



**42.**

**MODERNÍ  
ELEKTROCHEMICKÉ  
METODY**

**SBORNÍK PŘEDNÁŠEK**  
**Květen 2023**





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**

## **42. Moderní Elektrochemické Metody**

Jetřichovice, 22. – 26. května 2023

Uspořádali:

Tomáš Navrátil, Miroslav Fojta a Karolina Schwarzová

ISBN 978-80-908947-0-9

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: 42. Moderní Elektrochemické Metody  
Vydal: Srsenová Lenka - Best servis Ústí nad Labem  
Autor: kolektiv autorů  
Počet stran: 238  
Náklad: 75  
Vydání 1.  
Formát: A5  
ISBN: 978-80-908947-0-9

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**

# **42<sup>nd</sup> Modern Electrochemical Methods**

**Jetřichovice, Czech Republic**

**May 22<sup>nd</sup> - May 26<sup>th</sup>, 2023**

**Editors:**

Tomáš Navrátil, Miroslav Fojta, and Karolína Schwarzová

**ISBN 978-80-908947-0-9**

Poděkování partnerům konference  
42. Moderní Elektrochemické Metody



PŘÍRODOVĚDECKÁ  
FAKULTA  
Univerzita Karlova



**Metrohm**  
Česká republika



Chem  
Electro  
Chem

Chemistry  
Methods

Chem  
Phys  
Chem



Chemistry  
Europe

ECO-TREND PLUS s.r.o.

<b>Content</b>	<b>Page</b>
<i>Judita Anšti, Eva Vaněčková, Monika Spasovová, Milan Houska, Markéta Vrabcová, Eva Vogelová, Barbora Holubová, Vaisocherová-Lisalová Hana, and Viliam Kolivoška</i> Probing Charge Transfer and Mass Transport through Zwitterionic Polymer Brushes by Electrochemical Methods: The Supporting Self-Assembled Monolayer Chain Length Matters	9
<i>Martin Baroch, Luděk Mika, and Hana Dejmková</i> Application of Metal Reference Electrodes	14
<i>Jan Bartáček, Martin Kocířik, Jaroslav Pochobradský, Jan Svoboda, Jaromira Chýlčková, and Miloš Sedlák</i> Molecularly Imprinted Polymers for Selective Extraction of Xenobiotics	18
<i>Petr Barták, Jana Skopalová, Radek Jerga, Dana Štolbová, Tomáš Navrátil, and Jan Langmaier</i> Analytical Derivatization for Identification of Electrochemical Oxidation Products of Fentanyl	21
<i>Michaela Bártová and Tomáš Mikysek</i> Determination of Surfactants Using Potentiometric Titration	26
<i>Zeynab Belbasi, Jan Hrbáč, and David Jirovský</i> Determination of Six Antihistamines by HPLC-ECD Employing Bare and Modified Carbon Fiber Microelectrode	31
<i>Anna Bělušová, Jan Krejčí, Radka Kučerová, and Martin Klusáček</i> The Stability, Temperature Dependency, and Reproducibility of Ion-Selective Electrode Response	35
<i>Eva Bláhová, Lucie Serbanová, and Karolína Schwarzová-Pecková</i> Study of the Voltammetric Behaviour of 7 $\beta$ -hydroxycholesterol on Boron-doped Diamond Electrode	39
<i>Gabriela Broncová, Šára Hermochová, Miroslava Trchová, Šárka Havlová, Petr Vrablic, Petr Hlavín, Jiří Straus, and Michal Novotný</i> Electrochemical Visualization of Dactyloscopic Traces	43
<i>Peter Čambal, Jana Poláková, Simona Baluchová, Andrew Taylor, and Karolína Schwarzová-Pecková</i> Electrochemical Properties of Scaife Polished {110}-oriented Single-Crystal Boron-Doped Diamond Electrodes	47
<i>Hana Dejmková, Andrej Vikartovský, Jakub Pecák, and Martin Baroch</i> Comparison of Flow-through Boron-Doped Diamond Electrodes	52
<i>Juraj Dian, Martin Baroch, Václav Červený, Jindřich Jindřich, and Jakub Pšenčík</i> Spectroelectrochemical Study of Acidobasic Equilibria of Protoporphyrin Derivatives	55
<i>Daniel Dobrovodský, Aleš Daihel, Daniel Renčík, and Miroslav Fojta</i> Electrochemical Detection of G-quadruplexes using N-methyl Mesoporphyrin IX as a Redox Probe	59
<i>Jan Fischer, Lucie Fořtová, and Karolína Schwarzová-Pecková</i> Study of Absorption Properties of Boron-doped Diamond Using Methyl Viologen	63
<i>Miroslav Fojta, Zuzana Soldánová, Luděk Havran, Hana Pivoňková, and Monika Hermanová</i> Anodic Signal of Guanine Residues in DNA at the Mercury Electrode Depends on the Presence of Adenine and/or Cytosine	66

<i>Timea Baranová, Ján Krahulec, and Miroslav Gál</i>	69
Electrochemical Impedance Spectroscopy - Tool for the Determination of the Basic Kinetic Parameters of Enteropeptidase	
<i>Sanam Garehbhaghi, Amir M. Ashrafi, Lukas Richtera, and Vojtech Adam</i>	72
Highly Sensitive Amperometric Determination of Lactose by an Enzyme Cascade System	
<i>Monika Hermanová, Marcela Hrušková, Luděk Havran, and Miroslav Fojta</i>	75
Interactions of Modified and Natural DNA Components and Oligonucleotides with Mercury Ions	
<i>Lucia Hojová, Simona PISOŇOVÁ, Martin Vrška, Marian Marton, Marian Vojs, Tomáš Mackulák, and Andrea Vojs Staňová</i>	79
Electrochemical Oxidation of Selected Bisphenols on Boron-Doped Diamond Electrodes	
<i>Jan Hrbáč</i>	84
Energy-controlled Spark Discharges for Electrode Activation and Modification	
<i>Marta Chvojníková-Mlynarczyk, Ivana Šestáková, and Tomáš Navrátil</i>	87
Determination of Selected Natural Psychoactive Substances in Organic Matrices at 3D Printed Electrodes	
<i>Jaromíra Chýlková, Alona Usenko, Olexsandr Matvieiev, Jan Bartáček, Vladimír Jehlička, and Renáta Šelešiovská</i>	91
Voltammetric Determination of Selected Estrogen Mixtures in Waters	
<i>Kristýna Jelšíková, Eva Bláhová, Peter Čambal, and Karolína Schwarzová-Pecková</i>	95
Study of Electrochemical Behaviour of Bile Acids on Boron-Doped Diamond Electrode	
<i>Leon Jenner, Dzmity Pruchkouski, Matouš Petlák, and Eva Sýkorová</i>	99
Easy Detection of Protein-RNA Interactions by Northwestern Blotting	
<i>Radek Jerga</i>	103
How to Increase Selectivity in Voltammetry	
<i>Jitka Klíkarová, Milan Sýs, Veronika Šantrůčková, and Monika Toušková</i>	107
Optimization of Ethyl Carbamate Derivatization for Spectrophotometric and Electrochemical Detection	
<i>Jana Kocábová, Štěpánka Nováková Lachmanová, František Vavrek, Michal Valášek, and Magdaléna Hromádová</i>	111
Electrochemical Properties of Mixed Self-Assembled Monolayers Based on Terpyridine Transition Metal Complexes	
<i>Lucie Koláčná, Milan Maďar, Vojtěch Kubiček, and Jiří Ludvík</i>	116
Electrochemically Investigated pH-dependent Redox Properties of Copper Complexes of Azamacrocyclic Ligands	
<i>Anna Kubičková, Alice Tomníková, Dominik Smrž, and Tomáš Křížek</i>	121
The Use of Capillary Electrophoresis for the Control of Industrial Mixtures	
<i>Anton Lytvynenko, Simona Baluchová, Jan Krůšek, and Karolína Schwarzová-Pecková</i>	124
Voltammetric Detection of Monoamine Neurotransmitters in a Neurobasal Medium	
<i>Vladimír Mareček</i>	129
A Polarizable Reference Electrode	
<i>Olexsandr Matvieiev, Renáta Šelešiovská, Marian Vojs, Marián Marton, and Jaromíra Chýlková</i>	133
Screen-Printed Sensors with Chemically Deposited Boron-Doped Diamond Electrode: the Effect of the Ratio of the Area of the Working to the Auxiliary Electrode	

<i>Radovan Metelka, Martina Svtáková, Vjosa Grapci, and Tahir Arbneshi</i> Practical Experience with Planar Three-Electrode Sensors: Graphite Modified with Carbon Nanotubes vs. Boron-Doped Diamond	138
<i>Tomáš Mikysek and Barbora Indruchová</i> Voltammetric Determination of Arecoline	142
<i>Tomáš Navrátil, Libuše Trnková, Vojtěch Hrdlička, and Xiaochun Li</i> Elimination Voltammetry with Linear Scan: Advantages and Disadvantages	146
<i>Michal Nedvěd, Kristýna Jelsíková, Karel Nesměrák, and Karolína Schwarzová-Pecková</i> Electrochemical Oxidation of Phenolic Compounds on Boron-Doped Diamond Electrodes	151
<i>Ladislav Novotný, Simona Uchytílová, Gabriela Kuchtová, Lenka Svašková, and Libor Dušek</i> Possible Use of the Special Interface for Effective Potentiometric Measurements	155
<i>Anna Ondráčková, Marie Stiborová, Helena Dračinská, Luděk Havran, Karolína Schwarzová-Pecková, Miroslav Fořta</i> A Voltammetric Study of an Azo Dye Sudan I and Its Metabolites in the Presence of NADPH	159
<i>František Opekar and Petr Tůma</i> Electromembrane Mini-extraction On-line Connected to Capillary Electrophoresis	162
<i>Eva Pospíšilová, Miroslava Trchová, Radek Fajgar, Jan Kočí, and Tatiana V. Shishkanova</i> Screen-Printed Electrodes Modified with Electrochemically Oxidized 3-Aminobenzoic Acid: Characterization and Application	167
<i>Lucie Pražáková, Jan Fischer, Andrew Taylor, and Anna Kubičková</i> The Role of Electrochemistry in Degradation Studies	172
<i>Arezoo Saadati, Amir M. Ashrafi, Vojtěch Adam, and Lukáš Richtera</i> Molecularly Imprinted Polymer-based Sensor for Electrochemical Detection of Moxifloxacin	176
<i>Jana Škopalová, Petra Doležalová, Radek Jerga, Petra Krejčí, and Petr Barták</i> Electrochemical Oxidation of 1-Phenylpiperidine and 1-Phenylpiperazine	181
<i>Romana Sokolová, Eliška Jiroušková, Ilaria Degano, Jakub Wantulok, and Jacek Nycz</i> Application of In situ IR Spectroelectrochemical Techniques in Determination of Redox Mechanism of Bioactive Compounds	186
<i>Milan Šýs, Michaela Bártová, Martin Bartoš, Tomáš Mikysek, and Ivan Švancara</i> Electrochemical and Electron Microscopic Characterization of Solid-Disk Shungite Electrodes	191
<i>Renáta Šelešiovská, Oleksandr Matvieiev, Aneta Fendrichová, Lenka Janíková, and Jaromíra Chýlková</i> Electrochemical Oxidation of Systemic Fungicide Metalaxyl and its Determination in Natural Waters	195
<i>Martin Šikula, Eva Vaněčková, Magdaléna Hromádová, and Viliam Koltvoška</i> 3D Printed Microfluidic Cell for Spectroelectrochemical Analysis	200
<i>Libuše Trnková, Xiaochun Li, and Iveta Třísková</i> A Detailed Analysis of the Electron Transfer via Elimination Voltammetry	205
<i>Petr Tůma</i> Electrophoretic Monitoring of 3-hydroxybutyrate as an Indicator of Starvation with Inverse Tunable Electroosmotic Flow	208

<i>Sofija Tvorovská, Jiří Barek, and Bohdan Josypčuk</i>	213
An Enzymatic Biosensor with Amperometric Detection in a Flow Injection Analysis for the Determination of L-lactic Acid: Development and Application	
<i>František Vavřík, Michal Valášek, Gábor Mészáros, Jindřich Gasior, and Magdaléna Hromádová</i>	218
Effect of Functional Group Stabilization on Charge Transport Properties of 4,4'-Biphenol based Molecular Switch	
<i>Michal Zelenský, Jan Fischer, Simona Baluchová, Andrew Taylor, and Karolína Schwarzová-Pecková</i>	223
Electroanalysis of Dopamine on Bare and Chem-mechanically Polished BDD Electrodes	
<i>L. Žaloudková, V. Halama, J. Karban, V. Ostatná, and A. Daňhel</i>	227
Voltammetry of Organometallic Glycomimetics	
<b>Author Index</b>	<b>231</b>



## Probing Charge Transfer and Mass Transport through Zwitterionic Polymer Brushes by Electrochemical Methods: The Supporting Self-Assembled Monolayer Chain Length Matters

Judita Anšti<sup>1,2</sup>, Eva Vaněčková<sup>3</sup>, Monika Spasovová<sup>3</sup>, Milan Houska<sup>3</sup>, Markéta Vrabecová<sup>3</sup>, Eva Vogelová<sup>3</sup>, Barbora Holubová<sup>2</sup>, Vaisocherová-Lísalová Hana<sup>3</sup>, and Viliam Kolivoška<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Physics of the Czech Academy of Sciences, Na Slovance 2, 182 21 Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology Prague, Technická 3, 166 28 Prague, Czech Republic

<sup>3</sup> J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 23 Prague, Czech Republic

### Abstract

Recent advances in biosensing highlighted the importance of zwitterionic poly(carboxybetaine) (pCB) brushes which provide excellent antifouling properties combined with bio-functionalization capacity. These brushes are usually grafted from initiators on self-assembled monolayers (SAMs). Herein, the impact of the alkanethiolate SAM chain length on the structural and functional properties of the pCB brush is inspected. Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were used to investigate the penetrability of the brush for small molecules and interfacial charge transfer characteristics. The SAM length was found to have a substantial impact on all studied characteristics.

**Keywords:** Polymer brushes, Self-assembled monolayers, Antifouling, Cyclic voltammetry, Electrochemical impedance spectroscopy.

### Introduction

In biosensing, electrochemical methods, such as impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV), have been steadily gaining attention in recent years<sup>1</sup>. These two powerful techniques are “label-free”, so high biofouling resistance of utilized components is of the utmost importance for their successful implementation. However, the application of modern, tunable, ultralow fouling materials such as zwitterionic pCB brushes in electrochemical biosensors is still not common. Highly dense zwitterionic pCB brushes are a fairly new research topic<sup>2</sup> and their responsive character to changes in pH, temperature, and ionic strength of the surrounding environment is intensively studied<sup>3</sup>. Another important aspect is imposed by the requirements of impedimetric methods themselves<sup>1</sup>, especially when a redox probe is employed as a sensing element. The most commonly employed probes in recent impedimetric biosensing works are  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  and  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ <sup>4,5</sup>. The evaluated analytical parameter associated with the target analyte is charge transfer resistance ( $R_{ct}$ )<sup>1</sup>. In the case of zwitterionic PBs, the use of charged electroactive probes could be complicated by dipole-ion interactions, which could potentially impact the mass transport of the probe and hence the response of electrochemical biosensors. Therefore, the question of whether, and how, zwitterionic PBs, and the supporting self-assembled monolayers those PBs are grafted from, affect the mass transport of probes and interfacial charge transfer has to be answered before the widespread use of PBs as antifouling structures in impedimetric biosensing.

Herein, we combined CV and EIS approaches to probe the functional (charge transfer and mass transport) properties of antifouling pCB brush grown on alkanethiolate SAMs with varied chain lengths. As a representative zwitterionic brush, poly(carboxybetaine methacrylamide), pCBMAA, was chosen for its good biofouling resistance, biocompatibility, and readiness for

functionalization by biorecognition elements<sup>6,7</sup>. Charge transfer and mass transport properties of pCBMAA grown on alkanethiolate SAMs with varied chain lengths were examined by EIS and CV measurements employing  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  redox probe used frequently in bioanalytical applications<sup>8,9</sup>. Employing the combination of computer-assisted design and extrusion-based 3D printing, we have devised and manufactured a cell dedicated to electrochemical biosensing measurements.

## Experimental part

### *Design and manufacture of electrochemical cell*

We developed a custom-made 3D-printed cell with a three-electrode arrangement for CV and EIS measurements. Its design follows our recently developed approaches for manufacturing 3D printed reaction ware for electrochemical<sup>10-13</sup> and impedimetric<sup>14,15</sup> sensing.

The cell was manufactured employing fused deposition modeling (extrusion-based) 3D printer (I3 MK3S, Prusa Research s.r.o., Prague, Czech Republic). Before printing, the extruder was copiously purged at 250 °C with the respective filament to remove residues of previously used materials. The printing pad was cleaned with acetone (purchased from Penta, Czech Republic) at room temperature. To increase the adhesion between printed objects and the printing pad, the latter was covered by adhesive tape. The bottom cell part with a groove for the working electrode and Kalrez O-ring was printed from PLA filament (PLA Extrafill, Filamentum, Czech Republic) in a bottom-up direction, while the upper cell body with openings for reference and counter electrode, as well as inlet and outlet for inert gas, was printed from polypropylene filament (PP Natural, Fiberlog, Poland) in a top-down direction.

### *Preparation of alkanethiol self-assembled monolayers*

For all procedures requiring an aqueous environment, MilliQ deionized water (resistivity 18.2 M $\Omega$  cm, max. TOC 3 ppb, Millipore, France) was used. Compounds to prepare SAMs were purchased from Prochimia, Poland. They were diluted in absolute ethanol (UV spectroscopic grade, 99.8 %, Lachner, Czech Republic) to form solutions with 1 mM concentration. A polycrystalline gold sheet (10 mm x 10 mm x 0.5 mm, 99.95 %) served as the working electrode purchased from Goodfellow GmbH, Germany. The working electrode was pre-cleaned by 10 min immersion in freshly prepared Piranha solution (96 % sulfuric acid and 30 % hydrogen peroxide, both purchased from Penta, Czech Republic, mixed in a w/v ratio of 3/1). This treatment was followed by copious rinsing with water and anodic electropolishing performed in 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with a piece of Au wire (0.5 mm diameter, 99.99 %) serving as a counter-electrode. The electropolishing was terminated when the whole electrode surface was visibly oxidized. The electrogenerated surface gold oxide layer was subsequently dissolved by immersing in 1M HCl (prepared from suprapure 30 % HCl, Merck, Germany) for 1 min. The electropolishing/oxide removal step was repeated three times. Subsequently, the electrode was copiously rinsed with water and absolute ethanol and either immediately installed in the electrochemical cell (for the control experiment, see below) or immersed in 1mM ethanolic solution of respective SAM-forming compound in a custom-made flat-ended glass test tube. The self-assembly was performed overnight at room temperature without access to light. The such modified electrode was copiously rinsed with absolute ethanol and dried on air and either immediately installed in the electrochemical cell or further functionalized with pCB brush.

### *Characterization of samples by electrochemical measurements*

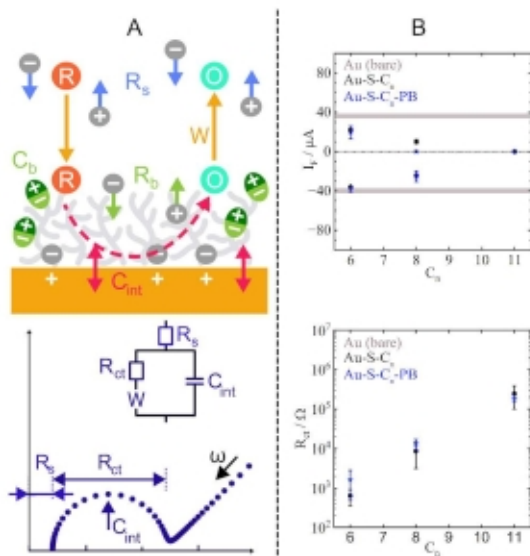
The gold working electrode (either bare or functionalized by alkanethiolate SAMs or SAM/pCBMAA brush bilayers) was inserted into the bottom part of the 3D-printed cell. Perfluoroelastomer O-ring (inner diameter 6.35 mm, thickness 1.78 mm, purchased from

DuPont Kalrez) was inserted in the groove in the top cell part with clean Teflon tweezers. The two cell parts were carefully fitted together and secured by office clips. The cell was immediately filled with 30 mL of aqueous 1mM solution of  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  (98 %, purchased from Sigma-Aldrich) used as the probe additionally containing standard PBS as the supporting electrolyte. Gold wire (0.5 mm diameter, 99.99 %) with a length of 20 cm folded as a serpentine and cleaned by Piranha solution as discussed above was used as the counter electrode. Leakless lab-made Ag/AgCl/1M LiCl assembly was used as the reference electrode. The probe/electrolyte solution was de-aerated by a stream of argon gas (99.998 %, Messer) through the cell for 15 min. All electrochemical measurements were performed using a commercial potentiostat (PGSTAT302N, Autolab, Metrohm). First, we employed CV with the bare gold electrode to determine the standard redox potential ( $E^0$ ) of the probe. Subsequently, gold electrodes modified with either alkanethiolate SAMs or SAM/pCBMAA brush bilayers were inspected. EIS was measured at the DC potential set to  $E^0$  value employing AC perturbation with zero-to-peak amplitude of 5 mV and frequency ranging from  $10^5$  to  $10^3$  Hz. As the next step, CV was performed with the linear (analog) potential sweep in the range of 0.4 and -0.6 V at a polarization rate of  $25 \text{ mV s}^{-1}$ . To confirm the presence of alkanethiolate SAM on the gold electrode, a reductive desorption experiment was performed by extending the cathodic potential limit to -2.0 V. Finally, such treated electrodes were inspected in the original potential range and the obtained response was used to verify the agreement between the potential set in the EIS and the  $E^0$  value of the redox probe.

## Results and discussion

Zwitterionic pCBMAA brushes were first synthesized by the surface-initiated atom transfer radical polymerization protocol described elsewhere<sup>16,17</sup> and then characterized by FT-IRRAS and spectroscopic ellipsometry to evaluate their thickness and relative density. Electrochemical techniques EIS and CV were employed to probe the penetrability of pCBMAA brushes for small molecules represented by the  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  redox probe and the influence of the length of supporting alkanethiolate SAM on charge transfer and mass transport properties. A summary of these results is displayed in Fig. 1 B, evaluating Faradaic peak current (top) from CV and charge transfer resistance ( $R_{ct}$ ) from EIS for systems with pCBMAA brush and without it. For the gold electrode modified by the shortest, C<sub>6</sub> SAM, the obtained CV had a shape similar to that recorded on the bare Au electrode used as a control experiment. Slightly decreased cathodic and anodic  $i_p$  values (36 and 22  $\mu\text{A}$ ) and increased peak-to-peak separation (118 mV) point to subtly slowed charge transfer due to the energetic barrier imposed by the SAM. The presence of the pCBMAA brush on the SAM did not alter  $i_p$  values, indicating that the PB structure did not hinder the mass transport of the probe between the solution and the electrode. For the medium-length, C<sub>8</sub> SAM, the retardation of the charge transfer is more pronounced, with a barely noticeable backward (re-oxidation) Faradaic feature. Corresponding characteristics were also observed for the C<sub>8</sub> SAM modified by the brush. For the longest C<sub>11</sub> SAM, both with and without brush, the cathodic Faradaic feature appears merely as a current onset, with the anodic feature completely missing. Results of CV clearly demonstrate that the interfacial charge transfer is slowed with increasing C<sub>n</sub> value in the SAM and that the mass transport of the redox probe is unaffected by the presence of the brush. SAMs with and without pCBMAA brush were further examined by EIS with the goal of quantifying the charge transfer resistance ( $R_{ct}$ ) and interfacial capacitance ( $C_{int}$ ) values. Values of  $C_{int}$  were determined from  $R_{ct}$  and frequency values corresponding to  $Z''$  maxima,  $f_{max}$ , as  $1/(2\pi f_{max} R_{ct})$ .<sup>1</sup> For the bare gold electrode, obtained data lay on a straight diagonal ( $Z'' = Z'$ ) line, implying that diffusional (Warburg) impedance is dominant in the entire inspected frequency range and the  $R_{ct}$  value is thus immeasurably small. Conversely, electrodes modified with SAMs show semicircles, with  $R_{ct}$  values increasing with C<sub>n</sub>. Values of  $C_{int}$  decrease with C<sub>n</sub>, corroborating that SAMs form

dielectric layers and their thickness increases with this parameter. The presence of the brush has no profound influence on  $R_{ct}$  and  $C_{ov}$  values, which is in line with the results of CV measurements. All results point to the conclusion that pCBMAA brush did not affect the concentration of the probe at the electrode/electrolyte interface and did not hinder the interfacial charge transfer. Therefore, it is safe to conclude that pCBMAA brushes grown on all three supporting SAMs showed excellent penetrability for small molecules and do not disrupt the structural integrity of SAMs.



**Fig. 1.** A) Schematic depiction with model Nyquist plot for probed systems reworked from Ref.<sup>1</sup>. Orange circles = probe in reduced form, turquoise circles = probe in oxidized form.  $R_b$  = the resistance of the polymer brush,  $C_{int}$  = interfacial capacitance,  $C_b$  = capacitance of the brush,  $R_s$  = the resistance of electrolyte. B) Faradaic peak current ( $i_p$ ) from CV (top) and charge transfer resistance ( $R_{ct}$ ) from EIS (bottom) presented as averaged data points with error bars from all measurements performed on pCBMAA brushes of varying chain length ( $C_n$ ) without brushes (black).

## Conclusions

Electrochemical impedance spectroscopy, cyclic voltammetry, and surface plasmon resonance were employed to probe penetrability, charge transfer properties, and resistance to biofouling of zwitterionic poly(carboxybetaine methacrylamide) brush grafted from supporting alkanethiolate SAMs of varying chain length. Whereas the presence of the polymer brush had little impact on the two former properties while providing the assembly with good biofouling resistance, it was found that the SAM chain length had a profound effect on the Faradaic peak current and charge transfer resistance. Seeing as these parameters are critical for the analytical performance of electrochemical biosensors, the results presented herein highlight how

important it is to consider the structure of tunable molecular supports for polymer brushes when designing such assemblies for real-world applications.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Czech Academy of Sciences (L200402251), Premium Lumina quaeruntur of the Czech Academy of Sciences (LQ100101902), and the Czech Science Foundation (21-19779S).

#### References

1. Anthi J, Kolivoška V., Holubová B, Vaisocherová-Lísalová H.: *Biomat. Sci.* (2021).
2. Zhang M., Yu P., Xie J., Li J.: *J. Mat. Chem. B* *10*, 2338 (2022).
3. Blackman L. D., Gunatillake P. A., Cass P., Locoock K. E. S.: *Chem. Soc. Rev.* *48*, 757 (2019).
4. Campiña J. M., Martins A., Silva F.: *J. Phys. Chem. C* *113*, 2405 (2009).
5. Choi E. Y., Azzaroni O., Cheng N., Zhou F., Kelby T., Huck W. T. S.: *Langmuir* *23*, 10389 (2007).
6. Višová I. a 11 spoluautorů: *Adv. Mat. Sci.* *9*, 2201210 (2022).
7. Barbey R., Lavanant L., Paripovic D., Schüwer N., Sugnaux C., Tugulu S., Klok H. A.: *Chem. Rev.* *109*, 5437 (2009).
8. Schrattecker J. D., Heer R., Melnik E., Maier T., Fafilek G., Hainberger R.: *Biosens. Bioelectron.* *127*, 25 (2019).
9. Lazar J., Schnelting C., Slavecheva E., Schnakenberg U.: *Anal. Chem.* *88*, 682 (2016).
10. Giorgini Escobar J. a 11 spoluautorů: *Electrochim. Acta* *360*, 136984 (2020).
11. Poltorak L., Rudnicki K., Kolivoška V., Sebechlebská T., Krzyczmonik P., Skrzypek S.: *J. Hazard. Mater.* *402*, 123411 (2021).
12. Vaněčková E. a 11 spoluautorů: *ChemElectroChem* *8*, 2137 (2021).
13. Dakošová O., Melníková E., Naumowicz M., Kolivoška V., Vaněčková E., Navrátil T., Labuda J., Veteška P., Gál M.: *Chemosphere* *313*, 137517 (2023).
14. Vivaldi F., Sebechlebská T., Vaněčková E., Biagini D., Bonini A., Kolivoška V.: *Anal. Chim. Acta* *1203*, 339600 (2022).
15. Sebechlebská T., Vaněčková E., Chojnínska-Młynarczyk M. K., Navrátil T., Poltorak L., Bonini A., Vivaldi F., Kolivoška V.: *Anal. Chem.* *94*, 14426 (2022).
16. Višová I. a 10 spoluautorů: *Macromol. Biosci.* *20*, (2020).
17. Vaisocherová-Lísalová H. a 12 spoluautorů: *Anal. Chem.* *88*, 10533 (2016).

## Application of Metal Reference Electrodes (Využití kovových referenčních elektrod)

Martin Baroch<sup>a</sup>, Luděk Míka<sup>b</sup>, and Hana Dejmková<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Chemistry Education, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

### Abstract

In this work, reference electrodes made of several materials were fabricated and tested. Exhaustive testing of the electrodes was performed employing potentiometric measurements, where long-term and short-term stability had been assessed; by cyclic voltammetry, in which influence on deformation and shift of voltammograms were observed; and by FIA with amperometric detection, which served as a testing setup for the intended main use of these electrodes in flow detectors. The most stable and repeatable performance, based on mentioned procedures, was obtained for antimony electrodes, which were then used for the fabrication of a miniaturized amperometric detector.

**Keywords:** Potentiometry, Amperometry, Voltammetry, Reference electrodes, Miniaturization.

### Úvod

Znalost napětí vkládaného mezi pracovní a referenční elektrodu je jednou z klíčových potřeb pro elektrochemická měření. Z tohoto důvodu je nutné, aby referenční elektroda měla během měření potenciál stabilní a dobře definovatelný, v ideálním případě by taková elektroda měla být také nepolarizovatelná<sup>1</sup>. Nejčastěji tyto elektrody sestávají z kovového drátku pokrytého vrstvou nerozpustné soli daného kovu ponořeného do roztoku soli, která má se zmíněnou nerozpustnou solí společný aniont. Tento systém pak musí být od měřeného roztoku oddělen fritou, aby bylo zamezeno případným kontaminacím. Nevýhodou této konstrukce je omezená možnost jejich miniaturizace, právě kvůli fritě, která je pro potřeby zejména průtokových měření zásadní, aby se minimalizovalo rozmývání zón analytu v detektoru<sup>2,3</sup>.

Jednou z možností pro zmenšení rozměrů referenční elektrody je použití samotného kovového drátku – čistého nebo modifikovaného – ponořeného do elektrolytu s obsahem vhodných protiontů. Příkladem může být použití pochloridovaného stříbrného drátku a přidání chloridových aniontů přímo do základního elektrolytu. Nevýhodou tohoto postupu je potřeba udržovat stabilní, nejlépe vyšší, koncentraci chloridů v průběhu všech měření<sup>4</sup>. Obdobným přístupem jsou tzv. elektrody kov-oxid, primárně fungující jako pH elektrody a využívající jako protiont  $H^+$ , jehož koncentrace bývá kontrolována i za jinými účely a bez zvláštních opatření. Příkladem takových elektrod jsou antimonové nebo bismutové elektrody studované v této práci; jejich potenciál je odvislý od poměru  $Sb/Sb_2O_3$  a  $Bi/Bi_2O_3$  na jejich povrchu<sup>4</sup>. Posledním typem studovaným v této práci byly elektrody hydrogenpaladiové, které mají, stejně jako předchozí, potenciál závislý na pH, jen se v tomto případě jedná o rovnovážný potenciál daný poměrem mezi vodíkem absorbovaným do struktury palladia a vodíkovými kationty, přítomnými v roztoku<sup>5,6</sup>.

Cílem této práce bylo připravit a otestovat zmíněné referenční elektrody ve smyslu krátkodobé a dlouhodobé stability a ověřit jejich chování a vlivu při použití ve voltamtrických metodách

a zejména v průtokových amperometrických měřeních s výhledem na jejich využití pro možnosti miniaturizace průtokových elektrochemických detektorů.

### Experimentální část

Antimonové a bismutové elektrody byly připravené roztavením daného kovu v dusíkové atmosféře. Tavenina kovu pak byla nasána do skleněné Pasteurovy pipety s nerezovým drátem sloužícím jako budoucí elektrický kontakt. Poté byly elektrody postupně očištěny roztokem 1 mol/L HCl, isopropanolem a vodou v ultrazvukové lázni. Každý čistící krok trval 30 minut.

Hydrogenpalladiové (PdH) elektrody byly připraveny potenciostatickým generováním vodíku z roztoku 0,1 mol/L HCl při  $-0,9$  V, po dobu přibližně 5 hodin. Příprava probíhala v tříelektrodevém uspořádání s paladiovým drátkem zapojeným jako pracovní elektroda.

Potenciometrická měření byla prováděna ve dvouelektrodevém uspořádání s potenciálovým rozdílem měřeným vždy mezi standardní argentochloridovou referenční elektrodou a studovanou kovovou referenční elektrodou.

Voltametrická měření byla prováděna v tříelektrodevém uspořádání s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku a platinovou pomocnou elektrodou. Jako referenční elektroda byla použita buď klasická argentochloridová elektroda nebo testované kovové referenční elektrody. Průtoková amperometrická měření byla prováděna v tzv. wall-jet uspořádání v přepadové nádobce. Jako základní elektrolyt byl použit Britton-Robinsonův pufr o koncentraci 0,2 mol/L. Jako analyt pro cyklickou voltimetrii a amperometrii byl použit roztok hexachloroiriditanu draselného o koncentraci 1,0 mmol/L rozpuštěného v základním elektrolytu o potřebném pH.

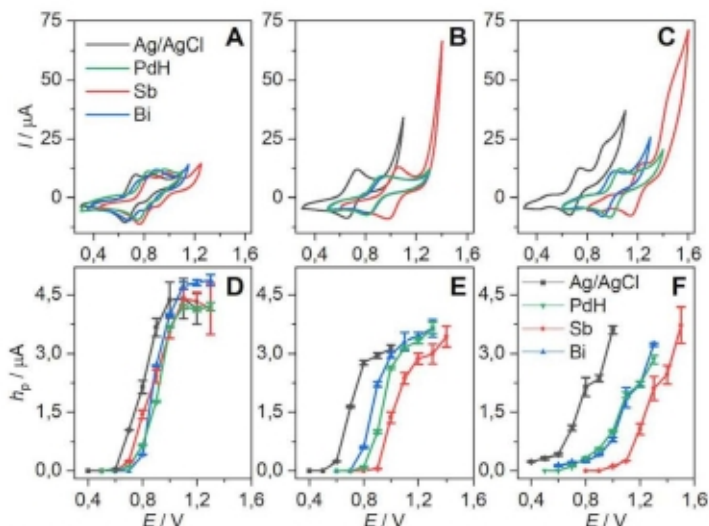
### Výsledky a diskuse

Během potenciometrických měření byla u všech elektrod pozorována změna potenciálu v závislosti na pH roztoku v rozsahu od 2,0 do 12,0. Nejblíže se teoretické hodnotě, tj. 59 mV/pH, přiblížila elektroda antimonová se směrnici kolem 47 mV/pH. Bismutová elektroda, která je stejného typu, měla směrnici pouze kolem 30 mV/pH, přičemž jednotlivá měření měla rozptyl až  $\pm 25$  mV. Tento jev mohl být způsoben nepravidelným oxidováním povrchu elektrody. Hydrogenpalladiové elektrody vykazovaly směrnici nejmenší, která se v průběhu pěti týdnů zmenšila z 22 mV/pH na 17 mV/pH. Zároveň u této elektrody postupně progradovala odchylka v bazické oblasti. Pro zlepšení odezvy bylo tedy nutné elektrodu rehydrogenovat. Z pohledu krátkodobé stability a sledování potenciálového driftu se jako nejstabilnější jeví elektrody antimonové a bismutové, se změnou potenciálu pod 2 mV za hodinu. Naopak největší pokles byl zaznamenán u hydrogenpalladiových elektrod v bazickém prostředí, kdy činil až 5 mV za hodinu.

Výsledky voltametrických měření, prováděných při pH 3,0; 7,0 a 11,0, vykazují posun anodického i katodického signálu hexachloroiriditanu, přibližně odpovídající potenciálovým rozdílům mezi argentochloridovou a studovanou referenční elektrodou, naměřeným potenciometricky, jak je možné vidět na obrázku 1A – C. Nejpesnější shoda byla naměřena u antimonových elektrod, naopak největší odchylky, až 90 mV, byly zjištěny u bismutových elektrod. Zároveň u těchto elektrod byla pozorována drobná deformace voltametrických křivek, kdy se zvětšila hodnota  $\Delta E_p$  mezi anodickým a katodickým signálem, v neutrálním a bazickém pH, oproti argentochloridové elektrodě.

Hydrodynamické voltamogramy získané při amperometrických měřeních v prostředí o pH 3,0; 7,0 a 11,0, zobrazená na obrázcích 1D – F, vykazují větší odchylky od potenciometricky

získaných hodnot, oproti voltametriickým měřením, zejména v kyselé a neutrální oblasti pH. To může být s největší pravděpodobností způsobené přítokem elektrolytu a posunutím rovnováhy mezi čistým kovem a oxidem v případě antimonových a bismutových elektrod a mezi absorbovaným vodíkem a vodíkovými kationty v případě hydrogenpaládiových elektrod, na rozhraní elektroda/elektrolyt. Nicméně průběh hydrodynamických voltamogramů nebo nijak významně deformovaný oproti standardně používané argentochloridové elektrodě.



**Obr. 1.** Cyklické voltamogramy (A – C) 1,0 mmol/L hexachlorořiditanu draselného v 0,2 mol/L Britton-Robinsonově pufru o pH 3,0 (A); 7,0 (B) a 11,0 (C); a hydrodynamické voltamogramy stejného analytu při použití pufru o pH 3,0 (D); 7,0 (E) a 11,0 (F) jako nosného elektrolytu, za použití argentochloridové (černá), hydrogenpaládiové (zelená), antimonové (červená) a bismutové elektrody (modrá).

## Závěr

Referenční elektrody vyrobené z materiálů citlivých na změnu pH byly úspěšně otestovány pomocí tří základních elektrochemických technik. Jako nejslibnější pro využití v miniaturizovaných detektorech se jeví elektroda antimonová – vzhledem k její velmi dobré stabilitě a minimální deformaci jak voltametriických tak amperometriických křivek. Naopak jako nejméně vhodná se jeví elektroda bismutová – zejména kvůli velkým odchylkám při voltametriických měřeních a nestabilitě odezvy na pH. Hydrogenpaládiová elektroda vykazovala, stejně jako antimonová, velmi dobré elektrochemické chování, nicméně vzhledem k principu této elektrody je nutná občasná rehydrogenace, což ztěžuje její případné využití v kompaktních detektorech.



### Acknowledgments

The research was performed within the framework of Specific University Research (SVV260690) and funded by the Grant Agency of Charles University (project 210122).

### References

1. Inzelt G., Lewenstam A., Scholz F.: *Handbook of Reference Electrodes*. Springer, Berlin 2013.
2. van den Brink F. T. G., Olthuis W., van den Berg A.: *TrAC Trends Anal. Chem.* *70*, 40 (2015).
3. Shinwari M. W., Zhitomirsky D., Deen I. A., Selvaganapathy P. R., Deen M. J., Landheer D.: *Sensors*. *10*, 1679 (2010).
4. Glab S., Hulaniicki A., Edwall G., Ingman F.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* *21*, 29 (1989)
5. Polk B. J., Stelzenmuller A., Mijares G., MacCrehan W., Gaitan M.: *Sens. Actuators, B.* *114*, 239 (2006).
6. Webster T. A., Goluch E. D.: *Lab Chip.* *12*, 5195 (2012).

## Molecularly Imprinted Polymers for Selective Extraction of Xenobiotics (Molekulárně otištěné polymery pro selektivní extrakci xenobiotik)

Jan Bartáček<sup>a</sup>, Martin Kocúrik<sup>a</sup>, Jaroslav Pochobradský<sup>a</sup>, Jan Svoboda<sup>a</sup>,  
Jaromíra Chýlková<sup>b</sup>, and Miloš Sedlák<sup>a</sup>

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

E-mail: jan.bartacek@upce.cz

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

### Abstract

Covalently prepared molecularly imprinted polymers (MIPs) were developed for the adsorption of 1-naphthaleneacetic acid (NAA). Molecular imprinting was performed using two different NAA derivatives. Both types of MIPs were able to adsorb >98% NAA from solution within 10 min. and desorb it quantitatively and can be used in at least 10 consecutive adsorption/desorption cycles. Ester-derived MIPs also showed selectivity for NAA in a mixture with other acids and were effective for continuous flow adsorption of NAA from the solution.

**Keywords:** 1-naphthaleneacetic acid, Molecularly imprinted polymers, Electrochemical determination, Specific sorption material.

### Introduction

Industrial agriculture is a major polluter, contaminating the environment with pesticides and agrochemicals. Molecularly imprinted polymers (MIPs) are synthetic materials that can selectively adsorb a target molecule from a mixture of other molecules<sup>1</sup>. MIPs are prepared by a non-covalent or covalent method. A non-covalent MIP can be prepared by mixing a template molecule with monomers that are capable of non-bonding interactions<sup>1</sup>. The covalent method involves attaching the template molecule to a polymerizable group via a cleavable linker, leaving a pendant group on the polymer that can interact with the template during rebinding. MIPs have been used successfully for the selective adsorption of various substances, including agrochemicals<sup>2</sup>.

In our work, novel MIPs were prepared for the selective adsorption of 1-naphthaleneacetic acid (NAA) by a covalent method using two different hydrolyzable linkers between the template and polymerizable group—ester (MIPs-A) and *N*-methylhydroxamate functionality (MIPs-B) (Fig. 1)<sup>3</sup>. MIPs are a promising tool for the selective adsorption of target molecules from complex mixtures. Both covalent and non-covalent methods can be used to prepare MIPs, with each method having its advantages and disadvantages. MIPs are likely to find wider applications in areas such as environmental monitoring, food safety, and drug discovery.

### Experimental part

#### *Adsorption/desorption experiments*

To conduct adsorption/desorption experiments, MIPs were added to a glass vial containing NAA stock solution (0.5 mL,  $10^{-3}$  mol·L<sup>-1</sup>, glycine-HCl buffer at pH = 2.6) and 2 drops of EtOH. The vial was then capped and sonicated in an ultrasound bath at 20°C for a specific time period. After filtering the suspension, the clear solution was analyzed electrochemically. The used MIPs were then placed in a glass vial containing 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH solution (EtOH:water; 1:1), sonicated for 10 min at 50°C, filtered, and analyzed electrochemically using Voltammetric analysis on an electrochemical analyzer EP 100VA (HSC Servis, Slovakia). The measurement

was conducted using a three-electrode cell, with a working electrode BDDE (Windsor Scientific Ltd., UK, active surface area of 7.07 mm<sup>2</sup>, inner diameter of 3 mm, resistivity of 0.075 Ω cm with a B/C ratio during deposition of 1000 ppm), a reference saturated AgCl electrode (Ag/AgCl/KCl (sat.)), and platinum wire as an auxiliary electrode (both from Monokrystal, Czech Republic).

## Results and Discussion



**Fig. 1.** Scheme of preparation of molecularly imprinted polymers for NAA adsorption.

This study tested the ability of molecularly imprinted polymers, synthesized in our laboratory (**Fig. 1**) (MIPs) to selectively adsorb naphthaleneacetic acid (NAA) from solution. A reference time of 1 hour was chosen for sample analysis. The working solution contained 10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup> NAA in glycine-HCl buffer, with the buffer chosen for its zwitterionic character and pH set at 2.6 to suppress NAA dissociation. The amount of polymer was chosen as 10% relative to the volume of the working solution, with 50 mg of NAA caught out from the solution and monitored by voltammetric analysis.

**Table I.**

Summarization of NAA adsorption results.

Polymer	Surface area (m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> )	Swellability in water (mL·g <sup>-1</sup> )	Adsorbed NAA <sup>a</sup> (%)
NIP	6.8 ± 0.6	1.5	23
MIPs-A	7.8 ± 0.9	2.5	>98
MIPs-B	12.8 ± 2.3	2.5	>98

<sup>a</sup> From 0.5 mL of 10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup> NAA in 0.1 mol·L<sup>-1</sup> glycine-HCl buffer at pH = 2.6; 1 h; 20 °C; 2 drops of EtOH

Despite the low surface area, significant uptake of NAA into the polymer matrix was observed, indicating the key importance of swelling. Non-imprinted polymer (NIP) caught out only 23% of NAA, while both MIPs prepared were able to catch out >98 % of NAA. Swellability, rather than the surface area in the dry state or pendant groups, was found to be the key factor in determining the ability of the copolymer to absorb NAA.

The amount of polymer required for quantitative adsorption of NAA from the solution was optimized. For both MIPs-A and MIPs-B, 40 mg of the polymer was found to be sufficient. For comparison, different amounts of non-imprinted polymer (NIP) were studied, which even at a loading of 80 mg was not able to catch out more than 30% of NAA from the solution. The time required for quantitative NAA uptake was also determined. For both MIPs-A and MIPs-B, only 10-30 minutes was sufficient.

The possibility of releasing adsorbed NAA and MIPs possible reusability was studied. Desorption was first carried out in aqueous sodium hydroxide solution at elevated temperature, but only trace amounts of NAA were released. Ethanol was found to result in a higher amount of NAA release, with 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH in ethanol-water (50% v/v) mixture resulting in

quantitative desorption of adsorbed NAA within only 10 minutes at elevated temperature. Catching out NAA from the model solution, filtration of the polymer on a sintered frit, drying it, and placing it in an ethanol-water solution of NaOH showed that even after 10 cycles, the polymers **MIPs-A** and **MIPs-B** retain their original properties. The reusability results of the prepared MIPs clearly showed that the MIPs prepared were able to catch out NAA from the solution repeatedly.

The developed methodology with **MIPs-A** polymer was validated to use in real water samples (tap water, well water) spiked with NAA ( $10^{-3}$  mol·L<sup>-1</sup> NAA). To simplify the procedure, solutions of NAA were prepared in water samples that were acidified with HCl to pH<3. The results show that the developed methodology can be applied to real samples without a loss of efficiency.

**MIPs-A** (which is significantly easier to prepare) was used for continuous flow removal of NAA from the solution. The lab-scale experiment was performed by preparing a 30 % methanolic solution of NAA at a concentration of  $1 \cdot 10^{-2}$  mol·L<sup>-1</sup> and adjusting the pH of the solution to pH = 2.8. The polyethylene column was packed with 0.81 g of **MIPs-A** and the column was fitted with a fitting, the column inlet was from the NAA stock solution and the column outlet was connected via the fitting to the UV detector. After the equilibration, the column was able to absorb NAA from 30 mL of the stock solution in each cycle, when more than 99% NAA were caught out. The molar adsorption capacity of the **MIPs-A** polymer was therefore estimated as 0.373 mmol·g based on the above experiment. The experiment also showed an equilibrium after the alkaline regeneration which was conducted by washing with 30% (v/v) of methanolic NaOH solution. After this washing, less than 0.25% of NAA was eluted from the column.

## Conclusions

We have developed new sorption materials using molecularly imprinted polymers to adsorb 1-naphthaleneacetic acid (NAA). This was achieved through a novel suspension polymerization method using visible light. We tested two types of polymers, the ester-derived MIPs and N-methylhydroxamate-linked MIPs. Both types of polymers were effective in binding NAA to their matrix and could be reused up to 10 times. Furthermore, the ester-derived MIPs are cost-effective and highly efficient in removing NAA from solutions. In the final testing, we continuously adsorbed a  $10^{-2}$  mol·L<sup>-1</sup> NAA solution, which was performed at least 10 times. The capacity of the polymer was 69.5 mg of NAA per 1 g of polymer. We validated the method for the adsorption of NAA from spiked samples of tap and well water, where the efficiency was the same as in the model buffered solution. These findings will be valuable for further research on developing selective MIPs for the adsorption of other carboxylic acids.

## Acknowledgments

The authors thank the University of Pardubice for financial support and Prof. Zdeňka Kolská for surface area analysis.

## References

1. Mayes A.G., Whitcombe M.J.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1742 (2005).
2. Parlapiano M., Akyol Ç., Foglia A., Pisani M., Astolfi P., Eusebi A.L., Fatone F.: *J. Environ. Chem. Eng.* 9, 105051 (2021).
3. Kocúrik M., Bartáček J., Svoboda J., Kolská Z., Chýlková J., Sedlák M.: *Polymer* 256, 125189 (2022).

**Analytical Derivatization for Identification of Electrochemical Oxidation Products of Fentanyl**  
**(Analytická derivatizace pro identifikaci produktů elektrochemické oxidace fentanylu)**

Petr Barták <sup>a</sup>, Jana Skopalová <sup>a</sup>, Radek Jerga <sup>a</sup>, Dana Štolbová <sup>a</sup>, Tomáš Navrátil <sup>b</sup>, and Jan Langmaier <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Palacký University Olomouc, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, 17. listopadu 1192/12, 779 00 Olomouc, Czech Republic, E-mail: petr.bartak@upol.cz

<sup>b</sup> J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic

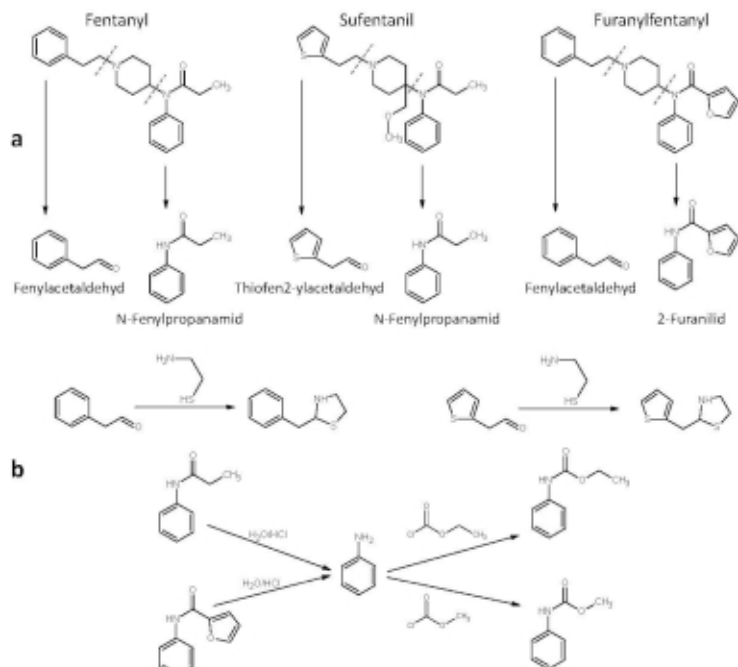
**Abstract**

Analytical derivatization and GC-MS analysis were employed for the identification of main products from the electrochemical oxidation of fentanyl derivatives. Chemical derivatization provides proof of the chemical reactivity of functional groups in oxidation products and serves for the chemical conversion of target compounds into the second series of derivatives to confirm the identification of particular products. Using the direct GC-MS analysis of oxidation products, derivatization of aldehydes with cysteamine and derivatization of amides by acidic hydrolysis and subsequent reaction with ethylchloroformate, phenylacetaldehyde, and N-phenylpropanamide were unambiguously identified as oxidation products from fentanyl, thiophen-2-ylacetaldehyde, and N-phenylpropanamide from sufentanil, and phenylacetaldehyde and 2-furanylid from furanylfentanyl.

**Keywords:** Fentanyl, Sufentanil, Furanylfentanyl, Electrochemical oxidation, Derivatization, Gas Chromatography-Mass Spectrometry.

**Úvod**

Fentanyl a jeho analoga jsou syntetické opioidy běžně používané v medicíně jako analgetika a anestetika <sup>1</sup>. S těmito látkami je spojena mimořádně vysoká míra rizika smrtelného předávkování při nelegálním zneužívání, zpravidla v kombinaci s jinými návykovými látkami <sup>2</sup>. Je dobře známo, že rostoucí zneužívání opioidů – včetně fentanylu – je v USA alarmujícím problémem a pro výstižné označení tohoto neblahého stavu se často používá termín „opioidní epidemie“ <sup>3,4</sup>. Opioidy jsou nejčastější příčinou úmrtí z předávkování a počet smrtelných případů se stále zvyšuje <sup>5</sup>. Významný nárůst úmrtí z předávkování (včetně předávkování opioidy) byl hlášen v roce 2020, s největší pravděpodobností jako jeden z mnoha důsledků pandemie COVID-19 (cit. <sup>6</sup>). V České republice bylo v roce 2020 hlášeno 28 úmrtí na předávkování opioidy <sup>7</sup>. Nepříznivá situace vyžaduje mimo jiné i vývoj nových, rychlých, levných, efektivních a dobře dostupných metod pro analýzu těchto látek. Deriváty fentanylu je možné analyzovat elektrochemicky. Mechanismus elektrochemické oxidace fentanylu byl studován při vývoji analytické metody pro rychlou kvantifikaci fentanylu v roztocích pomocí ex-situ adsorpční voltametrie <sup>8,9</sup>. K řešení mechanismu reakce byla mimo jiné použita plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Tyto experimenty byly zaměřeny na identifikaci hlavních navrhovaných produktů elektrochemické oxidace fentanylu (fenylacetaldehyd a N-fenylpropanamid), sufentanilu (thiopen-2-ylacetaldehyd a N-fenylpropanamid) a furanylfentanylu (fenylacetaldehyd a 2-furanylid) (Obr. 1). Prezentovaný příspěvek je zaměřen na využití analytické derivatizace cílových látek pro potvrzení identifikace oxidačních produktů pomocí GC-MS.



**Obr. 1.** Struktury studovaných látek a reakční schemata jejich elektrochemických přeměn (a) a následných derivatizačních reakcí oxidačních produktů (b).

### Experimentální část

2 mg příslušného fentanylu (fentanyl, sufentanil, furanylfentanyl) byly rozpuštěny ve 2 ml methanolu, smíseny s 2 ml 0,1M  $CH_3COONH_4$  ve vodě a elektrolyzovány na platinové sítkové elektrodě při 1,1 V (ref. SCE, pomocná Pt elektroda v odděleném prostoru s 0,1M  $NaClO_4$ ) po dobu 30 min. Elektrolyzát (4 ml) byl zředěn 4 ml redistilované vody a extrahován 2 ml ethylacetátu v centrifugační zkumavce. Organická fáze byla odebrána do čisté vialky, obsah zkumavky byl alkalizován 50  $\mu$ l 0,2M NaOH a extrahován 2 ml ethylacetátu. Spojené extrakty byly odpařeny mírným proudem dusíku při 50°C do sucha.

*Přímá analýza oxidačních produktů:* Odparek byl rekonstituován v 1 ml ethylacetátu a analyzován plynovou chromatografií.

*Derivatizace aldehydů:* K odparku byl přidán 1 ml roztoku cysteaminu (0,568 g cysteamin hydrochloridu ve 20 ml vody, alkalizovat 1M NaOH na pH 8 a doplnit do 25 ml), směs byla promíchána (5 min) a inkubována při laboratorní teplotě 1 hod. Deriváty byly extrahovány 2 ml ethylacetátu a analyzovány.

*Derivatizace amidů:* Odparek byl rozpuštěn v 1 ml 1M HCl a hydrolyzován 1 hod při 80°C. Po ochlazení byl roztok neutralizován 1M NaOH, bylo přidáno 25 µl methyl- nebo ethylchlorformiátu a 1 ml 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, roztok byl inkubován 30 min při laboratorní teplotě, extrahován 2 ml ethylacetátu a extrakt byl analyzován.

