectroelectrochemical experiments. The temperature control in variable temperature experiments was realized by ER4141VT Variable Temperature Accessory (Bruker, Germany). The solvent, dichloromethane (CH_2Cl_2 , dried (max. 0.005% H_2O) SeccoSolv®, Merck), was used as received. Tetrabutylammonium hexafluorophosphate ($n\text{-Bu}_4\text{NPF}_6$, 99 %, Sigma-Aldrich) was dried under reduced pressure for 24 h/70 °C and stored in desiccator before use. The quantum chemical calculations were performed using the Gaussian 09 program package. The optimal geometries were calculated by DFT/B3LYP without any constraints. All calculations of open-shell (ionized) states were evaluated using the unrestricted formalism (UB3LYP) with spin contamination below 0.01. The 6-31G(d,p) and cc-pVDZ basis sets of atomic orbitals were applied. Calculations are described in more detail in the original work ⁴.

Results and discussion

EPR spectroelectrochemical studies of some studied complexes, reveals two slightly different EPR signals upon oxidation, one assigned to the mixed-valence (MV) dimer and the other to the cation monomer. For another samples, interestingly three different EPR spectra were observed upon oxidation. In the region where the cation radicals dominate, a new broadened EPR spectrum with g -value of 2.0056 appears, and simultaneously the UV-Vis-NIR spectra show two strong maxima at 650 nm and 1010 nm.

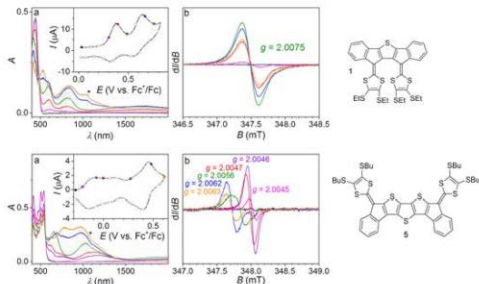


Fig. 1. In situ EPR/UV-Vis-NIR spectroelectrochemistry of **1** and **5** (0.5 mM) in CH_2Cl_2 + 0.2 M $n\text{-Bu}_4\text{NPF}_6$. Optical (a) and EPR spectra (b) correspond to the potential marked with circles in the corresponding voltammogram shown as inset in (a). The color code is maintained throughout the figure.

These species could possibly be ascribed to a $\text{TIF}^{\bullet+} \cdots \text{TIF}^{\bullet+}$ biradical species confirming the strong association between radical cations in this case. Also, the calculations reveal that the triplet ground state is more stable than the singlet ground state for doubly charged large conjugated systems. Going to the region of the second electron transfer, the concentration of such species strongly decreases, and remaining isolated cations exhibits a strongly shifted g -value of $g = 2.0063$, which confirms a lower delocalized spin in comparison to both the $\text{TIF}^{\bullet+} \cdots \text{TIF}^{\bullet+}$ and $\text{TIF}^{\bullet+} \cdots \text{TIF}^{\bullet+}$ associates. The B3LYP/6-31G(d,p) calculated Gibbs energy differences between the triplet and singlet ground states were calculated for all isolated dicationic and selected tetrathiafulvalene $\text{TIF}^{\bullet+} \cdots \text{TIF}^{\bullet+}$ associates (Fig. 2). The calculations reveal that the triplet ground state is more stable than the singlet for 1^{2+} and 3^{2+} , and the compounds are best described as biradicals. On the other hand, the ground states of the doubly charged **2a** and **5** are predicted to be open-shell singlets, while 4^{2+} is found to be in the closed-shell singlet state⁴.

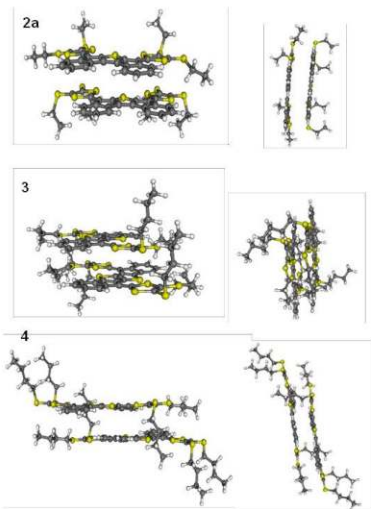


Fig. 2. The B3LYP/6-31G(d,p) optimal geometries (front and side views) of model neutral $\text{TIF}^{\bullet+} \cdots \text{TIF}^{\bullet+}$ associates for **2a**, **3** and **4** (the starting geometries were taken from X-ray structures). Negligible associate geometrical changes were found upon the charging.

Conclusions

As the result from systematic EPR/UV-VIS-NIR spectroelectrochemical studies on a selection of thienoacene-extended tetrathiafulvalenes we found the redox properties are strongly influenced by a remarkable ability of these molecules to associate, when not prevented by deviation from planarity (compound **1**). Compound **1** stood out here again as the one with the strongest associations between radical cations and between radical cations and neutrals. The intrinsic absorptions as well as those originating from associations of radical cations expand a remarkable broad region of the UV-Vis-NIR region, with absorption spectra that depend strongly on the structure of the spacer, and these thienoacene-extended tetrathiafulvalenes. From this reason seem these molecules promising for electrochromic materials applications⁴.

Acknowledgments

The authors acknowledge the support of Slovak Research and Development Agency (APVV-15-0053 and APVV-19-0024) and Slovak Scientific Grant Agency VEGA (1/0504/20, 1/0466/18). The investigated structures were synthesized in the University of Copenhagen by the prof. M. B. Nielsen group (see ref. 4).

References

1. Skabara P.J., Sallé M.: *Beilstein J. Org. Chem.* *11*, 1528 (2015).
2. Bergkamp J.J., Decurtins S., Liu S.X.: *Chem. Soc. Rev.* *44*, 863 (2015).
3. Jana A., Ishida M., Park J.S., Bähring S., Jeppesen J.O., Sessler J.L.: *Chem. Rev.* *117*, 2641 (2017).
4. Andersen C.L., Zalibera M., Luspai K., Christensen M.A., Darvasiova D., Lukes V., Raptap, Haley M.M., Hammerich O., Nielsen M.B.: *ChemPlusChem.* *84*, 1279 (2019).

Square-wave Voltammetric Detection of Ergosterol as an Indicator of Fungal Contamination of Foodstuff
(Square-wave voltametriická detekce ergosterolu jako indikátoru kontaminace potravin plísněmi)

Barbora Martinková ^a, Gylxhane Kastrati ^a, Iveta Brožková ^a, Tomáš Mikysek ^b, Zuzana Bilková ^a, and Lucie Korecká ^b

^a Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: lucie.korecka@upce.cz

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

Abstract

Ergosterol is a fungal-specific membrane sterol, whose amount correlates with fungal growth. Therefore, it could be used as biochemical marker of fungal contamination of food raw materials or products. This work aimed at implementation and optimization of square-wave voltammetric method for detection of ergosterol as simple screening method instead of time-consuming microbiological methods or liquid chromatography. Three different working electrodes, glassy carbon electrode, boron doped diamond electrode and screen-printed boron doped diamond electrode, were used and compared. Conditions of electrochemical detection were optimized. Finally, real samples represented by fungal mycelium and grain were analyzed.

Key Words: Ergosterol, Square-wave voltammetry, Glassy carbon electrode, Fungal contamination, Boron-doped diamond electrode, Screen printed electrode.

Úvod

Ergosterol (provitamin D₂, ergosta-5,7,22-trien-3β-ol) je hojně rozšířenou látkou, strukturně podobnou cholesterolu ¹. Je přítomný v buněčných membránách, kde reguluje její permeabilitu ². Jeho název byl odvozen od ergotismu, mykotoxikózy vyvolané obvykle kontaminovanými potravinami ³. Typický je výskyt ergosterolu v buňkách hub a plísní ². Ty jsou častými kontaminanty obilí, ořechů, sušených a dalších potravin, což vede nejen ke snížení kvality potravin, ale vzhledem k produkci sekundárních metabolitů (mykotoxinů), k riziku zdraví nebezpečných otrav ⁴⁻⁶.

Mikrobiologické metody stanovení přítomnosti plísní a mykotoxinů v potravinách jsou časově náročné. Proto je snaha hledat jednodušší a rychlejší screeningové metody stanovení kontaminace potravin. Bylo prokázáno, že existuje korelace množství produkovaného ergosterolu s růstem dané plísně ^{7,8}. Proto může být ergosterol biochemickým markerem kontaminace plísněmi.

Ergosterol lze, vedle běžně využívaných metod, kterými jsou zejména vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) ^{9,10}, plynová chromatografie (GC) ¹¹, nebo pro vzorky potravin e-nose ¹², stanovit elektrochemicky. Z detekčních metod lze využít diferenčně pulzní voltametrii (DPV) nebo square-wave voltametrie, jako pracovní elektrody jsou v literatuře zmiňovány elektroda ze skelného uhlíku (GCE) nebo borem dopovaná elektroda (BDDE) ¹³⁻¹⁵.

Cílem naší práce bylo optimalizovat parametry elektrochemické detekce a porovnat využitelnost tiskných tříelektrodoých senzorů s pracovní borem dopovanou diamantovou

elektrodou (SPE-BDDE) s GCE a BDDE. Po optimalizaci metody byl proveden pilotní experiment se vzorky známého množství směsi plisní.

Experimentální část

Chemikálie

Ergosterol (3 β -Hydroxy-5,7,22-ergostatriene), chloristan lithný (LiClO₄), Tetrabutylamonium hexafluorofosfát (Bu₄NPF₆), acetonitril bezvodý, methanol bezvodý, ethanol, izopropanol, dichlormethan (DCM) a *N,N*-dimethylformamid byly zakoupeny od firmy Merckgroup (Darmstadt, Německo). Ostatní chemikálie byly čistoty p.a (PENTA, Chrudim, ČR).

Přístroje

Pro elektrochemická měření byl používán kompaktní potenciostat PalSens2 se software PSTrace5 (PalmSens BV, Houten, Nizozemsko). Měření probíhala v tříelektrodovém uspořádání, kdy jako pracovní elektroda byla použita elektroda ze skelného uhlíku (GCE) (Metrohm, Herrisau, Švýcarsko) nebo borem dopovaná diamantová elektroda BDDE (Windsor Scientific, Velká Británie), jako referentní argentchloridová (Metrohm, Herrisau, Švýcarsko) a jako pomocná platinová (Elektrochemické detektory, ČR). Vedle toho byla použita i tištěná elektroda (SPE-BDDE) s pracovní BDDE elektrodou, referentní stříbrnou a pomocnou uhlíkovou elektrodou (Metrohm, Herrisau, Švýcarsko). GCE elektroda byla před měřením leštěna suspenzí Al₂O₃ prášku.

Podmínky elektrochemické detekce

Měření probíhalo v roztoku elektrolytu (0,1 M ACN/LiClO₄), BDDE elektroda byla před měřením aktivována proměřením 10 cyklických voltamogramů v rozsahu potenciálu od -1,5 do +1,6 V. Měření probíhalo za optimalizovaných podmínek: potenciálové okno od +0,4 do +1,2 V, potenciálový krok 5 mV, depoziční čas 150 s, depoziční potenciál +0,6 V, ekvilibrační čas 8 s, amplituda pulzu 45 mV, frekvence pulzu 10 Hz. Oxidační pik ergosterolu byl odečítán v maximu piku (+0,92 V)

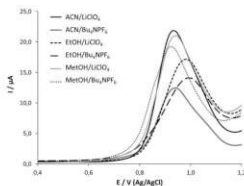
Výsledky a diskuse

Pro stanovení ergosterolu byla jako detekční metoda zvolena square-wave voltametrie SWV a pro měření byly testovány tři typy elektrod, dvě běžné elektrody, konkrétně elektroda ze skelného uhlíku (GCE, Windsor Scientific, Velká Británie) a borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE, Metrohm, Švýcarsko). Vedle toho byly testovány i komerční tištěné tříelektrodové senzory s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou (SPE-BDDE, Metrohm, Švýcarsko). Tištěné elektrody byly vybrány s ohledem na zamýšlenou využitelnost dané metody jako screeningové metody pro detekci kontaminace potravinových surovin plisněmi.

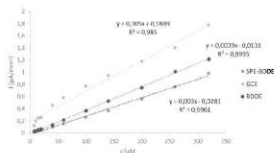
Měření probíhala v prostředí organických rozpouštědel s přidávkem chloristanu lithného (LiClO₄) nebo Tetrabutylamonium hexafluorofosfátu (Bu₄NPF₆). Byly testovány: bezvodý acetonitril, methanol, ethanol, izopropanol a *N,N*-dimethylformamid. S ohledem na cenu SPE byly analýzy provedeny s GCE a BDDE elektrodami. Nejlepších výsledků bylo dosaženo měřením v prostředí acetonitrilu, methanolu. V prostředí ethanolu došlo k posunu oxidačního piku k pozitivnějšímu potenciálu. Nejlepší výsledky byly získány ve směsi ACN/LiClO₄ jako elektrolytu, a to pro oba typy elektrod (výsledky měření s BDDE jsou uvedeny na obrázku 1). V dalších experimentech byly optimalizovány parametry SWV, depoziční čas, amplituda pulzu a frekvence pulzu. Optimalizované podmínky jsou uvedeny v experimentální části. Následně byly porovnány všechny tři výše uvedené elektrody proměření kalibračních závislostí standardu ergosterolu v rozmezí koncentrací 7,5–320 μ M. Výsledky jsou uvedeny na obrázku

2. Bylo opakovaně ověřeno, že v případě SPE-BDDE lze jednu elektrodu použít pro přibližně 4 měření. Pro všechny tři elektrody byl kalkulován limit detekce (LOD) mez stanovitelnosti (LOQ), kde nižších hodnot bylo dosaženo pro BDDE a SPE-BDDE v porovnání s GCE.

Pro ověření praktické využitelnosti metody byl analyzován reálný vzorek obsahující známé množství ($2,6 \times 10^1$ cfu/g) plísní rodu *Mucor*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus brasiliensis* a *Penicillium*. Ergosterol byl ze vzorku extrahován směsí MeOH/DCM (75:25, v/v), poměr pevné a kapalně fáze činil 1:25 (w/w). Extrakce byla opakována 3x s následným odpařením frakcí a rozpuštěním v elektrolytu (ACN/LiClO₄). Při měření byl zaznamenán oxidační pik ergosterolu na GCE a SPE-BDDE. Nejvyšší proudová odezva byla získána na GCE. Na BDDE byla na hraně hodnotitelnosti v porovnání se signálem čistého elektrolytu. V případě reálného vzorku se jedná o první experimenty, kde způsob extrakce vycházel z literatury¹⁵. Bude následovat úprava podmínek extrakce ergosterolu ze vzorku pro dosažení vyšší účinnosti.



Obr. 1. SW voltamogram ergosterolu (500 μM) v různých elektrolytech (Acetonitril (ACN)/LiClO₄; Acetonitril (ACN)/Bu₄NPF₆; Ethanol (EtOH)/LiClO₄; Ethanol (EtOH)/Bu₄NPF₆; Methanol (MeOH)/LiClO₄; Methanol (MeOH)/Bu₄NPF₆. BDDE elektroda.



Obr. 2. Kalibrační závislosti proudové hustoty na koncentraci ergosterolu naměřené na elektrodách: BDDE – borem dopovaná diamantová elektroda (windsor Scientific); GCE – elektroda ze skelného uhlíku (Metrohm); SP-BDDE – tiskěná borem dopovaná diamantová elektroda (Metrohm).

Závěr

V rámci experimentů byly pro stanovení ergosterolu testovány tři typy elektrod a optimalizovány podmínky elektrochemického stanovení. Jako nevhodnější elektrolyt pro všechny tři typy elektrod byl zvolen acetonitril s přidávkou LiClO₄. V prvních experimentech s reálným vzorkem, který byl tvořen směsí plísní, byl zaznamenán pik ergosterolu. Metoda se jeví jako využitelná pro screening kontaminace vzorků potravin, a to i s využitím SPE-BDDE,

nicméně je nutné nalézt nejvhodnější způsob extrakce ergosterolu pro zvýšení citlivosti stanovení.

Acknowledgments

Project of Czech Science Foundation (No. 20-01589S), financial support from the Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice project No. SGS-2021-005 and OP RDE project „Strengthening interdisciplinary cooperation in research of nanomaterials and their effects on living organisms“, reg. no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007421 are gratefully acknowledged.

References

1. Vazirian M., Faramarzi M. A., Ebrahimi S. E. S., et al.: *Int. J. Med. Mush.* 16, 77-84 (2014).
2. Dohnal V., Ježková A., Skládanka J.: *Ergosterol; klíčový steroid hub.* Kontakt 2, 449-454 (2008).
3. Vandamme E. J.: *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors.* Elsevier Applied Science, New York, 1989.
4. Kadakal Ç., Tepe T. K.: *Food. Rev. Int.* 35, 1-9 (2018)
5. Günaydin Ş., Karaca H.: *Akademik Gıda*, 13, 173-182 (2015)
6. Tanner M. E.: *Natur. Prod. Rep.* 32, 88-101 (2015)
7. Ekinci R., Otağ M., Kadakal Ç.: *Food. Chem.* 150, 17-21 (2014)
8. Yassihüyük N., Kadakal Ç., Otağ M. 5, 379-384 (2014)
9. Lohr D., Woeck Ch., Meinken E.: *Eur. J. Hort. Sci.* 82, 3-11 (2017)
10. Ito M., Ishimaru M., Shibata T., Hatate H., et al.: *Food Anal. Method*, 10, 2692-2699 (2017)
11. Zhou J., Guan W., Liang C., Yang F., et al.: *Anal. Let.* 48, 241-247 (2015).
12. Gancarz M., Wawrzyniak J., Gawrysiak-Witulska M., Wiącek D., et al.: *Int. Agrophys.* 31, 317-325 (2017).
13. Luong J. H. T., Male K. B., Glennon J. D.: *Analyst*, 134, 1965-1979 (2009).
14. Suljkanović M., Grabarczyk M., Wardak C., Adamczyk M., et al.: *Environment. Eng.* 6, 1-6 (2019).
15. Vukojević V., Djurdjić S., Švorc L., Veličković T. Č., et al.: *Food Anal. Met.* 11, 2590-2596 (2018).

The First Study of the Electrochemical Behavior of Mephenoxalone and its Determination using Screen-Printed Sensors with Chemically Deposited Boron Doped Diamond Electrode

Oleksandr Matvieiev ^a, Renáta Šelešová ^a, Marian Vojs ^b, Marián Marton ^b, and Jaromíra Chýlková ^a

^aUniversity of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Institute of Environmental and Chemical Engineering, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: oleksandr.matvieiev@student.upce.cz

^bSlovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Electrical Engineering and Information Technology, Institute of Electronics and Photonics, Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava, Slovak Republic

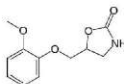
Abstract

Electrochemical oxidation of a mephenoxalone (MNL) was firstly studied using boron doped diamond electrode (BDDE). At different pH, an irreversible anodic peak was observed at potential of +1.375 V (vs. Ag/AgCl). The voltammetric method for MNL determination was developed using square wave voltammetry. This method provides low limit of detection ($5.5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$), wide linear dynamic range (1.0×10^{-7} – $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), and good recovery in the analysis of model samples as well as pharmaceutical preparation Dimexol 200 mg. The developed method was successfully transferred to the commercially available and lab-made screen-printed sensors with chemically deposited BDDE.

Key Words: Mephenoxalone, Dimexol, Electrochemistry, Voltammetry, Screen-printed sensors, Boron doped diamond electrode.

Introduction

Mephenoxalone (MNL, IUPAC name: 5-[(2-methoxyphenoxy)methyl]-1,3-oxazolidin-2-one) is the active substance in pharmaceuticals which has a nephro pharmaceutical effect and helps with anxiety in humans ¹⁻³, so it acts as a tranquilizer ⁴⁻⁷. MNL has relaxing properties for muscles and provides a pronounced sedation without causing serious side effects in humans ^{6,8}. MNL in combination with paracetamol has an analgesic character ⁹. Studies in dogs and rats have shown that long-term exposure to MNL leads to anemia, weight loss, hemolytic anemia and death in animals ^{1,2,10,11}. Therefore, such animal side effects require clear and precise control of the concentration of MNL in the environment.



Scheme 1: Structural formula of mephenoxalone.

To date, different instrumental detection methods are used to determine MNL, such as high-performance liquid chromatography with fluorescence detection ^{4,12,13}, spectrophotometry ³, and nuclear magnetic resonance ¹⁴ (NMR). All of these methods are exact, sensitive and selective. On the other hand, they are also expensive, instrumentally demanding, time consuming, and often require complicated sample preparation before analysis. An acceptable alternative may be electrochemical methods, which are characterized by no less accuracy, speed, simplicity, low cost and relatively simple sample preparation.

Until now, there is no information on the electrochemical behavior of MNL. Also, there is no information about the possibility of voltammetric determination of MNL in the literature. Therefore, this work will be devoted to the study of the electrochemical behavior of MNL at BDDE and to the development of a method for its determination. BDDE was chosen as working electrode due to its excellent electrochemical properties including a wide available potential window (3 V), low background current, good chemical resistance, low current noise, resistance to passivation, and high hardness¹⁵⁻¹⁸. BDDEs have been used frequently to determine a variety of drugs and health-hazardous substances¹⁹. In recent years, more and more scientific progress is focused to the miniaturization of equipment, speeding up the process and reducing the cost of analysis of various substances. Screen-printed sensors (SPE) are a partial solution to these problems, as they reduce the amount of aliquot to be analyzed and allow field analysis to be performed using mini-potentials. Therefore, in this work, the possibility of using printed sensors with chemically deposited BDDE (SP/BDDE) to determine the MNL was also be tested.

Experimental

Britton-Robinson buffer (BRB, pH 2–12) was prepared by mixing the acidic and alkaline components under a pH meter. The acidic component was a 0.04 M solution of H_3PO_4 , H_3BO_3 and CH_3COOH . The alkaline component was created by 0.2 M NaOH, 0.1 M HNO_3 , 0.05 M H_2SO_4 , 0.1 M H_2SO_4 , 0.1 M HCl, 0.1 M $HClO_4$ were diluted from concentrated 65 % HNO_3 , 96 % H_2SO_4 , 70 % HCl, 64.5 % $HClO_4$ (all from Ing. Petr Švec-PENTA s.r.o., Czech Republic). 1×10^{-3} M solution of MNL (Sigma-Aldrich) was prepared by dissolving the appropriate batch in acetonitril (Ing. Petr Švec-PENTA s.r.o., Czech Republic) and stored in a refrigerator. Solutions with lower concentrations were prepared fresh by diluting them with BRB daily. The pharmaceutical preparation Dimexol 200 mg (Glenmark Pharmaceuticals Distribution s.r.o., Czech Republic) was analyzed as a practical sample.

Voltammetric measurements were performed using Autolab PGSTAT204 (Metrohm Autolab, Netherlands) equipped with software Nova 2.1. Measurements were performed in a three-electrode set up with bulk BDDE (BioLogic, active surface area of 7.07 mm², inner diameter of 3 mm, B/C ration during deposition 1000 ppm) as a working electrode (WE), saturated argentchloride electrode (Ag/AgCl (KCl, sat.)) as a reference (RE) and platinum wire as a counter (CE) electrode (both Monokrystal, CZ). Commercially available SP/BDDE (DropSens, active surface area of 10.17 mm², inner diameter of 3,6 mm, B/C – producer does not provide this information) whil WE from BDD, CE from carbon, and RE from silver. The lab-made (LM) SP/BDDE was the second one consisted of BDD as WE as well as CE and silver RE (active surface area of 0.785, 3.14, 7.07 mm², inner diameter of 1, 2, 3 mm, B/C 312,500 ppm). In all cases, BDDEs were activated at the beginning of the working day by performing 20 cyclic voltammograms in the potential range from initial potential (E_{in}) of -1000 mV to switching potential (E_{switch}) of +2200 mV directly in the supporting electrolyte used. Activation procedure was terminated at the positive potential value, i.e., at the final potential (E_{fin}) +2200 mV. It was found that there was no need to reactivate or regenerate the electrode surfaces in any way between particular measurements. The measurement took place on the O-terminated electrode surface. Prior to measurements with SP/BDDEs, only as many cycles were performed until the recorded signals were stable.

Parameters of calibration curves and confidence intervals were calculated on the level of significance 0.05. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated from the calibration dependences as three times standard deviation and ten times standard deviation of an intercept divided by a slope.

Results and discussion

Voltammetric behavior of MNL ($2.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) was firstly studied using the bulk BDDE in slightly acidic medium of BRB of pH 5 at the scan rate of 100 mV s^{-1} . The obtained cyclic voltammograms are shown in Fig. 1A. On the obtained voltammograms there is one clearly expressed peak at the potential +1375 mV, and a little pronounced second peak +1580 mV. On the cathode part of the voltammograms there are no corresponding reduction peaks, which indicates that this oxidation reaction is irreversible. As it was found from the following studies of the effect of pH of the electrolyte on the anode signals, the optimal pH value is 9, because only one peak of MNL oxidation was observed. When using a solution of 0.1 M HNO₃, two distinct, separated peaks of anodic oxidation of MNL are observed, but the results are not reproducible. When using different types of acids (H₂SO₄, HCl, HClO₄) as a supporting electrolyte, the same situation is observed as in the BRB buffer, the peaks are not separated. Based on the dependences of the peak height on the scan rate, respectively on the square root of the scan rate it follows that these reactions are controlled by diffusion. When studying the electrochemical behavior of MNL at different electrodes (bulk BDDE, SP/BDDE and LM-SP/BDDE) there is a shift of the oxidation peak potential to a more negative region, which is most associated with the use of different reference electrodes. The height of the oxidation peaks is slightly lower on the SPS compared to the bulk BDDE (Fig. 1B).

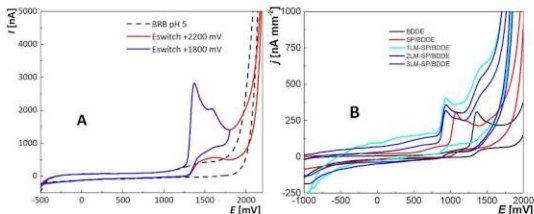


Fig. 1. Cyclic voltammograms of $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ MNL recorded on the BDDE (A) and on bulk BDDE, SP/BDDE, and LM-SP/BDDEs recalculated to current densities; Method – CV, $E_{in} = E_{fin} = -1500 \text{ mV}$, $E_{switch} = +2200 \text{ mV}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; supporting electrolyte – BRB (pH 5 (A) and 9 (B)).

The square wave voltammetry (SWV) provides higher current peaks of MNL compared to the differential pulse voltammetry (DPV). Therefore, this method was applied for its determination and the BRB (pH 9) was chosen as the supporting electrolyte. The next stage was optimizing of SWV parameters – scan rate (v) = 50 mV s^{-1} , modulation amplitude (A) = $+40 \text{ mV}$, and frequency (f) = 25 Hz . Moreover, the insertion of pre-treatment procedures such as CV, cathodic and anodic polarization and polishing were tested. Highest and well repeatable peak was achieved after cycling. Therefore, this procedure was chosen as the most suitable. Finally, the concentration dependences were measured and the basic statistical parameters as linear dynamic range (LDR), LOD, and LOQ were calculated (Table I). The ranges of linear dependence of peak height on MNL concentration for all electrodes are shown in Fig. 2A.

Table I.

Statistical parameters for MNL determination.

Electrode	LRD [mol L ⁻¹]	LOD ^a [mol L ⁻¹]	LOQ ^a [mol L ⁻¹]	RSD ₁₁ ^b [%]
BDDE	1.0×10 ⁻⁷ –3.0×10 ⁻⁵	5.5×10 ⁻⁸	1.8×10 ⁻⁷	0.89
SP/BDDE	3.0×10 ⁻⁷ –2.1×10 ⁻⁵	9.4×10 ⁻⁸	3.1×10 ⁻⁷	0.65
1LM-SP/BDDE	4.0×10 ⁻⁷ –3.0×10 ⁻⁵	9.9×10 ⁻⁸	3.3×10 ⁻⁷	0.66
2LM-SP/BDDE	3.0×10 ⁻⁷ –3.0×10 ⁻⁵	7.4×10 ⁻⁸	2.5×10 ⁻⁷	0.60
3LM-SP/BDDE	5.0×10 ⁻⁷ –3.0×10 ⁻⁵	5.8×10 ⁻⁸	1.9×10 ⁻⁷	0.95

^a Calculated from the recorded concentration dependence in the range of 5×10⁻⁷–1×10⁻⁵ mol L⁻¹.

^b Calculated from the 11 repeated measurements at the concentration of MNL of 5×10⁻⁶ mol L⁻¹.

In the following step, this method was verified in analysis of model solutions with MNL concentrations of 1.0×10⁻⁶ and 5.0×10⁻⁶ mol L⁻¹ using the standard addition method (SAM). The analysis was 5 times repeated and the corresponding statistical parameters were calculated. In addition, the developed method was also applied in the analysis of the medicinal product Dimexol 200 mg. In general, the obtained results were correct and very well repeatable (*RSD*₅ < 2.6 %), which confirms that the method is suitable for the determination of MNL.

The final step was to check the reproducibility of the results between the individual pieces of electrodes of the same type. This feature is especially important with regard to the possibility of using SPE as disposable sensors. And it is known that the reproducibility of printed sensors can be a problem. For this purpose, 10 repeated measurements of 1.0×10⁻⁵ mol L⁻¹ MNL were performed on a series of all tested sensors and the obtained peak heights are summarized in Figure 2B after recalculation to the current densities. It is clear that all the types of sensors investigated show very good reproducibility (*RSD*₅ < 5.0 %).

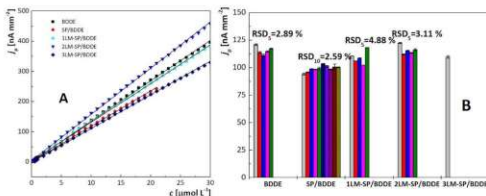


Fig. 2. Dependences of current densities on MNL concentration obtained on all tested electrodes (A) and peak height diagram of MNL (1.0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹) obtained on all tested electrodes (B): Method – SWV, supporting electrolyte – BRB (pH 9), E_{in} = 0 mV, E_{fin} = +2000 mV, v = 50 mV s⁻¹, A = +40 mV, f = 25 Hz.

Conclusion

In this work, the electrochemical behavior of mephexalone on a BDDE was studied for the first time. The oxidation reaction of MNL is irreversible and is controlled by diffusion. The method for determination of MNL was developed, which was successfully applied in the

analysis of model solutions and commercially available pharmaceutical preparation Dimexol 200 mg. This new method was tested also using SPE with chemically deposited BDDE. The repeatability of the voltammetric measurement of MNL on one sensor as well as the reproducibility on a series of SP/BDDEs was confirmed very good. The results indicate the suitability of the developed method for MNL determination applying different types of BDD sensors, *i.e.*, different arrangement of an electrochemical cell with BDDE as working electrode.

Acknowledgments

This work was supported by the grant project of The Czech Science Foundation (project No. 20-01589S), grant of the Slovak Research and Development Agency (APVV-16-0124), VEGA grants No. 1/0558/20 and by The University of Pardubice (projects No. SGSFCt_2021_003).

References

1. Benitz K.-F., Moraski R., Roepke R. R., Wozniak L. A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **4**, 220 (1962).
2. Kraft I. A.: *Clin. Not.* **118**, 841 (1962).
3. Erk N.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **21**, 429 (1999).
4. Bredikhin A. A., Bredikhina Z. A., Zakharychev D. V., Pashagin A. V.: *Tetrahedron: Asym.* **18**, 1239 (2007).
5. Lowinger P.: *Clin. Not.* **120**, 66 (1963).
6. Ochoa-Terán A., Rivero I. A.: *Arkivoc* **2008**, 235 (2008).
7. Dohnal J., Volková Z., Vytřas K.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7**, 755 (1989).
8. Laveck G. D., Bwklely P.: *J. Chronic. Dis.* **13**, 174 (1960).
9. Eskenazi J., Nikiforidis T., Livio J. J., Schelling J. Eur L.: *J. Clin. Pharmacol.* **9**, 411 (1976).
10. Franko B. V., Ward J. W., Gilbert D. L., Woodard G.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **19**, 93 (1971).
11. Yeary R. A., Benish R. A., Brahm C. A., Miller D. L.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **6**, 642 (1964).
12. Bredikhin A. A., Bredikhina Z. A., Gubaidullin A. T.: *Cryst. Eng. Comm.* **22**, 7252 (2020).
13. Uang Y.-S., Chen I.-K., Wang L.-H., Hsu K.-Y.: *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **759**, 91 (2001).
14. Rothchild R., Venkatasubban K. S., Braddock S., Sanders K., Traviglia S.: *Spectrosc. Lett.* **26**, 271 (1993).
15. Patel K., Hashimoto K., Fujishima A: *Denki Kagaku* **60**, 659 (1992).
16. Swain G. M., Anderson A. B., Angus J. C.: *MRS Bull.* **23**, 56 (1998).
17. Schwarzova-Peckova K., Vosahlova J., Barek J., Sloufova L., Pavlova E., Petrak V., Zavazalova J.: *Electrochim. Acta* **243**, 170 (2017).
18. Selesovska R., Krankova B., Stepankova M., Martinkova P., Janikova L., Chylkova J., Vojs M.: *J. Electroanal. Chem.* **821**, 2 (2018).
19. Baluchova S., Danhel A., Dejmkova H., Ostatna V., Fojta M., Schwarzova-Peckova K.: *Anal. Chim. Acta* **1077**, 30 (2019).

Changes in Catalytical Response of Histones at Mercury Surface (Zmeny katalytického signálu histónov na ortuťovej elektróde)

Eva Melníková^a, Tatiana Galicová^b, Miroslav Gál^a, and Veronika Ostatná^b

^a Slovak University of Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Department of Inorganic Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia

^b Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences
Královopolská 135, 61265 Brno, Czech Republic

Abstract

The histones are small basic proteins with a large number of electroactive residues (mostly arginines and lysines) that carry positive charge. As we know, protein properties and functions are strongly dependent on the structure and amino acid content. In this work, catalytic hydrogen evolution reaction (CHER) of histones was studied to understand histone's behaviour at charged surfaces. Constant current chronopotentiometric stripping and impedance measurement of capacitance dependence in time ($C-t$ curves) were used for the study. Using this combination of methods, we could differ between histones, and their high-ordered structure—octamer, which appears useful for the analysis of complex systems.

Key Words: Histone, Octamer, Chronopotentiometric stripping analysis, Catalytic hydrogen evolution.

Úvod

Chronopotentiometrická analýza konštantným prúdom (CPS) je vysoko citlivá metóda používaná na štúdium nekonjugovaných proteínov pomocou reakcie katalytického vylučovania vodíka (CHER) pričom proteín zastáva rolu katalyzátora. Zachytený a prepočítaný signál tzv. pík II, sa vyskytuje pri vysoko negatívnych potenciáloch, približne -1.8 V avšak prítomnosť proteínu ako katalyzátora spôsobuje posun vyvíjania vodíka k menej negatívnym potenciálom. Peptidy a proteíny poskytujú v dôsledku CHER dobre vyvinuté piky H,¹ ktoré umožňujú stanovenie lokálnych a globálnych zmien v štruktúre proteínu vplyvom denaturácie proteínu², oligomerizácie³, agregácie⁴, glykácie⁵, oxidačného poškodenia⁶, či výmeny jednej aminokyseliny⁷. V tejto práci sme analyzovali správanie sa histónov, menovite histónu H2A, H2B, H3, H4 a komplexnej štruktúry histónov, aby sme získali viac informácií o ich správaní na nabitých povrchoch. Históny ako malé bázičné proteíny zohrávajú dôležitú úlohu v stabilizácii negatívne nabitých DNA vo vnútri chromatinu. Chromatin je tvorený nukleozómami, ktoré pozostávajú z 200 bp DNA dvakrát obalených okolo histónového oktámeru, ktorý obsahuje dve kópie základných histónov, konkrétne H2A, H2B, H3 a H4 (molekulárna hmotnosť približne 11-16 kDa)⁸. Tvorba histónového oktámeru je postupný proces, ktorý si vyžaduje počiatočnú tvorbu histónových dimérov H3-H4 a H2A H2B a následne vznik dvoch dimérov (H2A H2B) a jedného tetraméru (H3 H4). Jednotlivé históny sa zhodujú v základnom motíve, ktorý tvoria tri α -helixy spojené dvoma slučkami^{8,9}, avšak odlišujú sa C- a N- koncom. Keďže hlavnou úlohou histónov je stabilizovať negatívne nabitú DNA všetky základné históny obsahujú vysoké množstvo zvyškov bázičných aminokyselín (AA), ako sú His, Lys a Arg¹⁰ umiestnených hlavne na ich vonných koncoch, a ktoré spôsobujú výrazný pozitívny náboj u histónov^{8,9}, a preto sú zaujímavým predmetom elektrochemickej analýzy.

Experimentálna časť

Elektrochemické merania boli merané potenciostatom značky Autolab III (Metrohm, Utrecht, Netherland) pripojený VA-Stand 663 (Metrohm, Herisau, Switzerland) v elektrochemickej cele s roztokom temperovaným na 24°C. Merania prebiehali v trojelektrodovom zapojení s pracovnou elektródou, ktorú predstavovala ortuťová kvapková elektróda (HMDE, plocha elektródy 0,4 mm²). Referenčnou elektródou bola argentochloridová Ag/AgCl 3 M KCl a ako protielektroda bol použitý platinový drôt. Podmienky meraní sa mierne lišili v závislosti od použitej metódy.

Chronopotenciometrické merania prebiehali s akumuláčnym medzikrokom. Na povrchu elektródy sa akumuloval proteín s koncentráciou 500 nM pri potenciáli $E_A = -1,1$ V po dobu 180 s v prostredí 30 mM sodného fosfátového pufru s pH 7,5 s následným prídavkom 2 M NaCl na zvýšenie iónovej sily. Samotný chronopotenciogram bol vyhotovený pri rozpúšťacom prúde $I = 10$ μ A.

Pri meraní kapacitancie v závislosti od času ($C - t$ kriviek) bol použitý Autolab PGSTAT12 s modulom FRA 2. Merania prebiehali pri frekvencii 250 HZ, amplitúdou 10 mV (rms) a aplikovaným potenciálom $-1,1$ V po dobu 600 s v roztoku 30 mM sodných fosfátov (pH 7.5) a prídavkom 2M NaCl, pričom proteín bol do roztoku pridaný až po prvých 100 s.

Materiály

Roztok základného elektrolytu pozostával z troch zložiek:

1. Kyslá zložka pufru NaH₂PO₄·H₂O (>98 %, Merck (Česká republika))
2. Zásaditá zložka pufru Na₂HPO₄·7H₂O (>98 %, Merck (Česká republika))
3. NaCl (99,5 %, Merck (Česká republika))

Históny H2A, H2B, H3, H4 a ich komplexná štruktúra- oktamér boli dodané firmou Merck (Česká republika). Presná koncentrácia roztokov bola prepočítaná na základe hodnôt absorpcie z UV-Vis spektra pri vlnovej dĺžke 280 nm odmeraných prístrojom NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (ThermoFisher Scientific, USA). Na prípravu a riedenie roztokov bola použitá tri-distilovaná voda.

Výsledky a diskuse

V rámci tejto práce sme študovali jednotlivé históny a ich komplexnú štruktúru (oktamér) pomocou CPS analýzy a meraní impedancie, konkrétne $C - t$ kriviek. Zatiaľ čo, analýza CPS nám poskytla informácie o schopnosti histónov katalyzovať vývoj vodíka, krivky $C - t$ odrážali zmeny elektrickej dvojvrstvy v čase po pridaní histónu. Použitím oboch prístupov sme študovali časovú závislosť adsorpcie histónu na negatívne nabitom povrchu elektródy. Získané údaje ukázali, že pri nižších koncentráciách sú históny orientované odlišne na povrchu elektródy v porovnaní s vyššími povrchovými koncentraciami. Vyššie píky H pri nižších časoch akumulácie naznačovali, že neštruktúrované a voľné C- a N-koncové časti s prístupnými elektroaktívnymi zvyškami mali lepší prístup k elektróde, a teda mohli viac prispievať ku CHER. Pri vyšších akumuláčnych časoch, však tieto konce neboli v priamom kontakte s elektródou a následne bol CHER sťažený. Krivky píkov H a $C - t$ krivky vykazovali odlišné správanie histónov H2A, H2B na rozdiel od H3 a H4. Rozdiely môžu byť spôsobené rôznym obsahom a dispozíciou elektroaktívnych skupín, konkrétne aminokyselín Lys a Arg, pričom v prípade histónu H3 bola adsorpcia aj CHER ovplyvnená prítomnosťou Cys zvyškov. V práci sme porovnali CPS krivky a $C - t$ krivky jednotlivých histónov s krivkami oktaméru. Pík H oktaméru bol nižší a posunul sa do negatívnejších potenciálov ako pík H jednotlivých histónov. Pri dlhších akumuláčnych časoch potenciálový posun dosiahol 100 mV. Krivky $C - t$ dokázali, že sa tvorba adsorbentnej vrstvy oktaméru na nabitom povrchu líši od tej pre jednotlivé históny.

Toto zistenie je v súlade s údajmi NMR a röntgenového žiarenia, ktoré ukazujú, že konce C- a N- koncov histónov sú v oktamérovej štruktúre menej prístupné.

Závěr

V tejto práci sme študovali jednotlivé históny a ich komplexnú štruktúru (oktamér) pomocou CPS analýzy a meraní impedancie, konkrétne $C - t$ kriviek. Ako sme ukázali, chronopotentiometria s konštantným prúdom je vysoko citlivá elektrochemická analýza, ktorá je vhodná aj na štúdium základných proteínov. V kombinácii s meraniami impedancie poskytuje CPS informácie o správaní samotných proteínov a ich povrchových komplexoch. Doplnkové informácie získané z oboch metód umožňujú lepšie porozumieť správaniu proteínov a ich komplexov na nabitých povrchoch.

Acknowledgments

This study was supported by the Czech Science Foundation project No. 18-18154S to VO and by the Slovak Research and Development Agency under the contracts no., APVV-17-0149, and PP-COVID-20-0019 to MG

References

1. Bartošik, M., Bertók, T., Ostatná, V., Paleček, J.: *Chem. Rev.* *115*, 2045, 2015.
2. Černocká, H., Ostatná, V., Paleček, E.: *Electrochim. Acta*, *174*, 356, 2015.
3. Borsarelli, C. D., Falomir-Loekhart, L. J., Ostatná, V., Fauerbach, J. A., Hsiao, H.-H., Urlaub, H., Paleček, E., Jares-Erijman, E. A., Jovin, T. M.: *Free Rad. Biol. Med.* *53*, 1004, 2012.
4. Paleček, E., Ostatná, V., Masařík, M., Bertoncini, C. W., Jovin, T. M.: *Analyst* *133*, 76, 2008.
5. Havlikova, M., Zatloukalova, M., Ulrichova, J., Dobes, P., Vacek, J.: *Anal. Chem.*, *87*, 1757, 2015.
6. Vargová, V., Giménez, R. E., Černocká, H., Trujillo, D. C., Tulli, F., Zanini, V. I. P., Paleček, E., Borsarelli, C. D., Ostatná, V.: *Electrochim. Acta* *187*, 662, 2016.
7. Kasalová, V., Hrstka, R., Herychová, L., Coufalová, D., Ostatná, V.: *Electrochim. Acta*, *240*, 250, 2017.
8. Wolffe, A.: *Chromatin: structure and function*, 3rd ed., Academic Press, San Diego, 1998.
9. Ramakrishnan, V.: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, *26*, 83, 1997.
10. <https://www.uniprot.org/>, Downloaded September 13th, 2020.

Electrochemical Detection of Arsenic Using Screen-Printed Carbon Electrodes Modified with Gold

(Elektrochemická detekce arsenu s využitím uhlíkových tištěných elektrod modifikovaných zlatem)

Radovan Metelka and Nela Halašková

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

E-mail: radovan.metelka@upce.cz

Abstract

This contribution summarizes possibilities and difficulties of electrochemical detection of As(III) at screen-printed carbon electrodes modified with gold. The modification of electrodes was performed via several electrolytic and non-electrolytic approaches: electrodeposition *in situ*, *ex situ* and drop-casting of gold nanoparticles in phosphate or citrate buffer. The resulting electrochemical behavior of bare and multi-walled carbon nanotubes-modified screen-printed electrodes with gold layer in the detection of As(III) was compared to that of glassy carbon and carbon paste electrodes coated with gold film, solid gold electrodes, and screen-printed gold electrodes.

Key Words: Arsenic, Screen-printed carbon electrodes, Gold film, Gold nanoparticles.

Úvod

Arsen vážně ovlivňuje lidské zdraví, pokud překračuje v pitné vodě maximální limit doporučený Světovou zdravotnickou organizací $10 \mu\text{g l}^{-1}$. Chronická expozice tímto polutantem je spojena s mnoha zdravotními problémy. Kontaminace podzemní vody určenou pro lidskou spotřebu postihuje po celém světě přibližně 50 milionů lidí ¹.

Mezi analytické techniky využívané pro detekci As se řadí také přímá voltametrie a rozpouštěcí analýza, které vyžadují pouze minimální přípravu vzorků, jsou vysoce citlivé a použitelné i pro stanovení nízkých koncentrací. Dále je možné využít různé způsoby zakoncentrování a imobilizace As na povrchu elektrod z uhlíkových (skelný uhlík, uhlíková pasta, borem dopovaný diamant) nebo kovových materiálů (platina, stříbro, měď a zlato) ².

Právě zlaté elektrody se ukazují jako nejvhodnější pro akumulaci As v rozpouštěcí analýze díky tvorbě stabilních intermetalických sloučenin Au-As během depozičního kroku ³, nicméně jejich použití je nákladné a povrch se obtížně čistí. Tyto nevýhody překonává použití zlatých filmových elektrod, vytvořených buď elektrolyticky redukcí iontů Au^{III} nebo přímým nanášením zlatých nanočástic většinou na uhlíkové substráty, jako je např. skelný uhlík ⁴, uhlíková pasta ⁵ nebo uhlíkové tištěné elektrody ³. Další možnosti jsou jednorázové zlaté tištěné elektrody ⁶.

Experimentální část

Elektrochemická měření byla prováděna ve Faradayově kleci s využitím tříelektrodových tištěných senzorů s pracovní uhlíkovou elektrodou (typ DRP-110), uhlíkovou elektrodou modifikovanou vícevláknovými uhlíkovými nanotrubičkami s karboxy skupinou (MWCNT-COOH) (typ DRP-110CNT) a zlatou elektrodou (typ DRP-250AT, vše Metrohm, Česká republika) o průměru 4 mm. Senzory DRP-110 a DRP-110CNT měly pomocnou elektrodu z uhlíku, DRP-250AT z platiny, pseudoreferentní elektrody byly u všech typů ze stříbra. Dále byly použity pracovní elektrody ze skelného uhlíku, zlata (obě Metrohm, Česká republika)

a uhlíkové pasty se silikonovým olejem, všechny průměr 3 mm. Třielektrodové zapojení doplňovaly pomocná platinová (typ Pt 12+, ED, s.r.o.) a referenční chloridostříbrná elektroda s vnitřním elektrolytem 3 M KCl (typ 6.0726.107, Metrohm, Česká republika). K elektrochemickým experimentům byl využíván potenciostat PalmSens 2 (Palm Instruments BV) řízený softwarem PStTrace 5.7.