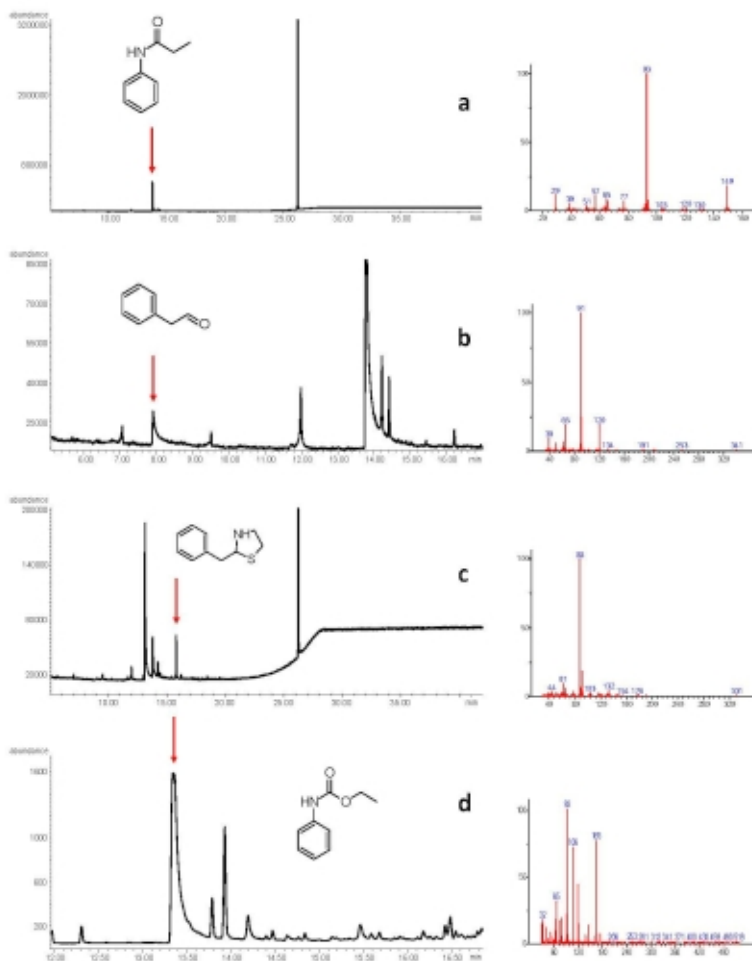
Analýza byla provedena na plynovém chromatografu Agilent 7890A s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975C (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) s nepolární kapilární kolonou HP-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), heliem jako nosným plynem (0,9 ml/min) a teplotním programem 50°C – 2 min – 10°C/min – 300°C – 15 min. Dávkován byl 1 µl vzorku s dávkovacím pulsem 200 kPa, 0,3 min.

### **Výsledky a diskuse**

Pro spolehlivou identifikaci oxidačních produktů a její potvrzení byly použity dvě základní strategie. První, přímočarý postup byl založen na přímé analýze oxidačních produktů po jednoduché extrakci z elektrolyzovaného vzorku (Obr. 2a,b), porovnání získaných hmotnostních spekter s databází a porovnání získaných spekter a retenčních časů s údaji získanými analýzou autentických standardů cílových látek. Po elektrolyze je však ve vzorku stále přítomno významné množství fentanylu a dalších oxidačních produktů a nelze zcela vyloučit, že tepelná degradace těchto látek v nástřikovém prostoru plynového chromatografu nemůže vést ke vzniku stejných produktů jako elektrolyza. Pro prokázání přítomnosti detegovaných oxidačních produktů ve vzorku ještě před GC-MS analýzou byla provedena derivatizace která zde slouží jako nástroj kvalitativní analýzy (i) prokázáním chemické reaktivity příslušné funkční skupiny a (ii) převedením cílových látek na druhou řadu derivátů, které jsou následně identifikovány. Pro chemickou přeměnu příslušného aldehydu byla použita jednoduchá reakce s cysteaminem vedoucí ke vzniku odpovídajícího substituovaného 1,3-thiazolidinu (Obr. 2c). V případě substituovaného amidu byla použita dvoukroková derivatizace využívající kyselou hydrolyzu a následně derivatizace uvolněného anilinu methyl- nebo ethylchlorformiátem za vzniku odpovídajícího methyl- nebo ethyl N-fenylkarbamátu (Obr. 2d). Všechny provedené experimenty tak poskytují data potvrzující přítomnost fenylacetaldehydu a N-fenylpropanamidu ve vzorku elektrolyzátu fentanylu. Experimenty provedené se sufentanilem a furanylfentanylem potvrzují, že elektrochemickou oxidací těchto látek vzniká vedle již zmiňovaného fenylacetaldehydu a N-fenylpropanamidu ještě analogický thiofen-2-ylacetaldehyd a 2-furanilid.

### **Závěr**

Analytická derivatizace a plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií se osvědčily jako vhodné nástroje pro identifikaci oxidačních produktů a řešení reakčního mechanismu elektrochemické oxidace fentanylu a dalších opioidů. Provedené experimenty potvrdily přítomnost fenylacetaldehydu a N-fenylpropanamidu v roztoku po elektrochemické oxidaci fentanylu. V případě sufentanilu byl jako odpovídající aldehydickej produkt prokázán thiofen-2-ylacetaldehyd a v případě furanylfentanylu byl jako amidický produkt prokázán zcela analogický 2-furanilid.



**Obr. 2.** Chromatogramy a hmotnostní spektra odpovídající přímé analýze oxidačních produktů fentanylu (a,b), derivatizaci fenylacetaldehydu cysteaminem (c) a hydrolyze a derivatizaci N-fenylpropanamidu (d).

#### Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation (project No. 20-07350S) and by the Palacký University Olomouc (project No. IGA\_PrF\_2023\_027).



## References

1. Kozák J., Lejško J., Vrba I.: Opioidy. Maxdorf, Praha 2021.
2. Shoff E.N., Zanev M.E., Kahl J.H., Hime G.W., Boland D.M.: *J. Anal. Toxicol.* *41*, 484 (2017).
3. Nelson L.S., Juurlink D.N., Perrone J.: *JAMA* *314*, 1453 (2015).
4. Lucyk S.N., Nelson L.S.: *Ann. Emerg. Med.* *69*, 91 (2017).
5. National Institute on Drug Abuse: Drug Overdose Death Rates. <https://nida.nih.gov/research-topics/trends-statistics/overdose-death-rates>, Downloaded March 3<sup>rd</sup> 2023.
6. Ciccarone D.: *Curr. Opin. Psychiatry.* *34*, 344 (2021).
7. Mravčík V., Chromynová P., Grohmannová K., Janíková B., Rous Z., Grohmannová L., Franková E., Nechanská B.: Zpráva o problematickém užívání psychoaktivních léků v České republice 2021. Úřad vlády České Republiky, Praha 2021.
8. Jerga R., Štolbová D., Zajacová Cechová M., Barták P., Skopalová J.: Elektrochemická oxidace a voltametrické stanovení fentanylu. 73. Zjazd chemikov. Horný Smokovec, Slovenská republika, 6. - 10. 9. 2021. Sborník příspěvků. *ChemZi* *17/1* (2021) 174.
9. Jerga R., Barták P., Skopalová J.: Voltammetric Determination of Fentanyl and its Analogues. XI. Moderní elektrochemické metody. Jetřichovice, Česká republika, 8.-12. 11. 2021. Sborník přednášek, str. 108-111.

## Determination of Surfactants Using Potentiometric Titration (Stanovení povrchově aktivních látek pomocí potenciometrické titrace)

Michaela Bártová and Tomáš Mikysek

University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical  
Chemistry, Studentská 573, 53210 Pardubice, Czech Republic,  
E-mail: michaela.bartova@student.upce.cz

### Abstract

This contribution is focused on the use of potentiometric titration for the determination of anionic surfactants. For this purpose ion-selective electrode of carbon paste type was used. Carbon paste consisted of graphite powder and o-nitrophenyloxyethylene as a pasting liquid where ion pairs formed during potentiometric titration were extracted. The electrode was tested for the determination of anionic surfactants in commercial samples. Performed experiments also include a comparison of manual and automatic titration.

**Keywords:** Potentiometric titration, Surfactants, Carbon paste electrode, Coated-wire electrode.

### Úvod

Princip potenciometrické titrace tenzidů je založen na tvorbě iontových párů. Takovéto páry vznikají mezi titračním činidlem obsahující lipofilní aniont nebo kationt a analyzovanou látkou, která obsahuje lipofilní k titrantu opačně nabitý iont. Z důvodu nízké rozpustnosti iontových asociátů ve vodě je lze v roztoku nalézt v podobě sraženin<sup>1</sup>. Samotný průběh měření pak spočívá v záznamu změny napětí měrného článku ponořeného do sledovaného roztoku, a to v závislosti na přidávku titrantu, z čehož je možné následně stanovit koncentraci daného analytu<sup>2</sup>.

Z hlediska elektrod jsou pro potenciometrické titrace povrchově aktivních látek často používané iontově selektivní elektrody (ISE) s kapalinovou či polymerní membránou. Příkladem ISE s kapalinovou membránou může být uhlíková pastová elektroda (CPE) a v případě ISE s polymerní membránou se může jednat o coated-wire elektrodu (CWE)<sup>3,4</sup>. Za jednu z výhod těchto elektrod lze pokládat to, že jsou použitelné pro stanovení všech typů tenzidů. Tento fakt je možný díky přidávku plastifikátoru do polymerní membrány či uhlíkové pasty (jako kapalné pojivo viz níže), do něhož jsou iontové páry, tvořené během titrace, současně extrahovány<sup>5</sup>. Další výhodou je i jejich snadná příprava, kterou lze provést v laboratoři. Coated-wire elektrody jsou konstruovány z vodivého materiálu (např. hliníkový drát), který má na konci polymerní membránu obsahující plastifikátor<sup>6-10</sup>. Podmínkou volby vodivého materiálu je inertnost vodiče vůči analytu a dalším látkám v měřeném roztoku<sup>11</sup>. V porovnání s uhlíkovými pastovými elektrodami vykazují coated-wire elektrody poměrně vysoký ohmický odpor. CPE jsou tvořeny směsí uhlíkové prášku a kapalného pojiva, které jsou společně vymíchány do pasty<sup>4</sup>. Jako kapalné pojivo lze v tomto případě volit přímo plastifikátor<sup>12</sup>. Alternativou k těmto jednoduše zhotovitelným elektrodám jsou na trhu dostupné elektrody (např. od Metrohm, Mettler Toledo, aj.), které jsou přímo určené pro titrace tenzidů.

Kromě potenciometrické titrace lze pro stanovení tenzidů využít i klasičtější a dříve hojně využívanou titrační metodu, kterou je tzv. dvoufázová titrace. Tento typ titrace se aplikuje výhradně pro ve vodě rozpustné aniontové povrchově aktivní látky, které jsou titrovány odměrným roztokem kationtového tenzidu. Titrace probíhá ve vodném prostředí za účasti

směsného indikátoru a organického rozpouštědla (chloroform), ve kterém je titrací vzniklá hydrofobní sůl rozpustná. Ta je následně během titrace extrahována do organické fáze. Bod ekvivalence je dán barveným přechodem vybraného indikátoru rozpouštěného v organické vrstvě<sup>13</sup>.

Mezi další analytické metody, kterými je možné stanovit tenzidy patří např. metody chromatografické, kam lze zařadit tenkovrstvou, kapalinovou a plynovou chromatografii. Taktéž zde nalézájí uplatnění i další elektrochemické metody, jako polarografie, voltametrie nebo přímá potenciometrie<sup>13,14</sup>. Dále jsou využitelné i metody jako ultrafialová spektroskopie, infračervená, hmotnostní a nukleární magnetická rezonanční spektrometrie. Tyto metody jsou spíše vhodné pro identifikaci, respektive pro charakterizaci chemické struktury tenzidů<sup>13</sup>.

Tenzidy jsou, z pohledu toxicity, méně až mírně toxické látky, ale na druhou stranu jsou dráždivé a pro organismy škodlivé. Některé z nich (např. sulfokyseliny) lze pokládat dokonce za žiraviny. Příkladem takové látky je dodecylbenzensulfonová kyselina, která se svoji silou vyrovnává kyselině sírové<sup>13</sup>. V přírodě mohou tenzidy sloužit některým mikroorganismům (především bakteriím) jako zdroj uhlíku, a z toho důvodu jsou jimi rozkládány<sup>13,15</sup>. Tato tzv. biodegradace probíhá ve dvou fázích. V první fázi jsou tenzidy metabolizovány na látky povrchově již neaktivní a v té druhé jsou následně rozloženy až na základní anorganické substance, jakými jsou např. oxid uhličitý, voda, sírany či dusičnany<sup>16</sup>. Průběh biodegradace je odlišný pro různé typy povrchově aktivních látek, jelikož závisí zejména na charakteru hydrofobních skupin obsažených v jejich strukturách<sup>15</sup>.

Tento příspěvek pojednává o praktickém využití potenciometrické titrace ke stanovení aniontových tenzidů obsažených v reálných vzorcích. Mimo jiné jsou zde porovnávány dva způsoby provedení titrace: i) manuální, a ii) pomocí automatického titrátoru.

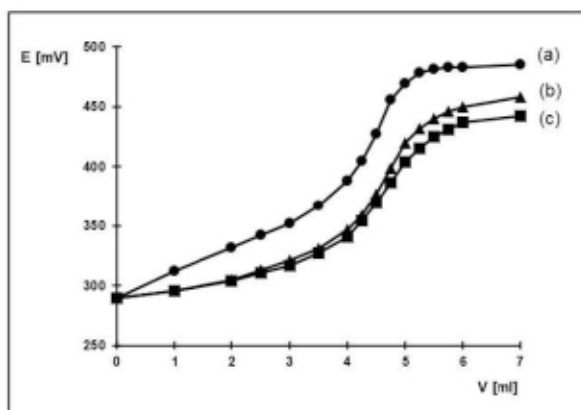
### Experimentální část

Měrný článek pro potenciometrickou titrací byl tvořen indikační CPE a referentní chloridostříbrou ( $\text{Ag} | \text{AgCl} | 3\text{M KCl}$ ) elektrodou. Uhlíková pasta byla připravena smísením 600 mg grafitového prášku (CR-5) a 400 mg pastové kapaliny, kterou zde představoval *o*-nitrofenyloktyléter. Pomocí přenosného pH metru CPH 52 (Elteca, Turnov) bylo sledováno napětí článku. V případě manuální titrace byla použita klasická skleněná byreta o objemu 10 ml, automatická titrace byla prováděna na titrátoru Orion 960 (Boston, USA). Veškeré chemikálie (p. a.), vyjma uvedených reálných vzorků, byly pořízeny od firmy Sigma Aldrich (Steinheim, Německo). K přípravě roztoků a měření byla použita vždy deionizovaná voda. Jako titrační činidla byly použity 0,01 M chlorid hexadecylpyridinia (CPC) a 0,0095 M tegotrant, jejichž koncentrace byla stanovena standardizací 0,0093 M tetrafenylboritanu sodného standardizovaného 0,01 M roztokem dusičnanu thalného. Vzorky SYNTAPON O a SYNTAPON EH byly poskytnuty společností ENASPOL a.s. (Teplíce, Česká republika). Pro přípravu jejich zředěných roztoků (250 ml) byla použita navážka 0,5 g vzorku. Vzorek prostředku na mytí nádobí W5 byl zakoupen od firmy Lidl Česká republika v.o.s. (Praha, Česká republika). Roztok tohoto vzorku (250 ml) byl připraven z navážky 1,0 g vzorku. K vlastnímu stanovení pak bylo vždy pipetováno 10 ml příslušného roztoku vzorku.

### Výsledky a diskuse

Ke stanovení tenzidů je v praxi stále hojně využívána, výše uvedená dvoufázová titrace, avšak i ta má své limity, a to především při stanovení aniontových tenzidů s kratším alkylovým řetězcem. Z tohoto důvodu jsme se začali touto problematikou zabývat ve snaze najít řešení pomocí potenciometrické titrace s využitím iontově selektivních elektrod. I když lze pomocí

uvedené potenciometrické titrace stanovit všechny typy tenzidů, tento příspěvek je věnován pouze stanovení vybraných aniontových tenzidů. K dispozici jsme měli dva vzorky anionaktivních tenzidů (SYNTAPON O a SYNTAPON EH), které byly manuálně titrovány roztokem tegotrantu (kationtový tenzid). Zde je nutné podotknout, že při potenciometrické titraci hraje roli výška a strmost napěťového skoku. Výška napěťového skoku je, mimo jiné, ovlivněna délkou alkylového řetězce aniontového tenzidu. Z tohoto důvodu byly oba vzorky titrovány tegotrantem, který poskytuje vyšší napěťový skok než např. CPC. První z nich, SYNTAPON O, představoval vodný roztok alkylsulfátu sodného o molekulové hmotnosti 234 g/mol, který obsahoval 8 uhlíků v uhlíkovém řetězci. Druhým vzorkem byl SYNTAPON EH, což je vodný roztok 2-ethylhexylsulfátu sodného o molekulové hmotnosti 232 g/mol. Průběh potenciometrické titrace tohoto vzorku je znázorněn na obr. 1, kde je patrné, že první titrace je odlišná, což mimo jiné platí i u titrací dalších vzorků. Tento fakt je dán tím, že při první titraci ještě není anionaktivní složka vzorku dostatečně extrahovaná do *o*-nitrofenyloxytyleteru, a tudíž pro přesnější vyhodnocení výsledku je nutné titraci opakovat. Výsledky stanovení (uvedené jako průměrné hodnoty tří opakovaných měření) jsou uvedeny v Tabulce I.



Obr. 1. Potenciometrické titrační křivky a) 1. měření, b) 2. měření, c) 3. měření ředěného vzorku SYNTAPON EH titrovaného 0,0095 M roztokem tegotrantu. Měrná elektroda: CPE.

#### Tabulka I

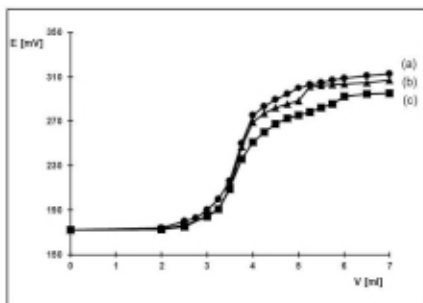
Výsledky stanovení aniontových tenzidů v reálných vzorcích.

Vzorek	Deklarováno [%]	Nalezeno [%]
SYNTAPON O	40–41	43,3 ± 1,4
SYNTAPON EH	40–44	43,6
W5 <sup>a</sup>	15–30	25,5
W5 <sup>b</sup>	15–30	24,8 ± 1

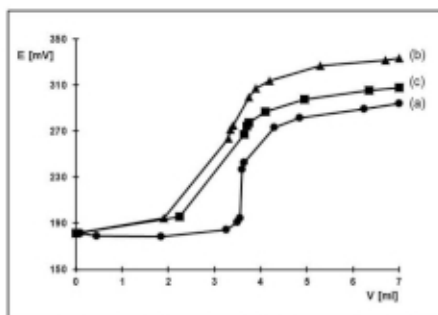
Stanovení provedeno pomocí <sup>a</sup> manuální titrace, <sup>b</sup> automatického titrátoru.

Potenciometrická titrace tenzidů má, kromě uvedených výhod, i své nevýhody. Jednou z nich je kvalitativní popis stanovovaného tenzidu. Je možné bez obtíží rozlišit mezi jednotlivými typy

tenzidů, avšak pokud není známa přesná struktura, lze výsledek stanovení uvést pouze jako ekvivalent známého tenzidu (např. dodecylsiranu sodného), což byl právě případ dalšího zkoumaného vzorku, kterým byl prostředek na mytí nádobí W5 od firmy Lidl Česká republika v.o.s. Zde jsme rovněž otestovali možnost využití automatického titrátoru, který je v praxi hojně využíván. Pro tyto titrace byl použit odměrný roztok kationtového tenzidu CPC. Průběhy obou titrací jsou znázorněny na obrázcích 2 a 3. Z výsledků obou typů titrací, uvedených v tabulce I, lze konstatovat, že oba provedené způsoby poskytují téměř totožné výsledky a také, že obsah aniontových tenzidů se nachází v rozmezí deklarovaného množství. Výhodou použití automatického titrátoru je zejména časová úspora, jelikož jedna titrace trvá přibližně 10 minut včetně vyhodnocení bodu ekvivalence. Taktéž lze tímto způsobem předjet chybám způsobených lidským faktorem. Z těchto důvodů automatická titrace nalézá v praxi mnohem větší využití než klasická manuální titrace.



**Obr. 2.** Potenciometrické titrační křivky a) 1. měření, b) 2. měření, c) 3. měření ředěného vzorku W5 titrovaného 0,01 M roztokem CPC. Měrná elektroda: CPE. Způsob provedení: manuální titrace.



**Obr. 3.** Potenciometrické titrační křivky a) 1. měření, b) 2. měření, c) 3. měření ředěného vzorku W5 titrovaného 0,01 M roztokem CPC. Měrná elektroda: CPE. Způsob provedení: automatická titrace.

## Závěr

Můžeme tedy konstatovat, že pomocí potenciometrické titrace se úspěšně podařilo stanovit obsah anionaktivních složek vzorků SYNTAPON O a SYNTAPON EH v deklarovaném rozmezí stejně, jako se podařilo u vzorku W5. Z tohoto důvodu lze usuzovat, že tuto metodu je možné spolehlivě aplikovat i na reálné vzorky. V neposlední řadě bychom rádi poděkovali firmě Enaspol a.s. za poskytnuté vzorky.

## References

1. Mikysek T., Stočes M., Vytřas K.: *Electroanalysis* 28, 2688 (2016).
2. Praus P., Vontrová J.: *Analytická chemie II: Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava* 2015.
3. Galović O., Samardžić M., Petrušić S., Sak-Bosnar M.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 9, 3802 (2014).
4. Khaled E., Mohamed G. G., Awad T.: *Sens. Act. B* 135, 74 (2008).
5. Mikysek T., Ďatko L., Vytřas K.: *II. seminář o tenzidech a detergentech*, Sb. předn. 29. Univerzita Pardubice, Pardubice 2016.
6. Kormali Ertürün H. E., Mikysek T., Vytřas K.: *LI. seminář o tenzidech a detergentech*, Sb. předn. 19. Univerzita Pardubice, Pardubice 2018.
7. Gelache M., Kaufmann J.M., Quarin G, et al: *Talanta* 43, 507 (1996).
8. James H., Carmack G., Freiser H.: *Anal. Chem.* 44, 856 (1972).
9. Cattrall R. W., Freiser H.: *Anal. Chem.* 43, 1905 (1972).
10. Cattrall R. W., Hamilton I. C.: *Ion-SEL. Electrode Rev.* 6, 125 (1984).
11. Vytřas K., Dajková M., Remes M.: *Česk. Farm.* 30, 61 (1981).
12. Švancara I., Vytřas K.: *Anal. Chim. Acta* 273, 195 (1993).
13. Šmidrkal J.: *Tenzidy*. VŠCHT Praha. 2020.
14. Buschmann N., Schulz R.: *Tenside, Surfactants, Detergents* 30, 18 (1993).
15. Wu Q., Zhao L., Song R., Ma A.: *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci* 227, (2019).
16. Scott M. J., Jones M. N.: *Biochimica et Biophysica Acta* 1508, 235 (2000).

## Determination of Six Antihistamines by HPLC-ECD Employing Bare and Modified Carbon Fiber Microelectrode

Zeynab Belbasi <sup>a</sup>, Jan Hrbáč <sup>b</sup>, and David Jirovský <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Palacky University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic, E-mail: zeynab.belbasi01@upol.cz

<sup>b</sup>Masaryk University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

### Abstract

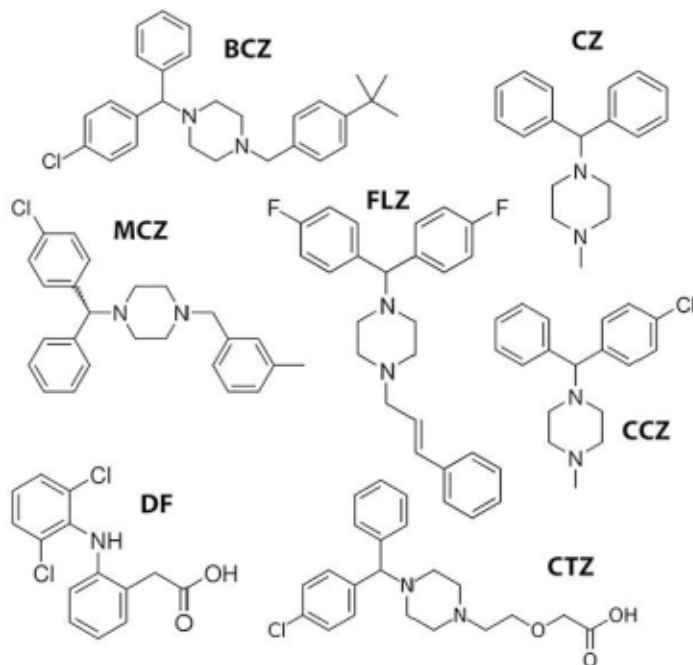
We used a spark-modified carbon fiber microelectrode (CFME), coated with a nanostructured nickel layer, and placed it in a flow-through detection cell for the simultaneous isocratic HPLC analysis of six piperazine antihistamines. Compared to the bare (carbon-modified) CFME, the nickel-coated electrode had a better affinity towards the studied drugs, resulting in a higher current response as well as better LODs and LOQs, as confirmed also by amperometry and cyclic voltammetry (CV).

**Keywords:** HPLC, electrochemical detection, amperometry, microelectrode, antihistamines, spark-discharge, metallic layers.

### Introduction

HPLC with electrochemical detection (HPLC-ED) is a technique that has become popular mainly due to its high sensitivity towards substances that easily undergo oxidation or reduction <sup>1</sup>. Although HPLC-ED is well applicable to a wide range of biologically active substances, one of its general limitations is that many important substances do not readily undergo electrochemical conversion at the working electrode to provide an analytically useful signal. One approach may be to use working electrodes made from less conventional materials (such as BDD), providing a wider usable potential range, or to use a specific modification of conventional working electrodes that promote the conversion of analytes and thus improve the analytical response <sup>2</sup>.

We used spark-modified, nanostructured-nickel-coated CFME as a sensitive detection sensor in the developed HPLC method for the determination of buclizine (BCZ), meclizine (MCZ), cetirizine (CTZ), flunarizine (FLZ), cyclizine (CZ) and chlorocyclizine (CCZ), antihistamine drugs commonly used in the treatment of a wide range of allergies. We focused on substances containing a piperazine ring in their molecule. The structural formulae of the selected analytes including diclofenac used as the internal standard can be seen in Fig. 1.



**Fig. 1.** Structures of selected piperazine antihistamines: Bucizine (BCZ), Mecizine (MCZ), Cyclizine (CZ), Chlorocyclizine (CCZ), Cetirizine (CTZ), Flunarizine (FLZ), Diclofenac (DF) – internal standard.

### Experimental

The standards of antihistamine drugs (bucizine, mecizine, cetirizine, flunarizine, cyclizine, and chlorocyclizine) and diclofenac were purchased from Sigma. Solutions of analytes were prepared by dissolution and diluting of antihistamine drugs in methanol and water. For the mobile phase preparation, sodium dihydrogen phosphate monohydrate (TraceSelect purity) purchased from Fluka (Fluka AG, Buchs, Switzerland) was used. Methanol (Merck, Darmstadt, Germany) was of gradient grade purity. The microelectrode fabrication was described in previous works<sup>3-5</sup>. Electrochemical measurements were performed using a nanoampere electrochemical workstation (L-Chem, Czech Republic, <http://www.lchem.cz/>). Leak-Free Ag/AgCl Reference electrode was used as a reference electrode. Platinum wire served as an auxiliary electrode.

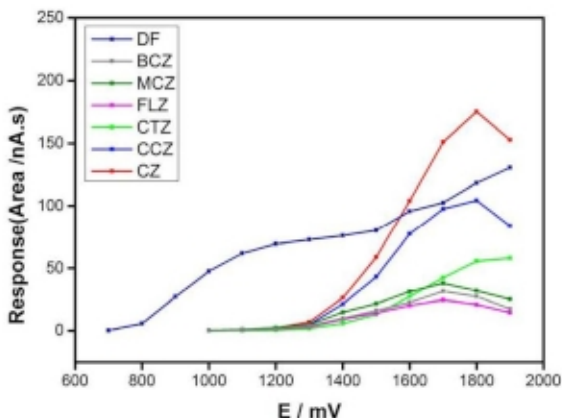
The HPLC system consisted of an ESA isocratic pump (Model 582) and a Rheodyne manual injector equipped with a 20  $\mu$ L loop. A Culochem III potentiostat (ESA Inc., Chelmsford, MA, USA) operating in a three-electrode arrangement was coupled with a self-designed



amperometric flow cell [4] equipped with a CFME. Before the injector, an ESA guard cell (Model 5020) was placed. The samples were introduced into the system using glass injection syringes (Hamilton, Reno, NV, USA). HPLC separations were performed using a reversed-phase ARION-CN 3  $\mu\text{m}$  column, 150  $\times$  2.1 mm I.D. The mobile phase consisted of 50 mM- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 3)/MeOH (45/55, v/v) and was filtered and degassed before use. The flow rate was 0.15 mL  $\text{min}^{-1}$ .

## Results and Discussion

All the analytes studied are oxidized only at relatively high positive potentials as they lack any of the typically easy-to-oxidize functional group. In the case of bare (unmodified) CFME as a working electrode, the background electrolyte starts to decompose in the upper potential region and the analytical response deteriorates significantly.

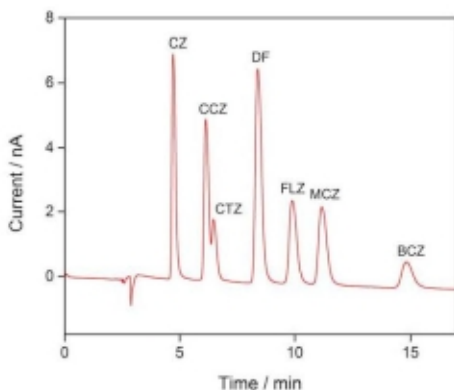


**Fig. 2.** Hydrodynamic voltammograms of selected drugs.

In contrast, spark-discharge Ni-modified CFME provided nicely defined hydrodynamic voltammograms that allowed substances of interest to be detected even at high working potentials (see Fig. 2).

The modified CFME was then employed as an amperometric detection sensor in the developed HPLC for the separation of six antihistamine drugs including an I.S. (Fig. 3).

A comparative HPLC experiment was carried out using a bare CFME in an identical arrangement. For both detection systems, calibrations were performed and limits of detection/quantification were calculated. The detection system using the nickel-modified CFME offered better signal stability, higher sensitivity (steeper calibration slopes), and lower LODs and LOQs compared to the unmodified CFME. To verify that the prepared electrode modification is stable and provides reproducible results, a stability study was also performed for the HPLC-ED method under final experimental conditions.



**Fig. 3.** HPLC-ED separation of the selected antihistamine drugs with Ni-modified CFME as a working electrode. Concentration:  $7 \cdot 10^{-6}$  mol L<sup>-3</sup> each analyte, E = +1500 mV (vs. Ag/AgCl).

### Conclusions

We have successfully applied the modified CFME as a working detection electrode for an isocratic HPLC-ED determination of six common antihistamines. The CFME was modified using the spark-discharge method described previously<sup>6</sup>. Using this technique, the fiber electrode was coated with a nanostructured layer of nickel, which contributes to improving the analytical properties of the sensor and achieving lower limits of detection and quantification when used as an amperometric sensor after previous HPLC separation of piperazine antihistamines.

### Acknowledgments

This research has been supported by the IGA project "IGA\_PrF\_2023\_027".

### References

1. Maio M., Di Fiore C., Iannone A., Carriera F., Notardonato I., Avino P.: *Analytica* **3**, 54 (2022).
2. Sharma S., Singh N., Tomar V., Chandra R.: *Biosensors & bioelectronics* **107**, 76 (2018).
3. Bartosova Z., Jirovsky D., Riman D., Halouzka V., Svidmoch M., Hrbac J.: *Talanta* **122**, 115 (2014).
4. Bartosova Z., Riman D., Jakubec P., Halouzka V., Hrbac J., Jirovsky D.: *The ScientificWorldJournal* **2012**, 295802 (2012).
5. Jakubec P., Bancirova M., Halouzka V., Lojek A., Ciz M., Denev P., Cibicek N., Vacek J., Vostalova J., Ulrichova J., Hrbac J.: *J. Agricul. Food Chem.* **60**, 7836 (2012).
6. Hrbac J., Rozsypal J., Riman D., Halouzka V., Hemzal D., Pavelka V. In: *XXXVII Moderni Elektrochemicke Metody* Navratil T. F. M., Schwarzová-Peckova K., Ed.: Jeticovice, 2016, pp 62.

## The Stability, Temperature Dependency, and Reproducibility of Ion-Selective Electrode Response

### (Studium stability, teplotních závislostí a reprodukovatelnosti odezvy iontově selektivních elektrod)

Anna Bělušová, Jan Krejčí, Radka Kučerová, and Martin Klusáček

BVT Technologies, a.s., Strážek 206, 592 53, Strazek, Czech Republic, E-mail: info@bvt.cz

#### Abstract

The article analyses the influence of temperature on ion-selective electrode measurements and their operational stability.

**Keywords:** Ion-selective electrode, ISE, Temperature stability, Operational stability.

#### Úvod

Teorie iontově selektivních elektrod (ISE) začala v roce 1937 analýzou skleněné pH elektrody<sup>1</sup>. Praktická teorie ISE začala v šedesátých letech<sup>2</sup>. Dnes se používají v klasickém uspořádání nebo jako aktivní součást ISFet<sup>3</sup>. Článek se zabývá klasickými ISE a analyzuje jejich tepelné vlastnosti a provozní stabilitu.

Klasické elektrody se běžně používají ponořením do testovaného/analyzovaného vzorku. Tento krok vkládá významný vliv na lidského operátora a jeho dovednosti. Proto měření probíhalo v plně automatizovaném režimu bez jakéhokoli vlivu lidské obsluhy s výjimkou spuštění měření.

#### Experimentální část

Při měření byly použity čtyři typy tradičních ISE o průměru 12 mm: K-ISE, Ca-ISE a Na-ISE (Monokrystaly, Turnov) a Cl-ISE elektroda (TMS, měřicí systémy, Turnov) ve spojení s referenční Ag/AgCl gelovou elektrodou (ED, Turnov). Elektrody byly připojeny k 15ti kanálovému potenciostatu (Monokrystaly, Turnov) s PC s měřicím programem logger (vzorkování po 0,5 s).

U každé ISE byla proměřena stabilita kalibrační křivky při 5, 15, 25 a 35 °C. Měření při jedné teplotě probíhalo kontinuálně v 8-10 opakovaných sekvencích (v celkové délce asi 6-7 hod.). Kalibrační roztoky a promývací roztok (objem 50 ml) byly upevněny ve speciální temperované desce připojené k průtokovému termostatu Julabo a MLW. Po kondicionaci a upevnění ISE do pohyblivého ramene již měření probíhalo zcela automaticky bez zásahu obsluhy na přístroji Autosamper Spectro (kompletní přestavba BVT Technologies).

#### Popis měřicího algoritmu:

Na počátku měření byla dvojice ISE a referenční Ag/AgCl elektrody 15 min promývána v kádince s destilovanou vodou (přívod a odvod kapaliny zajištěn peristaltickým čerpadlem). Poté byla dvojice ISE s referenční elektrodou přesunuta na 5 min do kádinky s destilovanou vodou, aby došlo k ustálení odezvy po předchozím promývání. Následně probíhalo měření po dobu 3 min postupně v pěti kalibračních roztocích od nejméně ( $10^{-5}$  mol/l) až k nejvíce koncentrovanému roztoku ( $10^{-1}$  mol/l), lišícími se vždy o jednu koncentrační dekádu. Při přesunech do dalšího kalibračního roztoku byla dvojice ISE a referenční elektrody ponořena vždy do tzv. „předkalibračního roztoku“, aby se minimalizovala chyba měření. Na konci měření celá jedné sekvence (kalibrační křivky) byla dvojice ISE a referenční elektrody promývána po dobu 15 min a celé měření se 8-10krát zopakovalo.

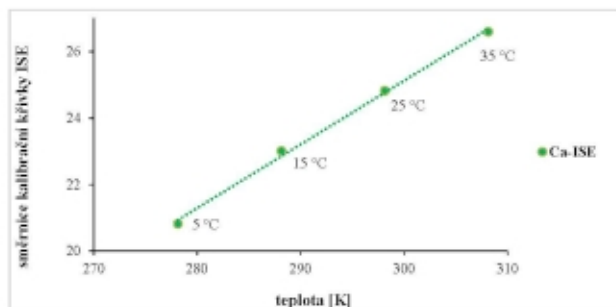
#### Použité chemikálie:

Pro přípravu kalibračních roztoků (v koncentraci  $10^{-4} - 10^{-5}$  mol/l) v destilované vodě pro Cl, K, Na, Ca-ISE byl použit KCl p.a. (Penta), NaCl p.a. (Penta),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  (P-lab, Roth). Pro úpravu pH kalibračních roztoků pro Na-ISE byl použit ethanolamin p.a. (Penta) a kyselina octová ledová, p.a. (Sigma-Aldrich). Iontová síla nebyla u kalibračních roztoků upravena.

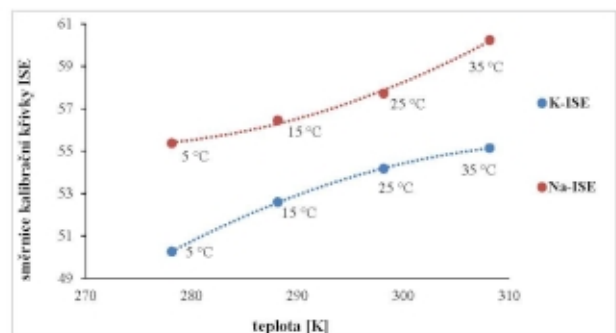
#### Výsledky a diskuse

Byla provedena měření Cl, K, Na, Ca-ISE elektrod. Obrázky ukazují typické chování elektrod.

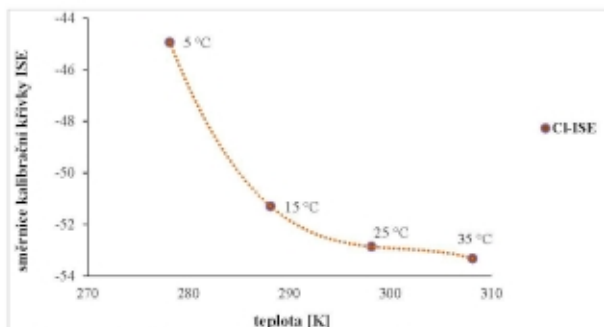
Obr. 1, Obr. 2 a Obr. 3 níže ukazují příklad typických závislostí směrnic kalibračních křivek různých ISE na teplotě.



Obr. 1. Závislost směrnic kalibrační křivky Ca-ISE na teplotě.



Obr. 2. Závislost směrnic kalibrační křivky K-ISE a Na-ISE na teplotě.



**Obr. 3.** Závislost směrnice kalibrační křivky Cl-ISE na teplotě.

Napětí ISE elektrody je určeno Nernstovou rovnicí (1):

$$E = E_0 - \frac{RT}{nF} \cdot \ln \left( \frac{a_x}{a_x} \right) = 2,303 \cdot \frac{RT}{nF} \cdot \log \left( \frac{a_x}{a_x} \right) \quad (1)$$

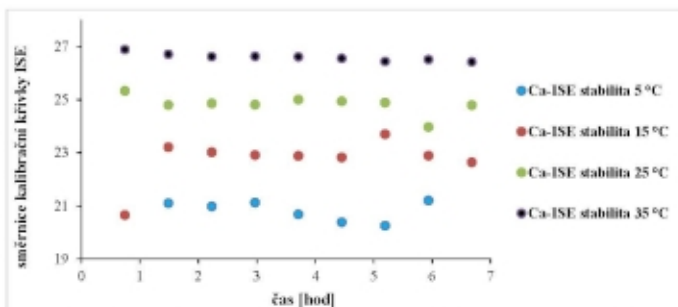
Kde  $a_x$  je součin dalších aktivit, které se podílejí na vytváření měřeného potenciálu a které se musí minimálně měnit.

Provedený rozbor ukazuje, že pro dosažení rozlišení aktivit cca 1 % je nutné měření potenciálu s rozlišením 59,2  $\mu$ V. Měření potenciálu s tímto rozlišením je již ovlivněno konstrukčním uspořádáním elektrody.

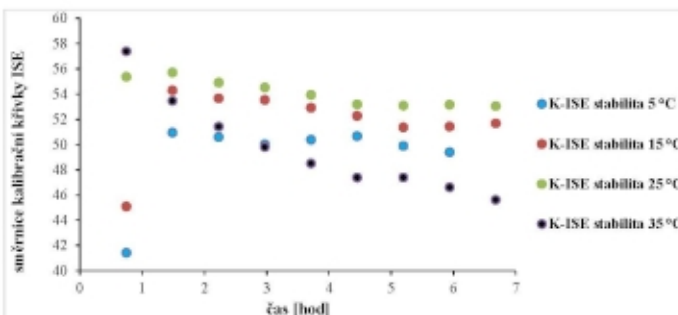
Měření je ovlivněno i dalšími elektrochemickými jevy, např. Donnanovou rovnováhou na ISE membráně, mechanismem pohyblivosti iontů a jeho teplotní závislostí.

Z Nernstovy rovnice vyplývá, že závislost směrnice kalibrační křivky na teplotě je lineární s hodnotou  $\frac{R}{nF}$ . Tak se chovala pouze Ca-ISE (Obr. 1) (směrnice 0,1916; korelace 0,9973). Pro Cl-ISE (Obr. 3) a K-ISE (Obr. 2) je závislost konkávní a pro Na-ISE je konvexní (Obr. 2). Popsané chování není způsobeno referenční Ag/AgCl elektrodou, která byla stejná ve všech měřeních. Nejpravděpodobnější vysvětlení je vliv iontové síly, Donnanova potenciálu nebo složitější teplotní závislosti pohyblivosti iontů v membráně. Vliv může mít teplotní hystereze či nedostatečná stabilizace elektrody před měřením.

Hodnota směrnice kalibračních křivek u všech čtyř typů ISE roste s teplotou, avšak stabilita signálu s rostoucí teplotou klesá (jak lze očekávat). Nejlepší časovou stabilitu vykazuje Ca-ISE (Obr. 4) a naopak největší časovou nestabilitu vykazuje K-ISE (Obr. 5). Např. u K-ISE je při 35 °C pokles směrnice kalibrační křivky 25 % za 6 hodin kontinuálního měření. ISE elektrody vykazují hysterezi – první měření je odlišné a závisí na předchozím měření uchovávaní a kondicionaci elektrody.



**Obr. 4.** Stabilita směrnice kalibrační křivky Ca-ISE při kontinuálním měření při teplotách 5, 15, 25 a 35 °C.



**Obr. 5.** Stabilita směrnice kalibrační křivky K-ISE při kontinuálním měření při teplotách 5, 15, 25 a 35 °C.

### Závěr

ISE elektrody jsou praktickým analytickým nástrojem. Výsledek měření však může být ovlivněn teplotní závislostí kalibrační křivky, která může být nelineární (tj. není splněna Nernstova rovnice) a časově nestabilní. Největší časová nestabilita byla zjištěna u K-ISE (změna směrnice 4 % za hod při 35 °C a 1 % za hod při 25 °C). Naopak největší časovou stabilitu vykazovala Ca-ISE elektroda (0,2 % za hod při 35 °C a 0,4 % za hod při 25 °C).

### Acknowledgments

This work was supported by the Agency for Entrepreneurship and Innovation – OP PIK program of the Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic and co-financed by the European Regional Development Fund, project ISE, CZ.01.1.02/0.0/0.0/21\_374/0027289.

### References

1. Nikolskij B. P., Tolmačeva T. A.: *Compt. Rend. Acad. Sci. URSS* 16, 99, (1937).
2. Sollner R., Shean G. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 86, 901 (1964).
3. Durst R.: *Electroanalysis* 24, 15 (2012).

**Study of the Voltammetric Behaviour of  $7\beta$ -hydroxycholesterol on Boron-doped  
Diamond Electrode**  
(Studium voltamtrického chování  $7\beta$ -hydroxycholesterolu na elektrodě z borem  
dopovaného diamantu)

Eva Bláhová, Lucie Serbanová, and Karolina Schwarzová-Pecková  
Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO  
Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 00 Prague 2,  
Czech Republic, E-mail: blahovaev@natur.cuni.cz

**Abstract**

The electrochemical behavior of  $7\beta$ -hydroxycholesterol was studied using cyclic and differential pulse voltammetry on a boron-doped diamond electrode in the media of acetonitrile – perchloric acid (water content 1 %). In this media, the studied substance (or its dehydration products) undergoes electrochemical oxidation and provides an irreversible anodic response at *ca* +0.86 V (vs. Ag/AgNO<sub>3</sub> in acetonitrile). Cyclic voltammetry and spectrophotometry were used to study the influence of acid concentration or water content in the supporting electrolyte to achieve optimal response.

**Keywords:**  $7\beta$ -hydroxycholesterol, Boron-doped diamond electrode, Oxidation, Oxysterols, Voltammetry.

**Úvod**

Oxysteroly jsou důležité látky ovlivňující řadu dějů v lidském těle. Jsou součástí mechanismu odbourání sterolů na žlučové kyseliny, podílejí se na homeostázi cholesterolu, jedná se ale i o látky účastníce se řady patogenezi. Oxysterolů, jako oxidovaných forem sterolů, existuje celá řada. Jsou odvozeny především od cholesterolu a fytoosterolů (tzv. oxyfytoosteroly – vznikají zejména oxidací sitosterolu a campesterolu, méně stigmasterolu a brassicasterolu), ale též od jejich prekurzorů<sup>1</sup>. Struktura cholesterolu a fytoosterolů je podobná. Tvoří ji steroidní jádro, hydroxylová skupina na uhlíku C3 a dvojná vazba mezi uhlíky C5 a C6, díky které podléhá oxidačním reakcím. Stejně tak oxidaci podléhají dvojně vazby u fytoosterolů, pokud jsou přítomny. K oxidačním reakcím může docházet i na postranním řetězci umístěném na uhlíku C17 (ref. <sup>1,2</sup>).

Detekce oxysterolů je poměrně komplikovaná, zároveň však důležitá, jelikož mohou být markery celé řady onemocnění. Též je třeba sledovat jejich výskyt v potravinách kvůli negativním vlivům na lidský organismus. Metody užívané k detekci patří mezi pokročilé instrumentální metody, především plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem použitá po separaci cholesterolu a oxysterolů a následné derivatizaci analytů, a kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií<sup>3,4</sup>. Důvodem je struktura oxysterolů podobná cholesterolu, který se ve vzorcích vyskytuje společně v nejméně tisíckrát vyšší koncentraci.

Elektrochemické metody byly dosud k detekci oxysterolů využity okrajově. Stejně jako pro ostatní steroidní sloučeniny neobsahující aromatický kruh nebo konjugované dvojně vazby pro ně platí, že se dají oxidovat pouze při vysoké kladných potenciálech v nevodných prostředích<sup>5</sup>. Tohoto přístupu bylo využito pro jejich stanovení v oxidativně modifikovaném LDL (low-density lipoprotein) cholesterolu metodou semi-mikro HPLC ve spojení s elektrochemickou detekcí (ECD) na elektrodě ze skelného uhlíku<sup>6</sup>. Detekce probíhala v mobilní fázi složené z acetonitrilu obsahujícího 50 mmol l<sup>-1</sup> LiClO<sub>4</sub>, a vložený potenciál +2,8 V (vs. Ag/AgCl).

Inovativním přístupem pro elektrochemickou detekci steroidních sloučenin, zavedeným na pracovišti UNESCO laboratoře elektrochemie životního prostředí na PFF UK, je jejich aktivace dehydratací steroidního skeletu, která vede k zavedení dvojných vazeb a případně dalším strukturálním změnám další umožňujícím následně elektrochemickou oxidací vzniklých produktů v rámci potenciálového okna běžných nemodifikovaných elektrod (např. platina, skelný uhlík, borem dopovaný diamant) <sup>7-10</sup>. Tato jednoduchá metoda je inspirována Liebermann-Burchardovou reakcí cholesterolu v prostředí kyseliny sírové, octové a acetanhydridu, která vede k jeho násobné dehydrataci a je základem Abell-Kendallový kolorimetrické metody detekce cholesterolu <sup>12,13</sup>. Uvedený dvoustupňový přístup spočívající v dehydrataci a následně přímé oxidaci produktů v témže prostředí byl dosud použit k voltametrické detekci primárních žlučových kyselin včetně jejich stanovení v séru <sup>8,10</sup>, ke stanovení cholesterolu v mléčných produktech <sup>7</sup> a ke stanovení jeho prekursoru 7-dehydrocholesterolu jako markeru Smith-Lemli-Opitzova syndromu <sup>9</sup>. Studium elektrochemické oxidace oxy(fyto)sterolů a vývoj elektrochemických metod založených na uvedeném přístupu pro jejich detekci představuje významnou možnost rozšíření dostupných analytických metod, obzvláště ve spojení se separačními metodami pro detekci směsí těchto analytů.

### Experimentální část

Studovanými látkami byl 7 $\beta$ -hydroxycholesterol (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA). Dále byl použit acetonitril pro HPLC (Honeywell); kyselina chloristá 70%, fosforečná 85% (Penta, Chrudim, ČR), sírová 96%, dusičná 65%, chlorovodíková 35% (vše Lach-Ner, Neratovice, ČR); chloristan sodný (Fluka) a alumina o velikosti částic 0,5  $\mu$ m (Elektrochemické detektory, Turnov). Všechny chemikálie byly analytické čistoty.

Pro voltametrická měření byl použit polarograf Eco-Tribo se softwarem Multielchem 3.2.0 (Eco-Trend Plus, Praha). Jako pracovní elektroda byla použita elektroda z borem dopovaného diamantu (BioLogic, Seyssinet-Pariset Francie) o průměru disku 3 mm ( $S = 7,07$  mm<sup>2</sup>). Pomocná elektroda byla platinová elektroda (Elektrochemické detektory, Turnov), a referenční elektroda nevodná elektroda dle Pleskova, která je tvořena stříbrným drátkem ponořeným do roztoku obsahujícího dusičnan stříbrný o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2}$  mol l<sup>-1</sup> a chloristan sodný o koncentraci 1 mol l<sup>-1</sup> v acetonitrilu. Před každým měřením byl povrch BDD elektrody aktivován leštěním. K spektrofotometrickému měření byl použit spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

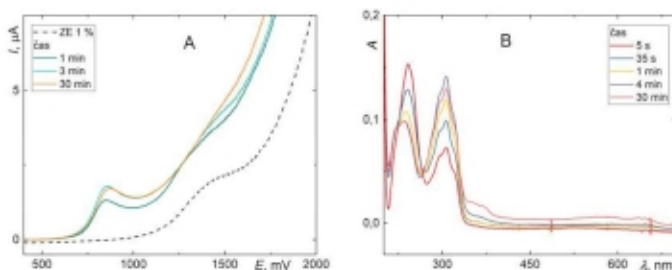
### Výsledky a diskuze

7 $\beta$ -hydroxycholesterol poskytuje v prostředí kyseliny chloristé v acetonitrilu anodickou odezvu při potenciálu okolo +860 mV. Za účelem získání optimální stability signálu bylo testováno prostředí o různých koncentracích kyseliny chloristé v základním elektrolytu (0,1; 0,05 a 0,01 M), z nichž nejvyšší a nejstabilnější odezvu v průběhu 90 min poskytuje 7 $\beta$ -hydroxycholesterol v nejméně koncentrované kyselině. Těž byla testována prostředí 0,1 M kyseliny chloristé s různými obsahy vody (s obsahem minimálního množství vody, tj. 0,55 %; 1 %, 5 % a 10 %). Nejvyšší a nejstabilnější odezva v průběhu 90 min byla pozorována v prostředí s 1 % vody (viz Obr. 1). V přítomnosti 5% obsahu vody docházelo během hodiny k postupnému nárůstu píku při cca +860 mV a méně výrazného píku při +1250 až +1350 mV v závislosti na čase. V prostředí s obsahem 10 % vody byl pozorován pouze pomalu narůstající pik při potenciálu okolo +1250 mV. Kromě kyseliny chloristé byl anodický signál pozorován i v jiných anorganických kyselinách – v kyselině sírové, dusičné a fosforečné.



Ze spektrofotometrických měření  $7\beta$ -hydroxycholesterolu provedených v 0,1 M kyselině chloristé s obsahem vody 0,55 % (Obr. 1) lze soudit, že dehydratační reakce probíhá během prvních přibližně 4 minut, kdy byl ve spektru pozorován pokles piku při cca 240 nm, a zároveň nárůst piku při cca 307 nm. Tato informace odpovídá poznatku, že i voltametrický signál se vyvine po 3-4 minutách. Produkt dehydratace má lehce fialovomodrou barvu, nárůst absorbance ve viditelné oblasti lze pozorovat při cca 580 nm s maximem po zhruba 30 minutách. Spektrofotometrické měření bylo provedeno též v prostředí 0,1 M kyseliny chlorovodíkové, kde byl pozorován nárůst piku při cca 307 nm k maximum po přibližně 30 minutách.

Pro další měření  $7\beta$ -hydroxycholesterolu byla jako vhodné prostředí zvolena 0,1 M kyselina chloristá s obsahem 1 % vody. V ní byla změřena kalibrační závislost, její lineární dynamický rozsah byl v intervalu 1 až 80  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a vypočtený limit detekce byl 0,20  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Dále byla v tomto prostředí změřena závislost odezvy na rychlosti polarizace, z níž vyplývá, že výška piku  $I_p$  je přímo úměrná odmocnině z rychlosti polarizace, tj. redoxní děj je řízen difúzí.



**Obr. 1.** A) LS voltamogram  $7\beta$ -hydroxycholesterolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v prostředí 0,1 M kyseliny chloristé v acetonitrilu s obsahem vody 1 %. Pracovní elektroda BDD (rychlost skenu 100  $\text{mV s}^{-1}$ ) B) Absorpční spektrum  $7\beta$ -hydroxycholesterolu ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v prostředí 0,1 M kyseliny chloristé v acetonitrilu s obsahem vody 0,55 %.

### Závěr

Bylo zjištěno, že  $7\beta$ -hydroxycholesterol poskytuje ireverzibilní anodický signál při cca +860 mV v prostředí kyseliny chloristé v acetonitrilu. Metodou cyklické voltametrie a spektrofotometrie byly nalezeny optimální podmínky, za kterých je tento anodický signál stabilní v čase pro provedení dalších experimentů, tedy měření závislosti odezvy na rychlosti polarizace a proměření kalibračních závislostí. Dalším předmětem studia bude studium voltametrického chování dalších sterolů (např.  $7\alpha$ -hydroxycholesterolu, 25-hydroxycholesterolu) a též ověření možnosti současného stanovení oxysterolů a cholesterolu.

### Acknowledgments

This research has been supported by the Grant Agency of Charles University (project GAUK 172823), the Czech Science Foundation (project GACR 19-11268S), and the Specific University Research (SVV 260690).