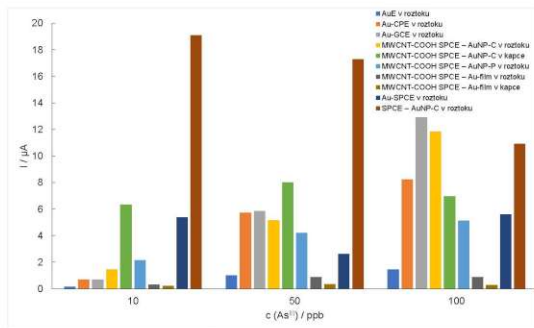
Pro přípravu roztoků As^{III} byl použit standard pro AAS (1 g l^{-1} v 2% HNO_3 , Sigma-Aldrich). Základní elektrolyty byly připraveny z koncentrovaných kyselin HCl (Fluka), H_2SO_4 (J.T.Baker) a HNO_3 (Merck) a 3 M KCl (Metrohm, Česká republika). Roztoky As^{III} byly stabilizovány přidávkou hydrazin sulfátu (Lachema Brno, Česká republika). Pro elektrodepozice filmu zlata byl použit standard Au pro AAS v 2% HNO_3 (1 g l^{-1} , Fluka). Zlaté nanočástice o průměru 10 nm byly nanášeny na elektrody z koloidního Au v citrátovém pufru a v 0,1 M fosfátovém pufru (Sigma-Aldrich). Měření probíhala buď v kapce roztoku, dávkovaném na povrch tiskového senzoru v objemu 40 μl , nebo v klasickém třielektrodovém uspořádání v nádobce s objemem roztoku 10 ml.

Výsledky a diskuse

Byly testovány různé způsoby elektrolytického vytváření Au filmu na povrchu pracovní elektrody tiskových senzorů: i) *in situ* redukci Au^{III} se současnou akumulací As^{III} a ii) *ex situ* v pokovovacím roztoku Au^{III} s následným opláchnutím senzoru. Vlastní analýza poté probíhala buď v 40 μl kapce vzorku nanášené přímo na senzor nebo v objemu 10 ml v měřicí nádobce. Zásadním faktorem při elektrochemické analýze As^{III} je volba vhodného složení základního elektrolytu a koncentrace jednotlivých složek. Z testovaných roztoků se jako optimální ukázala směs 1 M H_2SO_4 + 0,1 M HCl + 100 μM hydrazinu, která zajišťovala příznivé pH roztoku a dostatečnou koncentraci chloridových aniontů. Vyšší obsah chloridů ruší stanovení a přítomnost hydrazinu stabilizuje As^{III} před jeho oxidací.

Dále byl sledován vliv parametrů elektrodepozice Au filmu na výsledný oxidační pik As, který se na voltamogramech objevuje v rozmezí 0 – 0,1 V. Při *in situ* technice byly vhodnější kratší časy depozice do 30 s, delší časy velmi zvyšují signál pozadí, kdy se objevují intenzivní signály v rozmezí 0,2 – 0,3 V, které ruší detekci As^{III} . Podobné jevy byly pozorovány i při elektrodepozici Au filmu *ex situ*. Snížení pozadí a zlepšení opakovatelnosti měření bylo dosaženo použitím tiskových uhlíkových elektrod s funkcionalizovanými uhlíkovými nanotrubičkami (MWCNT-COOH) a přímým nanášením zlatých nanočástic o průměru 10 nm. Tento způsob tvorby Au filmu byl vhodný zejména při měření s kapkou vzorku, kdy na rozdíl od míchaného roztoku nedocházelo k přílišnému odplavení zlatých nanočástic z povrchu pracovní elektrody. Nižší pozadí bylo patrné při použití zlatých nanočástic v citrátovém pufru (AuNP-C) oproti fosfátovému pufru (AuNP-P). Nicméně i tak byly výsledné proudy piků nekonzistentní a s malou opakovatelností pro různé koncentrace As^{III} .

Srovnání s elektrochemickým chováním As^{III} na dalších elektrodách potvrdilo stejnou polohu oxidačního piků As a na rozdíl od tiskových elektrod i očekávaný nárůst měřeného signálu na koncentraci v rozmezí desítek ppb As^{III} . Takto bylo možné pracovat s CPE a GCE *in situ* vytvořeným zlatým filmem a s pevnou zlatou elektrodou. Paradoxně na zlaté tiskové elektrodě nebyl oxidační signál vůbec pozorován. Výsledné srovnání různých elektrod je uvedeno na Obr. 1 spolu s číselnými hodnotami proudu piků v Tabulce I.



Obr. 1. Srovnání výšek signálů As^{III} na různých elektrodách. DPV, 10 až 100 ppb As^{III} , 1 M H_2SO_4 + 0,1 M HCl + 100 μM hydrazinu, $E_{\text{acc}} = -0,3 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 120 \text{ s}$.

Tabulka I.

Srovnání výšek signálů As^{III} na různých elektrodách pro různé modifikace a uspořádání.

Typ elektrody / modifikace / uspořádání	Koncentrace As^{III} (ppb)		
	10	50	100
	I (μA)		
AuE v roztoku	0,16	0,99	1,45
CPE_Au-film v roztoku	0,69	5,72	8,23
GCE_Au-film v roztoku	0,69	5,86	12,91
MWCNT-COOH SPCE – AuNP-C v roztoku	1,44	5,14	11,83
MWCNT-COOH SPCE – AuNP-C v kapce	6,33	8,00	6,95
MWCNT-COOH SPCE – AuNP-P v roztoku	2,14	4,19	5,10
MWCNT-COOH SPCE – Au-film v roztoku	0,31	0,86	0,88
MWCNT-COOH SPCE – Au-film v kapce	0,20	0,34	0,27
SPCE - Au-film v roztoku	5,37	2,61	5,61
SPCE - Au-film v kapce	19,08	17,27	10,93

Závěr

Z provedených experimentů je patrné, že elektrochemická detekce As^{III} je na použitých tiskárných senzorech zatím velmi problematická, zvláště v porovnání s klasickými zlatými filmovými elektrodami a pevnou zlatou elektrodou. Svou roli může hrát i použitý uhlíkový inkoust, jeho složení a stabilita stříbrné pseudoreferenční elektrody. Vzhledem k předpokládanému charakteru rychlého stanovení s jednorázovými senzory nebyla testována předúprava povrchu uhlíkové tiskárné elektrody, která by mohla přispět ke zlepšení odezvy. V další fázi budou testovány uhlíkové substráty jiných výrobců.

Acknowledgments

Financial support from Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice (project No. SGS-2021-001) is gratefully acknowledged.

References

1. Toral-Sanchez E., Rangel-Mendez J. R., Chazaro-Ruiz L. F.: *J. Appl. Electrochem.* *46*, 205 (2016).
2. Sakira A.K., Somé I.T., Ziemons E., Dejaegher B., Mertens D., Hubert P., Kauffmann J.-M.: *Electroanalysis* *27*, 309 (2015).
3. Cinti S., Politi S., Moscone D., Palleschi G., Arduini F.: *Electroanalysis* *26*, 931 (2014).
4. Sun Y. C., Mierzwa J., Yang M. H.: *Talanta* *44*, 1379 (1997).
5. Svancara I., Vytras K., Bobrowski A., Kalcher K.: *Talanta* *58*, 45 (2002).
6. Laschi S., Bagni G., Palchetti I., Mascini M.: *Anal. Lett.* *40*, 3002 (2007).

Boron Doped Diamond Electrodes Modified with Gold Nanoparticles for Melatonin Detection
(Bórom dopované diamantové elektródy modifikované zlatými nanočasticami pre stanovenie melatonínu)

Pavol Michniak^a, Marián Marton^a, Michal Hatala^{b,c}, Vlastimil Řeháček^a, Martin Vrška^a,
Miroslav Behúl^a, and Marian Vojs^a

^aInstitute of Electronics and Photonics, Faculty of Electrical Engineering and Information Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Ilkovičova 3,
812 19 Bratislava, Slovakia, E-mail: pavol.michniak@stuba.sk

^bInstitute of Computer Engineering and Applied Informatics, Slovak University of Technology in Bratislava, Ilkovičova 2, 84216 Bratislava, Slovakia

^cDepartment of Graphic Arts Technology and Applied Photochemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9,
81237 Bratislava, Slovakia

Abstract

In this contribution, process of preparing three electrode system on alumina substrate is described. Boron doped diamond (BDD) prepared by MW CVD (MicroWave Chemical Vapor Deposition) was used as a material of working and counter electrode. Working electrode was modified with gold nanoparticles with different size and structure (porous nanoparticles). Scanning electron microscopy was used to BDD characterization. Electrochemical properties using the redox systems $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ and $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ were investigated. The BDD electrodes have also been assessed in determination of hormone melatonin in an aqueous solution by square wave voltammetry.

Key Words: Boron doped diamond, Electrochemical properties, MW CVD, Gold nanoparticles, Melatonin.

Úvod

Moderné elektrochemické metódy sú v súčasnosti veľmi populárne v rôznych oblastiach vedy. Jedným z najvhodnejších elektródových materiálov pre ich využitie sú bórom dopované diamantové elektródy, hlavne pre ich jedinečné vlastnosti. Povrch BDD elektród (BDDE) je možné rôzne modifikovať, napríklad rôznymi nanočasticami (NanoParticles - NPs) a zlepšiť už vynikajúce vlastnosti BDDE. Ako materiál pre NPs sa používajú rôzne kovy (napr. Au, Ag, Pt, Cu), bimetalické zlúčeniny (napr. Pt-Au, Pt-Ru, Sn-Sb), oxidy kovov (napr. TiO_2 , CuO_2) alebo rôzne kompozity. Hoci je objemové zlato je relatívne inertné, vo forme nanočastíc má výrazný katalytický účinok smerom k redoxným reakciám. Výhoda je tiež zvýšená difúzia pri meraní s použitím elektród s nanočasticami, kedy prevláda konvergentná difúzia pri relatívne malých skenovacích rýchlostiach, resp. planárna difúzia pri vyšších rýchlostiach skenovania, kedy je požadovaná menšia veľkosť NPs. Pri použití BDDE s NPs sa zvyšuje pomer signál/šum, kvôli zvýšenej difúzii a nárastu povrchových aktívnych miest v porovnaní s planárnou nemodifikovanou elektródou, čo môže zvýšiť selektívitu na vybraný analyt.

Pre stanovenie hormónu melatonínu (N-acetyl-5-metoxytryptamin) sú používané rôzne techniky (HPLC, UV spektrometria, elektroforéza, chemiluminiscencia), ktoré sú v porovnaní s elektrochemickou metódou drahé, komplikované, zdlhavé a často citlivé na maticové efekty. Pri štúdiu elektrochemického správania sa melatonínu a jeho stanovenia sa používa najmä cyklická a square-wave voltampérometria s rôznymi uhlíkovými elektródami.

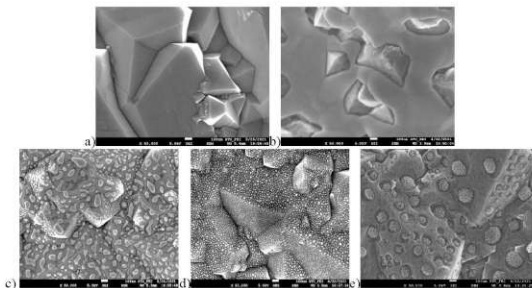
Experimentálna časť

BDDE boli pripravené na Al_2O_3 substrátoch veľkosti približne $7,3 * 25 \text{ mm}^2$ v aparatúre LA MW CVD (SCIA, lineárnou plazmou podporená chemická depozícia z pár). Následne boli na povrch BDD fyzikálnou depozíciou z pár vytvorené vrstvy kovu s hrúbkou Au 100 nm, 10 nm a 5 nm, resp. bimetalická vrstva s hrúbkou Au 5 nm a Ag 10 nm pre vytvorenie poréznych nanočastíc. BDDE s vytvorenými vrstvami kovov boli teplotne žihané pri 600°C . Pri vytváraní poréznych nanočastíc bolo Ag leptané v HNO_3 . Ag zvodové elektródy, referenčná elektróda a izolačná vrstva boli pripravené sieťotlačou.

Rastrovacia elektrónová mikroskopia (SEM JEOL JSM 7500F) bola použitá na sledovanie morfológie povrchu BDD, tvaru, štruktúry a distribúcie NPs. Elektrochemické merania prebiehali v trojelektrodovom zapojení na zariadení potentiostat / galvanostat Autolab PGSTAT 128N (METROHM). Pri elektrochemickej charakterizácii BDDE boli využité reverzibilné redoxné systémy $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ a $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$. Merania prebiehali cyklickou voltampérometriou pri rôznych rýchlostiach zmeny potenciálu (10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mV/s) v roztoku 2,5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ v 0,1 M KCl a 2,5 mM $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ v 0,1 M KCl. Použité roztoky boli pripravené z 18,2 M Ω demineralizovanej vody a z chemikálií analytickej kvality. Pre elektrochemické stanovenie melatonínu bola použitá metóda square-wave voltampérometrie (SWV) v pufrovanom Britton Robinson (BR) roztoku s upravenou iónovou silou 0,1 mol/L pomocou KCl.

Výsledky a diskusia

Povrch Al_2O_3 bol rovnomerne pokrytý polykrystalickou BDD vrstvou. Vrstvu BDD, ktorá nie je modifikovaná žiadnymi NPs a bola použitá aj ako podklad pre NPs je na Obr.1a. V prípade 100 nm sa vytvorila vrstva zlata, ktorá pri teplotnom žihaní čiastočne zakryla povrch BDD (Obr. 1b). Pri vytváraní NPs s Au 10 nm sa vytvorili častice s rôznou veľkosťou a je vidieť (Obr. 1c) výraznejší rozdiel medzi najmenšími a najväčšími časticami (max. 200 nm). NPs s hrúbkou Au 5 nm sa vyznačujú homogénnym pokrytím povrchu BDD (Obr. 1d). Pri poréznych nanočasticách je ich veľkosť až 100 nm a na SEM snímku je jasne viditeľná ich porézna štruktúra (Obr. 1e). Proces leptania pri ich výrobe spôsobil, že sú mierne vsadené do BDD vrstvy:

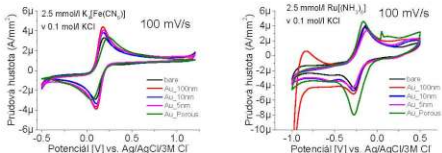


Obr. 1. SEM snímky a) BDDE bez modifikácie NPs a BDDE modifikované s hrúbkou vrstvy Au pred žiňaním: b) 100 nm c) 10 nm d) 5 nm a e) BDDE s poréznymi Au nanočasticami. Mierka je 100 nm.

Pre elektrochemickú charakterizáciu BDDE bol využitý reverzibilný redoxný systém $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, ktorý je typický pre inner sphere systémy, a reverzibilný redoxný systém $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$, typický pre outer sphere systémy. Z výsledných charakteristík boli pre redoxný systém $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ (**Tab I**) a redoxný systém $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ (**Tab II**) určené hodnoty anodického a katodického prúdu, ich vzájomného pomeru, anodického a katodického potenciálu, ich rozdielu a z neho bola vypočítaná konštanta rýchlosti prenosu náboja k^0 podľa postupu [7].

Pri meraní BDDE s AuNPs v redoxnom systéme $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ sme zistili výrazný vplyv nanočastíc na kinetiku reakcie, čo sa prejavilo znižujúcim sa rozdielom medzi anodickým a katodickým potenciálom. Elektroódový dej na elektróde prebiehajú rýchlejšie. Pri porovnaní konstanty rýchlosti prenosu náboja sa konštanta zvýšila minimálne 5 krát pre AuNPs veľkosti 5 nm, a až 12 krát pre AuNPs 100 nm a porézne nanočastice. Pri porovnaní anodických a katodických prúdov neboli v tomto redoxnom systéme pozorované výraznejšie rozdiely a ich pomer je 1,08 až 1,11.

V redoxnom systéme $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ sa vplyv NPs pri analýze rozdielu anodického a katodického potenciálu a z toho vypočítanej rýchlostnej konstanty prejavuje menej výrazne ako v redoxnom systéme $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$. Znižovanie veľkosti nanočastíc prispieva k zníženiu hodnoty konstanty k^0 . Najnižšia hodnota k^0 bola vypočítaná pre BDD s NPs 5 nm. Najvyššia hodnota rýchlostnej konstanty bola dosiahnutá pri BDD s poréznymi nanočasticami. Pri porovnaní anodických a katodických prúdov sa v tomto redoxnom systéme prejavuje katalytický účinok v katodickom smere iba pre BDD modifikovaný s poréznymi časticami. Tieto výsledky naznačujú, že AuNPs na povrchu BDDE je výhodné použiť hlavne pri elektrochemických dejoch prebiehajúcich s tzv. inner sphere mechanizmom.



Obr. 2. Voltampérogramy BDDE v roztoku a) 2,5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ v 0,1 M KCl b) 2,5 mM $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ v 0,1 M KCl pri 100 mV/s rýchlosti zmeny potenciálu.

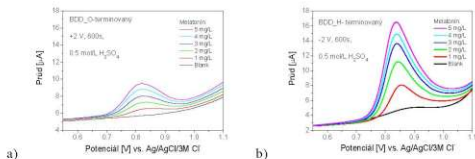
Tabuľka I. Základné elektrochemické parametre pre elektródy testované s redox systémom $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ v 0,1 mol L^{-1} KCl zistené pomocou CV.

Elektróda	I_{pa} [μA]	I_{pc} [μA]	I_{pa}/I_{pc}	E_a [mV]	E_c [mV]	ΔE_p [mV]	k^0 [cm/s]
Bare	3,37	3,11	1,08	236,82	58,59	178,23	$1,5 \times 10^{-3}$
Au= 100 nm	3,83	3,56	1,08	180,66	107,42	73,24	$18,9 \times 10^{-3}$
Au= 10 nm	4,17	3,86	1,08	185,55	102,54	83,01	$10,8 \times 10^{-3}$
Au= 5 nm	3,29	3,04	1,08	187,99	95,21	92,78	$7,3 \times 10^{-3}$
Porous Au	4,54	4,11	1,11	178,22	104,98	73,24	$18,9 \times 10^{-3}$

Tabuľka II. Základné elektrochemické parametre pre elektródy testované s redox systémom $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/4+}$ v 0,1 mol L^{-1} KCl zistené pomocou CV.

Elektróda	I_{pa} [μA]	I_{pc} [μA]	I_{pa}/I_{pc}	E_a [mV]	E_c [mV]	ΔE_p [mV]	k^0 [cm/s]
Bare	3,96	3,32	1,19	-150,45	-262,76	112,31	$3,58 \times 10^{-3}$
Au= 100 nm	3,89	3,30	1,18	-157,78	-272,52	114,74	$3,38 \times 10^{-3}$
Au= 10 nm	4,07	3,40	1,20	-148,01	-277,4	129,39	$2,46 \times 10^{-3}$
Au= 5 nm	3,44	2,95	1,17	-126,04	-289,61	163,57	$1,55 \times 10^{-3}$
Porous Au	4,48	6,62	0,68	-167,54	-267,64	100,10	$4,94 \times 10^{-3}$

Pre voltampérometrické stanovenie melatonínu boli použité BDD elektródy s priemerom 2 mm a elektródy s povrchom modifikovaným Au nanočasticami. Ukázalo sa, že zlaté nanočastice nezlepšujú odozvu elektródy, ako v podobnom prípade pri stanovaní neurohormónu dopamínu [8]. Dokonca v prípade poréznych nanočastíc a 100 nm zlatého filmu na BDD povrchu nebola žiadna odozva na melatónin. Pre stanovenie melatonínu na BDD elektródach bez zlatých nanočastíc boli optimalizované parametre SWV (20 mV – potenciálový krok, 50 mV – amplitúda, 250 Hz – frekvencia), akumuláčny potenciál (0,5 V). Zo závislosti prúdovej odozvy BDD elektródy od pH elektrolytu v rozsahu pH 2 až 7 je odozvy takmer konštantná 30 $\mu\text{A} \pm 0,1$. Pre ďalšie experimenty sme zvolili hodnotu pH = 3. Nakoľko pred oxidáčnym stanovením melatonínu je potenciál BDDE držaný pri potenciáli, ktorý je negatívnejší (v našom prípade +0,5 V) ako potenciál oxidáčného vrcholu melatonínu (+0,84 V), stanovili sme optimálny akumuláčny čas pre maximálnu prúdovú odozvu. V prípade H-terminovanej elektródy je to 60 s a v prípade O-terminovanej elektródy 80 s. Taktiež sme zistili, že výrazný vplyv na prúdovú odozvu má terminácia povrchu BDD. Na Obr. 3 sú porovnané SWV odozvy pre rozdielne terminované povrchy.



Obr. 3. Square-wave voltampéromy. Závislosť oxidáčného prúdu od koncentrácie melatonínu pre kyslíkovo-terminovanú (a) a vodíkovo-terminovanú (b) BDD elektródu. (1 – 5 mg/L) (vľavo) a vodíkovo-terminovanej (0,2 – 1 mg/L) (vpravo) BDD elektróde.

Záver

V tomto príspevku je opísaný proces prípravy BDDE modifikovaných rôznymi typmi Au nanočastíc. Boli pripravené vrstvy Au s rôznou hrúbkou 100 nm, 10nm, 5 nm, ktoré boli následne teplotným žihaním sformované do rôznych NPs. Boli pripravené aj porézne Au nanočastice. Voltampérometrické merania ukázali, že s použitím typického inner sphere redoxného systému $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-3-}$ sú dosiahnuté výrazne lepšie elektrochemické parametre ako pre nemodifikované BDDE. Pri použití outer sphere systému $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ vplyv nanočastíc nebol výrazný. BDD elektródy boli testované aj pre stanovenie koncentrácie melatonínu pomocou metódy square-wave voltampérometrie.

Acknowledgments

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmlúv č. APVV-16-0124, PP-COVID-20-0019 projektom grantovej agentúry VEGA MŠVVaŠ SR VEGA 1/054/20 a podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: „Strategický výskum v oblasti SMART monitoringu, liečby a preventívnej ochrany pred koronavírusom (SARS-CoV-2)“, Kód ITMS2014+: NFP313011A588, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

References

1. Muzyka K., Sun J., Fereja T.H., Lan Y., Zhang W., Xu G.: *Anal. Methods* **11**, 397 (2019).
2. Macpherson J.V.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 2935 (2015).
3. Yang N. (ed.): *Novel Aspects of Diamond*, Second edition, Springer Nature, Switzerland AG 2019.
4. Rehacek V., Hotovy I, Marton M., Mikolasek M., Michniak P., Vincze A., Kromka A., Vojs M.: *J. Electroanal. Chem.* **862**, 114020 (2020).
5. Mortet V., Taylor A., Vlkova Zivcova Z., Machon Z., Frank O., Hubik P., Tremouilles D., Kavan L.: *Diam. Relat.Mater.* **88**, 163 (2018).
6. Rao W., Wang D., Kups T., Baradacs E., Parditka B., Erdelyi Z., Schaaf P.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 6273 (2017).
7. Šelešovská, R., Kránková, B., Štěpánková, M., Martinková, P., Janíková, L., Chýlková, J., Vojs, M.: *J. Electroanal. Chem.* **821**, 2 (2018).
8. Weng J., Xue J., Wang J., Ye JS., Cui H., Sheu FS, Zhang Q.: *Adv. Funct. Mater.* **15**, 639 (2005).

Selected Copper (II) Complexes and their Catalytic Activity (Vybrané komplexy mědi a jejich katalytická aktivita)

Tomáš Mikysek^a, Milan Sýs^a, and Miroslav Novák^b

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 53210 Pardubice, Czech Republic,
E-mail: tomas.mikysek@upce.cz

^b Institute of Chemistry and Technology of Macromolecular Materials, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 53210, Pardubice, Czech Republic.

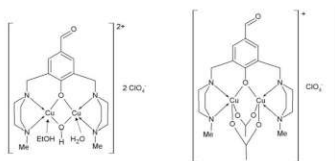
Abstract

This contribution offers a comparison of catecholase activity of recently synthesized copper complexes and enzyme tyrosinase towards selected neurotransmitters (dopamine, epinephrine, and noradrenaline). The Michaelis-Menten kinetics model was applied for such description. Besides a finding of comparable catalytic activity for the copper complexes tested, it has to be emphasized that the measurements have been performed in methanol whereas experiments with tyrosinase in aqueous media.

Key Words: UV-VIS spectrophotometry; Dopamine; Amperometry, Copper complexes; Tyrosinase.

Úvod

Jednou z oblastí využití enzymu tyrosináza jsou biosenzory, které slouží především ke stanovení obsahu polyfenolických resp. biologicky aktivních látek (např. neurotransmiterů)¹. Nicméně stabilita senzoru obsahujícího tyrosinázu je díky této biologické složce (enzymu) bohužel omezena pouze na několik týdnů v závislosti na jeho konstrukci a skladování²⁻⁴. To je jedním z důvodů, proč je část výzkumu věnována syntéze tzv. "umělých enzymů", tedy komplexů mědi s cílem napodobit chování tyrosinázy a zajistit tak větší stabilitu⁵⁻⁷. Všechny tyto látky jsou sice schopny katalyzovat přeměnu substrátu, avšak v porovnání s enzymem (tyrosinázou) vykazují nižší rychlost této přeměny⁶. 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 srovnání pomocí parametrů modelu Michaelis-Mentenově. K tomuto popisu se nejčastěji používá UV-VIS spektrofotometrie, ale lze s úspěchem využít i elektrochemických technik např. amperometrie. V tomto příspěvku je dále uvedeno, diskutováno porovnání kinetiky enzymu (tyrosináza) s nově syntetizovanými komplexy mědi (viz. Obr. 1).



Obr. 1. Struktury studovaných komplexů mědi.

Experimentální část

Chemikálie

Dopamin, epinefrin, noradrenalin, enzym tyrosináza (EC 1.14.18.1 z *Agaricus bisporus*), 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). Studované komplexy mědi $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{EtOH})](\text{ClO}_4)_2$ a $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OAc})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$ oba s ligandem: 2,6-bis[(N-methyl piperazine-1-yl)methyl]-4-formyl phenol (HL) byly syntetizovány na Ústavu chemie a technologie makromolekulárních látek Univerzity Pardubice.

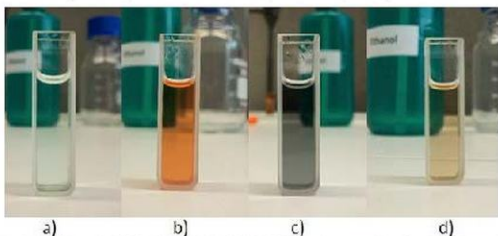
Instrumentace

Amperometrická měření byla prováděna v klasickém tří-elektrodeovém uspořádání, kde pracovní elektrodou byl disk ze skelného uhlíku (o průměru 3 mm), dále jako referenční 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 ovládnán prostřednictvím software NOVA 1.11.

Spektrofotometrické experimenty byly prováděny na přístroji V 2450 firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko) v 1 cm křemenné květe od firmy Fisher Scientific (Pardubice, ČR) v rozmezí vlnových délek od 800 do 200 nm rychlostí 0.5 nm s^{-1} .

Výsledky a diskuse

Katalytická aktivita komplexů mědi uvedených na obrázku 1 byla studována jak pomocí amperometrie tak pro srovnání i pomocí spektrofotometrie a to pro různé substráty v podobě vybraných neurotransmiterů (dopamin, epinefrin, noradrenalin). Kinetické parametry získané pomocí amperometrie ve vsádkovém uspořádání (kde na pracovní elektrodě byla sledována redukce příslušného o-chinonu, který vznikl katalytickou přeměnou substrátu) odpovídaly hodnotám získaným ze spektrofotometrických měření. Na obrázku 2 jsou pro ilustraci uvedeny barevné změny roztoků po reakci uvedeného komplexu mědi s příslušným substrátem.



Obr. 2. Ukázka roztoků $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OAc})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$ komplexu v methanolu a) a dále po jeho reakci s: b) epinefrinem, c) dopaminem, d) noradrenalinem.

Porovnáme-li hodnoty jednoho z kinetických parametrů (K_m) u obou studovaných komplexů s využitím dopaminu jako substrátu, dojdeme k řádově podobným hodnotám 0,730 mM vs 0,870 mM, kde nižší hodnota získaná pro acetátový komplex ukazuje na lepší afinitu tohoto katalyzátoru k danému substrátu, tedy dopaminu. Porovnáním struktur obou komplexů můžeme usoudit, že svou roli zde hraje rozdílné uspořádání koordinačního centra. Porovnáme-li dále tyto hodnoty s hodnotou tabelovanou pro enzym tyrosináza (0,84 mM) dostupnou v databázi BRENDA⁸, pak vidíme, že tyto hodnoty jsou podobné, avšak je nutné podotknout, že hodnoty pro oba komplexy byly získány v nevodném prostředí, zatímco pro enzym to bylo v prostředí fosfátového pufru pH 7. Přímé srovnání, za stejných podmínek, zatím bohužel není možné.

V Tabulce I jsou uvedeny kinetické parametry pro acetátový komplex mědi pro různé neurotransmitery. Jejich porovnáním lze vidět nejlepší katalytická aktivita komplexu pro epinefrin, a naopak nejnižší pro noradrenalin. Porovnáme-li však mezni rychlosti, pak epinefrin vykazuje nejnižší rychlost.

Tabulka I.

Hodnoty kinetických parametrů popisující katalytickou aktivitu komplexu $[Cu_2L(OAc)_2(H_2O)](ClO_4)$ pro vybrané neurotransmitery.

Substrát	K_m [mM]	V_{max} [AU s ⁻¹]
Epinefrin	0,415	$6,15 \cdot 10^{-4}$
Dopamin	0,730	$11,29 \cdot 10^{-4}$
Noradrenalin	0,956	$11,57 \cdot 10^{-4}$

Závěr

Tento příspěvek nabízí srovnání katalytické aktivity studovaných komplexů mědi v porovnání s enzymem tyrosinázou.

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., Tucek F.: *Biol. Inorg. Chem.* 21, 777 (2016).
6. Silavi R., Divsalar A., Akbar Saboury A.: *J. Biomol. Str. Dyn.* 30, 752 (2012).
7. Selmecci K., Réglér M., Giorgi M., Speier G.: *Coord. Chem. Rev.* 245, 191 (2003).
8. Sýs M., Obluková M., Kolívoška V., Sokolová R., Korecká L., Míkysek T.: *J. Electroanal. Chem.* 864, 114066 (2020).

BDD Electrodes for Electrochemical Degradation of Iodinated Contrast Media (BDD elektródy pre elektrochemickú oxidáciu jódových kontrastných látok)

Erika Mordačiková^a, Marian Vojs^b, Marián Marton^b, Pavol Michniak^b, Adam Bořík^c,
Roman Grabic^c, and Andrea Vojs Staňová^{a,c}

^aComenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Analytical Chemistry, Mlynská Dolina, Ilkovičova 6, 842 15, Bratislava, Slovak Republic,
E-mail: medvecka22@uniba.sk

^bSlovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Electrical Engineering and Information Technology, Institute of Electronics and Photonics, Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava, Slovak Republic

^cUniversity 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, Zatisí 728/II, 389 25 Vodnany, Czech Republic

Abstract

The occurrence of various micropollutants in wastewater and their potential toxicity to the aquatic environment causes an increased interest in their elimination from environmental waters. Tertiary processes using boron-doped diamond electrodes have proven to be a useful tool to improve their removal. In this work, electrochemical oxidation of iohexol (iodinated contrast media) in wastewater was performed on a BDD electrode with different current densities. Identification of the by-products formed was performed using an HPLC-HRMS system equipped with a Q-Exactive mass analyzer.

Key Words: Iodinated contrast media, Wastewater, BDDE, Degradation by-products, LC-HRMS.

Úvod

Jódované kontrastné látky sú využívané pri medicínskych zobrazovacích metódach a sú podávané v relatívne vysokých dávkach (až do 200 g/dávka)¹, čo sa vzhľadom na ich minimálnu mieru metabolizácie v organizme odráža na ich prítomnosti v odpadových vodách. Ročná celosvetová spotreba jódovaných kontrastných látok sa pohybuje na úrovni 3,5 tony ročne². Pre johexol sa priemerná ročná spotreba v závislosti od krajiny pohybuje od niekoľkých až po desiatky tisíc kilogramov³. Tieto látky sú na základe štúdií považované za perzistentné, s nízkou mierou odstraňovania v čistiarňach odpadových vôd (zvyčajne pod 50 %)⁴, preto sú s cieľom minimalizovať ich prítomnosť v odpadových vodách a vo vodách životného prostredia testované rôzne prístupy – terciárne stupne dočistenia odpadových vôd akými sú aj pokročilé oxidačné procesy (AOP).

Elektrochemické pokročilé oxidačné procesy (EAOP) sú podskupina AOP, ktorej výhodami sú najmä schopnosť elektrochemickej generácie/regenerácie reakčných činidiel⁵. Využitie bôrom dopovaného diamanu (BDD) ako elektródového materiálu v porovnaní s inými materiálmi (SnO₂, PbO₂, RuO₂, TiO₂) so sebou nesie množstvo výhod v podobe chemickej inertnosti, širokého potenciálového okna, nízkeho prúdu pozadia a iných⁶. Účinnosť týchto elektród rovnako ovplyvňuje množstvo premenných, medzi ktoré patrí zloženie BDD vrstvy, počiatočná koncentrácia mikropolutantov, zloženie matrice, hodnota prúduvej hustoty a podobne^{7,8}.

Pri hodnotení testovaného čistiaceho procesu je dôležité nielen získanie čo najvyššej miery eliminácie na jednej strane, ale aj „bezpečnosť“ procesu z pohľadu generovania produktov degradácie. Pri oxidácii mikropolutantov môžu v porovnaní s pôvodnou látkou vznikáť menej

pripadne rovnako toxické produkty, pripadne môžu tieto produkty predstavovať vyššie riziko než samotná pôvodná látka⁹. Kombinácia kvapalinovej chromatografie (LC) s vysokorozlišovacou hmotnostnou spektrometriou (HRMS) umožňuje sledovanie prítomnosti známych polutantov ale rovnako aj identifikáciu vznikajúcich látok počas rôznych degračných procesov aj v komplexných environmentálnych maticiach¹⁰.

Cieľom tejto práce bolo uskutočnenie elektrochemickej oxidácie johexolu v odpadovej vode s využitím BDDE pri aplikácii rôznej prúdovej hustoty a identifikácia jeho produktov vznikajúcich v priebehu degradácie.

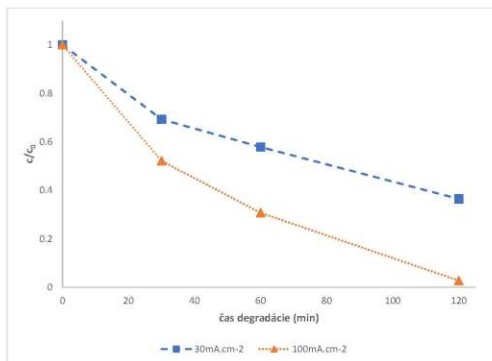
Experimentálna časť

Analytický štandard johexolu ako aj zložky mobilnej fázy (kyselina mravčia ($\geq 98\%$) a acetonitril, obe LC MS čistoty) boli zakúpené od firmy Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko). Voda, použitá na prípravu roztokov a mobilných fáz bola filtrovaná cez čistiaci systém Aqua-MAX-Ultra (Younglin, Kyounggi-do, Kórea). Odpadová voda pre účely elektrochemickej oxidácie bola získaná z prítoku čistiarne odpadovej vody miestnej časti Bratislava-Petržalka. Elektrochemická oxidácia bola uskutočnená s využitím BDD anódy ($2,67\% \text{ CH}_2/\text{H}_2$ a $12\,000 \text{ ppm B/C}$) a uhlíkovej katódy ($\Phi = 5\text{mm}$; $L = 40\text{mm}$) pri dvoch rôznych prúdových hustotách. Pre účely kvantitatívnej analýzy bolo využité prístrojové vybavenie HPLC-MS/MS s hmotnostným analyzátorom TSQ Quantum Ultra s trojitým kvadrupólom (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Identifikácia produktov oxidácie bola uskutočnená prostredníctvom HPLC-IRMS systému vybaveného hmotnostným spektrometrom Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific).

Výsledky a diskusia

Pre sledovanie vplyvu aplikovanej prúdovej hustoty na účinnosť eliminácie johexolu bola uskutočnená kvantitatívna HPLC-MS/MS analýza vzoriek odpadovej vody z prítoku čistiarne odpadových vôd Bratislava-Petržalka pred, počas a po elektrochemickej oxidácii s nastavením dvoch rôznych prúdových hustôt – 30 mA/cm^2 a 100 mA/cm^2 . Pre všetky prítomné cieľové analyty (74 liečiv, drog a ich metabolitov), prirodzene sa nachádzajúce v odobranej odpadovej vode ($> \text{LOQ}$) bola vyššia miera eliminácie zaznamenaná pri použití vyššej prúdovej hustoty, pričom vo väčšine prípadov dosahovala takmer 100% .

S cieľom sledovania vplyvu prúdovej hustoty na elimináciu johexolu a tvorbu degračných produktov bol do odpadovej vody pridaný štandardný roztok johexolu na koncentračnej úrovni 1 mg/L . Rovnako aj v prípade johexolu bol sledovaný nárast účinnosti eliminácie s nárastom hodnoty prúdovej hustoty. S využitím prúdovej hustoty 100 mA/cm^2 bola dosiahnutá 97% eliminácia johexolu už po 120 minútach oxidácie, zatiaľ čo pri použití prúdovej hustoty 30 mA/cm^2 koncentrácia johexolu v priebehu rovnakého času degradácie poklesla o 64% .



Obr. 1. Elektrochemická oxidácia johexolu v odpadovej vode s počiatočnou koncentráciou 1mg/L s využitím BDDE pri rôznych hodnotách prúdovej hustoty.

Identifikácia degradačných a transformačných produktov johexolu bola uskutočnená s využitím vzoriek odoberaných počas elektrochemickej oxidácie odpadovej vody a s bez prídavku štandardu johexolu. Na tento účel bola využitá kombinácia technik kvapalinovej chromatografie a vysokorozlišovacej hmotnostnej spektrometrie s využitím hybridného hmotnostného analyzátor kombinujúceho kvadrupólový analyzátor s orbitálnou iónovou pascou. Porovnávaním MS spektier získaných pre vzorky odpadovej vody pred a po uskutočnení degradačných experimentov bol vytvorený zoznam potenciálnych degradačných produktov. Na základe MS/MS experimentov bolo možné identifikovať degradačné produkty johexolu, pričom niektoré z nich ešte doposiaľ neboli v odbornej literatúre v spojení s BDDE publikované.

Záver

Na základe výsledkov z vykonaných experimentov bol preukázaný vplyv nastavenia prúdovej hustoty na účinnosť eliminácie vybraných mikropolutantov z odpadovej vody. Vo všetkých prípadoch, zvýšenie hodnoty prúdovej hustoty malo za následok vyššiu mieru eliminácie, ktorá pri vyššej prúdovej hustote dosahovala >95 %, pre johexol 97 %. S cieľom komplexného hodnotenia bezpečnosti využitia BDDE technológie, bola prostredníctvom HPLC-HRMS uskutočnená identifikácia degradačných produktov, vznikajúcich počas elektrochemickej degradácie johexolu v odpadovej vode, na základe ktorej bol navrhnutý mechanizmus odbúrania tejto látky.

Acknowledgement

Predmetná práca vznikla za finančnej podpory Agentúry na podporu výskumu a vývoja (APVV-19-0250 a APVV-16-0124) a VEGA grantu 1/0554/20. Práca vznikla aj za finančnej

References

1. Kormos J.L., Schulz M., Ternes T.A., *Environ. Sci. T.*, *45*, 8723 (2011).
2. Pérez S., Barceló D., *Anal. Bioanal. Chem.*, *387*, 1235 (2007).
3. de García S.O., Pinto Pinto G., García Encina P., Irusta Mata R., *Sci. Total Environ.* *444*, 451 (2013).
4. Margot J., Kienle C., Magnet A., Weil M., Rossi L., Felipe L., Alencastro D., Abegglen C., Thonney D., Chèvre N., Schärer M., Barry D.A., *Sci. Total Environ.* *461–462*, 480 (2013).
5. Sirés I., Brillas E., Oturan M.A., Rodrigo M.A., Panizza M., *Environ. Sci. Pollut. Res.*, *21*, 8336 (2014).
6. Alfaro M.A.Q., Ferro S., Martínez-Huitle C.A., Vong Y.M., *J. Braz. Chem. Soc.* *17*, 227 (2006).
7. Mordacikova E., Vojs M., Grabicova K., Marton M., Michniak P., Rehacek V., Borik A., Grabic R., Bruncko J., Vojs Stanova A., *J. Electroanal. Chem.* *862*, 114007 (2020).
8. Velegraki T., Balayiannis G., Diamadopoulos E., Katsaounis A., Mantzavinos D., *Chem. Eng. J.* *160*, 538 (2010).
9. Brienza M., Ahmed M.M., Escande A., Plantard G., Scrano L., Chiron S., Bufo S.A., Goetz V., *Chemosphere.* *148*, 473 (2016).
10. Gago-ferrero P., Schymanski E.L., Bletsou A.A., Aalizadeh R., Hollender J., Thomaidis N.S., *Environ. Sci. Technol.* *49*, 12333 (2015).

Voltammetric Determination of Heavy Metals in Honeybee Venom using Hanging Mercury Drop Electrode and Carbon Conductive Filaments for 3D Printer
(Voltamtrické stanovení těžkých kovů ve včelím jedu za použití rtuťové kapkové elektrody a uhlíkového vodivého filamentu pro 3D tisk)

Tomáš Navrátil, Marta Chojnínska, Ivana Šestáková, and Vojtěch Hrdlička
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

Heavy metals belong to typical contaminants of our environment. It is known that they are metabolized and incorporated into bee products as honey as well as honeybee venom (apitoxin). It is supposed that their composition can reflect contamination of the "bee environment" and can give us information about the environment in the neighborhood of human dwellings.

This study aimed to develop a simple method for the determination of heavy metals in honeybee venom. Due to the complicated matrix, wet microwave mineralization with sulfuric acid, nitric acid, under increased temperature and pressure, and repeated boiling with concentrated nitric acid had to be applied. Voltammetry proved to be very suitable for the determination of heavy metals.

Two types of working electrodes have been used: pen-type hanging mercury drop electrode and carbon conductive filaments for 3D printers. Results achieved using both of them and their advantages and limitations have been compared.

Key Words: Anodic stripping voltammetry, Heavy metals, Honeybee venom, Apitoxin, Mineralization, Pen type hanging mercury drop electrode, Carbon PLA conductive filaments for 3D printer.

Úvod

Včelí jed představuje sekret z jedového ústrojí včelích dělnic nebo včelí matky (nikoliv trubců). Smrtelná dávka pro člověka je asi 400-700 žihadel, LD50 myši i.v.=0,6 mg/kg. Po vysušení vzniká světle žlutý, velmi jemný prášek. Je rozpustný ve vodě za vzniku opaleskujícího roztoku. Typické složení (procenta představují podíl látky v sušině)¹⁻³:

- -50-55 % silně bazický polypeptid melitin (poškozuje červené i bílé krvinky), 2-3 % apamin (vliv na nervovou soustavu), MCD (mast cell degranulating) peptid (narušuje činnost buněčných membrán);
- Enzymy: 13-14 % fosfolypáza A a B, 2-3 % hyaluronidáza;
- Biogenní aminy: histamin, dopamin, noradrenalin.

Kromě výše uvedených látek jsou v jedu, podobně jako ve včelím medu, obsaženy látky, se kterými přichází tento blanokřídý hmyz do styku během svého života. Jedná se tedy i o těžké kovy, kterými je kontaminováno naše životní prostředí. Analýza včelího jedu včel medonosných žijících ve zvolené oblasti může tedy poskytnout informaci o plošném znečištění poměrně velké oblasti.

Vzhledem k rychlosti, selektivitě a citlivosti byly zvoleny voltamtrické metody. Metody analýzy těžkých kovů (Pb, Cd, Cu, Zn, Ni) voltamtrickými a dříve polarografickými metodami patří ke klasickým^{4,5} a nebylo potřeba je speciálně k těmto účelům modifikovat. Podstatně větší problém při analýzách biologického materiálu představuje skutečnost, že kovy jsou různým způsobem navázány nebo inkorporovány do organických molekul. Příkladem mohou

být „obraně molekuly organismu“ – metalothioneiny a fytochelatiny⁶⁻⁸, nebo nízkomolekulární organické kyseliny, které ovlivňují transport kovů přes biologické membrány⁷⁻¹². Voltametrické metody mohou být nápomocny při odhalování způsobů inkorporace těžkých kovů do uvedených molekul nebo lze pomocí nich stanovovat jejich celkový obsah, tedy jak formu volnou, tak váznou. V tom případě je potřeba odstranit veškerou organickou hmotu a uvolnit ionty kovů. Procesů mineralizace je nepřeberná řada¹³⁻¹⁷. Na rozdíl od moderních analytických metod jsou obtížně automatizovatelné, je v nich potřeba lidská obsluha a jejich časová náročnost mnohonásobně překračuje dobu samotné analýzy.

Použití ať již rtuťové kapkové elektrody nebo pevných amalgámových elektrod pro stanovení obsahu těžkých kovů v mineralizátu nepředstavuje žádný komplikovaný proces. Jejich výsledky jsou vzájemně ekvivalentní¹⁸ a meze detekce jsou velmi nízké i ve srovnání s nejmodernějšími spektrometrickými metodami¹⁸. Nicméně nové elektrodové materiály jsou neustále předmětem zájmu mnoha vědeckých pracovišť. Vzhledem k ohromnému rozmachu 3D tisku, který umožňuje uživatelům si vytvořit pracovní elektrodu nebo dokonce celou voltametrickou celu podle jeho požadavků (velikost, tvar, uspořádání aj.)¹⁹⁻²¹, bylo vhodné provést srovnání možnosti aplikace běžně dostupných 3D tiskových materiálů ke stanovení těžkých kovů.

Experimentální část

Přístroje

Pro voltametrická měření s tužkovou visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE) (Polaro-Sensors, Praha) (doba tvorby kapky 0,2 s, průměr kapiláry 0,4 mm) byl použit počítačem řízený Eco-Tribo Polarograf PC ETP s příslušenstvím (Polaro-Sensors, Praha) řízený programem Multielchem v. 3.2 pro Windows 10. Pro měření s 3D filamentem byl použit potenciostat PalmSens 3 a PSTrace 5 software (obojí PalmSens, Holandsko). V obou případech byla jako referentní elektroda použita Ag|AgCl|KCl(nasyc.) elektroda (Monokrystaly, ČR) a jako pomocná elektroda platinový plíšek (1 cm²).