## References

1. Otaegui-Arrazola A., Menéndez-Carreño M., Ansorena D., Astiasarán I.: *Food Chem. Toxicol.* **48**, 3289 (2010).
2. Brzeska M., Szymczyk K., Szterk A. J.: *Food Sci.* **81**, R2299 (2016).
3. Dzeletovic S., Breuer O., Lund E., Diczfalusy U.: *Anal. Biochem.* **225**, 73 (1995).
4. McDonald J. G., Smith D. D., Stiles A. R., Russell D. W. A.: *J. Lipid Res.* **53**, 1399 (2012).
5. Klouda J., Berek J., Nesměrāk K., Schwarzová-Pecková K.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* **47**, 384 (2017).
6. Matsunaga I., Hakamata H., Sadohara K., Kakiuchi K., Kusu F.: *Anal. Biochem.* **393**, 222 (2009).
7. Benešová L., Klouda J., Bláhová E., Nesměrāk K., Kočovský P., Nádvořníková J., Barták P., Skopalová J., Schwarzová-Pecková K.: *Food Chem.* **393**, 133278 (2022).
8. Klouda J., Berek J., Kočovský P., Herl T., Matysik F.-M., Nesměrāk K., Schwarzová-Pecková K.: *Electrochem. Commun.* **86**, 99 (2018).
9. Klouda J., Benešová L., Kočovský P., Schwarzová-Pecková K.: *Talanta* **229**, 122260 (2021).
10. Klouda J., Nesměrāk K., Kočovský P., Berek J., Schwarzová-Pecková K.: *Bioelectrochemistry* **134**, 107539 (2020).
11. Abell L. L., Levy B. B., Brodie B. B., Kendall F. E. J.: *Biol. Chem.* **195**, 357 (1952).
12. Xiong Q., Wilson W. K., Pang J.: *Lipids* **42**, 87 (2007).

## Electrochemical Visualization of Dactyloscopic Traces (Elektrochemická vizualizace daktyloskopických stop)

Gabriela Broncová<sup>a</sup>, Sára Hermochová<sup>a</sup>, Miroslava Trchová<sup>a</sup>, Šárka Havlová<sup>b</sup>,  
Petr Vrabec<sup>c</sup>, Petr Hlavín<sup>c</sup>, Jiří Straus<sup>a</sup>, and Michal Novotný<sup>b</sup>

<sup>a</sup>University of Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6,  
Czech Republic, E-mail: sara.hermochova@vscht.cz

<sup>b</sup>Institute of Physics of the Czech Academy of Sciences, Na Slovance 1999/2, 182 00  
Prague 8, Czech Republic

<sup>c</sup>Criminalistics Institute Prague Police of the Czech Republic, Bartolomějská 310/12, 110 00  
Prague, Czech Republic

### Abstract

This study is focused on the visualization of fingerprints with electropolymerized poly(neutral red) (PNR) on metal surfaces including cartridges. The polymer film was prepared from 2 mM NR using cyclic voltammetry in phosphate buffer with 0.1M KNO<sub>3</sub> on brass substrates in the potential range -0.20–0.50 V (vs. Ag/AgCl) at a scan rate of 50 mV s<sup>-1</sup> for 6–10 cycles. The morphology and structure of modified surfaces with fingerprints and PNR were studied. This perspective way to visualize latent fingerprints with observed details of the papillary lines could be applied future in forensic practice.

**Keywords:** Fingerprint, Brass, Cyclic voltammetry, Poly(neutral) red, Cartridge.

### Úvod

Otisky prstů (OP) jsou díky své jedinečnosti a stabilitě velmi důležité ve forenzní kriminalistice. Na podezřelých předmětech jsou často nalezeny latentní OP, které jsou za běžného osvětlení podstatně neviditelné<sup>1,2</sup>. K tvorbě latentních OP přispívají hlavně ekrinní potní žlázy, které se nacházejí převážně na papilárních liniích, a mazové potní žlázy, které se vyskytují na hlavě. Mazový OP je z velké části tvořen volnými mastnými kyselinami a jejich estery. Podstatnou část OP jak mazového, tak i ekrinního, tvoří voda, která se může během stárnutí OP lehce odpařit<sup>1–4</sup>. V praxi se setkáváme převážně s OP tvořenými oběma těmito složkami.

Vodivé polymery (VP) se v poslední době začaly využívat při vizualizaci mazových OP snímaných z kovových povrchů<sup>5</sup>. Na kovový materiál může být VP nanášen potenciostaticky nebo pomocí cyklické voltametrie (CV)<sup>1,2,6,7</sup>. V našich experimentech byla použita poly(neutrální) červen (PNR)<sup>7</sup>. Jedná se o polyfenazinové barvivo, které může být elektrochemicky deponovat na různé kovové substráty<sup>8,9</sup>. PNR má katalytický účinek a také mohou být následně měněny její elektrochemické a optické vlastnosti úpravou pH<sup>8,9</sup>. Během nanášení se PNR deponuje na kovový substrát mezi papilární linie OP a tím vzniká tzv. negativní obraz<sup>1,6</sup>.

Cílem práce bylo vizualizovat latentní OP na mosazných substrátech, jako jsou plíšky a nábojnice, pomocí tenkého filmu PNR, a tento postup optimalizovat a charakterizovat pro budoucí uplatnění na vystřelené nábojnice z kriminalistické praxe.

### Experimentální část

Všechny komerční chemikálie byly použity bez dalšího čištění. NR, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, KNO<sub>3</sub>, aceton a etanol byly získány od společnosti Lachema respektive Lach-ner a Penta (ČR). Roztok 2 mM monomeru NR byl připraven ve fosfátovém pufru o pH 7 s 0,1 M KNO<sub>3</sub> (označeném jako základní elektrolyt (ZE)).

Před nanesením mazového OP byly mosazné plíšky a nábojnice chemicky vyčištěny dle postupu Beresforda<sup>9</sup> namáčením v sekvenci roztoků: redestilovaná voda, aceton, teplá mýdlová voda a etanol. Poté byly substráty ponechány doschnout za laboratorních podmínek. Na suché substráty byl nanesen mazový OP opět dle Beresforda<sup>9</sup>. Ruce se umyly teplou mýdlovou vodou a ponechaly volně uschnout. Následně se pravý palec třel o kořen nosu a čelo z důvodu vytvoření mastného filmu, který byl následně nanesen na mosazný plíšek a nábojnici mírným tlakem během 1–2s.

Elektrochemická měření byla prováděna s potenciostatem/galvanostatem PGSTAT-12 Autolab (Eco-Chemie, Nizozemsko). Elektrodový člunek byl složen z nasycené referenční elektrody Ag/AgCl, Pt velkoplošné elektrody jako pomocné elektrody a mosazných plíšků a nábojnic jako pracovní elektrody, které byly přichyceny krokosvorkou.

Depozice PNR probíhala metodou cyklické voltametrie za podmínek uvedených v Tabulce I, které byly optimalizovány pro plíšky i nábojnice. Po dokončení polymerizace byly substráty opláchnuty v ZE bez monomeru a následně v redestilované vodě a ponechány doschnout na vzduchu za laboratorní podmínky.

#### Tabulka I.

Podmínky CV depozice PNR na mosazné substráty.

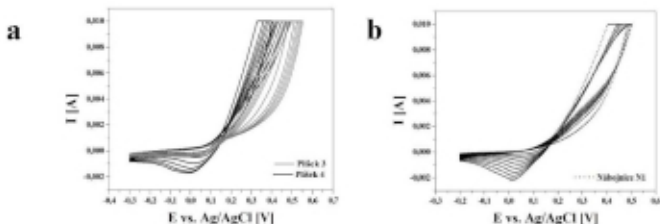
Označení vzorku	3	4	N1
Substrát	plíšek	plíšek	nábojnice .45 AUTO
OP	NE	ANO	ANO
Potenciálové rozmezí, mV	-300–550	-300–550	-200–500
Scan rate, mV s <sup>-1</sup>	50	50	50
Počet cyklů	6	6	8

Substráty (objekty) byly následně fotograficky zadokumentovány pomocí mobilního telefonu Samsung S21 5G, stereoskopického mikroskopu Nikon SMZ1500 s digitální zrcadlovkou Canon 1100D, (Japonsko). Dále byl použit skenovací elektronový mikroskop (SEM) Mira 3 LMH (Tescan, ČR). FTIR spektra byla změněna pomocí FTIR mikroskopu Nicolet iN10 MX (Thermo Fisher Scientific, USA) opatřený detektorem MCT-A chlazeným dusíkem.

#### Výsledky a diskuse

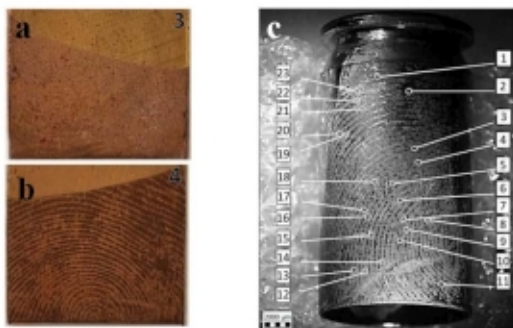
Vhodnou metodou pro depozici PNR na kovový substrát je metoda CV, která nám dovoluje sledovat a řídit tvorbu vznikající polymerní vrstvy. Na Obr. 1 jsou zaznamenány voltamogramy deponované PNR na tři mosazné objekty. Během prvního cyklu je pozorován katodický pik okolo potenciálu 0,07 V. Tento pik se se zvyšujícím se počtem cyklů posouval k potenciálu 0 V. Podobné průběhy jsou pozorovány při depozici PNR na různé mosazné substráty (plíšky, nábojnice s a bez OP). Hodnota proudu se během polymerizace viditelně měnila, což značilo tvorbu polymerního filmu na mosazném substrátu. Z cyklického voltamogramu je také možné posoudit, že OP polymerizaci filmu nebrání, naopak vrstva polymeru PNR vzniká rychleji než na substrátu bez OP.

Stejně jako při potenciostatickém nanášení PEDOT, které prováděl Costa a spol.<sup>10</sup>, nesměla být tloušťka nanesené polymerní vrstvy větší než tloušťka mastnoty OP, aby nedocházelo k převrstvení OP. Tloušťku vznikajícího filmu je možné regulovat rozmezím potenciálů a dobou nanášení filmu, která je ovlivněna počtem cyklů.



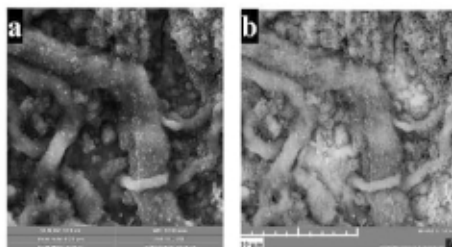
**Obr. 1.** Cyklické voltamogramy elektrochemické depozice PNR na a) mosazný plíšek 3 bez OP (šedá křivka) a plíšek 4 s mazovým OP (černá křivka); b) mosaznou nábojnici N1 s OP .45 AUTO od firmy Sellier & Bellot (šrafovaná křivka).

Během polymerizace NR na mosazné substráty také dochází k oxidaci mosazného povrchu, jak je popsáno v literatuře<sup>10</sup>, což může způsobit pevnější ukotvení vzniklé polymerní vrstvy na tomto substrátu. Na druhou stranu během optimalizace metody bylo nutno „zjemnit“ podmínky polymerizace, aby se eliminovalo rozpouštění mosazi na minimum volbou užšího potenciálové rozmezí. Výsledný polymerní film byl mnohem homogennější a jeho barva byla jasnější, jak je zdokumentováno na Obr. 2. Na vizualizovaném OP na nábojnici N1 (c) jsou vyznačeny čísla nalezené markanty (detaily druhé úrovně) 1–23. Některé z nich mohou být pozorovány pouhým okem, např. jizvy, ukončení, vidlice a očka.



**Obr. 2.** Mosazné substráty po nanesení PNR: a) suchý mosazný plíšek 3 bez OP s naneseným filmem PNR; b) vizualizovaný OP na mosazném plíšku 4 po nanesení PNR (plíšek s filmem byl mokrý, snímky pořízeny mobilním telefonem); c) nábojnice N1 (.45 AUTO od firmy Sellier & Bellot) s vizualizovaným mazovým OP a přiřazenými markanty (snímek pořízen pomocí stereoskopického mikroskopu).

Pomocí SEM byla zjištěna morfologie polymerní vrstvy, OP a jejich rozhraní. Z Obr. 3 je zřejmé, že PNR tvoří vlákna o průměru asi 0,5–1,5  $\mu\text{m}$ . Na snímku jsou vedle vláken PNR pozorovány i zlaté nanočástice, kterými byl vzorek před měřením poprášen z důvodů lepšího nasnímaní obrazu a ostřejšího přechodu mezi jednotlivými strukturálními motivy.



**Obr. 3.** Snímek morfologie PNR pořízený SEM v režimu: a) sekundárních elektronů (SE, z angl. *Secondary electrons*); b) zpětně odražených elektronů (BSE, z angl. *Back-scattered electrons*).

Modifikované mosazné substráty byly charakterizovány FTIR spektroskopií. Pomocí FTIR mikroskopu byly získány spektra jak OP, tak i deponovaných částí PNR mezi papírářskými liniemi OP. Výsledky budou zpracovány v další studii.

### Závěr

Tento návrh jednoduché metody pro vizualizaci otisků prstů na základě elektrochemické depozice PNR z neutrálního prostředí, kdy je minimalizováno poškození genetické informace by mohl usnadnit skenování otisků prstů z nábojnic v praxi. Parametry metody vizualizace (základní elektrolyt, potenciálový rozsah, počet cyklů) byly postupně optimalizovány, dokud nebyl otisk dostatečně viditelný. Je předpokládán další rozvoj metody a především aplikace metody na vystřelené nábojnice, které jsou klíčovým předmětem pro kriminalistickou praxi.

### Acknowledgments

This project Advanced Techniques of Visualization of Dactyloscopic Traces, VK01010022 was supported by the Ministry of the Interior of the Czech Republic from the Program Open Calls for Security Research 2023–2029 (OPSEC).

### References

- Slaninová T., Broncová G., Straus J., Shishkanova T. V.: *Chem. Listy* **113**, 530 (2019).
- Daluz H. M.: *Fundamentals of fingerprint analysis*. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton; London; New York 2015.
- Bleay S. M., Croxton R. S., De Puit M.: *Fingerprint Development Techniques: Theory and Application*. John Wiley & Sons, Incorporated, Newark, United Kingdom 2018.
- Girod A., Ramotowski R., Weyermann C.: *Forensic Sci. Int.* **223**, 10 (2012).
- Bersellini C., Garofano L., Giannetto M., Lusardi F., Mori G.: *J. Forensic Sci.* **46**, 871 (2001).
- Brown R. M., Hillman A. R.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 8653 (2012).
- Broncová G., Slaninová T., Dendisová M.: *Chem. Papers* **75**, 6673 (2021).
- Pauliukaite R., Ghica M., Barsan M., Brett C.: *Anal. Lett.* **43**, 1588 (2010).
- Pauliukaite R., Brett C. M. A.: *Electroanalysis* **20**, 1275 (2008).
- Beresford A. L., Brown R. M., Hillman A. R., Bond J. W.: *J. Forensic Sci.* **57**, 93 (2012).
- Costa C. V., Assis A. M. L., Freitas J. D., Tonholo J., Ribeiro A. S.: *Nano Sel.* **1**, 405 (2020).

**Electrochemical Properties of Scaife Polished {110}-oriented Single-Crystal Boron-Doped Diamond Electrodes**  
**(Elektrochemické vlastnosti mechanicky leštěných monokrystalických borem dopovaných diamantových elektrod s krystalovou orientací {110})**

Peter Čambal<sup>a</sup>, Jana Poláková<sup>a</sup>, Simona Baluchová<sup>a</sup>, Andrew Taylor<sup>b</sup>, and Karolina Schwarzová-Pecková<sup>b</sup>

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

<sup>b</sup> FZU – Institute of Physics of the Czech Academy of Sciences, Na Slovance 2, 182 21 Prague 8, Czech Republic

**Abstract**

Crystal orientations {111}, {100}, and {110}, naturally present in polycrystalline boron-doped diamonds, are the most studied among single-crystal boron-doped diamonds (SC-BDD). In this work, a comparison of the electrochemical behavior of four scaife polished {110}-oriented SC-BDDs deposited at a B/C ratio 250 – 2000 ppm has been performed. Cyclic voltammetry experiments with inner and outer sphere redox markers showed relatively fast heterogeneous electron transfer kinetics regarding all four SC-BDD electrodes. Furthermore, on SC-BDD {110}<sub>2000</sub>, calibration dependencies for dopamine were measured by square-wave voltammetry (SWV) on both, the H-terminated surface after cathodic pre-treatment and the O-terminated surface after anodic pre-treatment. Additionally, the SWV measurements were highly repeatable for each concentration level, and limits of detection and quantification were calculated.

**Keywords:** Single-crystal, Boron-doped diamond, Crystal orientation, Boron doping level, Scaife diamond polishing, Dopamine.

**Úvod**

Borem dopovaný diamant (BDD) je atraktivní elektrodový materiál, který se v elektrochemii používá od roku 1992 (ref. <sup>1,2</sup>). Unikátní vlastnosti zahrnující široké potenciálové okno ve vodných i nevodných prostředích, nízké proudy pozadí, velké přepětí kyslíku, chemickou stabilitu v náročných podmínkách zahrnujících vysoké teploty a proudové hustoty, biokompatibilitu a možnost generace hydroxylových radikálů *in situ* <sup>3,4,5</sup> z BDD dělají ideální materiál pro elektroanalýzu organických látek, elektrochemickou degradaci polutantů v odpadních vodách, elektrosyntézu, elektrokatalýzu, ale i uskladnění elektrické energie. Navíc lze BDD povrchy různě modifikovat a vylepšit tak jejich vlastnosti pro elektroanalytické aplikace. Elektrochemická odezva a další vlastnosti konvenčních polykrystalických BDD elektrod však závisí na několika důležitých faktorech, jako je: i) koncentrace boru, ii) terminace povrchu (H- vs. O-), iii) obsah nediamantového sp<sup>2</sup>-uhlíku a iv) krystalová orientace <sup>3,6,7,8,9</sup>, které řídí vodivost a ovlivňují heterogenní kinetiku elektronového přenosu. Leštěním BDD povrchu lze také změnit jeho chemické složení a vlastnosti, jelikož vede ke snížení obsahu kyslíku na povrchu a zrychlení kinetiky elektronového přenosu. Mechanické leštění diamantů spočívá v jejich tlačením na rychle rotující (ca 2800 rpm) železný kotouč za přítomnosti diamantové drti <sup>10</sup>.

Monokrystalické (single-crystal, SC-BDD) BDD zatím nebyly dostatečně studovány ani využívány jako elektrody. Nejčastěji jsou studovány krystalové orientace {111}, {100} a {110}, které se přirozeně vyskytují v polykrystalických BDD. Různé krystalové orientace na povrchu BDD filmů ovlivňují elektrochemické chování. Porozumění vlivu krystalové orientace

na elektrochemické chování a další vlastnosti BDD je zajímavá možnost cílené úpravy BDD povrchu pro elektroanalýzu specifických organických látek. Jedním z přístupů je studium homoepitaxiálně nebo heteroepitaxiálně připravených SC-BDD elektrod s konkrétní krystalovou orientací. Elektrochemických studií SC-BDD je málo kvůli výzvám v procesu přípravy. Potřebné jsou dobře definované diamantové monokrystaly o dostatečné velikosti, což se odráží na ceně. Ideálně je povrch SC-BDD hladký, bez (nebo s minimálním množstvím)  $sp^2$  uhlíku a povrchových defektů.

V této práci byly porovnávány dva sady čtyř SC-BDD elektrod s krystalovou orientací {110}, lišící se koncentrací boru (B/C = 250, 500, 1000 a 2000 ppm při depozici v plynné fázi). První set obsahoval SC-BDD elektrody přímo po depozici BDD filmu na monokrystalický substrát, druhý set byl připraven mechanickým leštěním povrchu elektrod prvního setu. Koncentrace boru v SC-BDD naměřené pomocí Ramanovy spektrometrie jsou relativně podobné, v rozsahu *ca*  $4,5 \times 10^{20} - 7,5 \times 10^{20} \text{ cm}^{-3}$ . Nejmenší koncentrace boru byla zaznamenána u SC-BDD {110}<sub>500</sub>. Cílem této práce bylo zjistit, jak mechanické leštění povrchu ovlivňuje elektrochemické chování SC-BDD a posoudit jejich vhodnost pro elektroanalýzu dopaminu (DA).

### Experimentální část

Syntetické monokrystalické diamanty typu Ib (0.5 €; Sumitomo Electric, Hartmetall GmbH, Germany) vyrobené technikou vysokého tlaku a teploty byly vyleštěny do krystalové roviny {110} pomocí mechanického leštění popsaného v ref.<sup>10</sup>. Takto vyleštěné substráty byly následně charakterizovány pomocí XRD (odchylka od roviny {110};  $< 4^\circ$ ) a použity k depozici BDD filmů. Stejná technika mechanického leštění byla použita po provedení všech měření na SC-BDD elektrodách přímo po depozici.

BDD filmy byly deponovány pomocí 1,5 kW MW-PECVD systému AX5010 (Seki Diamond Systems, USA) ve směsi obsahující 1 % metanu ve vodíku a trimethylboru jako zdroj boru. Podmínky depozice byly: výkon 700 W, tlak 100 mbar, teplota 1000 °C, čas 180 min a poměr B/C v plynné fázi 250, 500, 1000 a 2000 ppm. Výsledkem tohoto způsobu depozice je H-terminovaný povrch (as-deposited, H<sub>AD</sub>).

Roztoky redoxních markerů používaných k měření cyklických voltogramů byly 1 mmol dm<sup>-3</sup> hexakynoželeznanat draselný, 1 mmol dm<sup>-3</sup> hexachloroiriditan draselný, 1 mmol dm<sup>-3</sup> chlorid hexaaminruthenitů a 1 mmol dm<sup>-3</sup> ferrocenmethanol (FcMeOH) – všechny v 1 mol dm<sup>-3</sup> chloridu draselném. Dále byl použit 0,1 mmol dm<sup>-3</sup> dopamin v 0,1 mol dm<sup>-3</sup> fosfátovém pufru (pH = 7,40). Při katodickém i anodickém pre-treatmentu povrchů elektrod byla používána 0,5 mol dm<sup>-3</sup> kyselina sírová.

Standardy použité k přípravě roztoků redoxních markerů citlivých k povrchu elektrody (hexakynoželeznanat draselný, hexachloroiriditan draselný, chlorid hexaaminruthenitů a dopamin, Sigma-Aldrich) byly vysoké čistoty. Ostatní chemikálie byly analytické čistoty: chlorid draselný, dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného a kyselina sírová (vše Lach-ner, Neratovice, ČR).

K měření cyklických voltogramů byl používán potenciostat Autolab (Metrohm, ČR) a standardní tříelektrodové zapojení – jednotlivé SC-BDD byly použity jako pracovní elektrody, argentchloridová (Ag | AgCl | 3 mol dm<sup>-3</sup> KCl) referenční elektroda a platinový drát jako pomocná elektroda. SC-BDD byly během měření umístěny do speciálního 3D-tištěného držáku<sup>11</sup>. Při přípravě fosfátového pufru byl používán pH metr Jenway 3510 s kombinovanou



elektrodou. Ke kalibraci elektrody byla používána třibodová kalibrace se standardními pufrů pH = 4,00; 7,00 a 10,00. K čištění elektrodového povrchu před použitím byla používána ultrazvuková lázeň Sonorex (Bandelin, Německo).

Při katodickém pre-treatmentu v prostředí kyseliny sírové byl používán konstantní proud -20 mA, resp. proudová hustota ca  $-0,5 \text{ A cm}^{-2}$ . Rehydrogenace probíhala vždy v časových intervalech 1 min. Při anodickém pre-treatmentu byl vložen konstantní potenciál +2,4 V po dobu 5 min.

### Výsledky a diskuse

Vyleštěné SC-BDD elektrody a elektrody přímo po depozici byly charakterizovány pomocí CV experimentů s redoxními markery vnější (málo citlivé k chemickým změnám na povrchu) i vnitřní sféry (citlivé k chemickým změnám na povrchu). Jak bylo očekáváno, obecně markery vnější sféry na vyleštěný povrch nereagovaly výrazně. Rozdíl potenciálů anodického a katodického píku ( $\Delta E_p$ ) u  $\text{FeMeOH}^{+/0}$  a  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$  na vyleštěných površích byl prakticky totožný jako u čerstvě deponovaných elektrod. Pouze u SC-BDD  $\{110\}_{500}$  došlo po vyleštění k patrnému zrychlení kinetiky elektronového přenosu (o 26 mV), viz. Tabulka I a II. V případě  $[\text{IrCl}_6]^{2-/3-}$  došlo k mírnému zpomalení kinetiky elektronového přenosu pravděpodobně v důsledku záporného náboje komplexu a částečné oxidaci povrchu SC-BDD po leštění. Tato elektrostatická repulze vede ke zpomalení kinetiky elektronového přenosu navzdory povaze mechanismu elektronového přenosu  $[\text{IrCl}_6]^{2-/3-}$  přes vnější sféru.

Na druhou stranu redoxní markery vnitřní sféry ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  a dopamin/dopamin-*o*-chinon, DA/*o*-DQ) reagovaly na vyleštění povrchu SC-BDD větší změnou  $\Delta E_p$ , resp. potenciálu anodického píku DA ( $E_{pA}$ ) než markery vnější sféry. U  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  došlo po vyleštění k výraznému zrychlení kinetiky elektronového přenosu; nejvýrazněji u SC-BDD  $\{110\}_{500}$  (zmenšení  $\Delta E_p$  o 137 mV), pravděpodobně kvůli nejmenšímu obsahu boru, zatímco u ostatních SC-BDD elektrod byla zaznamenána změna  $\Delta E_p$  o ca 40-60 mV (Tabulka I+II). V případě DA/*o*-DQ se výsledky liší dle koncentrace boru. U méně dopovaných SC-BDD elektrod došlo ke zrychlení kinetiky elektronového přenosu, které se projevilo jak na  $E_{pA}$ , tak na  $\Delta E_p$ , u SC-BDD  $\{110\}_{250}$  (pokles  $\Delta E_p$  o ca 80 mV) a  $\{110\}_{500}$  (pokles  $\Delta E_p$  ca o 40 mV). Naopak u více dopovaných SC-BDD elektrod  $\{110\}_{1000}$  a  $\{110\}_{2000}$  došlo ke zpomalení (zvýšení  $\Delta E_p$  o ca 100 mV). Hodnoty  $E_{pA}$  pro dopamin naměřené na mechanicky leštěných  $\{110\}$  SC-BDD jsou však srovnatelné nebo nižší než hodnoty naměřené na chemicko-mechanicky leštěných polykrystalických BDD<sup>12</sup>. Na základě výsledků cyklické voltametrie redoxních markerů vnitřní sféry lze usoudit, že mechanické leštění může mít velký vliv na kinetiku elektronového přenosu.

### Tabulka I

Rozdíl potenciálu katodického a anodického píku  $\Delta E_p$  jednotlivých redoxních markerů a DA získané na SC-BDD s  $H_{AD}$  povrchem.

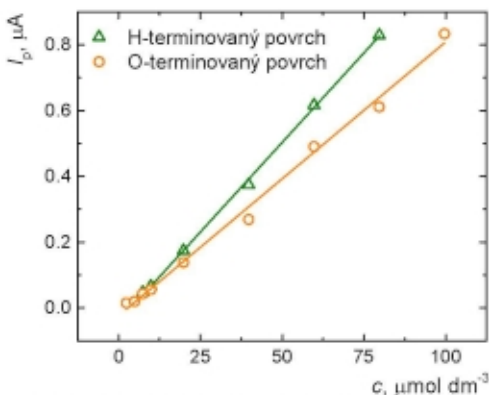
	Redoxní marker $\Delta E_p$ , mV				Dopamin	
	$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$	$\text{FeMeOH}^{+/0}$	$[\text{IrCl}_6]^{2-/3-}$	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$	$E_{pA, DA}$ , mV	$\Delta E_p$ , mV
$\{110\}_{250}$	70	63	76	137	459	434
$\{110\}_{500}$	95	63	63	232	420	386
$\{110\}_{1000}$	73	65	93	134	374	323
$\{110\}_{2000}$	63	63	84	122	335	276

**Tabulka II**

Rozdíl potenciálu katodického a anodického piku  $\Delta E_p$  pro cyklickou voltametrii jednotlivých redoxní markerů a DA získané na mechanicky leštěných SC-BDD.

Redoxní marker $\Delta E_p$ , mV					Dopamin	
SC-BDD	[Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>3+/2+</sup>	FeMeOH <sup>+0</sup>	[IrCl <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup>	[Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>2-/3-</sup>	$E_{pA, DA}$ , mV	$\Delta E_p$ , mV
{110} <sub>250</sub>	68	64	83	81	396	357
{110} <sub>500</sub>	69	63	85	95	391	342
{110} <sub>1000</sub>	71	68	83	90	462	435
{110} <sub>2000</sub>	63	68	91	83	410	368

Pro SC-BDD {110}<sub>2000</sub> s nejvyšší koncentrací boru byla změřena kalibrační závislost DA (v 0,1 mol dm<sup>-3</sup> fosfátovém pufru, pH = 7,40) metodou square-wave voltmetrie (SWV) na H-terminovaném i O-terminovaném povrchu. Použité optimální parametry SWV jsou i)  $A = 140$  mV,  $f = 60$  Hz a  $\Delta E = 5$  mV pro H-terminovaný povrch a ii)  $A = 70$  mV,  $f = 50$  Hz a  $\Delta E = 6$  mV pro O-terminovaný povrch. Koncentrační rozsah byl ~ 2 až 100  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ . V případě H-terminovaného povrchu byla lineární část kalibrace od 7,5 do 80  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  a v případě O-terminovaného povrchu od 2,5 do 100  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ , jak lze vidět na obr. 1. Dosažené meze detekce a kvantifikace byly 2,01  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  a 6,70  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  pro H-terminovaný povrch, resp. 4,06  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  a 13,1  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  pro O-terminovaný povrch. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s hodnotami naměřenými na polykrystalických a porézních BDD elektrodách za použití stejného způsobu vyhodnocení<sup>13</sup> i chemicko-mechanicky leštěných polykrystalických BDD elektrodách<sup>12</sup>. Odezva byla vysoce opakovatelná (RSD < 5 %) u obou typů terminace povrchu. Mezi jednotlivými měřeními bylo pro aktivaci elektrodového povrchu dostatečně pouze zamíchání roztoku.



**Obr. 1.** Kalibrační závislost DA pro H-terminovaný a O-terminovaný povrch. Měřeno SWV v 0,1 mol dm<sup>-3</sup> fosfátovém pufru (pH = 7,40) na SC-BDD {110}<sub>2000</sub>.

### Závěr

V porovnání s čerstvě deponovanými SC-BDD elektrodami, u mechanicky leštěných nebylo prokázáno znatelné zrychlení kinetiky přenosu elektronu pro redoxní markery vnější sféry. Na druhou stranu pro redoxní markery s mechanismem přenosu elektronu vnitřní sférou byly

prokázány značné rozdíly v rychlosti kinetiky elektronového přenosu, přičemž zrychlení nebo zpomalení závisí na koncentraci boru. Pomocí square-wave voltametrie byly na mechanicky leštěných SC-BDD dosaženy meze detekce a kvantifikace pro dopamin srovnatelné s hodnotami dosaženými na porézních, polykrystalických a chemicko-mechanicky BDD elektrodách<sup>12, 13</sup>. Dalším krokem bude měření v reálných vzorcích.

#### Acknowledgments

This research has been supported by Specific University Research (SVV 260690) and the Czech Science Foundation (project No. 20-03187S).

#### References

1. Patel K., Hashimoto K., Fujishima A.: *Denki Kagaku* *60*, 659 (1992).
2. Swain G. M., Ramesham R.: *Anal. Chem.* *65*, 345 (1993).
3. Yang N., Yu S., Macpherson J. V., Einaga Y., Zhao H. Y., Zhao G. H., Swain G. M., Jiang X.: *Chem. Soc. Rev.* *48*, 157 (2019).
4. Macpherson J. V.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* *17*, 2935 (2015).
5. Yu S., Liu S., Jiang X., Yang N.: *Carbon* *200*, 517 (2022).
6. Baluchová S., Daňhel A., Dejmková H., Ostatná V., Fojta M., Schwarzová-Pecková K.: *Anal. Chim. Acta* *1077*, 30 (2019).
7. Ando T., Asai K., Macpherson J. V., Einaga Y., Fukuma T., Takahashi Y.: *Anal. Chem.* *93*, 5831 (2021).
8. Ivandini T. A., Watanabe T., Matsui T., Ootani Y., Iizuka S., Toyoshima R., Kodama H., Kondoh H., Tateyama Y., Einaga Y.: *J. Phys. Chem. C* *123*, 5336 (2019).
9. Bogdanowicz R., Ryl J.: *Curr. Opin. Electrochem.* *31*, 100876 (2022).
10. J. R. Hird, J. E. Field: *Proc. R. Soc. Lond. A* *460*, 3547 (2004).
11. Čambal P., Baluchová S., Taylor A. Míka L., Vondráček M., Gedeonová Z., Hubík P., Mortet V., Schwarzová-Pecková K.: *Electrochim. Acta* 2023 submitted.
12. Zelensky M., Fischer J., Baluchová S., Klimša L., Kopeček J., Vondráček M., Fekete L., Eidenschink J., Matysik F.-M., Mandal S., Williams O. A., Hromadová M., Mortet V., Schwarzová-Pecková K., Taylor A.: *Carbon* *203*, 363 (2023).
13. Brycht M., Baluchová S., Taylor A., Mortet V., Sedláková S., Klimša L., Kopeček J., Schwarzová-Pecková K.: *Bioelectrochemistry* *137*, 107646 (2021).

## Comparison of Flow-through Boron-Doped Diamond Electrodes (Porovnání různých typů průtokových diamantových elektrod)

Hana Dejmková, Andrej Vikartovský, Jakub Pecák, and Martin Baroch

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

### Abstract

The performance of two high-area flow-through electrodes based on a boron-doped diamond is compared; attention is paid to electrochemical behavior towards selected polyphenolic compounds as well as to the peak shape and parameters of the calibration dependence. Both electrodes proved to be useful for the detection in HPLC, although none of them provided a high conversion degree toward the model analytes.

**Keywords:** Boron-doped diamond electrode, Amperometry, Flow-through detection.

### Úvod

*Konstrukce* velkoplošných průtokových elektrod na bázi borem dopovaného diamantu (BDDE) je problematika s potenciálně zajímavými výsledky, nicméně ne zcela přímočarým řešením. Elektrochemické vlastnosti BDDE, jako je odolnost, nízký proud pozadí a široké potenciálové okno, umožňují širokou aplikaci připravených elektrod pro coulometrickou detekci v kombinaci s průtokovými technikami<sup>1</sup>; kromě toho se, vzhledem ke specifickému průběhu oxidace na povrchu BDDE, zde otevírá možnost elektrochemických detekcí odpadních organických látek<sup>2</sup>. Technologie výroby BDDE pomocí depozice nicméně výrobu velkoplošných elektrod příliš nepodporuje, protože pravidelné pokrývání složitě strukturovaného substrátu je obtížné<sup>3,4</sup>.

V tomto příspěvku bude porovnáváno elektrochemické chování dvou velkoplošných průtokových BDDE, vyrobených různými technikami. Srovnávány byly jak parametry elektrochemické reakce, tak příspěvek k rozmytí chromatografické zóny a parametry kalibrační závislosti.

### Experimentální část

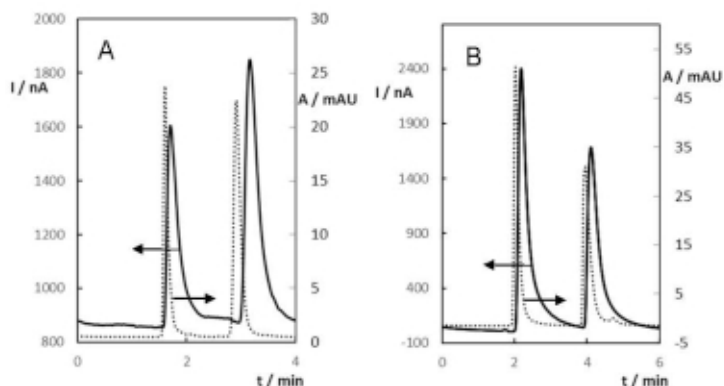
Jako modelové analyty byly využity dopamin a norepinefrin (Sigma-Aldrich). Měření byla prováděna na chromatografické sestavě složené z vysokotlaké gradientové pumpy BETA 10 (Ecom, ČR), degasseru DG 4014 (Ecom, ČR), šesticestného dávkovacího ventilu (Ecom, ČR) se smýčkou objemu 20  $\mu$ l, kolony Kinetex® EVO C18 (150  $\times$  4,6 mm) (Phenomenex), UV detektoru Sapphire (Ecom, ČR) s vlnovou délkou 280 nm a elektrochemického detektoru ADLC 1 (Laboratorní přístroje Praha, ČR). Jako mobilní fáze sloužil desetkrát zředěný Brittonův-Robinsonův pufr. Elektrochemická měření probíhala v tříelektrodovém uspořádání s platinovou pomocnou elektrodou a argentochloridovou (3M KCl) referenční elektrodou ponořených spolu s pracovní BDDE do přepadové nádoby. První testovanou pracovní elektrodou byla destička z porézního mikrokystalického borem dopovaného diamantu ve tvaru disku o poloměru 2,5 mm a tloušťce cca 60  $\mu$ m. Druhá elektroda měla tvar válce o poloměru 4 mm a výšce 2 mm, kterým procházelo šest děr o průměru 1 mm, přičemž povrch tohoto tělesa byl pokryt nanokystalickým diamantem; pracovala tedy jako vícekanálová tubulární elektroda.

### Výsledky a diskuse

Hydrodynamické voltamogramy studovaných látek byly na obou pracovních elektrodách naměřeny v prostředí o pH 2,5 až 10. Obě elektrody poskytovaly pro každou ze studovaných

látek jednu oxidační vlnu, jejíž potenciál klesal se stoupajícím pH, přičemž proudová odezva byla obdobná ve všech sledovaných prostředích. Pórzní BDDE vykazovala chování typické pro diamantové elektrody: přepětí elektrodové reakce zapříčinilo pomalý nárůst proudové odezvy a tedy protáhlý tvar voltametrické vlny. Multitubulární BDDE, pokrytá diamantem odlišného charakteru, se v tomto ohledu chovala více ve shodě s teoretickým chováním, s výraznějším tvarem vln. Na druhou stranu poskytovala pórzní BDDE mimě širší anodické potenciálové okno; jeho šifka se zmenšovala se stoupajícím pH mobilní fáze.

Negativní vliv konstrukce detektoru na rozmytí chromatografického piku byl pozorovatelný, nicméně šířka piku byla v obou detekčních systémech pouze přibližně dvojnásobná oproti UV spektrofotometrické detekci, což je akceptovatelná hodnota (Obr. 1). Stupeň konverze byl překvapivě vyšší u multitubulárního detektoru, kde dosáhl přibližně 10 % ve srovnání 5 % dosažených s pórzním detektorem. Opakovatelnost měření byla srovnatelná pro obě konstrukce - RSD nepřesáhla 5 % ( $n = 10$ ).



**Obr. 1.** Porovnání tvaru piku směsi norepinefrinu a dopaminu na pórzní BDDE při potenciálu 0,9 V (A) a multitubulární BDDE při potenciálu 0,6 V (B) ve srovnání s UV spektrofotometrickou detekcí (čárkovaná čára). Kolona Kinetex® EVO C18 (150 × 4,6 mm), mobilní fáze pufr pH 6.

Kalibrační závislosti byly měřeny v koncentračním rozsahu 1 až 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . V tomto koncentračním rozsahu jsou všechny naměřené křivky lineární s korelačním koeficientem mezi 0,9977 a 0,9995. Meze stanovitelnosti dosahují hodnoty přibližně 1  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro pórzní elektrodu a 0,5  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro multitubulární elektrodu, což patrně odráží rozdíly ve stupni konverze a tím i výšce piku.

### Závěr

V rozporu s očekáváním nevykázal ani jeden z testovaných konstrukčních typů elektrod vysoký stupeň konverze, blízký se kvantitativnímu. Přesto se jedná, s ohledem na získané parametry stanovení, účinné a efektivní pracovní elektrody pro průtokové měření. Elektrochemické chování multitubulární elektrody vykazuje některé rysy nediamantových uhlíkových elektrod,

se všemi z toho vyplývajících výhodami (nízké přepětí elektrodových reakcí) i nevýhodami (menší šířka potenciálového okna).

#### **Acknowledgments**

This research has been supported by the Czech Science Foundation (project No. 23-05688S) and it was performed within the framework of Specific University Research (SVV260690).

#### **References**

1. Baluchová S., Daňhel A., Dejmková H., Ostatná V., Fojta M., Schwarzová-Pecková K.: *Anal. Chim. Acta* *1077*, 30 (2019).
2. Martinez-Huitile, C. A.: *Materials Research*, *10*, 419 (2007).
3. Baroch M., Baluchová S., Taylor A., Mika L., Fischer J., Dejmková H., Mortet V., Sedláková S., Klimša L., Kopeček J., Schwarzová-Pecková K.: *Electrochim. Acta* *426*, 140758 (2022).
4. Petrák V., Vlčková Živcová Z., Krýsová H., Frank O., Zukal A., Klimša L., Kopeček J., Taylor A., Kavan L., Mortet V.: *Carbon*, *114*, 457 (2017).

## Spectroelectrochemical Study of Acidobasic Equilibria of Protoporphyrin Derivatives (Spektroelektrochemické studium acidobazických rovnováh derivátů protoporphyrinu)

Juraj Dian<sup>a,b</sup>, Martin Baroch<sup>b</sup>, Václav Červený<sup>b</sup>, Jindřich Jindřich<sup>c</sup>, and Jakub Pšenčík<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, Department of Chemical Physics, Ke Karlovu 3, 121 16 Prague 2, Czech Republic, E-mail: Juraj.Dian@natur.cuni.cz

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

<sup>c</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Organic Chemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

### Abstract

A spectroelectrochemical study of protoporphyrin IX and protoporphyrin IX dimethyl ester in non-aqueous media is presented. Variations in the absorption band intensities and spectral shifts during cyclic voltammetry are described. Optical absorption spectra of protoporphyrin IX in various redox states were more complex than those of protoporphyrin IX dimethyl ester due to the presence of two carboxyl groups. The carboxyl groups of protoporphyrin IX undergo deprotonation in the cathodic potentials, and additional bands in the absorption spectra were observed. The spectroelectrochemical results are compared with those obtained by other groups from spectrophotometric titrations.

**Keywords:** Protoporphyrin IX, Protoporphyrin IX dimethyl ester, Dimethylformamide, UV-Vis absorption, Spectroelectrochemistry, Cyclic voltammetry.

### Úvod

Porfyriny jsou součástí mnoha biologicky významných redoxních systémů, mezi nejdůležitější patří fotosyntetický aparát a dýchací řetězec<sup>1</sup>. Nesubstituovaný porfyrinový kruh představuje systém osmnácti elektronů konjugovaných vazeb v šestnáctičlenném vnitřním kruhu a vykazuje charakteristická absorpční spektra s dominantním Soretovým B pásem ( $S_0 \rightarrow S_2$ ) v okolí 400 nm a čtyřmi Q pásy ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) v červené oblasti viditelného spektra (Obr. 1). Optická spektra porfyrinů poskytují informace o poloze molekulových orbitalů a závisí na jejich redoxní formě. Výrazná závislost intenzity a polohy absorpčních pásů na redoxním stavu je důležitá zejména pro využití protoporphyrinu ve fotodynamické terapii, používané při léčbě některých nádorů<sup>2</sup>. Předběžná spektroelektrochemická studie protoporphyrinu IX v dimethylformamidu ukázala<sup>3</sup>, že v katodické oblasti jsou dva redoxní přechody, přičemž odpovídající redoxní formy mají významně odlišné spektrální vlastnosti. Cílem této studie bylo srovnání protoporphyrinu IX s protoporphyrinem IX dimethylesterem a určení vlivu přítomnosti karboxylových skupin na optickou absorpci.

### Experimentální část

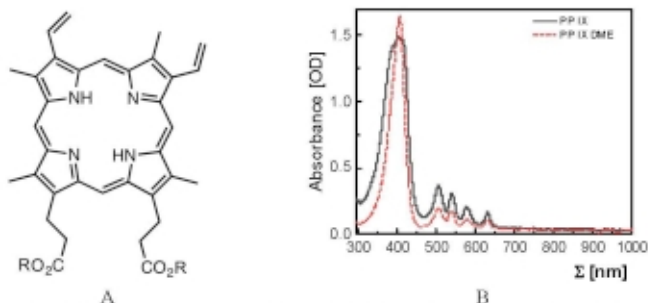
Protoporphyrin IX (PP IX), protoporphyrin IX dimethylester (PP IX DME), ferrocen, tetrabutylammonium hexafluorofosfát (TBA PF<sub>6</sub>) byly použity tak, jak byly dodány (Merck). TBA PF<sub>6</sub> (pomocný elektrolyt) byl dosušen za vakua (~5 Torr) při 60°C po dobu 10-12 hodin. *N,N*-dimethylformamid (DMF) (Merck) byl sušen pod molekulovými síty 4Å (tři dny a více) a destilován za sníženého tlaku (~10 Torr) vždy těsně před přípravou roztoků (PP IX, PP IX DME a ferrocenu). Roztoky vzorků byly před dávkováním do měřicí cely probublávány cca 15 min. argonem.

Spektroelektrochemická měření byla prováděna v optické tenkovrstvé cele Hartlova typu s Pt pracovní a pomocnou mřížkovou elektrodou a Ag pseudoreferenční elektrodou. Délka optické

dráhy mezi okénky byla  $-0.2$  mm, objem elektrolytu  $\sim 300$   $\mu$ l. Cyklická voltametrie PPIX a PP IX DME byla měřena potenciostatem Autolab PGSTAT101, rychlost skenu  $1-2$  mV/s. Absorpční UV-Vis spektra byla snímána vláknovým spektrometrem Avantes (ULS3648TEC), jako světelný zdroj byla použita širokospektrální halogen-deuteriová lampa Avalight DHc. Spektroelektrochemický experiment byl řízen procedurou v programovém prostředí Nova 2.1. Potenciál Ag pseudoreferenční elektrody byl kontrolován pomocí  $1$  mM ferrocenu v pomocném elektrolytu.

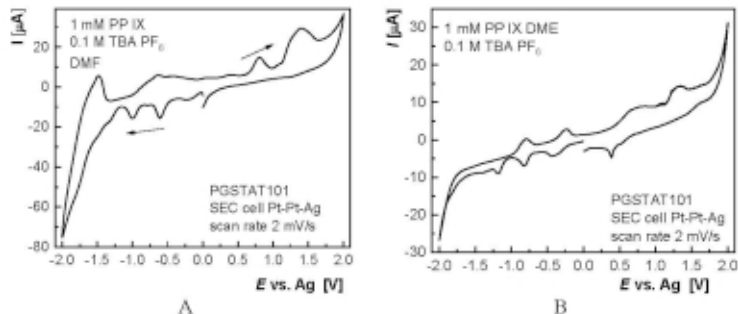
### Výsledky a diskuse

UV-Vis absorpční spektra  $\sim 1$  mM roztoků PP IX a PP IX DME (Obr. 1A) v  $0.1$  M TBA PF<sub>6</sub> v DMF jsou na obr. 1B. Hlavní rysy spekter studovaných sloučenin jsou výrazný Soretův B pás s maximem u vlnové délky kolem  $405$  nm a čtyři Q pásy s maximy mezi  $500-630$  nm.



**Obr. 1.** A – Chemická struktura protoporphyrinu IX ( $R = H$ ) a protoporphyrinu IX dimethyl esteru ( $R = -CH_3$ ). B – Absorpční UV-Vis spektra protoporphyrinu IX (PP IX) a protoporphyrinu IX dimethyl esteru (PP IX DME) v  $0.1$  M TBA PF<sub>6</sub> v *N,N'*-dimethylformamidu.

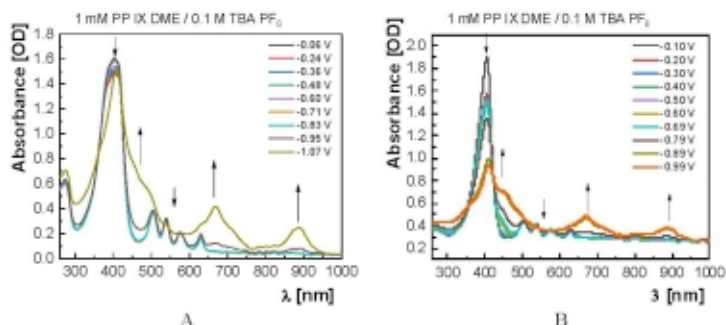
Na obr. 2 jsou cyklické voltamogramy studovaných porfyrinů v rozsahu  $-2V - +2V$ . Z obr. plyne, že základní redoxní vlastnosti obou systémů jsou si podobné.



**Obr. 2.** Cyklická voltametrie roztoků PP IX (A) a PP IX DME (B).



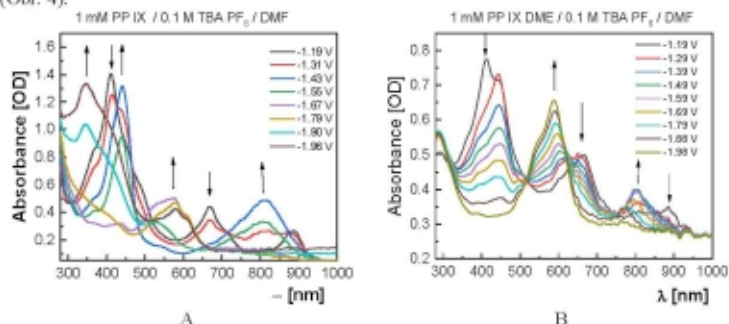
Čtyři absorpční Q pásy jsou charakteristické pro porfyriny se dvěma nesubstituovanými vodíky uprostřed tetrapyrrolového kruhu<sup>1</sup>. Spektroelektrochemické studium studovaných porfyrinů ukázalo, že při změně potenciálu v katodické oblasti dochází nejdříve k narušení vnitřního uspořádání pyrrolových atomů H (Obr. 3).



**Obr. 3.** Absorpční UV-Vis spektra PP IX (A) a PP IX DME (B) v oblasti prvního redoxního přechodu v katodické oblasti.

Z průběhu změn absorpčních spekter na obr. 3 je patrné, že první redukční stupeň probíhá na odlišných místech porfyrinového kruhu. Zatímco u PP IX je pokles intenzity Soretova pásu mírný a k podstatnému poklesu dochází až ve druhém redukčním kroku ( $\sim -1$  V), u PP IX DME je patrný monotónní pokles již od nízkých hodnot potenciálu v katodické oblasti. Postupný pokles intenzity Soretova pásu byl pozorován u různých derivátů porfyrinu v DMF při spektrofotometrických titracích a byl spojován s postupnou deprotonizací vnitřních atomů H tetrapyrrolového kruhu<sup>4,5</sup>. Chování PP IX DME odpovídá těmto pozorováním, zatímco u PP IX je první redukční stupeň doprovázen malou změnou intenzity Soretova pásu. Nejpravděpodobnějším důvodem je deprotonizace karboxylových skupin PP IX.

Nejvýraznější rozdíl v posunu elektronových hladin je pozorován v druhém redukčním stupni (Obr. 4).



**Obr. 4.** Absorpční UV-Vis spektra PP IX (A) a PP IX DME (B) v oblasti druhého redoxního přechodu v katodické oblasti.

U PP IX (Obr. 4A) následuje po červeném posunu k nárůstu širokého pásu u vlnové délky ~350 nm, zatímco u PP IX DME (Obr. 4B) dochází nejdříve k červenému posuvu (405 nm → 445 nm) a následně k úplnému poklesu Soretova pásu. Chování absorpčních pásů – jejich intenzita a pozice – v závislosti na redoxních podmínkách mají zásadní důležitost pro výběr vhodné vlnové délky ozařování ve fotodynamické terapii.

Vliv karboxylových skupin na spektroelektrochemické chování absorpčních pásů v druhém redukčním stupni (Obr. 4) je zřejmý i z většího počtu pásů u PP IX ve srovnání s PP IX DME, jakož i posunu izobestických bodů u PP IX. Absorpční pásy nad 800 nm odpovídají svojí spektrální polohou agregátům a souvisejí s vysokou koncentrací ( $c = 1 \text{ mM}$ ) studovaných barviv. V běžných spektroskopických studiích ( $c = 10^{-5} \text{ M}$ ) tyto pásy nejsou pozorovány.

### Závěr

Spektroelektrochemické chování protoporfyrinu IX a protoporfyrinu IX dimethylesteru ukázalo vliv karboxylových skupin na polohu elektronových hladin při různých hodnotách elektrodového potenciálu v katodické oblasti. První redukční krok vede u PP IX k malé změně intenzity Soretova pásu v důsledku deprotonizace karboxylových skupin, u PP IX je změna intenzity důsledkem deprotonizace atomů H tetrapyrrolového kruhu a je výrazná již při nízkých hodnotách potenciálu v katodické oblasti. Ve druhém redukčním kroku vede přítomnost karboxylových skupin u PP IX k většímu počtu absorpčních pásů a posunu izobestických bodů.

### References

1. Gouterman M.: *The Porphyrins, Vol. 3, Physical Chemistry – Part A*, (Dolphin, D., ed.), chapter 1, p. 1, Academic Press, New York 1978.
2. Abdel-Kader, M.H.: *Photodynamic Therapy – From Theory to Applications*, Springer, Berlin, Heidelberg 2014.
3. Povišer M.: *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova, Praha 2019.
4. Guo H.W., Jiang J., Shi Y., Wang Y., Wang Y., Dong S., *J. Phys. Chem. B* *110*, 587 (2006).
5. Evens K.K., Kaplan K.E., *J. Porphyrins Phthalocyanins* *21*, 680 (2017).

## Electrochemical Detection of G-quadruplexes using N-methyl Mesoporphyrin IX as a Redox Probe

Daniel Dobrovodský<sup>ab</sup>, Aleš Daňhel<sup>a</sup>, Daniel Renčíuk<sup>a</sup>, and Miroslav Fojta<sup>ab</sup>

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

<sup>b</sup> National Centre for Biomolecular Research, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic.

### Abstract

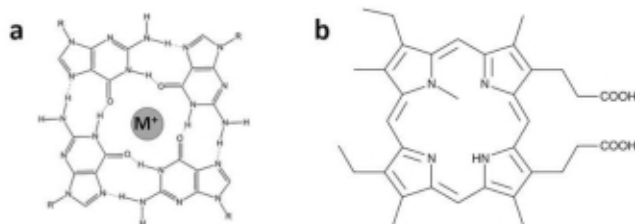
The development of novel analytical techniques for the study of alternative DNA G-quadruplexes (G4s) is becoming relevant with the increasing insight into their biological roles. An approach utilizing N-methyl mesoporphyrin IX (NMM) as a redox probe for electrochemical G4 analysis is introduced in this contribution. Basic electrochemical characterization of NMM was performed using cyclic voltammetry at a hanging mercury drop electrode (HMDE). NMM produced a significantly lower reduction peak in the presence of single- and double-stranded oligonucleotides (ODNs), compared to G4-forming ODNs, which were used for the selective detection of G4s. This effect was also used to monitor the K<sup>+</sup>-dependent folding of G4s.

**Keywords:** N-methyl mesoporphyrin, G-quadruplex, Electrochemical probes, Cyclic voltammetry, Hanging mercury drop electrode, DNA structure.

### Introduction

Electrochemical methods have been well-established as powerful tools for the study of nucleic acids. Compared to more conventionally used techniques, such as UV-vis or circular dichroism (CD) spectroscopy, electrochemistry offers increased sensitivity, a high degree of versatility, fast and simple analysis, along with the possibility of miniaturization for the development of portable biosensors. Faradaic, as well as non-faradaic signals of DNA obtained by a variety of voltammetric methods on mercury electrodes, have been shown to be sensitive to DNA structure, conformational changes, and damage. For example, DNA double-strand (ds) to single-strand (ss) transition, can be detected by differential pulse voltammetry or square-wave voltammetry as an increase of reduction peak of the nucleobases adenine and cytosine, which are more readily reduced in the ss-form. Likewise, specific changes in the double-layer capacitance of adsorbed DNA at mercury can be detected by alternating current voltammetry, which can be related to DNA structure or damage<sup>1</sup>.

However, no direct relationship between DNA structure and its intrinsic electrochemical response has so far been observed in the investigation of G-quadruplex DNA. G-quadruplex (G4) is an alternative, quadruple-helical DNA structure which can form in DNA sequences containing blocks of guanines. The guanines in G4 are associated with a network of Hoogsteen-type hydrogen bonds into square guanine tetrads (Fig. 1a)<sup>2</sup>. Formation and stability of G4s are tightly dependent on the presence of cations, that are involved in the G4 architecture (Fig. 1a)<sup>3</sup>. G4 structures are present in important genomic regions and the body of evidence for their involvement in the regulation of vital cellular processes is steadily growing<sup>4,5</sup>. For that reason, the development of a simple electroanalytical method for G4 detection might be useful. Since intrinsic DNA electroactivity is not readily usable for this purpose, we focused on the use of small molecules as electrochemical probes for the indirect detection of these structures<sup>6</sup>. In this contribution, the electrochemical behavior of N-methyl mesoporphyrin IX (NMM, Fig. 1b) is investigated and this compound is used for the discrimination of G4 DNA structures.



**Fig. 1.** Structure of a guanine tetrad with a central cation  $M^+$  (a) and the studied compound NMM (b).

### Experimental

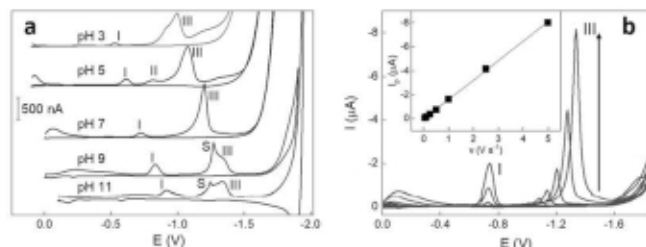
G4-forming oligodeoxynucleotides (ODNs) hut-T2 ((AG<sub>3</sub>T<sub>2</sub>)<sub>3</sub>AG<sub>3</sub>), TBA (G<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>TGTG<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>) and c-myc18 (AG<sub>7</sub>TG<sub>4</sub>AG<sub>3</sub>TG<sub>4</sub>) and G4-non-forming ODNs hut-com (C<sub>3</sub>TA<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C<sub>3</sub>T), odn31 (CATGCATGACGTCACTC<sub>3</sub>AGTC<sub>2</sub>GC<sub>3</sub>TAG) and odn31-com (CTAG<sub>3</sub>CG<sub>2</sub>ACTG<sub>3</sub>AGTGACGTCATGCATG) were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Double-stranded ODNs hut-ds and odn31-ds were prepared by hybridization of the appropriate pairs of complementary ODNs. The G4-forming ODNs were denatured at 95 °C for 5 min after which KCl was added to the final concentration of 0.3 M and the samples were slowly cooled to facilitate G4 folding. All ODNs were prepared for experiments as 5 μM solutions in 0.3 M KCl or LiCl. NMM was purchased from Santa Cruz Biotechnology (USA) and was stored as a 5 mM aqueous solution at 4 °C. All other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich.

Dependence of the electrochemical response of NMM on pH was measured in Britton-Robinson (BR) buffer pH 2 – 12. For all other experiments, 0.05 M lithium phosphate buffer pH 6.9 (LiPB) with or without 0.3 M KCl or LiCl was used. Electrochemical measurements were performed using cyclic voltammetry (CV) in the potential window (0.00 V; –1.85 V) at scan rate 1 V s<sup>-1</sup> unless stated otherwise, on PGSTAT128N potentiostat controlled by software Nova 2.1 (both Metrohm Autolab) in a three-electrode system with hanging mercury drop working electrode (HMDE), glassy carbon auxiliary electrode and Ag/AgCl/3M KCl reference electrode. Measured solutions were deaerated for 2 min before measurement and the mercury drop was created for the last 45 s of the deaeration period to allow adsorption of the analytes from the solution. CD spectroscopy was performed on a Jasco J-815 instrument (Jasco, Japan) at 20 °C in 1.0 cm quartz cuvettes in the wavelength range 230 – 330 nm at 200 nm min<sup>-1</sup> scan speed.

### Results and Discussion

The electrochemical behavior of NMM studied using CV at HMDE in BR buffer within the pH range from 2 to 12 (selected values in Fig. 2a) was determined to be rather complex. Reduction on NMM yielded three cathodic peaks labeled I, II, and III. Peak II only appeared between pH 4 and 5. The major reduction signal, peak III increased with increasing pH and reached its maximum intensity at pH 8, and sharply fell at higher pH values. The involvement of H<sup>+</sup> ions in the reduction processes behind all three peaks was evidenced by the shift of their reduction potential to more negative values with increasing pH. An additional signal, a spike S, likely of non-faradaic origin appeared near the potential of peak III at pH 9 and above. Peak III was best defined at pH 7 which was, therefore, chosen for further experiments in LiPB. CV

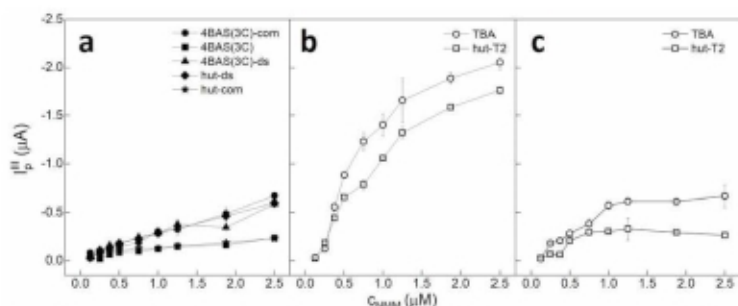
measurements of NMM with increasing scan rate between 0.05 and 5 V s<sup>-1</sup> revealed linear dependence of peak III height on this parameter (Fig. 2b), indicating an adsorption-controlled process. Involvement of adsorption to the HMDE surface in the reduction of NMM can be expected based on its aromatic character. Using peak III, NMM could be detected with a limit of detection of 0.04  $\mu$ M.



**Fig. 2.** a) Cyclic voltammograms of 1  $\mu$ M NMM in BR buffer of selected pH values at HMDE; b) Cyclic voltammograms of 1  $\mu$ M NMM in LiPB buffer measured at increasing scan rates: 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, and 5 V s<sup>-1</sup> (direction of the arrow), inset: evaluated scan rate dependence of peak III.

Next, NMM was used as an electrochemical probe for the detection of G4s based on their different electrochemical responses in the presence of various conformation of ODNs. Peak III was measured at increasing concentrations of NMM in the presence of 0.25  $\mu$ M of ODNs in LiPB with 0.3 M KCl added. In addition to providing the ionic strength needed for ODN adsorption to HMDE, KCl is necessary for the in-solution formation of G4s in the G4-forming ODNs. CD spectroscopy was used to confirm the existence of these structures, based on characteristic spectral patterns. In the presence of ss- and dsODNs (Fig. 3a), the obtained intensities of peak III were significantly lower, compared to the presence of G4-forming ODNs (Fig. 3b). This difference was particularly prominent at NMM concentrations above 0.25  $\mu$ M, i.e. in the excess of NMM. Based on our previous study<sup>6</sup>, the observed effect was attributed to the arrangement of adsorbed species on the HMDE surface. Linear ss and dsODNs are able to pack into dense layers on the electrode surface, and thus allow little space for the adsorption of the probe. G4s, on the other hand, form adsorbed layers with greater intermolecular distances, allowing a more facile reduction of NMM. In addition, NMM is able to bind G4s, which likely contributes to the observed difference.

Furthermore, the described approach was also able to discriminate between folded G4s and G4-folded ODNs in their unfolded state. In the presence of Li<sup>+</sup> ions, G4s are not formed. Thus, when 0.3 M of LiCl instead of KCl was added to LiPB, lower signals, comparable to the ss and dsODNs were obtained also with the G4-forming ODNs (Fig. 3c). Since folded and unfolded forms of the same ODN were discernible, we attempted to detect also the conformational transition with increasing K<sup>+</sup> concentration. Samples of 5  $\mu$ M TBA were prepared with increasing concentration of KCl, with the total salt concentration kept constant at 0.3 M by the appropriate concentration of LiCl and measured by CD to confirm the structural change based on the increase of a characteristic CD band. The samples were then diluted to 0.25  $\mu$ M and 1.25  $\mu$ M of NMM was added. The increase of peak III in CV of these samples confirmed, that the described method can detect K<sup>+</sup>-dependent G4 folding comparably to CD spectroscopy while requiring twenty times lower ODN concentration.



**Fig. 3.** Concentration dependence of peak III of NMM in the presence of 0.25  $\mu\text{M}$  of single- and double-stranded ODNs (a) and G4-forming ODNs (b, c) measured by CV at HMDE in LiPB buffer containing 300 mM KCl (a, b) or LiCl (c).

## Conclusions

In this contribution, basic electrochemical characteristics of NMM were determined by CV at HMDE. The reduction of NMM was determined to be adsorption controlled, and the limit of detection of this compound was determined to be 0.04  $\mu\text{M}$ . NMM was subsequently used as a voltammetric probe for the detection of G4 structures formed by ODNs. NMM in mixtures with G4s produced substantially larger peak III than in mixtures with ss and dsODNs and even the G4-forming ODNs in their unfolded states. The larger signal was mostly attributed to better access of the probe to the HMDE surface. The gradual transition from the unfolded state to G4 induced by  $\text{K}^+$  ions was also detected. These results can be useful in the development of new approaches for the electrochemical analysis of alternative DNA structures.

## Acknowledgments

This work has been supported by Czech Science Foundation project No. 22-11252S. The work was carried out within the sustainability period of the SYMBIT project reg. no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15\_003/0000477 financed from the ERDF.

## References

1. Palecek E., Bartosik M.: *Chem. Rev.* **6**, 112 (2012).
2. Neidle S., Balasubramanian S. (ed.): *Quadruplex Nucleic Acids*. RCS, Cambridge 2006.
3. Bhattacharyya D., Mirihana Arachchilage G., Basu S.: *Front. Chem.* **4**, 38 (2016).
4. Spiegel J., Adhikari S., Balasubramanian S.: *Trends Chem.* **2**, 2 (2020).
5. Rhodes D., Lipps H.: *Nucleic Acids Res.* **18**, 43 (2015).
6. Dobrovodsky D., Danhel A., Mothes-Martin E., Pratiel G., Renciuik D., Mergny J.-L., Fojta M.: *Electrochim. Acta* **442** (2023).



## Experimentální část

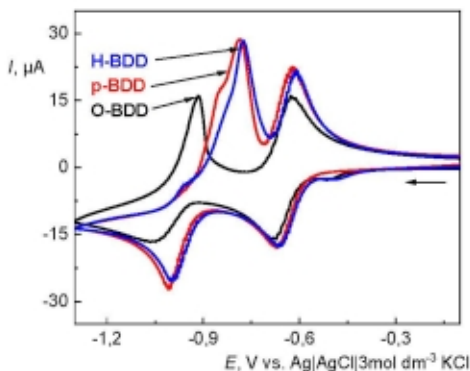
Všechny používané chemikálie měly čistotu p. a., roztoky byly přednostně připravovány přímo v základním elektrolytu, jako studovaný analyt byl použit N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichlorid, znám také jako methylviologen (98%, Sigma-Aldrich, USA).

Měření byla prováděna na přístroji Eco-Tribo polarograf řízeném počítačovým programem MultiEChem 3.2 (Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR). Při samotném měření bylo využíváno tříelektrodové uspořádání – referenční argenticchloridová elektroda ( $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{3 mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{KCl}$ ), pomocná platinová elektroda o ploše  $5,7\text{ mm}^2$  (obě Elektrochemické detektory, ČR) a pracovní byla borem dopovaná diamantová elektroda o průměru 3 mm aktivní plochy a o geometrické ploše  $7,1\text{ mm}^2$  (BioLogic SAS, Francie).

O-BDD povrch byl připraven v měřící cele v roztoku  $0,5\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{H}_2\text{SO}_4$  vložení vysokého aktivního potenciálu  $E_{\text{akt}} = +2400\text{ mV}$  za nepřetržitého míchání po dobu 10 min. Naproti tomu pro přípravu H-BDD povrchu bylo třeba ve stejném roztoku použít potenciál  $E_{\text{akt}} = -2400\text{ mV}$  za nepřetržitého míchání po dobu 10 min. Pro obnovu elektrodového povrchu byla elektroda aktivována 5 minut v závislosti opět v roztoku  $0,5\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{H}_2\text{SO}_4$  za neustálého míchání a vložení vysokého kladného aktivního potenciálu  $E_{\text{akt}} = -2400\text{ mV}$ . P-BDD povrch pracovní elektrody byl připraven pětiminutovým leštěním na lešticí podložce (Elektrochemické detektory, ČR), která byla napuštěna suspenzí aluminu o velikosti částic  $1,1\text{ }\mu\text{m}$  s deionizovanou vodou.

## Výsledky a diskuse

Redoxní chování MV bylo studováno metodou cyklické voltametrie na p-BDD, O-BDD a H-BDD elektrodách, viz Obr. 2. Výška a poloha katodických a anodických signálů MV byla studována v závislosti na parametrech, jako je rychlost skenu, akumulací potenciál a doba akumulace. Výsledky naznačovaly adsorpci MV na povrchu BDD elektrody.



**Obr. 2.** Cyklický voltamogram  $1\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{MV}$  v  $0,1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{KCl}$  na BDD elektrodách bez akumulace, sken od  $-1,3\text{ V}$  k  $-0,1\text{ V}$  a zpět.



Při akumulaci byl pozorován na O-BDD pouze nepatrný výskyt prvního oxidačního piků a významný nárůst druhého oxidačního piků. Na p-BDD a H-BDD dochází při akumulaci ke slévání obou oxidačních piků. Pro p-BDD je charakteristická výšková převaha prvního oxidačního piků nad druhým oxidačním pikem, u H-BDD je tomu naopak. Vzájemné porovnání průběhu cyklických voltogramů MV na jednotlivých površích splňuje předpoklady vodivosti a kinetiky HET daných površích.

Obecně lze říci, že první redukční pik vykazoval na všech površích děj řízený difúzí, druhý redukční pik na povrchu p-BDD a H-BDD vykazoval směrnici 0,4, což naznačuje, že se jedná o děje s výrazným příspěvkem difúze, dochází u nich však k určitému ovlivnění předchozími reakcemi. Oxidační děj prvního oxidačního piků byl jako jediný z piků ovlivněn adsorpcí MV na O-BDD, kdy jeho směrnice byla 0,7, tj. vykazoval děj smíšený. Všechny ostatní piky měly závislosti s nízkými směrnici menšími než 0,4, jejich děje byly výrazně ovlivněny ději předcházejícími.

Nejvýznamnější akumulace byla získána při akumulaci za míchání, a to na všech površích. Akumulace na O-BDD byla provedena při akumulacím potenciálu  $-1,3$  V, pro p-BDD a H-BDD byl užít potenciál  $-1,2$  V, jelikož poskytoval stejné a stabilní voltogramy s kratší dobou analýzy. Na všech površích se ukázalo určité akumulacní maximum v blízkosti doby akumulace 120 s. Za standardní dobu akumulace akumulacních i transferových experimentů bylo vybráno 60 s. Adsorpce byla prokázána adsorpční přenosovou rozpouštěcí voltametrií na O-BDD, kdy byl po přenosu, který následoval 60 s akumulaci při  $-1,2$  V, zachován signál MV z cca 40 % oproti měření prováděném bez přenosu.

### Závěr

Výsledky naznačují, že dochází k adsorpci MV nejen na katodicky upraveném, ale také na leštěném a anodicky upraveném povrchu BDD elektrody. U všech površích byla pozorována adsorpce MV<sup>0</sup> na obou oxidačních picích, jejich nejvýraznější růst při zvyšování doby akumulace byl sledován na leštěném povrchu, nejmenší byl na povrchu oxidovaném a nejlepší akumulaci poskytovala akumulace za míchání. Adsorpce byla potvrzena za pomoci metody adsorpční přenosové rozpouštěcí voltametrie.

### Acknowledgments

This research was supported by the Czech Science Foundation (project No. 20-03187S).

### References

1. Yang N., Yu S., MacPherson J. V., Einaga Y., Zhao H., Zhao G., Swain G. M., Jiang X.: *Chem. Soc. Rev.* **48**, 157 (2019).
2. Pecková K., Musilová J., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* **39**, 148 (2009).
3. Shpilevaya I., Foord J. S.: *Electroanalysis* **26**, 2088 (2014).
4. Baluchová S., Daňhel A., Dejmková H., Ostatná V., Fojta M., Schwarzová-Pecková K.: *Anal. Chim. Acta* **1077**, 30 (2019).

**Anodic Signal of Guanine Residues in DNA at the Mercury Electrode Depends on the Presence of Adenine and/or Cytosine**  
**(Anodický signál guaninových zbytků v DNA na rtuťové elektrodě je závislý na přítomnosti adeninu nebo cytosinu)**

Miroslav Fojta, Zuzana Soldánová, Luděk Havran, Hana Pivoňková, and Monika Hermanová  
<sup>1</sup>Institute of Biophysics, Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, 612 00, Brno, Czech Republic, E-mail: fojta@ibp.cz

**Abstract**

In this work, we studied the effects of thymine, cytosine, and adenine present in guanine-containing oligonucleotides on their voltammetric properties. We confirmed that the reduction of guanine to 7,8-dihydroguanine (the latter being subsequently detected by anodic oxidation) requires the presence of adenine and cytosine reduction products, which have been identified as catalysts of hydrogen evolution. The primary reduction step of guanine thus follows a chemical mechanism. Our results further suggest that the guanine voltammetric response is dependent on the presence of adenine or cytosine, and its use as an analytical signal for DNA structure needs to be approached with caution and with respect to the composition of the investigated DNA.

**Keywords:** guanine, cytosine, adenine, mercury electrode, cathodic reduction, chemical reduction, catalytic hydrogen evolution

**Úvod**

Elektrochemické vlastnosti nukleových kyselin předurčují možnost studia jejich vlastností pomocí voltametrických a dalších elektrochemických metod <sup>1</sup>. Báze nukleových kyselin mohou, v závislosti na podmínkách, být elektrochemicky oxidovány nebo redukovány na různých elektrodách za vzniku analyticky využitelných proudových signálů. Pro sledování oxidace bázi (zejména purinových) jsou využívány téměř výhradně uhlíkové elektrody, poskytující dostatečně široké potenciálové okno v anodické oblasti. K redukci nukleobázi se tradičně využívají elektrody obsahující rtuť, včetně visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE) a různých typů elektrod na bázi amalgamů <sup>2</sup>. Ty umožňují, díky vysokému vodíkovému přepětí, dosáhnout dostatečně negativních potenciálů, při kterých dochází k redukci cytosinu a adeninu za vzniku katodických signálů, a také k chemicky reverzibilní redukci guaninu na 7,8-dihydroguanin, který lze detekovat pomocí anodického signálu jeho zpětné oxidace na guanin (dále uváděný jako pik G). Jedná se o dobře definovaný voltametrický signál, který byl v minulosti opakovaně využit pro různé analytické účely, včetně detekce specifických poškození DNA <sup>3</sup> nebo sledování strukturálních přechodů v DNA. Vliv struktury DNA na její voltametrické chování byl pozorován zejména na negativně nabitých povrchu rtuťových elektrod, kde dochází k souhrně mezi adsorpci hydrofobních bázi na povrch rtuť a odpuzováním negativně nabitých fosfátových skupin od povrchu. Různé struktury DNA se liší dostupností zbytků bázi a tím pádem detekovanou elektrochemickou aktivitou <sup>1</sup>.

V naší předchozí práci <sup>4</sup> jsme zkoumali vztah mezi délkou homoguaninových bloků v syntetických oligodeoxynukleotidech (ODN), tvorbou guaninových kvadruplexů (G4) a změnami intenzity píku G. S délkou guaninového bloku rostla schopnost tvořit G4 detekované pomocí spektroskopie cirkulárního dichroismu a současně postupně klesala výška píku G, ačkoli celkový počet guaninů v ODN rostl. Pozorovaný jev byl tak přisouzen tvorbě G4 a jejich méně efektivní interakci s povrchem elektrody – a tudíž méně efektivní redukci guaninových zbytků – ve srovnání s nestrukturovanými ODN. Z dalších experimentů vyplynulo, že intenzita

píku G měřená při daném obsahu guaninu není nezávislá na obsahu dalších nukleobází, zejména cytosinu a adeninu, a že je tedy potřeba efekt struktury DNA na výšku tohoto signálu interpretovat s opatrností. Bylo ukázáno <sup>5</sup>, že cytosin a adenin, resp. produkty jejich elektrochemické redukce, katalyzují vyvíjení vodíku (CHE) na HMDE. Vezmeme-li v úvahu další pozorování, že primární redukce guaninu je podporována katalytickým vyvíjením vodíku v přítomnosti externích katalyzátorů jako je např. cisplatina <sup>6</sup>, lze závislost píku G na přítomnosti bázi poskytujících katalyticky aktivní redukční produkty přisoudit účasti CHE na primární redukci guaninu.

V této práci jsme se zaměřili na porovnání elektrochemických vlastností syntetických ODN o různých složení a sekvenci nukleotidů s důrazem na chování ODN obsahujících guanin v různém kontextu ostatních kanonických bázi.

### Experimentální část

**Materiál.** Syntetické ODN (viz Tab. 1) byly dodány firmou VBC-BIOTECH (Rakousko). ODN byly rozpuštěny v deionizované vodě. Alikvoty o koncentraci  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  byly skladovány při  $-20^\circ\text{C}$ . Ostatní chemikálie byly použity v čistotě pro analýzu.

**Tab. 1.**

Použité oligonukleotidy

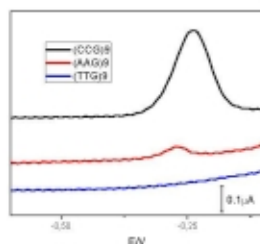
Sekvence	Označení	Délka (nukleotidů)
CCGCCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCG	(CCG) <sub>9</sub>	27
AAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAG	(AAG) <sub>9</sub>	27
TIGTIGTIGTIGTIGTIGTIGTIGTIG	(TIG) <sub>9</sub>	27

**Elektrochemická měření.** Všechna voltametrická měření byla provedena pomocí elektrochemického analyzátoru Autolab (Eco Chemie, Holandsko) připojeného k elektrodovému systému VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Vždy se používal tříelektrodový systém s HMDE jako pracovní, Ag/AgCl|3M KCl jako referenční a platinovým drátem jako pomocnou elektrodou. Měření byla provedena v režimu *in situ* (se studovaným ODN o koncentraci  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  v základním elektrolytu) nebo *ex-situ* (adsorpční přenosovou technikou <sup>1</sup>). Ve druhém případě byla DNA na elektrodu adsorbována ze 3- $\mu\text{L}$  kapky roztoku příslušného ODN (obsahující  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl a ODN o koncentraci  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) po dobu  $t_A = 60$  s. Elektroda byla následně opláchnuta a vložena do elektrochemické nádoby obsahující čistý základní elektrolyt, ve kterém bylo měření provedeno. Cyklická voltmetrie (CV) na HMDE byla provedena s počátečním potenciálem  $E_i = 0,1$  V a bodem obratu  $-1,85$  V, rychlostí skenu  $1 \text{ V s}^{-1}$ , v  $0,3 \text{ M}$  mravenčanu amonném s  $0,05 \text{ M}$  fosfátovým pufrům pH 6,9. Před každým měřením byl roztok základního elektrolytu 2 min probubláván argonem. Všechny experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě.

### Výsledky a diskuse

Zkoumali jsme několik sad syntetických oligonukleotidů obsahujících guanin v kontextu sekvencí ostatních bázi. Příklad uvedený v Tabulce 1. zahrnuje repetitivní sekvence, ve kterých jsou guaninové zbytky odděleny dublety CC, AA nebo TT. Takovéto sekvence nevytváří stabilní dvoušroubovice ani kvadruplexy a tudíž není důvod mezi nimi očekávat zásadní odlišnosti v přístupnosti guaninových zbytků pro redukci na povrchu HMDE (a tudíž ani výrazné změny v intenzitě píku G). Výsledky však ukazují značné rozdíly mezi těmito třemi ODN, kdy (TTG)<sub>9</sub> neposkytoval žádný měřitelný pík G a pík G poskytovaný (CCT)<sub>9</sub> byl o řád vyšší než pík G poskytovaný (AAG)<sub>9</sub> (Obr. 1). Podobné rozdíly byly pozorovány mezi dalšími

ODN obsahujícími guanin a lišícími se přítomností adeninu a/nebo cytosinu. V případě ODN poskytujících pik G se tento pik objevil pouze v případě, že byl negativní bod obratu umístěn v oblasti potenciálů negativnějších, než je potenciál redukce cytosinu/adeninu. Je tedy zřejmé, že schopnost tvorby G4 není jedinou vlastností ovlivňující redoxní procesy guaninu na HMDE (třebaže ODN se sekvencemi vhodnými pro formování G4 tvořily na HMDE méně stabilní adsorbované vrstvy ve srovnání s ostatními sekvencemi, jak bylo potvrzeno pomocí elektroaktivních sond <sup>7</sup>). Výsledky této práce tedy potvrzují předpoklad, že pro redukci guaninu na HMDE v prostředí neutrálního mravenčanu amonného je nutná přítomnost katalyzátorů vyvíjení vodíku (tj. redukce protonů) a primární krok této redukce sleduje chemický mechanismus.



**Obr. 1.** Úseky anodických větví cyklických voltamogramů zkoumaných ODN (viz legenda v obrázku a Tab. 1). Parametry měření jsou uvedeny v experimentální části.

### Závěr

Potvrdili jsme, že pro redukci guaninu na 7,8-dihydroguanin (který je následně detekován pomocí anodické oxidace) je nutná přítomnost redukčních produktů adeninu a cytosinu, které jsou katalyzátory vyvíjení vodíku. Primární redukční krok guaninu tak zřejmě probíhá chemicky reakcí s vyvíjeným vodíkem. Z našich výsledků dále plyne, že pik G je závislý na přítomnosti výše zmíněných bází a k jeho využití jako analytického signálu při studiu struktury DNA je potřeba přistupovat s opatrností a brát v úvahu složení zkoumaných sekvencí.

### Acknowledgments

This work has been supported by a CSF grant No. 22-11252S.

### References

1. Paleček E., Bartošik M.: *Chem. Rev.* *112*, 3427 (2012).
2. Sebest P., Fojta L., Ostatná V., Fojta M.; Danhel A.: *Bioelectrochemistry* *132*, 107436 (2020).
3. Fojta M., Danhel A., Havran L., Vyskocil V.: *Trac-Trends Anal. Chem.* *79*, 160 (2016).
4. Vidlakova P., Pivonkova H., Kejnovska I., Trmkova L., Vorlicikova M., Fojta M., Havran L.: *Anal. Bioanal. Chem.* *407*, 5817 (2015).
5. Řimánková L., Hasoň S., Daňhel A., Fojta M., Ostatná V.: *J. Electroanal. Chem.* *858*, 10 (2020).
6. Danhel A., Havran L., Trmkova L., Fojta M.: *Electroanalysis* *28*, 2785 (2016).
7. Dobrovodsky D., Danhel A., Mothes-Martin E., Pratiel G., Renciuik D., Fojta M.: *Electrochim. Acta* *442*, 141878 (2023).

**Electrochemical Impedance Spectroscopy - Tool for the Determination of the Basic Kinetic Parameters of Enteropeptidaze**  
**(Elektrochemická impedančná spektroskopia - nástroj pre stanovenie základných kinetických parametrov Enteropeptidázy)**

Timea Baranová <sup>a</sup>, Ján Krahulec <sup>b</sup>, and Miroslav Gál <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department 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

<sup>b</sup>Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovakia

**Abstract**

The study of enzymes as biocatalysts, either in terms of their application in industry or their function in the human body, has become increasingly important in recent years. The study of enzyme kinetics provides information on a wide range of reactions occurring in organisms, and this information in turn can be important for understanding and predicting not only the behavior and function of enzymes but even the metabolism of all living things. Moreover, data from kinetic measurements can be applied in practice to improve the quality and quantity of enzymatic biotechnological production of industrially important substances. In this work, we have focused on the determination of basic kinetic parameters of the enzyme enteropeptidase, while its activity will be observed on the synthetic substrate GD4K-(βNA). The physiological role of enteropeptidase consists in the conversion of the inactive trypsinogen into its active form - trypsin, while this process triggers a cascade of further conversions of inactive forms of enzymes into their active forms. We used electrochemical impedance spectroscopy to determine the basic kinetic parameters of individual enzyme mutations. We compared our data with those obtained by traditional fluorescence spectroscopy.

**Keywords:** Enteropeptidaze, Electrochemical impedance spectroscopy, Kinetics, Mutations.

**Úvod**

Enzymy predstavujú základné zložky živočíchov, rastlín a mikroorganizmov, keďže katalyzujú a koordinujú zložité reakcie bunkového metabolizmu. Okrem toho môžu byť získané biotechnologickými procesmi z prokaryotických buniek a použité na katalýzu rôznych komerčne významných procesov <sup>1</sup>. Príklady ich použitia zahŕňajú výrobu sladidiel, modifikáciu antibiotík, čistenie prostriedkov, pracích práškov a ich využitie v analytických zariadeniach a testoch s klinickým, forenzným a environmentálnym využitím <sup>2</sup>. Enteropeptidáza, známa aj ako enterokináza (EC 3.4.21.9), patrí medzi proteolytické enzýmy zo skupiny hydroláz, konkrétne do rodiny S1 peptidáz. Je syntetizovaná ako zymogén (proenteropeptidáza), ktorý musí byť aktivovaný inou proteázou, ako je trypsin alebo duodenáza. Aktivovaná enteropeptidáza potom zahajuje kaskádu reakcií, ktoré vedú k aktivácii ďalších zymogénov a následnému zapojeniu do tráviacich procesov súvisiacich s reguláciou signalizácie živín, absorpciou a metabolizmom <sup>3</sup>. Jej hlavnou úlohou je premena pankreatického prekursora trypsinogénu na aktívny trypsin, ktorý následne nielen hydrolyzuje peptidové väzby proteínov prijímaných potravou, ale aj aktivuje množstvo ďalších pankreatických zymogénov, ako sú chymotrypsinogén, proelastázy, prokarboxypeptidázy A, B, niektoré prolipázy a proesterázy <sup>4,5</sup>. Aktivácia pankreatických enzýmov je kľúčová pre trávenie bielkovín, ktoré sa musia rozložiť na aminokyseliny a byť absorbované v lúмене čreva <sup>1</sup>.

Cieľom našej práce bolo využitím elektrochemickej impedančnej spektroskopie stanoviť základné kinetické parametre mutovaných foriem enterokinázy, ich vzájomné porovnanie a porovnanie našich výsledkov s výsledkami získanými fluorescenčnou spektroskopiou.

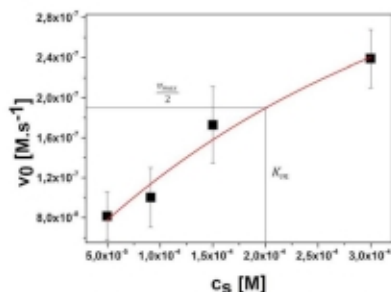
### Experimentálna časť

Na účely experimentu sme použili rôzne mutované formy enzýmu enteropeptidázy, ktoré sme získali od Katedry molekulárnej biológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského. Tieto mutácie boli produkované v metylotrofnej kvasinke *P. Pastoris* a odlišovali sa zmenou určitých konkrétnych aminokyselín v aktívnom mieste za iné, s ohľadom na aminokyselinovú sekvenciu prítomné vo vyšších organizmoch. Mutované enzýmy sme skladovali v mrazničke pri teplote  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby sme predišli ich prípadnej degradácii alebo kontaminácii.

Meranie základných biochemických parametrov sme uskutočnili pri potenciáli otvoreného obvodu (OCP). Na začiatku sme určili OCP a následne sme pridali enteropeptidázu do roztoku a spustili meranie elektrochemickej impedancie systému. Na zabezpečenie reprodukovateľnosti sme každú mutáciu enzýmu testovali pri rovnakej koncentrácii a s ohľadom na meniacu sa koncentráciu substrátu. Impedancia bola potom meraná 15-krát pri danom OCP a striedavom napätí s amplitúdou 9 mV. Meranie sme uskutočňovali v rozsahu frekvencií od 5 000 Hz do 10 Hz<sup>1</sup>.

### Výsledky a diskusia

Naším cieľom bolo využiť impedančné merania na získanie informácií o odporoch elektrolytu medzi pracovnou a referenčnou elektródou, aby sme sledovali zmenu vodivosti roztoku po štiepení substrátu na dve menšie molekuly - fluorofór a fúzu sekvenciu aminokyselín (GD4K). Táto zmena vodivosti môže byť spôsobená buď nárastom alebo poklesom vodivosti, a závisí od pohyblivosti organických molekúl (difúznym koeficientom) alebo solvatačného obalu daných molekúl (elektroforetické brzdenie)<sup>1</sup>. Z týchto údajov sme stanovili počiatočné rýchlosti reakcie, ktoré sme následne vyniesli v závislosti od koncentrácie substrátu, ako je znázornené na nasledujúcom obrázku.



**Obr. 1:** Závislosť počiatočnej rýchlosti enzymatickej reakcie pre Mut0 mutáciu enzýmu enterokináza v závislosti od koncentrácie substrátu<sup>1</sup>.

Okrem nelineárnej formy, na základe ktorej sme určili  $K_m$  a  $v_{max}$  sme tieto údaje previedli do lineárnej formy. Z týchto linearizovaných foriem sme určili  $K_m$ ,  $v_{max}$ , turnover number a mohutosť enzýmu a výsledky medzi jednotlivými mutáciami sme vzájomne porovnali.

Z výsledkov vyplývam že jednotlivé mutácie nezlepšujú kinetické parametre enzýmu <sup>1</sup>, hoci tieto mutácie boli cieleňé na zvýšenie nábojov interakcie medzi aktívnym miestom enzýmu a substrátom. Pravdepodobnou príčinou je, že okrem bodovej zmeny aminokyseliny dochádza k stérickým zmenám v aktívnom mieste enzýmu. Nami namerané údaje sú síce porovnateľné s údajmi získanými fluorescenčnou metódou, avšak všetky údaje vykazujú mierne zhoršené parametre. To môže byť zapríčinené nedokonalým miešanim použitím trojelektrodového systému na SPE eventuálne starnutím vzoriek enzýmu. Rovnako údaje získané linearizovanou formou sú zaťažené výraznejšou chybou, ktorá pochádza z merania impedancie systému <sup>1</sup>.

#### **Pod'akovanie**

Tento výskum bol podporený Agentúrou pre podporu výskumu a vývoja, číslo grantu APVV-21-0076.

#### **Literatúra**

1. Baranová T.: *Diplomová práca*. Slovenská technická univerzita v Bratislave, Bratislava 2023.
2. Robinson P. K.: *Essays Biochem.* 59, 1 (2015).
3. Sun W., et al.: *J. Pharm. Experimental Ther.* 375, 510 (2020).
4. Ogiwara K.: Takahashi, T., *PNAS* 104, 7021 (2007).
5. Sasaki M., et al.: *Pharmacol. Res. Persp.* 7, e00517 (2019).

## Highly Sensitive Amperometric Determination of Lactose by an Enzyme Cascade System

Sanam Garehbaghi<sup>a</sup>, Amir M. Ashrafi<sup>b</sup>, Lukáš Richtera<sup>b</sup>, and Vojtěch Adam<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Purkynova 123, 612 00 Brno, Czech Republic, E-mail: garehbaghi@vutbr.cz

<sup>b</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University in Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic.

### Abstract

Lactose detection is important in dairy products to decrease the risk of exposure to lactose in lactose-intolerant people. Using an enzymatic cascade system of  $\beta$ -galactosidase and glucose oxidase an electrochemical biosensor was developed. By using the developed biosensor, lactose was determined using the chronoamperometry technique with a sensitivity of 1.09  $\mu\text{A}/\text{mM}$ .

**Keywords:** Lactose, Chronoamperometry, Cascade system.

### Introduction

About 68% of the people in the world suffer from lactose intolerance that causes malabsorption in dairy products which are an important source of calcium and vitamins<sup>1</sup>. Hence, the consumption of lactose-free dairy products can reduce the risk of nutrition deficiency<sup>2</sup>. The conventional analytical methods for the detection of lactose include mid-infrared, HPLC, and enzymatic assays. The latter is more specific and requires inexpensive instrumentation<sup>3</sup>. It exploits an enzyme cascade system consisting of three enzymes,  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal), glucose oxidase (GOx), and horseradish peroxidase. The sensitivity, selectivity, and accuracy of this method rely on the catalytic activity of the enzyme components<sup>3</sup>.

Lactose biosensors with high sensitivity have previously been created<sup>4</sup>. However, using the  $\beta$ -gal enzyme creates higher selectivity towards lactose as the target analyte. This needs a cascade enzymatic system containing GOx and  $\beta$ -gal<sup>5</sup>. The  $\text{H}_2\text{O}_2$  produced from the oxidation of glucose by GOx entrapped in a multiwall carbon nanotube (MWCNT) employed on the electrode surface can be detected according to our previous study<sup>6</sup>. Extracting  $\beta$ -gal from medical tablets decreases the cost of enzyme production. Here a sensitive method has been established for the detection of lactose in phosphate buffer.

### Experimental

Glucose oxidase (GOx) obtained from *Aspergillus niger*  $\geq 100,000 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  solid (EC 1.1.3.4), chitosan, MWCNT, and  $\text{RuO}_2$ , and dimethylformamide (DMF) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

$\beta$ -gal tablets were purchased from Generica company, under the brand name Laktoleraza. As a source of  $\beta$ -gal enzyme solution, 200 mg/mL of lactose tablet was dissolved in 1 mL distilled water and filtered using a syringe with 0.2  $\mu\text{m}$  pore size filters. GOx with a concentration of 20 mg/mL was made in 0.1 M PBS solution. Chitosan with a concentration of 5% was made in a 1% acetic acid solution.

$\beta$ -gal and GOx and chitosan solutions were mixed in a volume ratio of 10:1:1. A dispersion of MWCNT was made with a concentration of 2 mg/mL in DMF, containing 5%  $\text{RuO}_2$ .



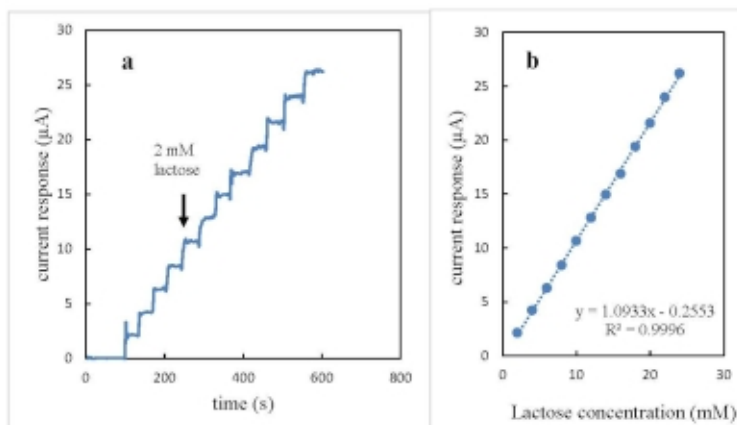
Then 3 layers (10  $\mu\text{L}$  each) of thus prepared MWCNT dispersion were drop cast on a glassy carbon electrode (GCE) and dried at room temperature. Later, 3 layers of 10 $\mu\text{L}$  enzymes and chitosan mixture were drop-casted on MWCNT-modified GCE.

A three-electrode system connected to an Autolab potentiostat/galvanostat (Metrohm, the Netherlands) was used for electrochemical analysis, where the bare GCE or modified GCE served as the working electrode, platinum as the counter electrode, and Ag/AgCl was used as the reference electrode.

Chronoamperometry technique was chosen to be implemented in 0.4 V as the applied potential, in a cell containing 0.1 M phosphate buffer 10 mL of, while lactose was added with increment in concentration of lactose at 2 mM in each injection.

### Results and discussion

Lactose is catalyzed to glucose and galactose by the  $\beta$ -gal enzyme. Later glucose is oxidized by GOx, where  $\text{H}_2\text{O}_2$  is produced as a product of this reaction<sup>5</sup>.  $\text{H}_2\text{O}_2$  is detected on the electrode surface as  $\text{RuO}_2$  acts as a mediator that facilitates the oxidation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  at a low applied potential<sup>6</sup>. As Fig. 1(a) shows each injection of lactose leads to an increment in lactose concentration of 2 mM in solution while an increase in current response of 5 $\mu\text{A}$  occurs in each injection.



**Fig. 1.** (a) chronoamperometry applied in 0.4 V, in phosphate buffer with pH of 7, each injection contained a 200  $\mu\text{L}$  of lactose concentration with the concentration of 0.1 M, and (b) the related calibration curve

As Fig. 2(b) shows the calibration diagram parameters used to calculate analytical results in the detection of lactose. The analytical figures of merits for the developed biosensors were obtained as follows, sensitivity was calculated to be 1.09  $\mu\text{A}/\text{mM}$ , the reproducibility indicated by RSD was calculated to be 11 %, the limit of detection (LOD) obtained by the  $3\sigma$  method was 0.65 mM, and a linear range of 2 to 24 mM was obtained.

## Conclusions

The enzymes of GOx and  $\beta$ -gal were entrapped in MWCNT by drop casting on the electrode surface. Using a cascade enzymatic system of GOx and  $\beta$ -gal enzymes, lactose was determined with the *LOD* of 0.65 mM in phosphate buffer solution. The developed biosensor can be used for rapid evaluation of the lactose content in foodstuffs.

## Acknowledgments

This research has been supported by the specific research project (project. No CEITEC VUT-J-22-7976).

## References

1. Storhaug C. L., Fosse S. K., Fadnes L. T.: *The lancet. Gastroenterology & hepatology* 2, 738 (2017).
2. Hodges J. K., Cao S., Cladis D. P., Weaver C. M.: *Nutrients* 11 (2019).
3. Jasti L. S., Dola S. R., Fadnavis N. W., Addepally U., Daniels S., Ponrathnam S.: *Enzyme and Microbial Technology* 64-65, 67 (2014).
4. Gursoy S. S., Yildiz A., Cogal G. C., Gursoy O.: *18*, 974 (2020).
5. Du K., Sun J., Zhou X., Feng W., Jiang X., Ji P.: *31*, 42 (2015).
6. Ashrafi A. M., Sýs M., Sedláčková E., Farag A. S., Adam V., Příbyl J., Richtera L.: *Sensors (Basel, Switzerland)* 19 (2019).

**Interactions of Modified and Natural DNA Components and Oligonucleotides with Mercury Ions**  
**(Interakce modifikovaných a přirozených složek DNA a oligonukleotidů s ionty rtuťi)**

Monika Hermanová<sup>a</sup>, Marcela Hrušková<sup>sb</sup>, Luděk Havran<sup>a</sup>, and Miroslav Fojta<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, 61265, Brno, Czech Republic, E-mail: hermanova@ibp.cz

<sup>b</sup> Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 267/2, 602 00 Brno, Czech Republic:

**Abstract**

The ability of DNA bases to form complexes with ions of transition metals is well known. In this work, we have studied the ability of natural and modified DNA bases, both in their monomeric forms and as parts of oligonucleotides, to form complexes with mercury. We confirmed the formation of the complex of thymine occurring in oligonucleotides with mercury; this feature is widely used in the construction of sensors for mercury detection. Furthermore, the ability to form these complexes was found for guanine, 2-thiothymine and 4-thiothymine, all of them in the form of nucleoside triphosphates.

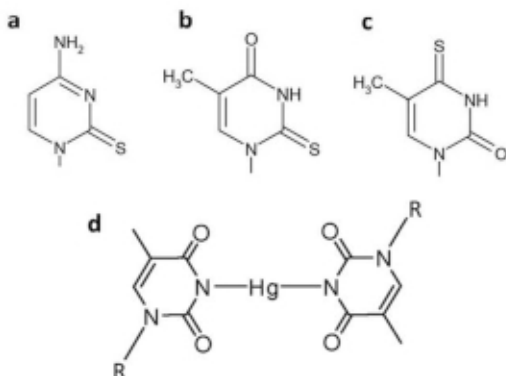
**Keywords:** Thymine-mercury complex, Thiopyrimidines, Cyclic voltammetry.

**Úvod**

Elektrochemické metody jsou vhodným nástrojem pro studium nukleových kyselin, pro kterýžto účel můžeme využít jak redoxní, tak kapacitní (tensametrické) signály poskytované nukleovými kyselinami. Mezi aspekty, které je možno takto sledovat patří například struktura, případně strukturní změny nukleových kyselin, jejich poškození, mutace, detekce nepřirozených bází, či možnost sledovat interakce DNA s proteiny nebo malými molekulami<sup>1,2</sup>, včetně iontů redox aktivních kovů<sup>3,4</sup>.

Možnost tvorby párů bází prostřednictvím atomů (iontů) přechodných kovů byla již v literatuře dobře popsána. Jedná se zejména o tvorbu komplexů thyminu se rtuťí, kdy atom rtuťi je vázán mezi atomy dusíku v poloze 3 obou thyminových zbytků (Obr. 1 d)<sup>5</sup>. Dalším popsáním příkladem je tvorba cytosinových párů prostřednictvím iontu stříbra<sup>6</sup>. Podobně jako u přirozeného způsobu párování bází, kdy k párování dochází prostřednictvím vodíkových můstků<sup>1</sup>, může i párování prostřednictvím iontů přechodných kovů vést ke stabilizaci sekundárních struktur jako jsou intermolekulární dvoušroubovice nebo vlásenky tvořené příslušným homonukleotidovým úsekem<sup>5,7</sup>. Těchto vlastností, tedy změn konformace DNA oligonukleotidů nebo aptamerů po navázání příslušného kovu, využívá řada sensorů pro detekci těžkých kovů<sup>8</sup>.

V této práci byla studována schopnost složek nukleových kyselin i DNA oligonukleotidů tvořit komplexy s ionty rtuťi generovanými přímo anodickou oxidací materiálu visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE). Získané výsledky byly srovnány s tím, jak se v tomto ohledu chovají některé modifikované báze, konkrétně thiopyrimidiny, což jsou báze, kde byly některé atomy kyslíku nahrazeny atomem síry (Obr. 1 a-c). Přirozeně se vyskytují v některých bakteriích, nicméně v současné době vykazují značný potenciál v řadě biotechnologických a farmakologických aplikací, např. v chemoterapii.



**Obr. 1.** Chemické struktury některých analyzovaných látek: **a** 2-thiocytosin; **b** 2-thiothymin; **c** 4-thiothymin; **d** pár thymin-Hg-thymin.

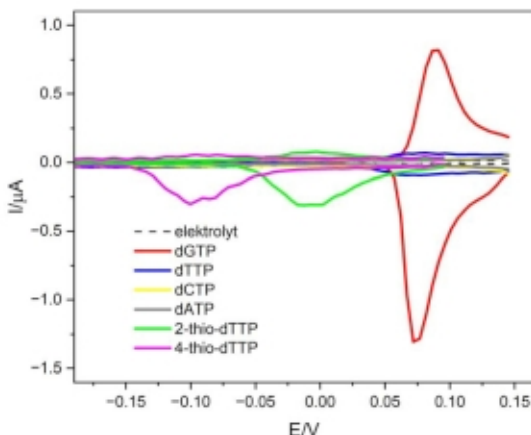
### Experimentální část

Pro měření byly použity následující jednořetězcové oligodeoxynukleotidy (ODN): dT<sub>30</sub>, dA<sub>30</sub>, dC<sub>30</sub> nebo dG<sub>10</sub> (Sigma Aldrich). Koncentrace ODN byla 10 μg·ml<sup>-1</sup>, vzorky, ze kterých byly ODN adsorbovány na povrch elektrody, obsahovaly 0,2 M NaCl. Monomerní složky DNA použité v této práci byly následující: thymin, thymidin, thymidin monofosfát, thymidin trifosfát, guanin, guanosin, guanosin monofosfát, guanosin trifosfát, cytidin trifosfát, adenosin trifosfát, 2-thiocytidin trifosfát, 2-thiothymidin trifosfát, 4-thiothymidin trifosfát; všechny byly rozpustěny v deionizované vodě (pouze guanin v 0,1 M NaOH) na koncentraci 5 mM. Všechna elektrochemická měření byla prováděna při laboratorní teplotě v třielektrodeovém zapojení (s visící rtuťovou kapkovou elektrodou, HMDE jako pracovní elektrodou, Ag/AgCl/3M KCl jako referenční elektrodou a platinovým drátkem jako pomocnou elektrodou) na přístroji Autolab (Ecochemie) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm). Měření oligodeoxynukleotidů byla provedena adsorptivní přenosovou rozpouštěcí voltametří (AdTS). DNA byla akumulována na povrchu elektrody ze 4 μl alikvotů po dobu 60 s, poté byla elektroda opláchnuta v deionizované vodě a umístěna do elektrochemické cely obsahující čistý elektrolyt. Měření monomerních složek DNA (bázi, nukleosidů, nukleosid monofosfátů a nukleosid trifosfátů) byla uskutečněna v nádobce, koncentrace jednotlivých látek byla vždy 40 μM. Cyklická voltametrie (CV) na HMDE byla prováděna v Britton-Robinsonově pufru o pH 7 nebo v elektrolytu obsahujícím 0,3 M mravenčan amonný a 0,05 M fosforečnan sodný, pH 6,9; nastavení pro cyklickou voltametrii byla následující: počáteční potenciál 0,15 V, potenciál bodu obratu -1,60 V nebo -1,85 V, koncový potenciál 0,15 V, scan rate 1 V·s<sup>-1</sup>.

### Výsledky a diskuse

Schopnost tvorby komplexů s ionty rtuť byla studována u čtyř přirozených nukleosid trifosfátů: dGTP, dTTP, dCTP a dATP, a u homooligonukleotidů G<sub>10</sub>, T<sub>30</sub>, C<sub>30</sub> a A<sub>30</sub>. Pro thymin byl navíc tento jev sledován i u báze, nukleosidu a nukleosid monofosfátu. Dle očekávání dCTP a dATP netvořily za daných podmínek voltametriicky detekovatelné komplexy se rtuť, jak je vidět na Obr. 2. Stejně tak nebyly sledovány redoxní signály u C<sub>30</sub> a A<sub>30</sub>. K zajímavému zjištění jsme ale došli při porovnání guaninu a thyminu. Obě tyto báze jsou v některých svých formách

schopny tvořit komplexy se rtuťí<sup>10</sup>. Jejich společným rysem je to, že jejich převažující tautomery mají ketoskupinu v sousední poloze (C6, resp. C4) vůči atomu dusíku (N1, resp. N3), který v nepřítomnosti rtuťi nese atom vodíku a přes který dochází k vazbě atomu rtuťi. Zatímco guanin ve formě nukleosid trifosfátu poskytuje výrazné signály komplexu se rtuťí, v homooligonukleotidu G<sub>10</sub> nebo jako jedna z bází v ODN se zastoupením všech čtyř bází takový signál nedává. Naopak thymín v homooligonukleotidu T<sub>30</sub> dává výrazný, analyticky využitelný signál komplexu se rtuťí<sup>8</sup>, ale u nukleosid trifosfátu můžeme pozorovat signál výrazně nižší. U thyminu ve formě volné báze ani u thymidinu tento signál nepozorujeme vůbec.



**Obr. 2.** Výřezy cyklických voltamogramů získaných na HMDE pro vybrané nukleosid trifosfáty.

U thiopyrimidinů, konkrétně u 2-thiothymidin trifosfátu (2-thio-dTTP) a 4-thiothymidin trifosfátu, (4-thio-dTTP), lze očekávat tvorbu komplexů se rtuťí díky přítomnosti síry v jejich molekulách<sup>2</sup>. Zatímco u obou přirozených bází můžeme pozorovat signály komplexu se rtuťí při takřka stejném potenciálu (okolo +0,08 V), u thiopyrimidinů je potenciál posunut do mírně negativnějších hodnot, -0,02 V pro 2-thio-dTTP a -0,1 V pro 4-thio-dTTP. ODN s několika inkorporovanými thiopyrimidiny tyto signály neposkytují.

### Závěr

Porovnali jsme schopnost tvorby komplexů se rtuťí u přirozených i modifikovaných bází DNA, a to jak v jejich monomerních podobách, tak jako součástí oligonukleotidů. Potvrdili jsme tvorbu komplexu se rtuťí pro thymín vyskytující se v oligonukleotidech, čehož je dle literatury hojně využíváno při konstrukci senzorů pro detekci rtuťi. Dále byla schopnost tvorby komplexů zjištěna u nukleosid trifosfátů guaninu a obou thiothyminů.

### Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation L.A project No. 21-46325L.

## References

1. Paleček E., Bartošik M.: *Chem Rev* *112*, 3427 (2012).
2. Špaček J., Fojta M.: *Electrochim. Acta* *364*, 137298 (2020).
3. Hason S., Pivonkova H., Vetterl V., Fojta M.: *Anal Chem* *80*, 2391 (2008).
4. Hason S., Vetterl V.: *Talanta* *69*, 572 (2006).
5. Liu G. F., Li Z. W., Zhu J. F., Liu Y., Zhou Y., He J. L.: *New J Chem* *39*, 8752 (2015).
6. Ono A., Cao S., Togashi H., Tashiro M., Fujimoto T., Machinami T., Oda S., Miyake Y., Okamoto I., Tanaka Y.: *Chem Commun* 4825 (2008).
7. He L. L., Cheng L., Lin Y., Cui H. F., Hong N., Peng H., Kong D. R., Chen C. D., Zhang J., Wei G. B., Fan H.: *J Electroanal Chem* *814*, 161 (2018).
8. Sahin S., Caglayan M. O., Üstünda Z.: *Talanta* *220*, 121437 (2020).
9. Bunzel E., Boone C., Joly H., Kumar R., Norris A. R.: *Inorganica Chimica Acta* *125*, 167 (1986).

## Electrochemical Oxidation of Selected Bisphenols on Boron-Doped Diamond Electrodes (Elektrochemická oxidácia vybraných bisfenolov na bórom dopovaných diamantových elektródach)

Lucia Hojová <sup>a</sup>, Simona PISOŇOVÁ <sup>a</sup>, Martin VRŠKA <sup>b</sup>, Marian Marton <sup>b</sup>, Marian VOJS <sup>b</sup>, Tomáš Mackuľák <sup>c</sup>, and Andrea VOJS STAŇOVÁ <sup>a,d</sup>

<sup>a</sup> Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Analytical Chemistry, Mlynská Dolina, Ilkovičova 6, 84215, Bratislava, Slovak Republic,

E-mail: andrea.stanova@uniba.sk

<sup>b</sup> Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of electrical engineering and information technology, Institute of Electronics and Photonics, Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava, Slovak Republic

<sup>c</sup> Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Chemical and Environmental Engineering, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic

<sup>d</sup> University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, Czech Republic

### Abstract

The occurrence of persistent organic micropollutants such as bisphenols in the environment is a serious global problem. Bisphenols are endocrine-disrupting chemicals, and their extensive use has led to the wide occurrence of bisphenols in various environmental ecosystems, at levels that may cause negative effects on the ecosystem and public health.