Měření na HMDE probíhalo ve 3 skupinách:

a) kadmium, olovo, měď

$E_{acc}=E_{in}=-800$ mV; $E_{fin}=+200$ mV; $v=20$ mV s⁻¹; $H_{puls}=50$ mV; $t_{puls}=100$ ms; okyseleno HCl na $pH=1$; $E_p(Cd)=-600$ mV; $E_p(Pb)=-400$ mV; $E_p(Cu)=+10$ mV;

b) zinek

$E_{acc}=E_{in}=-1200$ mV; $E_{fin}=-800$ mV; $v=20$ mV s⁻¹; $H_{puls}=50$ mV; $t_{puls}=100$ ms; 100 μ L Ga³⁺ (10 mg.L⁻¹); $pH=4$; $E_p(Zn)=-1000$ mV;

c) nikl

$E_{acc}=E_{in}=-500$ mV; $E_{fin}=-1500$ mV; $v=20$ mV s⁻¹; $H_{puls}=-50$ mV; $t_{puls}=100$ ms; $E_p=-1020$ mV (0,2 mL konc. NH₃, 0,1g NH₄Cl+0,1 mL 0,1% dimethylglyoximu; $pH=8.9$).

PLA/carbon black composite filament (Ø 1.75 mm, deklarovaná rezistivita 15 Ω cm) (C-PLA) byl vyroben firmou Gembird, Holandsko. Kromě kyseliny polymléčné (PLA) obsahuje uhlíkové saze, které zajišťují dostatečnou vodivost. K měření byl použit cca 5 cm dlouhý filament, který by po celé délce zaizolován smršťovací bužírkou K32-2 (GM Electronics, ČR). K měření byl použit jeho diskový průřez o průměru 1.75 mm. Povrch byl nejdříve leštěn smírkovým papírem 3M 401Q, pomocí suspenze aluminu (Al₂O₃, <50 nm, Sigma-Aldrich, ČR) a následně aktivován vložením napětí +1000 mV po dobu 60 s.

Obdobně měření na filamentu C-PLA probíhalo ve 3 skupinách:

- a) kadmium, olovo, měď:

$t_{acc} = 120$ s; $E_{acc} = E_{in} = -1200$ mV; $E_{fin} = +200$ mV; $v = 20$ mV s⁻¹; $H_{puls} = 50$ mV;
 $t_{puls} = 100$ ms; acet. pufr = 4.5; $E_p(Cd) = -780$ mV; $E_p(Pb) = -570$ mV; $E_p(Cu) = -100$ mV;

- b) zinek

$E_{in} = -1600$ mV; $E_{fin} = -500$ mV; $v = 20$ mV s⁻¹; $H_{puls} = 50$ mV; $t_{puls} = 100$ ms; acet. pufr pH = 4.5; $E_p(Zn) = -1020$ mV;

- c) nikl

$E_{acc} = E_{in} = -1400$; $t_{acc} = 30-80$ s $E_{fin} = +1000$ mV; $v = 20$ mV s⁻¹; $E_p = -1020$ mV;
 $H_{puls} = -50$ mV; $t_{puls} = 100$ ms (borátový pufr + 0,1 mL 0,1% dimethylglyoximu, pH = 8.2).

Včelí jed

Vzorky včelího jedu byly dodány Výzkumným ústavem potravinářským Praha, v. v. i. (dříve Výzkumným ústavem potravinářského průmyslu). Testované včely medonosné byly uzavřeny do boxu, jehož skleněné stěny byly potaženy nelubrikovanými kondomy. Po iritaci ultrazvukem včely bodaly přes žilovatív a jed se usazoval na skleněném povrchu. Po odpaření vody by suchý jed seškrabán žiletkou do nádobky a analyzován. Na získání 1 g včelího jedu bylo potřeba přibližně 100 000 včel.

Mineralizace

Rozklad na mokré cestě byl prováděn v mineralizátoru "Laboratorní zařízení k tlakovému rozkladu vzorků ZA-1" (Polaro Sensors, ČR) se zesílenou vnitřní teflonovou nádobkou (1 cm). Byla používána kyselina sírová, 95–98 %, p.a., a dýmavá kyselina dusičná, 100 %, p.a. (obě Sigma-Aldrich, ČR).

Výsledky a diskuse

Bylo analyzováno 5 vzorků včelího jedu: FC186, FC187, FC102 (stanovováno Cd, Pb, Cu, Zn) a FC214 a FC549 (stanovován pouze Ni). Ani jeden ze vzorků se v destilované vodě nerozpustil zcela, a i po odpaření do sucha zůstával na dně nádobky šedožlutý odpárek. Proto byly testovány různé postupy mineralizace. Některé z nich jsou uvedeny v Tabulce I. Samotná mineralizace na suché cestě spálením v peci nepřinesla znatelný výsledek. Obdobně, opakované odpaření do sucha s přidávkou kyseliny dusičné, sírové a ani dokonce fluorovodíkové či v kombinaci se spálením v peci se nejevilo jako dostatečné. Proto bylo přistoupeno k tlakové mineralizaci pomocí tlakového mineralizátoru „ZA1“, do něž byla převedena navážka a kyseliny (sírová a/nebo dusičná). Vzniklý mineralizát byl opět opakovaně odpařován do sucha za přítomnosti oxidačních kyselin. Hladiny kovů v mineralizátech získaných tlakovým rozkladem byly podstatně vyšší než bez něj, avšak výsledky byly nezávislé na vzorku. Proto bylo vyrobeno nové teflonové pouzdro o síle stěny 1 cm místo původních 0,3 cm. Na základě provedených experimentů byl vypracován postup mineralizace vhodný pro všechny testované vzorky jedu: Navážka 0,2 g jedu se převede do tlakového mineralizátoru, přidá 3 mL koncentrované kyseliny dusičné a 1 mL koncentrované kyseliny sírové. Mineralizátor se umístí do sušárny vyhřáté na 140 °C na dobu 4 hodin. Vzniklý mineralizát se odpaří do sucha. Proveďte se přidávek 1,5 mL koncentrované kyseliny dusičné a 1 mL koncentrované kyseliny sírové a odpaří se do sucha. Tento odpařovací proces se opakuje alespoň 10x (do vzniku bílého či průhledného odparku). Vzniklý odpárek je možno rozpustit v destilované vodě a pH upravit podle potřeby, jak je uvedeno v Experimentální části. Získané koncentrace těžkých kovů, které byly změněny za pomoci HMDE (doba tvorby kapky 0,2 s, průměr kapiláry 0,4 mm) a C-PLA elektrodě, jsou uvedeny v Tabulce II.

Tabulka I.

Testované způsoby mineralizace. Navážka jedů 0,2000±0,0025 g

	HNO ₃ [mL]	H ₂ SO ₄ [mL]	Tlakový mineraliz. [°C]	Teplota [°C]	Doba miner. [hod.]	Opak. odpaření/ HNO ₃ / [mL. H ₂ SO ₄]	Spálení v peci
						15x/1,0/0,0	
						15x/1,0/0,0	Ano
						10x/1,0/0,5	Ano
3	-	Ano	130	3,0		15x/1,0/0,5	
3	-	Ano	126	3,0		15x/1,0/0,5	Ano
3	1,0	Ano	140	4,0		10x/1,5/1,0	
		2,0	Ano	130	4,0	1x/0,0/0,0	
4	0,5	Ano	130	4,0		1x/0,0/0,0	
4	1,0	Ano	140	27,0		1x/13/1,5	Ano

Tabulka II.Koncentrace jednotlivých analytů stanovené po mineralizaci ve vzorcích včelího jedu při použití HMDE a C-PLA jakožto pracovních elektrod ($\alpha=0,05$).

HMDE	Pb	RSD	Cd	RSD	Cu	RSD	Zn	RSD	Ni	RSD
	[mg kg ⁻¹]		[mg kg ⁻¹]		[mg kg ⁻¹]		[mg kg ⁻¹]		[mg kg ⁻¹]	
FC186	4,97±0,22	3,6%	3,04±0,27	7,2%	22,8±1,2	4,2%	993±75	6,1%	20,4±1,4	5,4%
FC187	4,48±0,31	5,6%	3,24±0,30	7,5%	20,9±1,1	4,4%	1033±78	6,1%	19,51±0,61	2,5%
FC214	3,59±0,28	6,4%	0,429±0,040	7,4%	18,7±1,2	5,1%	1420±58	3,3%	11,90±0,56	3,8%
FC215	3,06±0,30	8,1%	0,361±0,038	8,6%	19,41±0,77	3,2%	1505±75	4,0%	13,3±1,2	7,0%
FC102	6,12±0,24	3,2%	0,99±0,10	8,1%	25,4±1,3	4,0%	1687±98	4,7%	26,2±2,0	6,2%
FC549	3,66±0,31	7,0%	0,450±0,44	7,8%	13,01±0,79	4,9%	1005±37	3,0%	9,65±0,60	5,0%
Prům.	4,31±0,28	5,7%	2,09±0,19	7,8%	20,0±1,1	4,3%	1273±70	4,5%	16,8±1,1	5,0%
C-PLA	Pb	RSD	Cd	RSD	Cu	RSD	Zn	RSD	Ni	RSD
	[mg kg ⁻¹]		[mg kg ⁻¹]		[mg kg ⁻¹]		[mg kg ⁻¹]		[mg kg ⁻¹]	
FC186	5,21±0,54	8,4%	3,14±0,46	12%	25,7±3,8	12%	1100±140	10,0%	18,1±1,4	6,5%
FC187	4,30±0,49	9,2%	2,45±0,55	18%	23,2±2,7	9,5%	990±110	9,1%	20,8±3,2	12%
FC214	3,21±0,48	12%	0,430±0,085	16%	15,3±3,4	18%	1240±220	14%	11,3±2,1	18%
FC215	3,61±0,67	15%	0,320±0,072	18%	16,9±3,1	15%	1520±160	8,6%	14,6±2,2	12%
FC102	6,29±0,63	8,1%	1,02±0,11	8,3%	21,6±3,8	14%	1440±240	13%	21,3±3,6	14%
FC549	3,04±0,53	14%	0,454±0,63	11%	12,2±1,1	7,3%	895±84	7,6%	9,7±1,4	11%
Prům.	4,28±0,56	11%	1,98±0,32	14%	19,2±3,0	13%	1200±160	10%	15,9±2,4	12%

Mineralizáty připravené výše uvedeným postupem byly analyzovány rovněž na pracovní elektrodě vytvořené z C-PLA filamentu o aktivním průměru 1,75 mm. Zcela nezbytným krokem se jevílo leštění elektrody pomocí smirkového papíru P600, následně byla opláchnuta destilovanou vodou a následně mechanicky vyleštěna na lešticí tkanině pomocí suspenze aluminu (Al₂O₃, <50 nm, Sigma-Aldrich, ČR). Po mechanickém leštění bylo nezbytné provést elektrochemickou aktivaci vložením napětí -2 400 mV (maximální, které umožňuje ETP) po dobu nejméně 180 s. Stanovení těžkých kovů na elektrodě vytvořené z vodivého C-PLA filamentu je komplikovanější, protože je potřeba provést elektrochemické čištění před každým měřením. Také citlivost stanovení je menší. Píky jsou posunuty do negativějších potenciálů oproti stanovení na HMDE. Při stanovení iontů zinku není potřeba přidávat ionty galia. Shoda výsledků při použití HMDE a C-PLA byla zjištěna s pravděpodobností p<0,05.

Závěr

Pomocí realizovaných experimentů byla vyvinuta metoda analýzy těžkých kovů obsažených ve včelím jedu. Před samotnou voltametrickou analýzou je potřeba provést mineralizaci na mokré cestě za zvýšeného tlaku a teploty (140 °C) a působení oxidačních kyselin (dusičné a sirové) po dobu 4 hodin a následného opakovaného rozpouštění v uvedených kyselin a odpařování do sucha. Voltametrické stanovení těžkých kovů v mineralizátu bylo realizováno za pomoci tužkové HMDE a vodivého C-PLA filamentu. Provedené analýzy potvrdily, že stanovení pomocí HMDE vykazuje vyšší citlivost a nižší meze detekce. Na druhou stranu se prokázalo, že vodivého C-PLA filamentu vyžaduje o něco delší dobu analýzy, ovšem je plně postačující pro stanovení olova, kadmia, mědi, niklu (jejich koncentrace se pohybují v jednotkách až desítkách mg kg⁻¹); zinku (jednotky g kg⁻¹). Shoda výsledků u všech stanovovaných kovů při použití HMDE a C-PLA byla zjištěna s $p < 0,05$.

Acknowledgments

The authors thank the project of Czech Science Foundation (GA ČR) No. 20-01589S, Specific University Research (SVV260560) (M.C.), and GA CU No. 373521 (M.C.) for financial support.

References

1. Meier J., White J.: *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Informa HealthCare, New York 1995.
2. <http://ctdbase.org/detail.go?type=chem&ace=C034201>, Downloaded: 29.8.2020.
3. Choinska M., Hrdlicka V., Sestakova I., Navratil T.: *Monatsh. Chem.* **152**, 35 (2021).
4. Brezina M., Zuman P.: *Polarography in medicine, biochemistry and pharmacy*. Interscience Publishers, New York. 1952.
5. Kopanica M., Navratil T., Sestakova I., Heyrovsky M.: *Methods for Eco-Tribo Polarograph*. Polaro-Sensors, spol. s r. o., Prague 1990-2004.
6. Sestakova I., Navratil T.: *Bioinorg. Chem. Appl.* **3**, 43 (2005).
7. Navratil T., Novakova K., Josypcuk B., Sokolova R., Sestakova I.: *Monatsh. Chem.* **147**, 165 (2016).
8. Sestakova I., Skalova S., Navratil T.: *J. Electroanal. Chem.* **821**, 92 (2018).
9. Navratil T., Sestakova I., Marecek V.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **6**, 6032 (2011).
10. Parisova M., Navratil T., Sestakova I., Jaklova Dyrtrtova J., Marecek V.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **8**, 27 (2013).
11. Novakova K., Navratil T., Sestakova I., Le M. P., Vodickova H., Zamecnikova B., Sokolova R., Bulickova J., Gal M.: *Monatsh. Chem.* **146**, 819 (2015).
12. Sestakova I., Navratil T., Josypcuk B.: *Electroanalysis* **28**, 2754 (2016).
13. Mader P., Szakova J., Miholova D.: *Analisis* **26**, 121 (1998).
14. Hynek D., Prasek J., Pikula J., et al.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **6**, 5980 (2011).
15. Veverkova L., Hradilova S., Milde D., Panacek A., Skopalova J., Kvitel L., Petrzlova K., Zboril R.: *Spectrochimica Acta Part B* **102**, 7 (2014).
16. Cadkova Z., Szakova J., Miholova D., Horakova B., Kopecky O., Krivska D., Langrova I., Tlustos P.: *J. Agric. Food Chem.* **63**, 2344 (2015).
17. Mader P., Curdova E.: *Chem. Listy* **91**, 227 (1997).
18. Cizkova P., Navratil T., Sestakova I., Josypcuk B.: *Electroanalysis* **19**, 161 (2007).
19. Vaneckova E., Bousa M., Lachmanova S. N., Rathousky J., Gal M., Sebechlebska T., Kolivoska V.: *J. Electroanal. Chem.* **857**, 113745 (2020).
20. Vaneckova E., Bousa M., Sokolova R., et al.: *J. Electroanal. Chem.* **858**, 113763 (2020).
21. Vaneckova E., Bousa M., Vivaldi F., Gal M., Rathousky J., Kolivoska V., Sebechlebska T.: *J. Electroanal. Chem.* **857**, 113760 (2020).

Electrochemical Characterization of Molecular Conductors Containing Redox Switching Element

Štěpánka Nováková Lachmanová ^a, František Vavrek ^a, Taňa Sebechlebská ^{a,b}, Jakub Šebera ^a, Viliam Kolivoška ^a, Jan Lukášek ^c, Nico Balzer ^c, Michal Valášek ^c, Marcel Mayor ^{c,d}, and Magdaléna Hromadová ^a

^aJ. 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

^bDepartment of Physical and Theoretical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovak Republic

^cKarlsruhe Institute of Technology (KIT), Institute of Nanotechnology, P.O. Box 3640, 76021 Karlsruhe, Germany

^dDepartment of Chemistry, University of Basel, CH-4056 Basel, Switzerland

Abstract

Electrochemical properties of new molecules containing tripodal anchor and redox switching element have been studied by cyclic voltammetry and DFT quantum mechanical calculations. Comparison of their redox properties with individual organometallic $[\text{Ru}(\text{terpy})_2]^{2+/3+}$ and $[\text{Os}(\text{terpy})_2]^{2+/3+}$ redox centers shows that covalently bonded tripodal anchor does not compromise the reversibility of a redox process and has no effect on the stability of new molecules. New molecular conductors have smaller HOMO-LUMO gap and both are oxidized at only slightly more positive potentials after tripodal substitution making them suitable for the development of molecular conductors with switching abilities.

Key Words: $[\text{Ru}(\text{terpy})_2]^{2+}$, $[\text{Os}(\text{terpy})_2]^{2+}$, Tripodal anchor, Cyclic voltammetry, DFT calculations.

Introduction

Highly stable electronic components with desired functionalities are indispensable for the future development of molecular electronic devices. Functional components include molecular conductors ¹, molecular switches ^{2,3}, diodes ⁴, transistors ⁵, and single molecule magnets ⁶. Multipodal anchors are mainly utilized to increase the stability and conducting properties of future devices and allow for the desired geometry related to the position of the functional component with respect to the conducting surface ^{7,8}. This work builds on our previous studies of molecular conductors containing tripodal anchoring groups ⁹⁻¹⁶, where a conducting molecular wire has been replaced by an organometallic complex serving as a signal switching element ¹⁷⁻²⁰. Chemical structures of molecules studied in this contribution are shown in Fig. 1.

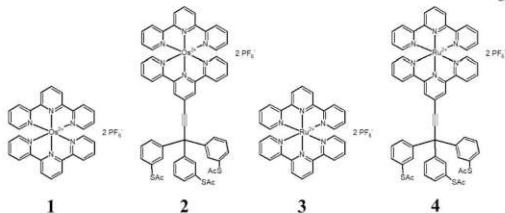


Fig. 1. Chemical structure of organometallic complexes **1** to **4**.

Aim of this work is to compare the electrochemical properties of bis(terpyridine) complexes of osmium(II) and ruthenium(II) in their native form (compounds **1** and **3**) and after covalent connection to a tripodal anchor (compounds **2** and **4**) allowing such molecules a directional attachment to the gold substrate. The reversibility of the redox switch and its stability after tripodal substitution is sought for.

Experimental

Electrochemical properties of molecules **1** to **4** were studied in acetonitrile solvent (99.8 % anhydrous, Sigma Aldrich) on the polycrystalline gold disc ($1.8 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$) and glassy carbon ($9.5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$) working electrodes using PGSTAT30 (Metrohm, Switzerland) potentiostat. Molecules **1** to **4** were used as received. Tetrabutylammonium hexafluorophosphate TBAPF₆ (p.a. $\geq 99\%$ for electrochemical analysis, Sigma Aldrich) was dried in the oven at 80°C before use. Solvent was dried with activated molecular sieves (0.3 nm, Lachema, Czech Republic) and finally with activated alumina just before the experiment. All glassware and electrochemical cell parts were cleaned in boiling 30% nitric acid and repeatedly boiled in the ultrapure water (18.2 M Ω cm, MilliQ Integral 5, Merck) followed by drying at 105°C. Three electrode system containing working electrode, Ag/AgCl|1M LiCl reference electrode and gold wire auxiliary electrode was used. Oxygen was removed from the cell by a stream of argon gas (99.998 % purity, Messer) and argon blanketed the solution throughout the experiment. Ferrocene was added at the end of each experiment as an internal standard.

Theoretical calculations were done by the B3LYP and modified B3LYP functionals using density functional theory (DFT) including polarizable continuum model (PCM) and/or conductor like screening model (COSMO) for acetonitrile solvent. Gaussian 09 program was used for geometry optimization tasks and ADF 2017 software was used for the calculations of the molecular orbital energies.

Results and discussion

Fig. 2 shows representative cyclic voltammograms for molecules **1** to **4** in the acetonitrile solvent.

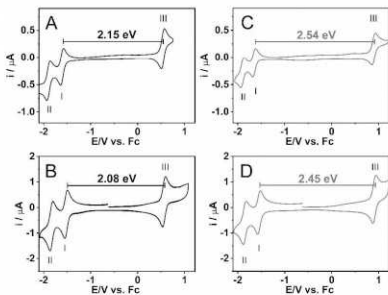


Fig. 2. Cyclic voltammogram for 0.77 mM **1** (A), 0.59 mM **2** (B), 0.54 mM **3** (C) and 0.47 mM **4** (D) in 0.1M TBAPF₆ and acetonitrile at the scan rate 0.1 V/s. Gold disc (A and C) and glassy carbon (B and D) working electrode was used. Numbers indicate experimental HOMO-LUMO gap.

The initial direction of the potential scan was towards more positive potential values followed by the reverse scan towards negative potentials. No noticeable difference was observed at the scan direction reversal as well as by the change of the electrode material. Peaks I and II at negative potentials represent two reversible one-electron charge transfer processes associated with the reduction of two terpyridine ligands. A voltammetric wave III at positive potential values represents one-electron oxidation (peak separation close to 59 mV) of the central metal ion M²⁺ to M³⁺ (M = Ru, Os). Both reduction and oxidation processes are reversible within the range of potential scan rates used (between 0.02 V/s and 10 V/s). This statement has been confirmed by the linear dependence of the peak current on the square root of the scan rate and by the ratio of the anodic and cathodic peak current, which was close to one (data not shown). These molecules can undergo multiple redox scan cycles without compromising their chemical stability.

The most important observation in Fig. 2 is a positive shift of the standard redox potentials of charge transfer processes I and II in molecules **2** and **4** compared to **1** and **3**. Together with a small positive shift of the standard redox potential of III this behavior translates to a decrease of the HOMO-LUMO gap in molecules **2** and **4** compared to their native forms **1** and **3**.

Energies of HOMO and LUMO frontier orbitals (HOMO^{exp} and LUMO^{exp}) were obtained from experimental standard redox potentials of processes I and II after an assumption that ferrocene/ferrocenium reference energy on the Fermi energy scale equals to -4.8 eV relative to vacuum^{21,22}.

Fig. 3A shows the correlation between DFT calculated HOMO^{theor} energy and experimental HOMO^{exp} energy since the process of switching represents oxidation related directly to HOMO. As can be seen from the slope which is close to 1 the quantum mechanical calculations including COSMO model for acetonitrile solvent can reproduce the experiment very well. Calculated orbital energies were used to obtain theoretical HOMO-LUMO gap, which was 2.62 eV for molecule **1**, 2.54 eV for molecule **2**, 3.01 eV for molecule **3** and 2.93 eV for molecule **4**, respectively.

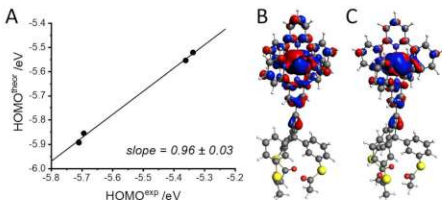


Fig. 3. Correlation between experimentally obtained and theoretically calculated HOMO energy (A) and corresponding computed HOMO orbital for molecules **2** (B) and **4** (C).

Compared to HOMO-LUMO gap values indicated in Fig. 2 these numbers systematically overestimate the experimental values, but they are able to reproduce the decrease in the HOMO-LUMO gap after tripodal modification very well. Fig. 3 shows also the calculated HOMO orbitals for molecules **2** (B) and **4** (C) that correspond to energies shown in Fig. 3A. In both cases the HOMO is localized on the organometallic center with slightly larger delocalization on terpyridine ligands for osmium cation.

Conclusions

We have studied electrochemical properties of two potential molecular conductors with redox switching abilities. We have shown that the electrochemical properties of the organometallic redox center are not compromised by the tripodal substitution. Both molecules **2** and **4** undergo reversible one electron oxidation without any subsequent chemical degradation steps. Quantum chemical calculations confirmed the experimentally observed decrease of the HOMO-LUMO gap compared to their osmium(II) and ruthenium(II) native forms **1** and **3**.

Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation (project no. 21-13458S).

References

1. Kolivoška V., Valášek M., Gál M., Sokolová R., Bulíčková J., Pospíšil L., Mészáros G., Hromadová M.: *J. Phys. Chem. Lett.* **4**, 589 (2013).
2. Darwish N., Aragonès A. C., Darwish T., Ciampi S., Díez-Pérez I.: *Nano Lett.* **14**, 7064 (2014).
3. Aragonès A. C., Aravena D., Cerdá J. I., Acís-Castillo Z., Li H., Real J. A., Sanz F., Híhath J., Ruiz E., Díez-Pérez I.: *Nano Lett.* **16**, 218 (2016).
4. 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).
5. Perrin M. L., Burzuri E., van der Zant H. S. J.: *Chem. Soc. Rev.* **44**, 902 (2015).
6. Bogani L., Wernsdorfer W.: *Nat. Mater.* **7**, 179 (2008).
7. Valášek M., Mayor M.: *Chem. Eur. J.* **23**, 13538 (2017).
8. Ishiwari F., Nascimbeni G., Sauter E., Tago H., Shoji Y., Fujii S., Kiguchi M., Tada T., Zhamikov M., Zojer E., Fukushima T.: *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 5995 (2019).
9. Hromadová M., Kolivoška V., Sokolová R., Šebera J., Mészáros G., Valášek M., Mayor M.: *XXXVI. Modern Electrochemical Methods, JETFichovice, May 23rd – 27th, 2016*. Book of Abstracts (Navrátil T., Schwarzová, K., Fojta M. eds.) p. 78.
10. Lindner M., Valášek M., Homberg J., Edelmann K., Gerhard L., Wulfhekel W., Fuhr O., Wächter T., Zhamikov M., Kolivoška V., Pospíšil L., Mészáros G., Hromadová M., Mayor M.: *Chem. Eur. J.* **22**, 13218 (2016).
11. Kolivoška V., Šebera J., Lindner M., Valášek M., Mayor M., Mészáros G., Gasior J., Hromadová M.: *XXXVII. Modern Electrochemical Methods, JETFichovice, May 15th – 19th, 2017, JETFichovice*, Book of Abstracts (Navrátil T., Schwarzová, K., Fojta M. eds.) p. 99.
12. Sebechlebská T., Šebera J., Kolivoška V., Lindner M., Gasior J., Mészáros G., Valášek M., Mayor M., Hromadová M.: *Electrochim. Acta* **258**, 1191 (2017).
13. Kolivoška V., Sebechlebská T., Šebera J., Gasior J., Lindner M., Lukášek J., Valášek M., Mayor M., Mészáros G., Hromadová M.: *XXXVIII. Modern Electrochemical Methods, JETFichovice, May 21st – 25th, 2018, JETFichovice*, Book of Abstracts (Navrátil T., Schwarzová, K., Fojta M. eds.) p. 132.
14. Hromadová M., Kolivoška V., Šebera J., Sebechlebská T., Gasior J., Nováková Lachmanová Š., Mészáros G., Lindner M., Mayor M., Valášek M.: *XXXIX. Modern*

Electrochemical Methods, Jetrichovice, May 20th – 24th, 2019, Jetrichovice, Book of Abstracts (Navrátil T., Schwarzová, K., Fojta M. eds.) p. 96.

15. Kolivoška V., Šebera J., Sebechlebská T., Lindner M., Gasior J., Mészáros G., Mayor M., Valášek M., Hromadová M.: *Chem. Commun.* **55**, 3351 (2019).
16. Šebera J., Lindner M., Gasior J., Mészáros G., Fuhr O., Mayor M., Valášek M., Kolivoška V., Hromadová M.: *Nanoscale* **11**, 12959 (2019).
17. Maeda H., Sakamoto R., Nishihara H.: *Coord. Chem. Rev.* **346**, 139 (2017).
18. Ozawa H., Baghernejad M., Al-Owaedi O. A., Kaliginedi V., Nagashima T., Ferrer J., Wandlowski T., García-Suárez V. M., Broekmann P., Lambert C. J., Haga M.: *Chem. Eur. J.* **22**, 12732 (2016).
19. Davidson R., Liang J.-H., Milan D. C., Mao B.-W., Nichols R. J., Higgins S. J., Yufit D. S., Beeby A., Low P. J.: *Inorg. Chem.* **54**, 5487 (2015).
20. Davidson R., Al-Owaedi O. A., Milan D. C., Zeng Q., Tory J., Hartl F., Higgins S. J., Nichols R. J., Lambert C. J., Low P. J.: *Inorg. Chem.* **55**, 2691 (2016).
21. Djurovich P. I., Mayo E. I., Forrest S. R., Thompson M. E.: *Organic Electronics* **10**, 515 (2009).
22. Cardona C. M., Li W., Kaifer A. E., Stockdale D., Bazan G. C.: *Adv. Mater.* **23**, 2367 (2011).

Voltammetric Detection of Selected Unnatural Bases in DNA Oligonucleotides (Voltametriická detekce vybraných nepřírozených bází v DNA oligonukleotidech)

Anna Ondráčková, Monika Hermanová, Hana Pivoňková, and Miroslav Fojta
Institute of Biophysics, Czech Academy of Sciences, Kralovopolska 135, CZ-61265, Brno,
Czech Republic, e-mail: agna333@gmail.com

Abstract

Design of unnatural nucleobases represents one of the ways towards expansion of genetic code in the area of synthetic biology. Electrochemical approaches have recently proved their potential in analysis of nucleic acids bearing low levels of modification with the unnatural bases. This work has been focused on voltammetric characterization of oligonucleotides modified with a synthetic base containing an electrochemically reducible nitro group. We have been able to differentiate the oligonucleotides containing the nitro-derivative from a fully natural analogue.

Key Words: Unnatural base, Voltammetry, Mercury, Oligonucleotide.

Úvod

Jeden ze směrů, kterými se ubírá současná syntetická biologie, spočívá ve vývoji systémů, ve kterých se v DNA kromě přírodních nukleobází nachází i báze uměle vytvořené. Zatímco některé systémy využívají pro párování nepřírodních bází pouze jejich prostorovou komplementaritu¹, jiné systémy zachovávají párování pomocí jak prostorové komplementarity, tak prostřednictvím vodíkových vazeb. Jedním z těchto systémů je i „Artificially Expanded Genetic Information System“ (AEGIS), který využívá různé uspořádání donorových a akceptorových skupin pro tvorbu vodíkových vazeb, což umožňuje tvorbu párů bází se stejnou geometrií jako přírodní A:T a G:C páry². Tímto způsobem tak bylo možné vytvořit DNA nebo RNA obsahující až šest párů bází, oproti přírodní DNA tedy o čtyři páry bází více, a takto vytvořená DNA nebo RNA se následně může účastnit replikace, transkripce, reverzní transkripce nebo translace³.

Již dlouho je známo, že elektrochemické metody mohou být použity pro studium nukleových kyselin⁴. Tradičně byly pro studium redukce nukleobází využívány rtuťové elektrody, zatímco oxidace bází byla pozorována na uhlíkových elektrodách, nicméně nedávno bylo zjištěno, že i elektroda z pyrolytického grafitu může být použita pro studium redukce nukleových kyselin v negativních potenciálech⁵. Kromě studia nemodifikovaných nukleových kyselin, pro které mohou být kromě signálů redukce a oxidace nukleobází využity i tenzometrické signály odpovídající adsorpčně-desorpčním jevům na elektrodě, byly elektrochemické metody využity i pro studium modifikovaných nukleových kyselin, například DNA modifikované komplexy oxidu osmičelého, či DNA s enzymaticky inkorporovanými nukleobázemi nesoucími elektroaktivní redoxní značky⁶. Nedávno byla popsána i možnost velice citlivé elektrochemické detekce nepřírodních bází pocházejících z laboratoře F. Romesberga¹, založená na jejich schopnosti katalyzovat vylučování vodíku⁷.

Naproti tomu, některé báze ze systému AEGIS nabízejí možnost jejich studia prostřednictvím redoxních signálů. V této práci jsme se zaměřili na nepřírozenou bázi triviálně označenou jako Z (6-amino-5-nitro-2(1H)-pyridon; Obr. 1). Pro elektrochemickou analýzu byly využity oligonukleotidy odvozené z lidské telomerní sekvence, které nesly modifikaci na jedné či dvou pozicích; elektrochemické chování takto modifikovaných oligonukleotidů bylo porovnáno

s nemodifikovanými oligonukleotidy, a to jak s C-bohatým řetězcem, tak s komplementárním G-bohatým řetězcem.



Obr. 1. Chemická struktura nepřirozené báze Z (6-amino-5-nitro-2(1H)-pyridon).

Experimentální část

Pro měření byly použity oligonukleotidy shrnuté v Tab. 1: tři oligonukleotidy obsahující bázi Z, sekvence neobsahující modifikovanou bázi a k ní sekvence komplementární. Koncentrace oligonukleotidů byla $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, rozpuštěny byly v 1 mM sodnofosfátový pufr (pH 7) + 0,3 mM EDTA. Mezi experimenty byl roztok skladován při -10°C .

Všechna elektrochemická měření byla prováděna při laboratorní teplotě v tříelektrodeovém 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 3 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 V, potenciál bodu obratu -1,85 V, koncový potenciál 0 V, rychlost polarizace 1 V.s⁻¹. Pro každé měření bylo provedeno 5 skenů.

Tabulka I.

Sekvence použitých oligonukleotidů.

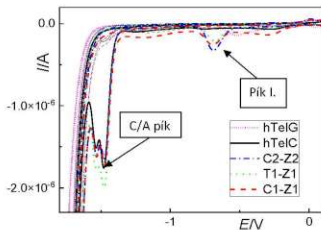
Sekvence	Název	Délka	ϵ
CCCTAACCCCTAACCCZTAACCC	C1-Z1	21	8988
CCCTAACCCCTAACCCZAACCC	T1-Z1	21	8988
CCZTAACCCCTAACCCZTAACCC	C2-Z2	21	8988
CCCTAACCCCTAACCCCTAACCC	hTelC	21	8988
GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG	hTelG	21	10641

Výsledky a diskuze

Při redukcí kteréhokoli z oligonukleotidů použitých v této práci, s výjimkou oligonukleotidu hTelG, můžeme na cyklických voltamogramech (Obr. 2) pozorovat redukční signál bázi cytosinu a adeninu – pik CA. Tento pik je rozdvojený, což odpovídá tomu, že báze adenin a cytosin se v oligonukleotidech nachází v blocích (zatímco v DNA s náhodným zastoupením bázi tyto dvě báze dávají společný nerozlišitelný CA pik⁸).

Dalším dobře vyvinutým katodickým signálem, který můžeme pozorovat na voltamogramech, je pik nacházející se okolo -0,6 V, označený jako pik I. Tento pik je specifický pouze pro oligonukleotidy obsahující bázi Z (tedy oligonukleotidy C1-Z1, T1-Z1 a C2-Z2) a lze tedy předpokládat, že tento pik odpovídá redukcí nitroskupiny, která je součástí struktury báze Z (Obr. 1). Již dříve bylo zjištěno, že elektrochemickou redukcí nitroskupiny lze pozorovat

například i u nitroskupinou modifikovaných bází, které jsou enzymaticky inkorporovány do DNA⁹. Pík I. oligonukleotidu C2-Z2 je v porovnání s oligonukleotidy C1-Z1 a T1-Z1 vyšší, což odpovídá tomu, že v jeho sekvenci se nachází dvě báze Z oproti jedné v každém z oligonukleotidů C1-Z1 a T1-Z1.



Obr. 2. Cyklické voltamogramy oligonukleotidů obsahujících nepřírozenou bázi Z: C1-Z1, T1-Z1 a C2-Z2, původní sekvence hTelC a její komplementární sekvence hTelG. Počáteční potenciál +0,1 V, potenciály obratu v -1,85 V a +0,1 V. Zobrazeny první dva cykly pro každý oligonukleotid.

Závěr

V této práci jsme ukázali, že je možné s využitím elektrochemické analýzy rozlišit oligonukleotidy obsahující nepřírozenou bázi Z od přirozených nemodifikovaných oligonukleotidů, a to díky signálu redukce nitroskupiny nacházející se ve struktuře báze Z, přičemž výsledky naznačují možnost kvantifikace počtu bází Z v dané analyzované sekvenci.

Acknowledgement

Tato práce vznikla za podpory projektu Leading Agency ARRS/GAČR reg. č. 21-46325L a projektu SYMBIT reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000477 financovaného z ERDF.

References

1. Malyshev D. A., Dhimi K., Lavergne T., Chen T., Dai N., Foster J. M., Corrêa I. R., Romesberg F. E.: *Nature* *509*, 385 (2014).
2. Yang Z., Chen F., Chamberlin S. G., Benner S. A.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *49*, 177 (2011).
3. Kim H.-J., Leal N. A., Hoshika S., Benner S. A.: *J. Org. Chem.* *79*, 3194 (2014).
4. Paleček E., Bartošík M.: *Chem. Rev.* *112*, 3427 (2012).
5. Špaček J., Daňhel A., Hasoň S., Fojta M.: *Electrochem. Commun.* *82*, 34 (2017).
6. Hocek M., Fojta M.: *Chem. Soc. Rev.* *40*, 5802 (2011).
7. Špaček J., Fojta M.: *Electrochim. Acta* *364*, 137298 (2020).
8. Trnková L., Jelen F., Postbieglová I.: *Electroanalysis* *15*, 1529 (2003).
9. Horáková P., Macičková-Cahová H., Pivoňková H., Špaček J., Havran L., Hocek M., Fojta M.: *Org. Biomol. Chem.* *9*, 1366 (2011).

Dialysis in Microliter Sample Volume Connected via Flow-gating Interface with Rapid Capillary Electrophoresis
(Dialýza mikrolitrových objemů vzorků spojená s rychlou kapilární elektroforézou prostřednictvím flow-gating interface)

František Opekar^a and Petr Tůma^b

^a Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 2030, 128 43 Prague 2, Czech Republic, E-mail: opekar@natur.cuni.cz

^b Charles University, Third Faculty of Medicine, Department of Hygiene, Ruská 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic

Abstract

A new analytical apparatus was described based on on-line connection of the electrophoresis in short capillary with a dialysis unit allowing dialysis from the microliter volume of the sample to the sub-microlitre volume of the acceptor solution. The properties of the apparatus were tested with model solutions of a mixture of inorganic cations (K^+ , Ba^{2+} and Na^+) and organic molecules (creatinine, histidine and arginine). The air-assisted flow-gating interface was manufactured in the form of a chip cast from PDMS. Basic properties of the apparatus, namely concentration dependences and separation parameters were presented.

Key Words: Dialysis, Electrophoresis, Short capillary, Flow-gating interface, Inorganic cations, Amino acids.

Úvod

Kombinace kapilární elektroforézy (CE) s flow-gating interface (FGI) je efektivní metodou pro on-line spojení analytické průtokové metody s CE a pro dávkování vzorku do krátkých kapilár při rychlých elektroforetických separacích. V literatuře je popsána řada konstrukčních variant FGI a jejich aplikací, viz např. referát¹. Princip dávkování vzorku do CE kapiláry s použitím FGI je, bez ohledu na jeho konstrukci a materiál, následující. Analyzovaný roztok kontinuálně přiváděný dávkovací kapilárou k separační kapiláře je od jejího vstupu odkláněn proudem základního elektrolytu (BGE). Pouze při dávkování vzorku do kapiláry je proud BGE na definovanou dobu zastaven, takže u vstupu separační kapiláry se vytvoří zóna roztoku vzorku, z níž je vzorek nadávkován. Poté je proud BGE obnoven, roztok vzorku je od vstupu separační kapiláry odplaven a je zahájena separace.

V naprosté většině doposud popsaných aplikací FGI-CE se zóna vzorku vytváří v prostoru, z něž je BGE roztokem vzorku vytěšňován. V práci² byl popsán FGI, v němž je vstup separační kapiláry umístěn proti dávkovací kapiláře v malém dávkovacím prostoru. Z něj je před dávkováním vzorku BGE odstraněn vzduchem, takže místo zóny vzorku se v prázdném prostoru mezi výstupem dávkovací a vstupem separační kapiláry vytvoří malá kapka roztoku vzorku, z níž je vzorek nadávkován. Je tím zcela eliminována možnost naředení vzorku BGE. Protože není nutno BGE vytlačovat z dávkovacího prostoru roztokem vzorku, je k nadávkování zapotřebí jeho velice malý objem. Po nadávkování vzorku do CE kapiláry je zbytek vzorku vypláchnut, dávkovací prostor naplněn BGE a zahájena separace. Tento tzv. „air-assisted“ FGI byl použit v této práci pro on-line spojení dialyzační nádoby o malém objemu (desítky μL), v níž dochází k dialýze do akceptorového roztoku v dialyzační trubičce o objemu desetin μL , s rychlou elektroforetickou separací v krátké kapiláře.

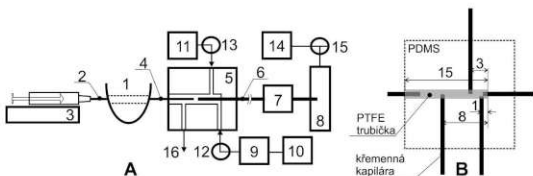
Experimentální část

Schéma aparatury je na obr. 1A. Aparaturu lze rozdělit do tří základních částí – dialyzační nádoby o malém objemu, tzv. dialyzační místičku (DM), FGI a CE v krátké kapiláře.

Dialyzační mistička a její připojení k FGI

Dialyzační mističkou, obr. 1A (1), je víčko 0,2 mL PCR mikrozkumavky. V jejích stěnách byly proti sobě vytvořeny otvory o průměru ca 0,5 mm, jimiž byla protažena asi 6 mm dlouhá dialyzační trubička z regenerované celulózy, OD 216 μm , ID 200 μm , MWCO13 kD. Vstupní hadičkou (2) je do dialyzační trubičky přiváděn akceptorový roztok lineární pumpou (3). Dialyzát je odváděn do FGI (5) výstupní hadičkou (4), zakončenou nerezovou dávkovací kapilárou, OD 350 μm , ID 200 μm , vstupující do dávkovacího prostoru FGI skrz silikonové těsnění. K zamezení stékání roztoku vytékajícího z dávkovací kapiláry po jejích stěnách, jsou stěny hydrofobizovány emulzí PTFE; kapka roztoku tak směřuje přímo proti vstupu separační kapiláry (6), viz obr. 2B. Objem dialyzační trubičky a výstupní hadičky (4) až k výstupu dávkovací kapiláry určené z geometrických rozměrů je 1,03 μL . Z funkčního hlediska je žádoucí, aby délka spoje mezi dialyzační mističkou a FGI byla co nejkratší. Z praktického hlediska však spoj musí zajistit určitou flexibilitu při spojování obou částí.

Do dávkovacího prostoru je dále přiváděn BGE z rezervoáru (10) pumpou (9) nebo vzduch pumpou (11). Průtoková rychlost obou medií je řízena piezoelektrickými mikropumpami a jejich průtok dávkovacím prostorem je podle programu ovládán solenoidovými miniventily (12, 13).



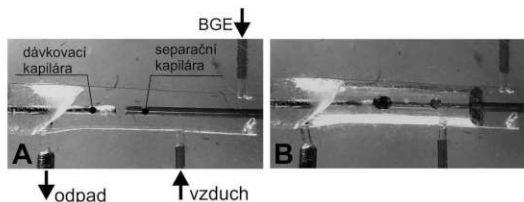
Obr. 1. Blokové schéma aparatury (A) a struktura a rozměry (v mm) předlohy pro odlití PDMS čipu FGI (B). 1 – dialyzační mistička, 2 – vstupní hadička, 3 – lineární pumpa, 4 – výstupní hadička zakončená dávkovací kapilárou, 5 – čip FGI, 6 – separační kapilára, 7 – detektor, 8 – koncová nádobka, 9, 11 – piezoelektrické pumpy, 10 – rezervoár BGE, 12, 13, 15 – solenoidové ventily, 14 – vakuová pumpa, 16 – odpad.

Flow-gating interface

Čip FGI o rozměrech 20 x 20 mm byl odlit z PDMS ve formě vyřiznuté ze silikonové gumy. Předloha FGI, viz struktura a rozměry na obr. 1B, byla sestavena ze standardní PTFE trubičky, OD 1/16", ID 200 μm a délce 15 mm, která v čipu určuje objem dávkovacího prostoru. Ve stěnách PTFE trubičky byly na příslušných místech kolmo na osu trubičky propíchnuty tři otvory, do nichž byly vsazeny asi 3 cm dlouhé kousky křemenných kapilár o OD 280 μm . Stejně kapiláry byly axiálně vsunuty i do PTFE trubičky. Takto sestavená předloha byla vložena do silikonové formy, zalita polymerační směsí a ponechána polymerovat při teplotě 50 °C po dobu 45 minut. Po ukončení polymerace a vyjmutí FGI z formy byly kapiláry a PTFE trubička z odlitku vytaženy. PDMS je elastický, takže separační kapiláru, kapiláry pro přívod BGE a vzduchu o OD 380 μm a odpadní trubičku lze do vytvořených kanálek po 280 μm kapilárách vsunout a jsou ve svých polohách fixovány a dobře utěsněny.

Elektroforetická aparatura

Elektroforetické separace byly prováděny v laboratorní zhotovené aparatuře. Vstup separační kapiláry je v dávkovacím prostoru FGI umístěn ve vzdálenosti $\approx 360 \mu\text{m}$ přímo proti výstupu dávkovací kapiláry. Separační kapilára prochází bezkontaktním vodivostním detektorem, obr. 1A (7), a ústí v koncové nádobce (8), kde je umístěna vysokonapěťová elektroforetická elektroda zdroje. Zemní elektroda je umístěna ve výstupu z FGI (16). Separace byly prováděny v křemenné kapiláře, OD $380 \mu\text{m}$, ID $25 \mu\text{m}$, délka celková/k detektoru $16,5/11,5 \text{ cm}$, při napětí/proudu $10 \text{ kV}/7 \mu\text{A}$ (606 V cm^{-1}). Koncová nádobka je spojena s vakuovou pumpou (14) přes trojcestný ventil (15). Podle jeho stavu je nádobka spojena buď s atmosférou – během separace, nebo s vakuovou membránovou pumpou při dávkování dialyzátu do separační kapiláry nebo při jejím promývání. Detaily hydrodynamického podtlakového dávkování lze nalézt v práci ³. BGE byl roztok 100 mM kyselina octová + 20 mM LiOH (pH 4,1), akceptorovým roztokem byl zředěný BGE vodou 1:1, čímž je zajištěn zaostřovací efekt vedoucí k zakoncentrování nadávkované zóny dialyzátu. Aparatura byla testována dvěma typy analytů: a) směsí anorganických kationtů K^+ , Ba^{2+} a Na^+ , b) směsí organických molekul kreatininu, histidinu a argininu.



Obr. 2. Dávkovací prostor FGI naplněný BGE při separaci a promývání separační kapiláry (A) a vyplněný vzduchem při dávkování dialyzátu; vzorek je pro lepší viditelnost obarven (B).

Pracovní postup

Činnost aparatury při analýze lze popsat šesti po sobě následujícími kroky. V základním stavu je dávkovací prostor FGI naplněn BGE (obr. 2A). Hadička od lineární pumpy přes DM až k výstupu dávkovací kapiláry je naplněna akceptorovým roztokem. Jednotlivé kroky jsou:

- 1) Do DM je pistovou pipetou odměřeno $50 \mu\text{L}$ roztoku vzorku a je zahájeno měření doby dialýzy.
- 2) Po uplynutí požadované doby je zapnuta lineární pumpa a dialyzát z dialyzační trubičky je tokem akceptorového roztoku transportován do FGI. Dávkovacím prostorem protéká BGE, který odklání roztok vystupující z dávkovací kapiláry od vstupu separační kapiláry, aby nedocházelo k spontánnímu dávkování.
- 3) Po příslušné době (viz dále) je dialyzát dopraven k výstupu dávkovací kapiláry a tok BGE je zastaven. Z dávkovacího prostoru je vzduchem vytlačen BGE a mezi dávkovací kapilárou a vstupem separační kapiláry se vytváří kapka roztoku dialyzátu (obr. 2B), z níž je podtlakovým pulsem generovaným v koncové nádobce dialyzát nadávkován do separační kapiláry.
- 4) Po nadávkování vzorku do separační kapiláry je lineární pumpa vypnuta, dávkovací prostor je naplněn BGE a zapnutím vysokého napětí je zahájena elektroforetická separace.
- 5) Po ukončení separace je separační kapilára promyta BGE vytvořením podtlaku v koncové nádobce.