The main goal of the present work is the study of electrochemical advanced oxidation processes (EAOPs) using boron-doped diamond electrodes (BDDE) at different working conditions for the removal of selected bisphenols from water. Identification of degradation and transformation products formed during the electrochemical oxidation process by a combination of HPLC-HRMS was done.

**Keywords:** persistent organic pollutants, BDDE, removal efficacy, identification of degradation products.

### Úvod

Od začiatku 20. storočia nastal prudký priemyselný rozmach, urbanizácia a takisto nárast počtu obyvateľov, ktoré vedú ku vzniku väčšieho množstva mikropolutantov, ku ktorým zaraďujeme aj bisfenoly. Bisfenoly sú známe najmä ako plastifikátory a sú súčasťou väčšiny plastových produktov. Hlavné nebezpečenstvo bisfenolov spočíva v tom, že môže dochádzať k ich úniku už počas výrobného procesu alebo uvoľňovaním (vylúhovaním) z vyhotovených plastových výrobkov. Výskyt týchto látok vo vodnom prostredí sa stal celosvetovým problémom. Ukázalo sa, že majú nepriaznivý vplyv nielen na ľudské zdravie, ale aj na životné prostredie. Bisfenoly sú látky, ktoré zaraďujeme medzi endokrinné disruptory. Takisto mnohé zdravotné problémy, ako je obezita, neplodnosť, poruchy pozornosti, či zvýšený výskyt rakoviny prsníka alebo rakoviny prostaty sú spájané s expozíciou človeka bisfenolmi. Bisfenoly sa môžu uvoľňovať do životného prostredia, či už do povrchových vôd, pôdy alebo sedimentov z viacerých zdrojov, ako sú rôzne výrobné procesy ale hlavne z priemyselných odpadových vôd <sup>1-5</sup>.

Zistilo sa, že bisfenoly sa nachádzajú v odpadových vodách na koncentračnej úrovni niekoľko desiatok až tisícok ng/l. V procesoch čistenia odpadových vôd však nedochádza k ich úplnému odstráneniu. Bežné čistiarne odpadových vôd boli navrhnuté najmä na elimináciu rôznych suspendovaných a koloidných častíc, rozpustených organických látok, patogénov a živín z odpadových vôd. Ukázalo sa, že terciárne procesy úprav dokážu účinne eliminovať rôzne organické mikropolutanty vrátane bisfenolov. K terciárnym procesom úprav zaraďujeme pokročilé oxidačné procesy. Ich podstatou je tvorba reaktívnych foriem kyslíka, ktoré interagujú so znečisťujúcimi látkami. Pri elektrochemických oxidačných procesoch dochádza ku degradácii bisfenolov pomocou hydroxylových radikálov, ktoré vznikajú oxidáciou vody. Pri generácii hydroxylových radikálov zohráva dôležitú úlohu materiál anódy. Bórom dopovaný diamant ako elektródový materiál sa v poslednom čase dostáva do popredia, najmä vďaka svojej fyzikálnej a elektrochemickej stabilite v porovnaní s ostatnými elektródovými materiálmi a takisto vysokému potenciálu vývoja kyslíka<sup>6-11</sup>.

Dôležitým nástrojom pri identifikácii a kvantifikácii organických mikropolutantov, ktoré sú vo vzorkách prítomné na nízkych koncentračných úrovniach je vysokorozlišovacia hmotnostná spektrometria. Vďaka výhodám, ako je citlivosť v režime záznamu hmotnostných spektier v plnom rozsahu m/z, správnosti určenia m/z a takisto možnosti využitia pre cieľenú aj necieľenú analýzu vzrástol záujem o využitie vysokorozlišovacej hmotnostnej spektrometrie na analýzu znečisťujúcich organických látok v environmentálnych vzorkách<sup>12-15</sup>.

Cieľom tejto práce je uskutočniť identifikáciu degradačných a transformačných produktov vybraných bisfenolov vznikajúcich v procese elektrochemickej oxidácie pomocou BDDE využitím vysokorozlišovacej hmotnostnej spektrometrie.

Práca sa venovala porovnaniu účinnosti anodickej oxidácie vybraných bisfenolov s využitím rôznych typov BDD elektród a rôznych solí a následnej identifikácii vzniknutých degradačných a transformačných produktov s využitím kombinácie vysokoúčinná kvapalinová chromatografia - vysokorozlišovacia hmotnostná spektrometria (HPLC-HRMS).

### **Experimentálna časť**

Na prípravu roztokov a mobilných fáz bol použitý chlorid sodný, síran sodný, kyselina mravčia (LC-MS čistoty), acetonitril (LC-MS čistoty), kyselina octová (>99,88 %) analytické štandardy bisfenolov (A, S, AF) a izotopicky značené štandardy bisfenolu A a triklosanu zakúpené od Sigma-Aldrich (Nemecko). Všetky roztoky boli pripravené z dvojstupňovo čistenej vody systémami Labconco a Millipore Simplicity (Lambda Life, Slovensko).

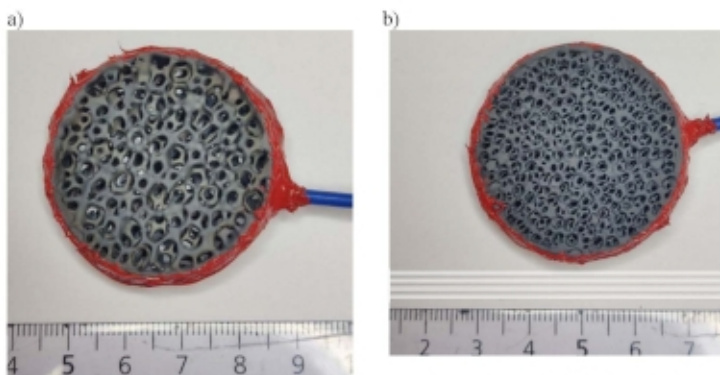
V rámci experimentálnej časti práce sme uskutočnili elektrochemickú oxidáciu vybraných bisfenolov, pričom sme využili bórom dopovanú diamantovú elektródu (B/C 312 500 ppm v plynnej fáze, merný odpor 0,017  $\Omega$  cm, koncentrácia nosičov náboja  $2,9 \times 10^{21}$  cm<sup>-3</sup> zaznamenaná Hallovou metódou) rastenú na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> poréznej keramike. Na Obr. 1 sú zobrazené BDD elektródy s rozdielnou porozitou (20 a 40 ppi, D=2,5 cm) kontaktované s Cu vodičom, z ktorých sa následne vyrobil BDD elektrochemický prietokový modul. Elektrochemická oxidácia sa uskutočňovala v 4 L nádobách s elektrolytom (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaNO<sub>3</sub>) s prídavkom vybraného bisfenolu (1 mg/L). Vzorky boli odoberané v čase 0, 10, 20, 30, 60, 120 a 240 minút elektrochemickej oxidácie pri dvoch rôznych prúdoch a to 0,2 a 1A. Vzorky boli následne uskladnené pri teplote -20°C a neskôr využité na účely kvantitatívnej analýzy. Na úpravu vzorky pred samotnou analýzou bola použitá filtrácia s využitím striekačkových filtrov z regenerovanej celulózy s veľkosťou pórov 0,45  $\mu$ m.



Kvantitatívna LC-MS/MS analýza bola uskutočnená pomocou kombinácie HPLC-MS/MS, s využitím hmotnostného spektrometra QExactive s iónovým zdrojom APCI/APPI v negatívnom aj pozitívnom ionizačnom móde (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). Identifikácia degradačných a transformačných produktov sa uskutočnila prostredníctvom HPLC-HRMS na prístrojovom vybavení LC-MS-IT-TOF™ (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a QExactive (Thermo Fisher Scientific, CA, USA).

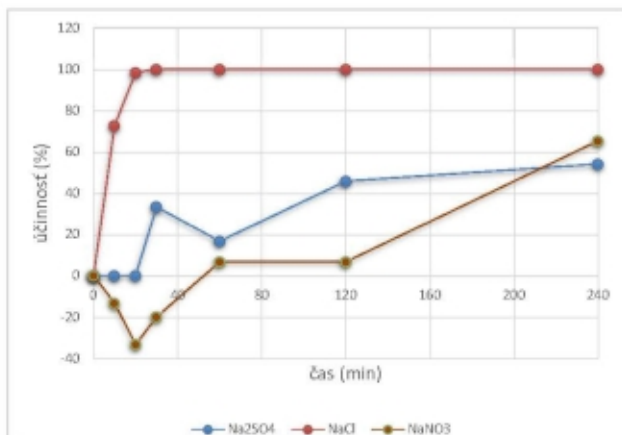
### Výsledky a diskusia

Cieľom predmetnej práce bolo sledovanie vplyvu použitej poréznej BDD elektródy a pracovných elektrolytov na účinnosť elektrochemickej oxidácie vybraných bisfenolov (A, S a AF) ako aj na vplyv typu BDDE na tvorbu degradačných a transformačných produktov. Pre tento účel boli na degradačné experimenty využité dva typy elektród (20 a 40 ppi, Obr. 1), dva rôzne prúdy (0,2 a 1A) a elektrolyty pripravené prídavkami soli ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a  $\text{NaNO}_3$ ).



**Obr. 1.** BDD elektródy s rozdielnou poretitou  $\text{Al}_2\text{O}_3$  keramiky: a) 20, b) 40 ppi  $D=2,5$  cm) kontaktované s Cu vodičom zaizolovaným so silikónovou pastou

Na účinnosť elektrochemickej oxidácie vybraných bisfenolov zo sledovaných premenných má zásadný vplyv soľ tvoriaca reakčný elektrolyt. Pri každej z testovaných elektród bola pri použití  $\text{NaCl}$  elektrolytu dosiahnutá výrazne vyššia účinnosť eliminácie vybraných bisfenolov. Príkladom je porovnanie účinnosti eliminácie bisfenolu A s použitím rôznych elektrolytov (Obr. 2). Zatiaľ čo pri použití  $\text{NaCl}$  bolo možné bisfenol A takmer úplne eliminovať už po 20 minútach oxidácie, pri  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a  $\text{NaNO}_3$  bolo možné eliminovať okolo 60% bisfenolu A po 240 minútach elektrochemickej oxidácie pri prúde 0,2A.



**Obr. 2:** Priebeh elektrochemickej oxidácie bisfenolu A s prídavkom NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaNO<sub>3</sub>.

Na identifikáciu vedľajších produktov oxidácie vybraných bisfenolov boli použité dva prístupy – analýza očakávaných látok (na základe publikovaných dát vytvorený zoznam degradačných a transformačných produktov) a necielená analýza. S využitím oboch prístupov bolo možné identifikovať vznikajúce produkty oxidácie vybraných projektov na BDE. Identifikácia prebiehala na základe záznamu presnej hodnoty m/z, sledovania izotopových pomerov, retenčných charakteristík a MS/MS záznamov.

### Záver

V práci bola porovnávaná účinnosť elektrochemickej oxidácie vybraných bisfenolov na BDD elektróde. Sledoval sa vplyv použitej elektródy a pracovného elektrolytu na účinnosť a rýchlosť odstránenia bisfenolov A, S a AF. Výsledky preukázali, že typ soli použitej pri elektrochemickej oxidácii výrazne vplyva na účinnosť odstránenia vybraných bisfenolov.

Analýzou očakávaných zlúčenín a necielenou analýzou pomocou HPLC-HRMS bolo umožnené overiť hypotézu, že počas elektrochemickej oxidácie dochádza pri použití rozdielnych elektród a pracovných elektrolytov a rôzne komplexnej matrice ku generovaniu rozdielnych degradačných a transformačných produktov.

### Acknowledgments

Predmetná práca vznikla za finančnej podpory Agentúry na podporu výskumu a vývoja (APVV-19-0250) a VEGA grantu 1/0554/20, 1/0631/22, finančnej podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky - projekt „CENAKVA“ (LM2018099).

### References

1. Kanaujia D. K., Paul T., Sinharoy A., Pakshirajan K., *Curr. Pollut. Rep.* **5**, 112 (2019).
2. Hug C., Ulrich N., Schulze T., Brack W., Krauss M., *Environ. Pollut.* **184**, 25 (2014).
3. Bhatt P., Bhandari G., Bilal M., *J. Environ. Chem. Eng.* **10**, 107598 (2022).
4. Wang H., Liu Z.-h., Zhang J., Huang R., Yin H., Dang Z., Wu P., Liu Y., *Sci. Total Environ.* **692**, 107 (2019).

5. Catenza C. J., Farooq A., Shubear N. S., Donkor K. K., *Chemosphere* 268, 129273 (2021).
6. Liang L., Zhang J., Feng P., Li C., Huang Y., Dong B., Li L., Guan X., *Front. Environ. Sci. Eng.* 9, 16 (2015).
7. Margot J., Rosii L., Barry A. D., Holliger Ch., *WIREs Water* 2, 457 (2015).
8. Hu Y., Zhu Q., Yan X., Liao Ch., Jiang G., *Environ. Res* 178, 108732 (2019).
9. Garrido-Cardenas A. J., Esteban-García B., Aguera A., Sánchez-Pérez A. J., Manzano-Agugliaro F., *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 170 (2019).
10. Pisharody L., Gopinath A., Malhotra M., Nidheesh V. P., Kumar S. M., *Chemosphere* 287, 132216 (2022).
11. Musilová J., Barek J., Pecková K., *Chem. Listy* 103, 469 (2009).
12. Hernández F., Sancho V. J., Ibáñez M., Abad E., Portolés T., Mattioli L., *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1251 (2012).
13. Celma A., Sancho V. J., Schymanski L. E., Fabregat-Safont D., Ibáñez M., Goshawk J., Barknowitz G., Hernández F., Bijlsma L., *Environ. Sci. Technol.* 54, 15120 (2020).

## Energy-controlled Spark Discharges for Electrode Activation and Modification

Jan Hrbáč

Institute of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, E-mail: jhrbac@mail.muni.cz

### Abstract

Spark discharge occurs when the dielectric strength of the atmosphere in the electrode gap is exceeded (3.6 kV/mm for air). The energy released during the spark is enough to erode electrode materials and heat them up to plasma, which is rapidly cooled to form electrode material(s)-derived nanoparticles. At the same time, heat can alter the electrode surface, by desorption of impurities, introduction of oxygen moieties, etc. In this contribution, an Arduino-based high-voltage power supply is described, allowing to control the number and energy of discharges. The concept is evaluated for riboflavin sensing on silver-sparked screen-printed electrodes.

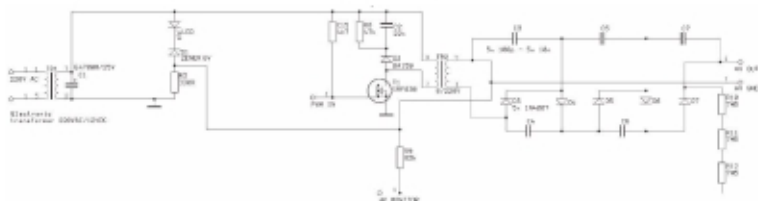
**Keywords:** Spark discharge, Electrode activation, Metal nanoparticles, Sensor.

### Úvod

Jiskrový výboj vzniká mezi dvěma elektrodami, mezi které je vloženo vysoké stejnosměrného napětí (stovky voltů až několik kilovoltů), pokud jsou přiblíženy na dostatečnou vzdálenost, při které je překročena dielektrická pevnost atmosféry v mezelektrodovém prostoru (3,6 kV/mm pro vzduch). Energie uvolněná během jiskrového výboje stačí k erozi elektrodových materiálů a jejich zahřátí do formy plazmy, která se rychle ochladí a vytvoří nanočástice odvozené z elektrodových materiálů. U stejnosměrného vysokonapětového zdroje je elektroda připojená k zápornému pólu erodována výboji více než kladná elektroda. To je základem pro modifikaci kladné elektrody nanomateriály odvozenými z elektrody připojené k zápornému pólu. Zároveň může působením uvolněného tepla docházet ke změnám povrchu elektrody, v případě uhlíkových elektrod desorpci nečistot, vnášením kyslíkových skupin atd., což zpravidla vede nejprve ke zlepšení elektrochemických vlastností (aktivaci) elektrody, posléze až k degradaci elektrody. U konvenčního vysokonapětového zdroje se jiskra skládá z více výbojů, jejichž frekvence a energie jsou definovány podle výstupní kapacity napájecího zdroje. Specifické místo na elektrodě je proto zasaženo jiskrou tvořenou vícenásobnými výboji. V tomto příspěvku konference je popsán vysokonapětový zdroj řízený arduinem, který umožňuje řídit počet výbojů a jejich energii.

### Experimentální část

Aparatura pro modifikaci elektrod jiskrovým výbojem se skládá ze zdroje vysokého napětí (VN) a 3D pozicionéru, který umožňuje distribuovat jiskrové výboje na povrch elektrody (obvykle elektroda vytvořená sitotiskem, SPE). Namísto obvyklého oscilátoru tvořeného diskretními součástkami je u zdroje VN použit programovatelný PWM výstup arduina Mega. Výkonový stupeň VN generátoru (obr. 1) se skládá ze spinacího MOSFET tranzistoru (T1), ke kterému je jako zátěž připojen zvyšovací transformátor (TR2).

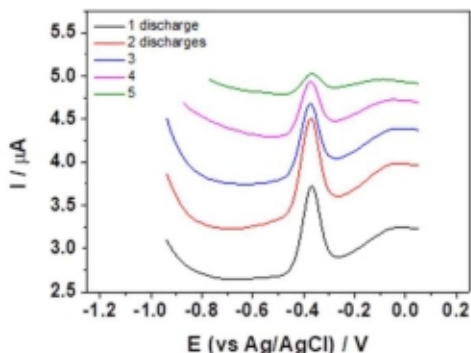


**Obr. 1.** VN zdroj řízený PWM výstupem Arduino Mega.

Jako TR2 je místo vhodnějšího transformátoru s feritovým jádrem použit obyčejný DPS transformátor s kovovým jádrem, aby konstrukce napájecího zdroje byla jednoduchá a reprodukovatelná. Napětí na sekundárním vinutí TR2 je dále zvyšováno v Cockroft-Waltonově kaskádě, kterou tvoří diody 1N4007 D3-D7 a uživatelsky volitelné sady kondenzátorů (C5-C9), ručně přepínatelné mezi hodnotami 0,1, 1, 2,2, 3,3, 4,7 a 10 nF pomocí vícepólového otočného přepínače. Dělič napětí (R10-R12/R9) poskytuje signál úměrný výstupnímu vysokému napětí (HV monitor), který se používá jako zpětná vazba pro řízení procesu Arduinoem.

### Výsledky a diskuse

Aparatura byla testována na příkladu stanovení riboflavinu (vit. B6) na sitotiskových elektrodách modifikovaných stříbrnými nanočásticemi<sup>3</sup>. Obr. 2 ukazuje diferenciální pulsní voltamogramy riboflavinu na tiskových elektrodách v závislosti na počtu výbojů aplikovaných na jedno místo („sparking spot“) ze 705.



**Obr. 2.** Set diferenciálních pulsních voltamogramů riboflavinu ( $c = 100 \text{ nM}$ ) naměřený na sitotiskových elektrodách (3 mm průměr), modifikovaných stříbrnými nanočásticemi generovanými 705 jiskrami obsahující různý počet výbojů (uvedeno v legendě grafu).

Z dat uvedených na Obr. 2 vyplývá, že odezva riboflavinu je nejvyšší pro dva výboje na jiskru, přičemž odezva pro jeden výboj je srovnatelná. Pro vyšší počty výbojů se odezva snižuje. Dále je zřejmé, že se s počtem výbojů progresivně zvyšuje poloha DP voltamogramů na y-ose grafu, tj. zvyšuje se proud pozadí. Proud pozadí je u DPV určen kapacitním proudem, který není kompenzován při odečtení proudových signálů před- a na konci pulsu vloženého na elektrodu. Domníváme se, že poloha DP voltamogramu souvisí s mírou oxidace povrchu elektrody.

### **Závěr**

Zkonstruovali jsme aparaturu obsahující vysokonapěťový zdroj pro kontrolovanou produkci jiskrových výbojů mezi elektrodou sloužící jako senzor a elektrodou, která je zdrojem nanočástic, kterými je senzor modifikován a 3D pozicionér, sloužící k distribuci jiskrových výbojů na povrch modifikované elektrody. Aparatura byla testována na sitotiskových elektrodách modifikovaných stříbrnými nanočásticemi při stanovení riboflavinu pomocí DPV.

### **References**

1. Papavasileiou A.V., Hoder T., Medek T., Prodromidis M.I., Hrbac J.: Talanta 258,124409 (2023).

## Determination of Selected Natural Psychoactive Substances in Organic Matrices at 3D Printed Electrodes

Marta Chojińska-Młynarczyk<sup>a,b</sup>, Ivana Šestáková<sup>a</sup>, Tomáš Navrátil<sup>a</sup>

<sup>a</sup>J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 00 Prague 8, Czech Republic, E-mail: marta.chojinska@jh-inst.cas.cz

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

### Abstract

Psilocybin and its derivative psilocin are popular psychoactive substances both as experimental treatments in clinical trials and as illicit drugs. Their potential ability to influence the human brain entails the need for a fast, inexpensive, selective, and sensitive method of their determination. The aim of our study was the development of new 3D-printed electrodes which fulfill these demands and are useful for medical, toxicological, and forensic purposes. Successful development allows determining in real matrices (human plasma and dried mushrooms) concentrations of the order of  $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ .

### Keywords:

3D-printed electrodes, natural psychoactive substances, psilocin, psilocybin

### Introduction

Psychoactive substances are widely used in some subcultures, especially among young people who would like to find the possibility to relax or change their consciousness. Many of these substances naturally occur in plants and were used for medical and religious purposes. One example of this natural alkaloid may be psilocybin which may be found in the mushrooms genus *Psilocybe*. These alkaloids were mostly known in Latin America and their potential was discovered by Albert Hofmann in the late 1950s<sup>1,2</sup>. Psilocybin (4-phosphoryloxy-N,N-dimethyltryptamine) is a natural indole alkaloid from *Psilocybe* that does not have psychoactive potential. Mushrooms from the genus *Psilocybe* usually contain 0.5-2 % of psilocybin and psilocin is found in trace amounts<sup>2-5</sup>. Spontaneous change of psilocybin to psilocin (a psychoactive metabolite) causes hallucinogenic effects (both substances are shown in Figure 1).

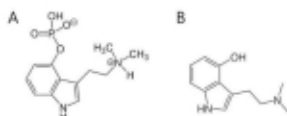


Fig. 1. (A) Psilocybin and (B) psilocin structure.

After oral administration, psilocybin is absorbed in the intestine. It is transported into the liver, where undergoes the first metabolic pathway to psilocin<sup>6-8</sup>.

Psilocin after the affection of the brain undergoes phase-I (20%) and phase-II metabolism (80%)<sup>9</sup>. Phase-II metabolism is the analog of serotonin metabolism, which creates the psychoactive effects of psilocin. This substance is a serotonergic agonist, which binds to 5-HT<sub>2A</sub> and other serotonin receptors. It blocks sodium-dependent serotonin transporter and as a result, higher concentrations of serotonin may be observed. Moreover, psilocin binds also to dopamine receptors<sup>6,10-13</sup>.

Similarities between serotonin-dopamine metabolism and psilocin metabolism cause psychoactive effects. People may observe for example the following symptoms: physiological, visual, cognitive, transpersonal, and some adverse effects<sup>6,14-31</sup>.

### Aim of the study

Psilocybin and its derivative psilocin are interesting examples of natural psychoactive substances which may be used in medicine. They may be effective in depression, obsessive-compulsive disorder, anxiety, addictive disorders (tobacco, drugs, and alcohol), psychosomatic diseases, and pain relief<sup>32-41</sup>.

Priority in clinical trials is the non-expensive, selective, sensitive, and easy method of the determination of used compounds. In this case, 3D-printed materials and electrochemistry allow the development of new analytical techniques which fulfill every of the mentioned demands. Because of that, we decided to prepare our lab-made 3D-printed electrodes for fast, sensitive, and simultaneous determination of psilocybin and psilocin in organic matrices.

### Experimental part

The first step of our research was the preparation of the 3D-printed electrodes from carbon fiber PLA and the development of the initial pretreatment which may be used for increasing the signals obtained at the electrode surface. In this first step, we used 1 mmol dm<sup>3</sup> hexaammineruthenium(III) chloride to control the influence of different parameters of pretreatment. We concluded that the best approach is electrochemical pretreatment: 10 cyclic voltammetry scans in a buffer pH 7, initial potential -1000 mV and final potential +1500 mV.

After pretreatment, we started our experiments with psilocybin and psilocin. Firstly, we determine them using adsorptive stripping voltammetry in Britton-Robinson buffer to develop the optimal parameters for future experiments in organic matrices. They are presented in the following Table I.

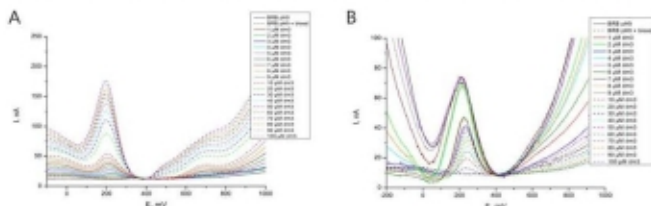
**Table I**  
Optimal parameters for the determination of psilocybin and psilocin.

Parameters of the measurement	Psilocybin	Psilocin
Measurement solution pH	9	9
Accumulation potential ( $E_{acc}$ )	-400 mV	-500 mV
Accumulation time ( $E_{acc}$ )	80 s	80 s
Initial potential ( $E_{in}$ )	-400 mV	-500 mV
Final potential ( $E_{fin}$ )	1300 mV	1300 mV
Scan rate	20 mV s <sup>-1</sup>	20 mV s <sup>-1</sup>
Pulse height	50 mV	50 mV
Pulse width	80 s	80 s

We observed that in Britton-Robinson buffer small amount of psilocybin was changed into psilocin under the influence of used potential. In the result, after the addition of psilocybin solution to the buffer, we observed signals from psilocybin (around +900 mV) and 3x lower signals of psilocin (around 450 mV). As well, there was some additional signal around +200 mV, probably from some other derivative of psilocybin. The addition of the psilocin solution confirms that this analyte gives a signal around +450 mV. In human plasma mixed with Britton-Robinson buffer 1:1, each signal was shifted to the lower potential. The Psilocybin signal appeared around +750 mV and the psilocin signal around +200 mV. Moreover, we observed



that in the human plasma psilocybin is almost totally changed into psilocin during the electrochemical experiment. It suggests that in the human plasma, we are dealing with liver enzymes that affect our experiments. However, even in that situation, we will be able to evaluate signals of psilocybin and psilocin simultaneously. These results are shown in Fig. 2.



**Fig. 2.** Adsorptive stripping voltammetry at 3Dprinted electrode of psilocybin (A) and psilocin (B). In the picture (A) it is visible that psilocybin (signal around +750 mV) was converted into psilocin (signal around +200 mV), which was confirmed in the analysis (B) of psilocin (signal around +200 mV).

The last step of our research was the determination of psilocybin and psilocin in the natural, dried mushroom genus *Psilocybe*. In this part, we proved that in the dried mushroom we can find psilocybin with signal shifted to +1100 mV. As we know from the literature, mushrooms contain only trace amounts of psilocin. In that case, the small signal of psilocin (around +200 mV) may be the result of the voltammetric measurement and electrochemical change of psilocybin into psilocin, similarly as in Britton-Robinson buffer in the first part of our research.

## Conclusions

3D-printed electrodes and electrochemical measurements are useful for the determination of psilocybin and psilocin in natural organic matrices. In our research, we proved that adsorptive stripping voltammetry at carbon fiber PLA electrodes may be used for the successful simultaneous determination of these two compounds. Moreover, it is a fast, inexpensive, and easy approach without long sample preparation, which may be used for medical, toxicological, and forensic purposes.

## Acknowledgments

The authors would like to thank the financial support of the Czech Science Foundation (GAČR No. 20-01589S), Specific University Research (SVV 260690), and the Grant Agency of Charles University No. 373521.

## References

- Hofmann A., Frey A., Ott H., Petzlik T., Troxler F.: *Experientia* **14**, 397 (1958).
- Hofmann A., Heim R., Brack A., Kobel H., Frey A., Ott H., Petzlik T., Troxler F.: *Helv. Chim. Acta* **42**, 1557 (1959).
- Pedersen-Bjergaard S., Sannes E., Rasmussen K.E.: *J. Chromatogr. B* **694**, 375 (1997).
- Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K. E., Sannes E.: *Electrophoresis* **19**, 27 (1998).
- Keller T., Schneider A., Regenscheit P., Dimhofer R., Rucker T., Jaspers J., Kisser W.: *Forensic Sci. Int.* **99**, 93 (1999).
- Geiger H. A., Wurst M. G., Daniels R. N.: *ACS Chem. Neurosci.* **9**, 2438 (2018).
- Diris-Oliveira R. J.: *Drug Metab Rev* **49**, 84 (2017).
- Meyer M. R., Maurer H. H.: *Pharmacogenomics* **12**, 215 (2011).

9. Chen J. B., Li M. J., Yan X. T., Wu E., Zhu H., Lee K. J., Chu V. M., Zhan L. F., Lee W., Kang J. S.: *J. Chromatogr. B* 879, 2669 (2011).
10. Halberstadt A. L., Geyer M. A.: *Neuropharmacology* 61, 364 (2011).
11. Blair J. B., Kurrasch-Orbaugh D., Marona-Lewicka D., Cumbay M. G., Watts V. J., Barker E. L., Nichols D. E.: *J. Med. Chem.* 43, 4701 (2000).
12. McKenna D. J., Repke D. B., Lo L., Peroutka S. J.: *Neuropharmacology* 29, 193 (1990).
13. Strumila R., Nobile B., Korsakova L., Lengvenyte A., Olie E., Lopez-Castroman J., Guillaume S., Courtet P.: *Pharmaceuticals-Base* 14, (2021).
14. Nichols D. E.: *ACS Chem. Neurosci.* 9, 2331 (2018).
15. Holze F., Caluori T. V., Vizeli P., Liechti M. E.: *Psychopharmacology* 239, 1893 (2022).
16. Johnstad P. G.: *Nord Stud Alcohol Dr* 35, 39 (2018).
17. Carhart-Harris R. L., Kaelen M., Bolstridge M., Williams T. M., Williams L. T., Underwood R., Feilding A., Nutt D. J.: *Psychol. Med.* 46, 1379 (2016).
18. Kanen J. W., Luo Q., Kandroodi M. R., Cardinal R. N., Robbins T. W., Nutt D. J., Carhart-Harris R. L., den Ouden H. E. M.: *Psychol. Med.* (2022).
19. Becker A. M., Klaiber A., Holze F., Istampoulouglou I., Duthaler U., Varghese N., Eckert A., Liechti M. E.: *Int. J. Neuropsychoph.* (2022).
20. Holze F., Avedisian I., Varghese N., Eckert A., Liechti M. E. E.: *Front. Pharmacol.* 12, (2021).
21. Kaelen M., Barrett F. S., Roseman L., Lorenz R., Family N., Bolstridge M., Curran H. V., Feilding A., Nutt D. J., Carhart-Harris R. L.: *Psychopharmacology* 232, 3607 (2015).
22. Kraehenmann R., Pokorny D., Vollenweider L., Preller K. H., Pokorny T., Seifritz E., Vollenweider F. X.: *Psychopharmacology* 234, 2031 (2017).
23. Muller F., Kraus E., Holze F., Becker A., Ley L., Schmid Y., Vizeli P., Liechti M. E., Borgwardt S.: *Psychopharmacology* 239, 1933 (2022).
24. Horowitz M. J.: *Am. J. Psychiat.* 126, 565 (1969).
25. Hoffman J. A.: *Arch. Gen. Psychiat.* 41, 631 (1984).
26. Abraham H. D.: *Arch. Gen. Psychiat.* 41, 632 (1984).
27. Lerner A. G., Goodman C., Rudinski D., Lev-Ran S.: *Int. J. Psychiatr. Rel.* 51, 307 (2014).
28. Naditch M. P., Fenwick S.: *J. Abnorm. Psychol.* 86, 352 (1977).
29. Batzer W., Ditzler T., Brown C.: *J. Addict. Dis.* 18, 57 (1999).
30. Voelkel A.: *Psychopharmacologia* 26, 122 (1972).
31. Ramaekers J. G., Hutten N., Mason N. L., Dolder P., Theunissen E. L., Holze F., Liechti M. E., Feilding A., Kuypers K. P. C.: *J Psychopharmacol* 35, 398 (2021).
32. de Wit H., Molla H. M., Bershad A., Bremner M., Lee R.: *Addict. Biol.* 27, (2022).
33. Murray C. H., Tare L., Perry C. M., Malina M., Lee R., de Wit H.: *Psychopharmacology* 239, 1735 (2022).
34. Kuypers K. P. C.: *Ther. Adv. Psychopharm.* 10, (2020).
35. Sousa T. R., Rema J., Machado S., Novais F.: *Curr. Top. Med. Chem.* 22, 1250 (2022).
36. Gasser P., Holstein D., Michel Y., Doblin R., Yazar-Klosinski B., Passie T., Brenneisen R.: *J. Nerv. Ment. Dis.* 202, 513 (2014).
37. Fuentes J. J., Fonseca F., Elices M., Farr M., Torrens M.: *Front. Psychiatry* 10, (2020).
38. Dodd S., Norman T. R., Eyre H. A., Stahl S. M., Phillips A., Carvalho A. F., Berk M.: *CNS Spectrums* (2022).
39. Heuschkel K., Kuypers K. P. C.: *Front. Psychiatry* 11 (2020).
40. MacCallum C. A., Lo L. A., Pistawka C. A., Deol J. K.: *Front. Psychiatry* 13, (2022).
41. Yu C. L., Yang F. C., Yang S. N., Tseng P. T., Stubbs B., Yeh T. C., Hsu C. W., Li D. J., Liang C. S.: *Psychiat. Invest.* 18, 958 (2021).43.

## Voltammetric Determination of Selected Estrogen Mixtures in Waters (Voltametrické stanovení směsí vybraných estrogenů ve vodách)

Jaromíra Chýlková<sup>a</sup>, Alona Usenko<sup>a</sup>, Oleksandr Matvieiev<sup>a</sup>, Jan Bartáček<sup>b</sup>, Vladimír Jehlička<sup>c</sup>, and Renáta Šešelsková<sup>a</sup>

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

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

<sup>c</sup>University of Pardubice, Faculty of Transport Engineering, Department of Informatics in Transport, Studentská 95, 532 10 Pardubice, Czech Republic

### Abstract

A novel procedure was developed for the voltammetric determination of a mixture of the most abundant estrogens in waters. The analysis is carried out by electrochemical oxidation using differential pulse voltammetry (DPV) in an alkaline solution containing 0.066 mol l<sup>-1</sup> NaOH and 80 % acetonitrile. Furthermore, a mathematical approach was proposed to evaluate the content of individual estrogens in the mixture.

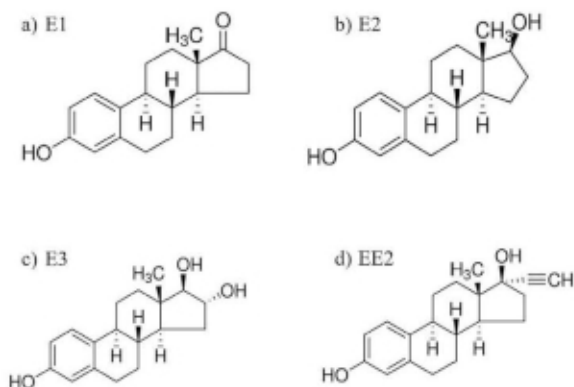
**Keywords:** Voltammetry, Boron-doped diamond electrode, Estrogen, 17 $\beta$ -estradiol, estriol, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol.

### Úvod

Mezi významné mikropolutanty vod patří tzv. endokrinní disruptory, což jsou látky narušující správnou funkci žláz s endokrinní sekrecí<sup>1</sup>. Jsou vysoce stabilní, a proto závažným způsobem ohrožují životní prostředí a následně zdraví člověka. Konkrétně se jedná o léčiva, kosmetické preparáty, pesticidy, hormonální látky aj. Steroidní hormony lze rozdělit na přírodní a syntetické. Přírodní se tvoří u lidí a u zvířat v nadledvinkách, varlatech, vaječnicích a v placentě. Do této skupiny patří například estron (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3) nebo testosteron. Syntetické hormony zahrnují především 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2), diethylstilbestrol, 19-norethindron aj., které jsou součástí hormonální antikoncepce a dalších užívaných farmak. Většina estrogenů je z těla vylučována močí. Prostřednictvím městských splaškových vod se pak dostávají do vod povrchových. V nich pak ovlivňují procesy související především s reprodukci živočichů. Dochází k feminizaci, dále pak ke zhoršení celkového zdravotního stavu, popřípadě ke karcinogenezi<sup>2</sup>.

K voltametrickému stanovení hormonálních látek bylo již vypracováno velké množství prací využívajících nejrůznější indikační elektrody. Jednalo se například o HMDE<sup>3,4</sup>, GCE<sup>5,6</sup>, pastovou uhlíkovou elektrodu CPE<sup>7</sup>, BDDE<sup>8</sup> popřípadě tiskné elektrody SPE<sup>9,10</sup>. Ve všech těchto studiích bylo řešeno stanovení vždy jen jedné látky.

V této práci byla zaměřena pozornost na voltametrické stanovení čtyř nejvíce se vyskytujících estrogenů v povrchových a odpadních vodách, a to estronu, 17 $\beta$ -estradiolu a estriolu, které patří do skupiny přírodních látek a jednoho syntetického 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu. Strukturální vzorce těchto látek jsou uvedeny na Obr. 1.



**Obr. 1.** Strukturmi vzorce studovaných estrogenů estronu (E1), 17β-estradiolu (E2), estriolu (E3) a 17α-ethynylestradiolu (EE2).

### Experimentální část

Standardní roztoky přírodních estrogenů byly připraveny v ethanolu, a to o koncentracích  $4,54 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  pro estron,  $4,52 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  pro 17β-estradiol a  $4,33 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  pro estriol. Syntetický estrogen 17α-ethynylestradiol byl rozpuštěn pro studii pH v acetonitrilu, pro kvantitativní analýzu pak byl připraven roztok v ethanolu. Koncentrace byly v obou případech stejné, a to  $5,4 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ .

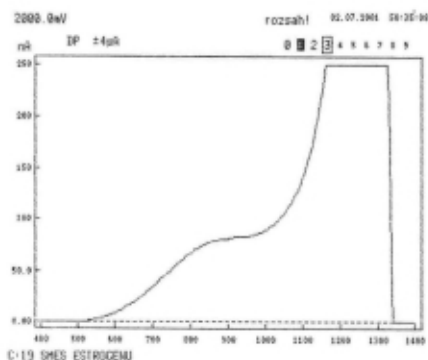
K voltametričkému stanovení studovaných estrogenů byl využíván elektrochemický analyzátor EP 10/VA (HSC servis, Bratislava). Měřicí článek se skládal z pracovní elektrody z borem dopovaného diamantu (BDDE, BioLogie, Seyssinet-Pariset, Francie), argentchloridové referenční elektrody a pomocné platinové elektrody (obě Monokrystaly, Turnov, Česká republika). Stanovení 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 +400 mV až +1400 mV při rychlosti polarizace  $25 \text{ mV s}^{-1}$ . Tyto podmínky byly stanoveny experimentálně. Lineární závislosti proudu na koncentraci analytů bylo dosaženo v alkalickém základním elektrolytu obsahujícím  $0,066 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH}$  a 80 %-ní acetonitril.

### Výsledky a diskuse

Vhodné složení základního elektrolytu k elektrochemické oxidaci studovaných hormonů bylo hledáno experimentálně analýzou látky EE2. Bylo zjištěno, že v kyselém a neutrálním prostředí Britonova-Robinsonova pufru za přítomnosti acetonitrilu je závislost výšky píků na koncentraci analytu nelineární. Zároveň dochází se zvyšující se koncentrací analytu k posunu polohy píků k pozitivnějším potenciálům. Maximum píků oxidace EE2 při pH 1,97 se nachází u +1200 mV v přítomnosti 33 % acetonitrilu a v prostředí 66 % acetonitrilu pak u +1400 mV. Obdobné výsledky byly získány i v prostředí o pH 4,17. Linearity mezi výškou píků anodické oxidace EE2 a koncentrací bylo dosaženo až v alkalickém prostředí v přítomnosti 80 %-ního acetonitrilu, maxima pro rostoucí koncentraci analytu se neposouvala a nacházela se

u +930 mV. Další experimenty ukázaly, že i ostatní studované přírodní estrogény poskytují lineární odezvu v tomto základním elektrolytu.

Hlavním cílem této práce bylo pokusit se rozlišit jednotlivé nejčastěji se vyskytující estrogény ve vodách vedle sebe. Vzhledem k tomu, že přírodní estrogény byly špatně rozpustné v acetonitrilu, bylo nutné přejít při přípravě standardních roztoků analytů do ethanolického prostředí, což následně ovlivňovalo tvar křivek anodické oxidace. Díky podobnosti struktury analyzovaných estrogenů se dalo předpokládat podobné chování při anodické oxidaci. To se také potvrdilo. Tvar piků je obdobný a jejich poloha je blízká. Látka E1 má v navrženém základním elektrolytu maximum při +890 mV, látka E2 rovněž při +890 mV, estriol E3 při +800 mV a syntetický estrogen EE2 pak při +990 mV. Pokud se analyzuje směs těchto látek o přibližně stejné koncentraci, získá se záznam, který na první pohled neindikuje žádnou směs, jak dokumentuje Obr. 2.



**Obr. 2.** Záznam voltametrické analýzy směsi estrogenů E1, E2, E3 a EE2.

K rozlišení jednotlivých estrogenů v této směsi byl navržen postup, kombinující experimentální a matematický přístup. Nejdříve se pro jednotlivé samotné látky změní proudová odezva pro zvyšující se koncentraci. Pro naměřená data se metodou nejmenších čtverců vypočítají parametry regresní přímky, která popisuje závislost proudu na koncentraci. Směrnice přímky ( $k$ ) dané složky představuje odezvový faktor, který vyjadřuje závislost proudu na koncentraci a toto lze vyhodnotit pro kteroukoliv zvolenou hodnotu potenciálu piků. Po následném záznamu směsi studovaných látek, kdy k proudové odezvě přispívají všechny přítomné složky je možné sestavit potřebnou soustavu rovnic, které vyjadřují závislost proudu na koncentracích jednotlivých složek při určitém konkrétním potenciálu. Počet rovnic musí odpovídat počtu analyzovaných složek. Soustavu rovnic lze řešit s využitím maticového počtu, kde matice soustavy musí být čtvercová. Z výsledků lze s určitou pravděpodobností stanovit koncentraci jednotlivých složek. Tento přístup byl pro začátek testován na dvousložkové směsi estrogenů E1 a E3. Obsah estronu byl stanoven s chybou -7,8 %, obsah estriolu pak s chybou +5,3 %.

Pro stanovení celkové koncentrace čtyř nejčastěji se vyskytujících estrogenů ve vodách byly vybrány čtyři potenciály, a to +800, +890, +950 a +1000 mV, pro které byly vyhodnoceny směrnice  $k = I_p/c$  u všech složek. Následně bylo třeba nalézt takový potenciál, při kterém se směrnice regresních přímek jednotlivých složek vzájemně co nejméně lišily. Pro každý potenciál se vypočítala průměrná hodnota odpovídajících směrnice regresních přímek a

optimální potenciál byl zvolen tak, aby odchylka směric od daného průměru byla minimální. Pro takto zvolený optimální potenciál byla vypočtena celková koncentrace analyzovaných estrogenů. Tento postup byl aplikován na stanovení modelové směsi všech čtyř studovaných estrogenů, které byly zastoupeny v přibližně stejné koncentraci. Nalezená hodnota se lišila od skutečné o +4 %. Navržený způsob voltametrického stanovení směsi nejčastěji se vyskytujících estrogenů ve vodách bude dále testován.

### **Závěr**

V rámci této práce byly navrženy experimentální podmínky k voltametrickému stanovení směsi nejčastěji se vyskytujících estrogenů ve vodách. Jako indikační elektroda sloužila BDDE, byla využita anodická oxidace metodou DPV. Podrobnou studii voltametrické odezvy jednotlivých látek byl navržen způsob stanovení celkového obsahu estrogenů ve čtyřsložkové směsi a také možnost určení zastoupení jednotlivých složek.

### **Acknowledgments**

This research has been supported by the Czech Science Foundation (Project No. 20-01589S) and The University of Pardubice (Project No. SGSFChT\_2023\_002).

### **References**

1. Adeel M., Song X., Wang Y., Francis D., Yang Y.: *Environ. Int.* *99*, 107 (2017).
2. Bilal M., Iqbal H.M. N.: *Sci. Total Environ.* *690*, 447 (2019).
3. Ghoneim E.M., El-Desoky H.S., Ghoneim M.M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* *40*, 255 (2006).
4. Triviño J.J., Gómez M., Valenzuela J., Vera A., Arancibia V.: *Sens. Actuators, B* *297*, 126728 (2019).
5. Liu X., Feng H., Liu X., Wing D.K.Y.: *Anal. Chim. Acta* *689*, 212 (2011).
6. Zheng Z.X., Wang M., Shi X.Z., Wang C.M.: *Sci. Rep.* *9*, 14162 (2019).
7. Li C.: *Bioelectrochemistry* *70*, 263 (2007).
8. Perez C., Simões F.R., Cordognoto L.: *J. Solid State Electrochem.* *20*, 2471 (2016).
9. Santos A.M., Wong A., Prado T.M., Fava E.L., Fatibello-Filho O., Sotomayor M.D.P.T., Moraes F.C.: *Talanta* *224*, 121804 (2021).
10. Silva L.R.G., Rodrigues J.G.A., Franco J.P., Santos L.P., D'Elia E., Romão W., Ferreira R.D.Q.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *208*, 111430 (2021).

## Study of Electrochemical Behaviour of Bile Acids on Boron-Doped Diamond Electrode (Studium elektrochemického chování žlučových kyselin na borem dopované diamantové elektrodě)

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

### Abstract

The electrochemical behavior of primary bile acids (cholic acid and chenodeoxycholic acid) and secondary bile acids (lithocholic acid, deoxycholic acid, and ursodeoxycholic acid) using cyclic voltammetry on the boron-doped diamond electrode was studied. Specifically, the behavior of primary and secondary bile acids in the negative potential region was compared in the media of acetonitrile–perchloric acid (water content *ca* 0.55 %). Unlike secondary bile acids, primary bile acids provide a signal in the negative potential region at *ca* -0.4 V (vs. Ag/AgNO<sub>3</sub>). The development of these signals is time-dependent. This signal could represent a base for the selective determination of primary bile acids in the presence of secondary bile acids in a sample.

**Keywords:** Boron-doped diamond electrode, Primary bile acids, Secondary bile acids, Voltammetry

### Úvod

Žlučové kyseliny a jejich konjugáty s glycinem a taurinem se v organismu primárně vyskytují ve žluči. Následně jsou vylučovány do střeva, kde se podílejí na trávení, vstřebávání a metabolismu lipidů. Jsou rozlišovány dvě skupiny žlučových kyselin – primární a sekundární žlučové kyseliny. Primárními žlučovými kyselinami v lidském těle jsou cholová a chenodeoxycholová kyselina, které vznikají v játrech syntézou z cholesterolu. Tyto primární žlučové kyseliny mohou být buď v játrech dále konjugovány s glycinem nebo taurinem nebo jsou transportovány do střeva, kde z nich enzymovou činností mikroorganismů vznikají sekundární žlučové kyseliny: deoxycholová, lithocholová a ursodeoxycholová kyselina. Přestože se na první pohled struktura, chemické a fyzikální vlastnosti primárních a sekundárních žlučových kyselin příliš neliší, mají v organismu odlišné funkce a jejich různé hladiny v organismu jsou indikátorem různých onemocnění<sup>1-3</sup>.

Základem struktury žlučových kyselin je elektrochemicky neaktivní steroidní jádro s hydroxylovou skupinou na C3, případně dalšími hydroxylovými skupinami. Alifatický uhlíkatý řetězec zakončený karboxylovou skupinou je umístěn na C17. Elektrochemická aktivita žlučových kyselin pro oxidace tak závisí na aktivních reakcích, kdy jsou do steroidního jádra zaváděny dvojně vazby pomocí dehydratace silnou anorganickou kyselinou<sup>4-6</sup>. Po použití dehydratačního kroku je možné detegovat cholovou a chenodeoxycholovou kyselinu (po extrakci na pevné fázi) v umělém séru (*LOD* = 80 μmol l<sup>-1</sup>)<sup>6</sup>.

Redukce žlučových kyselin byly zkoumány na rtuťové kapající elektrodě pomocí diferenční pulsní polarografie<sup>7</sup>, kdy zřejmě dochází ke katalytickému vývoji vodíku na karboxylové skupině, nebo na elektrodě ze skelného uhlíku a elektrodě ze skelného uhlíku modifikované mnohostěnnými uhlíkovými nanotrubičkami<sup>8</sup>. Samotnému analytickému stanovení žlučových kyselin za využití elektrochemických metod se věnuje jen několik málo studií<sup>10,11</sup>. V studiích,

kde byla jako pracovní elektroda použita zlatá elektroda, probíhala detekce 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 ( $LOD = 0,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ )<sup>9</sup>, resp.  $E_1 = +0,05$  V,  $E_2 = +0,60$  V a  $E_3 = -0,60$  V ( $LOD = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$ )<sup>10</sup>. 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  $+1,40$  V<sup>11</sup>.

### Experimentální část

Studovány byly primární žlučové kyseliny: cholová a chenodeoxycholová kyselina a sekundární žlučové kyseliny: deoxycholová, lithocholová a ursodeoxycholová 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  $0,5 \mu\text{m}$  (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. Používalo 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.

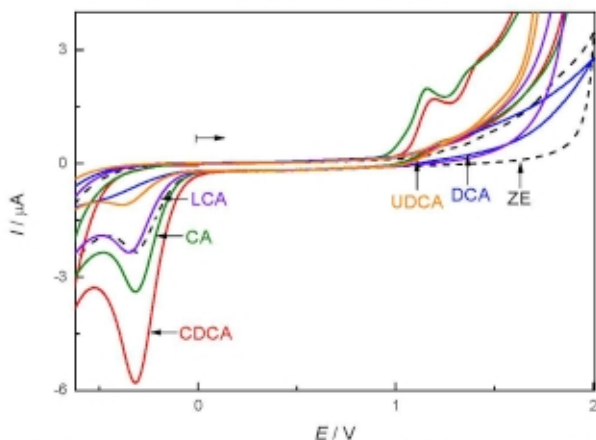
### Výsledky a diskuse

Na základě předchozího studia odezvy chenodeoxycholové kyseliny v oblasti záporných potenciálů bylo studováno elektrochemické chování dalších vybraných žlučových kyselin této oblasti. Studovány byly dvě skupiny žlučových kyselin: primární (cholová a chenodeoxycholová kyselina) a sekundární (deoxycholová, lithocholová a ursodeoxycholová kyselina). V předchozích studiích bylo zjištěno, že chenodeoxycholová kyselina poskytuje redukční signál při potenciálu *ca*  $-0,4$  V pouze za určitých podmínek: po vložení vysoce kladného potenciálu  $\geq +2,0$  V, při kterém dochází na BDD elektrodě k rozkladu vody a tvorbě  $\text{HO}^\bullet$  radikálů, a zároveň v přítomnosti kyslíku v měřeném roztoku. Samotný vývoj katodické odezvy v těchto podmínkách trvá *ca* 45 minut od smísení roztoku žlučové kyseliny s kyselinou chloristou. Další experimentální práci bylo zjištěno, že vývoj katodického signálu lze urychlit zahřátím ve vodní lázni po dobu 5 minut na  $50^\circ\text{C}$ . Stejně jako v případě elektrochemické oxidace je tedy nutné aktivovat steroidní skelet žlučové kyseliny dehydratační reakcí, která může indukovat další změny v jejích struktuře. Studium elektrochemického chování dalších žlučových kyselin probíhalo vždy po zahřátí ve vodní lázni.

Na obr. 1 jsou zaznamenány cyklické voltamogramy studovaných primárních i sekundárních žlučových kyselin. Byly měřeny od potenciálu 0 V anodicky do potenciálu  $+2,0$  V, kdy již dochází k rozkladu elektrolytu (a vývoji hydroxylových radikálů), následoval katodický scan do potenciálu  $-0,7$  V. V případě primárních žlučových kyselin (cholová a chenodeoxycholová kyselina) dochází k výraznému nárůstu anodického signálu při  $+1,2$  V, který odpovídá oxidaci produktů dehydratace a ve zpětném skenu v oblasti záporných potenciálů k vývoji signálu při *ca*  $-0,4$  V oproti hodnotám základního elektrolytu. Tyto kyseliny podléhají dehydratační reakci díky přítomnosti  $7\alpha$  hydroxylové skupiny na steroidním skeletu v antiperiplanární poloze k vodíku na C8 (ref. 5). Naopak pro sekundární žlučové kyseliny (deoxycholová, lithocholová a



ursodeoxycholová kyselina) nebyl zaznamenán ani výrazný anodický, ani katodický signál. Tyto kyseliny mají 7β hydroxylovou skupinu (ursodeoxycholová kyselina), nebo není hydroxylová skupina na C7 přítomna (litocholová a deoxycholová kyselina), jejich struktura se v přítomnosti dehydratující kyseliny tedy zřejmě nemění a nejsou elektrochemicky oxidovatelné. Výška proudové odezvy litocholové kyseliny je prakticky totožná s linií základního elektrolytu, dochází zde pouze k posunu potenciálu o ca -0,05 V. Pro deoxycholovou a ursodeoxycholovou kyselinu můžeme pozorovat pokles proudu, a to až pod linii základního elektrolytu, zřejmě v důsledku jejich adsorpce na povrch elektrody, která byla prokázána např. pro rtuťové elektrody<sup>12</sup>. Dále bylo ověřeno, že pro žádnou ze studovaných kyselin není katodický signál přítomen, pokud je scan proveden katodicky od počátečního potenciálu 0 V. Na základě těchto zjištění by bylo možné vyvinout vysoce selektivní elektrochemickou metodu pro detekci primárních žlučových kyselin ve směsi se sekundárními.



**Obr. 1.** Cyklické voltamogramy primárních žlučových kyselin: cholová (CA) a chenodeoxycholová kyselina (CDCA) ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) a sekundárních žlučových kyselin: litocholová (LCA), deoxycholová (DCA) a ursodeoxycholová kyselina (UDCA) ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v prostředí kyseliny chloristé ( $c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$ ) a acetonitrilu (obsah vody ca 0,55 %) na BDD elektrodě. Základní elektrolyt (ZE) znázorněn přerušovanou čarou. Měřeno od počátečního potenciálu 0 V, anodický scan do +2,0 V, zpětný katodický scan do -0,7 V. Měřeno v přítomnosti kyslíku, rychlost skenu  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ .

### Závěr

Předmětem studia bylo elektrochemické chování primárních (cholová a chenodeoxycholová kyselina) a sekundárních žlučových kyselin (deoxycholová, ursodeoxycholová a litocholová kyselina) v prostředí acetonitrilu a kyseliny chloristé s minimálním obsahem vody. Byly studovány podmínky vzniku odezvy těchto žlučových kyselin v oblasti záporných potenciálů na BDD elektrodě. Bylo zjištěno, že v případě primárních žlučových kyselin dochází k navýšení signálu poskytnutého v oblasti záporných potenciálů při ca -0,4. Oproti tomu sekundární žlučové kyseliny způsobují snížení proudové odezvy oproti průběhu křivky základního elektrolytu v dané oblasti. Oba tyto jevy by mohly být základem pro voltametriickou či amperometriickou metodu detekce žlučových kyselin v případech, kdy je třeba zjistit nejen

celkovou hladinu žlučových kyselin, ale je důležité rozlišit, zda se jedná o primární nebo sekundární žlučové kyseliny.