- 6) Z DM je odsát zanalyzovaný vzorek, DM je propláchnuta kapkou vody a krátkodobým zapnutím lineární pumpy je dialyzační trubička naplněna čistým akceptorovým roztokem. Aparatura je tak připravena na novou analýzu.

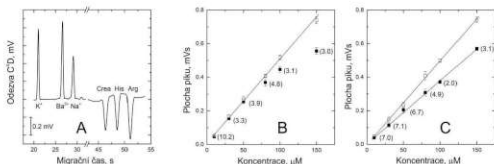
Kroky 1) 5) a 6) jsou manuální, vykonává je obsluha, zbývající probíhají automaticky po spuštění počítačového programu vytvořeného v LabView. Program přes jednoduchá interface ovládá činnost jednotlivých komponent aparatury: solenoidové ventily (dobu průtoku BGE a vzduchu dávkovacím prostorem FGI a dobu dávkování řízenou délkou podtlakového pulsu v koncové nádobce), spouští a zastavuje lineární pumpu a zapíná separační napětí.

Optimalizované parametry jednotlivých kroků analýzy

Doba dialýzy: 100 s (anorganické kationty), 150 s (organické molekuly); průtoková rychlost akceptorového roztoku: $5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; doba potřebná k dopravě dialyzátu z DM k ústí dávkovací kapiláry: 17 s; průtoková rychlost BGE: $280 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; doba potřebná k vytlačení BGE vzduchem z dávkovacího prostoru: 1 s; doba vytváření kapky dialyzátu mezi dávkovací a separační kapilárou: 1 s (objem kapky vzorku $\approx 0,1 \mu\text{L}$); doba dávkování 0,3 s při negativním tlaku 50 kPa; doba naplnění dávkovacího prostoru BGE před zapnutím vysokonapětového zdroje a zahájení separace: 5 s.

Výsledky a diskuse

Na obr. 3 jsou elektroferogramy směsi analytů použitých k testování vlastností popisované aparatury a koncentrační závislosti draselného kationtu a kreatininu změřené v dialyzátu; pro přehlednost je uvedena koncentrační závislosti ploch těchto dvou analytů jako zástupce anorganických iontů a organických molekul, charakter koncentračních závislosti ploch piků dalších testovaných analytů je zcela obdobný. Pro srovnání jsou uvedeny i koncentrační závislosti těchto analytů při přímém dávkování (tj. bez dialýzy) z roztoků vzorků v akceptorovém pufru; chybové úsečky a hodnoty RSD dokumentují přesnost měření. Vyhodnoceným parametrem byly plochy piků v jednotkách mVs (odezva C¹D není přepočítávána na vodivost).



Obr. 3 Elektroferogramy registrované po 100 s dialýze anorganických iontů a 150 s dialýze organických molekul (A). V obou případech probíhala dialýza z vodného roztoku o ekvimolární koncentraci $50 \mu\text{M}$ příslušných analytů do akceptorového roztoku. Koncentrační závislosti draselného iontu (B) a kreatininu (C) při dávkování přímém (\square) a po dialýze (\blacksquare). Experimentální body jsou střední hodnotou z pěti opakovaných měření, RSD je v závorkách. Při přímém dávkování jsou koncentrační závislosti pro oba analyty ve sledovaném oboru koncentrací 10 až $150 \mu\text{M}$ lineární, v dialyzátu dochází v případě anorganických iontů při vyšších koncentracích k odklonu od linearit. Parametry lineárních regresních rovnic koncentračních závislostí všech testovaných analytů jsou v tabulkách I a II, a u organických

molekul i separační parametry. Ve všech případech byly hodnoty úseků v rámci intervalu spolehlivosti rovny nule, jsou uváděny pro ilustraci a tištěny menším typem písma.

Tabulka I.

Parametry lineární regresní analýzy koncentračních závislosti anorganických kationtů při dávkování po dialýze. Koncentrační obor 10 - 80 μM .

Parametr	K^+	Ba^{2+}	Na^+
Úsek $\times 10^3$, mVs	$1,41 \pm 2,18$	$-5,21 \pm 11,85$	$6,13 \pm 8,18$
Směrnice $\times 10^3$, mVs/ μM	$5,04 \pm 0,04$	$6,21 \pm 0,02$	$2,80 \pm 0,16$
R^2	0,999	0,997	0,993
LOD, μM	1,4	5,9	9,1

Tabulka II.

Parametry lineární regresní analýzy koncentračních závislosti organických molekul při dávkování po dialýze. Koncentrační obor 10 - 150 μM .

Parametr	Crea	His	Arg
Úsek $\times 10^3$, mVs	$4,79 \pm 5,98$	$-7,72 \pm 11,24$	$5,13 \pm 15,02$
Směrnice $\times 10^3$, mVs/ μM	$3,76 \pm 0,07$	$4,60 \pm 0,13$	$5,88 \pm 0,18$
R^2	0,998	0,996	0,996
LOD, μM	6,4	9,9	10,3
Počet pater $\times 10^{-5}$, m^{-1}	$2,85 \pm 0,26$	$2,94 \pm 0,43$	$2,75 \pm 0,36$
Migrační čas, s	$46,10 \pm 0,27$	$48,35 \pm 0,36$	$50,92 \pm 0,23$

Závěr

V práci je testována další možná strategie využití FGI s dávkováním vzorku do elektroforetické kapiláry v prázdném prostoru. Je tak rozšířeno portfolio metod kombinujících FGI s CE, z nichž lze vybírat tu vhodnou pro řešení konkrétní analytické úlohy. Vzhledem k velmi malému objemu vzorku potřebného pro dávkování do separační kapiláry, lze využít dialýzy z mikrolitrového objemu vzorku do dialyzační trubičky obsahující submikrolitrový objem akceptorového roztoku. Lze tak před separací dialýzou upravovat vzorky, které jsou k dispozici pouze v malém objemu (častý případ např. u klinických vzorků).

Parametry analýzy, především doba dialýzy, je závislá na charakteru a koncentraci analytu. Lze ji nejlépe určit, pokud je to možné, s použitím modelového vzorku. Problém by mohl být i s kalibrací vzhledem k malým objemům vzorku, pro něž je určena. Je tedy zřejmé, že by metoda mohla být vhodná především pro speciálních případy analýzy a spíše pro kvalitativní screeningové aplikace.

Acknowledgement

Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentuře České republiky, grant 18-04902S.

References

- Gong M.J., Zhang N., Maddukuri N.: *Anal. Methods* 10, 3131 (2018).
- Opekar F., Tůma P.: *Electrophoresis* 40, 587 (2019).
- Opekar, F. Tůma P.: *J. Chromatogr. A* 1480, 93 (2017).

Electrochemical Detection of 2-aminoindane

Eva Pospíšilová and Tatiana V. Shishkanova

University of Chemistry and Technology, Prague, Faculty of Chemical Engineering,
Department of Analytical Chemistry, Technická 5, 166 28 Praha 6, Czech Republic,
E-mail: pospisae@vscht.cz

Abstract

The aim of this work is to compare the results of the detection of 2-aminoindane (2-AI) using potentiometry with ion-selective membranes (ISMs) and differential pulse voltammetry (DPV). The potentiometric signal is the result of ion exchange occurred onto phase boundary ISM-sample, the voltammetric signal is the result of oxidation of 2-AI on the surface of glassy carbon electrode. It was found that i) both the potentiometric sensitivity and selectivity are influenced by the kind of the active component, ii) the potentiometry with ISMs can be considered as a suitable method for the determination of 2-AI.

Key Words: Aminoindane, Potentiometry, Voltammetry, Ion-selective membrane.

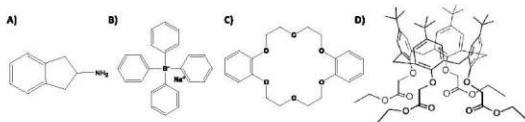
Introduction

2-aminoindane (2-AI) belongs to the class of new psychoactive substances (NPSs). Aminoindanes such as 2-aminoindane (2-AI), 5,6-methylenedioxy-2-aminoindane (MDAI), 5,6-methylenedioxy-*N*-methyl-2-aminoindane (MDMAI), 5-iodo-2-aminoindane (5-IAI), 5-methoxy-6-methyl-2-aminoindane (MMAI), and 5-methoxy-2-aminoindane (MEAI) represent a relatively new generation of NPSs¹. 2-aminoindane (Scheme 1A) shows the structure and stimulatory effect similarities to amphetamine. The development of forensic analytical methods and sensor systems for the identification and detection of these substances has received major attention². High-performance liquid chromatography, gas chromatography combined with mass spectrometry, and Raman spectroscopy are popular laboratory techniques used for NPSs analysis³. Electrochemical methods could prove to be suitable alternatives for the mentioned analytical techniques for the rapid analysis of NPSs. However, there are not many works related to analysis 2-AI and its derivatives⁴⁻⁷.

The attempts of electrochemical detection of 2-AI were described in references^{4,8}. One approach was based on indirect detection of 2-AI using linear sweep voltammetry on a graphite printed electrode. The other approach was based on the selective interaction of 2-AI with benzo-15-crown-5 attached to the surface of a platinum electrode. This work is focused on the comparison of 2-AI detection using differential pulse voltammetry (DPV) and potentiometry with ion-selective membranes (ISMs).

Experimental

2-aminoindane hydrochlorid (98%) was purchased from Sigma-Aldrich (USA). The ISMs were prepared using reagents of analytical purity from Fluka (Switzerland), namely tetrahydrofuran (THF), poly(vinyl chloride) (PVC), nitrophenyl(octyl)ether (NPOE), sodium tetraphenylborate (TPBNa, Scheme 1B) dibenzo-18-crown-6-ether (DB18C6 (Scheme. 1C) and potassium tetrakis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]borate (KTFFB). 4-*tert*-butylcalix[4]arene tetraacetate (calix[4]arene, Scheme. 1D) was synthesized at the Department of Organic Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague. Inorganic compounds used for both potentiometric and voltammetric measurements were from Lach-Ner, Czech Republic. Solutions were prepared using distilled water.



Scheme 1. Structure of 2-aminoindane (A) and active components of the experimental ion-selective membranes: sodium tetraphenylborate (B), dibenzo-18-crown-6-ether (C), and 4-tert-butylcalix[4]jarenetetraacetate (D).

Voltammetric measurements were carried out using PalmSens 3 (PalmSens BV, Netherlands), controlled by the PalmSens 4.3 program. Three-electrode arrangement consisted of glassy carbon (GC) electrode as the working electrode, argentochloride electrode (Ag/AgCl, 3 mol/l KCl) as the reference electrode, and platinum plate as the counter electrode. Differential pulse voltammetry (DPV) was carried out with potential step 0,01 V, scan rate 0,1 V/s, pulse potential 0,001 V, and pulse time 1 ms. The pretreatment of the electrode surfaces was described in previous work⁹.

Potentiometric measurements were carried out using a digital ion-meter PHI 04 MG (Prague, Labio, Czech Republic). Concentration dependences of inorganic ions (Na⁺, K⁺) were measured by adding volume ($V = 0,02; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 2,5; 4$ ml) of 0,1 mol/l stock solution analyte to the potentiometric cell ($V = 20$ ml). Concentration dependence of 2-AI was measured by adding volume ($V = 0,5; 4,5; 3; 5; 6; 10; 22,6; 250$ μ l) of 0,1 mol/l stock solution analyte to the potentiometric cell ($V = 5$ ml). The potentiometric characteristics were determined using the IUPAC recommendation¹⁰. The potentiometric selectivity coefficients ($\log K_{2-AI,j}^{pot}$) were measured by a separate solution method¹¹. The standard addition method¹² was applied to determine 2-AI concentration in the model samples. The regeneration of ISMs surface was carried out in the distilled water with constant stirring for 10 minutes.

Results and discussion

The main purpose of this work was to estimate the possibilities of the detection of 2-AI using voltammetric and potentiometric approaches. Voltammetric measurement of 2-AI was carried out using DPV technique (please, see "Experimental"). The appearance of the peak at +1.2 V was the result of oxidation of primary amino group present in 2-AI structure¹³. It was found that the voltammetric detection of 2-AI can be done in concentration range from $1,5 \times 10^{-3}$ to $13,3 \times 10^{-3}$ mol/l (Fig. 1A). Additionally, the GC-electrode surface required thoroughly regeneration combining both mechanical cleaning and electrochemical pretreatment.

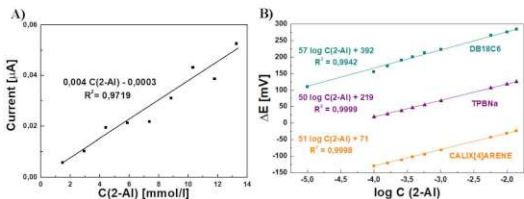
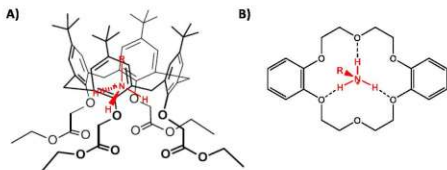


Fig. 1. Concentration dependences obtained for 2-aminoindan using voltammetric (A) and potentiometric (B) approaches.

As active components of ISMs, neutral carries (calix[4]arene and DB18C6) and cation exchanger (TPBNa) were used. Each active component of the experimental ISMs is supposed to display selectivity for 2-AI in a different way. In the case of TPBNa, the potentiometric signal is the result of a Coulombic interaction between a positively charged amino group of 2-AI and a negatively charged TPB⁻ anions. In the case of both DB18C6 and calix[4]arene, there is important the formation of hydrogen bonds between the amino group 2-AI and the supramolecular receptor (Scheme 2). It is well known, that calix[4]arene is able to form stable endo-complexes¹⁴ with amine groups. The interaction occurs between the phenol group of calix[4]arene and the amino group of 2-AI and the rest of the molecule is then position inside the cavity as shown in Scheme 2A. The same applies to DB18C6, where hydrogen bonds are formed between the amino group of 2-AI and the oxygen atoms of the crown-ethers (Scheme 2B)¹⁵.



Scheme 2. Binding of primary amino group to calix[4]arene (A) and dibenzo-18-crown-6-ether (B).

Taking into account the selectivity of DB18C6 towards K^+ ions¹⁶ and calix[4]arene towards Na^+ ions¹⁷, the potentiometric responses of the experimental membranes were measured primarily to these inorganic cations. The experimental findings should help with choosing of salt (either NaCl or KCl) as an inner solution of ion-selective electrodes and should eliminate the interference from K^+ and Na^+ ions. Potentiometric measurements were carried out in the concentration range from $1,0 \times 10^{-4}$ mol/l up to $2,9 \times 10^{-2}$ mol/l. These experiments confirmed the affinity of the DB18C6- and calix[4]arene-based membranes towards K^+ (+58mV/decade) and Na^+ (+99 mV/decade) ions, respectively (Fig. 2). Therefore, $1,0 \times 10^{-4}$ mol/l NaCl was used

as inner solution for DB18C6, 1.0×10^{-1} mol/l KCl was used for TPBNa and calix[4]arene ion-selective electrodes.

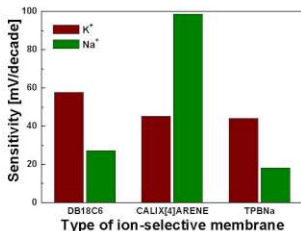


Fig. 2. The comparison of the sensitivity of ion-selective membranes based on dibenzo-18-crown-6-ether, calix[4]arene, and cation exchanger towards K⁺ and Na⁺ ions.

The potentiometric response and selectivity ($\log K_{2-AI,J}^{pot}$) of the experimental ISMs towards 2-AI are depicted in Figure 1B and Table I, respectively. Evidently, the DB18C6-based membranes showed the near Nernstian response (+57 mV/decade) in a concentration range from 1.0×10^{-5} up to 1.4×10^{-2} mol/l (Fig. 1B, dark cyan curve). The difference between the calix[4]arene and cation exchanger-based membranes was observed at measurement of the potentiometric selectivity coefficients with interferences Na⁺ and K⁺ ions.

Table I.

The values of the potentiometric selectivity coefficients ($\log K_{2-AI,J}^{pot}$) determined for the experimental ion-selective membranes.

Interfering ions	Potentiometric selectivity coefficients ($\log K_{2-AI,J}^{pot}$)		
	DB18C6	Calix[4]aren	TPBNa
Na ⁺	-6.7	+1.1	-4.1
K ⁺	-5.6	+0.1	-3.3
NH ₄ ⁺	-6.7	-2.1	-3.6

Comparing the potentiometric selectivity coefficient values showed that i) the DB18C6-based membrane has the higher selectivity towards 2-AI; ii) both of Na⁺ and K⁺ ions are interferences at application of the calix[4]arene-based membrane. The interference of Na⁺ can be explained by a high affinity of calix[4]arene for Na⁺ ions¹⁷.

It is possible to conclude that the potentiometric detection of 2-AI has a number of advantages before its voltammetric detection. Therefore, the potentiometry with ISMs was chosen for the detection of 2-AI in model samples (Table II). Obviously, the results agree satisfactorily with the labelled amounts.

Table II.

Potentiometric detection of 2-aminoindane in model sample using experimental ion-selective membranes.

ISMs	Introduced (mol/l)	Found (mol/l)
TPBNa	2.0×10^{-4}	$(2.2 \pm 0.1) \times 10^{-4}$
DB18C6	2.0×10^{-4}	$(2.4 \pm 0.1) \times 10^{-4}$
Calix[4]aren	2.0×10^{-4}	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^{-4}$

Conclusion

This work is devoted to the comparison of the potentiometric and voltammetric detection of 2-AI that belongs to new psychoactive substances. Potentiometry with ISM was found to provide more possibilities for the electrochemical detection of 2-AI in terms of working concentration range, sensitivity, and selectivity, compared to voltammetry. The active component of ISMs allows to affect and guide the selectivity of the potentiometric determination, which should play a key role during 2-AI detection in the real samples. The development of the potentiometric detection of new psychoactive substances is in progress.

Acknowledgment

Authors are grateful to Assoc. Prof. Jan Budka (Department of Organic Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague) for synthesizing 4-tert-butylcalix[4]arene tetraacetate used in this work. This work was supported by a specific university research (MSMT No. 21-SVV/2021).

References

1. Pinterova N., Horsley R. R., Palenicek T.: *Front. Psychiatry* 8, 236 (2017).
2. Sainsbury P. D., Kicman A. T., Archer R. P., King L. A., Braithwaite R. A.: *Drug Test. Anal.* 3, 479 (2011).
3. Smith J. P., Sutcliffe O. B., Banks C. E.: *Analyst* 140, 4932 (2015).
4. Cumba L. R., Koliopoulos A. V., Smith J. P., Thompson P. D., Evans P. R., Sutcliffe O. B., do Carmo D. R., Banks C. E.: *Analyst* 140, 5536 (2015).
5. Strano-Rossi S., Anzillotti L., Castrignanò E., Romolo F. S., Chiarotti M.: *J. Chromatogr. A* 1258, 37 (2012).
6. Elie L., Elie M., Cave G., Vetter M., Croxton R., Baron M.: *J. Raman Spectrosc.* 47, 1343 (2016).
7. Al-Saffar Y., Stephanson N. N., Beck O.: *J. Chromatogr. B* 930, 112 (2013).
8. Shishkanova T. V., Štěpánková N., Tlustý M., Tobrman T., Jurásek B., Kuchař M., Trchová M., Fítl P., Vršata M.: *Forensic Toxicol.* 373, 137862 (2021).
9. Pospíšilová E.: *Bachelor thesis*, VŠCHT, Praha 2019.
10. Ernő L., Yoshio U.: *Pure Appl. Chem.* 80, 85 (2008).
11. Bakker E., Bühlmann P., Pretsch E.: *Chem. Rev.* 97, 3083 (1997).
12. Saxberg B. H., Kowalski B. R.: *Anal. Chem.* 51, 1031 (1979).
13. Adenier A., Chehimi M. M., Gallardo I., Pinson J., Vilà N.: *Langmuir* 20, 8243 (2004).
14. Bauer L. J., Gutsche C. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 107, 6063 (1985).
15. Izatt R. M., Izatt N. E., Rossiter B. E., Christensen J. J., Haymore B. L.: *Science* 199, 994 (1978).
16. Pandey P. C., Prakash R.: *Sens. Actuators, B* 46, 61 (1998).
17. O'Connor K. M., Arrigan D. W. M., Svehla G.: *Electroanalysis* 7, 205 (1995).

Looking into the Photo-stability of Eosin by Electrochemical Methods

Francesca Sabatini^a, Romana Sokolova^b, and Ilaria Degano^a

^a University of Pisa, Department of Chemistry and Industrial Chemistry, Via Moruzzi 13, 56124 Pisa, Italy, E-mail: f.sabatini4@gmail.com

^b J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic

Abstract

Eosin Y is a synthetic organic dye belonging to the xanthene family. Its bright and fluorescent pink hue attracted and intrigued the painters of the 19th century, who experimented eosin as pigment lake (often called *Geranium lake*) in their paintings. Nevertheless, eosin coloration is as beautiful as unstable, and examples of work of arts with faded hues have been documented. Eosin is not only photo-sensitive but also pH sensitive, making its study very complex. In this work, the combination of electrochemical and spectroscopic techniques revealed to be effective for correlating the physical evidence of eosin fading with its chemical degradation.

Key Words: Eosin, Synthetic dye, UV-Vis Spectroelectrochemistry, Cyclic voltammetry, UV-Vis Spectroscopy, Oxidation.

Introduction

Eosin Y (AR87, C.I. 45380, Fig. 1) is an acid dye synthesized for the first time in 1873 according to literature¹. The geometry of this colorant is characterized by the xanthene moiety that lies on a plane and an aromatic phenyl ring perpendicular to this plane. The conjugated π system of the xanthene, which strongly absorbs in the visible range, is responsible for the vivid and intense coloration provided by eosin². Due to the attractiveness of this pink hue, eosin has been used as pigment lake by 19th painters, especially by Vincent van Gogh³. Nevertheless, eosin revealed poor lightfastness: the bright pink areas on the paintings bleached in a very short time⁴. Thus, in the recent years, the challenging case of eosin has attracted the attention of many scientists and its degradation phenomenon has been investigated both by spectroscopic techniques⁵⁻⁸ and by chromatographic and spectrometric ones^{7,9-11}. Few studies have been published on the electrochemical behavior of eosin and they are mostly focused on the possible use of metal-free dyes in photovoltaic cells¹² and on the removal of synthetic dyes from wastewaters¹³. Electrochemical oxidation and UV-Vis spectroelectrochemical investigations in combination with chromatographic techniques have proved effective for the determination of oxidation mechanism of organic compounds¹⁵⁻¹⁷.

In the present work the photo stability of eosin was investigated using UV-Vis Spectroscopy, Cyclic voltammetry and UV-Vis Spectroelectrochemistry in order to provide a contribution in the disclosing this complex oxidation process.

Experimental part

Standard and reagents

Eosin Y disodium-salt (Eo-Na; $\geq 85\%$ purity) was purchased from Sigma Aldrich (Fig. 1). The chemicals used as supporting electrolyte (KCl) and for the preparation of the Britton-Robinson buffers (0.04 M stock solutions of H_3PO_4 , CH_3COOH , H_3BO_3 and 0.2 M NaOH, Sigma Aldrich, USA) were of reagent grade. Britton-Robinson buffers (pH 1.6, 3.3, 4.0-4.7, 7.0 and 9.5) were prepared at constant ionic strength 0.15 mol/L adjusted by the addition of appropriate amount of $NaClO_4 \cdot H_2O$ (Sigma Aldrich). Buffer at pH 0.9 was obtained admixing 1 mL of 0.1 M KCl with 10 mL of 0.2 M HCl. The solutions were prepared with ultrapure water (Millipore).

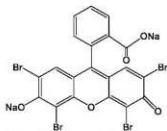


Fig. 1. Chemical structure of Eosin Y disodium-salt.

UV-Vis Spectroscopy

Analyses were performed using a V-750 UV-Vis spectrometer (Jasco International Co., Japan) equipped with Halogen (WI) and Deuterium lamps. The instrument operated with spectral acquisition in the range of 200–760 nm, every 0.2 s and 4 nm resolution.

Cyclic voltammetry

Cyclic voltammetry was performed in an optically transparent thin-layer electrode cell using a PGSTAT 12 AUTOLAB potentiostat (Metrohm Autolab, The Netherlands). The cell contains a three-electrode system (Ag|AgCl|1 M LiCl reference electrode, glassy carbon (diameter 0.9 mm) working electrode, platinum net auxiliary electrode). Measures were performed in Britton-Robinson buffers or 0.1 M KCl. Oxygen was removed from the solution by bubbling with a stream of argon.

UV-Vis Spectroelectrochemistry

An optically transparent thin-layer electrode (OTTLE) cell (8) with a three-electrode system (platinum as working and auxiliary electrodes, silver as quasi-reference electrode) mounted in a thin layer (thickness 0.18 mm) between optical windows were used. Sufficiently optically transparent platinum gauze (80 mesh) of the size 5×5 mm served as the working electrode. The potential scan rate was $5 \cdot 10^{-3}$ V/s. Spectral changes during electrolysis were registered using an Agilent 8453 diode-array detector. 1.0 cm quartz cuvettes were used for testing the stability of the compound when exposed to air.

Results and discussion

UV-Vis Spectroscopy

The remarkable photo-sensitivity of eosin was easily revealed exposing an aqueous solution of eosin Y disodium-salt to natural light: the absorbance drastically decreases approaching to zero in less than 6 days (Fig. 2 top). No isosbestic points are observed contrary to what happened when the solution was irradiated with a monochromatic laser at 405 nm or 532 nm by Alvarez-Martin et al.⁴. Thus, the stability of eosin in solution is strongly dependent on the light exposure leading to the formation of uncolored compounds (Fig. 2 bottom).

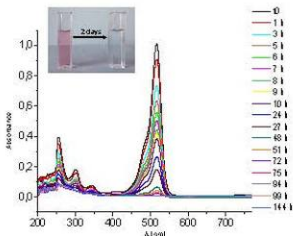


Fig. 2. Top: fresh aqueous eosin solution (left) 2-days irradiated eosin solution (right); Bottom: UV-Vis spectra of eosin (0.065 mM, in solution of 0.2 M KOH) exposed to natural light, collected at different time intervals.

Cyclic voltammetry

The oxidation of eosin was studied at different pH values (pH = 0.9, 1.6, 3.3, 4.0, 4.7, 7.0 and 9.5) by the variability of the cyclic voltammograms due to the several dissociation forms in which eosin could be present in relation to pH.

The voltammogram collected in strong acidic pH (pH = 0.9) shows only one peak belonging to the oxidation of eosin neutral form. Still in acidic conditions (pH = 1.6 and 3.3) two waves were registered, and they can be attributed to the oxidation of the dissociated anionic and neutral form. At pH 4.4 only one wave related to the anion was detected, while at pH = 4.7 two waves are present due to the anionic and dianionic forms (A^{2-}). In the end, eosin is present in solution at pH 7 and higher only as the dianion A^{2-} (Fig. 3). The oxidation of the dianionic form leads to the formation of a product P_{ox} , as proved at the negative range of potential in the backward scan (Fig. 3).

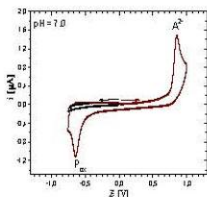


Fig. 3. Cyclic voltammograms of 0.37 mM EO-Na solution in Britton-Robinson buffer on glassy carbon electrode at pH = 7. Scan rate was 0.1 V/s.

UV-Vis Spectroelectrochemistry

UV-Vis Spectroelectrochemistry experiments were performed both in acidic (pH = 3) and in neutral (pH = 7) conditions. The spectra collected at the beginning of the scanning are identical

to that of eosin. During oxidation, the intensity of the absorption spectrum of eosin ($\lambda_{max} = 520$ nm) decreases continuously and a slight increase of absorbance in correspondence of 225 nm is detectable.

Conclusion

The results reported allowed us to highlight the photo and pH sensitivity of eosin. The adopted approach provides useful findings regarding the oxidation of eosin. The future application of exhaustive electrolysis and high-performance liquid chromatography coupled to spectroscopic and spectrometric detectors will contribute to outline the oxidative degradation process of this highly unstable dye.

Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Academy of Sciences (RVO: 61388955).

References

1. de Keijzer M., van Bommel MR., Geldof M.: "Early synthetic organic lake pigments used by Vincent van Gogh at the end of his lifetime." In: *EU-Artech Symposium on Vincent van Gogh and Contemporaries*, 2009.
2. Hirano K.: *Bull Chem Soc Jpn.*, 56, 3, 850-854 (1983).
3. Kirby J., Townsend K.H., Stijnman A.: "The reconstruction of late 19th-century French red lake pigments." In: Archetype Publications, ed. *Art of the Past: Sources and Reconstruction*, 2005.
4. <http://www.metmuseum.org/exhibitions/listings/2015/van-gogh>. Downloaded September 3rd, 2015.
5. Alvarez-Martin A., Trashin S., Cuykx M., Covaci A., De Wael K., Janssens K.: *Dye Pigment*, 145, 376-384 (2017).
6. Centeno SA., Hale C., Carò F., Cesarotto A., Shibayama N., Delaney J., Dooley K van der Snickt G., Janssens K., Stein SA.: *Herit Sci*, 5, 1 (2017).
7. Sabatini F., Eis E., Degano I., Thoury M., Bonaduce I., Lluveras-Tenorio A.: *Dye Pigment*, 180 (2020).
8. Chieli A., Romani A., Degano I., Sabatini F., Tognotti P., Miliani C.: *Dye Pigment*, 181 (2020).
9. Sabatini F., Giugliano R., Degano I., Lluveras-Tenorio A., Sokolová R., Thoury M., Colombini MP.: *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*, 364, 1 (2018).
10. Sabatini F., Degano I., Colombini MP.: *Sep Sci Plus*, 3, 6, 207-215 (2020).
11. Pirok BWJ., Moro G., Meekel N., Berbers SVJ., Schoenmakers PJ., van Bommel MR.: *J Cult Herit.*, 38, 29-36 (2019).
12. Alvarez-Martin A., Cleland TP., Kavich GM., Janssens K., Newsome GA.: *Anal Chem.*, 91, 16, 10856-10863 (2019).
13. Majek M., Filace F., von Wangelin AJ.: *Beilstein J Org Chem.*, 10, 1, 981-989 (2014).
14. Bogdanovsky GA., Vidovich GL., Kultin DY., Lebedeva OK., Zakharov AN.: *Appl Catal A Gen.*, 232, 1, 137-145 (2002).
15. Wantulok J., Sokolova R., Degano I., Kolivoska V., Nycz JE., Fiedler J.: *Chem Electro Chem Fundam Appl.*, 15, 2935-2943 (2021).
16. Sokolová R., Ramešová Š., Kocábová J., Kolivoška V., Degano I., Pitzalis E.: *Monatshette für Chemie - Chem Mon.*, 147, 1375-1383 (2016).
17. Ramešová Š., Sokolová R., Degano I.: *Electrochim Acta*, 182, 544-549 (2015).
18. Ramešová Š., Degano I., Sokolová R.: *Electrochim Acta*, 133, 359-363 (2014).

Electrochemical Oxidation of Fentanyl and its Analogues (Elektrochemická oxidace fentanylu a jeho analogů)

Jana Skopalová^a, Radek Jerga^a, Dana Štolbová^a, Monika Zajacová Cechová^a, Petr Cankar^b,
and Petr Barták^a

^a Palacký University Olomouc, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry,
17. Listopadu 1192/12, 779 00 Olomouc, Czech Republic, E-mail: jana.skopalova@upol.cz

^b Palacký University Olomouc, Faculty of Science, Department of Organic Chemistry,
17. Listopadu 1192/12, 779 00 Olomouc, Czech Republic

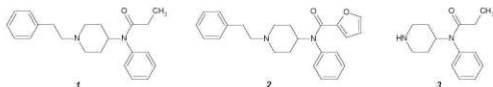
Abstract

Fentanyl and its analogues are potent synthetic opioids abused in illicit drugs. Analysis of fentanyls can be based on their electrochemical oxidation providing a voltammetric peak at potential about 0.9 V (vs. SCE) in neutral aqueous media. Controlled potential electrolysis in combination with HPLC-MS and GC-MS, as well as on-line coupling of electrochemistry with mass spectrometry, were used to identify electrochemical oxidation products of selected fentanyls. *N*-dealkylated products and products hydroxylated on the dehydrogenated piperidine ring were found in solutions electrolyzed in aqueous media. Electroactive dimeric products adsorbed on the working electrode surface provided analytically usable voltammetric current signal.

Key words: Fentanyl, Furanylfentanyl, Norfentanyl, Electrochemical Oxidation, Voltammetry, Electrochemistry - Mass Spectrometry.

Úvod

Fentanyl a jeho analogy (Obr. 1) jsou syntetické opioidy vyvinuté pro použití v akutních případech analgezie a zvládnání chronické bolesti např. v pokročilých stádiích nádorových onemocnění. Stále častěji však dochází k jejich nezákonnému zneužívání, zejména ve směsích s heroinem, v nichž zvyšují psychotropní účinek drogy. Nízký terapeutický index (rozíl mezi účinnou a smrtelnou dávkou) fentanylu a jeho derivátů bývá příčinou neúmyslného, avšak často smrtelného předávkování nelegálními drogami s příměsí fentanylu a jeho analogů¹.



Obr. 1. Strukturální vzorce fentanylu (1), furanylfentanylu (2) a norfentanylu (3).

Nejčastěji používanými metodami pro analýzu fentanylu a jeho analogů jsou vysokoučinná kapalinová a plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí²⁻⁴. Vedle těchto instrumentálně náročných metod lze využít i metody elektrochemické. Pro rychlou analýzu fentanylu, jeho metabolitu norfentanylu a prekurzoru 4-anilino-*N*-fenethylpiperidinu přímo v terénu byl vyvinut elektrochemický senzor na bázi jednorázově tištěné uhlíkové elektrody modifikované iontovou kapalinou (1-butyl-1-methylpyrrolidinium bis(trifluormethylsulfonyl)imidem)⁵. Cyklickou square-wave voltametrií byl na tomto senzoru zaznamenáván specifický signál oxidace fentanylu a redukce jeho oxidačních produktů představující „otisk prstu“ analytu vhodný pro jeho selektivní stanovení ve směsi s dalšími elektroaktivními látkami. Pro analýzu fentanylu a jeho derivátů ve směsi s heroinem je vhodná kapalinová chromatografie s amperometrickou detekcí založenou rovněž na elektrochemické oxidaci fentanylu⁶.

Přestože anodická oxidace fentanylu a jeho analogů bývá využívána k analytickým účelům, její mechanismus nebyl dosud objasněn. Tato práce je zaměřena na analýzu produktů elektrochemické oxidace fentanylu s využitím on-line spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií a kombinace vysokoučinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí.

Experimentální část

Zásobní roztoky fentanylu, furanylfentanylu a norfentanylu (vše Lipomed, Švýcarsko), byly připraveny v koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l v methanolu (HPLC grade, VWR Chemicals). Kyselina octová, octan amonný a amoniak pro přípravu roztoků byly čistoty „pro analýzu“, mobilní fáze byla připravena z acetonitrilu (HPLC grade, VWR Chemicals).

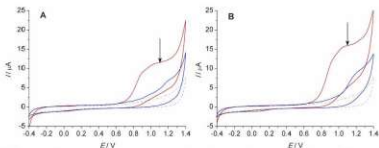
Elektrochemické experimenty byly prováděny na přístroji Autolab PGSTAT128N (Metrohm Autolab, Nizozemsko) v tříelektrodevém zapojení s referenční kalomelovou a pomocnou platinovou elektrodou. Cyklické voltamogramy byly zaznamenány s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku polarizovanou rychlostí 50 mV/s v rozsahu -0,4 až 1,4 V. Elektrolyza za konstantního potenciálu 1,1 V (vs. SCE) na platinové sířkové elektrodě, s pomocnou elektrodou umístěnou v odděleném katodovém prostoru, probíhala v roztoku $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l příslušného derivátu fentanylu v 0,05M- $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ v 50% methanolu po dobu 30 min.

Elektrolyzované roztoky byly přímo analyzovány v systému Acquity UPLC I-Class vybaveném eL PDA detektorem a spojeném online s tandemovým hmotnostním spektrometrem Synapt G2S s elektrosprejem jako iontovým zdrojem (vše Waters, USA). Separace se prováděla na stacionární fázi C18 s gradientovou elucí dvousložkovou mobilní fází (složka A – 0,1% HCOOH v H_2O , složka B – 0,1% HCOOH v CH_3CN). Iontový zdroj ESI pracoval v kladném i záporném módu při teplotě 120 °C, s napětím na kapiláře ± 2 kV, tlakem zmlžovacího plynu (N_2) 600 kPa, s průtokem sušícího plynu (N_2) 400 l/h o teplotě 200 °C.

On-line spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií bylo realizováno s potenciostatem ADL1 (Laboratorní přístroje, Praha) s průtokovou coulometrickou celou 5021A (ESA, USA) s pracovní porézni uhlíkovou elektrodou, pomocnou Pd a referenční Pd/ H_2 elektrodou. Roztok vzorku obsahující $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l příslušného derivátu fentanylu v 0,05M- $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ v 50% methanolu byl dávkován do průtokové cely rychlostí 8 $\mu\text{l}/\text{min}$ pomocí lineární pumpy NE-1002X (New Era Pump System, USA). Z průtokové cely byl roztok přiváděn do iontového zdroje (elektrosprej) hmotnostního spektrometru Agilent 1100 Series LC/MSD Trap (Agilent, USA). Elektrosprej pracoval v kladném i záporném módu při teplotě 200 °C, rychlostí průtoku sušícího plynu (N_2) 5 l/min, tlaku zmlžovacího plynu (N_2) 103 kPa, napětí na kapiláře bylo $\pm 3,5$ kV.

Výsledky a diskuse

Cyklické voltamogramy studovaných fentanylů (Obr. 2) zaznamenané v neutrálním prostředí poskytují anodický proudový signál při potenciálu kolem 0,9 V. Tvar signálu závisí na koncentraci látky a rychlosti polarizace pracovní elektrody. Při vyšších koncentracích a rychlostech polarizace je rozdělený, ve zředěných roztocích a pomalejších rychlostech je patrný jediný pik. Hodnoty směrnice závislosti logaritmu proudu piků na logaritmu rychlosti polarizace 0,72 pro fentanylu a 0,66 pro furanylfentanylu potvrzují vliv adsorpce na proudovou odezvu fentanylů. Absence proudových signálů na katodické větvi voltamogramu svědčí o ireverzibilitě elektrodevé reakce.



Obr. 2. Cyklické voltamogramy 0,5 mmol/l fentanylu (A) a furanylfentanylu (B) před elektrolyzou (červená) a po elektrolyze (modrá) 30 min při potenciálu 1,1 V (vyznačen šipkou), v základním elektrolytu (šedá čárkovaná křivka) tvořeném 0,05M- $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ v 50% (v/v) CH_3OH ; rychlost polarizace elektrody ze skleněho uhlíku 50 mV/s.

HPLC-MS analýza roztoků fentanylu a furanylfentanylu po elektrolyze za konstantního potenciálu 1,1 V odhalila několik monomerních produktů elektrochemických reakcí (Tabulka I). Produkt elektrolyzy fentanylu s retenčním časem 0,63 min a s hodnotou m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 233 (Fen-OP1) odpovídá norfentanylu (Obr. 1, struktura 3), produkt s retenčním časem 1,61 min a s m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 150 (Fen-OP2) je *N*-fenylpropanamid. Obě tyto látky patří k hlavním produktům metabolismu fentanylu, který probíhá za katalýzy enzymy cytochromu P450⁷. Další detekované produkty vznikly dehydrogenací a monohydroxylací (OP3, OP4), dihydroxylací (OP5) resp. methoxylací (OP6) piperidinového kruhu fentanylu. Analogické produkty byly nalezeny i u furanylfentanylu (Tabulka I). Identifikace produktů byla provedena na základě změřené přesné hmoty a fragmentace příslušných iontů. Identita produktů OP1 a OP2 byla prokázána srovnáním se standardy norfentanylu a *N*-fenylpropanamidu.

Tabulka I.

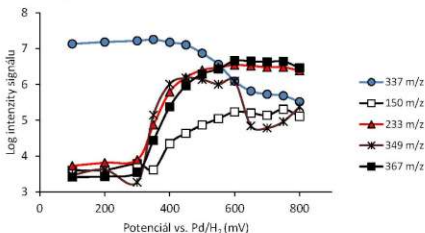
HPLC-MS analýza fentanylu, furanylfentanylu a jejich oxidačních produktů.

Látka/produkt	t_R /min	m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$	Sumární vzorec	dtm ^a (mDa)
Fentanyl	1,57	337,2262	$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}$	-1,8
Fen-OP1	0,63	233,1664	$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}$	1,0
Fen-OP2	1,61	150,0906	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{NO}$	-1,3
Fen-OP3	3,56	349,1940	$\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2$	2,4
Fen-OP4	5,03	351,2034	$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2$	-3,9
Fen-OP5	4,41; 4,57	367,2021	$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3$	-0,1
Fen-OP6	2,75	383,2324	$\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_3$	-1,1
Furanylfentanyl	1,83	375,2083	$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2$	1,0
FF-OP1	0,65	271,1443	$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2$	-0,4
FF-OP2	2,69	188,0712	$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{NO}_2$	-1,0
FF-OP3	5,11	389,1856	$\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3$	-0,9
FF-OP4	2,26	391,2033	$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3$	1,1
FF-OP5	4,50; 4,56	405,1828	$\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$	1,4
FF-OP6	2,73	421,2153	$\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_4$	2,6
Norfentanyl	0,63	233,1753	$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}$	7,6

^adtm = odchylka experimentálně zjištěné hodnoty m/z od teoretické hodnoty

On-line elektrochemie s hmotnostní spektrometrií poskytla výsledky, které jsou v souladu se závěry off-line HPLC-MS analýz elektrolyzátů obou fentanylů. Změny intenzity MS signálů iontů produktů vznikajících elektrochemickou oxidací fentanylu v závislosti na potenciálu

pracovní uhlíkové grafitové elektrody v průtočné cele spojené přímo s hmotnostním spektrometrem ukazuje Obr. 3.



Obr. 3. Závislost logaritmu intenzit MS signálů iontů vznikajících při on-line elektrochemické oxidaci fentanylu ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/l) v 0,05M- $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ v 50% methanolu.

Závěr

K elektrochemické oxidaci fentanylu a jeho analogů dochází na atomech dusíku vázaných v piperidinovém cyklu a vanilidové části molekuly. Odštěpení elektronů spojené s dehydrogenací a hydrolyzou vede ke vzniku jednak *N*-dealkylovaných produktů, jednak produktů hydroxylovaných na částečně dehydrogenovaném piperidinovém kruhu. Lze předpokládat, že jedoelektronovou oxidací anilidového dusíku adsorbované formy fentanylu vzniká radikál, který může podléhat na povrchu pracovní elektrody elektropolymeraci, jež se projevuje analyticky využitelným voltametrickým signálem.

Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation (project No. 20-07350S) and Palacky University Olomouc (project IGA_PrF_2021_021).

References

- Shoff E. N., Zaney M. E., Kahl J. H., Hime G. W., Boland D. M.: *J. Anal. Toxicol.* **41**, 1 (2017).
- Strayer K. E., Antonides H. M., Juhascik M. P., Daniulaityte R., Sizemore I.: *ACS Omega* **3**, 514 (2018).
- Lurie I. S., Iio R.: *J. Chromatogr. A* **1216**, 1515 (2009).
- Strano-Rossi S., Álvarez I., Taberner M. J., Cabarcos P., Fernández P., Bermejo A. M.: *J. Appl. Toxicol.* **31**, 649 (2011).
- Goodechild S. A., Hubble L. J., Mishra R. K., Li Z., Goud K. Y., Barfidokht A., Shah R., Bagot K. S., McIntosh A. J. S., Wang J.: *Anal. Chem.* **91**, 3747 (2019).
- Elbardisy H. M., Foster C. W., Cumba L., Antonides L. H., Gilbert N., Schofield C. J., Belal T. S., Talaat W., Sutcliffe O. B., Daabees H. G., Banks C. E.: *Anal. Methods* **11**, 1053 (2019).
- Feierman D. E., Lasker J. M.: *Drug Metab. Dispos.* **24**, 932 (1996).

UV-Vis and IR Spectroelectrochemistry of Copper Complexes and Bioactive Compounds

Romana Sokolova^a, Michaela Oblukova^a, Milan Sys^b, Tomas Mikysek^b, Jakub Wantulok^c,
Jacek Nycz^c, and Ilaria Degano^d

^aJ. 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

^bInstitute of Chemistry and Technology of Macromolecular Materials, The University of
Pardubice, 532 10 Pardubice, Czech Republic

^cInstitute of Chemistry, University of Silesia in Katowice, ul. Szkolna 9; 40-007 Katowice,
Poland

^dUniversity of Pisa, Department of Chemistry and Industrial Chemistry, Via Moruzzi 13,
56124 Pisa, Italy

Abstract

The interpretation of the change of absorption spectrum of an oxidized and reduced molecule recorded during the electron transfer is an efficient tool for the determination of oxidation or reduction mechanism. This technique provides the information about the electroactive chromophore and is performed in two regimes of electrochemical measurement, cyclic voltammetry and chronoamperometry, respectively. This approach was successfully applied to study the fundamental electrochemical behavior of recently synthesized copper complexes providing biomimetic activity, of polyphenolic bioactive compounds, and also for the reduction of halogenated phenanthrolines. The identification of redox products was done by chromatographic techniques as HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS.

Key words: Copper complexes, Spectroelectrochemistry, Catechol, Oxidation, Reduction, Antioxidants, Phenanthrolines.

Introduction

The understanding of bioactivity of compounds in processes, where electron transfer reactions play an important role, is a challenge for many researchers. The formation of radicals during oxidation or reduction, the presence of short living intermediates, reaction mechanisms involving electron and proton transfers, all contribute to the comprehension of drugs activities, their mode of action and determination of their metabolites.

The use of on-line spectroelectrochemical methods and analytical separation techniques is required for the complete elucidation of the oxidation or reduction mechanisms. The changes in the absorption spectrum are monitored in situ while the electrochemical reaction is carried out under controlled conditions¹. UV-Vis spectroelectrochemistry is used with advantage for short living intermediates detection and for elucidation of the chemical reversibility of electrolytic process. IR spectroelectrochemistry is helpful determining the electroactive site in a molecule when recording changes of intensity of absorption bands attributed to specific functional groups. These techniques were efficient in studies of the oxidation mechanism of bioactive polyphenolic compounds and their copper complexes:²⁻⁴ the mechanism of oxidation leading to a non-stable intermediate benzofuranone derivative was resolved with the help of spectroelectrochemical and HPLC-MS/MS techniques^{4,6}. Spectroelectrochemistry was also powerful in solving redox properties of bioactive hydroxyquinoline compounds⁷.

Moreover, the mechanism of catalytic (catecholase) activity of newly synthesized dinuclear copper complexes with tyrosinase motif (Cu₂O₂) can be characterized by means of spectroelectrochemistry.

Experimental part

Reagents

The studied copper complex $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OAc})_2(\text{H}_2\text{O})] (\text{ClO}_4)$ was synthesized at The University of Pardubice according to references.^{8,9} Luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) was purchased from Sigma Aldrich, Czech Republic. Tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF₆, Sigma Aldrich) used as a supporting electrolyte was dried at 90 °C for 1h before use. Acetonitrile (anhydrous, water <0.001%) was purchased from Sigma Aldrich. 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 with acetone and acetonitrile, then the electrode was cleaned electrochemically by the application of a 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 TBAPF₆ 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 CaF₂ 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.

Theoretical calculations

The theoretical calculations of molecules in vacuum were performed using the DFT employing the EDF2 functional and 6-31G* basis set (Spartan¹⁴, Wavefunction, USA).

Results and discussion

The absorption spectra of copper containing complex during reduction were recorded in the spectroelectrochemical cell. Two modes of measurement, chronoamperometry and cyclic voltammetry, were used as described in our previous article¹⁰.

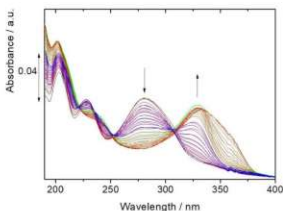


Fig. 1. UV-Vis spectroelectrochemistry of $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OAc})_2(\text{H}_2\text{O})] (\text{ClO}_4)$ during reduction.

The reduction of the complex is accompanied by a decrease of bands at 228 and 281 nm, while absorbance at 241 and 329 nm increases. The reaction is chemically and electrochemically

reversible showing that the reduced complex is reoxidized to the starting molecule (Fig. 1). During the reaction, copper(II) is reduced to copper(I). Polyphenolic compounds were selected as further system for testing the spectroelectrochemical cell. During oxidation of luteolin the absorption bands at 211, 267 nm and 399 nm decrease. Simultaneously, the intensity of absorption bands at 245 nm, 298 nm, and broad 491 nm increase (not shown). In the latter case, the oxidation was irreversible due to the participation of subsequent chemical reactions, which lead to a low molecular weight compounds³⁻⁵.

Table 1. Calculated and experimental values of wavenumbers of chlorinated phenanthrolines in cm^{-1} .

ν / cm^{-1}		4,7-dichloro-6-fluoro-1,10-phenanthroline							
Calculated	1622	1576	1532	1310	1272	1144	1110	1061	
Experimental	1628	1573	1545	1288	1275	1160	1118	1088	
ν / cm^{-1}		4-chloro-6-fluoro-1,10-phenanthroline							
Calculated	1630	1603	1583	1339	1321	1252	1234	1126	1078
Experimental	1639	1608	1586	1343	1307	1261	1246	1137	1103

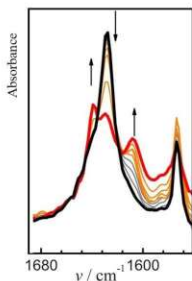


Fig. 2. IR spectroelectrochemistry of 4,7-dichloro-6-fluoro-1,10-phenanthroline at the potential of the first reduction wave.

Fig. 2 shows the change in intensity of the vibration bands belonging to the dechlorinated compound 4,7-dichloro-6-fluoro-1,10-phenanthroline during its reduction. Vibration bands at 1628 cm^{-1} , 1573 cm^{-1} , 1545 cm^{-1} , 1288 cm^{-1} , 1275 cm^{-1} , 1160 cm^{-1} , 1118 cm^{-1} , 1088 cm^{-1} decreased. The range of wavenumbers below 1300 cm^{-1} is not shown. Interestingly, the vibration bands assigned to the reduction product of dechlorinated phenanthroline, which contains only one chlorine substituent in the chemical structure, increase: 1639 cm^{-1} , 1608 cm^{-1} , 1586 cm^{-1} , 1343 cm^{-1} , 1307 cm^{-1} , 1261 cm^{-1} , 1246 cm^{-1} , 1137 cm^{-1} , 1103 cm^{-1} . The calculated wavenumbers (see Table 1), even if calculated for the molecule in vacuum, are in very good agreement with the experimental values. Analytical determination of products in solution after the reductive electrolysis HPLC-MS/MS detection confirmed the cleavage of chlorine during the reduction of 4,7-dichloro-6-fluoro-1,10-phenanthroline.^{11,12}

Conclusion

The UV-Vis and IR spectroelectrochemistry were used for registering the spectral changes occurring during the electron transfer processes, both oxidation and reduction. The obtained data will serve to the determination of oxidation and reduction mechanisms of bioactive compounds and will be used to rationalize the mode of action and catalytic (catecholase) activity of novel copper containing complexes intendedly designed to replace natural tyrosinase enzyme in a biosensor sensitive for catechols.

Acknowledgments

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

Literature

1. Kaim W., Fiedler J.: *Chem Soc Rev* **38**, 3373 (2009).
2. Kocabova J., Fiedler J., Degano I., Sokolova R.: *Electrochim. Acta* **187**, 358 (2016).
3. Ramesova S., Sokolova R., Degano I.: *Electrochim. Acta*, **182**, 544 (2015).
4. Sokolova R., Kocabova J., Marhol P., Fiedler J., Biedermann D., Vacek J., Kren, V.: *J. Phys. Chem. B*, **121**, 6841 (2017).
5. Ramesova S., Degano I., Sokolova R.: *J. Electroanal. Chem.* **788**, 125 (2017).
6. Sokolova, R., Ramesova, S., Kocabova, J., Kolivoska, V., Degano, I., Pitzalis, E.: *Monatsh. Chem.*, **147**, 1375 (2016).
7. Sokolova R., Nycz J. E., Ramesova S., Fiedler J., Degano I., Szala M., Kolivoska V., Gal M.: *J. Phys. Chem. B* **119**, 6074 (2015).
8. Reim J., Krebs B.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 3793 (1997).
9. Bharathi K. S., Sreedaran S., Rahiman A. K., Rajesh K. Narayanan V.: *Polyhedron* **26**, 3993 (2007).
10. Castano A. G., Sokolova R., Degano I.: "On UV-Vis Spectroelectrochemistry of Luteolin-7-O-Glucoside." In: *Modern electrochemical methods XXXIX*. (Eds. Navrátil, T.; Fojta, M.; Schwarzová, K.) [Sborník přednášek mezinárodní odborné konference XXXIX. Moderní elektrochemické metody]. Jettechovice (CZ), May 20-24, 2019, Srsenová L. – Best servis Ústí n. L., p. 31, 2019.
11. Wantulok, J., Degano, I., Gal, M., Nycz, J. E., Sokolova, R.: *J. Electroanal. Chem.* **859**, article n. 113888, 1-10 (2020).
12. Wantulok, J., Sokolova, R., Nycz, J., Degano, I.: "Oxidation and reduction of selected 1,10-phenantrolines." In: *Modern electrochemical methods XXXIX*. (Eds. Navrátil, T.; Fojta, M.; Schwarzová, K.) [Sborník přednášek mezinárodní odborné konference XXXIX. Moderní elektrochemické metody]. Jettechovice (CZ), May 20-24, 2019, Srsenová L. – Best servis Ústí n. L., p. 240, 2019.

**The Brdička Reaction for the Study of Thermostable Proteins, especially
Metallothionein in Urine**
**(Brdičkova reakce pro studium termostabilních proteinů, především metallothioneinu
v moči)**

Vít Skoták ^a, Božena Hosnedlová ^{a,b}, Marta Kepínská ^c, Milan Jakubek ^b, Tomáš Parák ^d, and
Rene Kizek ^{a,b,c}

^a CONEM Metallomics Nanomedicine Research Group (CMNRG), Korunní 2569/108,
Vinohrady, 101 00 Praha, Czech Republic

^b BIOCEV, First Faculty of Medicine, Charles University, Průmyslová 595, CZ-25250
Vestec, Czech Republic

^c Department of Biomedical and Environmental Analyses, Faculty of Pharmacy with Division
of Laboratory Diagnostics, Wrocław Medical University, Borowska 211, 50-556 Wrocław,
Poland

^d Department of Clinical Laboratories, Hospital of Milosrdných bratří, Polní 3, 639 00 Brno,
Czech Republic

Abstract

A pilot study was performed to detect thermostable proteins present in urine using the Brdička reaction. The proposed method was applied to the analysis of urine of patients with prostate cancer (CaP). The mean AUC of the PC group (n = 63) was 151.7 ± 48.0 , RSD 53.7 %. The difference between the control group and PC group was significant (P = 0.076).

Key words: Albumin, Thiols, Catalytic reaction, Prostate cancer, Metallothionein, Differential pulse voltammetry.

Úvod

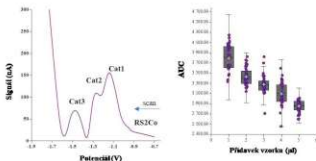
Profesor Rudolf Brdička a profesor Heyrovský publikovali v časopise Nature informace o využití polarografie při diagnostice nádorového onemocnění ¹⁻³. Pro rychlou diagnostiku různých zhoubných nádorů jsou intenzivně hledány nové vhodné markery ⁴. Většina nádorových markerů se stanovuje z krve a jsou tedy méně vhodné pro samotestování. Biologickou tekutinou, která je snadno dostupná je moč, avšak její nevýhodou je výrazná variabilita chemického složení. Metallothioneiny (MT) jsou biologicky významné molekuly. Jsou charakteristické vysokým obsahem thiolových skupin. U pacientů se zhoubným nádorem lze předpokládat zvýšení hladiny MT. Jednou s nejrozšířenější malignitou jsou zhoubné nádory prostaty (CaP). O vztahu MT a moči není známo mnoho informací. Thiolové skupiny jsou odpovědné za katalytické signály vylučování vodíku. Elektrochemickému stanovení MT se věnovala řada výzkumů. Podrobné studie provedl Olafson ⁵⁻⁷, Šestáková ⁸. Tompson ukazuje elektrochemické signály různých proteinů včetně aplikace metody na reálné vzorky *S. serrata* a *C. gigas* ⁹. Cílem této práce bylo elektrochemické studium MT v moči a jejich změny u pacientů se zhoubným nádorem prostaty.

Experimentální část

Chemikálie použité pro analýzu byly zakoupeny od Merck (Darmstadt, Německo) a Greiner Bio-One (Kremsmunster, Rakousko) v analytické čistotě. Ultračistá voda byla připravena na zařízení ELGA (Londýn, Spojené království), pH bylo kontrolováno na zařízení Orion. Elektrochemická analýza byla provedena v tříelektrodeovém zapojení VA-Stand 663. Byla použita pracovní elektroda HMDE s plochou $0,4 \text{ mm}^2$, referenční Ag/AgCl/3M KCl a pomocná elektroda byla z uhlíku. Brdičkův základní elektrolyt obsahoval $1 \text{ mM Co(NH}_3)_6\text{Cl}_2$ a 1 M amonný pufr (pH 9,6). AdTS DPV parametry: počáteční potenciál: $-0,35 \text{ V}$, konečný potenciál: $-1,95 \text{ V}$, modulační čas $0,057 \text{ s}$, potenciálový krok: $1,05 \text{ mV/s}$, modulační amplituda: 250 mV . Pro chemickou analýzu moči byl použit analyzátor Mindray BS300 a BS400 (Shenzhen, Čína). Kontrolní skupina byla moč zdravých dobrovolníků ($n = 5$, věk 16 až 18) a primozáchyť CaP ($n = 14$, věk 60). Elektrochemická analýza byla provedena na Metrohm (Herisau, Švýcarsko) podle SOP. Individuální vzorky ($n = 5$) byly smíchány do sterilní nádoby (objem minimálně 500 ml). Po přípravě směsné moči se byla moč analyzována a sterilizována při $110 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut . Ostatní reálná moč byla denaturována při $99 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 min , poté byla centrifugována po dobu 30 min při $14\,000 \text{ g}$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, pro analýzu byl použit supernatant. Veškerá analyzovaná data byla převedena do laboratorní databáze QINSLAB a statisticky vyhodnocena. Všechny analýzy byly provedeny minimálně v 5 opakováních.

Výsledky a diskuse

Elektrochemická analýza MT byla popsána v různých pracích^{5, 6}. Dlouhodobě je pro tyto analýzy využíváno Brdičkovy reakce. Podrobně jsme popsali námi modifikovanou metodiku v práci Petrová et al.^{10, 11}. Jedním z našich cílů bylo vyhodnocení získaných voltametričeských křivek (určení ploch pod křivkou AUC). Byla provedena studie přidávek albuminu (0; 0,5; 1; 2; 5; 10; 25; 50; 100 $\mu\text{g/ml}$) v aplikovaných množstvích vzorku pro analýzu (10; 20; 40; 60; 120 μl). U získaných voltamogramů byla vyhodnocena AUC pod grafem ve 4 zónách (zóna od $-0,6 \text{ V}$ do $-1,0 \text{ V}$, druhá od $-1,0 \text{ V}$ do $-1,3 \text{ V}$, třetí od $-1,3 \text{ V}$ do $-1,6 \text{ V}$ a čtvrtá zóna od $-1,6 \text{ V}$ do $-1,95 \text{ V}$). Získané AUC pro jednotlivé zóny ukázaly nejlepší závislost pro zónu 2 a 3. Zaznamenané AUC odezvy jednotlivých zón narůstaly v závislosti na množství aplikovaného vzorku, AUC RSD se pohybovaly mezi 20–40 %. V experimentu byla testována hladina thiolových sloučenin v moči pomocí Brdičkovy reakce. Výše uvedený postup a matematické vyhodnocení jsme se rozhodli aplikovat na elektrochemickou analýzu vzorků moči. Získaný vzorek moči byl nejprve denaturován a následně elektrochemicky analyzován. Kromě uvedené elektrochemické analýzy byly vzorky také podrobeny chemické analýze. Chemická analýza moči (kontrolní skupina): kreatinin $9,4 \pm 4,2 \text{ mmol/l}$; kys. močová $1,94 \pm 0,8 \text{ mmol/l}$; močovina $96,8 \pm 49 \text{ mmol/l}$; osmolalita $72,3 \pm 54 \text{ mmol/l}$; SAR $0,06 \pm 0,01 \text{ AU}$. Pacienti s CaP: kreatinin $9,5 \pm 2,7 \text{ mmol/l}$; kys. močová $2,8 \pm 0,8 \text{ mmol/l}$; močovina $49,8 \pm 9,2 \text{ mmol/l}$; osmolalita $236 \pm 160 \text{ mmol/l}$; SAR $0,09 \pm 0,01 \text{ AU}$. Bylo provedeno porovnání signálů voltamogramů vzorků moči kontrol a pacientů s CaP. Průměrná AUC kontrolní skupiny ($n = 28$) byla $106,8 \pm 11,1$, RSD 30,9 %. Průměrná AUC CaP skupiny ($n = 63$) byla $151,7 \pm 48,0$, RSD 53,7 %. Rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou CaP byl statisticky průkazný ($P = 0,076$). Swierczek et al. studovali hladiny MT v moči po environmentální kontaminaci a zjistil 6–15krát nárůst po expozici kadmii¹². Zajímavým výsledkem je potvrzení vazby kadmia na MT v moči, kdy koncentrace MT kontrolní skupiny byla kolem $0,8 \mu\text{g/l}$, ale skupina se zlobným nádorem vykazovala statisticky zvýšenou hladinu kolem $1,8 \mu\text{g/l}$ ¹³.



Obr. 1. Typický průměrný ($n = 5$) DP voltamogram albuminu (13 ng/ml) přítomného ve vzorku moči s redoxním signálem RS2Co a katalytickými signály Cat1, Cat2 a Cat3. Bylo dávkováno 100 μ l vzorku do základního elektrolytu. Box ploty AUC signálu v zóně 4 albuminu (ze všech analyzovaných koncentrací) v přidávku: 1–120; 2–60; 3–40; 4–20; 5–10 μ l do moči.

Závěr

Metalothioneiny jsou stanoveny v řadě různých maticí, především ve vzorcích orgánů. V poslední době jsme věnovali pozornost detekci MT v krvi a séru. Další maticí, ve které je MT možné analyzovat, je moč. Byla provedena pilotní studie elektrochemické analýzy MT v moči. Navíc nás zajímaly změny vyvolané rozdílnými přidávkami vzorku a albuminu. Rozhodli jsme se jednotlivé katalytické signály matematicky vyhodnocovat jako AUC ve čtyřech potenciálových zónách. Uvedené metodické přístupy jsme aplikovali na sledování změn obsahu MT u pacientů s CaP. Mezi testovanými skupinami se podařilo prokázat rozdíly, ale musí být dále detailněji studovány.

Acknowledgments

Tato práce vznikla za podpory grantu Liga proti rakovině Praha 2019, projektu „Centrum nádorové ekologie – výzkum nádorového mikroprostředí v organismu podporujícího růst a šíření nádoru“ (reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000785) podpořený z Operačního programu „Výzkum, vývoj a vzdělávání“ a za laskavého přispění společnosti Metrohm Česká republika.

References

1. Brdicka R.: *Nature* **139**, 1020 (1937).
2. Brdicka R.: *Nature* **139**, 330 (1937).
3. Heyrovsky J.: *Nature* **142**, 317 (1938).
4. Prusa R., Blastik O., Potesil D., Trmkova L., Zehnalek J., Adam V., Petrlova J., Jelen F., Kizek R.: *Clin. Chem.* **51**, A (2005).
5. Olafson R. W.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* **19**, 111 (1988).
6. Olafson R. W., Olsson P. E.: *Methods in Enzymol.* **205**, 205 (1991).
7. Olafson R. W., Sim R. G.: *Anal. Biochem.* **100**, 343 (1979).
8. Sestakova I., Navratil T.: *Bioinorg. Chem. Appl.* **3**, 43 (2005).
9. Thompson J. A. J., Cosson R. P.: *Marine Environ. Res.* **11**, 137 (1984).
10. Petrlova J., Potesil D., Mikelova R., Blastik O., Adam V., Trmkova L., Jelen F., Prusa R., Kukačka J., Kizek R.: *Electrochim. Acta* **51**, 5112 (2006).
11. Trmkova L., Kizek R., Vacek J.: *Bioelectrochemistry* **56**, 57 (2002).
12. Swierczek S., Abuknesha R. A., Chivers I., Baranovska I., Cunningham P., Price R. G.: *Biomarkers* **9**, 331 (2004).
13. Wolf C., Strenziok R., Kyriakopoulos A.: *Anal. Chim. Acta* **631**, 218 (2009).

Catalytic Oxidation of Dopamine: Mushroom Tyrosinase vs. Dinuclear Copper(II) Complex

Milan Šýs^a, Tomáš Mikysek^a, and Miroslav Novák^b

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: milan.sys@upce.cz

^b Institute of Chemistry and Technology of Macromolecular Materials, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 53210, Pardubice, Czech Republic

Abstract

The aim of this scientific study was to compare catecholase activity (representing the ability to oxidize *ortho*-diphenols) of tyrosinase enzyme (isolated from the common mushroom *Agaricus bisporus*) with a completely synthetic dinuclear copper complex toward the neurotransmitter dopamine using standard Michaelis-Menten kinetics model. Both, standard UV-Vis spectrophotometry and amperometry in a batch configuration were presented as complementary methods to study the catecholase activity. Despite the finding of comparable catalytic activity (similar Michaelis-Menten constants), it is necessary to mention that tyrosinase enzyme is not active in methanol solution like investigated dinuclear copper(II) complex.

Key Words: Catecholase activity; Dopamine; Tyrosinase; Amperometric detection.

Introduction

Generally, traditional biosensors based on natural enzymes have a short lifetime¹ to be integrated into miniature systems (handheld meters) and could be directly used by patients, like in case of glucometers². Nowadays, the development of biomimetic sensors represents a wide interest of the scientific society in the field of clinical analysis due to promising long lifetime³. Numerous scientific papers suggest that a replacement of long-term unstable mushroom (isolated from *Agaricus bisporus*) tyrosinase (TYR) enzyme by copper biomimetic complexes could bring expected improvement⁴. From literature, it is possible to find out that the TYR enzyme forms a tetramer of 119.5 kDa that is composed of two types of subunits, namely H subunits (~43 kDa) and L subunits (~14 kDa). The H subunit contains a binuclear copper-binding site in the oxy-state, in which three histidine residues coordinate each copper ion⁵. In comparison with naturally occurring enzyme, a newly synthesized dinuclear copper complex $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{EtOH})]^{2+} 2\text{ClO}_4^-$ with 2,6-bis[(*N*-methyl piperazine-1-yl)methyl]-4-formyl phenol as ligand (L), which chemical structure is shown in Fig. 1., could have a potential diphenolase (catecholase) activity (see Fig 2)⁶. The aim of this work was to define whether this dinuclear copper(II) complex catalyses an oxidation reaction of dopamine to dopamine-*o*-quinone by air oxygen, as well as the TYR enzyme.

Experimental part

Dopamine, *p*-hydroxybenzaldehyde, *N*-methylpiperazine, paraformaldehyde, $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, triethylamine, 99.99% methanol (MeOH), 99.99 lithium perchlorate were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). All solvents were used without any purification. A deionized water characterized by low resistivity of 18.3 M Ω cm was prepared using Millipore Milli-Q[®] purification system from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

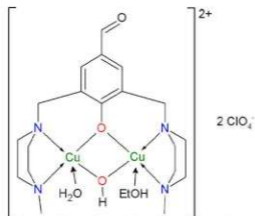


Fig. 1. Chemical structure of investigated dinuclear copper(II) complex.

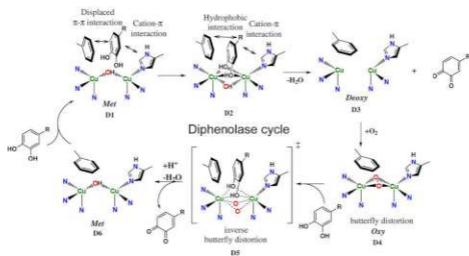


Fig. 2. Diphenolase cycle of mushroom tyrosinase.

All measurements in ultraviolet and visible regions of the spectrum were carried out with UV-Vis spectrophotometer UV2450 from Shimadzu (Kyoto, Japan) using 1 cm quartz cuvette from Fisher Scientific (Pardubice, Czech Republic) in the range of wavelengths from 800 to 200 nm at scanning speed of 0.5 nm s^{-1} .

Measurements of kinetics were performed in 3 mL pure MeOH containing $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ with $150 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ biomimetic complex, and investigated for concentrations from 100 to $1600 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ dopamine. At the first, UV-Vis spectrophotometry of the biomimetic complex solution was only measured, and then obtained spectrum was corrected for the blank absorbance signals. For determination of parameters such as Michaelis constant (K_m^{app}) and apparent maximum reaction velocity ($V_{\text{max}}^{\text{app}}$), absorbance values at wavelengths 465 nm for dopamine was used.

Each measurement intended for hydrodynamic amperometry was performed in a batch arrangement. Traditional three-electrode cell, consisting GCE (working), saturated calomel electrode (SCE) with $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ in MeOH as salt bridge (reference) and platinum sheet

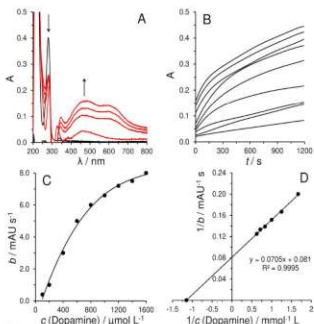
(auxiliary), were together connected to the AUTOLAB PGSTAT101 potentiostat/galvanostat from Metrohm Česká republika s.r.o. (Prague, Czech Republic), which was operated through NOVA 1.11 software.

Each experiment was performed in a conventional glass cell from International Chemistry Co., LTD. (Matsudo-shi, Japan) containing 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ synthesized dinuclear copper complex in a non-deaerated pure MeOH with 0.1 mol L^{-1} LiClO_4 at detection potential of -0.1 V and stirring speed of 400 rpm. Otherwise, all important changes in the working conditions are shown in the figure legends.

Results and Discussion

To determine the wavelength of maximum absorbance of dopamine-quinone which undergoes a nucleophilic reaction (cyclization) to form a leukodopamine-chrome (5,6-dihydroxyindole) ⁷, UV-Vis spectra of 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dopamine (black) in the presence of 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dinuclear copper(II) complex were recorded every 10 min (red lines), as shown in Fig. 3A. The wavelength of 460 nm was set to measure kinetic curves for 100-1600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dopamine (Fig. 3B) which were interpolated by quadratic function. For coefficients of determination (R^2) higher than 0.998, b -values of corresponding quadratic equations characterizing the change in absorbance (A) over time (t) were used for construction of Michaelis-Menten saturation curve for a catalytic reaction (Fig. 3C). The appropriate Lineweaver-Burk plot is shown in Fig. 3D.

Fig. 3. Spectrophotometric kinetic study of the catecholase activity of



$[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{EtOH})]^{2+} 2\text{ClO}_4^-$ complex towards dopamine oxidation.

If tabulated value of $K_m^{\text{app}}=0.840 \text{ mmol L}^{-1}$ dopamine (BRENDA database) is taken into account for TYR enzyme (*Agaricus bisporus*) in 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer (pH 7), the value of $K_m^{\text{app}}=0.870 \text{ mmol L}^{-1}$ dopamine calculated from spectrophotometric measurements in pure MeOH containing 0.1 mol L^{-1} LiClO_4 indicates the fact that comparable catalytic activity was attained. Moreover, an analogical kinetic study as in the previous case was also carried out amperometrically because the product of dopamine catalytic oxidation (dopamine-quinone) can be electrochemically reduced at 0 (A), -0.1 (B), and -0.2 V. Obtained kinetic curves (D) were

linearized (E) to calculate K_m^{app} value, as shown in Fig. 4. The K_m^{app} values of 0.867, 0.763, and 0.776 mmol L⁻¹ dopamine was found for 0, -0.1, and -0.2 V respectively. This finding suggests that detection potential does not have any significant effect on catecholase activity of [Cu₂L(OH)(H₂O)(EtOH)]²⁺ 2ClO₄⁻ complex and both analytical methods used are completely comparable.

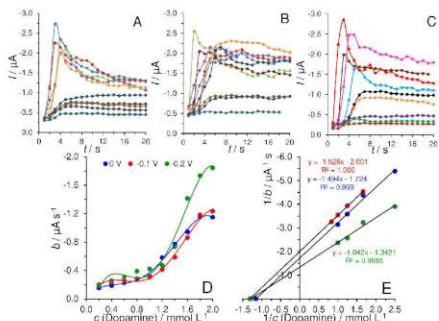


Fig. 4. Amperometric kinetic study of the catecholase activity of [Cu₂L(OH)(H₂O)(EtOH)]²⁺ 2ClO₄⁻ complex towards dopamine oxidation.

Conclusion

The results obtained show that the synthesized dinuclear copper complex provides in pure MeOH similar catalytic (catecholase) activity as natural tyrosinase enzyme in aqueous phosphate buffer of pH 7.0. However, this complex is not stable in phosphate buffer due to probable precipitation of Cu²⁺ cations.

Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation (project 19-03160S).

References

- Lee H. J., Jin H. E., Desai M. S., Ren S., Kim S., Lee S. W.: *Nanoscale* 7, 18379 (2015).
- Tonyushkina K., Nichols J. H.: *J. Diabetes Sci. Technol.* 3, 971 (2009).
- Mobin S. M., Sanghavi B. J., Srivastava A. K., Mathur P., Lahiri G. K.: *Anal. Chem.* 82, 5983 (2010).
- Silavi R., Divsalar A., Saboury A. A.: *J. Biomol. Struct. Dyn.* 30, 752 (2012).
- Ismaya W. T., Rozeboom H. J., Weijn A., Mes J. J., Fusetti F., Wichers H. J., Dijkstra B. W.: *Biochemistry* 50, 5477 (2011).
- Molitor C., Mauracher S. G., Rompel A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 113, E1806 (2016).
- Ding Y. H., Floren M., Tan W.: *Biosurf. Biotribol.* 2, 121 (2016).

New Screen-Printed Sensors with Chemically Deposited Boron Doped Diamond Electrode – Electrochemical Properties and Application
(Nové tištěné senzory s chemicky deponovanou borem dopovanou diamantovou elektrodou – elektrochemické vlastnosti a aplikace)

Renáta Šelešovská ^a, Oleksandr Matvieiev ^a, Marian Vojs ^b, Martin Vrška ^b, and Jaromira Chýlková ^a

^aUniversity of Pardubice, Faculty of chemical technology, Institute of Environmental and Chemical Technology, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic,

E-mail: renata.selesovska@upce.cz

^bSlovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Electrical Engineering and Information Technology, Institute of Electronics and Photonics, Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava, Slovak Republic

Abstract

The subject of this work was the investigation of electrochemical properties and application possibilities of new screen-printed sensors (SPE) with chemically deposited boron doped diamond electrode (BDDE). Using conventional redox markers ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ and $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$), these sensors were tested in comparison with bulk BDDE in a standard arrangement and commercially available SPEs based on the evaluation of the parameters of the obtained cyclic voltammograms. At the same time, the new sensors were applied in the determination of a number of bioactive substances important from the point of view of environmental protection or human health (*e.g.*, drugs and pesticides).

Key Words: Screen-printed sensors, Boron doped diamond electrode, Electrochemical characterization, Electroanalysis.

Úvod

Významným trendem ve vývoji v oblasti současné elektroanalytické chemie je proces miniaturizace. Požadavky související např. s diagnostikou, různými medicínskými aplikacemi nebo monitorováním škodlivých látek v životním prostředí vedou k vývoji miniaturizovaných přenosných elektrochemických systémů a senzorů připravených z alternativních materiálů, které umožní rychlou a levnou analýzu přímo na místě. Technologie sitotisku je osvědčenou metodou pro přípravu jednoduchých tištěných senzorů (SPE, screen-printed electrode) využitelných v praxi. Jejich hlavní výhodou je nízká cena a možnost snadné sériové výroby, což vede k použití ve formě jednorázových senzorů. Velkou rolí hraje i jednoduchý a snadno přizpůsobitelný design umožňující aplikaci SPE v přenosných analyzátoch a průtokových systémech ¹⁻⁵. Je však třeba zdůraznit, že elektrochemické vlastnosti, a tedy i aplikační možnosti tištěných senzorů závisí zejména na materiálu pracovní elektrody.

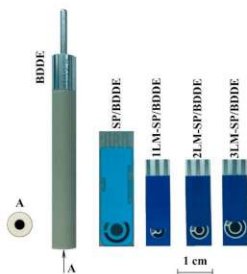
Borem dopovaná diamantová elektroda ^{6,7} vykazuje výjimečné elektrochemické vlastnosti jako je široké využitelné potenciálové okno, nízký proud pozadí, nízký šum a vysoká odolnost vůči pasivaci povrchu ⁸⁻¹⁰. Proto byla tato elektroda v minulosti aplikována při stanovení celé řady anorganických i organických látek ¹¹⁻¹⁴. Vzhledem k jedinečnosti tohoto elektrodového materiálu se nabízí možnost jeho uplatnění v tištěných senzorech. V případě BDDE se ovšem nejedná o SPE v pravém slova smyslu, ale o tištěný senzor s chemicky deponovanou BDDE jako pracovní elektrodou (SP/BDDE).

Předmětem této práce je studium elektrochemických vlastností a možností aplikace nové laboratorně připravené (LM) SP/BDDE.

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_3PO_4 , H_3BO_3 a CH_3COOH . Alkalickou složkou byl 0,2M NaOH. Další roztoky kyselin používané jako elektrolyty byly ředěny z koncentrovaných 65 % HNO_3 , 96 % H_2SO_4 , 70 % HCl a 64.5 % $HClO_4$ (všechny Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o., ČR). Roztok KCl (Penta-Švec, Praha) byl připraven rozpuštěním navážky v destilované vodě a roztoky $K_4[Fe(CN)_6]$ a $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ (oba Sigma-Aldrich) byly připraveny rozpuštěním vhodné navážky v roztoku KCl. $1 \cdot 10^{-3}M$ roztoky analyzovaných látek (Iomoxicam, mephenoxalon, atomoxetin a triticonazol, všechny Sigma-Aldrich) byly připraveny rozpuštěním příslušné navážky ve vodě nebo v acetonitrilu a uchovávány v lednici. Roztoky s nižší koncentrací byly připravovány denně čerstvé, a to ředěním základním elektrolytem.

Pro voltametrická měření byl používán Autolab PGSTAT204 (Metrohm Autolab, Netherlands) vybavený softwarem Nova 2.1. Ve standardním třielektrodovém uspořádání elektrochemické cely byla jako pracovní elektroda (WE) použita BDDE (BioLogic, aktivní plocha $7,07 \text{ mm}^2$, B/C během depozice 1000 ppm), referentní (RE) byla nasycená argentchloridová elektroda a pomocnou elektrodu (CE) tvořil platinový drátek (obě Monokrystaly, ČR). Dále byly použity dva typy tištěných senzorů. Prvním byl komerčně dostupný SP/BDDE (DropSens, aktivní plocha $10,17 \text{ mm}^2$, vnitřní průměr 3,6 mm, B/C – výrobce tuto informaci neposkytuje) s WE z BDD, CE z uhlíku a RE ze stříbra. Laboratorně vyrobené LM-SP/BDDE (aktivní plocha 0,785; 3,14 a $7,07 \text{ mm}^2$, vnitřní průměr 1, 2 a 3 mm, B/C 312 500 ppm) byly tvořeny WE a CE z BDD a RE ze stříbra. Všechny testované elektrody jsou uvedeny na Obr. 1.

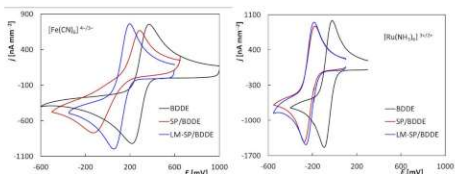


Obr. 1. Přehled testovaných senzorů – klasická BDDE, komerčně dostupná SP/BDDE a laboratorně vyrobené LM-SP/BDDE s různou plochou, resp. průměrem pracovní elektrody.

Výsledky a diskuse

Poté, co byly nově připravené LM-SP/BDDE charakterizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a Ramanovy spektrometrie, byly jejich elektrochemické vlastnosti testovány pomocí cyklické voltametrie (CV) redoxních systémů $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ and $[Ru(NH_3)_6]^{2+/3+}$. Na Obr. 1 jsou uvedeny získané voltametrické křivky pro obě látky

zaznamenané na klasické BDDE i obou typech testovaných tiskných senzorů. Pro přehlednost je uvedena pouze křivka pro LM-SP/BDDE s průměrem 2 mm. V Tabulce I. jsou pak shrnuty parametry těchto křivek pro všechny senzory. Z obrázku je zřejmé, že při práci s SPE senzory došlo k posunu potenciálů piků směrem k méně pozitivním hodnotám oproti klasickému uspořádání s „bulk“ BDDE, což je pravděpodobně způsobeno použitím tzv. pseudo referenční stříbrné elektrody. V případě „outer sphere“ redoxního markeru $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ byly získány velice podobné voltamogramy svědčící o dobré reversibilitě systému (tj. poměr proudové hustoty (j_p) anodického a katodického piků se blíží 1 a rozdíl potenciálů anodického a katodického piků (ΔE_p) se blíží teoretické hodnotě 59 mV) pro všechny testované senzory. U „inner sphere“ systému $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ byl pozorován zřetelný posun k ireverzibilitě u SP/BDDE, kdy ΔE_p byl pro tento senzor dvojnásobný v porovnání s BDDE a LM-SP/BDDE. V další fázi byly zaznamenány voltamogramy v závislosti na rychlosti polarizace, kdy byly získány lineární závislosti j_p na $v^{1/2}$, což svědčí o difúzně řízené reakci. Tyto výsledky svědčí o velmi dobrých elektrochemických vlastnostech LM-SP/BDDE.



Obr. 2. Cyklické voltamogramy redoxních systémů $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ (A) a $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ (B) zaznamenané na všech testovaných senzorech (CV, elektrolyt – 0,1M KCl, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $c([\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}) = 2,5 \text{ mM}$, $c([\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}) = 2,5 \text{ mM}$).

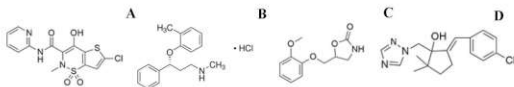
Tabulka I.

Parametry cyklických voltamogramů redoxních systémů $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ a $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$.

	Elektroda	j_{pa} [nA mm ⁻²]	j_{pc} [nA mm ⁻²]	j_{pa}/j_{pc}	E_{pa} [mV]	E_{pc} [mV]	ΔE_p [mV]
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$	BDDE	857,0	-829,4	1,03	367,3	220,5	146,8
	SP/BDDE	634,1	-535,4	1,18	283,1	-111,7	394,7
	1LM-SP/BDDE	776,9	-665,4	1,17	195,3	18,8	176,5
	2LM-SP/BDDE	873,5	-816,1	1,07	193,3	60,4	132,9
	3LM-SP/BDDE	938,8	-881,6	1,06	187,4	72,3	115,0
$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$	BDDE	1283,3	-1266,0	1,01	-47,2	-110,6	63,5
	SP/BDDE	1093,5	-1144,0	0,96	-193,6	-278,9	85,3
	1LM-SP/BDDE	1058,5	-1024,0	1,03	-199,6	-265,1	65,5
	2LM-SP/BDDE	1179,3	-1161,8	1,02	-191,6	-251,2	59,5
	3LM-SP/BDDE	1142,1	-1144,3	1,00	-191,7	-253,1	61,5

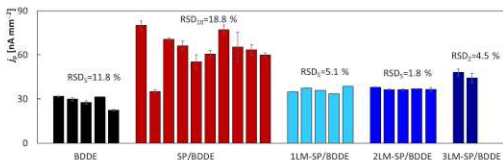
Další část práce byla zaměřena na možnosti aplikace LM-SP/BDDE při analýze různých látek. Na Obr. 3. jsou uvedeny strukturální vzorce léčiv lornoxicamu, atomoxetinu a mephenoxalonu a pesticidu triticonazolu. S využitím „bulk“ BDDE byly nejprve vyvinuty metody stanovení těchto látek, které byly převedeny na tiskné senzory a byly vyhodnoceny základní statistické

parametry jako lineární dynamický rozsah (*LDR*), mez detekce (*LOD*) a stanovitelnosti (*LOQ*). Poté byly analyzovány jak modelové roztoky, tak reálné farmaceutické nebo pesticidní přípravky. Z výsledků vyplývá, že všechny testované senzory umožňují dosažení srovnatelných hodnot *LOD*, resp. *LOQ*, ale LM-SP/BDDE vykazují obvykle nejširší *LDR*. Ve všech případech byly získány správné a velmi dobře opakovatelné (*RSD* < 3 %) výsledky stanovení.



Obr. 3. Strukturální vzorce lornoxicamu (A), atomoxetinu (B), mephenoxalonu (C) a triticonazolu (D).

Často zmiňovaným problémem tištěných senzorů je opakovatelnost a reprodukovatelnost měření, resp. samotných senzorů. Proto byla poslední část práce zaměřena na tyto parametry. Nejprve byla testována opakovatelnost měření na jednom senzoru. Pro každou výše zmíněnou látku bylo změřeno vždy 11 opakovaných měření při jedné koncentraci analytu na každém senzoru a z vyhodnocených výšek píku byla vypočtena hodnota relativní směrodatné odchylky, která se pohybovala vždy do 5 % (chybové úsečky u sloupců v Obr. 4 pro lornoxicam). Na základě dlouhodobějších studií pak bylo zjištěno, že oba typy tištěných senzorů mohou být bez problémů používány opakovaně, a to i několik týdnů, resp. měsíců, a jejich odezva se v podstatě nemění. Na druhou stranu se v souvislosti s tištěnými senzory obvykle hovoří o možnosti jednorázového použití a v takovém případě je nezbytné, aby byly proudové odezvy analyzovaných látek na jednotlivých kusech senzoru reprodukovatelné. Jinými slovy, aby byly produkované senzory reprodukovatelné. Proto byly měřeny signály výše uvedených látek opakovaně rovněž na více kusech jednotlivých typů testovaných senzorů. Pro ilustraci jsou výsledky získané pro lornoxicam shrnuty v Obr. 4., kde jednotlivé sloupce představují proudovou hustotu píku analytu na jedné konkrétní elektrodě. Z obrázku je evidentní, že nejlepší reprodukovatelnost byla získána pro LM-SP/BDDE (*RSD* ≤ 5 %). Současně bylo zjištěno, že na SP/BDDE docházelo k významným změnám potenciálu oxidačních píků látek mezi jednotlivými kusy senzoru, např. pro lornoxicam se E_p pohyboval v rozsahu od 300 do 600 mV. Na „bulk“ BDDE a LM-SP/BDDE k posunu potenciálu nedocházelo.



Obr. 4. Reprodukovatelnost a opakovatelnost měření LRX na jednotlivých testovaných typech senzorů (DPV, elektrolyt – BRB (pH 3), $c_{LRX} = 1,0 \times 10^{-5}$ M).

Závěr

V rámci této práce byly studovány elektrochemické vlastnosti a aplikační možnosti nově připraveného tištěného senzoru s chemicky deponovanou BDDE jako pracovní elektrodou. Na základě studií provedených na běžně používaných redoxních systémech a vybraných analytech ze skupiny léčiv a pesticidů lze říci, že tyto nové senzory mají velice dobré elektrochemické vlastnosti srovnatelné nebo lepší než BDDE použité v klasickém uspořádání nebo komerčně dostupný tištěný senzor. Velkou výhodou je, že poskytují velice dobře opakovatelné a reprodukovatelné výsledky a mohou být používány jak opakovaně pro dlouhodobé studie na jednom senzoru, tak jako jednorázové senzory.

Acknowledgments

Tato práce byla vypracována za finanční podpory Grantové agentury ČR (projekt č. 20-01589S), Univerzity Pardubice (projekt č. SGSFChT_2021_003), projektu agentury APVV (APVV-16-0124) a VEGA grantu č. 1/0554/20.

References

1. Li M., Li Y.T., Li D.W., Long Y.T.: *Anal. Chim. Acta* **734**, 31 (2012).
2. Taleat Z., Khoshroo A., Mazloum-Ardakani M.: *Microchim. Acta* **181**, 865 (2014).
3. Barton J., Garcia M.B.G., Santos D.H., Fanjul-Bolado P., Ribotti A., McCaul M., Diamond D., Magni P.: *Microchim. Acta* **183**, 503 (2016).
4. Beitollahi H., Mohammadi S.Z., Safaei M., Tajik S.: *Anal. Met.* **12**, 1547 (2020).
5. Pohanka M.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **15**, 11024 (2020).
6. Patel K., Hashimoto K., Fujishima A.: *Denki Kagaku* **60**, 659 (1992).
7. Swain G.M., Anderson A.B., Angus J.C.: *MRS Bull.* **23**, 56 (1998).
8. Luong J.H.T., Male K.B., Glennon J.D.: *Analyst* **134**, 1965 (2009).
9. Schwarzova-Peckova K., Vosahlova J., Berek J., Sloufova L., Pavlova E., Petrak V., Zavazalova J.: *Electrochim. Acta* **243**, 170 (2017).
10. Selesovska R., Krankova B., Stepankova M., Martinkova P., Janikova L., Chylkova J., Vojs M.: *J. Electroanal. Chem.* **821**, 2 (2018).
11. Peckova K., Musilova J., Berek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* **39**, 148 (2009).
12. Baluchova S., Danhel A., Dejmekova H., Ostatna V., Fojta M., Schwarzova-Peckova K.: *Anal. Chim. Acta* **1077**, 30 (2019).
13. Selesovska R., Herynkova M., Skopalova J., Keliskova-Martinkova P., Janikova L., Cankar P., Bednar P., Chylkova J.: *Electroanalysis* **31**, 363 (2019).
14. Selesovska R., Hlobenova F., Skopalova J., Cankar P., Janikova L., Chylkova J.: *J. Electroanal. Chem.* **858**, 113855 (2020).

Metallothioneins as Biomarker of Environmental Pollution Metallothioneiny jako biomarkery znečištění životního prostředí

Ivana Šestáková^a, Daniela Krávková^b, and Tomáš Navrátil^a

^a 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

^b Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6, Czech Republic

Abstract

Small wild mammals living at contaminated soil are exploited for monitoring of their metal and metallothionein (MT) levels, which can be influenced by presence of parasites. This has been tested in laboratory experiment with white rats (*Rattus norvegicus*) infected with tapeworm *Himenolepis diminita* and given diet enriched with lead or zinc. The influence of parasite was confirmed with analysis of samples, where metal concentrations in infected groups were lowered in comparison with the uninfected rats. Within infected groups, tapeworms MT levels were 6 or 3 times higher than MT in tapeworms of the control group. Obtained results support possibility of using MT concentration in *Himenolepis diminita* for biomonitoring.

Key Words: metallothioneins, lead, zinc, rats, tapeworms, biomarker, voltammetry, Brdička reaction.

Úvod

Sledování obsahu metallothioneinů jako biomarkery znečištění vodního prostředí¹ je předmětem řady studií i mezinárodního programu (Mediterranean Action Plan of The United Nations Environment Program, 1999). Pro sledování vlivu kontaminace půdy jsou vhodnou možností volně žijící drobní savci, kde hladiny metallothioneinů^{2,3} závisí na obsazích kovů v půdě, a i na dietních zvyklostech (omnivoři, herbivoři, karnivoři). V posledním desetiletí nabývají na významu studie vlivu parazitů, kde je popisován jak pozitivní, tak negativní vliv parazitů na obsahy kovů ve tkáních hostitele. U některých parazitů ryb byl zjištěn řádový nárůst obsahu kovů ve tkáních parazitu, který vedl k uvažování možnosti užití právě parazitů jako indikátoru znečištění^{4,5}.

Pro monitorování znečištění olovem se vzhledem k četnosti výskytu tasemnice jako vhodný uvažuje soubor potkan-tasemnice *Hymenolepis diminita*, který byl ověřen při podávání octanu Pb v laboratorním experimentu⁶. Zatímco ve tkáních hostitele byly měřitelné koncentrace olova pouze v ledvinách, ve tkáních tasemnice byl obsah olova 17x vyšší. Nicméně další experimenty jak laboratorní⁷ tak terénní⁸ nevedly k jednoznačným závěrům. Proto jsme považovali za přínosné zjistit hladiny metallothioneinů ve tkáních tasemnice *Hymenolepis diminita* v experimentu s přidávkou organicky vázaného olova⁹ nebo zinku¹⁰, kde bylo potvrzeno snížení obsahu kovů ve všech vzorcích infikovaných skupin. Pro stanovení obsahu metallothioneinů byla využita modifikovaná Brdičkova reakce^{11,12}, která se osvědčila u laboratorních i terénních vzorků^{3,13}.