#### Acknowledgments

This research has been supported by the Grant Agency of Charles University (project GAUK 362621), the Czech Science Foundation (project GACR 19-11268S), and the Specific University Research (SVV 260690).

#### References

1. Begley M., Gahan C. G. M., Hill C.: *FEMS Microbiol. Rev.*, *29*, 625 (2005).
2. Noriega L., Cuevas I., Margolles A., de los ReyesGavilán C. G.: *Int. Dairy J.*, *16*, 850 (2006).
3. Zhao X., Liu Z., Sun F., Yao L., Yang G., Wang K.: *Front. Physiol.*, *13*, 826740 (2022).
4. Klouda J., Barek J., Nesmerak K., Schwarzova-Peckova K.: *Crit. Rev. Anal. Chem.*, *47*, 384 (2017).
5. Klouda J., Barek J., Kočovský P., Herl T., Matisyk F.-M., Nesměrāk K., Schwarzová-Pecková K.: *Electrochem. Commun.*, *86*, 99 (2018).
6. Klouda J., Nesměrāk K., Kočovský P., Barek J., Schwarzová-Pecková K.: *Bioelectrochemistry*, *134*, 107539 (2020).
7. Ferri T., Campanella L., Deangelis G.: *Analyst*, *109*, 923 (1984).
8. Liu X., Wang L., Zhang S., Deng X., Tang X., Huang X.: *Electroanalysis*, *18*, 2385 (2006).
9. Dekker R., Vandermeer R., Olieman C.: *Chromatographia*, *31*, 549 (1991).
10. Chaplin M.: *J. Chromatogr. B-Biomed. Appl.*, *664*, 431 (1995).
11. Scalia S., Tirendi S., Pazzi P., Bousquet E.: *Int. J. Pharm.*, *115*, 249 (1995).
12. Jelšiková K., Yershová P., Fojt L., Fojta M., Schwarzová-Pecková K.: 2D-condensation and redox reactions of bile acids at hanging mercury drop electrode, *in preparation*.

## Easy Detection of Protein-RNA Interactions by Northwestern Blotting

Leon Jenner, Dzmítry Pruchkouski, Matouš Petlák, 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

The telomerase RNA provides a template for a large number of proteins that together make up the telomerase ribonucleoprotein complex that maintains the ends of linear chromosomes in most eukaryotes. Much work has been done to characterize mammalian telomerase and investigate its role in cancer and aging. Much less is known about plant telomerase, although an important first step was the successful identification of the telomerase RNA in the model plant *Arabidopsis thaliana*. To date, only one *in vitro* plant protein binding partner for this RNA has been identified using classical gel-shift experiments. One reason for this could be the time-consuming need for optimization in these experiments and a general lack of stability and solubility amongst many putative RNA-binding proteins. Northwestern blotting is a relatively obscure method that has nevertheless been used to identify several *Arabidopsis thaliana* proteins that bind telomeric RNA. Fragments of RNA and putative binding proteins were also successfully used in combination to give some information on the specificity and locality of these interactions. The research was supported by the Czech Science Foundation, project no. 20-01331X.

**Keywords:** Telomerase, Telomere, RNA-protein interactions.

### Introduction

Non-coding RNAs have been known since the 1950s and today there is evidence to suggest that a large part of the non-gene encoding eukaryotic genome can be and is transcribed<sup>1</sup>. One example of a biological system that features an essential non-coding RNA is the ribonucleoprotein complex telomerase, where the human non-coding telomerase RNA (TR) acts as a scaffold for at least seven other proteins and provides a template for the DNA repeats that make up telomeres<sup>2</sup>. While the catalytic protein subunit of telomerase is conserved across species, the gene encoding TR evolves and may be the primary reason for telomeric variation across eukaryotic species<sup>3</sup>. Research into plant telomerases is some way behind that of systems in mammals and yeast, but the recent discovery of the 268 nt telomerase RNA in the model plant *Arabidopsis thaliana* (AtTR) is an important step in making up for this deficit<sup>4</sup>. The next step will be to identify the protein components of telomerase, which would then in turn give some idea how plant telomeres interact with other biological pathways. A classical *in vitro* experiment to determine proteins that bind to AtTR is the electrophoretic mobility assay (EMSA). This was used to successfully identify interactions between AtTR the plant homolog of the multi-role RNA binding protein dyskerin<sup>5</sup>. However, EMSA experiments require extensive optimization that can often vary between proteins of interest and putative RNA-binding proteins in particular are difficult to keep soluble, as evidenced by Song *et al.* employing a truncated form of the dyskerin sequence in their experiments. The less standard technique of Northwestern blotting<sup>6</sup> allows a faster and simpler method of screening candidate At proteins or protein domains for the presence or absence of AtTR binding activity that might then be further characterized by more quantitative techniques.

## Methods

Protein and RNA samples were prepared as described previously<sup>7</sup>. Predicted domains of a putative RNA binding protein were prepared as glutathione transferase (GST) fusion proteins. RNA constructs of the complete AtTR sequence, a predicted pseudoknot secondary structural motif (SS), and the sequence with the predicted pseudoknot deleted ( $\Delta$ SS) were synthesized *in vitro* and end-labeled with a radioactive <sup>32</sup>P containing phosphate group for detection.

Two parallel sets of samples of cell extracts expressing protein sequences were loaded onto 12.5% acrylamide gels containing 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and run for 50 minutes at 180 V in SDS-containing glycine buffer. The typical heat denaturing step used for denaturing gel electrophoresis was omitted to avoid irreversible damage to proteins. Various buffer compositions were used and the experiment is resilient to a range of conditions that can be tailored to specific proteins if necessary. After initial electrophoresis, gels were then transferred to an electroblotting cassette, sandwiched by blotting paper (Whatman), and with a nitrocellulose membrane covering the side towards the anode. Gels were then electroblotted for 90 minutes in glycine buffer without SDS, but with 10% methanol to aid in the transfer to the nitrocellulose membrane. After blotting, membranes were transiently stained with 0.1% Ponceau S red stain to determine the extent of total protein transfer to the membrane. Membranes were then separated into those destined for Western blotting and those for Northern blotting.

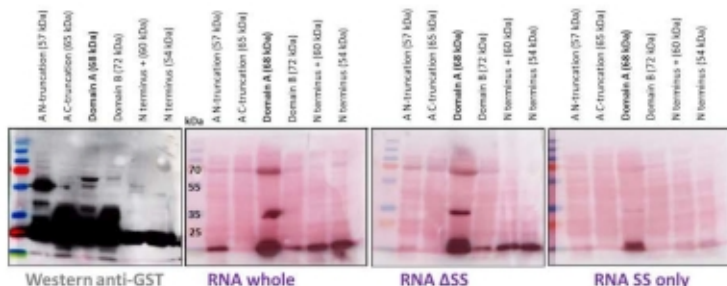
Western membranes were blocked with 25% low-fat milk in Tris-buffered saline (TBS) solution for 1 hour with constant rolling at room temperature and then incubated overnight at 4 °C with 1:8000 dilutions of anti-GST (GST fusion proteins) or anti-poly-His (His-tagged proteins) monoclonal antibodies raised in mice (Santa Cruz). Following this, membranes were washed with TBS three times for 10 minutes each, then incubated for 1 hour in TBS with 1:5000 anti-mouse antibodies fused to horseradish peroxidase. The membranes were washed again as before and then Fentoglow developer solution (Thermo Fisher) was used to visualize bands using chemiluminescence. Chemiluminescent images were recorded using an Amersham 500 system.

Northern membranes were instead incubated for 1 hour with RNA binding buffer to remove SDS and encourage refolding of membrane-bound proteins, followed by incubation in fresh buffer containing 4 nM <sup>32</sup>P-labelled AtTR for 2 hours at room temperature. Membranes were then washed with fresh RNA binding buffer for 10 minutes, dried, and then covered in plastic foil, and exposed to a phosphorimaging desk overnight (or longer depending on isotope strength). Phosphorimages were recorded using a Typhoon laser imager.

## Results and discussion

GST fusion proteins were prepared that each contained partial sequences of a predicted AtTR binding protein, including predicted domains A and B, shorter and longer sections of the N-terminus, and N- and C-truncations of the domain A. These were overexpressed in *Escherichia coli* BL21 cell extract and blotted, both with anti-GST antibodies (Fig. 1, left panel) and constructs of radiolabelled AtTR including a predicted secondary structural motif and a deletion of the same (Fig. 1, right and central panels). Western blotting identified that all fusion proteins were expressed to some extent, although intact N-terminal fragments were present in lower amounts than the others, and the N-terminal truncation of domain A was present in considerably higher amounts. Together with these, there is evidence of a ladder of GST-containing breakdown products that range until the mass of free GST (23 kDa). Northern blotting features a strong signal consistent with the mass of intact GST fusion to domain A, as well as a lower-mass signal that could indicate the GST-free sequence (45 kDa) or another breakdown product

that is still competent at binding. These signals are strong for the whole AfTR sequence and the AfTR construct with the predicted secondary structure deleted (Fig. 1, central panels), but much fainter for the secondary structural sequence alone (Fig. 1, right panel). In many wells for all Northern blots there are low molecular weight bands indicating AfTR-binding bands which are assigned as non-specific *E. coli* RNA-binding proteins as they are lost or otherwise decrease in intensity when purified proteins are used instead of cell extracts (data not shown).



**Figure 1.** Northwestern blots of *E. coli* cell extracts overexpressing GST fusion proteins of putative RNA binding protein sequences with masses as indicated. Molecular weight markers (blue, red, and green bands) on the left-hand lane of each membrane indicate approximate masses as indicated. **Left:** Western blot for GST, present in both intact fusion proteins and breakdown products. **Centre to Right:** Northern blots, black signals show masses of protein species that bind AfTR constructs overlaid with pink Ponceau S-stained signals indicating the presence of any protein on the membranes.

The Northwestern blots in combination suggest that the predicted domain A binds AfTR. Truncation of this sequence at either N- or C- termini abolishes this binding, suggesting that the entire initially predicted fragment is at least close to the minimal binding domain. The loss of signals when the predicted secondary structural motif is used, suggests that either this predicted motif is not present in actuality, or that this structure is not necessary for the binding of this protein. This is consistent with the idea that multiple proteins may be required to bind to AfTR at once and that each individual protein component of the overall telomerase ribonucleoprotein complex has a specific area of AfTR where it binds.

## Conclusions

Although there is a clear indication that GST fusion proteins are unstable or fragment either during electrophoresis or in solution, the qualitative nature of Northwestern blotting means that as long as some intact fusion protein is present, such samples can still be used to investigate RNA binding. This is even possible without the necessity to purify proteins overexpressed in bacteria, as long as non-specific background binding is taken into account. The technique was used to indicate that the putative domain A binds AfTR in a manner that seems to be independent of the predicted AfTR secondary structural motif. As such, further quantitative binding or structural experiments can now disregard non-AfTR binding sequences and focus on the binding properties of the approximately-identified binding domain sequence.

## Acknowledgments

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

## References

1. Palazzo A.F., Lee E.S.: *Front. Gen.* 6, 2 (2015).
2. Ghanim G.E., Fountain A.J., van Roon A.M., Rangan R., Das R., Collins K., Nguyen T.: *Nature* 593, 449 (2021).
3. Peška V., García S.: *Front. Plant Sci.* 11, 117 (2020).
4. Fajkus P., Peška V., Závodník M., Fojtová M., Fulnečková J., Dobias Š., Kilar A., Dvořáčková M., Zachová D., Nečasová I., Sims J., Sýkorová E., Fajkus J.: *Nucl. Acids Res.* 47, 9842 (2019).
5. Song J., Castillo-González C., Ma Z., Shippen D. E.: *Nucl. Acids Res.* 49, 9496 (2021).
6. Schumacher J. M, Lee K., Edelhoff S., Braun R. E.: *J. Cell Biol.* 129, 1023 (1995).
7. Jenner L.P., Pruchkouski D., Sýkorová E.: LXI. Modern Electrochemical Methods, Jettichovice, May 22<sup>nd</sup> – 26<sup>th</sup>, 2022, Jettichovice, Book of Abstracts (Navrátil T., Schwarzová, K., Fojta M., eds.), p. 84.

## How to Increase Selectivity in Voltammetry (Jak zvýšit selektivitu ve voltametrii)

Radek Jerga

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

Selectivity is one of the biggest problems in voltammetry, mainly in the case of substances with similar redox potentials, which provide overlapping peaks. However, if one of the analytes provides an electrochemically active product after oxidation, we can distinguish between these substances. This is the case of fentanyl and capsaicin, which both form oxidation products that can be further reduced and re-oxidized, providing analytical signals at potentials different from the anodic oxidation peak. This was utilized in the developed *ex-situ* cyclic square-wave voltammetry method based on pre-electrolysis of the sample followed by cathodic reduction and anodic oxidation of the original oxidation product.

**Keywords:** Capsaicin, Fentanyl, Norfentanyl, Voltammetry.

### Úvod

Voltametrické metody lze použít ke kvantifikaci velkého množství elektroaktivních látek. Jejich zásadní nevýhodou je však špatná selektivita pro látky s blízkými redox potenciály. Pokud pak matrice vzorku obsahuje látky, které jsou elektrochemicky aktivní a jejich redoxní potenciál je blízký analytu, je nutné provést takové kroky, aby voltametrická metoda umožnila selektivní stanovení analytu.

Jednou z nejčastějších možností zvýšení selektivity je předúprava vzorku, která je obecně důležitá pro všechny metody analytické chemie. Látky lze separovat extrakcí kapalina-kapalina, pomocí SPE apod. Velkou výhodou elektrochemických metod je ovšem možnost modifikace elektrod, která může vést k selektivní reakci pouze určité skupiny látek nebo pouze analytu.

Množství elektrodových materiálů a použitelných modifikátorů je důvodem, proč jsou modifikace elektrod velice rozmanité a dostatečnou kreativitou lze selektivitu elektrody omezit přímo na požadovaný analyt. Příkladem může být jednoduché použití banánu jako přírodního zdroje enzymu polyfenol oxidázy, čímž se ušetří na nutnosti kupovat drahý čistý enzym. Rozemletý banán se přidá do uhlíkové pastové elektrody, čímž vznikne polyfenol oxidázový biosenzor například pro analýzu pyrokatecholu<sup>1</sup>.

Další možná modifikace může například využít fosfolipidy, které jsou schopny tvořit dvojvrstvy na povrchu elektrody ze skelného uhlíku (GCE) upraveném anodickou oxidací. Fosfolipidová dvojvrstva napodobuje svou strukturou i funkci buněčnou membránu. Tato dvojvrstva propustí lipofilní látky a zabrání přístupu hydrofilních látek k povrchu elektrody. Modifikace GCE fosfolipidy ze sójových bobů byla úspěšně použita pro analýzu kapsaicinoidů v chilli<sup>2</sup>.

V této práci je selektivita voltametrické analýzy studována z hlediska elektrochemického chování analyzovaných látek – kapsaicinu (CA) a fentanylu (FEN). Společnou vlastností těchto látek je skutečnost, že produkty jejich elektrochemické oxidace je možné reverzibilně redukovat

a reoxidovat, čímž jsou použitím cyklické square-wave voltametrie (CSWV) získány proudové signály při nižších potenciálech, než má hlavní anodický pik. Další zvýšení selektivity pak bylo umožněno použitím adsorpční voltametrie, kdy se analyt adsorbuje na povrch elektrody z roztoku vzorku a měření je provedeno po přenesení do čistého elektrolytu.

## Experimentální část

### Přístroje

Všechna elektrochemická měření byla provedena na potenciostatu/galvanostatu Autolab PGSTAT128N (Metrohm Autolab, Nizozemsko) řízeném softwarem Nova 1.12. Všechny experimenty byly provedeny v tříelektrodovém zapojení s pracovní GCE (Bioanalytical Systems, USA), referenční kalomelovou elektrodou (Monokrystaly, Česká republika) a pomocnou platinovou elektrodou.

### Chemikálie

Fentanyly a norfentanyly byly pořízeny od firmy Lipomed (Švýcarsko), kapsaicin byl zakoupen od firmy Merck (Německo). Pro přípravu Britton-Robinsonova (BR) pufru byly použity kyselina fosforečná (Penta, Česká republika), kyselina boritá (Lachema, Česká republika), kyselina octová a hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika).

### Cyklická voltametrie a ex-situ adsorpční CSWV

Cyklická voltametrie FEN byla provedena v potenciálovém rozsahu -0,4 až 1,2 V s rychlostí skenu 50 mV s<sup>-1</sup>.

Adsorpční CSWV metoda je založena na adsorpci analytu z míchaného roztoku, do kterého je na 5 s ponořena GCE. Ta je poté opláchnuta deionizovanou vodou a umístěna do voltametrické cely s elektrolytem tvořeným BR pufrem (pH 2 pro kapsaicin, pH 8,5 pro fentanyly a norfentanyly). Dalším krokem je pre-elektrolýza za konstantního potenciálu následovaná katodickou a anodickou polarizací elektrody v režimu SWV.

Metoda pro FEN využívala pětisekundovou pre-elektrolýzu při 950 mV, následovanou katodickou polarizací elektrody od 950 mV do -400 mV rychlostí 100 mV s<sup>-1</sup>, s výškou pulzu -50 mV a frekvencí 25 Hz. Následující anodický sken byl proveden od potenciálu -400 mV do 950 mV rychlostí 100 mV s<sup>-1</sup>, s výškou pulzu 50 mV a frekvencí 25 Hz.

CSWV analýza CA byla provedena s pre-elektrolýzou při potenciálu 850 mV po dobu 5 sekund, po níž následovala katodická polarizace elektrody od 850 mV do -100 mV rychlostí 140 mV s<sup>-1</sup>, s amplitudou -50 mV a frekvencí 35 Hz. Následný anodický sken byl veden od potenciálu -100 mV do 850 mV rychlostí 140 mV s<sup>-1</sup>, amplitudou 50 mV a frekvencí 35 Hz.

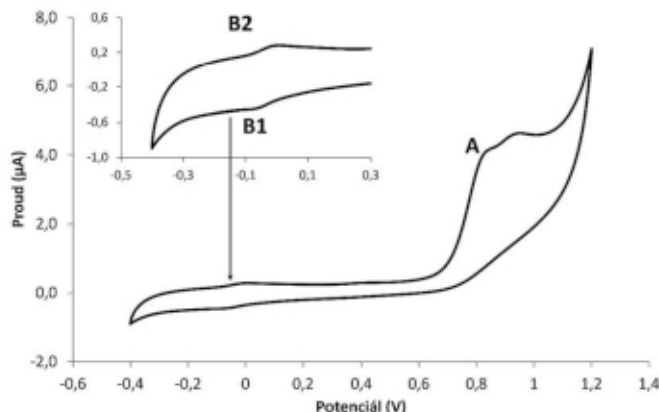
Pracovní elektroda byla před každou analýzou vyčištěna krátkým ponořením do hexanu a vyleštěna na tkanině (Buchler, USA) navlhčené roztokem aluminu (velikost částic 0,05 μm).

## Výsledky a diskuse

Na Obr. 1 je vidět cyklický voltamogram FEN ( $c = 0,05 \text{ mmol l}^{-1}$ ) zaznamenaný přímou analýzou FEN v BR pufru. Lze vidět proudový signál A odpovídající anodické oxidaci FEN se dvěma maximy při potenciálech 0,8 V a 0,93 V. V katodickém skenu se pak objevuje redukční pik B1 a v následném anodickém skenu pik B2. Píky B1 a B2 jsou způsobeny reakcí produktu vznikajícího při anodické oxidaci FEN, které odpovídá dvojpek A. Oba píky B1 i B2 lze využít pro analytické účely. Obdobná situace je u CA.



Látky poskytující produkty oxidace, které jsou elektrochemicky aktivní a potenciály piků následné redukce a re-oxidace těchto produktů se nacházejí mimo hlavní oxidační pik, nabízejí výhodnou možnost selektivní analýzy v případech, kdy je v matrici vzorku látka s podobným redoxním potenciálem, který by způsoboval navyšování proudu piků při jednoduché oxidaci sledované látky. Využití elektrochemické reakce oxidačního produktu analytu umožňuje vynechat krok předúpravy vzorku, případně i krok modifikace elektrody. Celková doba analýzy se tak může zkrátit o minuty až hodiny.



**Obr. 1.** Cyklický voltamogram fentanylu ( $c = 0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) v BR pufru pH = 8,5.

Pro stanovení FEN a CA s využitím voltametričních signálů jejich oxidačních produktů byla vyvinuta CSWV metoda, v níž se látka nejprve oxiduje při konstantním potenciálu, a poté je vzniklý produkt redukován v katodickém skenu a následně re-oxidován v anodickém skenu. Záznam analýzy FEN a CA touto metodou je na Obr. 2. Pro obě látky byly určeny nejvhodnější potenciály pre-elektrolýzy (+850 mV pro CA a +950 mV pro FEN) a doba pre-elektrolýzy (5 s pro obě látky).

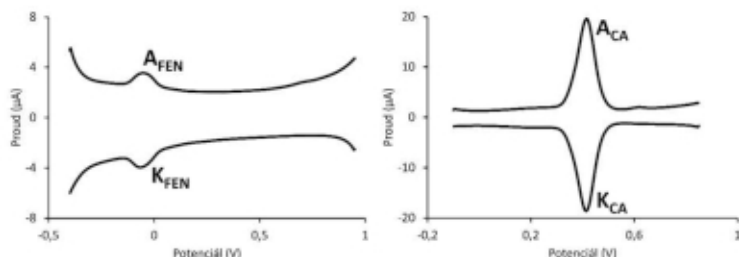
Pro zlepšení selektivity metody byla CSWV metoda rozšířena na *ex-situ* adsorpční voltametrii, protože obě analyzované látky mají hydrofobní charakter. Proto je lze jednoduše akumulovat na povrchu GCE. Při *ex-situ* metodě je analyt nejprve akumulován ponořením do míchaného roztoku, přičemž jako dostatečná doba ponoření bylo experimentálně určeno 5 sekund. Po krátkém opláchnutí deionizovanou vodou je elektroda s adsorbovaným analytem přenesena do cely se základním elektrolytem a je provedena samotná CSWV analýza. Popsaná transferová metoda umožňuje adsorpci oddělit analyt i ze vzorků se složitou matricí, jako je např. homogenizovaný rostlinný materiál, a eliminovat vliv řady rušivých, zejména polárních a iontových látek z matrice.

*Ex-situ* CSWV byla použita pro sestrojení kalibračních závislostí zkoumaných látek za použití jak katodického, tak anodického piků (Obr. 2). V případě FEN byla změněna kalibrační závislost v koncentračním rozsahu  $1\text{--}10 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  vždy se třemi opakováními. Regresní rovnice kalibračních přímek měly tvar pro katodický pik:

$I_{pa}[\text{nA}] = (107,3 \pm 1,9) c[\mu\text{mol l}^{-1}]$ , korelační koeficient  $r = 0,9994$ ;  
pro anodický pik:

$$I_{pa}[\text{nA}] = (102,1 \pm 1,7) c[\mu\text{mol l}^{-1}] + (30,7 \pm 10,5)[\text{nA}], r = 0,9994.$$

Kalibrační závislost CA byla měřena v rozsahu koncentrací  $0,05\text{--}1 \text{ mg l}^{-1}$  se třemi opakováními. V případě katodického piky byla získána regresní kalibrační přímka  $I_{pc}[\mu\text{A}] = (1,011 \pm 0,006) c[\text{mg l}^{-1}]$ ,  $R = 0,9998$ . Vyhodnocením anodických piků byla získána závislost  $I_{pa}[\mu\text{A}] = (1,070 \pm 0,006) c[\text{mg l}^{-1}]$ ,  $R = 0,9999$ .



**Obr. 2.** Cyklické square-wave voltamogramy fentanylu ( $c = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$ , vlevo) a kapsaicimu ( $c = 50 \text{ mg l}^{-1}$ , vpravo).

## Závěr

Byla vyvinuta *ex-situ* cyklická square-wave voltametriká metoda pro analýzu kapsaicimu a fentanylu. Princip metody spočívá v akumulaci analytu na povrch elektrody a přenesení elektrody do roztoku elektrolytu, kde je analyt nejprve oxidován za konstantního potenciálu a vzniklý produkt je poté katodicky redukován a anodicky re-oxidován. Tím se získají dva analytické signály s potenciálem odlišným od potenciálu piky primární oxidace analytu. Uvedený postup umožňuje do značné míry oddělit signál analytu od případných interferentů, které se mohou oxidovat při podobném potenciálu jako stanovovaná látka, ale jejich produkty nejsou dále elektroaktivní, případně jejich redukce/oxidace probíhá při jiných potenciálech. Ve spojení s jednoduchým oddělením analytu ze vzorku cestou *ex-situ* adsorpční akumulace lze efektivně zvýšit selektivitu voltametriká analýzy a zkrátit celkovou dobu analytického procesu.

## Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation (project GAČR No. 20-07350S) and by the Palacký University (project OPIE CZ.02.2.69/0.0/0.0/19\_073/0016713, grant DSGC-2021-0191 and project IGA\_PrF\_2023\_027).

## References

1. Broží N., Vallja L., Shehu A., Vasjari M.: *J. Food Process. Preserv.* **43**, e13838 (2018).
2. Jerga R., Rajčová A., Müllerová V., Barták P., Cankaf P., Navrátil T., Skopalová J.: *J. Electroanal. Chem.* **S58**, 113790 (2020).

## Optimization of Ethyl Carbamate Derivatization for Spectrophotometric and Electrochemical Detection

Jitka Klikarová, Milan Sýs, Veronika Šantrůčková, and Monika Toušková  
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University  
of Pardubice, Studentská 573, 53210 Pardubice, Czech Republic, E-mail:  
Jitka.Klikarova@upce.cz

### Abstract

Ethyl carbamate is a process contaminant posing a potential hazard to human health. It is formed in food and beverages mainly during their fermentation and it is primarily contained in stone fruit spirits. Before analysis, derivatization of ethyl carbamate is required since it lacks a chromophore, fluorophore, or electrophore in its structure, making direct detection challenging or non-selective. Hence, this research deals with the possibilities of ethyl carbamate derivatization for its subsequent spectrophotometric or electrochemical detection. The work aimed to develop a rapid, simple, cheap, and manually undemanding approach for ethyl carbamate determination, allowing its preliminary screening in food samples of various types.

**Keywords:** Ethyl Carbamate, Derivatization, Spectrophotometric Detection, Electrochemical Behavior.

### Introduction

Carbamates are very stable compounds obtained by the substitution of the hydrogen atoms of carbamic acid. The conjugation of the free electron pair of the nitrogen atom with the neighboring acyl residue (so-called tautomerization, i.e. the relocation of the hydrogen atom within the compound to form a keto-enol tautomeric pair) leads to the loss of the pyramidal character of the nitrogen atom and thus to the characteristic planar grouping of carbamates (-O-CO-N=). This implies that the C-N bond has a partial double bond character, which, together with strong intermolecular hydrogen bonds, increases the stability of carbamates and thereby their reluctance to react with other substances<sup>1-3</sup>.

Ethyl carbamate (EC) is the best-known representative of the carbamate family. Due to the absence of chromophore, fluorophore, and electrophore in the structure of this carcinogenic compound, a derivatization step must be included before its analysis. For EC derivatization, the reagent 9-xanthyrol (9-XA) is exclusively used, resulting in the formation of fluorescent and thermally stable xathylamides (XEC)<sup>4</sup>. The derivatization takes place in a strongly acidic aqueous environment and the dark, but the kinetics of the reaction depends on many factors, such as pH, the salinity of the sample, or the presence of interferents<sup>5,6</sup>.

In this work, we focused on simplifying the traditional EC derivatization with 9-XA, describing the electrochemical behavior of the XEC derivative, and comparing the spectrophotometric and electrochemical results. Since no other method of EC derivatization has been described so far, the second aim of this work was to find a new reagent capable of quantitative reaction with EC to form a radiation-absorbing or electrochemically active derivative.

### Experimental

The derivatization reaction of ethyl carbamate using the 9-XA reagent was based on the procedure reported in Ref. <sup>7</sup>, which was subsequently thoroughly optimized. The modified derivatization procedure took place at laboratory temperature and in an acidic environment of HCl. The quantitative reaction lasted 20 minutes and resulted in a yellow product that remained

stable for at least one week. The optimized derivatization of EC using *p*-dimethylaminobenzaldehyde (*p*-DMAB), known as Ehrlich's reagent, was carried out in an acidic HCl environment and took only 5 minutes, with the resulting yellow product being stable for at least one week.

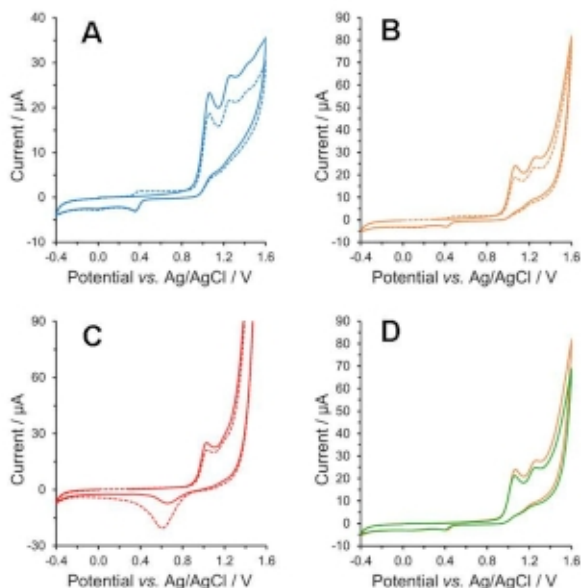
Voltammetric measurements of the reagents themselves and the corresponding derivatives were carried out in a three-electrode system, including a working glassy carbon electrode (GCE) with a diameter of 3 mm, a reference silver chloride electrode with 3 mol L<sup>-1</sup> KCl as a salt bridge, and an auxiliary Pt-sheet electrode. All experiments were performed in ethanolic and aqueous solutions of HCl containing 1 mmol L<sup>-1</sup> *p*-DMAB or 10 mmol L<sup>-1</sup> 9-XA with the different concentrations of EC using cyclic voltammetry from -0.4 up to +1.6 V, at a potential step of 5 mV and scan rate of 50 mV s<sup>-1</sup>. The derivatization reactions were carried out under constant stirring for 5 or 20 min. Finally, the resulting XEC were also analyzed using square-wave voltammetry (SWV) with a potential range from 0 to +1.4 V at a potential step of 5 mV, potential amplitude of 25 mV, and frequency of 20 Hz.

Chromatographic separations of XEC derivatives were performed on a Luna C18 (150 × 3.0 mm; 3 μm particles) column tempered at 35 °C. The mobile phase (MP) was composed of a 20 mmol L<sup>-1</sup> aqueous solution of sodium acetate with a pH of 7.2 (A) and 100% acetonitrile (B) at a flow rate of 0.8 mL min<sup>-1</sup>. The optimized gradient program was as follows: 0 min – 62 % B, 4 min – 70 % B, and 5 min – 100 % B. A sample volume of 20 μL was injected and a fluorescent detector was set to excitation and emission wavelengths of 233 nm and 600 nm, respectively. Regarding *p*-DMAB derivatives, their chromatographic separations were performed on an Ascentis Express C18 (150 × 3.0 mm; 2.7 μm particles) column tempered at 30 °C. The MP consisted of an aqueous solution of HCOOH at a pH 3 (A) and 100% methanol (B) at a flow rate of 0.4 mL min<sup>-1</sup> and the optimized gradient elution program: 0 min – 20 % B, 5 min – 61 % B, and 10 min – 62 % B. A sample volume of 2 μL was injected and the spectrophotometric detector was set to a wavelength of 420 nm.

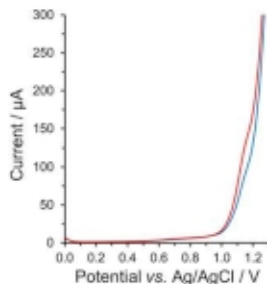
## Results and Discussion

For the EC derivatization, a considerable amount of derivatization agents, namely phenyl isothiocyanate, dansyl chloride, 2,4-dinitrophenylhydrazine, *p*-nitrophenylhydrazine, or *p*-toluidine, 9-XA, and *p*-DMAB, were tested under different reaction conditions. Since EC contains a reluctantly reacting -O-CO-NH- functional group, only reactions with 9-XA and *p*-DMAB led to the formation of the corresponding derivatives. Both derivatization procedures were thoroughly optimized in terms of ratio and amount of reactants, environment (pH and ionic strength) and kinetics of the reaction, and the stability of the obtained derivatives.

First, the electrochemical behavior of both derivatization reagents was investigated. In contrast to 9-XA, which provided electrochemical signals only in the repetitive cycles, the cyclic voltammetry of *p*-DMAB provided numerous oxidation peaks and one redox pair (in the second cycle) in the acidic environment. Moreover, the character of the signals is strongly influenced by the concentration of HCl present, as shown in Fig. 1. Unfortunately, the addition of EC did not cause any definite change in either the number of peaks or their positions. Only a low oxidation peak of XEC could be observed (Fig. 2). This phenomenon should be the subject of further research.

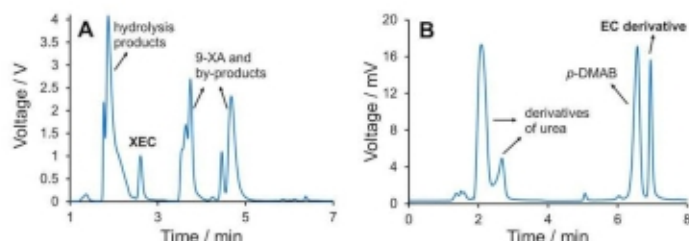


**Fig. 1.** Cyclic voltammograms of  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  *p*-DMAB reagent without the presence of HCl (A; blue), the reagent in the environment of  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  HCl (B; yellow) and  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  HCl (C; red), and with  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  EC together with  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  HCl (D; green). Notes: Normal line means the first cycle, while the dashed line represents the second cycle. The last figure compares the electrochemical behavior of *p*-DMAB itself in the environment of  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  HCl (yellow line) with that of the resulting EC derivative in the same medium (green line).



**Fig. 2.** Square-wave voltammograms of  $0.01 \text{ mmol L}^{-1}$  9-XA reagent in the environment of  $1 \text{ mol L}^{-1}$  HCl and 40% ethanol (blue line) and with the addition of  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  EC to the same medium (red line).

The obtained derivatives were subsequently analyzed using reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with fluorescent (FLD) or spectrophotometric (UV/VIS) detectors. For both derivatives, the separation conditions had to be very carefully optimized. Different stationary phases (amide, nitrile, regular C18, or so-called PS and aqua C18) were tested in combination with various combinations of organic-aqueous MPs. The organic modifier was either acetonitrile or methanol, and aqueous solutions of sodium and ammonium acetate, phosphate buffer, triethylamine, and HCOOH at different concentrations and pH were used as the second MP component. The final chromatograms of both derivatives are depicted in Fig. 3.



**Fig. 3.** Optimized RP-HPLC-FLD chromatogram of XEC derivative (A) and RP-HPLC-UV/VIS chromatogram of EC and urea after *p*-DMAB derivatization (B).

## Conclusions

A total of seven different reagents were tested for EC derivatization. However, only 9-XA and *p*-DMAB actually reacted with EC, both yielding yellow products. The optimization of both derivatization procedures was performed chromatographically using RP-HPLC with the spectrophotometric or fluorescent detector. Regarding the *p*-DMAB derivatization, unfortunately, it was not possible to electrochemically distinguish the reagent from the product of the corresponding reaction with EC. On the contrary, the XEC derivative (reaction product of EC with 9-XA) can be detected at potentials higher than +1.2 V, which could be used for liquid chromatography with electrochemical detection in the future.

## Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the SGS-2023-001 project.

## References

1. Kaiser D., Bauer A., Lemmerer M., Maulide N.: *Chem. Soc. Rev.* **47**, 7899 (2018).
2. Li G., Ma S., Szostak M.: *Trends Chem.* **2**, 914 (2020).
3. Mindl J., Čegan A.: *The chemistry of carbamates*. *Sci. Pap. Univ. Pardubice A.* **5**, 130 (1999).
4. Herbert P., Santos L., Bastos M., Barros P., Alves A.: *J. Food Sci.* **67**, 1616 (2002).
5. Ajtony Z., Szoboszlai N., Bencs L., Viszket E., Mihucz V. G.: *Food Chem.* **141**, 1301 (2013).
6. Zhou K., Liu Y., Li W. Q., Liu G. L., Wei N., Sun Y. M., Bai W. D., Xu Z. L.: *Food Anal. Methods.* **10**, 3856 (2017).
7. Li G., Zhong Q., Wang D., Zhang X., Gao H., Shen S.: *Food Control.* **56**, 169 (2015).

## Electrochemical Properties of Mixed Self-Assembled Monolayers Based on Terpyridine Transition Metal Complexes

Jana Kocábová<sup>a</sup>, Štěpánka Nováková Lachmanová<sup>a</sup>, František Vavrek<sup>a</sup>, Michal Valášek<sup>b</sup>, and Magdaléna Hromadová<sup>a</sup>

<sup>a</sup> J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 00 Prague 8, Czech Republic, E-mail: jana.kocabova@jh-inst.cas.cz

<sup>b</sup> Karlsruhe Institute of Technology, Institute of Nanotechnology, P. O. Box 3640, 76021 Karlsruhe, Germany

### Abstract

This work presents the electrochemical characterization of mixed self-assembled monolayers (SAMs) of  $[\text{Os}(\text{terpy})_2]^{2+}$  and terpyridine connected by tripodal anchoring groups to the polycrystalline gold bead electrode and provides a comparison with SAM based on  $[\text{Os}(\text{terpy})_2]^{2+}$  tripodal molecules without diluting terpyridine tripodal molecules. It is shown that both arrangements enable reproducible preparation of well-defined compact films. The electron transfer rate constant for mixed SAM was determined from cyclic voltammograms according to Laviron's analysis and compared with the rate constant obtained previously for SAM containing only  $[\text{Os}(\text{terpy})_2]^{2+}$  tripod.

**Keywords:** Transition Metal Complexes, Terpyridine,  $[\text{Os}(\text{terpy})_2]^{2+}$ , Tripodal Anchor, Self-Assembled Monolayers, Adsorption, Cyclic Voltammetry, Gold Bead Electrodes.

### Introduction

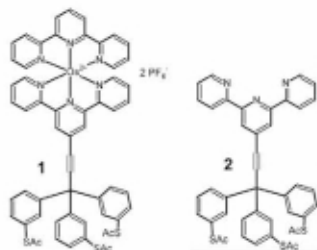
Transition metal complexes based on  $[\text{M}(\text{terpyridine})_2]^{2+}$  offer a wide range of use for their photophysical and photochemical properties<sup>1-3</sup>. These molecules rank among the promising group of compounds for molecular electronics, new electrochromic devices, and sensors<sup>4</sup>. These redox-active centers are linked via ethynylene to the tripodal anchoring groups, which are functionalized by thioacetates. These functional groups, specifically designed for the formation of Au-S bond, provide the covalent interaction between the molecule and gold electrode<sup>5,6</sup>. Tripodal arrangement of the anchoring groups supports the formation of fully compact self-assembled monolayers (SAMs) of redox-active centers perpendicular to the electrode surface<sup>7,8</sup>. Molecules studied in this work are shown in Fig. 1, where molecule  $[\text{Os}(\text{terpy})_2]^{2+}$  tripod is labeled **1** and abbreviated as Os-tripod. A molecule containing the same tripod connected *via* ethynylene to terpyridine is labeled **2** and abbreviated terpy-tripod.

This contribution compares the electrochemical properties of SAMs of molecule **1** with mixed SAMs of molecules **1** and **2** on the polycrystalline gold bead electrode. Mixed monolayers were prepared from their respective solutions in one to one *v/v* ratio. Such SAMs should lead to desired geometry and surface concentration of redox-active centers within the self-assembled structures.

### Experimental

Transition metal complexes **1** and **2** were synthesized in the laboratory of Dr. Valášek in Germany. They were stored in the form of thioacetates to prevent the oxidation of thiolate anchoring groups. Ethanol (99.8%, molecular biology grade, AppliChem GmbH), ferrocene (98%, Sigma Aldrich), hydrogen peroxide (30%, p. a., unstabilized), nitric acid (65%, p. a., Lach-Ner), sulfuric acid (96%, p. a., Lach-Ner), triethylamine ( $\geq 99.5\%$ , BioUltra, Sigma Aldrich) and argon gas (99.998%, Messer) were used as received. Acetonitrile (99.8%, anhydrous, Sigma Aldrich) was dried with activated sieves (0.3 nm, Lachema) and by the

alumina powder activated in the oven at 200 °C which was added to the electrochemical cell before the measurements. Tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF<sub>6</sub> ≥ 99.9%, p. a. for electrochemical analysis, Sigma Aldrich) was dried in the oven at 80 °C before use. All glassware and PTFE chambers for SAM preparation were cleaned by boiling in 25% nitric acid and repeatedly boiled in ultrapure deionized water (Milli-Q Integral 5 water purification system, resistivity of 18.2 MΩ cm, maximum TOC of 3 ppb, Merck Millipore) followed by drying at 110 °C.



**Fig. 1.** Chemical structure of molecules **1** [Os(terpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> tripod (Os-tripod) and **2** (terpy-tripod).

The electrochemical measurements were done in the electrochemical cell with the three-electrode arrangement. The Ag|AgCl|1M LiCl electrode separated from the test solution by a salt bridge with a double-fritted junction was used as the reference electrode. The platinum net was used as the auxiliary electrode. One of two Au bead electrodes (0.215 or 0.267 cm<sup>2</sup> area) was employed as the working electrode. Au bead electrodes were cleaned in freshly prepared Piranha solution, rinsed with ultrapure water, annealed in a butane flame, and let to cool down under Ar atmosphere. Self-assembled monolayers of studied compounds were prepared on the freshly cleaned Au bead electrodes by the deposition from the solution of studied compounds ( $c = 5 \times 10^{-5}$  M) in ethanol with triethylamine (10% w/v) as a deprotecting agent. In the case of mixed SAM, the ratio of Os-tripod to terpy-tripod was 1:1, v/v ratio. Electrodes were incubated in deposition solutions in PTFE chambers for 19 hours at 60 °C. Physisorbed molecules were removed by repeated rinsing with ethanol. SAM-modified electrodes were dried in the stream of argon.

Ferrocene was employed as an internal standard. The cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy measurements were done using potentiostat PGSTAT30 (Metrohm, Switzerland) with FRA2 module for EIS measurements and SCAN250 and ADC10M modules for cyclic voltammetry. Oxygen was removed from the solution by a stream of argon and the measurements were done in the argon atmosphere. Obtained data were analyzed in program Origin 9.1 (OriginLab Corporation, USA).

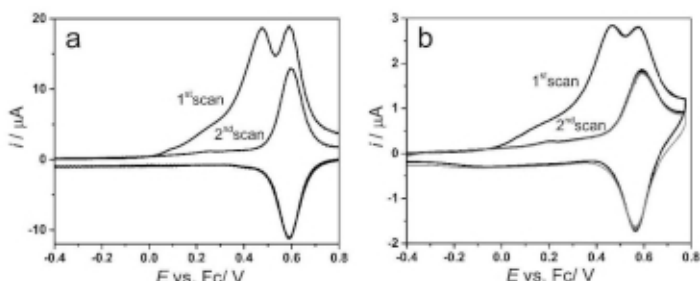
## Results and discussion

Electrochemical properties of SAM **1** and mixed SAM of molecules **1** and **2** formed on the Au polycrystalline bead electrodes were studied by cyclic voltammetry in acetonitrile at various scan rate values in the range 0.05 V s<sup>-1</sup> to 1000 V s<sup>-1</sup>. The reversible Os<sup>2+</sup>/Os<sup>3+</sup> oxidation process was observed at E<sup>0</sup> = 0.58V against Fe/Fe<sup>+</sup> couple. The formation of the adsorbed molecular film was proved by a linear dependence of the peak current values on the scan rate. Data analysis showed the fundamental importance of meticulous drying processes of all of the used solution components. Even traces of water in the solution caused distortion of obtained



results at a constant temperature. Peak separation at scan rate  $0.1 \text{ V s}^{-1}$  was 13 mV for Os-tripod SAM and 28 mV for mixed SAM. The values higher than zero indicate interactions between the molecules in the adsorbed film<sup>9</sup>. Peak separation is increasing with increasing scan rates due to the influence of the heterogeneous electron-transfer kinetics on the voltammetric response<sup>10,11</sup>.

All of the first curves in cyclic voltammograms of SAMs of **1** and mixed SAMs of **1** and **2** showed more oxidation waves than the subsequent curves. Oxidation peak with a maximum peak current at potential 0.47 V vs. ferrocene obtained for both SAMs was not observed on the following scans. Figure 2 shows representative first and second cyclic voltammogram scans obtained for Os-tripod SAM and mixed SAM. The different shape of the first voltammograms indicates the SAMs stabilization process.<sup>12</sup> Even the careful electrode rinsing by ethanol (removal of possibly physisorbed molecules) and repeated cyclic voltammetry scans at a potential range from  $-0.1$  to  $0.2 \text{ V}$  vs. ferrocene did not suppress the presence of multiple oxidation waves on the very first voltammetry scan. Scanning potential to more positive values leads to the observation of only one redox signal in the adsorbed state.



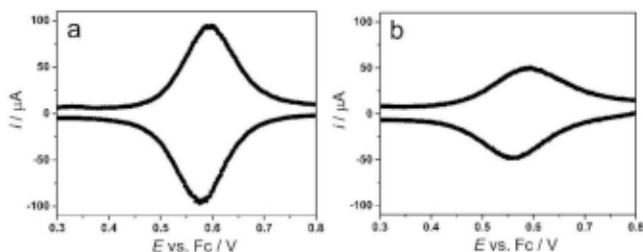
**Fig. 2.** The 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> CV cycles obtained for (a) Os-tripod SAM at scan rate  $0.1 \text{ V s}^{-1}$ ; (b) mixed SAM of Os-tripod and terpy-tripod on gold bead electrode ( $A = 0.215 \text{ cm}^2$ ) in  $0.5 \text{ M TBAPF}_6$  in acetonitrile at scan rate  $0.02 \text{ V s}^{-1}$ .

The surface concentration  $\Gamma$  of adsorbed molecules **1** (in SAM and mixed SAM) was determined from the cyclic voltammograms (Fig. 3) after the baseline subtraction according to the equation

$$\Gamma = \frac{\int i(E)dE}{nFAv}$$

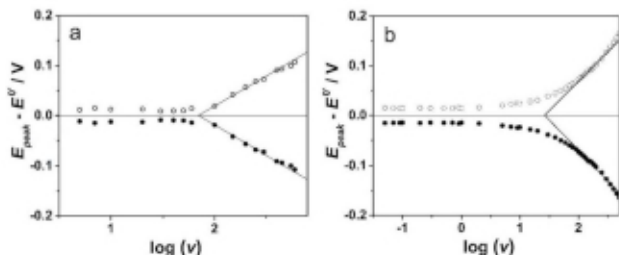
where  $i$  is current,  $E$  is the applied potential,  $n$  is the number of electrons,  $F$  is Faraday constant,  $A$  is the electrode area and  $v$  is the scan rate. Values of the surface concentration  $\Gamma$  obtained from the anodic wave for SAM containing **1** only was  $4.7 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$  (the corresponding area per molecule  $A^{mol} = 3.5 \times 10^{-15} \text{ cm}^2$ ) and  $2.5 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$  ( $A^{mol} = 6.6 \times 10^{-15} \text{ cm}^2$ ) for mixed SAM, respectively. The value corresponds to a diluted form of  $[\text{Os}(\text{terpy})_2]^{2+}$  tripod in the mixed SAM.

The length of the molecules was obtained by the Spartan 08 program. Terpy-tripod molecule has a length of 1.4 nm and Os-tripod molecule 1.9 nm, respectively.



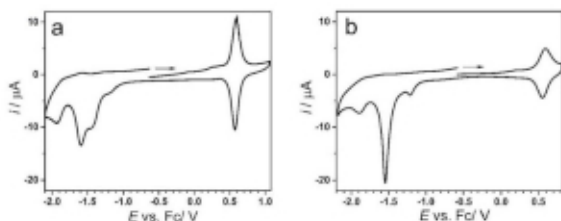
**Fig. 3.** Cyclic voltammetry of (a) Os-tripod SAM; (b) mixed SAM of Os-tripod and terpy-tripod on gold bead electrode ( $A = 0.267 \text{ cm}^2$ ) in  $0.5 \text{ M TBAPF}_6$  in acetonitrile at scan rate  $1 \text{ V s}^{-1}$ .

According to Laviron's analysis<sup>9</sup> the value of electron transfer (ET) rate constant  $k^0$  was calculated based on the equation  $k^0 = \alpha n v F / RT$ , and the characteristic scan rate  $v$  is obtained from the cross-section of fitted lines having a slope of  $+120$  and  $-120 \text{ mV/decade}$  indicating one-electron transfer with  $\alpha = 0.5$  transfer coefficient. ET rate constant  $k^0$  for Os-tripod SAM<sup>13</sup> (see Fig. 4a) was  $(1.36 \pm 0.03) \times 10^3 \text{ s}^{-1}$  and for mixed SAM (see Fig. 4b) was  $(0.52 \pm 0.03) \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ , respectively.



**Fig. 4.** Graph of  $E_{\text{peak}} - E^0$  against the logarithm of scan rate  $v$  in  $\text{V s}^{-1}$  for oxidation (empty circle) and reduction (filled circle) wave of (a) Os-tripod SAM; (b) mixed SAM on gold bead electrode ( $A = 0.267 \text{ cm}^2$ ) in  $0.5 \text{ M TBAPF}_6$  in acetonitrile.

Controlled electrochemical desorption of SAMs from the Au bead electrode surface was done by the application of a negative potential scan in the cyclic voltammetry measurement see Fig. 5. From the integration of the curves in the potential range of SAMs desorption after the baseline subtraction and under the assumption that two electrons are transferred to terpyridine ligands of  $[\text{Os}(\text{terpy})_2]^{2+}$  we can conclude that all three thiolate bonds were ruptured. The oxidation process involving Os(II) transition metal center present in the electroactive SAMs requires one electron transfer. The comparison between charge transferred in the cathodic and anodic sides of the cyclic voltammograms in the Os-tripod SAM and mixed SAMs confirms that molecules were bound to the gold electrode surface by all three thiols.



**Fig. 5.** Controlled electrochemical desorption of (a) Os-tripod SAM; (b) mixed SAM on gold bead electrode in 0.5 M TBAPF<sub>6</sub> in acetonitrile at scan rate 0.1 V s<sup>-1</sup>. The arrows indicate the scan direction.

### Conclusions

We have prepared novel mixed SAMs of [Os(terpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> tripod molecules that contained almost the same ratio of redox-active molecules and diluting electrochemically silent tripod molecules as that which was used for SAM preparation. This observation suggests that the affinity of redox-active and diluent molecules towards the gold electrode surface are almost identical. Under these conditions, we have observed that the electron transfer process slows down with decreasing surface concentration of [Os(terpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> tripod molecules within the non-electroactive matrix.

### Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation (21-13458S).

### References

- Zhou X., Ren A.-M., Feng J.-K.: *J. Organomet. Chem.* **690**, 338 (2005).
- Sauvage J.-P., Collin J.-P., Chambron J.-C., Guillerez S., Coudret Ch., Balzani V., Barigelli F., De Cola L., Flamigni L.: *Chem. Rev.* **94**, 993 (1994).
- Koivisto B. D., Robson K. C. D., Berlinguette C. P.: *Inorg. Chem.* **48**, 9644 (2009).
- Xiang D., Wang X., Jia C., Lee T., Guo X.: *Chem. Rev.* **116**, 4318 (2016).
- Salvatore P., Hansen A. G., Moth-Poulsen K., Bjørnholm T., Nichols R. J., Ulstrup J.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 14394 (2011).
- Kitagawa T., Idomoto Y., Matsuura H., Hobara D., Kakiuchi T., Okazaki T., Komatsu K.: *J. Org. Chem.* **71**, 1362 (2006).
- Sebechlebská T., Šebera J., Kolivoška V., Lindner M., Gasior J., Mészáros G., Valášek M., Mayor M., Hromadová M.: *Elchim. Acta* **258**, 1191 (2017).
- Sakamoto R., Ohirabaru Y., Matsuoka R., Maeda H., Katagiri S., Nishihara H.: *Chem. Commun.* **49**, 7108 (2013).
- Laviron, E.: *J. Electroanal. Chem.* **100**, 263 (1979).
- Bard A. J., Faulkner L. R.: *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York 2001.
- Figgemeier E., Merz L., Hermann B. A., Zimmermann Y. C., Housecroft C. E., Güntherodt H.-J., Constable E. C.: *J. Phys. Chem. B* **107**, 1157 (2003).
- Kocábová J., Vavrek, F., Nováková Lachmanová Š., Šebera J., Valášek M., Hromadová M.: *Molecules* **27**, 8320 (2022).
- Nováková Lachmanová Š., Vavrek F., Sebechlebská T., Kolivoška V., Valášek M., Hromadová M.: *Elchim. Acta* **384**, 138302 (2021).

**Electrochemically Investigated pH-dependent Redox Properties of Copper Complexes of Azamacrocyclic Ligands**  
**(Elektrochemické studium pH závislých redoxních vlastností komplexů mědi s aza-makrocyclickými ligandy)**

Lucie Koláčná<sup>a</sup>, Milan Maňar<sup>b</sup>, Vojtěch Kubiček<sup>b</sup>, and Jiří Ludvík<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular Chemistry, J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Dolejškova 3, 182 00 Prague 8, Czech Republic,  
E-mail: lucie.kolacna@jh-inst.cas.cz

<sup>b</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Inorganic Chemistry, Hlavova 2030, Prague 2, Czech Republic

**Abstract**

Investigated Cu(II) complexes are based on plain or cross-bridged cyclam. The electrochemically inactive cyclam was modified by carboxylate, phosphonate, or phenolate pendant arms. Cu(II) represents the main redox center of the complexes. Modification of the ligand causes a changed pattern of complex redox response in buffered aqueous solution. Irreversible Cu(II) reduction results in complex decomposition to amalgamated copper and ligand in excess. After Cu(0) electrochemical *in situ* re-oxidation, copper and ligand are re-complexed. Complexes undergo isomerization, accelerated by increasing the temperature. The influence of pH on complex isomerization and the reversibility of its reduction was described.

**Keywords:** Cyclam, Cu(II) complexes, Pendant arms, Electrochemical reduction, Polarography, Cyclic voltammetry, Mercury electrodes.

**Úvod**

Molekulární elektronika je progresivní směr moderní materiálové chemie. Zabývá se vývojem elektronických prvků na úrovni jedné molekuly. Nejdůmyslnější molekulární elektroniku najdeme v přírodě v podobě metaloenzymů. Jedním ze směrů výzkumu jejich modelů jsou komplexy různě substituovaných azamacrocyclů. Předností těchto molekul je jejich stabilita a dobře definovaná syntéza<sup>1-5</sup>.

Deriváty azamacrocyclů nacházejí další uplatnění např. v nejrůznějších oborech medicíny, ale také v průmyslu a technologiích. Cyclam (1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan) a jeho deriváty jsou díky termodynamické stabilitě a kinetické inertnosti komplexů vhodné pro komplexaci přechodných kovů I. řady. Komplexy derivátů cyclamu jsou využívány pro simulaci aktivních center enzymů, jako senzory i katalyzátory. Komplexy radioisotopů mědi mohou sloužit pro nejrůznější medicínské aplikace – <sup>67</sup>Cu pro terapeutické využití, <sup>64</sup>Cu v diagnostických zobrazovacích metodách (pozitronová emisní tomografie, jednofotonová emisní výpočetní tomografie), <sup>64</sup>Cu a <sup>62</sup>Cu pro diagnostické zobrazovací metody (pozitronová emisní tomografie). Naše studie se zabývá komplexy stabilních isotopů <sup>63</sup>Cu, <sup>65</sup>Cu, které slouží především jako modelové molekuly a systémy.