Experimentální část

Skupiny laboratorních potkanů byly kontrolovaným způsobem infikovány tasemnicí *Hymenolepis diminita* a po dobu 6 týdnů krmeny standardní směsí ST-1 (kontrolní skupina). Skupině P byla jedenkrát týdně přidána dávka rostliny pistia s obsahem 6 mg Pb, skupině Z mléčan zinečnatý v dávce 120 mg. Po 6 týdnech byla zvířata usmrcena a odebrány vzorky jednotlivých tkání a tasemnice z tenkého střeva. Vzorky byly zpracovány lyofilizací^{9,10}.

Biologické extrakty byly připravovány z 25 mg lyofilizovaného materiálu podle metodiky Hispada et. al., 2008¹². Navážený materiál byl zhomogenizován (UltraTurrax T25) v 6 ml pufru (20mM Tris, 150mM NaCl – pH 8,6 + 10mM 2-mercaptoethanol a inhibitory proteáz: 20 μ M leupeptin, 2 μ M aprotinin a 100 μ M benzamidin – (Sigma) a následně centrifugován při 4 °C, 16 090 g po dobu 30 minut. 1,5 ml supernatantu S1 bylo denaturováno 15 min. při 97°C. Po denaturaci a následném chlazení na teplotu 4 °C proběhla další centrifugace při 4 °C, 10 000 g po dobu 15 minut. Získaný supernatant S2 byl chlazen a uskladněn při -80 °C až do vlastního stanovení.

Voltametrická stanovení byla prováděna s použitím počítačově řízeného analyzátoru PC-ETP (Polaro-Sensors, Česká republika) se softwarem POLAR PRO 5.1. Pracovní elektroda byla HMDE (rtuťová tužková elektroda fy Polaro Sensors). Referentní elektroda byla Ag/AgCl/KCl_{nas}, pomocná elektroda Pt drátek (Elektrochemické Detektory, Turnov, Česká republika). Měření byla prováděna při laboratorní teplotě v dusíkové atmosféře. Pro měření pH byl používán pH metr Jenway 3505 (Bibby Scientific Ltd. UK). Pro výpočet výsledků analýzy z analyzátoru PC-ETP byla použita kalibrační křivka vytvořená metodou standardního přídatku standardu Cd-Zn metalothioneinu (Enzo Life Sciences) k elektrolytu s extraktem tasemnice kontrolní skupiny.

Amonný pufr pH 9.5 pro voltametrická měření byl připravován z chloridu amonného, p.a. a roztoku amoniaku, p.a. (obojí Lachema, Brno). Základní elektrolyt byl 1 M amonný pufr pH 9,5 s 1 mM Co(NH₃)₆Cl₃ (Sigma-Aldrich).

Výsledky a diskuse

Analýza obsahu kovů ve tkáních ukázala že ve všech infikovaných skupinách byly nižší hladiny nežli ve skupinách bez tasemnic. Hladina Pb v tasemnicích byla 45.1x vyšší než v játrech hostitele⁹ ve skupině P, zatímco ve skupině Z bylo v tasemnicích dvojnásobné množství zinku než v játrech hostitele¹⁰. Tato zjištění jsou v souladu s možností dosažení lepší citlivosti pro stanovení obsahu MT v tasemnicích ve srovnání s obvykle používaným stanovením v játrech. Dosažené průměrné hodnoty obsahu MT v tasemnicích jednotlivých skupin tuto možnost potvrzují (Tabulka I).

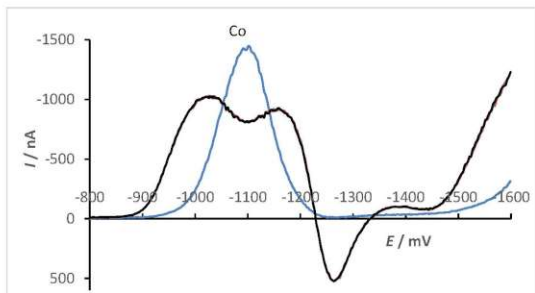
Tabulka I

Průměrné hodnoty obsahu MT v tasemnicích jednotlivých skupin

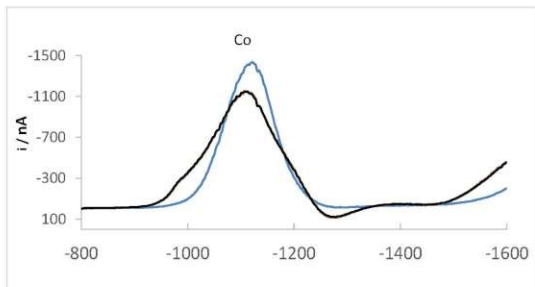
Skupina	Obsahy MT [μ g/ml]
Kontrolní skupina	5,58
Skupina P	33,19
Skupina Z	14,37

Pro vyhodnocení byly použity pouze hodnoty, kdy nebyla na záznamu diferenční pulsní voltmetrie (DPV) přítomna předvlna u cca -985 mV svědčící o degradaci MT na nízkomolekulární fragmenty¹³ při manipulaci s nativním materiálem (Obr. 1).

Na voltogramu v případě existence této předvlny (Obr. 2) dochází ke snížení katalytického piku Brdičkovy reakce u -1400 mV a tedy nižším výsledkům obsahu MT, jak bylo statisticky zpracováno pro stanovení v játrech laboratorního potkana¹³.



Obr.1. DP voltamogram správně připraveného vzorku. 10 ml amonného pufru s 1 mM Co (III) - pik Co, poté přidáno 80 μ l vzorku tasemnice skupiny P. HMDE, puls -50 mV, rychlost scanu 20 mV s^{-1} .



Obr. 2. DP voltamogram částečně degradovaného vzorku. 10 ml amonného pufru s 1 mM Co (III) - pik Co, poté přidáno 80 μ l vzorku tasemnice skupiny Z. HMDE, puls -50 mV, rychlost scanu 20 mV s^{-1} .

Pro možné využití získaných závěrů pro analýzy u volně žijících drobných savců je třeba znát druh parazita a jeho výskyt v dané lokalitě i ročním období¹⁴, což není vždy jednoduché. Dalším faktorem je lokalizace tasemnice v organismu-v případě *Hymenolepis diminuta* je to tenké střevo, kde dochází k transportu živin membránou. Vysoké hodnoty metalothioneinů

v tasemnicích s olovem podávaných s rostlinou pistia jsou ve shodě s pozitivním ovlivněním transportu olova studovaným dříve na modelu fosfolipidové membrány¹⁵.

Závěr

Stanovení obsahu metalothioneinů s využitím Brdičkovy reakce na visící rtuťové kapkové elektrodě prokázalo možnost využití tasemnice *Hymenolepis diminuta* jako vhodného organismu pro biomonitoring. Záznam metodou diferenční pulsní voltametrie umožňuje kontrolu, zda během zpracování nativního materiálu nedošlo k degradaci molekul metalothioneinu na fragmenty s nižší molekulovou hmotností.

Acknowledgements

This research has been supported by the Czech Science Foundation (project GA ČR No. 20-01589S).

References

1. Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J., Rainbow P.S.: *Aquat. Toxicol.* 76, 160 (2006).
2. Veltman K., Huijbregts M.A.J., Hamers T., Wijnhoven S., Hendriks A.J.: *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1488 (2007).
3. Krivská D.: Ph.D. Thesis. ČZU v Praze, 2019.
4. Sures B.: *Trends Parasitol.* 20, 170 (2004).
5. Petřlová J., Krizkova S., Zítka O., Hubalek J., Prusa R., Adam V., Wang J., Beklova M., Sures B., Kizek R.: *Sens. Actuators, B* 127, 112 (2007).
6. Sures B., Grube K., Taraschewski H.: *Ecotoxicology* 11, 365 (2002).
7. Torres J., Peig J., Eira C., Borrés H.: *Environ. Pollut.* 143, 4 (2006).
8. Čadková Z., Míhlová D., Száková J., Válek P., Jankovská I., Langrová I.: *Parasitology* 141, 826 (2014).
9. Horáková B., Čadková Z., Száková J., Jankovská I., Langrová I.: *Ecol. Indic.* 85, 753 (2018).
10. Jankovská I., Sloup V., Száková J., Magdálek J., Horáková B., Langrová I.: *Sci. Agric. Bohemoslov.* 49, 98 (2018).
11. Olafson R.W., Olson P.E.: *Methods Enzymol.* 205, 203 (1991).
12. Hispard F., De Vauffleury A., Cosson, R., Devaux S., Scheifler R., Coeurdassier M., Gimbert F., Martin H., Richert L., Bertheolt A., Badot P.: *Environ. Int.* 34, 381 (2007).
13. Krivská D., Šestáková I., Száková J., Čadková Z., Kotíková Z., Langrová I.: *Ecol. Indic.* 98, 214 (2019).
14. Marcogliese D.J., Pietrok M.: *Trends Parasitol.* 27, 123 (2011).
15. Šestáková I., Skalová Š., Navrátil T.: *J. Electroanal. Chem.* 821, 92 (2018).

Electrochemical Study of Titanocene Difluoride and Difluoride Derivatives (Elektrochemická studie titanocen difluoridových a dichloridových derivátů)

Ludmila Šimková, David Dunlop, Alan Liška, and Jiří Ludvík

J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences,
Dolejškova 3, 182 23 Praha 8, Česká republika, E-mail: ludmila.simkova@jh-inst.cas.cz

Abstract

Recently, titanocene derivatives have been investigated in term of their potential use as cytostatics in the treatment of oncological diseases. The potentials for reduction or oxidation of individual substances are one of the key properties which fundamentally affect the cytostatic efficiency. Our previous results led us to investigate the redox properties of series of titanocene difluoride and dichloride derivatives. This study is mainly focused on the effect of the substitution of cyclopentadienyl ring and the halide anion on the redox properties of the derivative.

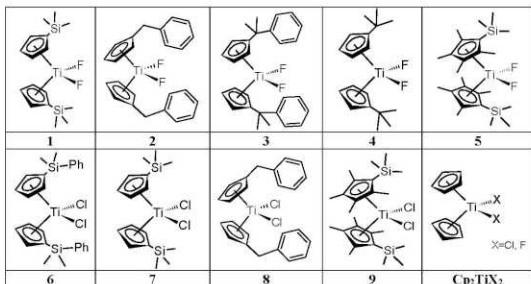
Key Words: Titanocene derivatives, Tuning of redox behavior, Substitution of cyclopentadienyl ring, Halide anion, Redox properties.

Úvod

Deriváty titanocenu nacházejí bohaté využití jako katalyzátory při celé řadě chemických transformací. Nieméně v poslední době se zkoumá i jejich potenciální využití jako cytostatik při léčbě onkologických onemocnění. Nedávné studie poukázaly na vyšší cytotoxicitu u celé řady titanocen difluoridových derivátů v porovnání s jejich dichloridovými analogy^{1,2}. Následné zkoumání mechanismu účinku titanocenů poukázalo na rozpad endoplasmatického retikula rakovinných buněk působením reaktivních kyslíkových částic (ROS).³ Tyto částice generované pomocí redoxně aktivních kovů (v našem případě titanocenů) můžou být účinným prostředkem pro selektivní likvidaci rakovinných buněk, jejichž homeostáza je na přítomnost ROS citlivější v porovnání se zdravými buňkami.⁴

Jednou z klíčových vlastností, které zásadně ovlivňují cytostatickou účinnost, jsou potenciály redukce, případně oxidace jednotlivých látek. Pro charakterizaci a studium redox mechanismů těchto nových sloučenin je velmi vhodný elektrochemický přístup. Bohužel, v literatuře lze nalézt pouze omezené a nesystematické informace týkající se elektrochemického chování titanocen dihalidů, mechanistické úvahy většinou chybí nebo se mezi sebou liší. V ojedinelé studii mechanismu redukce $[\text{Cp}_2\text{TiX}_2]$ ($X = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) je ukázán vliv halogenu na povahu redukovanych částic⁵. Zatímco pro $X = \text{Br}$ a I převládají částice Cp_2TiX a $(\text{Cp}_2\text{TiX})_2$, pro $X = \text{Cl}$ je hlavní složkou $(\text{Cp}_2\text{TiX}_2)^-$. Protože byla nedávno ve studiích disociační vazby elektronů Cp^*TiX_2 ($X = \text{Cl}, \text{F}$) nalezena významně vyšší stabilita Cp^*TiF_2 než Cp^*TiCl_2 ⁶, předpokládáme, že v případě redukce titanocen difluoridů by částice $(\text{Cp}_2\text{TiX}_2)^-$ mohla být ještě více zastoupena. Proto jsme se v naší předchozí práci zaměřili na dosud jedinou elektrochemickou studii difluoridů a jejich permethylovaných derivátů⁷.

Naše dosavadní výsledky nás vedly k dalšímu zkoumání redoxních vlastností rozšířené řady titanocen difluoridových a dichloridových derivátů (Obr. 1), přičemž byl kladen důraz na vliv substituce cyklopentadienylového kruhu a halogenidového aniontu na redoxní charakteristiku daného derivátu.



Obr. 1. Struktury studovaných titanocen dihalidů.

Experimentální část

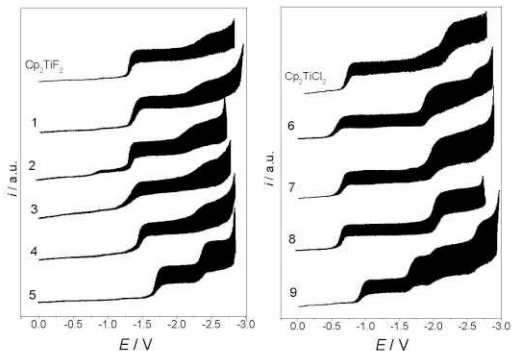
Elektrochemické chování bylo studováno pomocí dc-polarografie (doba kapky 1 s, rychlost scanu 10 mV / s) a cyklické voltametrie při následujících rychlostech polarizace: 100, 200, 500 a 1000 mV/s. Všechna měření probíhala v acetonitrilu (LC-MS Chromasolv®, 99,9%, Fluka) obsahujícím 0,1 M roztok terabutylamonium hexafluorofosfátu (Bu₄NPF₆) (TCl, > 98,0%) jako základní elektrolyt a po vyhublání argonem. Studované látky byly měřeny v koncentracích 0,1; 0,5 a 1 mM. Všechny experimenty byly prováděny v nedělené 10 ml nádobce v tříelektrodovém systému. Jako pracovní elektrody byla použita: kapající rtuťová elektroda (DME), visící rtuťová kapková elektroda (HMDE), případně elektroda ze skelného uhlíku (GCE, ø 3 mm). Pomočná elektroda byla vyrobena z platinového drátu a jako referenční elektroda sloužila nasycená kalomelová elektroda (SCE) oddělená od roztoku acetonitrilu vodivým můstkem naplněným základním elektrolytem. Dc-polarografické experimenty byly prováděny za použití analogového potenciostatu PA4 s XY zapisovačem, oba Laboratorní přístroje Praha. Cyklická voltametrie byla prováděna potenciostatem PGSTAT 101 (Autolab-Metrohm) a zaznamenávána softwarem NOVA 1.11.

Pomocí kvantových výpočtů byly struktury všech zkoumaných (včetně původních i redukovaných) molekul optimalizovány na úrovni B3LYP / CEP-31G (Gaussian). Byl zohledněn vliv rozpouštědla (CPCM). Identita minim byla ověřena výpočty vibračních frekvencí. Vypočtené redoxní potenciály jsou vztaheny k vybranému reprezentativnímu členu série, který slouží jako vnitřní standard, a odpovídají idealizovanému, termodynamickému, plně reverzibilnímu přenosu jednoho elektronu.

Výsledky a diskuze

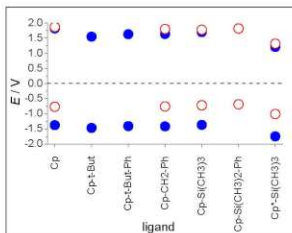
Elektrochemické chování titanocen dihalidů bylo studováno jak za ustáleného stavu pomocí depolarografie, tak i dynamicky cyklickou voltametří. Aby se vyloučil vliv materiálu pracovní elektrody na elektrodovou reakci, byly provedeny stejné experimenty jak se rtuťovou pracovní elektrodou, tak s elektrodou ze skelného uhlíku. Acetonitril byl vybrán proto, že poskytuje nejširší dostupné potenciálové okno (+2,5 až -2,9 V vs SCE) současně na rtuť i na skelném uhlíku.

V dostupném rozmezí potenciálů se studované deriváty titanocen dihalidů redukuji v několika redukčních krocích (Obr. 2), což ukazuje na komplikovaný mechanismus s následnými chemickými reakcemi díky přítomnosti několika redukovatelných center. Na druhé straně oxidace probíhá pouze v jednom kroku. Ukázalo se, že volba materiálu pracovní elektrody má určitý vliv na elektrochemické procesy, neboť na skelném uhlíku jsou pozorované redoxní piky obecně méně výrazné kvůli vyššímu nabíjecímu (kapacitnímu) proudu. Kromě toho se kinetika následných reakcí mírně liší, což se projevuje zejména v cyklické voltametii jako vzájemně různé proporce piků v závislosti na rychlosti scanu. Všechny pozorované redoxní procesy jsou řízeny difúzí.



Obr. 2. DC-polarografické záznamy zkoumaných titanocen difluoridů (série vlevo) a dichloridů (série vpravo).

Studovaná série komplexů zahrnuje pět titanocen difluoridů a čtyři titanocen dichloridy nesoucí identické substituenty na obou cyklopentadienylových kruzích. Nejdůležitější pro elektrochemickou charakterizaci nové sloučeniny je její první redukční a první oxidační potenciál. Potenciály prvního anodického (E_{pa}) a katodického (E_{pc}) piků studovaných sloučenin v závislosti na typu ligandu jsou uvedeny na Obr. 3.



Obr. 3. Graf závislosti prvního anodického (E_{pa}) a prvního katodického (E_{pc}) potenciálu studovaných titanocen dihalidů (modré plně značky fluorované, červené prázdné značky chlorované deriváty) získaných z cyklické voltametrie na skelném uhlíku při rychlosti scanu 100 mV/s na ligandu. Potenciály jsou vztaženy k SCE.

Na základě literatury ^{7,8} a porovnání prvních redukčních a oxidačních proudů je možné očekávat, že prvním redukčním krokem všech titanocen dihalidů je v zásadě jednoelektronový proces, jehož reverzibilita je omezena rychlými následnými reakcemi (to platí zejména pro titanocen difluoridy, zatímco proud titanocen dichloridů je vyšší). Na druhé straně, první oxidační krok vykazuje dvojnásobnou výšku proudu ve srovnání s výškou proudu v redukci difluoridů, což odpovídá irreverzibilní oxidaci se spotřebou dvou elektronů. V případě derivátů **1**, **7** a **8** je proud oxidačního kroku ještě mnohem vyšší.

Elektrochemická redukce titanocen difluoridů začíná jednou dobře vyvinutou vlnou/píkem, po které následuje (po přibližně 800 mV) druhý, mnohem menší proces naznačující částečnou reverzibilitu, po kterém je zaznamenána velmi malá indikace třetího kroku. Tento vzorec chování je pozorován na rtuťi i na skelném uhlíku.

Elektrochemická redukce chlorovaných derivátů se zdá být mnohem komplikovanější, probíhá ve více redukčních krocích (Obr. 2) a u výrazně pozitivnějších potenciálů. Přestože píky na cyklické voltametii titanocen difluoridů a dichloridů na HMDE a na GCE se vyskytují zhruba na stejných potenciálech (± 10 mV), dc-polarografické vlny dichloridů se objevují asi o 100 mV dříve, při méně negativních potenciálech. Tento posun způsobený vlivem elektroodvoďového materiálu je pravděpodobně kinetického původu, protože primární redukční štěpení atomu chloru vede k chloridovým iontům, které snadno tvoří nerozpustnou rtuťovou sloučeninu. Proto první redukční vlny/píky titanocen dichloridů jsou vyšší než od titanocen difluoridů a druhý redukční krok není reverzibilní.

Rozdíl mezi první oxidací a prvním redukčním potenciálem je další důležitou redoxní charakteristikou jakékoli sloučeniny, protože koreluje s mezerou HOMO-LUMO. Z rozdílu prvního redukčního a prvního oxidačního potenciálu lze pozorovat tři rysy: a) dichloridy mají potenciálovou mezeru ΔE asi o 0,5 V nižší než difluoridy; b) titanoceny obsahující Cp* mají jejich ΔE mírně nižší (o 0,1 – 0,2 V) než titanoceny s Cp; c) další substituce na cyklopentadienylovém kruhu má zanedbatelný vliv na ΔE .

Závěry

Redoxní vlastnosti titanocen difluoridů a dichloridů byly zkoumány pomocí standardních elektrochemických metod. Hlavní důraz byl kladen na vliv substituce cyklopentadienylového kruhu a přítomnost halogenidového aniontu na redoxní charakteristiku daného titanocenu. Elektrochemická redukce chlorovaných derivátů se zdá být mnohem komplikovanější oproti fluorovaným derivátům. Ukázalo se, že i volba materiálu pracovní elektrody má určitý vliv na elektrochemické procesy, především na kinetiku následných reakcí.

Acknowledgments

Tato práce vznikla s podporou grantu GAČR č. 17-05838S a institucionální podpory RVO 61388955.

References

1. Eger S., Immel T. A., Claffey J., Müller-Bunz H., Tacke M., Groth U., Huhn T.: *Inorg. Chem.* **49**, 1292 (2010).
2. Hodík T., Lamač M., Červenková Šťastná L., Karban J., Koubková L., Hrstka R., Cisařová I., Pinkas J.: *Organometallics* **33**, 2059 (2014).
3. Koubková L., Vyzula R., Karban J., Pinkas J., Ondroušková E., Vojtešek B., Hrstka R.: *Invest. New Drugs* **33**, 1123 (2015).
4. Glasauer A., Chandel N. S.: *Biochem. Pharmacol.* **92**, 90 (2014).
5. Enemark R. J., Larsen J., Hjøllund G. H., Skrydstrup T., Daasbjerg K.: *Organometallics* **24**, 1252 (2005).
6. Langer J., Zawadzki M., Färnik M., Pinkas J., Fedor J., Kočíšek J.: *Eur. Phys. J. D* **72** (2018).
7. Šimková L., Svoboda J., Pinkas J., Skoupiřová H., Hrstka R., Dunlop D., Lamač M., Gyepes R., Ludvík J.: *Electroanalysis* **31**, 1 (2019).
8. Langmaier J., Samec Z., Varga V., Horáček M., Mach K.: *J. Organometal. Chem.* **579**, 348 (1999).

Oxidation Processes of *N*-methylguanines

Libuše Trnková^a, Iveta Trísková^a, Alan Liška^b, and Jiří Ludvík^b

^aMasaryk University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Laboratory of Biophysical Chemistry and Electrochemistry, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

E-mail: libuse@chemi.muni.cz

^bJ. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Department of Molecular Electrochemistry and Catalysis, Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic

Abstract

The oxidation processes of *N*-methylguanines were investigated in both experimental and theoretical way. Voltammetric oxidation potentials of guanine and its methyl analogues, acquired on polymer pencil graphite electrode (pPeGE), were compared with the HOMO (SOMO) energies calculated by density functional (DFT) methods. Our study contributes to understanding not only the oxidation processes of methylated guanines but also their role in epigenetics.

Key words: Guanine, *N*-methylated guanine, Oxidation process, Voltammetry, HOMO (SOMO) energy, DFT methods, Epigenetic modification.

Introduction

Epigenetic modifications, particularly DNA methylation, have been traditionally regarded as static modifications. Progress in epigenetics during past few years has demonstrated that the modifications of the genome are much more dynamic than initially thought^{1,2}. Recent research is revealing that redox metabolism is an increasingly important determinant of epigenetic control that may have significant ramifications in both human health and disease^{1,2}. One of several epigenetic mechanisms that cells use to control gene expression is DNA methylation and one of different methylated guanines, 7- methylG (epiguanine) is recognized as the biomarker of DNA methylation³. In our study, we focused not only on the study of the oxidation process of 7-methylG, but also on the processes of other *N*-methylated derivatives (1-, 3-, and 9-methylG).

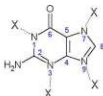


Fig. 1. The methyl group (X) position on guanine skeleton.

Experimental

Linear sweep voltammetry (LSV)

The voltammetric experiment was carried out by using electrochemical analyzer μ AUTOLAB TYPE III (Metrohm, Switzerland). The pencil graphite electrode (PeGE; 0.5 HB Tombow, Japan) with an effective area of 16 mm² was used as the working electrode⁴⁻⁶. The Ag/AgCl/3M KCl and the platinum wire were used as a reference and a counter electrode, respectively. The samples with concentration of 20 μ M were prepared in phosphate-acetate buffer (pH 3.16 – 7.52). The voltammetric conditions were as follows: scan rates 100, 200, 400, 800 mV/s; the start and the end potentials were -0.1 V and 1.6 V, respectively. All experiments were performed under argon atmosphere and at room temperature.

Elimination Voltammetry with Linear Scan (EVLS)

The EVLS procedure⁷⁻¹⁰ allows recognizing the partial current contributions via an elimination function $f(I)$ which is formed from the total voltammetric currents measured at different scan rates, taking one of these as the reference scan rate (v_{ref}). The simultaneous elimination of the charging and kinetic current components ($I_k \sim v^{\beta}$, $I_c \sim v$), and also by utilizing conservation of the diffusion current component ($I_d \sim v^{1/2}$), we can obtain the EVLS function $f(I)$ as a linear combination of the total voltammetric currents multiplied by the elimination coefficients. For the integer of 2 the E4 elimination is implemented by the equation:

$$f(I) = -11.657 I_{1/2,ref} + 17.485 I_{ref} - 5.8584 I_{2ref} \quad (1)$$

For an adsorbed electroactive species undergoing irreversible electron transfer, the EVLS E4 curve results in a specific peak-counterpeak (p-cp) signal⁹. It is a fast and simple identification of the electron transfer process taking place in the adsorbed state of the molecule under investigation. For the EVLS procedure the LSV curves (measured at 200, 400, and 800 mV/s) were smoothed (the Savitzky – Golay filter, level 2) by using GPES Manager 4.9.

Theoretical methods

Structures of the methylGs were optimized; the identities of minima were verified by vibration frequency calculations. The changes in free energy were calculated at DFT level using the general purpose B3LYP functional and more specific ω B97X-D functional^{11,12}. For both functionals, 6-31+G(d) basis set was utilized; in the case of SPARTAN the basis set 6-31G* was applied. Geometry optimizations were performed directly in the reaction field, either using IEFPCM or COSMO implementation (CPCM) in the PCM framework¹³. Absolute free energy of electron at 298 K was taken from the work¹⁴, the standard Gibbs energy of hydrated proton from Ref.¹⁵ and absolute potential of SHE from Ref.¹⁶.

Results and discussion

Using different graphite electrodes, the best oxidation responses of *N*-methylGs were observed on the polymer pencil graphite electrodes (pPeGEs)¹⁷ (Fig 2).

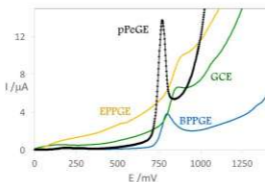


Fig. 2. Voltammetric oxidation signals of 1-methylG (20 μ M) on different graphite electrodes (pH 5.06; scan rate 400 mV/s). pPeGE – polymer Pencil Graphite Electrode, GCE – Glassy Carbon Electrode, BPPGE – Basal Plane Pyrolytic Graphite Electrode, EPPGE - Edge Plane Pyrolytic Graphite Electrode.

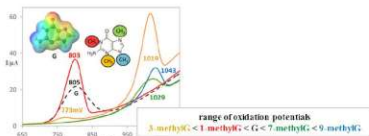
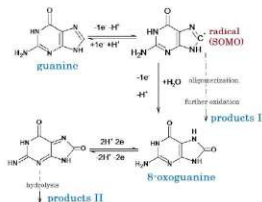


Fig. 3. Voltammetric oxidation signals of *N*-methylGs (20 μM) on pPeGE (pH 5.06; scan rate 400 mV/s). The ESP map of G (the isosurface level = 0.03).

Elimination peak-counterpeaks signals of methylguanines revealed adsorption activity in the range 9-methylG < 3-methylG ≈ 7-methylG < 1-methylG. The LSV experiments pointed to approximately the same number of protons and electrons transferred. In context of previous study on guanine derivatives¹⁷ only neutral radicals as the oxidation products were considered ($-1\text{H}^+ - 1\text{e}^-$).



Therefore, calculated levels of corresponding frontier orbitals (SOMO) were correlated to the experimental LSV peak oxidation potentials.

Table I.

Correlation between theoretical E_{SOMO} and experimental oxidation potentials E_p .

	$E_{\text{SOMO}}/\text{eV}$	E_p/V (pH3.3)
GNMe3N_R	-	0.915 (I)*
GNMe1N_R	-6.244	0.924
GN1_R	-6.317	0.947
GNMe7N_R	-6.497	1.106
GNMe9N_R	-6.522	1.120
GNMe3N_R	-6.643	1.154 (II)*

* the values (I) and (II) correspond to two oxidation signals of 3-methylG

Candidate tautomeric model structures for the quantum chemical calculations were chosen with respect to conserving the aromatic character of the purine ring. Thus, the hydrogen atoms located on various nitrogen atoms were varied. As a result, limited number of input structures was taken into account.

Conclusions

Oxidation processes of *N*-methyl derivatives of G (1*N*, 3*N*, 7*N*, and 9*N*) were investigated on a polymer pencil graphite electrode (Tombow, pPeGE) to ascertain the relationship between the position of the methyl group and the corresponding oxidation behavior. It was found that energetically easier oxidation can be expected in case of methyl substitution at the pyrimidine ring rather than at the imidazole one. The position of the methyl group affects the rapid protonation/deprotonation and tautomeric equilibria that involve oxidation processes. The voltammetric data were completed with quantum chemical calculations: (i) the HOMO energies of all *N*-methylGs, (ii) the SOMO energies of the corresponding cations, and (iii) the theoretical oxidation potentials obtained from thermochemical cycles. Possible tautomeric structures of all the methyl derivatives were optimized using COSMO solvation models at B3LYP/6-31+G(d) level. While 1-, 7- and 9-mG tautomers of lowest energy resemble G, guanosine and GMP derivatives in the sense that their species have hydrogen atoms located on N1 and N9 atoms¹⁷, 3-methylG prefers to have N7 atom protonated. This finding will be discussed in more detail with respect to specific electrochemical properties of 3-methylG reported from experiments.

Acknowledgments

This research has been financially supported by the project MUNI/A/1424/2019 of Ministry of Education, Youth and Sports (MEYS) of the Czech Republic. Computational resources were supplied by the project "e-Infrastruktura CZ" (e-INFRA LM2018140) provided within the program Projects of Large Research, Development and Innovations Infrastructures.

References

1. Liu C., Jiao C., Wang K., Yuan N.: *DNA Methylation and Psychiatric Disorders*, D. R. Grayson (ed.), *Epigenetics and Psychiatric Disease*, Elsevier, Amsterdam, 2018.
2. Choudhuri S.: *Fundamentals of Genes and Genomes* (Ch 1), in *Bioinformatics for Beginners*, Elsevier Science Publishing Co Inc, 2014.
3. Bianchini F., Wild C.P.: *Toxicology Letters* 72, 175 (1994).
4. Navratil R., Jelen F., Kayran U., Trnkova L.: *Electroanalysis* 26, 952 (2014).
5. Aladag N., Trnkova L., Kourilova A., Ozsoz M., Jelen F.: *Electroanalysis* 22, 15 (2010).
6. Navratil R., Kotzianova A., Halouzka V., Opletal T., Triskova I., Trnkova L., Hrbac J.: *J. Electroanal. Chem.* 783 (2016)152.
7. Dracka O.: *J. Electroanal. Chem.* 402, 19 (1996).
8. Trnkova L.: *J. Electroanal. Chem.* 582, 258 (2005).
9. Trnkova L., Kizek R., Dracka O.: *Electroanalysis*, 12, 905 (2000).
10. Trnkova L.: *Chem. Listy* 95, 518 (2001).
11. Becke A.D.: *J. Chem. Phys.* 98, 5648 (1993).
12. Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Scalmani G., Barone V., Petersson G. A., Nakatsuji H., et al., *Gaussian 16*, rev. A. 03, Gaussian Inc., Wallingford CT (2016).
13. Amovilli C., Barone V., Cammi R., Cancès E., Cossi M., Mennucci B., Pomelli Ch. S., Tomasi J.: *Advances in Quantum Chemistry*, vol. 32, p.227-261, Elsevier, 1998.
14. Bartmess J. E.: *J. Phys. Chem. A*, 98, 6420 (1994).
15. Shields G.C., Seybold P.G.: *Computational Approaches for the Prediction of pKa Values*, CRC Press, Taylor&Francis Group, Boca Raton, London, New York, 2014.
16. Evans D. H., *Chem. Rev.*, 108, 2113 (2008).
17. Liska A., Triskova I., Ludvik J., Trnkova L.: *Electrochim. Acta* 308, 108 (2019).

Monitoring of Ketamine Metabolism using Capillary Electrophoresis in PAMAPTAC Coated Capillaries

(Sledování metabolismu anestetika ketaminu pomocí kapilární elektroforézy v PAMAPTAC pokrytých kapilárách)

Petr Tůma^a and Dušan Koval^b

^aCharles University, Third Faculty of Medicine, Department of Hygiene, Ruská 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic, E-mail: petr.tuma@lf3.cuni.cz

^bInstitute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic

Abstract

Capillary electrophoretic separation of aesthetic ketamine and its metabolites norketamine, hydroxynorketamine, and dehydronorketamine is performed under influence of opposite electroosmotic flow. Electrophoretic separation is realized in covalently coated fused silica capillaries covered by copolymer of neutral acrylamide (PAM)/cationic 3-acrylamidopropyl trimethylammonium chloride (APTAC). The content of APTAC in polymerization mixture changed in range 0 – 6 % and the generated electroosmotic flow changes in interval 0 – 20 x 10⁻⁹ m²/V.s. The determination of ketamine and its derivatives in rat serum is performed in 4% PAMAPTAC capillary with inner diameter of 25 µm in 500 mM aqueous solution of acetic acid (pH 2.3) as background electrolyte. LOD ranges from 2.2 ng/mL for dehydronorketamine to 4.1 ng/mL for hydroxynorketamine. New method is applied for the time monitoring of ketamines in rat serum after the intra venous administration of low dose of anaesthetic at level 2 mg/kg.

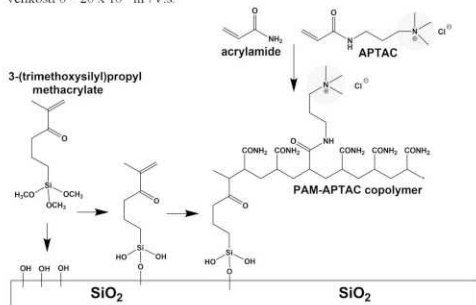
Key Words: Acetonitrile, Serum, Capillary electrophoresis, Coating, Pharmaceuticals.

Úvod

Kapilární elektroforéza (CE) představuje silný nástroj pro stanovení metabolitů a léčiv v tělních tekutinách¹. Mezi hlavní přednosti CE patří vysoká separační účinnost, krátká doba analýzy, snadná úprava komplexní biologické matrice, nízká spotřeba vzorku a ostatních činidel. Zajištění vysoké separační účinnosti (*N*) společně s krátkým migračním časem je spojeno s prováděním separace při vysokých intenzitách separačního pole (*E*) v kapilárách o malém vnitřním průměru (ID), ID ≤ 25 µm, v nichž je zajištěn účinný odvod Jouleova tepla². Optické UV-Vis detektory vykazují v kapilárách o malém ID nízkou citlivost a lze je úspěšně nahradit bezkontaktními vodivostními detektory (C²D). C²D dosahují pro látky iontové povahy citlivost na hladině 10⁻⁶ mol/L, jak bylo ukázáno při stanovení minerálů³, aminokyselin⁴, sacharidů⁵ a farmaceutik⁶.

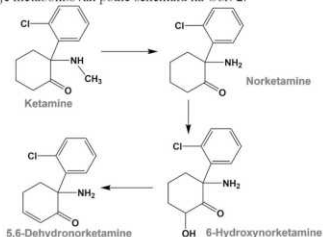
Důležitějším parametrem než je počet teoretických pater představuje elektroforetické rozlišení (*R*). Během rychlých separací prováděných v krátkých kapilárách, kdy analyt setrvává v kapiláře po krátkou dobu, jsou hodnoty *R* nižší v porovnání se separacemi prováděnými v dlouhých kapilárách. Zajímavým řešením tohoto problému je provádění separace v režimu protisměrné elektroforézy, kdy analyt migruje proti směru opačně namířeno elektroosmotického toku (EOF). Analyt za těchto podmínek setrvává v kapiláře po delší dobu a separuje se v krátké kapiláře za využití maximální *E*. Za tímto účelem jsou vyráběny permanentně pokryté kapiláry, ve kterých je nabitý polymer kovalentně navázán na silanolové skupiny. V této práci je přímo uvnitř křemenné kapiláry syntetizován kopolymer mezi iontovým 3-akrylamidopropyl trimethylammonium chloridem (APTAC) a neutrálním akrylamidem (PAM) s proměnným obsahem iontové složky a výsledný kopolymer se označuje

PAMAPTAC ^{7, 8} (Obr. 1). Přidavek neutrálního akrylamidu do polymerační směsi vede k syntéze kopolymerů s řízeným obsahem iontové složky, čímž se generuje proměnný EOF o velikosti 0 – 20 x 10⁻⁹ m²/V.s.



Obr. 1. Schéma syntézy kopolymeru PAMAPTAC uvnitř křemenné kapiláry ⁷.

Kovalentně pokryté PAMAPTAC kapiláry jsou následně použity pro separaci anestetika ketaminu a jeho tří metabolitů. Ketamin je užíván v humánní i veterinární medicíně ⁹ pod obchodním názvem Ketanest, Ketaset, Ketalar, Narketan, Narkamon a Calypsal. Působí jako antagonist N-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů, váže se také na opioidní a sigma receptory, vyvolává anestézii ¹⁰, stimuluje kardiovaskulární a respirační centra a má analgetické účinky. V játrech je metabolizován podle schématu na Obr. 2.



Obr. 2. Metabolismus mateřského anestetika ketaminu v játrech potkana.

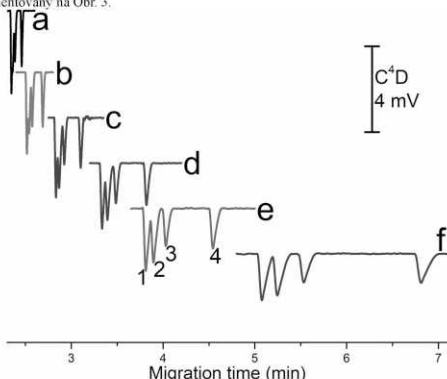
Experimentální část

Veškerá elektroforetická měření byla provedena na přístroji kapilární elektroforézy Agilent 7100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) vybaveném bezkontaktním vodivostním detektorem (ADMET, ČR) ¹¹, který je společně s kapilárou vložen do kazety a termostatován

na 25 °C. CE separace jsou prováděny v 25 µm PAMAPTAC kapilárách s 0 – 6% obsahem iontového APTAC v polymerační směsi; kapiláry mají vnitřní/vnější průměr 25/363 µm, efektivní a celkovou délku 16,6/31,4 cm (Composite Metal Services, UK). Vzorek je do kapiláry dávkován hydrodynamicky tlakem 50 mbar po 120 s. Sérum potkana je ředěno acetonitrem v poměru 1:3, následně třepáno, centrifugováno a získaný supernatant použit k CE analýze. Všechny použité chemikálie dosahovaly analytického stupně čistoty a pro přípravu základních elektrolytů (BGE) a dalších roztoků byla použita deionizovaná voda.

Výsledky a diskuze

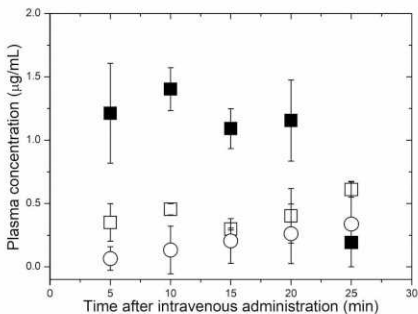
V PAMAPTAC kapilárách jsou prováděny separace modelových směsí ketaminu, norketaminu, dehydronorketaminu a hydroxynorketaminu. Se zvyšující se hodnotou protisměrného EOF se migrační čas ketaminu prodlužuje z počáteční hodnoty 2,5 min pro PAM pokrytou kapiláru s nulovým EOF až na hodnotu 9 min v 6% PAMAPTAC. S rostoucí dobou setrvání analytu v kapiláře také klesá separační účinnost, měřená jako počet teoretických pater N , protože se prodlužuje čas pro rozmytí piku vlivem difúze i elektrodisperze. Důležité je, že se s rostoucím protisměrným EOF také plynule zvyšuje elektroforetické rozlišení R (ketaminu/norketaminu) z hodnoty 0,8 pro PAM pokrytou kapiláru až na hodnotu 3,0 pro 6% PAMAPTAC. Pozitivní efekt na vzrust R je výrazný především pro vyšší hodnoty EOF, když se hodnota mobility protisměrného EOF v absolutní hodnotě blíží elektroforetické mobilitě analytu. Záznamy CE separace směsí ketaminů a tří jeho metabolitů s přidávkem infuzního roztoku do vzorku jsou dokumentovány na Obr. 3.



Obr. 3. CE separace modelové směsi ketaminu a jeho metabolitů na koncentrační hladině 1,0 µg/mL v PAMAPTAC pokryté kapiláře s postupně se zvyšujícím podílem iontového APTAC v polymerační směsi: a - 0%, b - 1%, c - 2%, d - 3%, e - 4%, f - 5%. Experimentální podmínky, BGE, 500 mM AcOH; celková/efektivní délka kapiláry 31,4/16,6 cm; vzorek dávkován tlakem 50 mbar po dobu 120 s; anestetika rozpuštěna v 25% v/v fyziologickém roztoku a 75 % v/v

acetonitrilu; napětí/proud, +30 kV/5,4 μ A; identifikace: 1 – dehydronorketamin, 2 – norketamin, 3 – ketamin, 4 - hydroxynorketamin.

LOD a LOQ stanovené z kalibrační závislosti výšky piku na koncentraci analytu odpovídající hodnotě trojnásobku respektive desetinásobku šumu C^D se pohybují v rozmezí 2,2 – 4,1 μ g/mL pro LODs, a 7,4 – 13,6 μ g/mL pro LOQs. V provedené fyziologické studii byla na počátku experimentu potkanům intravenózně aplikována nízká dávka ketaminu na hladině 2 mg ketaminu/ 1 g váhy potkana na následně jim byla odebírána krev v 5 min intervalech po dobu 25 min, Obr. 4. Hladina mateřského ketaminu je během prvních 20 min na úrovni 1,1 – 1,4 μ g/mL a po 25 min byl zaznamenán pokles na 0,2 μ g/mL. Metabolity norketamin a hydroxynorketamin se začínají objevovat již od páté min od aplikace ketaminu a jejich hladina pozvolně vzrůstá s tím, že koncentrace norketaminu jsou po celou dobu vyšší než koncentrace následného metabolitu hydroxynorketaminu. Poslední metabolit v řadě dehydronorketamin nebyl nalezen a předpokládá se, že než dojde k jeho syntéze, jsou předchozí metabolity vyloučeny z těla močí.



Obr. 4. Hladina ketaminu (■), norketaminu (□) a hydroxynorketaminu (○) v séru potkana po intravenózní aplikaci dávky anestetika 2 μ g/g váhy potkana v čase 0 min.

Závěr

Kopolymer PAMAPTAC představuje vhodné kovalentní pokrytí křemenné kapiláry vyrobitelné v laboratoři. Proměnným zastoupením iontového APTAC v polymerační směsi se generuje aniontový EOF v širokém rozmezí mobilit, dle požadavků příslušné aplikace. CE separace prováděné in PAMAPTAC kapilárách prokazatelně zvyšují rozlišení sousedních piků a umožňují provádět citlivé monitorování farmaceutik.

Acknowledgments

Autoři děkují za finanční podporu GAČR, grant 18-04902S.

References

1. Phillips T.M.: *Electrophoresis* 39, 126 (2018).
2. Tůma P., Samcová E., Štulík K.: *Electroanalysis* 23, 1870 (2011).
3. Šolínová V., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 29, 1743 (2006).
4. Tůma P., Málková K., Samcová E., Štulík K.: *J. Sep. Sci.* 33, 2394 (2010).
5. Tůma P., Málková K., Samcová E., Štulík K.: *Anal. Chim. Acta* 698, 1 (2011).
6. Tůma P.: *J. Chromatogr. A* 1345, 207 (2014).
7. Tůma P., Koval D., Sommerová B., Vaculín S.: *Talanta* 217, 8 (2020).
8. Tůma P., Gojda J., Sommerová B., Koval D.: *J. Electroanal. Chem.* 857, 6 (2020).
9. Robertson S.A., Taylor P.M.: *J. Feline Med. Surg.* 6, 321 (2004).
10. Morgan C.J.A., Curran H.V.: *Addiction* 107, 27 (2012).
11. Tůma P.: *J. Sep. Sci.* 40, 940 (2017).

Comparison of the Covalent Laccase Immobilization at Amino- and Carboxyl-functionalized Mesoporous Silica, Glassy Carbon, and Graphite Powders using Different Coupling Agents for Optimal Biosensor Preparation

Sofia Tvorýnska^{a,b}, Jiří Barek^b, and Bohdan Josypčuk^a

^aJ. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: sofia.tvorýnska@jh-inst.cas.cz

^bCharles 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 order to find the most suitable immobilization protocol, a comparison of three strategies based on the application of $-NH_2$ and $-COOH$ functionalized supports with the different activation agents (glutaraldehyde and carbodiimide) have been conducted for the covalent enzyme (laccase) attachment. Two kinds of the supports, namely mesoporous silica (SBA-15, MCM-41) and carbonaceous (glassy carbon, graphite) powders, have been used. It was found that a biosensor consisted of tubular detector of silver solid amalgam as a working electrode and the enzymatic mini-reactor with laccase covalently attached to glutaraldehyde activated $-NH_2$ functionalized MCM-41 shows the best results regarding sensitivity and stability for dopamine detection.

Key Words: Covalent enzyme immobilization, Support surface functionalization, Laccase, Enzymatic mini-reactor, Biosensor, Flow injection analysis.

Introduction

Proper selection of the binding enzyme technique has a significant impact on the quality and efficiency of the enzymatic biosensors¹. The frequently used immobilization method with some merits and demerits for designing and development of the enzyme-based biosensors is the covalent coupling². The strong covalent interaction between the enzyme and supports provides the high stability and long lifetime of the biosensors with the minimal enzyme leakage. The covalent attachment of the enzymes on the solid supports is generally performed by initial functionalization of the support surface with the anchor groups, their activation, and, finally, the enzyme coupling to the activated support³. Therefore, the kind of the support (included porosity, surface area, etc.), type of the functional groups introduced on the support surface (their density, hydrophilic/hydrophobic balance on the support surface) as well as coupling agent (its reactivity, the ability to provide the molecule spacer) are the factors of the primary importance, which should be taken into account at the development of the enzyme immobilization protocol⁴. The validity of these factors might be different depending on the particular enzyme. Thus, it usually requires to test all of these factors ("trial and error approach"). In spite of a quite large number of the developed protocols of the covalent enzyme attachment, only a few studies focused on the systematic comprehensive optimization of all above mentioned factors can be traced in the literature⁵⁻⁸.