Cílem naší práce bylo studium komplexace, zjištění vztahu mezi substitucí ligandů, strukturou komplexu a redoxními vlastnostmi cyclamových koordinačních sloučenin při různých hodnotách pH a současně vyhodnocení intramolekulární komunikace mezi centrálním kovem a periferními skupinami. Proto byla syntetizována řada ligandů s pendantními rameny nesoucími různé substituenty. Soustředili jsme se na azamacrocycly s nemodifikovaným cyclamem, jehož deriváty nesly na atomech dusíku pendantní ramena s karboxylátem, fosfonátem a fenolátem, a na cyclam nesoucím v cyklu ethylenové „přemostění“, tzv. cross bridged, cb-cyclam. Redukční

vlastnosti byly sledovány ve vodném prostředí o různém pH na rtuťových elektrodách. Vyhodnocení redukčních potenciálů a jejich interpretace umožnily určení vlivu substitucí, teploty i pH na celkové redoxní vlastnosti molekul.

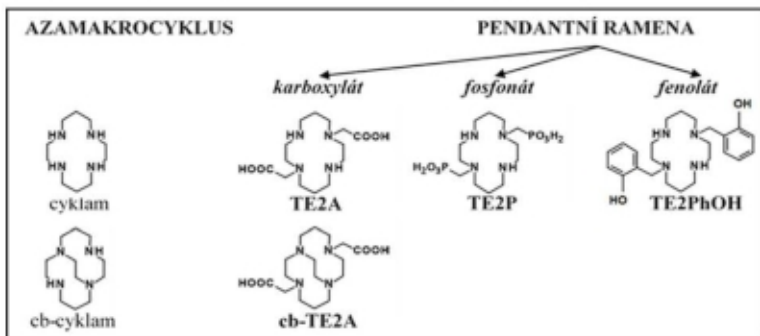
### Experimentální část

Všechna měření byla provedena v tříelektrodeovém uspořádání v nedělené elektrochemické cele ve vodném prostředí. Koncentrace studovaných látek byla přibližně  $3 \cdot 10^{-4}$  M, jako základní elektrolyt byl použit Britton-Robinsonův pufr. Pracovní elektrody byly rtuťové – kapající elektroda s dobou kapky 1 s a rychlostí polarizace  $10 \text{ mV s}^{-1}$  pro DC polarografii (DC-P) a visící rtuťová kapka (80 ms) jako stacionární elektroda (HMDE) s rychlostní polarizace  $0,05\text{--}1 \text{ V s}^{-1}$  pro CV. Referenční elektrodou byla standardní kalomelová elektroda (SCE) oddělená solným můstkem obsahující Britton-Robinsonův pufr, pomocnou elektrodou platinový plíšek. Pro DC-P byl použit analogový potenciostat PA4 a XY zapisovač 4106 (Laboratorní přístroje Praha, ČR). CV na HMDE byla měřena pomocí SMDE 1 (Laboratorní přístroje Praha, ČR). Měření CV byla řízena potenciostatem Autolab PGSTAT101 (Metrohm, Švýcarsko) a softwarem Nova 1.11. Kyslík byl ze vzorků odstraněn probubláváním argonem. Komplexace probíhala v poměru měď:ligand 1:2 ( $3 \cdot 10^{-3}$  resp.  $6 \cdot 10^{-3}$  M) ve vodném prostředí pH 5 při laboratorní teplotě přes noc. Studie závislosti elektrochemického chování na pH probíhaly v Britton-Robinsonově pufru v celém rozsahu pH a v celém rozsahu potenciálů. Zahříváním vzorků na  $90^\circ \text{C}$  byla indukována isomerace. pH závislost redoxního chování vysokoteplotního isomeru byla sledována v celém rozsahu pH, časová závislost byla monitorována při pH 6,64.

### Výsledky a diskuse

Redukce molekul byla studována ve vodném prostředí Britton-Robinsonova pufru v celém rozsahu pH na rtuťových elektrodách – pomocí DC-P a CV na HMDE.

Studované látky (Obr. 2) obsahovaly azamakrocyclický ligand s koordinovaným měďnatým kationtem. Jako ligand byly použity nemoďifikovaný cyklam nebo cb-cykلام s „přemostněním“ cyklu, pendantní ramena obsahovala karboxylát, fosfonát nebo fenolát.



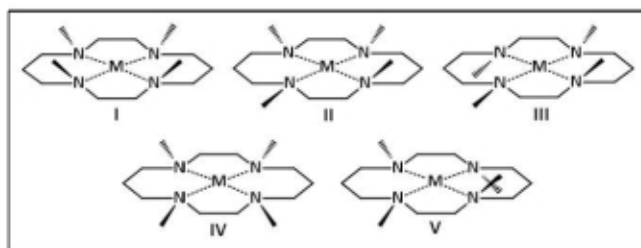
Obr. 1. Studované ligandy – deriváty cykلامu.

Komplexace probíhala přes noc při laboratorní teplotě ve vodě při pH 5 v poměru kov:ligand 1:2, výsledná koncentrace komplexu v roztoku byla  $3 \cdot 10^{-3}$  M. Pro studium elektrochemických vlastností byly připravené komplexy ředěny  $10\times$  příslušným pufrům.

Samotné ligandy jsou elektrochemicky neaktivní, dochází pouze k posunu potenciálu redukčního rozkladu elektrolytu k méně záporným hodnotám. Hlavním redukčním centrem studovaných molekul je kov –  $\text{Cu}^{2+}$  iont. Redukce komplexu je díky jeho stabilizaci silnou vazbou ligandu výrazně posunuta k negativnějším potenciálům vůči redoxnímu potenciálu volného měďnatého kationtu. Ireversibilní dvouelektronová redukce vyústí v rozpad komplexu na  $\text{Cu}^0$  a výchozí ligand, v průběhu zpětného scanu na CV pak dochází k re-oxidaci amalgamované  $\text{Cu}^0$  na  $\text{Cu}^{2+}$  (patrný katodický peak). Vzhledem k tomu, že komplexace probíhala v nadbytku ligandu, umožňuje regenerace mědi na  $\text{Cu}^{2+}$  opětovnou tvorbu komplexu.

Komplexy azamacrocyklů vytvářejí několik isomerních forem (Obr. 2<sup>5</sup>), které se liší vzájemnou orientací substituentů na atomech dusíku cyklamu a vzájemnou orientací dvou koordinovaných pendantních ramen nebo dalších dvou ligandů koordinovaných v neobsazených pozicích koordinačního polyhedronu (*cis* nebo *trans*)<sup>6, 7</sup>. V případě koordinované mědi se vyskytují tři isomery – pentakoordinovaný (isomer V), pentakoordinovaný *cis* (isomer I) a hexakoordinovaný *trans* (isomer III), které se vzájemně přeměňují v závislosti na teplotě a pH.

Se zvyšujícím se pH se redukční potenciály posouvají v souladu s posunem potenciálu redukčního rozkladu elektrolytu směrem k negativnějším hodnotám.



Obr. 2. Schematické znázornění isomerů komplexů cyklamu<sup>5</sup>.

#### $\text{Cu}^{2+}$ -TE2A

V kyselém pH (do pH 3) převažuje jedna isomerní forma s nejnižším redukčním potenciálem (I nebo V), v méně kyselých a alkalických oblastech se k té první isomerní formě přidá ještě druhá s potenciály posunutými vůči sobě o ~60 mV. Zahříváním připraveného komplexu ve vodném roztoku při pH 5 na 90 °C dochází k další isomeraci. Podíl isomerů I a V ve vzorku se postupně snižuje a komplex přechází na stabilní isomerní formu III (hexa *trans* konformace) s redukčním potenciálem přibližně o 200 mV zápornějším (v závislosti na pH se potenciál pohyboval v rozmezí od -0,62 V do -0,94 V). Po třech dnech zahřívání bylo detekováno zanedbatelné množství původních forem. Naopak, stopy stabilní isomerní formy III byly ve vzorku v zanedbatelném množství přítomné již po skončení komplexace. Redukce všech isomerních forem probíhá v celém rozsahu pH ireversibilně: dochází zde k redukci  $\text{Cu}^{2+}$  na kov, který se amalgamuje na rtuť, a tím i k rozpadu komplexu za uvolnění mědi a ligandu.

#### $\text{Cu}^{2+}$ -TE2PhOH

Také tento komplex se vyskytuje ihned po komplexaci ve dvou isomerních formách. V kyselých oblastech pH dominuje isomer s nižším redukčním potenciálem (I nebo V). Od

pH 5,55 přibude druhý signál – ve vzorku jsou přítomné oba isomery. V neutrálním pH jsou na CV patrné dva oddělené peaky (formy I a V) s rozdílem potenciálů  $\sim 60$  mV. V alkalické oblasti pak převládá forma se zápornějším redukčním potenciálem. Při zahřívání připraveného vodného roztoku komplexu při pH 5 na teplotu  $90^\circ\text{C}$  dochází ke kompletní přeměně na isomer III s redukčním potenciálem posunutým o 100 mV k zápornějším hodnotám již po jednom dni. Stopy této isomerní formy jsou ve vzorku v zanedbatelném množství detekovatelné především v kyselém prostředí již po skončení komplexace. Také u této látky vyústí dvouelektronová ireversibilní redukce všech isomerů v celém rozsahu pH k rozpadu komplexu.

#### **Cu<sup>2+</sup>-TE2P**

V celém rozsahu pH je po komplexaci přítomna pouze jedna isomerní forma (I). Zahříváním připraveného vodného roztoku při pH 5 na  $90^\circ\text{C}$  komplex postupně přechází na isomerní formu III s redukčním potenciálem o 150–200 mV zápornějším (v závislosti na pH v rozmezí od  $-0,58$  V do  $-1,06$  V). Po třech dnech byly detekovány pouze stopy původního isomeru. Stopy isomerní formy III nejsou ve vzorku přítomné po skončení komplexace. Redukce žádného z isomerů nevykazuje v celém rozsahu pH známky reversibility; i tady dochází k redukčnímu rozpadu komplexu na ligand a měď.

#### **Cu<sup>2+</sup>-cbTE2A**

V celém rozsahu pH byla přítomna jedna isomerní forma. Do pH 8 probíhá redukce zcela ireversibilně, dochází tedy k reduktivnímu rozpadu komplexu na ligand, který je v roztoku v nadbytku, a na volnou měď. Při vyšších hodnotách pH redukce přechází na semi-reversibilní a od pH 9 pak na jednoelektronovou reversibilní redukci s rozdílem potenciálů katodického a anodického peaku CV  $\sim 70$  mV. Je zřejmé, že při těchto hodnotách pH nedochází k rozpadu komplexu spojenému s uvolněním a amalgamací mědi, ale ke změně komplexu Cu<sup>2+</sup> na komplex Cu<sup>+</sup>. Zahříváním připraveného vodného roztoku komplexu při pH 5 na  $90^\circ\text{C}$  nedochází k žádným přeměnám forem komplexu. Komplex se tedy vyskytuje pouze v jedné stabilní isomerní formě – V stabilizované od začátku již zmíněným přeměněním.

#### **Závěr**

V naší studii jsme se zabývali komplexy dvojmočné mědi s azamakrocyclickými ligandy – cyklamem nebo cb-cyklamem, substituovanými rameny obsahujícími karboxylát, fosfonát nebo fenolát. Samotné ligandy jsou elektrochemicky neaktivní. Měďnatý kationt je hlavním redukčním centrem všech studovaných komplexů. Redukce komplexu je díky stabilizaci měďnatého kationtu silnou vazbou ligandu výrazně posunuta k negativnějším potenciálům vůči redoxnímu potenciálu volného měďnatého kationtu. Ireversibilní dvouelektronová redukce mědi vyústí v rozpad komplexu na Cu<sup>0</sup> a nezměněný ligand. Po *in-situ* elektrochemické re-oxidaci amalgamované mědi na Cu<sup>2+</sup> dochází v nadbytku ligandu k opětovné tvorbě komplexu. Modifikace ligandů způsobuje rozdílné elektrochemické chování komplexů. Byl prokázán vliv acidobazické rovnováhy na isomerci a redukční chování komplexů. Se zvyšujícím se pH se redukční potenciály v souladu s posunem potenciálu reduktivního rozkladu elektrolytu systematicky posouvají směrem k negativnějším hodnotám. Elektrochemická redukce také umožňuje detekci různých isomerů komplexů (forma I, III a V) a monitorování průběhu isomerace. V dalším výzkumu se zaměříme především na identifikaci isomerních forem I a V a korelaci strukturních a elektrochemických dat.

#### **Acknowledgments**

This research has been supported by the Czech Science Foundation project (GAČR) GA21-23261S and institutional support RVO 61388955.

## References

1. Awais M. A., Cai Z. X., Zhang N., Yu L. P.: *Chem. Eur. J.* *24*, 17180 (2018).
2. Mathew P. T., Fang F. Z.: *Engineering* *4*, 760 (2018).
3. Lukes I., Kotek J., Vojtisek P., Hermann P.: *Coord. Chem. Rev.* *216*, 287 (2001).
4. Kotek J., Lubal P., Hermann P., Cisarova I., Lukes I., Godula T., Svobodova I., Taborsky P., Havel J.: *Chem. Eur. J.* *9*, 233 (2003).
5. Mad'ar M., Kolacna L., Koucky F., Havlickova J., Kuchar J., Kotek J., Kubicek V., Ludvik J., Hermann P.: *J. Organomet. Chem.* *989* (2023).
6. Bosnich B., Poon C. K., Tobe M. L.: *Inorg. Chem.* *4*, 1102 (1965).
7. Meyer M., Dahaoui-Gindrey V., Lecomte C., Guillard L.: *Coord. Chem. Rev.* *178*, 1313 (1998).



## The Use of Capillary Electrophoresis for the Control of Industrial Mixtures (Využití kapilární elektroforézy pro kontrolu průmyslových směsí)

Anna Kubišková, Alice Tomníková, Dominik Smrž, and Tomáš Křížek  
Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 6,  
128 00 Prague 2, Czech Republic; E-mail: anna.kubickova@natur.cuni.cz

### Abstract

The determination of corrosion inhibitors in coolants presents a difficult analytical problem due to their different physicochemical properties. Currently, several instrumental techniques are required for their determination. The main objective of this work was to develop methods for the determination of these substances using a single instrumental technique. Capillary zone electrophoresis was selected as a suitable technique and four methods were developed for the determination of four different groups of corrosion inhibitors.

**Keywords:** Electrophoresis, Engine coolants, Carboxylic acids, Ethanolamine.

### Úvod

Mnoho průmyslových a stavebních činností vyžaduje kvalitní systém odvodu tepla. K tomuto účelu slouží nemrznoucí směsí s teplosměnnými vlastnostmi. Jedná se o směsí ethylenglykolu a/nebo propylenglykolu s vodou, které obsahují další nutné komponenty jako např. inhibitory koroze, odpěňovač, zhořčující látku bitrex®, látky regulující pH atd. Jejich přesné složení je vždy přizpůsobené specifickému použití nemrznoucí směsí. V současnosti používané inhibitory koroze lze rozdělit do několika kategorií - anorganické anionty (dusitany, dusičnany, fosforečnany a molybdenany), karboxylové a dikarboxylové kyseliny s délkou uhlíkatého řetězce C6-C12, aryltriazoly (tolyltriazol, benzotriazol, merkaptobenzotriazol) a aminy (mono-, di-, triethanolamin). Složení nemrznoucí směsí, včetně typů a koncentrací jednotlivých inhibitorů koroze, je zásadní pro její správnou použitelnost a musí být kontrolováno.

Jednotlivé typy inhibitorů koroze se od sebe zásadně liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, a proto byla doposud pro jejich stanovení používána celá řada instrumentálních metod (plynová chromatografie, kapalinová chromatografie, iontově-výměnná chromatografie, atomová absorpční spektrometrie, spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem)<sup>1-3</sup>.

Cílem této práce bylo stanovení různých typů inhibitorů koroze a příbuzných sloučenin jedinou instrumentální technikou. Kapilární elektroforéza (CE) byla zvolena, protože poskytuje rychlou separaci nabitých analytů, je nenáročná na přípravu vzorku a vyznačuje se malou spotřebou vzorku i dalších provozních kapalin. CE již byla použita pro analýzu inhibitorů koroze mědi na bázi aminů<sup>4</sup>. Dále je v literatuře zmíněno elektroforetické stanovení některých sloučenin používaných jako inhibitory koroze, ale v jiných než glykolových maticích. Jedná se např. o analýzu etanolaminů v plastech a vodě<sup>5</sup> nebo stanovení karboxylových kyselin používaných jako inhibitory koroze v pokovovacích lázních, v biologických maticích a ve vzorcích aerosolů<sup>6-8</sup>.

### Experimentální část

Veškeré experimenty probíhaly na kapilární elektroforéze 7100 CE System (Agilent Technologies, Německo) s nepokrytou křemennou kapilárou o vnitřním průměru 50 μm a spektrometrickým detektorem.

Stanovení anorganických inhibitorů koroze probíhalo v kapiláře délky 80 (71,5) cm, separační napětí bylo -20 kV, dávkování probíhalo elektrokineticky napětím -5 kV po dobu 10 s. Základní elektrolyt se skládal z 10 mM chromanu sodného, 0,5 mM cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB) a 5mM kyseliny N-cyclohexyl-2-aminoethansulfonové (CHES). Hodnota pH byla upravena 1M hydroxidem sodným na 9,0. Anorganické inhibitory byly detekovány nepřímo při vlnové délce 450 nm (ref. 375 nm).

Stanovení organických inhibitorů probíhalo v kapiláře délky 50 (41,5) cm, separační napětí bylo -25 kV, dávkování probíhalo elektrokineticky napětím -5 kV po dobu 20 s. Základní elektrolyt se skládal z 20mM kyseliny 2,6-pyridindikarboxylová (PDC), 0,5 mM cetyltrimethylamonium chloridu (CTAC). Hodnota pH byla upravena 1M hydroxidem sodným na 7,2. Organické inhibitory byly detekovány nepřímo při vlnové délce 350 nm (ref. 254 nm).

Stanovení aryltriazolů probíhalo v kapiláře délky 50 (41,5) cm, separační napětí bylo 30 kV, dávkování probíhalo hydrodynamicky tlakem 5 mbar po dobu 10 s. Základní elektrolyt se skládal z 10mM tetraboritanu sodného. Hodnota pH byla upravena 1M hydroxidem sodným na 9,0. Aryltriazoly byly detekovány při vlnové délce 210 nm.

Stanovení ethanolaminů probíhalo v kapiláře délky 50 (41,5) cm, separační napětí bylo 30 kV, dávkování probíhalo hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 15 s. Základní elektrolyt se skládal z 60mM kyseliny octové a 30mM histidinu. Hodnota pH byla upravena 1M hydroxidem sodným na 4,6. Ethanolaminy byly detekovány nepřímo při vlnové délce 225 nm (ref. 375nm).

Vzorky chladicích kapalin byly před měřením 10x resp. 100x naředěny deionizovanou vodou v závislosti na očekávaném obsahu analytů. Poté byly přefiltrovány přes stříkačkový filtr Puradise FP 30 o velikosti pórů 0,2  $\mu\text{m}$ . Ke všem vzorkům byl před analýzou přidán jako marker elektroosmotického toku roztok thiomocoviny o koncentraci 1  $\text{g dm}^{-3}$  v poměru 9:1 vzorku ku markeru.

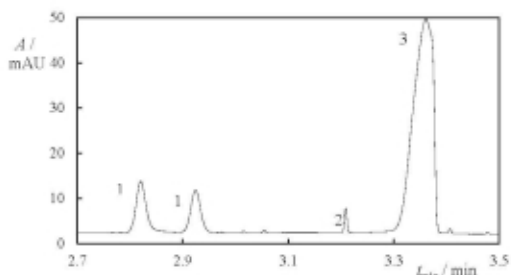
### Výsledky a diskuse

V rámci této práce byly vyvíjeny a optimalizovány celkem čtyři elektroforetické metody stanovení inhibitorů koroze běžně se vyskytující v nemrznoucích směsích. Vyvinuté metody jsou vhodné jak pro stanovení směsí inhibitorů koroze, tak pro jejich stanovení v chladicích kapalinách běžně dostupných na trhu.

Vzhledem k rozdílné fyzikálně-chemické povaze jednotlivých skupin inhibitorů koroze bylo třeba vždy zvolit vhodnou strategii pro dosažení účinné separace a dostatečně citlivé detekce analytů. V případě anorganických aniontů a aniontů organických kyselin bylo třeba do základního elektrolytu přidat látku obracející elektroosmotický tok (CTAB, CTAC). Pro dosažení citlivé a robustní detekce bylo třeba provádět detekci nepřímo. Pro zjednodušení celého procesu byla silně absorbující látka vždy přidána již do základního elektrolytu (chroman sodný, kyselina 2,6-pyridindikarboxylová, histidin).

Všechny čtyři vyvinuté metody poskytují spolehlivé výsledky. Limit detekce se pro všech osmnáct testovaných inhibitorů koroze pohybuje kolem 1 ppm, tedy pod běžnými koncentracemi inhibitorů v komerčních chladicích kapalinách. Relativní směrodatné odchylky elektroforetických mobilít jednotlivých analytů se pohybovaly od 0,4 % do 1,0 %, relativní směrodatná odchylka plochy piku pak od 2,0 % do 3,0 %. Lineární dynamický rozsah stanovení je 5,00 až 500 ppm pro všechny analyzované inhibitory koroze.

Výtěžnost metod byla určena pomocí komerčně dostupných chladicích kapalin (Fridex Stabil, Fridex Eko a CS Antifreeze G12+), do kterých bylo přidáno známé množství analytů (viz ukázkový elektroferogram je na Obr. 1). Její hodnota se pohybovala mezi 90 a 110 %. Pomocí těchto vzorků byl navíc otestován vliv matrice na separaci analytů. Bylo prokázáno, že přítomnost matrice má na separaci jen minimální vliv.



**Obr. 1.** Elektroferogram nemrznoucí směsi Fridex Stabil s přidavkem 125 ppm merkaptobenzothiazolu. Popis píků: 1 – tolyltriazol, 2 – benzotriazol, 3 – merkaptobenzotriazol.

### Závěr

Kapilární elektroforéza je ideální instrumentální technikou, která umožní stanovit širokou škálu inhibitorů koroze přítomných v nemrznoucích směsích. Byly vyvinuty čtyři metody stanovení jednotlivých skupin inhibitorů koroze. Vyvinuté metody byly validovány a následně byla ověřena vhodnost metod pro stanovení inhibitorů koroze i v reálných vzorcích chladicích kapalin. Limity detekce všech 18 stanovovaných látek se pohybovaly kolem 1 ppm s chybou stanovení do 3% (vyjádřeno jako relativní směrodatná odchylka plochy píků).

### Acknowledgments

This research has been supported by Czech Technological Agency (projects TJ01000170 and TJ04000540).

### References

1. Jemal M., Ouyang Z.: *J. Chromatogr. B* 709, 233 (1998).
2. Smrč D.: *Bachelor Thesis*. Charles University, Prague 2017.
3. McNeill K. S., Cancilla D. A.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 265 (2009).
4. Chen C. C., Lin C. E.: *Anal. Chim. Acta* 321, 215 (1996).
5. Pereira P. A., Tavares M. F. M.: *J. Chromatogr. A* 1051, 303 (2004).
6. Taraba L., Křížek T., Kubičková A., Coufal P.: *J. Sep. Sci.* 38, 4255 (2015).
7. Hodek O., Křížek T.: *Anal. Methods* 11, 4575 (2019).
8. Adler H., Sirén H.: *J. Anal. Met. Chem.* 2014, 498168 (2014).

## Voltammetric Detection of Monoamine Neurotransmitters in a Neurobasal Medium

Anton Lytvynenko<sup>a</sup>, Simona Baluchová<sup>a</sup>, Jan Krůšek<sup>b</sup>, and Karolina Schwarzová-Pecková<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 6, 128 00 Prague 2, Czech Republic. E-mail: lytvynecan@natur.cuni.cz

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

### Abstract

The possibility of electroanalytical detection of important neurotransmitters – dopamine and serotonin – in a neuron cultivation medium on boron-doped diamond electrodes was studied and confirmed. The presence of both analytes manifested as a peak on a differential pulse voltammogram within +300 – +450 mV vs. Ag/AgCl reference electrode. Limits of detection as low as 0.2 and 2.0  $\mu\text{M}$  for serotonin and dopamine, respectively, were achieved. The performance of oxidized and polished electrode surfaces was compared. Mechanical polishing resulted in *ca.* twofold lower limits of detection, but lower reproducibility of measurements at higher concentrations.

**Keywords:** Electroanalysis, Boron-doped diamond, Neurotransmitters, Dopamine, Serotonin, Neuron cultivation medium, Surface state, Fouling.

### Introduction

Dopamine and serotonin (5-hydroxytryptamine), hereinafter referred as DA and 5-HT, respectively, belong to a family of important neurotransmitters necessary for the functioning of the nerve system of humans and animals. Issues in their metabolism are associated with several serious illnesses like schizophrenia, depression, Parkinson's disease, *etc.*, which significantly impair human life<sup>1</sup>. Therefore, the development of methods to determine the concentration of these neurotransmitters in biological media, preferably *in situ*, could potentially assist in the diagnosis, understanding, and treatment of the disorders associated with their improper functioning.

Electrochemistry is promising for the elaboration of cheap and simple analytical procedures and the corresponding devices for the determination of various redox-active analytes, especially point-of-care and wearable devices as well as the ones operating *in situ* and *in vivo*. In turn, the analytical performance of the procedure is typically primarily dependent on the characteristics of the working electrode. Boron-doped diamond (BDD) is especially attractive for electroanalysis for its combination of specific properties: wide electrochemical window, low capacitive currents, and high fouling resistance<sup>2-4</sup>. The latter is especially crucial for the determination of organic analytes, which often undergo irreversible redox transformations (thus fouling the surface with their products), as well as for use in biological media (able to foul the surface with its components, especially macromolecular ones). Nevertheless, even the electrodes with high fouling resistance require the development of procedures for the regeneration of the surface state to ensure reproducible results.

Each carbon atom within BDD is connected to four other ones, forming a diamond crystal structure. For superficial atoms, one or more surrounding ones are missing; therefore, the corresponding vacancies are filled with other atoms or functional groups completing the total valence of carbon. The nature of these terminal groups is dependent on the history of the surface and imposes a severe impact on its electrochemical properties<sup>4,5</sup>. While the as-synthesized surface is terminated by hydrogen atoms, aerial and electrochemical oxidation (both

spontaneous and intentional) leads to the introduction of various oxygen-containing groups ( $-\text{OH}$ ,  $>\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{O}-$ , etc.). On polished surfaces, the presence of oxygen-containing functionalities was found as well, but in lower quantities and predominantly in the form of  $-\text{OH}$  groups (therefore corresponding to a "less oxidized" surface)<sup>6</sup>. "More oxidized" surfaces are associated with higher hydrophilicity and more sluggish electron transfer kinetics. Except for possible differences in the affinity of the surface to various analytes, hydrophilicity contributes to the improvement of biocompatibility of BDD electrodes, facilitating their potential employment *in vivo*. Intentional electrochemical oxidation and polishing constitute two relatively convenient ways to remove fouling layers from the BDD electrodes after measurements and return the surface to some predefined state.

This work aimed at the development of an electroanalytical procedure for the detection of DA and 5-HT in Neurobasal, a medium for the cultivation of neural cells, employing BDD electrodes, as well as elucidation of the influence of the BDD surface state on its electroanalytical performance in such procedure.

### Experimental

All reagents and materials were commercially available (Sigma-Aldrich, Lach-Ner) and used without further purification. Neurobasal™ neuron cultivation medium was purchased from ThermoFischer Scientific. Millipore Milli-Q water (18.2 M $\Omega$  cm) was used for the preparation of all aqueous solutions. Solutions of DA and 5-HT were stored in dark flasks in a fridge and discarded no later than after 3 days of storage. Dry powders of dopamine hydrochloride and serotonin hydrochloride, as well as Neurobasal, were stored in a fridge as well.

Autolab PGSTAT302N instrument (Metrohm, Switzerland) was employed for electrochemical experiments (cyclic voltammetry, CV; differential pulse voltammetry, DPV) together with 3-electrode cell (Pt wire as the counter electrode, Ag/AgCl in 3 M KCl as the reference electrode). A 3 mm BDD disk electrode (BioLogic SAS, France) with a 500–1000 ppm doping level was taken as the working electrode.

Two surface states of the BDD electrodes were considered: "oxidized" (o-BDD) and polished (p-BDD). For o-BDD, the electrode surface was initially conditioned by applying +2400 mV for 5 min in 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, the procedure was repeated until constant  $\Delta E_p$  (285 mV) of the  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  redox reaction (a redox-marker, which is surface-sensitive for BDD) on cyclic voltammograms had been reached. Before each measurement, the o-BDD surface was re-activated *in situ* by applying +2400 mV for 30 s (followed by stirring the solution for 1 min). For p-BDD, fifty "8"-shaped movements of an electrode slightly pressed into a polishing pad wet with alumina slurry were performed as a basic activation procedure (followed by stirring the solution for 1 min after re-immersion of the electrode); for initial conditioning, it was repeated a few times until constant  $\Delta E_p$  (75 mV) of the  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  redox reaction had been reached.

The measurements were conducted in series. First, for each concentration, a neat Neurobasal was measured twice to condition the electrode and check the reproducibility of its performance. After that, the analyte was added to the desired concentration as an aqueous  $2 \cdot 10^{-3}$  M solution (eventually more diluted to reach the lowest concentrations) and measured a few (3–7) times (*vide infra*). The limit of detection ( $LoD$ ) and limit of quantification ( $LoQ$ ) were calculated from the slope ( $a$ ) and the standard deviation of intercept ( $SD_b$ ) of the linear regression of the calibration curve ( $I_{av} = ac + b$ ) as  $LoD = 3SD_b/a$  and  $LoQ = 10SD_b/a$ , respectively.

## Results and discussion

Neurobasal is a complex, commercially available medium (existing in a few slightly differing formulations) with pH = 7.3 consisting of dozens of components (amino-acids, inorganic salts, vitamins, buffer compounds, *etc.*), while at least 8 of them are redox-active within the potential range available on BDD electrodes (5 amino-acids, 2 vitamins, and HEPES). Nevertheless, within the potential range 300–450 mV, where the peaks corresponding to the oxidation of DA and 5-HT in Neurobasal appear, no notable redox processes associated with Neurobasal itself are observed (Fig. 1). This enables the detection of both analytes on both types of the pretreated BDD surfaces.

The DPV curves were measured for DA and 5-HT in concentrations 1.0–100.0 and 0.1–100.0  $\mu\text{M}$ , respectively (Table I). At the lowest measured concentrations, the peaks (shoulders) on the curves which could be assigned to the presence of the analytes were either not recognizable (for o-BDD) or barely visible (for p-BDD).

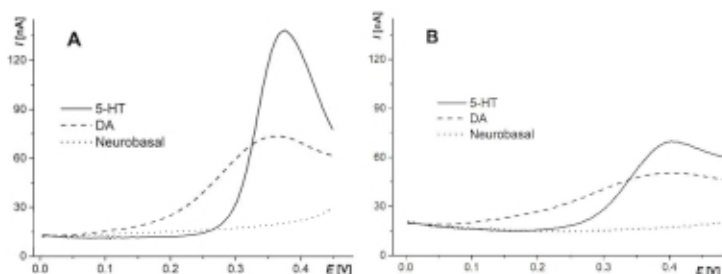


Fig. 1. Differential pulse voltammograms of  $6 \cdot 10^{-6}$  M DA and 5-HT in Neurobasal as a supporting electrolyte as well as neat Neurobasal on (A) p-BDD and (B) o-BDD.

Table I.

Parameters of electroanalytical evaluation of DA and 5-HT on BDD electrode surfaces.

Parameter	DA, o-BDD	DA, p-BDD	5-HT, o-BDD	5-HT, p-BDD
The lowest measured concentration, $\mu\text{M}$	1.0	1.0	0.1	0.1
$RSD(i_p)$ range, %	0.30–1.44	1.53–5.46	0.60–3.18	0.73–13.67
$LoD$ , $\mu\text{M}$	4.0	1.9	0.4	0.2
$LoQ$ , $\mu\text{M}$	13.3	6.3	1.3	0.6
Upper limit of LDR, $\mu\text{M}$	60.0	80.0	10.0	8.0

Repeatability of the peak currents values ( $i_p$ ) obtained from a few (3–7) consequent measurements of the same analyte solutions was evaluated throughout the considered concentration ranges. No systematic changes in the DPV curves are observed in any system except DA on p-BDD, where an additional peak at *ca.* 80 mV emerges and rises upon consequent scanning (accompanied by some decay of the “main” DA oxidation peak). It should be noted that no such effect is observed if phosphate buffer (pH 7.0) instead of Neurobasal is used as the medium. Therefore, the emergence of such a peak could be caused by some specific interactions of Neurobasal components, DA, and the polished surface or the remnants of the polishing medium (alumina). Technically, this limits the number of useful repetitive

measurements in this system to three. The values of the relative standard deviations (*RSD*) of  $i_p$  are listed in Table I. Poorer repeatability in the case of 5-HT could indicate its stronger ability to foul the surface<sup>3</sup>. In the case of the o-BDD, the highest standard deviations are observed at low concentrations, where the values of  $i_p$  are the lowest (therefore, small current deviations caused by noise and by processes result in higher RSD values). In the case of p-BDD, the standard deviations are generally higher than on o-BDD, and the highest ones are observed at high concentrations. This could be caused by the lower surface restoration efficiency of the manual polishing compared to the oxidative treatment (as it is more complicated to ensure even treatment of the entire surface) leading to less reproducible results (more pronounced at higher concentrations, where fouling is more severe). Lower  $i_p$  values at the same analyte concentration are typically associated with more positive peak potentials, which evidences in favor of differences in the charge transfer rate as the origin of the deviations.

On p-BDD,  $i_p$  values at the same concentrations of the analytes are on average ca. 2 times higher than on o-BDD, and simultaneously sharper (have a smaller width at a given percent of  $i_p$ ). This can be caused by more sluggish kinetics of interfacial electron transfer on o-BDD surfaces, similarly to the previously reported results<sup>4</sup>. Similarly, LoD values on p-BDD are ca. 2 times lower than on o-BDD (Table I). Moreover, on the p-BDD all potentials are slightly shifted (by dozens of millivolts) toward less positive potentials. The values of  $i_p$  of 5-HT are on average ca. 2 times higher than for DA at the same concentrations. However, the LoD values for 5-HT are ca. 10 times lower than the corresponding ones for DA; such discrepancy could be caused by better-shaped 5-HT peaks facilitating their recognition and precise  $i_p$  evaluation. On the contrary, the upper limit of the linear dynamic range (LDR) for 5-HT is at least 6 times lower than for DA (which, again, could be caused by more severe fouling of the surface by oxidation products of 5-HT) and, quite surprisingly, is almost unaffected by the activation method (Table I).

### Conclusions

The possibility of electrochemical detection of DA and 5-HT in a neuron cultivation medium employing BDD electrodes and differential pulse voltammetry is shown. The system is an order of magnitude more sensitive to serotonin (the lowest achieved LoD is 0.2 vs 2.0  $\mu\text{M}$  for dopamine, both values were obtained on p-BDD). However, serotonin causes more severe electrode fouling at higher concentrations. Mechanical polishing as the method of the electrode surface re-activation allows for achieving 2 times lower LoD values compared to electrochemical oxidation, which could be explained by faster electron transfer on the polished surface and, therefore, sharper peaks with higher peak currents. On the contrary, oxidative treatment results in higher repeatability of the voltammetric curves (especially at higher concentrations), which could be caused by poorer reproducibility of the manual polishing. Nevertheless, the choice of the re-activation method did not notably change the upper limit of the linear dynamic range.

### Acknowledgments

The authors thank Ms. A. Eremina (Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry) for performing auxiliary electrochemical measurements. A. L. acknowledges the support of JUNIOR Fund of Charles University partially covering his research stay at Charles University. The authors acknowledge the support of the Czech Science Foundation (project GAČR 20-03187S).

## References

1. Nakamura S.: *Front. Biosci. (Schol Ed)*, *14*, 4 (2022).
2. Yang N., Yu S., Macpherson J. V., Einaga Y., Zhao H., Zhao G., Swain G. M., Jiang X.: *Chem. Soc. Rev.* *48*, 157 (2019).
3. Yu S., Liu S., Jiang X., Yang N.: *Carbon*, *200*, 517 (2022).
4. Baluchová S., Daňhel A., Dejmková H., Ostatná V., Fojta M., Schwarzová-Pecková K.: *Anal. Chim. Acta* *1077*, 30 (2019).
5. Lourenco B. C., Brocenschi R. F., Medeiros R. A., Fatibello-Filho O., Rocha-Filho R. C.: *ChemElectroChem* *7*, 1291 (2020).
6. Hutton L. A., Iacobini J. G., Bitziou E., Channon R. B., Newton M. E., Macpherson J. V.: *Anal. Chem.* *85*, 7230 (2013).
7. Göell A. G., Meadows K. E., Unwin P. R., Macpherson J. V., *Phys. Chem. Chem. Phys.* *12*, 10108 (2010).



## A Polarizable Reference Electrode

Vladimír Mareček

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

### Abstract

New concept of a reference electrode for electrochemical systems resolves a problem of a poor potential stability of reference electrodes based on the distribution of a strongly hydrophobic common cation between two immiscible electrolyte solutions (ITIES). The use of a polarizable metal electrode instead of a classical reference electrode is demonstrated in a modified conventional four-electrode cell with ITIES. A simple battery operated potentiostat controls the working electrode potential in a three-electrode configuration. The working metal electrode then serves as a polarizable reference organic solvent electrode in a four-electrode system for the polarization of the water/organic solvent interface.

**Keywords:** Reference electrode, Liquid/liquid interface, Chloride extraction, Common ion distribution.

### Introduction

Reference electrodes in the organic phase are often based on the distribution of a common ion between the aqueous and the organic phase. Stability of the reference electrode potential in this case depends on an unalterable concentration of a common ion in both phases in contact. In most cases the aqueous phase electrolyte consists of a solution of chloride ions in combination with a hydrophobic cation serving as a common ion.

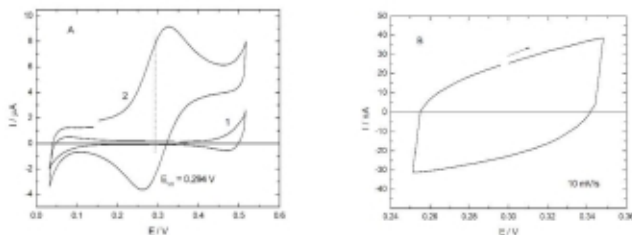
Recently, it has been demonstrated that in the case of a strongly hydrophobic cation serving as a common ion a spontaneous extraction of an aqueous electrolyte occurs<sup>1</sup>. The driving force of this extraction is a formation of ion-pairs of the aqueous electrolyte ions in the organic phase. The ion-pairs formation decreases the equilibrium concentration of the aqueous electrolyte anion in the organic phase and facilitates its transfer from the aqueous phase. The transfer of anion from the aqueous phase is accompanied by the transfer of cation and proceeds as an electroneutral reaction. The ion-pairs in the organic phase can agglomerate into large clusters and form stable water-in-oil nanoemulsions<sup>2-6</sup>. This process results in a decrease of the aqueous electrolyte concentration which affects the interfacial liquid/liquid potential and potential of Ag/AgCl electrode.

In this paper a novel concept of a reference electrode is introduced. The use of a simple three-electrode battery operated potentiostat is proposed where a polarizable metal electrode serves as a new reference electrode<sup>7</sup> in a modified conventional four-electrode electrolytic cell.

### Experimental

Reagent grade tetrapentylammonium chloride (TPeACl), tetraethylammonium chloride (TEACl), sodium tetraphenylborate (NaTPB), bis(triphenylphosphoranylidene)ammonium chloride (BACl), lithium tetrakis(pentafluorophenyl)borate (LiTB) ethyl etherate and LiCl were supplied by Sigma Aldrich, and used as received. TPeATPB and BATB were prepared by metathesis of the corresponding salts TPeACl and NaTPB, and BACl and LiTB, respectively. Tetraethylammonium dicarbollycobaltate (TEADCC) was prepared at the Institute of Inorganic Chemistry ASCR, v.v.i. Electrolyte solutions were prepared using deionized water ( $< 0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$ , GORO system, Czech Republic), and 1,2-dichloroethane (1,2-DCE, 99%, Penta).





**Fig. 2.** (A) Cyclic voltammograms recorded in the galvanic cell shown in Fig. 1 and Scheme 1. Curve 1 is the base electrolyte voltammogram, curve 2 was recorded in the presence of 0.5 mM TEACl in the aqueous phase. The voltage applied to the working electrode  $W$  was  $U_1 = 0.305$  V vs. the reference electrode  $R$ . Polarization rate  $v = 0.01$  V/s. (B) Cyclic voltammogram recorded in the three-electrode cell  $C$ ,  $R$  and  $W$ , see Fig. 1 and Scheme 1. Polarization rate 10 mV/s.

The Galvani potential difference between the aqueous (w) and the organic phase (o), cf. Scheme 1, can be written, neglecting the electrolyte IR drop, as

$$\Delta_{\sigma}^w \varphi = -E + \varphi_{RE2} - \varphi_{RE1} \quad (1)$$

where  $E$  is the applied voltage to the four-electrode cell CE1, RE1 and CE2, RE2. The potential  $\varphi_{RE2}$  of the reference electrode RE2 is controlled by a battery operated potentiostat with an input voltage  $U_1$  and is related to the potential  $\varphi_R$  of the reference electrode  $R$  by

$$\varphi_{RE2} = U_1 - \varphi_R = U_1 + \Delta_{\omega}^{A\theta} \varphi_{Ag|AgCl}^0 - \frac{RT}{F} \ln a_{Cl^-}^{w'} - \Delta_{\sigma}^w \varphi_{TEA+}^0 - \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{TEA+}^{w'}}{a_{TEA+}^0} \quad (2)$$

Thus, for  $\Delta_{\sigma}^w \varphi$  we get

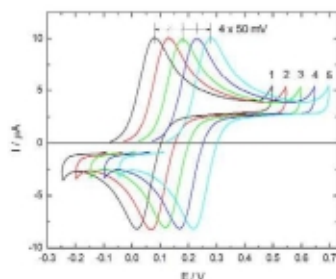
$$\Delta_{\sigma}^w \varphi = U_1 - E + \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{Cl^-}^{w'}}{a_{Cl^-}^0} - \Delta_{\sigma}^w \varphi_{TEA+}^0 \quad (3)$$

For the electrolyte concentrations shown in Scheme 1, the value of  $E^0 = 0.275$  V derived from the voltammogram in Fig. 1 and the value of  $U_1 = 0.305$  V, we get for  $\Delta_{\sigma}^w \varphi^0$

$$\Delta_{\sigma}^w \varphi^0 = 0.305 - 0.275 - 0.018 - 0.019 = -0.007 \text{ V} \quad (4)$$

The small deviation from the zero value is probably caused by a liquid junction potential  $\Delta_{\sigma}^{o'} \varphi$  at the organic phase boundary  $o'/o$ .

The effect of the change of the input voltage  $U_1$  on the recorded voltammograms is shown in Fig. 3. The TPeATPB electrolyte in Scheme 1 is replaced by BATB of the same concentration. The aqueous phase (w) contains ca 0.5 mM TEACl.  $U_1$  is changing from 0.05 to 0.25 V in 0.05 V steps. According to Eq. 2 the reference electrode RE2 potential  $\varphi_{RE2}$  is changing from -0.327 to -0.077 V. The shift of the voltammograms corresponds to the change of  $U_1$ . The steady-state current flowing through the working electrode  $W$  was less than 10 nA in all cases. This makes the electrolyte IR drop between the reference electrode  $R$  and the working electrode  $W$  negligible. For  $U_1 = 0.05$  V is the half-wave potential of the TEA<sup>+</sup> transfer  $E_{1/2}^{TEA+} = 0.051$  V. Using  $\Delta_{\sigma}^w \varphi_{TEA+}^0 = 0.019$  V, we get for  $E^0 = 0.032$  V. The liquid junction potential reaches the value 0.019 V which is somewhat larger value than in the previous case. The stability of the polarizable reference electrode is very good, no change of the voltammogram was detected after an hour delay.



**Fig. 3.** Cyclic voltammograms recorded in the cell shown in Fig. 1 and Scheme 1.  $U_1$  was varied from 0.05 (curve 1) to 0.25 V (curve 5) in 0.05 V steps. The organic base electrolyte in Scheme 1 is replaced by 5 mM BATB. The aqueous phase (w) contains ca 0.5 mM TEACl. Polarization rate  $v = 0.01$  V/s. IR drop compensation 2.9 k $\Omega$ .

### Conclusions

Novel concept of a polarizable reference electrode has been introduced. It can be utilized whenever a current reference electrode potential is not sufficiently stable and a composition of another stable one could interfere with the electrochemical system under study. This concept can be utilized also in the cases where the reference electrode serves as a source of a current, e.g. in a two-electrode electrolytic cells. In principle, the polarizable reference electrode exhibits a low impedance which improves stability of the electrochemical system. This can play an important role in a high frequency and pulse measurements.

### Acknowledgments

Financial support from the Czech Science Foundation (project number 22-32631S) is gratefully acknowledged.

### References

1. Mareček: *Electrochem. Commun.* **8S**, 57 (2018).
2. Siver B.R., Holub K., Mareček V.: *J. Electroanal. Chem.* **806**, 91 (2017).
3. Wang L., N. Kikkawa N., Morita A.: *J. Phys. Chem. B* **122**, 3562 (2018).
4. Holub K., Samec Z., Mareček V.: *Electrochim. Acta* **306**, 541 (2019).
5. Trojánek A., Samec Z., Mareček V.: *Electrochim. Acta* **361**, 137059 (2020).
6. Mareček V., Samec Z.: *J. Solid State Electrochem.* **24**, 2173–2174 (2020).
7. Mareček V.: *Electrochem. Commun.* **141**, 107354 (2022).
8. Czapkiewicz J., Czapkiewicz-Tutaj B.: *J. Chem. Soc. Faraday trans. 1.*, **76**, 1663 (1980).

## Screen-Printed Sensors with Chemically Deposited Boron-Doped Diamond Electrode: the Effect of the Ratio of the Area of the Working to the Auxiliary Electrode

Oleksandr Matvieiev <sup>a</sup>, Renáta Šelešiovská <sup>a</sup>, Marian Vojs <sup>b</sup>, Marián Marton <sup>b</sup>, and Jaromíra Chýlková <sup>a</sup>

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

<sup>b</sup>Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Electrical Engineering and Information Technology, Institute of Electronics and Photonics, Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava, Slovak Republic

### Abstract

The subject of this work was the study of the effect of the ratio of the areas of the working to the auxiliary electrodes of screen-printed sensors with a chemically deposited boron diamond electrode (BDDE) on their electrochemical properties and applicability. Three different ratios of 0.9, 0.4, and 0.1 were studied. Using conventional redox markers ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ ,  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ , and dopamine), the electrochemical properties of these sensors were compared based on the evaluation of the parameters of the obtained cyclic voltammograms. The influence of the area ratio of working to auxiliary electrodes on the analysis of 2,6-dichlorophenol was also investigated.

**Keywords:** Screen-printed sensors, Boron-doped diamond electrode, Electrode area, Redox marker, Cyclic voltammetry, Electrochemical impedance spectroscopy.

### Introduction

One of the trends of development in the field of modern analytical chemistry as well as electroanalytical chemistry is the process of miniaturization. Requirements related to, e.g., diagnostics, various medical applications, or monitoring of harmful substances in the environment lead to the development of miniaturized, fast, and cheap portable electrochemical devices and sensors made of alternative materials that allow fast and cheap on-site analysis (*sc.*, point-of-care testing). Screen-printing technology is a proven method for making simple screen-printed sensors (SPE) that can be used in practice. Their main advantage is a low price and the possibility of easy serial production, which leads to their use as disposable sensors <sup>1-5</sup>. However, it should be emphasized that the electrochemical properties and, therefore, the application possibilities of SPE depend mainly on the material of the working electrode.

Boron-doped diamond electrode (BDDE) exhibits exceptional electrochemical properties such as a wide available potential window, low background current, good chemical resistance, low current noise, resistance to passivation, and high hardness <sup>6-9</sup>. BDDE was used until now in the analysis of various biologically active substances important for environmental protection and human health <sup>10-13</sup>. In our previous work, new SPEs with chemically deposited BDDE as a working electrode were put into practice <sup>14</sup>. In addition to the material of the working electrode, the arrangement of the electrochemical cell, the size of the electrodes, their distance, *etc.*, also play an important role in the construction of sensors. In this work, we investigated the effect of the ratio of the areas of the working (WE) and auxiliary (CE) electrodes on the electrochemical properties, the detection characteristics, and the repeatability/reproducibility of the obtained results in the analysis of biologically active substances.

## 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 composed of 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  $H_2SO_4$  and 1 M  $H_2SO_4$  were diluted from concentrated 96 %  $H_2SO_4$  (all from Ing. Petr Švec-PENTA s.r.o., Czech Republic).  $1 \times 10^{-3}$  M solution of 2,6-DCF (Sigma-Aldrich) was prepared by dissolving the appropriate batch in acetonitrile (Ing. Petr Švec-PENTA s.r.o., Czech Republic) and stored in a refrigerator. Solutions with lower concentrations were prepared fresh daily by diluting the stock solution with electrolytes. The stock solution of  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl was prepared by dissolution of the appropriate amount of powder (Penta-Švec, Czech Republic) in the distilled water and the standard solutions of  $2.5 \text{ mmol L}^{-1}$   $K_3[Fe(CN)_6]$  and  $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$  and dopamine (DA) (all of the purity  $\leq 99$  %, Sigma-Aldrich) were prepared in the solution of  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl.

Voltammetric measurements were performed using Autolab PGSTAT204 (Metrohm Autolab, Netherlands) equipped with software Nova 2.1.5. Measurements were performed in a three-electrode set up with bulk BDDE (BioLogic, surface area ( $A$ ) of  $7.07 \text{ mm}^2$ , inner diameter of 3 mm, B/C ration during deposition 1000 ppm) as WE, saturated argentchloride electrode (Ag/AgCl (KCl, sat.)) as a reference (RE) and platinum wire as CE (both Monokrystaly, CZ). The lab-made SP/BDDE (SlovakDiamondGroup, FEI STU, Slovakia) was the second one consisting of chemically deposited BDDE (inner diameter and surface area of 3 mm and  $7.07 \text{ mm}^2$ , 2 mm and  $3.14 \text{ mm}^2$ , 1 mm and  $0.785 \text{ mm}^2$ , B/C 312,500 ppm) as WE as well as CE and Ag/AgCl RE. The CE area was kept constant ( $7.925 \text{ mm}^2$ ). Thus, three different sensors were obtained with WE and CE area ratios of 0.9, 0.4, and 0.1, as shown in Figure 1.



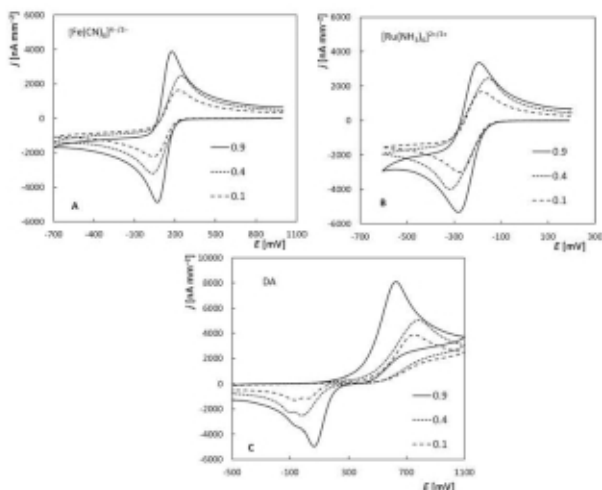
Fig. 1. Applied sensors.

In all cases, WEs were activated at the beginning of the working day by performing 20 (for BDDE) or 10 (for SP/BDDE) cyclic voltammograms in the potential range from initial potential ( $E_{in}$ ) of  $-1500 \text{ mV}$  to switching potential ( $E_{switch}$ ) of  $+2200 \text{ mV}$  directly in the supporting electrolyte. The activation procedure was terminated at the positive potential value, i.e., at the final potential ( $E_{fin}$ )  $+2200 \text{ mV}$ . 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.

Parameters of calibration curves and confidence intervals were calculated on the level of significance 0.05. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated from the calibration dependences as three times the standard deviation and ten times the standard deviation of an intercept divided by a slope.

## Results and discussion

Electrochemical properties of SPEs with different area ratios of WE to CE were studied by cyclic voltammetry (CV) of the following redox systems:  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ ,  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ , and DA. Fig. 2 shows the obtained voltammetric curves for all redox markers. Considering the different working areas of the electrodes, the current was recalculated to the current density. Table I summarizes the parameters of these curves for all sensors. In the case of the "outer sphere" redox marker  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ , the current density and reversibility of the observed reaction decrease with a reduced ratio area. A similar dependence was obtained also for the "inner sphere" markers of the  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  and DA. The reduction of the area of the WE with the same area of the CE leads to the deterioration of the reversibility of the ongoing reactions and the decreasing of current density. These changes are much more pronounced in the case of DA. Such a course of dependence can be caused by two factors, the influence of the ratio of the areas of the WE to the CE (*i.e.*, the electrochemical effect) or the increase in the distance between the WE and CE (*i.e.*, the geometric effect).



**Fig. 2.** Cyclic voltammograms of  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  (A),  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  (B), and DA (C) recorded on the tested sensors (electrolyte – 0.1 mol L<sup>-1</sup> KCl,  $\nu = 100$  mV s<sup>-1</sup>,  $c([\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}) = c([\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}) = c(\text{DA}) = 2.5$  mmol L<sup>-1</sup>).

Electrochemical impedance spectroscopy was also conducted to investigate this phenomenon. This study was performed using redox markers, which were already mentioned above, the frequency ranged from 10k to 0.1 Hz with an amplitude of 10 mV. The elementary scheme R(Q[RW]) for the "inner sphere" and RW for the "outer sphere" systems were used to simulate and fit the measured spectra. The results of the electrochemical impedance spectroscopy simulation are shown in Table II.

The value of the resistance of the electrolyte between the WE and CE ( $R_e$ ) increases with a decrease in the area ratio, which indicates that the geometric effect has an influence and worsens

the electrochemical properties. The second important parameter is the resistance of electron transfer ( $R_{ct}$ ), which increases when the surface area decreases, which indicates that the electrochemical effect also has an impact and deteriorates the properties of the sensors. Therefore, we can summarize that the deterioration of the electrochemical properties of sensors with a decrease in the ratio of the areas of the working and auxiliary electrodes is due to a combination of electrochemical and geometric effects.