Therefore, this research is based on the systematic investigation of a number of factors, namely the kind of support, its anchor groups, and the coupling agents, on the covalent laccase (Lac) attachment in order to develop the most suitable immobilization protocol for the efficient biosensor preparation. Two different kinds of the powdered supports, such as mesoporous silica (SBA-15 and MCM-41) and carbonaceous powders (glassy carbon and graphite) have been tested. Laccase from *Trametes versicolor* has been selected as the testing enzyme.

Experimental

Laccase from *Trametes versicolor* (Lac, EC 1.10.3.2; 12.9 U mg⁻¹), dopamine, glutaraldehyde (GA, grade II, 25 % aqueous solution), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, ≥98.0 %), N-hydroxysuccinimide (NHS, ≥97.0 %), (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES), *p*-phenylenediamine, mesoporous silica powder SBA-15 (particle size 2–6 μm, pore size ≈ 7 nm, surface area ≈ 600 m²g⁻¹), mesoporous silica powder MCM-41 (pore size 2.1–2.7 nm, surface area ≈ 1000 m²g⁻¹), glassy carbon (GC, spherical powder, particle size 2–12 μm), and graphite (Gr, microcrystalline), were purchased from Sigma-Aldrich®. Carboxyethylsilanetriol (CEST, 25 % aqueous solution) was purchased from aber GmbH® (Germany). All other chemicals were of p.a. or higher grade.

Amperometric measurements were carried out at the laboratory temperature using computer-controlled electrochemical stand (Polaro-Sensors, Czech Republic) with MultiElchem v. 3.1 software (J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the CAS, v.v.i.). Three-electrode flow-through cell with tubular detector of polished silver solid amalgam (TD-AgSA, laboratory-made⁹, inner diameter (*ID*) 0.5 mm, the amalgam tube length 6.0 mm) as a working electrode has been used. A miniaturized saturated calomel electrode based on silver paste amalgam (laboratory-made¹⁰, it has the same potential as classical saturated calomel electrode (SCE)) was used as a reference electrode. The auxiliary electrode was platinum wire (diameter 1.0 mm, length 10 mm). The system for flow injection analysis (FIA) with electrochemical detection comprised of a linear syringe pump, PC controlled 2-position 6-port sample injector valve, a laboratory-made injection loop of PTFE tubing (100 μL), PC controlled solenoid operated micro-pump, the enzymatic mini-reactor, and the flow-through cell with TD-AgSA. The capillaries and PTFE tubing with *ID* 0.5 mm were used to connect the individual components. A scheme of the used flow injection system is shown and described in details in our previous papers^{11,12}.

Results and discussion

To investigate the influence of the support type, the functional groups introduced on the support surface, and the methods of activation, three different strategies of the covalent Lac immobilization have been tested:

- A. Lac has been covalently attached to –NH₂ functionalized supports through GA;
 - B. Lac has been covalently bounded to –NH₂ functionalized supports through EDC/NHS;
 - C. Lac has been covalently coupled to –COOH functionalized supports through EDC/NHS.
- All the resulting powdered supports covalently covered by Lac have been tested as the filling in column-type enzyme mini-reactor coupled with TD-AgSA as a working electrode for dopamine detection in FIA. The principle of dopamine detection is based on the cathodic reduction of dopamine-*o*-quinone formed *via* previous Lac-based oxidation. The following parameters for dopamine detection were used: $E_{det} = -50$ mV, $v_{flow} = 0.1$ mL min⁻¹, $V_{inj} = 40$ μL, carrier solution (CS): [0.1 mol L⁻¹ acetate buffer (AcB); pH 4.8]¹³.

Basically, the procedure of the covalent Lac immobilization on the powdered supports by each strategy consists of three steps: **I.** Synthesis of the functionalized supports, which means the modification of support surfaces either by –NH₂ or –COOH groups (MCM41–NH₂, MCM41–COOH, SBA15–NH₂, SBA15–COOH, GC–NH₂, GC–COOH, Gr–NH₂, and Gr–COOH). **II.** Activation of the functional support groups/enzymatic groups with specific activation agent (GA or EDC/NHS) to make them reactive towards enzyme/functionalized supports. **III.** Enzyme binding to the supports.

Because of the high content of silanol groups (–SiOH), mesoporous silica powders can be easily functionalized using the widespread technique of silanization¹⁴. Thus, SBA-15 and MCM-41

were coated by aminosilane APTES to form -NH_2 groups on the surfaces^{15,16}, whereas carboxylsilane CEST was used to form -COOH groups. To obtain -COOH functionalized carbonaceous powders, GC and Gr were treated with a mixture of concentrated acids ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{:HNO}_3 = 3\text{:}1$ (w/v)). The acid pre-treatment promotes the appearance of polar hydrophilic groups, such as predominantly carboxyl (-COOH), some hydroxyl (-OH), and carbonyl (>C=O). Coating of GC and Gr with -NH_2 groups was performed by two methods:

- amino silanization of GC-OH and Gr-OH formed *via* previous chemical oxidation of carbonaceous powders by $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ¹⁷. The prepared -NH_2 functionalized carbonaceous powders using this technique are referred to as GC-NH₂(APTES) and Gr-NH₂(APTES);
- amino functionalization by diazonium salt radical method¹⁸. The following denotations GC-NH₂(d.s) and Gr-NH₂(d.s) have been used,

As clearly seen in Fig. 1, a choice of the immobilization strategy has a great influence on the biosensor responses, which depend on the used strategy for Lac attachment in the next order *strategy A > strategy B > strategy C*. This tendency is observed for MCM-41 and SBA-15 as well. Differences of the biosensor responses may be originated from the following two factors: (1) Differences in the reactivity of GA and EDC/NHS, affecting the enzyme binding. Although adding NHS to EDC improves the stability of the active intermediate formed after the activation of -COOH groups, it still exists only for a short time. Therefore, the low stability of NHS ester intermediate can lead to the time limited interaction between Lac and supports in the cases of strategies B and C. (2) Differences in the distance between the enzyme and supports. GA, contrary to carbodiimide with none molecular spacer, provides a longer spacer arm, ensuring the lower steric hindrances for Lac attachment in strategy A. Besides, GA can form oligomeric molecules (dimeric or trimeric) according to aldol condensation, which can further prolong the distance between the enzyme and the support¹⁹. In strategies B and C the distances between the immobilized Lac and supports determine only by the lengths of appropriate silanes chain.

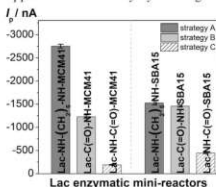


Fig. 1. Influence of three different strategies of the covalent Lac attachment on the biosensor responses. Experimental conditions: $C_{\text{dopamine}} = 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$, $E_{\text{det}} = -50 \text{ mV}$, $v_{\text{flow}} = 0.1 \text{ mL min}^{-1}$, $V_{\text{inj}} = 40 \text{ }\mu\text{L}$, CS: $[0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ AcB, pH } 4.8]$.

To the best of our knowledge, the suitability of -NH_2 functionalized carbon-based materials as the supports for the enzyme immobilization has been rarely investigated. So far, only several papers have reported about the development of the biosensors based on the covalent attachment of the different enzymes on -NH_2 functionalized carbon felt²⁰, carbon dots²¹, single and multi-walled carbon nanotubes²², and graphite²³. In this research the covalent Lac attachment on -NH_2 and -COOH functionalized carbonaceous powders through GA and EDC/NHS, respectively, has been compared. Similarly to the results obtained on mesoporous silica powders, it was found that the biosensors with Lac covalently immobilized to GA activated -NH_2 functionalized carbonaceous powders (strategy A) exhibit much higher peak current than

the biosensors with Lac bounded to EDC/NHS activated $-COOH$ functionalized supports (strategy C), as depicted in Fig. 2. Judging from the obtained data, it can be assumed that a combination of $-COOH$ anchor groups with EDC/NHS as the coupling agent is much worse for Lac immobilization (at least on studied MCM-41, SBA-15, GC, and Gr).

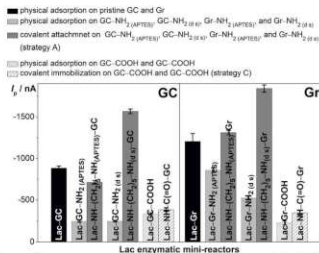


Fig. 2. Comparison of the current responses for the biosensors with different enzymatic mini-reactors based on the physically adsorbed and covalently attached Lac on carbonaceous powders (GC and Gr).

Additionally, the physical adsorption of Lac on the pristine, $-NH_2$ and $-COOH$ functionalized MCM-41, SBA-15, GC, and Gr have been investigated under the same conditions (pH of immobilization) as the covalent binding. It was found that Lac is negligibly physically adsorbed on pristine and the functionalized mesoporous silica powders; less than 10 % of the bounded enzyme during the covalent attachment procedure at pH 7.0 has been referred to spontaneously physically adsorbed Lac (the results are not shown). Meanwhile, the significant physical adsorption of Lac has been observed on carbonaceous powders, especially on the pristine Gr and GC. (Fig. 2). Based on these results, it could be supposed that Lac is preferably adsorbed on the hydrophobic surfaces. Despite the relative high biosensor responses with Lac physically adsorbed on the pristine Gr and GC, such biosensors showed the quite short lifetime due to the rapid Lac leakage.

The analytical characteristics of the developed dopamine biosensors with all enzymatic mini-reactors have been evaluated. The biosensor with Lac covalently immobilized to GA activated MCM41-NH₂ showed the best sensitivity and the limit of detection (3-SD, where SD – standard deviation of the blank) was calculated as 18.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Regarding the stability, it was found that Lac bounded to $-NH_2$ functionalized mesoporous silica powders *via* GA (strategy A) has shown the highest stability ($\geq 47.9\%$ of the initial responses after 100 measurements over 120 days), whereas Lac immobilized with strategy B on MCM41-NH₂ and SBA15-NH₂ has provided the intermediate stability ($\geq 25.5\%$). The lowest stability was obtained with Lac bounded to $-COOH$ functionalized mesoporous silica and carbonaceous powders through EDC/NHS (strategy C) ($\geq 3.2\%$). These results imply that the inactivation mechanism of the bounded Lac activity significantly depends on the used immobilization strategy.

Conclusions

In this work, the great influence of the support type, the kind of the functional support groups, and the activation method on the properties of the attached Lac has been shown. As a result, a biosensor based on enzymatic reactor fixed by Lac covalently immobilized on GA activated MCM41-NH₂ powder with TD-AgSA as a detector has been proposed as the most sensitive and stable for dopamine detection in flow injection analysis.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Grant Agency of Charles University in Prague (Project 1356120) and it was carried out within the framework of Specific Charles University Research (SVV 260560). JB and ST are thankful to the Grant Agency of the Czech Republic (Project 20-01589S) for the financial support. BJ is grateful to the Grant Agency of the Czech Republic (Project 20-07350S) for the financial support.

References

1. Sassolas A., Blum L. J., Leca-Bouvier B. D.: *Biotechnol. Adv.* **30**, 489 (2012).
2. Zucca P., Sanjust E.: *Molecules*. **19**, 14139 (2014).
3. Hanefeld U., Gardossi L., Magner E.: *Chem. Soc. Rev.* **38**, 453 (2009).
4. Fopase R., Paramasivam S., Kale P., Paramasivan B.: *J. Environ. Chem. Eng.* **8**, 104266 (2020).
5. Labus K., Turek A., Liesiene J., Bryjak J.: *Biochem. Eng. J.* **56**, 232 (2011).
6. Szalápatá K., Osińska-Jaroszuk M., Bryjak J., Jaszek M., Wilkolazka-Jarosz A.: *Braz. J. Chem. Eng.* **33** (2), 251 (2016).
7. Zynek K., Bryjak J., Szymańska K., Jarzębski A.: *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **16**, 180 (2011).
8. Tvorynska S., Barek J., Josypčuk B.: In: *Proceedings of the 15th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry"*. K. Nesměrák (ed.), Prague, Faculty of Science, Charles University 2019, p. 61–66.
9. Yosypchuk O., Barek J., Yosypchuk B.: *Electroanalysis* **24**, 2230 (2012).
10. Yosypchuk B., Barek J., Yosypchuk O.: *Electroanalysis* **23**, 2226 (2011).
11. Josypčuk B., Barek J., Josypčuk O.: *Anal. Chi. 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. Tvorynska S., Barek J., Josypčuk B.: *Electroanalysis* **31**, 1901 (2019).
16. Tvorynska S., Barek J., Josypčuk B.: *J. Electroanal. Chem.* **860**, 113883 (2020).
17. Shanmugharaj A. M., Bae J. H., Lee K. Y., Noh W. H., Lee S. H., Ryu S. H.: *Compos. Sci. Technol.* **67**, 1813 (2007).
18. Amiri A., Maghrebi M., Baniadam M., Heris S. Z.: *Appl. Surf. Sci.* **257**, 10261 (2011).
19. Migneault I., Darigueneve C., Bertrand M.J., Waldon K.C.: *BioTechniques* **37**, 790 (2004).
20. Wang Y., Hasebe Y.: *Talanta* **79**, 1135 (2009).
21. Su Y., Zhou X., Long Y., Li W.: *Microchim. Acta* **158**, 114 (2018).
22. Biloivan O.A., Rogaleva N.S., Korpan Y.I.: *Bipolym. Cell* **26** (1), 56 (2010).
23. Vaz-Dominguez C., Campuzano S., Rudiger O., Pita M., Gorbacheva M., Shleev S., Fernandez V. M., De Lacey A. L.: *Biosens. Bioelectron.* **24**, 531 (2008).

Application of Boron Doped Diamond Electrode for Voltammetric Monitoring of Quality of Phytostimulation Preparations
(Využití borem dopované diamantové elektrody při voltammetrické analýze kvality přípravků ovlivňujících růst rostlin)

Alona Usenko^a, Jaromíra Chýlková^a, Jiří Vaňha^b, Lenka Janíková^a, and Renáta Šelešová^a

^aInstitute of Environmental and Chemical Engineering, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 95, 532 10 Pardubice, Czech Republic,
E-mail: jaromira.chylikova@upce.cz

^bInstitute of Organic Chemistry and Technology, University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Studentská 95, 532 10 Pardubice, Czech Republic

Abstract

The aim of the present paper was to examine voltammetric behavior of plant stimulators employing boron doped diamond electrode. A triazine paclobutrazol, which was selected as a representative, provided one well-developed signal in an alkaline electrolytes at about +2000 mV, which could be detected owing to a wide potential window of BDDE. Simple and rapid voltammetric method was developed and it was reached low limit of quantification (LOQ = 0.15 µg mL⁻¹) and detection as well (LOD = 0.05 µg mL⁻¹). The applicability of the proposed method was verified by voltammetric analysis of phytostimulation preparation containing paclobutrazol and difenoconazol.

Key Words: Phytostimulator, Paclobutrazol, Difenconazol, Indole-3-acetic acid, Indole-3-butyric acid, 1-Naphthaleneacetic acid, Voltammetry, Boron doped diamond electrode.

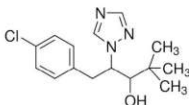
Úvod

V souvislosti s rozmachem lidské populace jsou kladeny velké nároky na produkci potravin. Důležitou úlohu v této oblasti hraje rostlinná strava. Pěstování rostlin je však spojeno s celou řadou problémů. Škodlivý vliv hmyzu, plísní a plevelných rostlin je řešen používáním pesticidů. Existují však i problémy spojené s přírodními jevy a jejich následky. Jedná se zejména o bouřky, kroupy, povodně, silný vítr, nedostatek vody atd. Je třeba, aby užitkové rostliny byly vůči těmto jevům odolné. Za tímto účelem se používají nejrůznější syntetické regulátory růstu. Tyto látky mají širokou škálu účinků. Mezi ně patří jak stimulování, tak i potlačování růstu stonků a kořenů, regulace tloušťky stonku a kvetení, zabránění opadávání listů a plodů, stimulování tvorby chloroplastu a tak dál.

Nejčastěji používanými stimulatory jsou fytohormony, mezi nimiž zaujímá významné místo kyselina indolyl-3-ocetová (IAA). Patří do skupiny auxinů, které ovlivňují především tvorbu kořenového systému při množení rostlin. Dalšími látkami s podobnými účinky jsou kyselina indolyl-3-maselná (IBA) a kyselina 1-naftyloctová (NAA), resp., její sodná sůl (NAANA)¹⁻⁷. Na českém trhu jsou dostupné například v přípravcích Stimulax I-III.

Rozsáhlým výzkumem bylo zjištěno, že účinnou ochranu rostlin proti stresovým faktorům jako je např. sucho, extrémní teplota, plynný oxid siřičitý, popřípadě plísňové infekce zajišťují látky na bázi triazolů. Jejich představitelem je např. paklobutrazol (PBZ), jehož strukturou vzorec je uveden na obr. 1. Toto pozitivní působení je často vysvětlováno hormonálními změnami. Biochemické účinky triazolů zahrnují také detoxikaci reaktivních forem kyslíku, zvýšení hladiny prolinu, antioxidantů a obsahu chlorofylu^{8,9}. Kvůli širokému použití se PBZ dostává skoro do všech složek životního prostředí. Vzhledem k tomu, že není zcela bezpečný, obzvlášť pro živočichy, jeho aplikace ve složkách životního prostředí se musí neustále sledovat.

Vzhledem k tomu, že většina látek, využívaných jako regulátory růstu rostlin, je elektroaktivní, bylo v rámci této práce studováno jejich oxidační chování a byly vyvinuty voltametrické metody jejich stanovení s využitím borem dopované diamantové elektrody (BDDE).



Obr.1. Strukturní vzorec paklobutrazolu.

Experimentální část

Standardní roztoky PBZ byly připravovány v koncentračním rozmezí od 34,8 do 41,8 mg/25mL acetonitrilu navážením příslušného množství pevné látky (Sigma-Aldrich) a rozpustěním v acetonitrilu. Podobným způsobem byl připravován standardní roztok difenokonazolu (DFK, Sigma-Aldrich). Zásobní roztok 0,1 mol L⁻¹ NaOH byl připravován rozpustěním odpovídajícího množství pevného NaOH (firma Lachema Brno o čistotě 98 %) v destilované vodě. Jako reálný vzorek byl analyzován přípravek TOPREX od firmy Syngenta Czech s.r.o., obsahující podle údajů distributora 11,3 % PBZ a 22,5 % DFK. 0,5 mL přípravku TOPREX bylo nadávkováno do 50mL odměrné baňky a doplněno po rysku acetonitrilem.

K voltametrickému měření byl použit elektrochemický analyzátor EP 100VA (HSC servis Bratislava, Slovensko). Měřící článek se skládal z BDDE (Windsor Scientific Ltd., Velká Británie), referenční argentchloridové elektrody a pomocné platinové elektrody (obě Monokrystaly, Turnov, Česká republika). Stanovení testovaných látek probíhalo pomocí elektrochemické oxidace s využitím diferenční pulzní voltametrie (DPV). Pracovní elektroda byla před každým měřením ošetřena vložení potenciálu +2200 mV, -200 mV a +2200 mV vždy po dobu 10 sekund. Při vlastní analýze byla polarizována v rozsahu potenciálů +1200 až +2200 mV při rychlosti polarizace 40 mV s⁻¹.

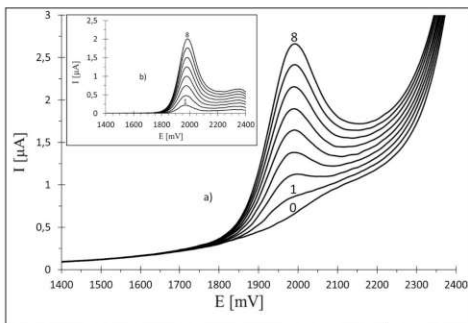
Výsledky a diskuse

Předmětem této práce bylo studium voltametrického chování vybraných regulátorů růstu, konkrétně IAA, IBA, NAA a triazolů PBZ a DFK. Bylo zjištěno, že všechny zkoumané látky poskytují oxidační signál vhodný k analytickým účelům. Protože byl tento signál zaznamenán často při značně pozitivních potenciálech, byla pro vývoj metod jejich stanovení použita BDDE. S využitím cyklické voltametrie (CV) a DPV byl testován vliv pH prostředí a složení základního elektrolytu na polohu, tvar a výšku piků. Na základě těchto experimentů byl zvolen vhodný základní elektrolyt. U látek, jejichž voltametrické chování nebylo doposud popsáno v literatuře, byl navržen mechanismus oxidace, který byl potvrzen analýzou oxidačních produktů metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC-MS). Pro stanovení jednotlivých látek byla vzhledem k citlivosti používána DPV. Byly optimalizovány jak parametry této metody, tak podmínky případné předúpravy nebo regenerace povrchu pracovní elektrody. Vyvinuté metody byly ověřeny při analýze celé řady modelových roztoků a na závěr byly úspěšně aplikovány při analýze praktických vzorků komerčně dostupných přípravků pro regulaci růstu rostlin.

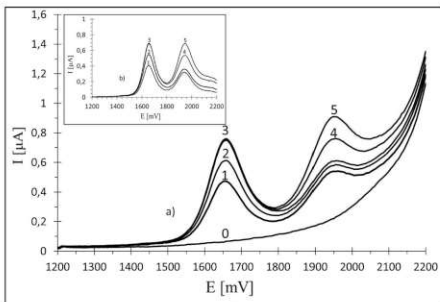
Jako příklad jsou na tomto místě uvedeny výsledky studie, týkající se PBZ. Ten lze oxidovat v alkalickém prostředí zředěného NaOH za přítomnosti acetonitrilu, který zajišťuje rozpustnost analytu. PBZ dává dobře vyhodnotitelný pík v širokém rozmezí koncentrací, jehož poloha v závislosti na množství analytu leží těsně pod +2000 mV. Tyto hodnoty potenciálu jsou dosažitelné právě díky použité BDDE. Pomocí cyklické voltametrie bylo zjištěno, že se jedná o ireverzibilní děj.

Pro analytické účely je důležité, že výška oxidačních piků je lineárně závislá na koncentraci PBZ v roztoku, což dokumentuje obr. 2, který znázorňuje jak původní naměřené křivky, tak piky po odečtení záznamu základního elektrolytu. Byla proměřena celá řada koncentračních závislostí při nastavených optimálních podmínkách a na základě těchto měření byly vypočteny základní statistické parametry, např. limit detekce pro stanovení PBZ ($LOD = 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Vzhledem k tomu, že součástí jediného dostupného přípravku v ČR obsahujícího PBZ (TOPREX) je jako doprovodná složka přítomen DFK, a to ve významném množství, bylo třeba se zaměřit také na voltametriickou analýzu této látky. Bylo zjištěno, že za podmínek stanovení PBZ, podléhá DFK také oxidaci, přičemž pík se nachází při potenciálech cca +1550 až +1780 mV. Nedochází tedy k interferenci zkoumaných látek, což dokládá obr. 3, znázorňující křivky získané při analýze reálného přípravku TOPREX. Kvantitativním vyhodnocením pomocí přidávků standardů bylo zjištěno, že obsah obou látek odpovídá deklarovaným hodnotám.



Obr. 2. Křivky anodické oxidace paklobutrazolu v prostředí $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH; a) – původní naměřené piky, b) – piky po odečtení odezvy základního elektrolytu (0 – odezva základního elektrolytu, 1 až 8 – přidávky paklobutrazolu)



Obr. 3. Křivky anodické oxidace přípravku TOPREX; a) – původní naměřené píky, b) – píky po odečtení odezvy základního elektrolytu (0 – odezva základního elektrolytu, 1 – přidavek vzorku TOPREXu, 2 a 3 – přidavky standardního roztoku DFK, 4 a 5 – standardní přidavky PBZ)

Závěr

Díky širokému potenciálovému oknu BDDE bylo možné vyvinout citlivé metody pro stanovení celé řady rostlinných stimulatorů růstu na principu jejich anodické oxidace. Tyto metody jsou jednoduché a rychlé, a proto mohou být využity při kontrole složení komerčně dostupných přípravků.

Acknowledgments

Tato práce byla financována z prostředků Grantové agentury České republiky (projekt č. 20-01589S).

References

1. Thimann K. V. v knize: *Plant Physiology: A Treatise* (Steward F. C., ed.), sv. VIB, kap. 5. Academic Press, New York, (1972).
2. Schreiber K., Hütte H. R., Sembdner G. (Eds.): *Biochemistry and Chemistry of Plant Growth Regulators*. Proc. Int. Symposium, Halle (1974).
3. Kutina J.: *Regulátory růstu a jejich využití v zemědělství a zahradnictví*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha (1977).
4. Epstein E., Lavee S.: *Plant. Cell. Physiol.* 25, 697 (1984).
5. Ludwig-Müller J.: *Plant. Growth Reg.* 32, 219 (2000).
6. Woodward A. W., Bartel B.: *Ann. Bot.* 95, 707 (2005).
7. Simon S., Petrášek, J.: *Plant. Sci.* 180, 454 (2011).
8. Procházka S., Macházková I., Krekule J., Šebánek J.: *K. Fyziologie rostlin*. Praha: Akademie věd České republiky, (1998).
9. Rademacher W.: *Growth Retardants: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways*. (2000).

Electroplating of 3D Printed Electrodes for Selective Electrochemical Reduction of CO₂

Eva Vaněčková^a, Milan Bouša^a, Violetta Shestivska^a, Jiří Kubišta^a, Jiří Rathouský^a, Táňa Sebechlebská^{a,b}, and Viliam Kolivoška^a

^aJ. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences,

Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: viliam.kolivoška@jh-inst.cas.cz

^bDepartment of Physical and Theoretical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská Dolina, Ilkovičova 6, 84215 Bratislava 4, Slovakia

Abstract

In this work, computer assisted design and fused deposition modelling 3D printing are employed to devise and manufacture electrodes from polylactic acid-carbon nanotube conductive composite. Electrodes are further modified by copper electroplating to prepare catalysts for the electrochemical reduction of carbon dioxide. Scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray analysis are used to inspect the surface morphology and chemical composition of obtained catalysts. Cyclic voltammetric investigations reveal that the copper electroplating leads to the increase of electrode activity by three orders of magnitude.

Key Words: 3D Printing, Electrochemical Reduction of Carbon Dioxide, Electroplating.

Introduction

The second half of the recent decade has seen an unprecedented boom in applying 3D printing (3DP) manufacturing technologies in science. In 3DP, objects are created by positioning a target material on previously formed layers. Combination of 3DP with computer assisted design (CAD) allows fast, inexpensive, safe and environmentally friendly manufacture of customized objects. Fused deposition modelling (FDM) is the most common and versatile 3DP technique based on extruding a thermoplastic filament through a heated moving nozzle. Low cost and wide availability of FDM 3D printers render this technique particularly suitable for the construction of electrochemical cells. Used filament materials involve polylactic acid (PLA)¹⁻⁷, acrylonitrile butadiene styrene⁸⁻¹⁴, polypropylene^{15,16}, polyesters¹⁷, polystyrene¹⁸ and polyamide^{19,20}. The functionality of 3DP electrochemical cells was demonstrated for various processes and applications including water splitting^{15,21}, wastewater cleaning¹, organic electrosynthesis^{2,3,16} or enzymatic biofuel cells⁸. Furthermore, 3DP cells found applications as electroanalytical sensors for the determination of heavy metal ions^{4,5,18}, hydrogen peroxide⁹, organic compounds^{5-7,10-12} and tumor markers¹⁷.

Recent achievements in the preparation of thermoplastic composite materials containing carbon allotropes have allowed FDM 3DP to be used as a tool for the manufacture of conductive electrodes. Pioneering work of Rymanis et al.¹⁸ showed that electrodes printed from the polystyrene/graphite/carbon nanofiber composite filament may be used to determine Pb²⁺ ions by differential pulse voltammetry. More recent works relied on commercial composites of PLA with graphene^{6,12-14}, carbon black^{4,5,22}, carbon nanotubes²³ and metals including copper²⁴ as conductive fillers. Bi-material FDM 3DP employing conductive composites to make electrodes and insulating filaments for cells led to integrated electrochemical devices for electroanalysis^{4-7,11,12,18} and Raman¹³ and UV/VIS¹⁴ spectroelectrochemistry.

In this work we employ bi-material FDM 3DP to manufacture an integrated platform dedicated to copper electroplating with the goal of preparing catalysts for the electrochemical reduction of carbon dioxide. Electrodes are printed from conductive polylactic acid-carbon nanotube (PLA-CNT) composite and electroplated by copper as described in our recent contribution²⁴.

The electroplating cell is manufactured from the insulating PLA. The electrochemical activity of manufactured electrodes is investigated by cyclic voltammetry in aqueous electrolytes.

Experimental part

Cells and electrodes were devised employing Autodesk Fusion 360 CAD software (Autodesk Inc., USA) and subsequently exported as stl files to Prusa Slicer software (Prusa Research, Czech Republic), where instructions for the 3D printer were generated. The electroplating cell (depicted by blue colour in Fig. 1) has a rectangular shape and interior. Its internal length is 0.20 m, defining the distance between the cathode and the anode. The internal cross-sectional area of the cell is identical to the geometrical area of electrodes ($6.4 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2$). Electrodes (black) are equipped by insulating housings (white). The cell additionally contains a hole in the middle of its top part, through which the electroplating solution is introduced.

The electroplating cell and housings were manufactured from transparent insulating PLA purchased from Gembird, The Netherlands. The PLA-CNT conductive composite (brand name AlfaOhm) employed to print electrodes was purchased from FiloAlfa, Italy. All objects were manufactured employing a Prusa I3 MK3 FDM 3D printer equipped with a 0.4 mm brass nozzle and a smooth polyimide-coated spring steel sheet as the printing support (all items were obtained from Prusa Research, Czech Republic). The temperature of the nozzle and the printing support was kept at 225 and 60 °C, respectively. The layer height was set to 0.1 mm. The printing speed was set as default for PLA filaments. The cell was printed with 20 % rectangular infill, while 100 % rectangular infill was applied to electrodes and housings.

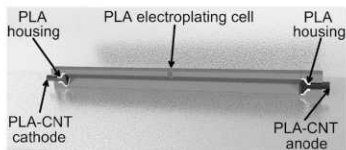


Fig. 1. CAD cross-sectional drawing of the 3DP platform for copper electroplating.

Sides of electrodes were masked by a 0.2 mm thick PTFE tape and such modified electrodes were mounted into housings. Two of such assemblies were placed into the electroplating cell to serve as the cathode and the anode. The cell was further filled with the electroplating solution (0.1 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ in deionized water). Electrochemical impedance spectroscopy (Autolab, Metrohm) performed in the frequency range of 10^5 and 10^{-1} Hz, at zero DC offset and 10 mV rms AC amplitude was employed to determine the total cell resistance. The electroplating was performed as follows. The cell was connected to a DC source (Aritma, Czech Republic) and the voltage U_0 of 4.0 V was applied for one hour while continuously monitoring the electric current by a multimeter (Amprobe 5XP-A). The cathode was then demounted from the cell, briefly rinsed with deionized water and dried in the air while the anode was discarded. The surface of as-printed and electroplated electrodes was investigated by field emission scanning electron microscopy (Hitachi S-4800) and energy dispersive X-ray analysis (Noran EDX system). Electrochemical performance of as-printed and electroplated electrodes was inspected by cyclic voltammetry in aqueous 0.1 M NaHCO_3 electrolyte saturated either by CO_2 or Ar (for control experiments). All experiments were performed in a three-electrode two-compartment glass cell with Ag/AgCl reference electrode and platinum net counter electrode placed behind

a Nafion membrane. The cell resistance was compensated by positive feedback electronics. Electrode potential values are stated in the reversible hydrogen electrode (RHE) scale.

Results and discussion

The total resistance of the electroplating cell is in the range of $2000 \pm 200 \Omega$ while the electric current passing during electroplating amounts to 1.0 ± 0.1 mA and is constant in time. The effective cell voltage applied in electroplating is thus $U = U_0 - IR = 2.0$ V. Experimentally obtained current was compared to theoretically predicted figure determined as follows. The ionic-strength corrected electric conductivity of aqueous 0.1 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ electrolyte at 298 K amounts to 1.66 S m^{-1} ²⁵. For values of the effective voltage and the cell length (0.20 m) one obtains the electric field strength of 10 V m^{-1} . For the electrode area used ($6.4 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2$) the application of Ohm's law leads to the theoretical electrolyte migration current of 1.06 mA. This value is in a perfect agreement with current observed during electroplating (1.0 ± 0.1 mA) indicating that currents due to parasitic cathodic processes (reduction of H^+ or dissolved ambient oxygen) are negligible compared to that of the copper reduction process.

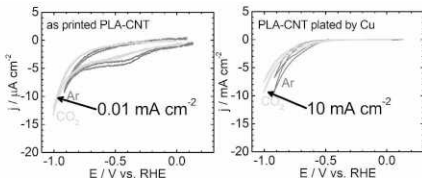
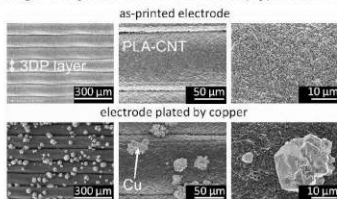


Fig. 2. Cyclic voltammetric response of as-printed PLA-CNT electrodes (left) and the same electrodes modified by copper electroplating (right) in aqueous 0.1 M NaHCO_3 saturated by argon (red) and carbon dioxide (green). Obtained at 0.01 V s^{-1} .

Left panel of Fig. 2 shows the cyclic voltammetric response of as-printed PLA-CNT electrodes in the aqueous 0.1 M NaHCO_3 saturated by argon (red) and carbon dioxide (green). For both dissolved gases, the double-layer capacitance region is limited by the onset of the reduction processes around -1.0 V vs. RHE. In the absence of carbon dioxide, H^+ ions (or water) are reduced at the electrode. In the presence of CO_2 , this process is accompanied by the reduction of CO_2 . Upon introducing CO_2 , the observed onset of reduction processes is shifted towards more negative potential values. Most likely, a part of electrochemically active surface sites originally available for the H^+ reduction is blocked by CO_2 or products of its reduction. This decreases the rate of the H^+ reduction manifesting itself as diminished total cathodic current. We note that the use of RHE scale takes into account changes in the pH value of the electrolyte bulk. Observed changes of the electrode activity thus cannot be rationalized by an altered concentration of protons in the electrolyte bulk. Right panel of Fig. 2 shows the response of electrodes modified by the copper electroplating obtained under the same conditions as used for as-printed electrodes. The presence of copper on the electrode surface leads to an increase of the faradaic current by three orders of magnitude. This confirms that copper functions as a catalyst for H^+ and CO_2 reduction processes.

SEM imaging of as-printed PLA-CNT electrodes confirmed evenly spaced layers (Fig. 3, top). EDX analysis revealed that the surface of as-printed electrodes is composed exclusively of carbon and oxygen (Table I). The copper electroplating of these electrodes leads to surface clusters with the diameter ranging from 20 to 50 μm (Fig. 3, bottom) and remarkably high copper content (97 ± 1 at. %). Bare surface regions of electroplated electrodes contain no copper and their composition is virtually identical to that of as-printed PLA-CNT electrodes (Table I). Fig. 3. SEM images of as-printed PLA-CNT electrodes (top) and the same electrodes modified



by copper electroplating (bottom) at gradually increasing resolution (left to right).

Table I. Surface elemental composition of as-printed and electroplated PLA-CNT electrodes.

Sample/Element	C / at. %	O / at. %	Cu / at. %
as-printed electrode	78 ± 1	21 ± 1	0
electroplated electrode (bare region)	84 ± 1	16 ± 1	0
electroplated electrode (clusters)	0	4 ± 1	97 ± 1

Conclusions

PLA-CNT electrodes manufactured by FDM 3DP were modified by copper electroplating to prepare catalysts for the electrochemical reduction of carbon dioxide. SEM and EDX surface analysis confirmed the presence of clusters with remarkably high copper content. Cyclic voltammetry performed in aqueous electrolytes concluded that the copper electroplating leads to the increase of the electrode activity by three orders of magnitude. We are currently analyzing the distribution of products of the electrochemical reduction of carbon dioxide.

Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation (No. 18-09848S). The authors further acknowledge the support of the Research Infrastructure NanoEnvicZ provided by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (No. LM2018124) and Slovak Research and Development Agency (No. APVV18-0075).

References

1. Mousset E., Weiqi V.H., Kai B.F.Y., Koh J.S., Tng J.W., Wang Z.X., Lefebvre O.: *J. Mater. Chem. A*, 5, 24951 (2017).
2. Lozano I., Lopez C., Menendez N., Casillas N., Herrasti P.: *J. Electrochem. Soc.*, 165, H688 (2018).
3. Guima K.E., Alencar L.M., da Silva G.C., Trindade M.A.G., Martins C.A.: *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 6, 1202 (2018).

4. Katseli V., Thomaidis N., Economou A., Kokkinos C.: *Sensor. Actuator. B-Chem.*, *308*, 127715 (2020).
5. Katseli V., Economou A., Kokkinos C.: *Electrochem. Commun.*, *105*, 100 (2019).
6. O'Neil G.D., Ahmed S., Halloran K., Janus J.N., Rodriguez A., Rodriguez I.M.T.: *Electrochem. Commun.*, *99*, 56 (2019).
7. Katseli V., Economou A., Kokkinos C.: *Talanta*, *208*, 120388 (2020).
8. Rewatkar P., Bandapati M., Goel S.: *Int. J. Hydrogen Energy*, *44*, 31434 (2019).
9. Bishop G.W., Satterwhite J.E., Bhakta S., Kadimisetty K., Gillette K.M., Chen E., Rusling J.F.: *Anal. Chem.*, *87*, 5437 (2015).
10. Dias A.A., Cardoso T.M.G., Cardoso R.M., Duarte L.C., Munoz R.A.A., Richter E.M., Coltro W.K.T.: *Sensor. Actuator. B-Chem.*, *226*, 196 (2016).
11. Richter E.M., Rocha D.P., Cardoso R.M., Keefe E.M., Foster C.W., Munoz R.A.A., Banks C.E.: *Anal. Chem.*, *91*, 12844 (2019).
12. Cardoso R.M., Mendonça D.M., Silva W.P., Silva M.N., Nossol E., da Silva R.A., Richter E.M., Muñoz R.A.: *Anal. Chim. Acta*, *1033*, 49 (2018).
13. dos Santos M.F., Katic V., dos Santos P.L., Pires B.M., Formiga A.L.B., Bonacin J.A.: *Anal. Chem.*, *91*, 10386 (2019).
14. Wirth D.M., Sheaff M.J., Waldman J.V., Symcox M.P., Whitehead H.D., Sharp J.D., Doerfler J.R., Lamar A.A., LeBlanc G.: *Anal. Chem.*, *91*, 5553 (2019).
15. Chisholm G., Kitson P.J., Kirkaldy N.D., Bloor L.G., Cronin L.: *Energ. Environ. Sci.*, *7*, 3026 (2014).
16. Lowe S.E., Shi G., Zhang Y.B., Qin J.D., Wang S.J., Uijtendaal A., Sun J.Q., Jiang L.X., Jiang S.Y., Qi D.C., Al-Mamun M., Liu P.R., Zhong Y.L., Zhao H.J.: *ACS Appl. Nano Mater.*, *2*, 867 (2019).
17. Damiati S., Kupcu S., Peacock M., Eilenberger C., Zamzami M., Qadri I., Choudhry H., Sleytr U.B., Schuster B.: *Biosensors & Bioelectronics*, *94*, 500 (2017).
18. Rymansab Z., Irvani P., Emslie E., Medvidovic-Kosanovic M., Sak-Bosnar M., Verdejo R., Marken F.: *Electroanalysis*, *28*, 1517 (2016).
19. Poltorak L., Rudnicki K., Kolivoška V., Sebechlebská T., Krzyczmonik P., Skrzypek S.: *J. Hazard. Mater.*, *402*, 123411 (2021).
19. Giorgini Escobar J., Vaněčková E., Nováková Lachmanová Š., Vivaldi F., Heyda J., Kubišta J., Shestivska V., Španěl P., Schwarzová-Pecková K., Rathouský J., Sebechlebská T., Kolivoška V.: *Electrochim. Acta*, <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136984>.
20. Hughes J.P., dos Santos P.L., Down M.P., Foster C.W., Bonacin J.A., Keefe E.M., Rowley-Neale S.J., Banks C.E.: *Sustain. Energy Fuels*, *4*, 302 (2020).
21. Vaneckova E., Bousa M., Novakova Lachmanova S., Rathousky J., Gal M., Sebechlebska T., Kolivoska V.: *J. Electroanal. Chem.*, *857*, 113745 (2020).
22. Vaneckova E., Bousa M., Vivaldi F., Gal M., Rathousky J., Kolivoska V., Sebechlebska T.: *J. Electroanal. Chem.*, *857*, 113760 (2020).
23. Vaneckova E., Bousa M., Sokolova R., Moreno-Garcia P., Broekmann P., Shestivska V., Rathousky J., Gal M., Sebechlebska T., Kolivoska V.: *J. Electroanal. Chem.*, *858*, 113763 (2020).
24. performed in PeakMaster 5.4, download at <https://web.natur.cuni.cz/gas/peakmaster.html>

Theoretical Interpretation of Single Molecule Conductance and Thermopower of Selected Model Molecules
(Teoretická interpretácia molekulárnej vodivosti a Seebeckovho koeficientu u vybraných modelových molekúl)

František Vavrek ^a, Jakub Šebera ^{ab}, Olena Butsyk ^{ac}, Viliam Kolivoška ^a,
Gábor Mészáros ^d, and Magdaléna Hromadová ^a

^aJ. 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

^bInstitute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences,
Flemingovo náměstí 2, 160 00 Prague 6, Czech Republic

^cInstitute of Physics of the Czech Academy of Sciences, Na Slovance 2, 182 21 Prague 8,
Czech Republic

^dInstitute of Materials and Environmental Chemistry, Research Center for Natural Sciences,
Hungarian Academy of Sciences, Magyar tudósok körútja 2, 1117 Budapest, Hungary

Abstract

This contribution presents a comparison between values of single molecule conductance and thermopower of selected model organic molecules arising from density functional theory-based calculations, and the ones obtained by experiment. By applying the non-equilibrium Green's function approach along with further specified modifications and approximations, the computed values were compared with those gained from the scanning tunneling microscope-based break junction technique and its setup modified for simultaneous measurement of both stated quantities. This outcome presents quantitative and qualitative comparison with experimentally obtained values, along with the discussion about the relevance and accuracy of the chosen theoretical approach.

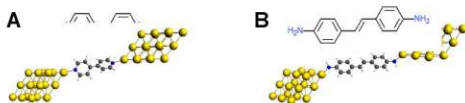
Key Words: Single molecule conductance, Single molecule thermopower, Scanning tunneling microscope break junction technique (STM-BJ), Density functional theory (DFT), non-equilibrium Green's function (NEGF).

Úvod

Molekulárna elektronika predstavuje jeden zo súčasných alternatívnych smerov vo vývoji a koncepcii výroby elektronických súčiastok používaných v modernej výpočtovej technike. Značná miera pozornosti je venovaná najmä podoblasti organickej elektroniky, ktorá sa v danom výskume zameriava na potenciálne využitie organických molekúl s vhodnými elektrickými vlastnosťami. V uplynulých dvoch desaťročiach bola tejto výskunnej podoblasti venovaná značná pozornosť, najmä čo sa týka teoretických prác zameraných na štúdium orbitálvej štruktúry vybraných druhov a skupín molekúl a z nich plynúce mechanizmy presunu elektrického náboja v rámci tela molekuly i nábojového transportu skrz molekulu ¹. Následne experimentálne štúdie sústredili svoju pozornosť na štúdium fyzikálnych veličín jednotlivých druhov molekúl, najmä molekulárnej elektrickej vodivosti G ^{2,3} a Seebeckovho koeficientu S ³ s cieľom potvrdiť alebo vyvrátiť publikované teoretické závery. Štúdiom týchto dvoch veličín v kombinácii s teoretickým modelovaním je v súčasnej dobe najpokročilejšou formou skúmania elektrických vlastností (nielen) organických molekúl.

Cieľom tejto práce je prezentovať výsledky teoretických výpočtov so zameraním na hodnoty fyzikálnych veličín G a S u vybraných organických molekúl získaných prostredníctvom výpočtových metód založených na DFT a NEGF a porovnať ich s hodnotami týchto veličín získanými experimentálne. Vo výsledkoch je tiež dodatočne doplnená analýza geometrie

molekulového spojenia. Vybranými vzorkami boli modelové organické molekuly 4,4'-bipyridínu (A) a 4,4'-diaminostilbenu (B) (Obr. 1), ktoré boli predmetom predchádzajúcej autorskej štúdie ⁴.



Obr. 1. Chemická štruktúra molekúl 4,4'-bipyridínu (A) a 4,4'-diaminostilbenu (B) spolu s analyzovanou geometriou molekulového spojenia za použitia dvojice (111) klastrov Au₁₈.

Experimentálna časť

Experimentálne merania boli vykonané pomocou STM-BJ techniky merania ⁵ na aparatúre tvorenej modifikovaným prístrojom Agilent 5500 SPM (Agilent Technologies, USA). Do skenovacej hlavy prístroja bol implementovaný dvojitý bipolárny logaritmický I-U prevodník ⁶ umožňujúci rýchle a presné monitorovanie vzdialenosti medzi hrotom a substrátom, ako aj meranie elektrického prúdu *I* pri vývoji molekulového spojenia v širokom prúdovom rozsahu. Pohyb pracovnej elektródy, ako aj nastavenie a monitorovanie hodnôt elektrického potenciálu na elektródach boli ovládané pomocou bipotenciostatu s dvojicou laditeľných bipolárnych I-U prevodníkov ⁶. Daný bipotenciostat je schopný pracovať jak v režime kontinuálneho stabilného zdroja napätia, tak i v režime rýchleho prepínania (rádovo stovky μs až jednotky ms) medzi stavom uzavretého obvodu s priloženým napätím (ON) a obvodu s odpojeným zdrojom napätia (OFF). V stave ON je prítomnosť molekuly medzi elektródami reprezentovaná hodnotou elektrického prúdu, ktorá je nositeľom informácie o elektrickej vodivosti *G* molekuly podľa vzťahu plynúceho z Ohmovho zákona $I = G \times V_{bias}$, kde V_{bias} predstavuje hodnotu potenciálového rozdielu medzi elektródami. V stave OFF je zdroj napätia odpojený a detegovaná hodnota reziduálneho napätia v obvode odpoďadá termoelektrickému napätiu generovanému molekulou, ako dôsledok rozdielu prevádzkových teplôt pripojených elektród. Hodnota termoelektrického napätia V_{th} určuje Seebeckov koeficient *S* molekuly podľa vzťahu ⁷

$$S = S_{Au} - \frac{V_{th}}{\Delta T}$$

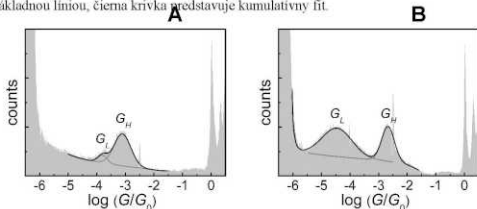
kde $S_{Au} = 1,94 \times 10^{-6} \text{ V K}^{-1}$ je Seebeckov koeficient zlata ⁸ a ΔT je teplotný rozdiel medzi pracovnou elektródou a protielektródou. Ako pracovná elektróda bol použitý zlatý elektrochemicky leptaný hrot vyrobený z drôtu s priemerom 0,25 mm (99,999 %, Goodfellow, Veľká Británia), protielektródu tvoril substrát tvorený podložkou z polykrystalického zlata ($10 \times 10 \times 1 \text{ mm}$, 99,95 %, Goodfellow, Veľká Británia) s prítaveným zlatým drôtom, na ktorej bola nanesená vzorka. Na dosiahnutie požadovaného rozdielu teplôt bola aparatúra doplnená o systém umožňujúci prietok ohrevnej/chladiacej kvapaliny cez podložku umiestnenú pod substrátom. Pracovná elektróda bola udržiavaná na izbovej teplote, ktorá bola sotožnená s teplotou vo vnútri experimentálnej aparatúry. Chemikálie na prípravu vzoriek, ako i procedúry čistenia laboratórneho skla, zlatého substrátu, PTFE meracích ciel vlastnej výroby a tesniacich O-krúžkov Kalrez (Dupont, USA) používaných počas experimentálnych meraní boli podrobne opísané v predchádzajúcej autorskej štúdií ⁴.

Theoretické hodnoty elektrických vodivostí a Seebeckových koeficientov vybraných molekúl **A** a **B** boli vypočítané pomocou kombinácie metód DFT a NEGF. Geometrická optimalizácia neukotvených molekúl vo vákuu bola prevedená s použitím funkcionálu B3LYP⁹. Optimálna vzdialenosť elektród v molekulovom spojení, reprezentovaných dvoma klastrami Au₁₈ s kryštalografickou orientáciou (111) (Obr. 1), bola určená z potenciálovej krivky vytvorenej variováním vzdialenosti klastrów s krokom 0,1 Å a optimalizovaním molekuly medzi týmito klastrami v každom kroku potenciáloveho skenu. Geometrické optimalizácie boli prevedené v softvéri Gaussian 09. Energetické minimá získané optimalizačným algoritmom sa použili na výpočet transmisných funkcií pomocou NEGF metódy a funkcionálu PBE0, ktorý je v literatúre odporúčaný ako optimálny pre tento typ výpočtu¹⁰. Výpočty typu PBE0/NEGF boli prevedené pomocou softvéru ADF 2017. Hodnoty elektrických vodivostí G pre obe molekuly boli vypočítané v priblížení nulového rozdielu napätia medzi elektródami na základe Landauerovej rovnice¹¹ $G = G_0 \times \pi(E_F)$, kde veličina $G_0 = 7,75 \times 10^{-5}$ S je kvantum elektrickej vodivosti a $\pi(E_F)$ ^{12,13} je hodnota transmisnej funkcie pri hodnote energie Fermiho hladiny $E_F = -5,1$ eV¹⁴. Hodnoty uvedené vo výsledkovej časti predstavujú priemernú hodnotu z energetického intervalu $-5,2$ až $-5,0$ eV. Hodnoty Seebeckových koeficientov boli vypočítané na základe rovnice¹⁵

$$S(E_F) = -\frac{1}{3e} \pi^2 k_B^2 T \left. \frac{\partial \ln \pi(E)}{\partial E} \right|_{E=E_F} \quad (1)$$

kde e je elementárny náboj, k_B je Boltzmannova konštanta a T je teplota určená priemerom teplôt oboch elektród. Hodnota derivácie transmisnej funkcie bola numericky derivovaná a priemerovaná na energetickom intervale $-5,2$ až $-5,0$ eV.

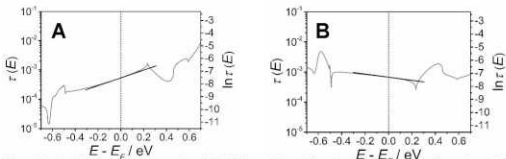
Obr. 2. ID histogramy elektrických vodivostí molekuly **A** (vľavo) a **B** (vpravo). Tmavošedé krivky v jednotlivých grafoch reprezentujú fity píków Gaussovou funkciou s nekonštantnou základnou líniou, čierna krivka predstavuje kumulatívny fit.



Výsledky a diskusia

Na Obr. 2 sú znázornené ID histogramy elektrickej vodivosti G pre obe skúmané molekuly, získané z dát nameraných kontinuálnou STM-BJ metódou. U oboch molekúl boli identifikované dva štatisticky významné píky. Tie boli následne podrobené analýze fitovaním Gaussovou funkciou s nekonštantnou základnou líniou. Označenie G_H resp. G_L odkazuje na vyššiu (*high*) resp. nižšiu (*low*) strednú hodnotu vodivosti daných píków. Zatiaľ čo u molekuly **A** sú obe hodnoty vodivosti G_H , G_L v odbornej literatúre dobre zdokumentované¹⁶, v prípade molekuly **B** zatiaľ nebola publikovaná žiadna vedecká práca alebo štúdia, ktorá by referovala o dvoch štatisticky významných hodnotách vodivosti. Hodnoty vodivosti

v jednotkách $\log(G/G_0)$ boli $G_H(\mathbf{A}) = -3,1 \pm 0,3$; $G_L(\mathbf{A}) = -3,8 \pm 0,2$; $G_H(\mathbf{B}) = -2,7 \pm 0,2$ a $G_L(\mathbf{B}) = -4,5 \pm 0,5$. Odčítaním hodnoty transmisnej funkcie $\tau(E_F)$ pre príslušnú molekulu z grafov na Obr. 3 a použitím Landauerovej rovnice sme dospeli k optimalizovaným teoretickým hodnotám vodivosti, konkrétne $G^*(\mathbf{A}) = -3,3$ resp. $G^*(\mathbf{B}) = -3,2$. Zatiaľ čo teoretická hodnota $G^*(\mathbf{A})$ je v rámci tolerancie v dobrej zhode s experimentálnou hodnotou $G_H(\mathbf{A})$, aplikujúc túto analógiu na molekulu **B** je hodnota $G^*(\mathbf{B})$ vzhľadom na hodnotu $G_H(\mathbf{B})$ mierne podhodnotená.



Obr. 3. Grafy hodnôt transmisnej funkcie $\tau(E)$ a jej prirodzeného logaritmu $\ln \tau(E)$ pre molekulu **A** (vľavo) a **B** (vpravo), získané z výpočtov metódy NEGF s využitím funkcionálu PBE0. Kvôli lepšej názornosti sú zobrazené iba segmenty funkcií v okolí Fermiho hladiny. Čierne línie znázorňujú dotyčnice ku grafom v bode $E = E_F$.

Analýzou experimentálnych dát z Obr. 2 v podobe 2D histogramu vodivostných kriviek¹⁹ sme získali experimentálny údaj o dĺžke Z molekulového spojenia pre obe konfigurácie vodivosti. S ohľadom na značenie použité v predšom odstavci, získané hodnoty dĺžok boli $Z_H(\mathbf{A}) = 7,4$ Å; $Z_L(\mathbf{A}) = 9,2$ Å; $Z_H(\mathbf{B}) = 10,4$ Å a $Z_L(\mathbf{B}) = 15,4$ Å. Metódou geometrickej optimalizácie s využitím funkcionálu B3LYP sme dospeli k hodnotám dĺžok $Z^*(\mathbf{A}) = 9,1$ Å a $Z^*(\mathbf{B}) = 12,9$ Å. Aj v tomto prípade hodnoty predpovedané teoretickým modelom lepšie korelujú s experimentálnymi hodnotami pre molekulu **A** resp. pre hodnotu $Z_L(\mathbf{A})$, ktorá sa v literatúre stotožňuje s geometriou molekulového spojenia, v ktorom je molekula **A** kotvená medzi elektrónmi atómami dusíka na pyridylových jadrách (Obr. 1) a hodnota dĺžky tohto spojenia sa stotožňuje s dĺžkou molekuly **A**^{16,17}.

Odčítaním hodnoty parciálnej derivácie $\partial(\ln \tau(E))/\partial E$ v bode $E = E_F$ a aplikáciou rovnice (1) sme pre štandardnú hodnotu $T = 300$ K dospeli k optimalizovaným teoretickým hodnotám Seebeckovho koeficientu, konkrétne $S^*(\mathbf{A}) = -2,3 \times 10^{-5}$ V K⁻¹ a $S^*(\mathbf{B}) = 8,2 \times 10^{-6}$ V K⁻¹. Na základe porovnania so strednými hodnotami uvádzanými v literatúre^{3,16,18} ako aj v predchádzajúcej autorskej štúdií⁴ konštatujeme kvalitatívnu zhodu s ohľadom na hodnotu znamienka teoretických hodnôt, avšak z hľadiska magnitudy sú obe teoretické hodnoty viditeľne odchylené: hodnota $S^*(\mathbf{A})$ je značne nadhodnotená a hodnota $S^*(\mathbf{B})$ podhodnotená, pričom sa relatívne odchyľky menia v rozsahu cca 170–240 % pre molekulu **A** a cca 35–45 % pre molekulu **B**. Odchyľky spomínaných predpovedaných teoretických hodnôt (nielen u Seebeckovho koeficientu, ale aj u elektrickej vodivosti a dĺžky molekulového spoja) od publikovaných experimentálnych výsledkov u všetkých uvedených analyzovaných veličín možno prisudzovať použitým obmedzujúcim podmienkam, ako napr. rigidite uvažovaných molekulárnych štruktúr pri modelovaní, obmedzeným variačným podmienkam vo výpočtoch a z toho plynúcej nepresnosti a nízkej variabilite získaných teoretických hodnôt. Najmä v prípade molekuly **B** je vzhľadom na centrálnu dvojitú väzbu CH=CH v jej molekulárnej štruktúre (Obr. 1) nepochybne žiaduce uvažovať nad vplyvom cis-trans izomerie, ako aj určitú molekulárnu pružnosť. Tieto, ale aj iné aspekty majú určitý nezanedbateľný vplyv na hodnoty analyzovaných veličín, avšak v tejto práci neboli uvažované.

Záver

Cieľom tejto práce bolo porovnanie experimentálnych hodnôt veličín elektrickej vodivosti G , Seebeckovho koeficientu S a dĺžky Z molekulového spojenia u modelových organických molekúl 4,4'-bipyridínu (**A**) a 4,4'-diaminostilbénu (**B**) s teoretickými hodnotami predpovedanými na základe výpočtovej analýzy použitím metód DFT a NEGF. V prípade molekuly **A** bola pozorovaná dobrá zhoda teórie s experimentom s výnimkou teoretickej hodnoty Seebeckovho koeficientu, ktorá bola vzhľadom na publikované experimentálne hodnoty viditeľne podhodnotená. V prípade molekuly **B** boli u všetkých analyzovaných veličín pozorované výraznejšie odchýlky teoretických hodnôt od experimentálnych, čo pripisujeme ako dôsledok obmedzujúcich podmienok, použitých pri teoretickej analýze daných molekulárnych štruktúr.

Acknowledgments

Autori tejto práce ďakujú za finančnú podporu Grantovej agentúre Českej republiky (projekt č. 18-04682S a projekt č. 20-03691X).

References

1. Wörner H. J. a 19 spoluautorov: *Struct. Dyn.* **4**, 06158 (2017).
2. Hromadová M., Vavrek F.: *Curr. Opin. Electrochem.* **19**, 63 (2020).
3. Rincón-García L., Evangeli C., Rubio-Bollinger G., Agraft N.: *Chem. Soc. Rev.* **45**, 4285 (2016).
4. Vavrek F., Butsyk O., Kolivoška V., Nováková Lachmanová Š., Sebechlebská T., Hromadová M.: *Sborník přednášek mezinárodní konference XXXIX. Moderní Elektrochemické Metody* (Navrátil T., Fořta M., Schwarzová K. ed.), str. 231. Lenka Srsenová – BEST Servis, Ústí nad Labem 2019.
5. Xu B., Tao N. J.: *Science* **301**, 1221 (2003).
6. Mészáros G., Li Ch., Pobelov I., Wandlowski T.: *Nanotechnology* **18**, 424004 (2007).
7. 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).
8. Blatt J., v knihe: *Thermoelectric power of metals*, str. 264. Plenum Press, New York 1976.
9. Becke A. D.: *J. Chem. Phys.* **98**, 5648 (1993).
10. Adamo C., Barone V.: *J. Chem. Phys.* **110**, 6158 (1999).
11. Landauer, R.: *IBM J. Res. Dev.* **1**, 223 (1957).
12. Datta S.: *Electronic transport in mesoscopic systems*. Cambridge University Press, 1997.
13. Landauer, R.: *J. Phys.: Condens. Matter* **1**, 8099 (1989).
14. Veenstra S. C., Stalmach U., Krasnikov V. V., Hadziioannou G., Jonkman H. T., Heeres A., Sawatzky G. A.: *Appl. Phys. Lett.* **76**, 2253 (2000).
15. Paulsson, M., Datta, S.: *Phys. Rev. B* **67**, 241403 (2003).
16. Kim T., Darancet P., Widawsky J. R., Kotiuga M., Quek S. Y., Neaton J. B., Venkataraman L.: *Nano Lett.* **14**, 794 (2014).
17. Brooke R. J., Jin Ch., Szumski D. S., Nichols R. J., Mao B.-W., Thygesen K. S., Schwarzacher W.: *Nano Lett.* **15**, 275 (2015).
18. Borges A., Fung E.-D., Ng F., Venkataraman L., Solomon G. C.: *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 4825 (2016).
19. Martin C. A., Ding D., Sorensen J. K., Bjornholm, T., van Ruitenbeck J. M., van der Zant H. S. J.: *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 13198 (2008).

Boron Doped Diamond Electrodes on Alumina Substrates (Príprava Bórom Dopovaných Diamantových Elektród Na Keramických Substrátoch)

Marian Vojs^a, Pavol Michniak^a, Michal Hatala^{b,c}, Vlastimil Řeháček^a, Miroslav Behúl^a,
Martin Vrška^a, and Marián Marton^a

^aInstitute of Electronics and Photonics, Faculty of Electrical Engineering and Information Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Ilkovicova 3, 812 19 Bratislava, Slovakia, E-mail: marian.vojs@stuba.sk

^bInstitute of Computer Engineering and Applied Informatics, Slovak University of Technology in Bratislava, Ilkovičova 2, 84216 Bratislava, Slovakia

^cDepartment of Graphic Arts Technology and Applied Photochemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovakia

Abstract

Three electrode system (WE – working, CE – counter, REF – quasi reference electrode) on alumina substrate for electrochemical measurement in small sample volume based on boron doped diamond (BDD) was described. The BDD growth was carried out in a linear antenna microwave chemical vapor deposition (LA MWCVD) reactor as a material of working and counter electrode. Scanning electron microscopy and Raman spectroscopy were used to BDD characterization. Thickness of BDD was 3.25 μm . The width of potential window, stability of electrode material and electrochemical properties in redox systems $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ and $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ were investigated. The width of potential window is 2.702 mV, which decreases after 100 measurements by 1.63 %. Were confirmed, that electrochemical reaction on electrode is diffusion controlled and reversible for lower scan rates.

Key Words: Boron doped diamond, Electrochemical properties, LA MW CVD, BDD on alumina.

Úvod

Uhlíkové elektródy založené na diamantovej štruktúre so sp³ hybridizovanými uhlíkovými väzbami tvoria v elektrochémii perspektívny elektródový materiál, hlavne pre excelentné vlastnosti diamantu ako chemická inertnosť a tvrdosť. Intrinzičný diamant je elektricky izolant so šírkou zakázaného pásma 5,47 eV. Jeho elektrická vodivosť typu P sa dá výrazne ovplyvňovať dopovaním, najčastejšie bórom.

Chemická depozícia z pár (CVD – Chemical Vapor Deposition) je metóda, pomocou ktorej je možné pripraviť tenké diamantové vrstvy. Ako prekurzor uhlíka sa najčastejšie používa plyn CH₄, ktorý je spolu s procesnými plynmi (hlavne H₂) aktivovaný buď žeravenými vlákňami (HF CVD – Hot Filament CVD) alebo mikrovlnami (MW CVD- MicroWave CVD). Ako zdroj bóru sa najčastejšie používajú dibóran a trimetylborán, prípadne trimetylborátu. Tepelne stabilné materiály ako Si, Al₂O₃ a SiO₂ sa veľmi často používajú ako substráty pre rast BDD.

Experimentálna časť

BDDE boli pripravené na Al₂O₃ substrátoch 50*50 mm², nadrezané na jednotlivé elektródy veľkosti 7,3 x 25 mm². WE a CE boli pripravené selektívnou nukleáciou pomocou nano-diamantových častíc (<10 nm (TEM), Sigma-Aldrich). Selektívna nukleácia je proces, kedy je diamantová vrstva deponovaná iba na plochách pokrytých nukleačnou vrstvou. Plocha WE bola 12,02 mm² a plocha CE 8,13 mm². BDDE boli pripravené v aparatúre LA MW CVD (SCIA, lineárnou plazmou podporená chemická depozícia z pár) pri výkone 6 kW.

Ag zvodové elektródy (pre zvýšenie vodivosti a odolnosti BDDE v konektore), referenčná elektróda a izolačná vrstva boli zhotovené pomocou sieťotlačače. Tlač prebiehala na poloautomatickom tlačovom stroji (ATMA TY-600H, Taiwan) s podtlakovou fixáciou potlačaného substrátu. Pre tlač Ag zvodových a referenčnej elektródy bola použitá tlačová pasta s obsahom strieborných častíc AST6025 (SunChemical, USA) a polyesterová sieťovina s hustotou 71 vlákien/cm (SEFAR PME 71-48Y, Švajčiarsko). Pre proces chloridácie Ag na Ag/AgCl bola použitá chronoampérometria s pripojenou RE ako WE, s pripojeným napätím 0,7 V za stáleho miešania počas 30s v roztoku 0,1 M KCl. Plocha RE bola 1,41 mm².

Izolačná vrstva bola tlačaná pomocou sieťotlačovej pasty na kremičitej báze s minerálnym plnivom 240-SB (FERRO, USA). Po 5 minútach pri laboratórnej teplote (podpora rozlivu) bola vrstva sušená v laboratórnej sušiarňi UN 55 (MEMMERT, Nemecko) pri teplote 150 °C po dobu 120 minút.

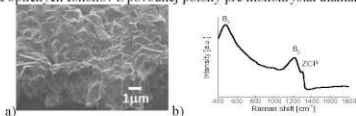


Obr. 1. Pripravený trojelektrodový systém s BDD pracovnou a pomocnou elektródou.

Elektrochemické merania prebiehali v trojelektrodovom zapojení na zariadení potenciostat / galvanostat Autolab PGSTAT 128N (METROHM). Cyklická voltampérometria v roztoku 0,5 M H₂SO₄, (-2 V až 2 V, rýchlosť zmeny potenciálu 100 mV/s) bola použitá pre sledovanie šírky potenciálového okna. Stabilita elektródy sa sledovala po 10, 50 a 100 cykloch CV (-2 V až 2 V, 100 mV/s, roztok 0,5 M H₂SO₄). Pri elektrochemickej charakterizácii BDDE boli využité reverzibilné redoxné systémy [Fe(CN)₆]⁴⁻³⁻ a [Ru(NH₃)₆]³⁺. Merania prebiehali cyklickou voltampérometriou pri rôznych rýchlostiach zmeny potenciálu (10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mV/s) v roztoku 2,5 mM [Fe(CN)₆]⁴⁻ v 0,1 M KCl a 2,5 mM [Ru(NH₃)₆]³⁺ v 0,1 M KCl. Použité roztoky boli pripravené z 18,2 MΩ demineralizovanej vody a z chemikálií analytickej kvality.

Výsledky a diskusia

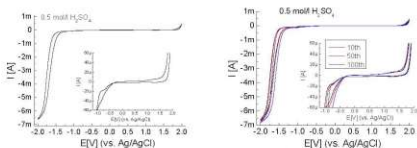
Povrch Al₂O₃ bol rovnomerne pokrytý polykryštalicou BDD vrstvou. (Obr.1) Hrúbka BDD vrstvy bola 3,25 μm. V Ramanovom spektre (Obr.2). BDD sú viditeľné spektrálne pásma pri približne 480 cm⁻¹ (B₁), 1200 cm⁻¹ (B₂) a 1305 cm⁻¹ (ZPC). Maximum ZPC(sp³) patrí k zvyškom maxima diamantu zónového stredového fonónu (ZCP) a je posunuté v dôsledku prechodov elektrických a optických fonónov z pôvodnej polohy pre monokryštál diamantu (1 333 cm⁻¹).



Obr. 1. a) SEM snímka pod uhlom 45° lomu a b) Ramanove spektrum BDD vrstvy na Al₂O₃ substráte (He-Ne laser, λ=633 nm).

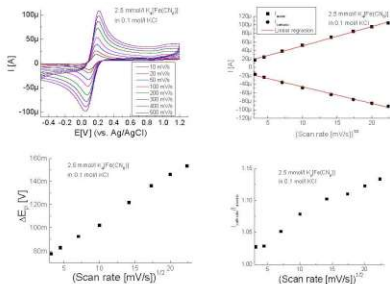
Pomocou cyklickej voltampérometriu sme získali hodnotu potenciálového okna, pre rozdielnu plochu WE. Hraničným potenciálom bolo dosiahnutie prúdu 20 μA v katodickom (E=-872 mV) aj anodickom (E=1 830 mV) smere. Šírka potenciálového okna (po 10 cykloch CV) v 0,5 M

H₂SO₄ bola vypočítaná 2 702 mV. Stabilita elektródy sa zisťovala po 10, 50 a 100 cykloch. Cyklické voltampérogramy ukázali dobrú stabilitu elektródy, pričom potenciálové okno sa po 50 meraniach zúžilo iba mierne o 1,44% (2 663 mV), resp. o 1,63% po 100 meraniach (2 658 mV).



Obr. 2. a) Cyklický voltampéromogram BDDE v 0,1 M H₂SO₄ (b) Cyklické voltampérogramy po 10, 50 a 100 meraniach, rýchlosť zmeny potenciálu 100 mV/s.

Pre elektrochemickú charakterizáciu BDDE bol využitý reverzibilný redoxný systém [Fe(CN)₆]⁴⁻³⁻. Rozdiel medzi anodickým a katódickým signálom je 78 mV pri 10 mV/s, čo je blízko teoretickej hodnote 59 mV, kedy je elektródová reakcia reverzibilná. Pri vyšších rýchlostiach zmeny potenciálu sa tento rozdiel zvyšuje až do 153 mV pri 500 mV/s. Zo získaných údajov (Tab. I) vyplýva, že sa lineárne zvyšuje katódický (R²=0,995) a anodický (R²=0,998) signál v závislosti od druhej mocniny zmeny potenciálu, čo odpovedá difúzne riadenej elektródovej reakcii. Toto potvrdzuje aj pomer anodického a katódického prúdu, ktorý je blízky hodnote 1 (maximálne 1,13 pre 500 mV/s).



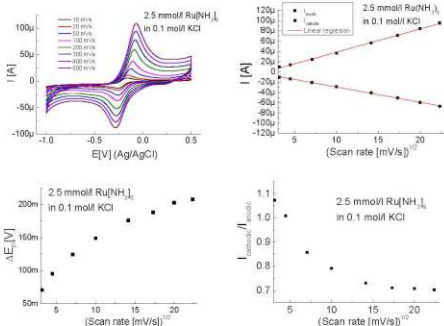
Obr. 2. a) Voltampérogramy BDDE v roztoku 2,5 mM [Fe(CN)₆]⁴⁻ v 0,1 M KCl pri rôznych rýchlostiach zmeny potenciálu b) závislosť anodického a katódického prúdu c) rozdielu potenciálov a d) závislosť pomeru katódického a anodického prúdu od druhej mocniny rýchlosti zmeny potenciálu.

Tabuľka I.

Vypočítané parametre regresnej priamky pre redoxný systém $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$

Meranie	Smernica (V/s)	Priesečník (μA)	R^2
Anodický smer	$4,55 \pm 0,08$	$4,73 \pm 1,18$	0,9976
Katodický smer	$-3,93 \pm 0,1$	$-6,9 \pm 1,45$	0,9952

Pri elektrochemickú charakterizáciu BDDE bol využitý aj reverzibilný redoxný systém $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$. Rozdiel medzi anodickým a katodickým signálom je 70 mV pri 10 mV/s, čo je blízko teoretickej hodnote 59 mV, kedy je elektródová reakcia reverzibilná. Pri vyšších rýchlostiach zmeny potenciálu sa tento rozdiel zvyšuje až do 200 mV pri 500 mV/s. Zo získaných údajov (Tab. I) vyplýva, že sa lineárne zvyšuje katodický ($R^2=0,999$) a anodický ($R^2=0,998$) signál v závislosti od druhej mocniny rýchlosti zmeny potenciálu, čo odpovedá difúzne riadenej elektródovej reakcii. Toto potvrdzuje aj pomer anodického a katodického prúdu, ktorý je blízky hodnote 1. Rozdiel medzi charakterizáciu v redoxných systémoch $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ a $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ je ten, že pomer katodického a anodického prúdu pri redoxnom systéme $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ sa zvyšuje v závislosti od druhej mocniny rýchlosti zmeny potenciálu, čo je v kontraste s opačným trendom pri $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$.



Obf. 3. a) Voltampérogramy BDDE v roztoku 2,5 mM $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ v 0,1 M KCl pri rôznych rýchlostiach zmeny potenciálu b) závislosť anodického a katodického prúdu c) rozdiel potenciálov a d) závislosť pomeru katodického a anodického prúdu od druhej mocniny rýchlosti zmeny potenciálu

Tabuľka II.Vypočítané parametre regresnej priamky pre redoxný systém $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$.

Meranie	Smernica (V/s)	Priesečník (μA)	R^2
Anodický smer	4,54±0,07	-6.93±0.99	0,9983
Katodický smer	-2.96±0,04	-0.07±0.53	0,9989

Záver

V tomto príspevku je opísaný proces prípravy trojelektrodového systému na Al_2O_3 substráte. BDD vrstva s hrúbkou 3,25 μm pripravená metódou LA MW CVD bola použitá ako materiál pre prípravu WE a CE. Sieťotlač bola úspešne použitá na vytvorenie REF, elektrických zvodových kontaktných elektród a elektricky izolačnej vrstvy chrániacej kontaktné elektródy. Elektrochemické merania ukázali, že potenciálové okno BDDE je 2,7 V, ktoré sa po 100 meraniach zníži o 1,63 %. Potvrdilo sa, že na elektródach prebieha difúzne riadená elektrodová reakcia, ktorá je reverzibilná pri nižších rýchlostiach zmeny potenciálu.

Acknowledgments

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmlúv č. APVV-16-0124, PP-COVID-20-0019 projektom grantovej agentúry VEGA MŠVVaŠ SR VEGA I/054/20 a podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: „Strategický výskum v oblasti SMART monitoringu, liečby a preventívnej ochrany pred koronavírusom (SARS-CoV-2)“, Kód ITMS2014+: NFP313011ASS8, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

References

1. Muzyka K., Sun J., Fereja T.H., Lan Y., Zhang W., Xu G.: *Anal. Methods* 11, 397 (2019).
2. Macpherson J.V.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 2935 (2015).
3. Rehacek V., Hotovy I, Marton M., Míkolasek M., Michniak P., Vincze A., Kromka A., Vojs M.: *J. Electroanal. Chem.* 862, 114020 (2020).
4. Mortet V., Taylor A., Vlekova Zivcova Z., Machon Z., Frank O., Hubik P., Tremouilles D., Kavan L., *Diam. Relat. Mater.* 88, 163 (2018).
5. Šelešovská R., Kránková B., Štěpánková M., Martinková P., Janíková L., Chýlková, J., Vojs M.: *J. Electroanal. Chem.* 821, 2 (2018).

Electrochemical Preparation and Characterization of Polymetallic Catalysts for Hydrogen Economy

Jana Záchenská and Matilda Zemanová

STU in Bratislava, Institute of Inorganic Chemistry, Technology and Materials, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: jana.zachenska@stuba.sk

Abstract

Ni-Fe-W cathode catalyst for zero-gap alkaline water electrolysis was studied. Ni-Fe-W coatings were prepared by galvanic electrodeposition on nickel foam. The influence of composition of the electrolyte on the morphology and catalytic properties were studied. It was found that composition of electrolytes affects catalytic properties of Ni-Fe-W coatings on nickel foam. Electrocatalytic properties of polymetallic Ni-Fe-W coatings are higher compared to two-component Ni-Fe catalyst.

Key Words: Ni-Fe-W coatings, Zero-gap alkaline water electrolysis, Electrocatalysis, Hydrogen evolution reaction.

Introduction

The concept of hydrogen economy is important due to climate change and global warming. Alkaline water electrolysis seems to be promising technology for producing hydrogen without using fossil fuels^{1,2}. Zero-gap assembly is novel cell design with electrodes pressed against the membrane. The smaller distance between electrodes significantly contributes to reduce the ohmic resistance and allows to work with electrolytes with lower concentration (<20 wt.%). Zero-gap cell designs work with highly porous electrodes with large surface area. The efficiency of zero-gap cell depends on the choice of cathode and anode material catalyst, and hydroxide ion conducting membrane. Recent studies are focused on development of new materials for electrodes and membrane as well^{3,4}.

For its catalytic properties, platinum electrode is still the best electrode for hydrogen evolution reaction (HER). However, its high cost is the main reason for the research of its substitution⁵. One of promising materials are nickel and nickel alloys. Ni-Fe based materials have gained much attention due to their high potential as an effective catalyst toward both OER and HER. Although Ni-Fe electrodes for water splitting are known since last century, their activity and stability in practical application should be improved^{6,7}. Besides the combination of nickel and iron, Ni-W alloys seem to be a promising material for HER. Ni-W alloys provided good mechanic, tribological and corrosion properties and stability in alkaline medium⁸. The aim of the project was study of nickel, iron and tungsten as effective catalyst for alkaline water electrolysis.

Experimental part

In this work Ni-Fe-W coatings were tested as possible cathode catalyst for zero-gap alkaline water electrolysis. Nickel based coatings were prepared by direct current electrodeposition on nickel foam. Electrodeposition was conducted at current density of 16 and 8 A·dm⁻². Temperature was 60°C and time of electrodeposition was 30 min. Before electrodeposition, surface of nickel foam was activated in a 20 % sulfuric acid solution. After electrodeposition, samples were rinsed with distilled water. Different electrolytes were used to deposited Ni-W-Fe coatings (Table I)

Table I. Composition of used electrolytes.

	$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Nomenclature of samples
	Concentration (mol/l)				
Electrolyte 400	0.07	0.23	0.4	0.015	Ni-Fe-W_400
Electrolyte 100	0.07	0.23	0.1	0.015	Ni-Fe-W_100
Electrolyte 10	0.07	0.23	0.01	0.015	Ni-Fe-W_10
Electrolyte 0	0.07	0.23	0	0.015	Ni-Fe

The surface morphology of prepared samples was studied by means of SEM. Catalytic properties of specimens were investigated in a zero-gap electrolyzer for alkaline water electrolysis. Main part of electrolyzer consists of porous cathode and anode and a membrane between the electrodes. Prepared coating on nickel foam was cathode. Used anode was pure nickel foam. The electrolyte was a 10 wt.% potassium hydroxide solution. Load measurements were carried out for 30 min. Voltage applied to the cell was in the range of 1.5-2 V with a step of 0.05 V and current passing through the cell was recorded. Electrodeposited Ni-Fe coating were used as reference for zero-gap load measurements.

Result and discussion

Galvanic electrodeposition seems to be cheap and simple way to prepare catalysts with large surface area. Besides big surface area of catalyst it is important to prepare stable materials in alkaline medium. Ni-W provided good stability in alkaline medium, however their catalytic properties can be improved. On the other hand, Ni-Fe coatings reached significantly higher catalytic performance over Ni-W electrodes⁷⁻⁹. The aim of the study was to find optimal composition of Ni-Fe-W electrodes as catalysts for zero-gap alkaline water electrolysis with high effectivity and stability.

Morphology of the studied samples was investigated by means of SEM. Fig. 1 depicts morphology of the prepared specimens from different electrolytes at current density of 8 and 16 $\text{A} \cdot \text{dm}^{-2}$. One can see that substrate is homogenously covered. SEM records display slightly nodular structure of prepared coatings Ni-Fe-W_400 and Ni-Fe (Fig. 1a and Fig. 1d). Fig. 1b depicts wrinkled morphology of sample Ni-Fe-W_100. The coatings Ni-Fe-W_10 is distinguished by cracks on the surface (Fig. 1c).

Catalytic properties of the prepared samples were studied in zero-gap electrolyzer for alkaline water electrolysis. The performance was studied by recording load curves, i.e., current recorded passing through the cell, and then values were recalculated to current densities. The load curves of the tested Ni-Fe-W samples prepared from different electrolytes at current density of 8 $\text{A} \cdot \text{dm}^{-2}$ are shown in Fig. 2a. The best results provided samples deposited from electrolyte 100. Similar results can be seen in Fig. 2b where are shown samples prepared from different electrolytes at current density of 16 $\text{A} \cdot \text{dm}^{-2}$. Sample Ni-Fe-W_100 provided best results compared to other samples prepared at current density of 16 $\text{A} \cdot \text{dm}^{-2}$. Samples prepared from electrolyte 10 could not be measured due to cracks on the surface (Fig. 1c).

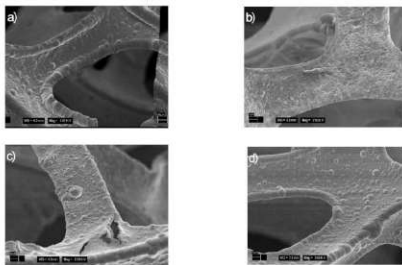


Fig. 1. Morphology of prepared samples from: a) electrolyte 400, b) electrolyte 100, c) electrolyte 10, d) electrolyte 0 at current density of 8 and $16 \text{ A}\cdot\text{dm}^{-2}$ (magnification 2000x).

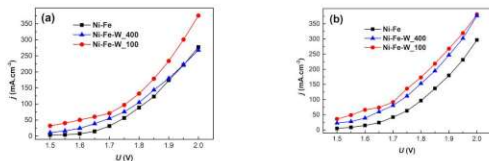


Fig. 2. Load curves of prepared samples from different electrolytes at current density of a) $8 \text{ A}\cdot\text{dm}^{-2}$ and b) $16 \text{ A}\cdot\text{dm}^{-2}$.

Fig. 3 shows comparison of load curves of specimens prepared from electrolyte 100. Sample prepared at current density of $16 \text{ A}\cdot\text{dm}^{-2}$ provided best results compared to other prepared samples. Reason can be wrinkled morphology as an assumption of higher surface area (Fig. 1b).

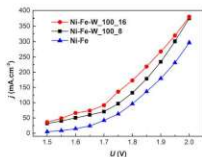


Fig. 3. Load curves of prepared samples from electrolytes 100 and Ni-Fe sample.

After measurements in zero-gap electrolyzer morphology of samples was studied. SEM records of samples are shown in Fig. 4. After load measurement cracks appeared on the surface of all studied samples.

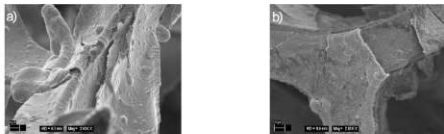


Fig. 4. Morphology of prepared samples after load measurements from: a) electrolyte 400 and b) electrolyte 100 at current density of $8 \text{ A} \cdot \text{dm}^{-2}$ (magnification 2000x).

Conclusion

The influence of electrolyte composition on the morphology and catalytic properties of Ni-Fe coatings towards HER was studied. The coatings were deposited on nickel foam by galvanic electrodeposition. Electrodeposition is the effective way to influence the composition and morphology of Ni-Fe-W coating. The catalytic activity of the prepared electrodes was investigated in a zero-gap electrolyzer for alkaline water electrolysis. Electrocatalytic properties of polymetallic Ni-Fe-W coatings is higher compared to two-component Ni-Fe catalyst.

Acknowledgments

This work was financially supported by the grant of the Slovak Scientific Grant Agency VEGA under the contract number 1/0747/21.

References

1. Sun J., Zhu D., Sun Y., Ma L., Guo J., Liu Q. and Zhang, X.: *J. Alloys Compd.* **833**, 155131 (2020).
2. David M., Ocampo-Martínez C. and Sánchez-Peña R.: *J. Energy Storage* **23**, 392 (2019).
3. Phillips R. and Dunnill C.W.: *RSC Adv.* **6**, 100643-100651 (2016).
4. Pletcher D. and Li X.: *Int. J. Hydrogen Energ.* **36**, 15089 (2011).
5. Santos D.M.F., Sequeira C.A.C., Maccio D., Saccon, A. and Figueiredo, J.L.: *Int. J. Hydrogen Energ.* **38**, 3137 (2013).
6. Ge Z., Fu B., Zhao J., Li X., Ma B. and Chen Y.: *J. Mater. Sci.* **55**, 14081 (2020).
7. Torabinejad V., Aliofkhaezrai M., Assareh S., Allahyarzadeh M.H. and Sabour Rouhaghdam A.: *J. Alloys Compd.* **691**, 841 (2017).
8. Suryanto B.H.R., Wang Y., Hocking R.K., Adamson W., Zhao C.: *Nat. Commun.* **10**, 5599 (2019).

Česká společnost chemická

reprezentuje a hájí zájmy a aktivity chemiků v celé České republice. Je respektována i v zahraničí, neboť se postupně formovala již od roku 1866 a patří tak k jedné z nejstarších profesních chemických organizací na světě.

Společnost pomáhá svým členům průběžně si rozšiřovat a prohlubovat odborné znalosti a dovednosti, šíří a propaguje nové poznatky ze všech chemických oborů, podporuje kvalitní chemické vzdělávání na všech typech škol, zároveň všestranně pomáhá mladým chemikům. Organizuje různé konference, semináře a pracovní setkání, pro svoje členy vydává měsíčník Chemické listy.

Ve svých řadách Společnost vítá **studenty i učitele.**



Česká společnost chemická, Novotného lávka 5, Praha 1, www.csch.cz

Členské výhody:

- Možnost zažádání o evropskou nostrifikaci chemického vzdělání a odborné praxe spojenou s udělením titulu EurChem, platného v celé EU,
- Podstatné slevy u vložného na sjezdech a konferencích, jejichž oficiálním pořadatelem je ČSCH,
- Informace o dění v evropských strukturách, jako např. EuCheMS, ECTN, EC2E2N a podobně,
- Možnost přidruženého členství v IUPAC, a z toho plynoucí sleva u nakladatelství Blackwell a na konferencích sponzorovaných IUPAC
- Možnost získání a doporučení členské přihlášky do významných zahraničních chemických společností (RSC, ACS, GDCh, GÖCh, SFC aj.)
- Přístup k elektronickým informačním médiím Společnosti,
- Možnost zapojení se do práce a komunikace v jedné z místních či odborných poboček ČSCH,
- Volný přístup k tištěným verzím časopisů ChemPubSoc Europe v „knihovně ČSCH“
- Možnost objednání předplatného Chemických listů s významnými slevami,
- Významná sleva (ca 90 %) na předplatné časopisu Chemistry – A European Journal, a dalších evropských časopisů konsorcia ChemPubSoc Europe, jichž je ČSCH spolumajitelem,
- Přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- Možnost získání příležitostných slev obchodních firem spolupracujících s ČSCH,
- Sleva při zapůjčení automobilu (až 35 %) u společnosti AVIS a HERTZ na celém světě, kromě Austrálie, a použití těchto automobilů na akcích v ČR za speciální tarify,
- Sleva 20 % z publikačních poplatků v časopise ChemOpenChem, který společnost spoluvlastní.
- Možnost uplatnit informace z vlastní pracovní činnosti (výsledky, novinky, inzerce, tisková oznámení aj.).



Rejstřík autorů

- Arbneshi Tahir, 122
Bábková Zuzana, 77
Baluchová Simona, 9, 14
Balzer Nico, 188
Barek Jiří, 248
Baroch Martin, 18
Bartáček Jan, 94
Barták Petr, 108, 210
Bártová Kateřina, 21
Behúl Miroslav, 171, 267
Benkšová Michaela, 26
Bilková Zuzana, 122
Birošová Lucia, 41
Bořik Adam, 179
Bouša Milan, 257
Brožková Iveta, 155
Brycht Mariola, 31
Butsyk Olena, 262
Cankař Petr, 210
Čabala Radomír, 112
Červenková Andrea, 36
Čierna Martina, 41
Dakošová Olívia, 41, 44
Daňhel Aleš, 47, 58, 71
Darvasiová Denisa, 151
Degano Ilaria, 206, 214
Dejmková Hana, 18, 51, 63
Dian Juraj, 54
Dobrovodský Daniel, 58, 71
Dorčák Vlastimil, 71
Dunlop David, 234
Eremina Anna, 9
Fischer Jan, 9, 14, 63
Fojt Lukáš, 66, 74
Fojta Miroslav, 47, 58, 71, 77, 193
Frühwirt Philipp, 147
Gál Miroslav, 41, 44, 164
Galicová Tatiana, 164
Gescheidt-Demner Georg, 147
Giampaglia Dominika, 51
Grabic Roman, 179
Grüner Bohumír, 66, 74
Haas Michael, 147
Halašková Nela, 167
Hason Stanislav, 71
Hatala Michal, 171, 267
Havran Luděk, 66, 71, 74, 77
Hermanová Monika, 71, 77, 193
Hiveš Ján, 26, 36
Hodačová Jana, 54
Hojová Lucia, 85
Horká Blanka, 9
Hosnedlová Božena, 218
Hrdlička Vojtěch, 81, 89
Hromadová Magdaléna, 188, 262
Choińska Marta, 89, 183
Chýlková Jaromíra, 94, 159, 225, 253
Jaklová Dyrtrtová Jana, 21
Jakubek Milan, 218
Janíková Lenka, 253
Jaromíra Chýlková, 253
Jashari Granit, 98, 122
Jelínek Ivan, 54
Jelšíková Kristýna, 102
Jenner Leon, 105
Jerga Radek, 108, 210
Jiroušková Eliška, 112
Josypčuk Bohdan, 117, 248
Kastrati Gylxhane, 122, 155
Kepinska Marta, 218
Kizek Rene, 218
Klíma Jiří, 130
Klouda Jan, 102
Koláčná Lucie, 126, 130
Kolivoška Viliam, 188, 257, 262
Korecká Lucie, 122, 155
Košťūr Roman, 135
Kovač Ishak, 21
Koval Dušan, 243
Krahulec Ján, 41
Kramplová Zuzana, 139
Krůšek Jan, 9
Křivská Daniela, 230
Kubišta Jiří, 257
Langmaier Jan, 117, 143
Lemiart Andrzej, 31
Liška Alan, 126, 147, 234, 239
Ludvík Jiří, 126, 130, 147, 234, 239
Lukášek Jan, 188
Lukeš Vladimír, 151
Lušpai Karol, 151
Mališová Emília, 26, 36
Mandal Soumen, 14
Martinková Barbora, 155
Marton Marián, 85, 159, 171, 179, 267
Matvieiev Oleksandr, 159, 225
Mayor Marcel, 188
Melníková Eva, 44, 164

- Mészáros Gábor, 262
 Metelka Radovan, 98, 122, 167
 Michniak Pavol, 171, 179, 267
 Mika Luděk, 14
 Mikysek Tomáš, 98, 155, 176, 214, 221
 Mordačiková Erika, 85, 179
 Navrátil Tomáš, 81, 89, 183, 230
 Novák Miroslav, 176, 221
 Nováková Lachmanová Štěpánka, 188
 Nycz Jacek, 214
 Obluková Michaela, 214
 Ondráčková Anna, 193
 Opekar František, 196
 Ostatná Veronika, 71, 164
 Outlá Martina, 71
 Parák Tomáš, 218
 Pejzlová Michaela, 9
 Pivoňková Hana, 71, 77, 193
 Polák Peter, 130
 Pospíšilová Eva, 201
 Pruchkouski Dzmitry, 105
 Purdešová Andrea, 139
 Rapta Peter, 151
 Rathouský Jiří, 257
 Řeháček Vlastimil, 171, 267
 Sabatini Francesca, 206
 Samec Zdeněk, 143
 Sebechlebská Táňa, 188, 257
 Sedlák Miloš, 94
 Shestivska Violetta, 257
 Shishkanova Tatiana V., 201
 Schwarzová-Pecková Karolína, 9, 14, 63, 102
 Skopalová Jana, 108, 210
 Skoták Vít, 218
 Skrzypek Sławomira, 31
 Sládková Šárka, 18, 63
 Sokol Jozef, 139
 Sokolová Romana, 112, 206, 214
 Soldánová Zuzana, 71
 Sýkorová Eva, 105
 Sýs Milan, 98, 122, 176, 214, 221
 Šebera Jakub, 188, 262
 Šelešovská Renáta, 94, 159, 225, 253
 Šestáková Ivana, 183, 230
 Šimková Ludmila, 234
 Špaček Jan, 71
 Štolbová Dana, 210
 Švancara Ivan, 98
 Švecová Blanka, 122
 Taylor Andrew, 9, 14, 63
 Tobrman Tomáš, 130
 Trnková Libuše, 239
 Trisková Iveta, 239
 Tůma Petr, 196, 243
 Tvorynska Sofiia, 117, 248
 Usenko Alona, 94, 253
 Valášek Michal, 188
 Váňa Jiří, 94, 253
 Vaněčková Eva, 257
 Vavrek František, 188, 262
 Vojs Marian, 85, 159, 171, 179, 225, 267
 Vojs Staňová Andrea, 85, 179
 Vojtěch Hrdlička, 183
 Vrška Martin, 85, 171, 225, 267
 Wantulok Jakub, 214
 Williams Oliver, 14
 Záchenská Jana, 272
 Zajacová Cechová Monika, 210
 Zalibera Michal, 151
 Zelenský Michal, 14
 Zemanová Matilda, 135, 272
 Zuzana Bilková, 155

Metrohm demonstrační laboratoř na Univerzitě Karlově



 **Metrohm**
Česká republika



www.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 (zvoněk, 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

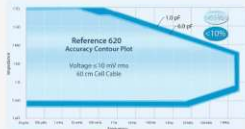
připojením na síť 220/50 Hz; 3,5 mA; akumulátor nebo trafo; váha 1,9 kg

POTENCIOSTATY GALVANOSTATY ZRA (ZERO RESISTANCE AMMETER)

AKADEMICKÉ ZIALLY PRE
UNIVERZITY A VYSOKÉ ŠKOLY



**Prístroje od firmy Gamry sú vhodné
pre širokú škálu aplikácií:**



- korózne merania
- fyzikálna elektrochémia
- testovanie senzorov
- bioelektrochémia
- testovanie a meranie batérií
- hodnotenie povlakov
- polovodiče
- fotovoltailika a mnohé ďalšie aplikácie

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 Tast 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 (polarografií a voltametří)

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⁻, CN⁻, Br⁻, J⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻, S²⁻)**
- **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, výluhů púd; geologických vzorků; rud; popelků 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 pogarantiční 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, projekci 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

Elektronický docházkový systém ComArr nabízí všestranné řešení v okruhu docházky zaměstnanců, rezervaci prostředků a řízení přístupu do objektu.

Inteligentní slaboproudé instalace

Chcete zabezpečit své okolí ? Rodinu, zaměstnance, kolegy, firmu, nebo školu ? Nebo pomoci 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



ComArr®

Za 30 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



ISE sponsored Meeting



CHEMAGAZÍN

© Best servis Ústí nad Labem

ISBN 978-80-905221-8-3