**Table I**

Parameters of cyclic voltammograms of redox markers  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ ,  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  and DA (electrolyte – 0.1 mol L<sup>-1</sup> KCl,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $\alpha([\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}) = \alpha([\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}) = \alpha(\text{DA}) = 2.5 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

$A_{WE}/A_{CE}$	$j_{pa}$ [nA mm <sup>-2</sup> ]	$j_{pc}$ [nA mm <sup>-2</sup> ]	$j_{pa}/j_{pc}$	$E_{pa}$ [mV]	$E_{pc}$ [mV]	$\Delta E_p$ [mV]
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$						
0.9	4574	-4454	1.03	174.3	73.5	100.7
0.4	2912	-2791	1.04	224.8	33.3	191.5
0.1	2038	-1913	1.07	224.6	43.3	181.3
DA						
0.9	6081	-4498	1.35	627.9	63.9	564.0
0.4	3057	-2151	1.42	779.0	-26.7	805.7
0.1	2359	-1059	2.23	748.8	13.6	735.2
$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$						
0.9	4397	-4192	1.05	-192.7	-273.3	80.6
0.4	3208	-3147	1.02	-162.5	-313.6	151.1
0.1	2476	-2452	1.01	-182.7	-273.3	90.6

**Table II**

Values of individual elements of electrical equivalent circuits (EEC) (R[RW]/Q) for Fe and DA redox markers and R(W) for Ru redox marker calculated using FRA software simulation (2.5 mmol L<sup>-1</sup>  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ , DA and  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  in 0.1 mol L<sup>-1</sup> KCl,  $f = 1-10,000 \text{ Hz}$ ,  $A = 10 \text{ mV}$ ).

$A_{WE}/A_{CE}$	$R_s$ [Ω]	$R_{CT}$ [Ω]	$Y_0$ [μMh s <sup>0</sup> ]	$n$	$Y_0$ [μMh s <sup>1/2</sup> ]	$\chi^2$
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$						
0.9	113	289	20.6	0.657	429	0.01
0.4	3570	6830	3.51	0.762	150	0.01
0.1	3070	48300	0.228	0.841	27.1	0.01
DA						
0.9	238	16700	4.68	0.942	325	0.01
0.4	3660	63400	2.04	0.878	138	0.04
0.1	3160	334000	0.244	0.849	28.2	0.04
$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$						
0.9	103	-	-	-	456	0.01
0.4	3500	-	-	-	152	0.05
0.1	3200	-	-	-	28.1	0.04

Finally, the influence of the ratio of the areas of WE to CE during the analysis of 2,6-dichlorophenol in a model solution and real river water was investigated. For this purpose,



a method of voltammetric analysis of 2,6-dichlorophenol was developed using BDDE in a classic three-electrode arrangement. In general, the obtained results of the analyzes as well as their reproducibility correlated with the above-described results dealing with the electrochemical properties of tested sensors, a decrease in the ratio of the areas of the WE to the CE leads to the deterioration of the recovery, sensitivity, and RSD.

### Conclusions

In this work, the effect of the ratio of the areas of the working to the auxiliary electrodes during the production of lab-made screen-printed sensors with the chemically deposited boron-doped diamante electrode on their electrochemical properties was investigated. Based on research conducted on three redox systems: two "inner sphere" ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  and dopamine) and one "outer sphere" ( $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ ), and the selected analyte 2,6-dichlorophenol, it can be said that a decrease in the ratio of the areas of the working to the auxiliary electrode leads to the deterioration of the electrochemical properties, sensitivity, recovery, and RSD.

### Acknowledgments

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (project No. 20-01589S), The University of Pardubice (project No. SGSFChT\_2023\_002), and Slovak VEGA grants number 1/0554/20 and 1/0631/22.

### References

1. Li M., Li Y.T., Li D.W., Long Y.T.: *Anal. Chim. Acta* 734, 31 (2012).
2. Taleati 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. Swain G.M., Anderson A.B., Angus J.C.: *MRS Bull.* 23, 56 (1998).
7. Luong J.H.T., Male K.B., Glennon J.D.: *Analyst* 134, 1965 (2009).
8. Patel K., Hashimoto K., Fujishima A.: *Denki Kagaku* 60, 659 (1992).
9. Selesovska R., Krankova B., Stepankova M., Martinkova P., Janikova L., Chylkova J., Vojs M.: *J. Electroanal. Chem.* 821, 2 (2018).
10. Baluchova S., Danhel A., Dejmekova H., Ostatna V., Fojta M., Schwarzova-Peckova K.: *Anal. Chim. Acta* 1077, 30 (2019).
11. Selesovska R., Navratil T., Hrdlicka V., Michniak P., Hatala M., Vojs M., Marton M., Matvieiev O., Janikova L., Chylkova J.: *Electrochim. Acta* 403, 139642 (2022).
12. Baluchova S., Mamaloukou A., Koldenhof R., Buijsters J.: *Electrochim. Acta* 450, 142238 (2023).
13. Selesovska R., Sokolova R., Krejcova K., Schwarzova-Peckova K., Mikysek T., Matvieiev O.: *J. Electroanal. Chem.* 930, 117155 (2023).
14. Usenko A., Chylkova J., Vana J., Matvieiev O., Janikova L., Selesovska R.: *J. Electroanal. Chem.* 935, 117360 (2023).
15. Matvieiev O., Šelesovská R., Vojs M., Marton M., Michniak P., Hrdlička V., Hatala M., Janiková L., Čhylková J., Skopalová J., Cankar P., Navrátil T.: *Biosensors* 12, 241 (2022).

## Practical Experience with Planar Three-Electrode Sensors: Graphite Modified with Carbon Nanotubes vs. Boron-Doped Diamond

Radovan Metelka<sup>a</sup>, Martina Svitáková<sup>a</sup>, Vjosa Grapci<sup>b</sup>, and Tahir Arbneshi<sup>b</sup>

<sup>a</sup> University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic,  
E-mail: radovan.metelka@upce.cz

<sup>b</sup> University of Prishtina, Faculty of Mathematical and Natural Science, Department of Chemistry, Prishtina, Kosovo

### Abstract

This contribution summarizes the practical experience gained during the experiments with planar sensors manufactured by screen-printing and other technologies for the preparation of working electrodes. The electrochemical properties of sensors with working electrodes made of screen-printed graphite modified with multiwalled carbon nanotubes and boron-doped diamond, prepared by chemical vapor deposition, were examined and compared in the electroanalysis of nicotine, uric acid, guanine, and adenine. The differences in intensities of the analytical signals, their repeatability, and the shift of peak potentials are discussed with respect to the material and composition of the working and reference part of the sensors.

**Keywords:** Screen-printed carbon electrode, Boron-doped diamond electrode, Nicotine, Uric acid, Guanine, Adenine, Electroanalysis.

### Introduction

Nowadays, a great variety of electrochemical sensors is manufactured for the electroanalysis of various compounds. Among different types of bulky disc electrodes of classical design, there are also numerous types of miniaturized sensors, including three-electrode setups. Several manufacturing technologies are generally used to prepare these sensors, which aim to be low-cost, mass-producible, and easy to operate but still have sufficient electroanalytical performance<sup>1</sup>. Such devices are mainly targeted as disposable, one-shot sensors allowing measurements in the field or enabling undemanding point-of-care testing. A typical example is glucose strips for everyday monitoring of blood glucose.

In the case of screen-printed sensors, the used materials, conditions, and technological operations during each layer-forming step must not influence the resulting electroanalytical performance of the prepared working electrode. Most screen-printed sensors utilize low-cost graphite inks with various compositions for printing the electrodes. The composition of the ink greatly influences the electrochemical behavior of the working electrode<sup>2,3</sup>. It is usually a tradeoff between the properties important for printing (such as proper viscosity, thixotropy, and printing line definition after curing) and good electrochemical characteristics (low resistance and background currents, fast electron transfer, and small peak potential separation for reversible systems). Various bulk or surface modification of working electrodes by carbon nanomaterials, metal, or metal oxide nanoparticles is regularly employed to improve the abovementioned sensor capabilities<sup>4,5</sup>.

Moreover, proper care must be given to forming the reference part of the sensor. Generally, a pseudoreference system made of silver/silver chloride ink is used in screen-printed sensors. However, a silver layer only is very often deposited as a simple and easy-to-prepare pseudoreference part. Such configurations are greatly influenced by the presence of chloride

ions in the measuring solution leading to the potential change of the reference and subsequent shift of voltammetric signals along the potential axis. Furthermore, some analyzed species may react or bind with silver, causing the potential change at the reference part of the sensor. The presented contribution directly compares the behavior of two planar sensors with various working electrodes and pinpoints the subtle differences in the electrochemical detection of several organic compounds.

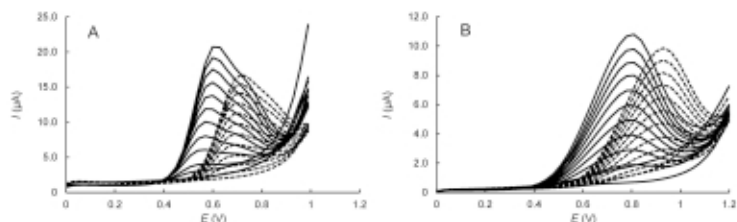
### Experimental

Electrochemical detection was carried out using two planar sensors. The first one was a screen-printed three-electrode sensor DRP-110 CNT (Metrohm Czech Republic, Prague, Czech Republic) containing a carbon working electrode, modified with multi-walled carbon nanotubes functionalized with carboxy groups (MWCNTs-COOH), carbon auxiliary, and silver pseudoreference electrodes (SPCE). The second device was a planar sensor with working and auxiliary electrodes made of boron-doped diamond electrodes prepared by chemical vapor deposition. The reference part was a screen-printed silver layer, which was further electrochemically anodized in 0.1 M KCl solution (BDD, Slovak University of Technology in Bratislava, Bratislava, Slovakia). Details about the preparation of this sensor can be found elsewhere <sup>6</sup>. Experiments were performed using electrochemical analyzers PGSTAT30 operated by Nova 1.11 software (Metrohm Czech Republic, Prague, Czech Republic) and PalmSens 2 controlled by PSTrace 5.9 software (PalmSens BV, Houten, The Netherlands). Multimeter inoLab® pH 720 with SenTix® 81 pH electrode (both WTW, měřicí a analytická technika, s.r.o., Prague, Czech Republic) was used to measure the pH of supporting electrolytes. Samples were analyzed by differential pulse voltammetry (DPV) and square wave voltammetry (SWV) in non-deaerated supporting electrolytes. All chemicals used for the preparation of Britton-Robinson and acetate buffers, sodium hydroxide, nicotine, guanine, adenine, and uric acid were bought from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

### Results and discussion

The electrochemical properties of both planar sensors were first tested and compared in the detection of nicotine in 0.1 M BRB. This compound can be readily oxidized at both electrodes leading to an intensive current signal influenced by the pH of the supporting electrolyte. However, electrochemical oxidation of nicotine at graphite modified with MWCNTs-COOH appeared at more negative potentials compared to boron-doped diamond. The single oxidation peak at lower pH changed to two joined signals in basic solutions starting from pH 7. Contrary, only a single broad response is observed in the case of the BDD electrode. Further study revealed that the oxidation of nicotine is governed predominantly by the diffusion to the electrode surface. There is only a slight influence of the adsorption, manifesting in the peak current increase up to 15 s of accumulation. Longer accumulation times did not further enhance the signal and rather caused a drop in the current response at both tested types of working electrodes.

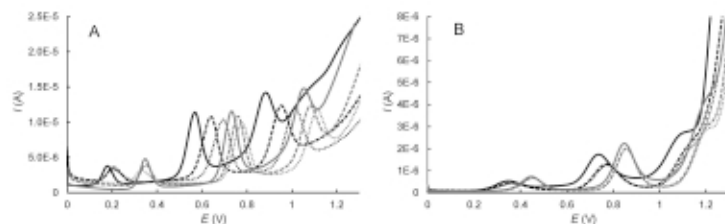
Moreover, the optimum for the highest oxidation currents was pH 8 for SPCE but pH 11 for boron-doped diamond. The repetitive experiments showed a gradual decrease in the analytical performance of SPCE, whereas it was possible to use the BDD for a prolonged period with only minor changes in peak currents and sensitivity of the detection. After several measurements, the peaks retained the same peak potential, which changed with the addition of 0.1 M KCl by approx. 90 mV to more positive potentials (Fig. 1). This demonstrates the major effect of chloride ions activity in the supporting electrolyte on the position of voltammetric signals, which must always be considered and maintained constantly for proper evaluation of voltammograms recorded at sensors with a pseudoreference electrode.



**Fig. 1.** Voltammograms of 15–300  $\mu\text{mol L}^{-1}$  nicotine in 0.1 M BRB (solid line) and with the addition of 0.1 M KCl (dashed line) at A) SPCE-MWCNTs-COOH, pH 8, and B) BDD sensor, pH 11. DPV,  $E_p = 125$  mV,  $v = 150$  mV  $s^{-1}$ .

Simultaneous analysis of uric acid, guanine, and adenine revealed different characteristics of both sensors in the electrochemical oxidation of these compounds. The SPCE-MWCNTs-COOH again exhibited lower overpotential needed for the oxidation of all analytes compared to the BDD. Peak maxima were shifted by up to 200 mV to more negative potentials than in the case of the BDD. All signals are pH-dependent; therefore, finding the optimum value enabling sensitive detection for all compounds was necessary. Relatively intensive peak currents were obtained in weak acidic electrolytes; electrochemical oxidation of uric acid in basic solutions was almost negligible. Thus, an acetate buffer of pH 5.5 was selected as a compromise providing sufficient sensitivity and peak potential separations of all oxidation signals.

The complications arose during repetitive measurements of the mixture of organic compounds at the same electrode surface. Contrary to nicotine detection, an apparent shift of peak potentials to more positive values, higher for guanine and adenine up to 130 mV and 120 mV, respectively, was observed in the second and third SWV scans for SPCE-MWCNTs-COOH (Fig. 2). Such a substantial potential shift was not recorded at the BDD sensor. This behavior might be explained by the binding of purine bases on the silver layer<sup>7</sup> of the pseudoreference part in the SPCE-MWCNTs-COOH sensor, changing its interfacial structure and hence the potential. The addition of 0.1 M KCl to the solutions lowers the shift in peak potentials, but resulting peaks are moved closer to the anodic limit with elevated background currents.



**Fig. 2.** SWV voltammograms of 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  uric acid, guanine, and adenine in 0.1 M acetate buffer pH 5.5 (black color) and with the addition of 0.1 M KCl (grey color) at A) SPCE-MWCNTs-COOH, and B) BDD sensor: first scan (solid line), second scan (dashed line), and third scan (dotted line).

The situation is similar in the case of the BDD sensor. After adding chlorides, the oxidation signals are moved again to more positive potentials; however, this time, it is impossible to quantify the peak of adenine properly.

### Conclusions

Although printed planar sensors are meant to be used as disposable, one-shot sensors, care must be taken if repetitive measurements required for the necessary statistical evaluation of results are performed at the same electrode surface. Apart from the slow degradation of the analytical performance of modified graphite electrodes with numerous measurements (where the BDD electrode excels), the usual pseudoreference part of these printed sensors made of silver might also not be sufficiently stable in the prolonged detection of some organic compounds. This can introduce obstacles in the evaluation of voltammetric signals, which can be shifted along the potential axis to such an extent that they even diminish in the working potential window. Anodization of the silver layer to produce silver chloride seems to be an elegant way to stabilize the voltammetric response. It would be preferred over printing mixed Ag/AgCl inks due to a better chance of whole covering of the potentially sensitive silver layer.

### Acknowledgments

Mobility support (CEEPUS CZ-0212-16-2223 network) and financial support from the Faculty of Chemical Technology, the University of Pardubice (project No. SGS-2022-002) are gratefully acknowledged.

### References

1. Stefano J. S., Orzari L. O., Silva-Neto H. A., de Ataíde V. N., Mendes L. F., Coltro W. K. T., Paixão T. R. L. C., Janegitz B. C.: *Curr. Opin. Electrochem.* *32*, 100893 (2022).
2. Fanjul-Bolado P., Hernandez-Santos D., Lamas-Ardisana P. J., Martín-Pernía A., Costa-García A.: *Electrochim. Acta* *53*, 3635 (2008).
3. Kadara R. O., Jenkinson N., Banks C. E.: *Sens. Actuator B-Chem.* *138*, 556 (2009).
4. Suresh R. R., Lakshmanakumar M., Arockia Jayalatha J. B. B., Rajan K. S., Sethuraman S., Krishnan U. M., Rayappan J. B. B.: *J. Mater. Sci.* *56*, 8951 (2021).
5. Camargo J. R., Orzari L. O., Araújo D. A. G., de Oliveira P. R., Kalinke C., Rocha D. P., Luiz dos Santos A., Takeuchi R. M., Muñoz R. A. A., Bonacin J. A., Janegitz B. C.: *Microchem. J.* *164*, 105998 (2021).
6. Matvieiev O., Šešlovská R., Vojs M., Marton M., Michniak P., Hrdlička V., Hatala M., Janíková L., Chýlková J., Skopalová J., Cankář P., Navrátil T.: *Biosensors* *12*, 241 (2022).
7. Arakawa H., Neault J. F., Tajmir-Riahi H. A.: *Biophys. J.* *81*, 1580 (2001).

## Voltammetric Determination of Arecoline (Voltamtrické stanovení arekolinu)

Tomáš Mikysek and Barbra Indruchová

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

E-mail: tomas.mikysek@upce.cz

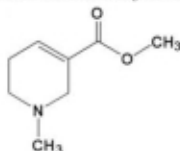
### Abstract

This study describes the electrochemical behavior of arecoline and offers a method for its determination. Arecoline undergoes oxidation showing one irreversible process at about +0.95 V involving two electrons. The influence of various electrolytes as well as pH dependence is described herein. The method using square-wave voltammetry as a tool for the arecoline determination was verified by the determination of arecoline in areca nut.

**Keywords:** Carbon paste electrode, Arecoline, Square-wave voltammetry.

### Úvod

Arekolín, systematickým názvem metyl ester kyseliny 1-metyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-5-karboxylové (Obr. 1), patří mezi alkaloidy vyskytující se především v ořeších palmy arekové (*Areca catechu*). Tento alkaloid s pyridinovým jádrem je odvozen od kyseliny nikotinové. V jižní Asii, Číně a v některých afrických zemích je zvykem užívání arekolinu ve formě žvýkání tzv. „Betelového sousta“. Jedná se o ještě zcela nedozrálé rozdrčené ořechy areky obecně zabalené v listech pepřovníku betelového potřeného vápnem. Někdy se mohou přidat listy tabáku, hřebíček nebo další aromatické koření. Betelové sousto tedy obsahuje všechny alkaloidy palmy arekové, ale hlavní aktivní složkou je zde především arekolín<sup>1</sup>.



**Obr. 1.** Struktura arekolinu.

Pravidelné uživatele této drogy můžeme poznat podle zčernalých zubů a dásní. Výzkumy arekolinu ukázaly, že má mnohé pozitivní i negativní účinky na lidský organismus. To zahrnuje vliv na nervovou, kardiovaskulární, endokrinní a zaživací soustavu a také účinky na další tělesné pochody. Avšak nedávné studie naznačují, že s užíváním arekolinu jsou spojena častá onemocnění ústní dutiny<sup>2</sup>.

Ke klasickým metodám, používaným ke stanovení arekolinu patří nečastěji separační techniky<sup>3-6</sup> (např. ve spojení s hmotnostní spektrometrií), jako jsou: HPLC-MS, GC-MS, nebo kapilární elektroforéza. Alternativou k těmto metodám mohou být elektrochemické metody.

V tomto příspěvku je prezentována základní elektrochemická charakterizace a stanovení přírodní látky arekolín pomocí cyklické voltametrie a square-wave voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě. Výsledky popisují chování výše uvedené látky v různých typech základních elektrolytů a zároveň základní optimalizaci experimentálních podmínek pro stanovení arekolinu.

## Experimentální část

**Chemikálie.** Arekolín – Methyl 1-methyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-5-karboxylát (Santa Cruz Biotechnology), jeho standardní roztok byl připraven rozpustěním 23,61 mg arekolínu v 10 ml vody. Pro přípravu základních elektrolytů v podobě 0,1 mol/l roztoků (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl) a k přípravě série Britton-Robinsonových pufrů bylo použito běžných laboratorních chemikálií. Všechny potřebné roztoky byly připraveny z deionizované vody systému Milli-Q od firmy Millipore.

**Instrumentace.** Všechna elektrochemická měření byla prováděna na přístroji AUTOLAB (model "PGSTAT-128"; Metrohm - Autolab B.V., Utrecht, Nizozemí), ke kterému byla připojena měřící cela s tří-elektrodovým systémem obsahujícím uhlíkovou pastovou elektrodu z uhlíkového prášku „CR-5“ (Maziva Týn, CZ) a parafinového oleje (Merck; CZ) a pro srovnávací měření elektrodu ze skelného uhlíku dále pak referenční elektrodu Ag | AgCl | 3 M KCl a pomocnou elektrodu (Pt).

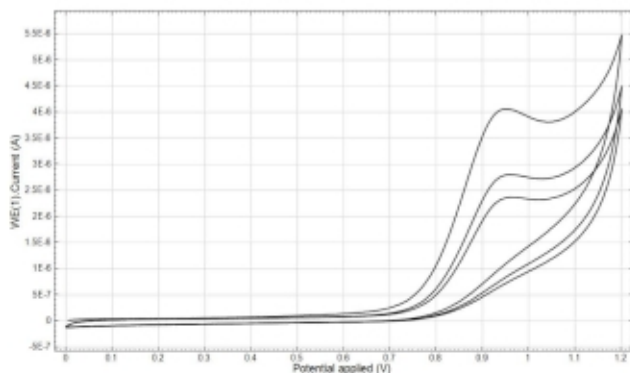
## Postupy

**Square-wave Voltametrie (SWV).** Tyto experimenty byly prováděny v roztoku výše uvedených elektrolytů obsahujících různé koncentrace arekolínu. U většiny experimentů byly použity následující podmínky: počáteční potenciál 0,0 V, koncový potenciál 1,2 V frekvence 25 Hz, amplituda 20 mV, potenciálový krok 10 mV, doba kondicionace 10 s při potenciálu -0,2 V.

**Příprava reálného vzorku.** Ořech arekové palmy, zakoupený od firmy Herbal-store s.r.o. Jablonec nad Nisou, byl nastrohán a následně jeho navážka 0,5238 g byla převedena do kádinky s 10 ml deionizované vody. Vzniklá suspenze byla ponechána v ultrazvuku po dobu 10 minut a následně přefiltrována, filtrát byl používán bez dalších úprav přímo k měření.

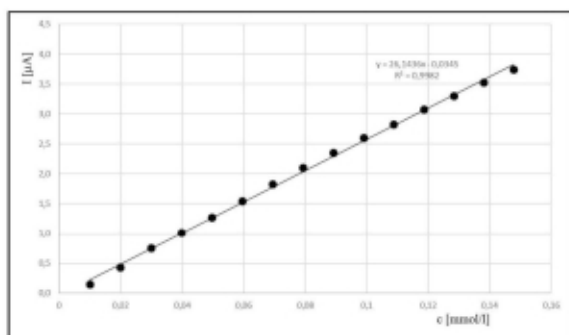
## Výsledky a diskuse

Elektrochemické chování arekolínu bylo studováno v různých elektrolytech na vybraných typech elektrod. Z cyklické voltametrie (Obr. 2) vyplývá, že k oxidaci arekolínu, na uhlíkové pastové elektrodě, dochází při potenciálu cca +0,95 V. Tato oxidace je ireverzibilní a s největší pravděpodobností dvouelektronová. Při použití elektrody ze skelného uhlíku bylo pozorováno podobné chování, avšak signál zahrnoval dva oxidační procesy jejichž potenciály byly od sebe vzdáleny cca. 100 mV. Dalším krokem bylo testování několika základních elektrolytů, kde bylo zjištěno, že arekolín je elektroaktivní v neutrálním a bazickém prostředí. Jako optimální byl zvolen Britton-Robinsonův pufr o pH 9,15. Mezi následující kroky optimalizace metody stanovení arekolínu patřilo sledování vlivu doby míchání, a kondicionačního potenciálu před vlastním skenem. Z tohoto měření vyplynulo, že se zvyšující se dobou míchání odezva klesá, a také se zhoršuje opakovatelnost měření, jako optimální byla tedy vybrána doba míchání 10 s. Při optimalizaci kondicionačního potenciálu bylo zjištěno, že odezva výrazně klesá při potenciálu negativnějším než -0,2 V, naopak v oblasti pozitivnějších potenciálů se odezva nemění. Tyto dva kroky jsou nedílnou součástí zajištění stability signálu, a tedy opakovatelného měření. Vzhledem k tomu, že jako pracovní elektroda byla použita uhlíková pastová elektroda, nabízí se otázka, zda měření realizovat na stejném povrchu, nebo povrch obnovovat před každým měřením. Proto byla provedena sada deseti měření na stejném povrchu a následně sada dalších deseti, kdy byl povrch elektrody před každým měřením obnoven. Z dosažených výsledků je zřejmé, že měření na stejném povrchu vychází výrazně lépe. Nemusí to však být pravidlem. Pokud je stanovovaná látka lipofilního charakteru, může docházet k extrakci do uhlíkové pasty, což je na jednu stranu výhodné z pohledu akumulace, ale poněkud problematické při zajištění opakovatelnosti měření.



**Obr. 2.** Cyklický voltamogram arekolinu o koncentraci 0,1 mmol/l na CPE v Britton-Robinsonově pufru o pH 9,15, rychlost skenu 100 mV/s.

Dalším krokem bylo sestavení kalibrační řady (Obr. 3), která byla následně použita, spolu s vícenásobným standardním přidavkem, jako metoda vyhodnocení analýzy reálného vzorku.



**Obr. 3.** Kalibrace arekolinu v Brittonově-Robinsonově pufru o pH 9,15.

Optimalizace navržené metody byla ověřena analýzou reálného vzorku ořechu arekové palmy. Touto analýzou byl zjištěn obsah 1,32 mg/g, což odpovídá 0,13 hm.% arekolinu v uvedeném ořechu. Literatura uvádí, že obsah arekolinu se pohybuje kolem 0,3 hm.%, avšak může výrazně kolísat, a v některých případech může být minimální.



### **Závěr**

Tato práce se zabývá stanovením arekolinu a zároveň popisem jeho elektrochemického chování. Arekolin je oxidován dvěma elektrony, a poskytuje ireverzibilní elektrodovou reakci při potenciálu cca +0,95 V. Pro vlastní stanovení se jeví jako nevhodnější elektrolyt Britton-Robinsonův pufr o pH 9,15. Výše uvedená analýza ukázala, že navržená metoda je vhodná ke stanovení arekolinu v reálném vzorku ořechu arekové palmy. Tato metoda nabízí vhodnou alternativu k již zavedeným vesměs chromatografickým metodám.

### **Acknowledgments**

The support received from the University of Pardubice (Project No. SGS-2023-001) is gratefully acknowledged.

### **References**

1. Liu Y.-J., Peng W., Hu M.-B., Xu M., Wu C.-J.: *Pharm. Biol.* *54*, 2753 (2016).
2. Chuang H.-C., Tsai M.-H., Lin Y.-T., Chou M.-H., Yang K.-L., Chien C.-Y. : *Technol. Cancer Res. Treat.*, *21*, 15330338221146870 (2022).
3. Ab R. N., Sarker Z. I., Setianto W. B., Omar F. M., Akanda J., Abd K. M.: *J. Food Drug Anal.* *18*, 4 (2010).
4. Hayes M., Khemani L., Bax M., Alkalay D.: *Biomed. Environ. Mass Spect.* *18*, 1005 (1989).
5. Jantarat C., Sirathanarun P., Songserm W., Srinornate W., Daengprom S.: *Walailak J. Sci. Technol.* *10*, 57 (2013).
6. Xiang Q., Gao Y., Han B., Li J., Xu Y., Yin J.: *Luminescence* *28*, 50 (2013).

## Elimination Voltammetry with Linear Scan: Advantages and Disadvantages

Tomáš Navrátil<sup>a</sup>, Libuše Trnková<sup>b</sup>, Vojtěch Hrdlička<sup>a</sup>, and Xiaochun Li<sup>b</sup>

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

<sup>b</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

### Abstract

Elimination voltammetry with linear scan (EVLS) represents an almost traditional mathematical method that helps to obtain additional and detailed information about the recorded electrochemical signals and therefore, to better understand the analyzed systems. Although it has been substantially developed and expanded during its existence of more than a quarter of a century and has found many areas of application, like any other mathematical and experimental method, it exhibits several advantages and disadvantages. In this contribution, we summarize its strengths, weaknesses, opportunities, as well as threats.

**Keywords:** Elimination voltammetry with linear scan, Advantages, Disadvantages, Adsorption, Charge transfer coefficient.

### Introduction

Elimination voltammetry with linear scan (EVLS) is an electrochemical technique used to investigate the behavior of redox-active compounds in a solution. The first paper on EVLS was published more than a quarter of a century ago<sup>1</sup>. This mathematical-physical-chemical method was initialized by so-called Elimination Polarography (EP), which Prof. Dračka and colleagues had already published almost ten years earlier<sup>2-5</sup>. The initial idea to eliminate sub-current components such as diffusion, capacitance, or kinetics arose when trying to uncover minor current responses hidden in majority responses, e.g., reduction of purine derivatives accompanied by a huge current of hydrogen evolution. EP allows using certain mathematical operations with  $i-t$  curves to eliminate a selected polarographic current which is characterized by different dependence on time. To obtain elimination polarograms, it is necessary to determine the values of the total polarographic current, its integral and derivative or double integral, and calculate their linear combinations with appropriate coefficients. While the elimination procedure in EP works based on different dependencies of the current components over time ( $t^r$ ), the EVLS method uses the dependencies of partial currents on the scan rate ( $v^r$ ). Shortly after the publication of EVLS theory, this elimination procedure was verified experimentally for the case of reversible and irreversible processes and the potential range expansion<sup>6</sup>. Over twenty years, several publications were created in which EVLS helped to solve controversial questions about the mechanisms of electrode processes, including processes with a totally adsorbed electroactive particle. Like every method, EVLS has its advantages and disadvantages; it also has its limitations, but also a lot of other possibilities in its development and application.

### Experimental

Experimental data for the EVLS procedure were obtained using potentiostats (Eco-Tribo polarograph, Autolab, Metrohm Czech Republic, PalmSens B.V., The Netherlands, or hand-made potentiostat) working in the linear sweep or cyclic voltammetric modes with a usual three-electrode arrangement. According to the requirements of the selected elimination function (which current component to conserve and which to eliminate), scan rates were chosen. To maintain the same number of potential-current pairs for different scan rates voltammograms

had to be taken with the same step value, most often 2 mV. In addition to this condition, there was a requirement for the best possible performance of the potentiostat consisting of (i) proper resistance compensation, (ii) constant current line without offset, and (iii) minimal current drift. The most accurate and reproducible EVLS results were registered on the surface of mercury electrodes<sup>6-14</sup>, where the initial conditions for all scan rates were the same. It is a different situation with solid electrodes (solid amalgam electrodes<sup>15,16</sup>, graphite composite electrodes<sup>17</sup>, paraffin-impregnated graphite electrodes<sup>18</sup>).

The very important condition to realize the EVLS calculation is the appropriate software. Only a few electrochemical software have included the corresponding built-in module, e.g., Multielechem (J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Czech Republic). In addition to the commonly known interactive programming environment MATLAB, the software package 'eLChem Viewer', which exploits the graphical programming language LabView, can find practical use in calculating the elimination coefficients for diverse scan rates<sup>19</sup>.

However, even an inexperienced user can perform the necessary calculations using Matlab software (MathWorks, USA) or any spreadsheet calculator, e.g., Excel (Microsoft, USA). The only entry condition is that the recording electrochemical software can export the recorded data in ASCII format.

## Results and discussion

Based on more than 25 years of EVLS development<sup>1, 6, 7, 20, 21</sup> and practical applications<sup>12, 22, 23</sup>, we would like to summarize some of the advantages, disadvantages, opportunities, and threats of this very handy and useful method<sup>1, 20, 21, 24, 25</sup>. By combining two basic conditions for the application of the EVLS procedure, namely (a) when the total current is recognized as the sum of the current components (charging, diffusion, kinetics, etc.) and (b) when each current component is expressed by the product of the potential function  $Y_j(E)$  and the scan rate function  $W_j(v)$ , we can describe the total voltammetric current as:

$$I = I_c + I_d + I_k + I_1 + I_2 + \dots = Y_1(E)v^1 + Y_2(E)v^2 + Y_3(E)v^3 + Y_4(E)v^{(1)} + Y_5(E)v^{(2)} + \dots \quad (1)$$

Generally, this equation can be extended to other current components. For  $n$  registered voltammetric currents, up to  $n-1$  partial currents are eliminable; in other words, if the exponent  $x$  is known, further eliminations can be performed. The EVLS procedure is based on the principle of normalization, with one scan rate selected as the reference rate and the corresponding total current measured at this being the reference current  $I_{ref}$ . One scan rate is usually smaller than the reference scan (e.g.  $1/2 v_{ref}$ ), and one is greater (e.g.  $2v_{ref}$ ). According to the precondition of which current component we intend to eliminate and which to conserve, the coefficients of the EVLS function are calculated. The normalization simplifies  $n$  equations because we calculate values relative to the reference scan (reference current). Due to the zero exponent for the kinetic current component,  $I_k$  has the simplest expression; the capacity (charging) current  $I_c$  and the diffuse current  $I_d$  are dependent on  $v$ , with the exponents 1 and 1/2, respectively:

$$I_{f_{ref}} = \left(\frac{v}{v_{ref}}\right) I_c + \sqrt{\frac{v}{v_{ref}}} I_d + I_k + \dots \text{etc.} \quad (2)$$

Although other current ratios (integers) were taken into account, including their sophisticated use, the integer ratio of 2 has been mostly employed, i.e.  $1/2 v_{ref}$ ,  $v_{ref}$ , and  $2v_{ref}$ . For this integer, the elimination function  $f(I)$ , which eliminates the charging and kinetic current components and conserves the diffusion component, corresponds to the equation:  $f(I) = -11,657 I_{1/2} + 17,485 I_{ref} - 5,8284 I_2$  (3).

Although the SWOT (Strengths, Weaknesses, Opportunities, and Threats) analysis began to be

used primarily to evaluate for-profit organizations, today SWOT analysis appears in many fields at a variety of levels and for a variety of purposes. SWOT analysis can be used as a means of evaluating the strategic position of the presented method in the given field of research. One such method is EVLS in the field of modern electrochemical methods.

### **Strengths of EVLS**

Elimination voltammetry with linear scan:

- is based not on empirical, but on strictly theoretical foundations;
- enables to eliminate, conserve, or combine particular contributions (the charging, diffusion, kinetic, irreversible currents  $I_c$ ,  $I_d$ ,  $I_k$ , and  $I_r$ ) of DC voltammetric signals<sup>6,10,22</sup>, and the total number of current components considered is not limited;
- helps to clarify the mechanism of some electrode processes<sup>6,10,22</sup>;
- enables to extend of the potential window and increases the resolution of overlapped voltammetric signals;
- provides the charge transfer coefficient  $\alpha$  when the number of electrons  $n$  is known<sup>1,26</sup>;
- can help by revealing the various morphology of the electrode surface (roughness, polymers, or nanoparticles) and possible analyte-electrode interactions<sup>20</sup>;
- can distinguish between linear and spherical diffusion;
- can confirm that the electron transfer takes place in the adsorbed state<sup>7,22</sup> via EVLS E4;
- reveals the fact that the adsorption process is relatively slow;
- sets new baseline corrections for adsorbed electroactive species (peak-counterpeak signals);
- reveals a preceded chemical reaction before the electron transfer;
- enables to determine the  $pK_a$  value of the analyte<sup>27,28</sup>;
- can be applied in inorganic<sup>29</sup>, organic<sup>17, 29-33</sup>, molecular<sup>7, 9, 11, 31, 34-43</sup>, pharmaceutical chemistry<sup>44,45</sup>, toxicology<sup>15,23</sup>, agrochemistry<sup>13,46-48</sup>, as well as biochemistry<sup>12,23,49</sup>.

### **Weaknesses of EVLS**

- the principal postulate (*i.e.*, that the registered current is a mathematical sum of particular contributions which can be eliminated or conserved) is not always valid;
- the starting experimental conditions for all chosen scan rates should be the same (the problem of adsorption and fouling of the electrode surface for the subsequent scan);
- evaluation of the elimination signals is complex and it is necessary to take into account more registered signals and more EVLS functions;
- to calculate the elimination signals, it is necessary to register the voltammetric signals at a relatively wide range of scan rates (*e.g.*, from 10 to 320 mV/s) and therefore, the time run-up to the given potential from the starting potential is different.

### **Opportunities of EVLS**

- the elimination procedures can be very easily built into any software<sup>50</sup>;
- there are many promising directions for the development of EVLS theory (*e.g.*, description of elimination signals in the case of a chemical reaction that precedes an electron transfer).
- EVLS is also being developed successfully and *via* reversible electrode reactions can be employed as a testing electrochemical tool for a perfect setting of electrode systems<sup>20,21</sup>.

### **Threats of EVLS**

- the producers of the most frequently used electrochemical software are not inclined to build the EVLS calculation procedures into their products;
- the theory of EVLS is insufficiently widespread among electrochemists and EVLS theory is not the content of teaching at universities.

## Conclusions

Elimination voltammetry with linear scan (EVLS) is one of the electrochemical (and mathematical) techniques developed in the Czech Republic. In almost 30 years since its theoretical derivation, it has undergone significant development, which has proven its meaningfulness and the important place it undoubtedly belongs to. It has been shown in a huge number of experiments that its theoretically derived foundations correspond with experimental results (and *vice versa*)<sup>20, 21</sup>. This contribution aims to summarize in great brevity the advantages, disadvantages, opportunities, and threats associated with the development and practical use of this technique. Of course, like other methods, this one is not self-saving and the results provided by it must be combined with the results obtained by other techniques. Its application is associated with numerous disadvantages. On the other hand, the authors of this manuscript are convinced that many of the EVLS disadvantages and threats could be averted and turned into advantages. They firmly believe in the bright future of this purely Czech (Czech-Moravian) method.

## Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation (Project No. GAČR 20-01589S). The financial support provided by Masaryk University project: Development of methods and instrumentation for the analysis of biologically important substances (MUNI/A/1539/2021 and MUNI/A/1421/2022).

## References

1. Dracka O.: *J. Electroanal. Chem.* *402*, 19 (1996).
2. Dracka O.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* *51*, 288 (1986).
3. Dracka O.: *J. Electroanal. Chem.* *296*, 405 (1990).
4. Korenek K., Trnkova L., Dracka O.: *Chemical Papers-Chemiecke Zvesti* *44*, 527 (1990).
5. Trnkova L., Dracka O.: *J. Electroanal. Chem.* *348*, 265 (1993).
6. Trnkova L., Dracka O.: *J. Electroanal. Chem.* *413*, 123 (1996).
7. Trnkova L., Kizek R., Dracka O.: *Electroanalysis* *12*, 905 (2000).
8. Trnkova L., Jelen F., Postbieglova I.: *Electroanalysis* *15*, 1529 (2003).
9. Trnkova L., Kizek R., Vacek J.: *Bioelectrochemistry* *63*, 31 (2004).
10. Trnkova L.: *J. Electroanal. Chem.* *582*, 258 (2005).
11. Trnkova L., Jelen F., Petřlova J., Adam V., Potesil D., Kizek R.: *Sensors-Basel* *5*, 448 (2005).
12. Sestakova I., Navratil T.: *Bioinorg. Chem. Appl.* *3*, 43 (2005).
13. Skopalova J., Navratil T.: *Chem. Anal.-Warsaw* *52*, 961 (2007).
14. Zimpl M., Skopalova J., Jirovsky D., Bartak P., Navratil T., Sedonikova J., Kotoucek M.: *Scientific World Journal* *2012*, 1 (2012).
15. Selesovska R., Bandzuchova L., Navratil T., Chylkova J.: *Electrochim. Acta* *60*, 375 (2012).
16. Novakova K., Navratil T., Jaklova Dyrtrtova J., Chylkova J.: *J. Solid State Electrochem.* *17*, 1517 (2013).
17. Navratil T., Senholdova Z., Shanmugam K., Berek J.: *Electroanalysis* *18*, 201 (2006).
18. Rozik R., Trnkova L.: *J. Electroanal. Chem.* *593*, 247 (2006).
19. Hrbac J., Halouzka V., Trnkova L., Vacek J.: *Sensors-Basel* *14*, 13943 (2014).
20. Trnkova L.: *J. Electroanal. Chem.* *905* (2022).
21. Li X. C., Triskova I., Trnkova L.: *Electrochim. Acta* *442* (2023).
22. Sander S., Navratil T., Novotny L.: *Electroanalysis* *15*, 1513 (2003).
23. Bandzuchova L., Selesovska R., Navratil T., Chylkova J.: *Electroanalysis* *25*, 213 (2012).
24. Trnkova L.: *Chem. Listy* *95*, 518 (2001).

25. Trnkova L.: *Chem. Listy* *112*, 802 (2018).
26. Trnkova L., Friml J., Dracka O.: *Bioelectrochemistry* *54*, 131 (2001).
27. Pilarova I., Lubal P., Trnkova L.: *Electroanalysis* *24*, 349 (2012).
28. Trnkova L., Serrano N., Pilarova I.: *Xxxiii Moderni Elektrochemicke Metody*, 224 (2013).
29. Choinska M., Hrdlicka V., Redondo B. R., Barek J., Navratil T.: *Proceedings of the 16th International Students Conference Modern Analytical Chemistry*, 70 (2020).
30. Sebkova S., Navratil T., Kopanica M.: *Chem. Listy* *97*, 843 (2003).
31. Sebkova S., Navratil T., Kopanica M.: *Anal. Lett.* *38*, 1747 (2005).
32. Yosypchuk B., Navratil T., Lukina A. N., Peckova K., Barek J.: *Chem. Anal.-Warsaw* *52*, 897 (2007).
33. Navratil T., Barek J., Fasinova-Sebkova S.: *Electroanalysis* *21*, 309 (2009).
34. Trnkova L., Kizek R., Dracka O.: *Bioelectrochemistry* *55*, 131 (2002).
35. Trnkova L., Jelen F., Postbieglova I.: *Electroanalysis* *18*, 662 (2006).
36. Mikelova R., Trnkova L., Jelen F., Adam V., Kizek R.: *Electroanalysis* *19*, 348 (2007).
37. Jelen F., Kourilova A., Hason S., Kizek R., Trnkova L.: *Electroanalysis* *21*, 439 (2009).
38. Huska D., Adam V., Trnkova L., Kizek R.: *Chem. Listy* *104*, 177 (2010).
39. Balcarova Z., Holubova S., Trnkova L.: *Modern Electrochemical Methods Xxxi*, 16 (2011).
40. Serrano N., Holubova S., Trnkova L.: *Electroanalysis* *23*, 2217 (2011).
41. Triskova I., Trnkova L.: *Chem. Listy* *110*, 222 (2016).
42. Triskova I., Trnkova L., Kejnovska I., Vorlickova M.: *Proceedings of International Conference Modern Electrochemical Methods Xxxix*, 209 (2019).
43. Trnkova L., Triskova I., Vorlickova M., Kejnovska I., Dvorakova Z., Pivonkova H., Fiala R.: *Electroanalysis* *31*, 2081 (2019).
44. Skalova S., Langmaier J., Barek J., Vyskocil V., Navratil T.: *Electrochim. Acta* *330*, 135180 (2020).
45. Selesovska R., et al.: *Electrochim. Acta* *403*, 139642 (2022).
46. Novakova K., Navratil T., Jaklova Dyrtrtova J., Chylkova J.: *Int. J. Electrochem. Sci.* *8*, 1 (2013).
47. Bandzuchova L., Selesovska R., Navratil T., Chylkova J.: *Electrochim. Acta* *113*, 1 (2013).
48. Novakova K., Hrdlicka V., Navratil T., Harvila M., Zima J., Barek J.: *Monatsh. Chem.* *147*, 181 (2016).
49. Hrdlicka V., Barek J., Navratil T.: *Talanta* *221*, 121594 (2021).
50. Barath P., Zak J., Trnkova L., Hubalek J., Adam V., Kizek R.: *X Pracovni Setkani Fyzikalnich Chemiku a Electrochemiku/ 10th Workshop of Physical Chemists and Electrochemists*, 35 (2010).

**Electrochemical Oxidation of Phenolic Compounds on Boron-Doped Diamond  
Electrodes**  
**(Elektrochemická oxidace fenolických látek na borem dopovaných diamantových  
elektrodách)**

Michal Nedvěď, Kristýna Jelšiková, Karel Nesměrák, and Karolína Schwarzová-Pecková  
Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO  
Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 43, Prague 2, Czech  
Republic, E-mail: karolina.schwarzova@natur.cuni.cz

**Abstract**

In this work, the influence of mesomeric and inductive effects of *meta*- and *para*-positioned substituents on the electrochemical behavior of phenolic compounds on boron-doped diamond (BDD) electrode was investigated using cyclic voltammetry. The obtained BDD surface was mechanically polished (p-BDD) or *in-situ* pretreated by anodic or cathodic activation to obtain O- and H-terminated surface. The p- and H-BDD surfaces exhibited faster electron transfer kinetics for tested phenolic compounds and for the redox couple  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  in comparison with O-BDD. Further, for these surfaces, the highest correlation coefficient of Hammett correlation was obtained in a pH 11 medium, *i.e.*, for the dissociated forms of phenolic compounds.

**Keywords:** Boron-doped diamond, Electrode pretreatment, Hammett correlation, Phenolic compounds, Voltammetry.

**Úvod**

Borem dopovaný diamant (BDD) je v posledních 30ti letech často vyhledávaným elektrodovým materiálem díky svým specifickým elektrochemickým a fyzikálním vlastnostem, jako je například široké potenciálové okno, nízký proud pozadí, biokompatibilita a především fyzikální i chemická odolnost tohoto materiálu v širokém rozsahu rozpouštědel a pH prostředí<sup>1,2</sup>. Je používán pro stanovení organických látek v biologických, environmentálních a farmaceutických maticích díky své malé náchylnosti k pasivaci elektrodového povrchu, popřípadě snadnému elektrochemickému čištění pomocí vkládání kladného či záporného potenciálu v oblasti úniku základního elektrolytu, kterými lze docílit změny hydrofilních vlastností a vodivosti borem dopované diamantové elektrody<sup>3,4</sup>. BDD filmy připravované ve vodíkové atmosféře na konci procesu chemické depozice par (CVD) jsou terminovány vodíky (tzv. H-terminovaný povrch); obdobného efektu lze dosáhnout katodickou předpřípravou elektrody vložím vysoké záporného proudu či potenciálu v oblasti vývinu vodíku<sup>3,5</sup>. Taková elektroda má hydrofobní charakter, naopak hydrofilní je BDD elektroda s navázanými skupinami obsahujícími kyslík (O-terminace), která se připravuje vložím kladného potenciálu v oblasti úniku základního elektrolytu, kdy se anodickým rozkladem vody vytvářejí OH radikály oxidující povrch elektrody (rovnice 1).



Poslední používanou úpravou BDD povrchu je mechanické leštění suspenzí aluminu, obdobně jako u dalších tuhých elektrod. Důsledkem této úpravy je snížení obsahu kyslíkatých skupin vázaných na  $\text{sp}^2$  hybridizované uhlíky a zrychlení kinetiky elektronového přenosu pro mnohé redoxně aktivní sloučeniny<sup>3,6,7</sup>.

Takto upravené BDD povrchy jsou relativně odolné vůči pasivaci meziprodukty elektrodových reakcí, u některých typů sloučenin k ní však dochází. Mezi ně patří např. fenoly, kdy prvním krokem jejich oxidace je jednoelektronová oxidace za vzniku fenoxyl radikálu, který je stabilizován přes své mezomerní struktury. Tyto radikály buď reagují dále za vzniku dimerů, oligomerů a polymerů pasivujících elektrodový povrch, nebo dochází k další jednoelektronové oxidaci, adici vody (přednostně do polohy *ortho* a *para*) a vzniku dihydroxyderivátů. Ty snadno podléhají  $2e^-/2H^+$  oxidaci na odpovídající chinony<sup>8-11</sup>. Míra pasivace závisí na struktuře fenolu a prostředí, jak bylo prokázáno např. pro chlorované fenoly<sup>12-13</sup>. Na klasických elektrodových materiálech (Pt, Au, uhlíkové elektrody (skelný uhlík, uhlíkové pasty)) se regenerace pasivované elektrody zpravidla řeší mechanicky, tj. leštěním povrchu. Naproti tomu na BDD površích se v mnoha případech osvědčila anodická aktivace, kdy OH radikály generované *in-situ* rozkladem vody oxidují vzniklý polymerní film a při jejím opakování před každým voltametrickým záznamem je zaručena jeho reprodukovatelnost. BDD elektrody tak umožňují rychlou a citlivou voltametrickou detekci fenolických látek, jak bylo prokázáno např. pro chlorofenoly<sup>12-13</sup>, nitrofenoly<sup>14</sup> či kresoly<sup>11</sup>. Reakční cesta při oxidaci fenolických látek je ovlivněna pH prostředí, koncentrací fenolických látek v měřicí cele, proudovou hustotou a samozřejmě materiálem měřicí elektrody. Významným faktorem je vlastní reaktivita hydroxylové skupiny na aromatickém jádře, která je pochopitelně ovlivněna přítomností substituentů, tj. jejich mezomerními a indukčními efekty a strukturou včetně objemové velikosti.

Cílem této práce bylo studium vztahu mezi pH měřeného roztoku a úpravou povrchu BDD na jedné straně a elektrochemickou oxidací fenolu a jeho *meta* a *para* substituovaných derivátů na straně druhé. Ke studiu byly vybrány deriváty s jednoduchými funkčními skupinami vykazujícími odlišné indukční a mezomerní efekty, konkrétně -H, -CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH, -Cl, -CF<sub>3</sub> a -NO<sub>2</sub>. Na základě použitého postupu předúpravy byl povrch BDD buď mechanicky leštěn (p-BDD), anodicky oxidován (O-BDD) nebo katodicky redukován (H-BDD). Pro tyto povrchy byla vyhodnocována Hammetova korelace<sup>15</sup> pro vyhodnocení vlivu funkční skupiny na potenciál elektrochemické oxidace příslušného fenolu a sledována pasivace povrchu.

### Experimentální část

Zásobní roztoky o koncentraci 1 mmol.l<sup>-1</sup> v deionizované vodě byly připraveny rozpustěním standardů studovaných látek: fenol, 3- a 4-chlorfenol, 3- a 4-methylfenol, 3- a 4-(trifluoromethyl)fenol, 3- a 4-hydroxybenzoová kyselina, 3- a 4-methoxyfenol, 3- a 4-nitrofenol, 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina a 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina (vše čistoty ≥ 98%, Sigma-Aldrich, USA). Pro voltametrickou analýzu byly tyto zásobní roztoky 10x zředěny na koncentraci 1·10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup> Brittonovým – Robinsonovým (BR) pufrům o pH 2,0 a 11,0.

Voltametrie byla měřena na přístroji Eco-Tribo Polarograf (Eco-Trend Plus, Česká republika) s využitím vsádkového třielektrodového zapojení s pracovní BDD elektrodou o ploše 7,07 mm<sup>2</sup> (BioLogic, Seyssinet-Pariset, Francie; poměr B/C při depozici par 1000 ppm), referenční argentochloridovou elektrodou (Ag | AgCl | 3mol.l<sup>-1</sup> KCl) a pomocnou platinovou elektrodou (Elektrochemické detektory, Turnov, Česká republika). K přípravě pufru o přesném pH byl použit pH metr AD1020 (Adwa Instruments, Maďarsko). Při měření na O-BDD povrchu byla elektroda aktivovaná vložením kladného potenciálu  $E_{akt} = +2.4$  V v prostředí 0,5 mol.l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> po dobu 30s mezi jednotlivými skeny. Poté měření roztoku obsahujícího 4-nitrofenol byla doba aktivace prodloužena na 2 min. Katodická aktivace, tj. hydrogenace povrchu (H-BDD) byla provedena vložením záporného aktivčního potenciálu  $E_{akt} = -2.5$  V v 2 mol.l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> po dobu



15 min za stálého míchání. Samotná hydrogenace nebyla dostačující k úplnému vyčištění pasivované elektrody, proto bylo nutné elektrodu před každým skenem nejprve 30 s ležet v odvodě suspenzi oxidu hlinitého s velikostí částic 0,5  $\mu\text{m}$  na polyuretanem fixované podložce (Elektrochemické detektory, Česká republika) a poté elektrochemicky aktivovat záporným aktivčním potenciálem  $E_{\text{akt}} = -2,5 \text{ V}$  ve 2  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  po dobu 60 s za stálého míchání. Měření na p-BDD povrchu probíhalo vždy po 30s leštění aluminou před každým skenem.

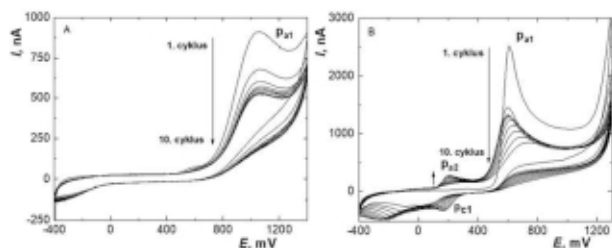
### Výsledky a diskuze

Vliv pH (kyselé pH 2,0 vs. zásadité pH 11,0) na elektrooxidaci substituovaných fenolů na p-BDD, O-BDD a H-BDD byl studován pomocí cyklické voltametrie. Uvedené hodnoty pH byly zvoleny s ohledem na pKa hydroxylové skupiny studovaných fenolických sloučenin (pohybují se v rozmezí 10,26 (4-methylfenol) až 7,15 (4-nitrofenol)) tak, aby v roztocích byla zastoupena převážně její disociovaná forma (pH 11,0) nebo protonizovaná neutrální forma (pH 2,0). Příklad zaznamenaných cyklických voltamogramů je uveden na obr. 1. Oxidace fenolických sloučenin je iniciována  $1e^-$  oxidací za vzniku fenoxo radikálu (signál  $p_{a1}$ ), který je dále oxidován v  $3e^-$  procesu za adice vody za vzniku chinoidních struktur. Jejich redukce/oxidace v dalších skenech vede ke vzniku redoxního páru  $p_{e1}/p_{e2}$ . Tato reakční cesta je komplikována množstvím mezomerních struktur fenoxo radikálu a dalších meziproductů, které mezi sebou mohou reagovat. Tyto procesy vedou ke vzniku dimerů až polymerních filmů pasivujících povrch elektrody<sup>8-11</sup>. Oxidační potenciály, vznik chinoidních struktur a pasivace elektrody je dána strukturou výchozí látky, prostředím a typem elektrody. Na obr. 1 je toto demonstrováno pro H-BDD a O-BDD elektrodu, kdy v případě oxidace fenolu na H-BDD nedochází k vývoji  $p_{e1}/p_{e2}$  signálu páru chinon/hydrochinon, zároveň je evidentní nižší míra pasivace v průběhu následných deseti cyklů v porovnání s 4-chlorfenolem, u kterého jsou signály  $p_{e1}/p_{e2}$  vyvinuty a rostou s počtem cyklů. Nižší míra pasivace je v souladu s hydrofobním charakterem H-BDD povrchu. Obecně k oxidaci studovaných fenolů na všech površích BDD docházelo při nižších potenciálech v zásaditě prostředí ve srovnání s kyselým. Voltametrické signály fenolických kyselin nebyly vyvinuty na elektrodě O-BDD v prostředí o pH 11,0, zřejmě vlivem elektrostatického odpuzování mezi částečně záporně nabitým povrchem O-BDD a dianionem studovaných kyselin (pKa karboxylové skupiny studovaných kyselin je ca 4,5). Dále byla pro testování vlivu substituentu v poloze *meta* nebo *para* na oxidační potenciál fenolů použita Hammettova korelace<sup>15</sup>. Nejvyšší korelační koeficient byl zjištěn pro povrchy p-BDD a H-BDD a prostředí o pH 11,0, tj. pro disociované formy fenolických sloučenin. Zdá se, že heterogenní kinetika přenosu elektronů není na p-/H-BDD inhibována, což ukazuje na zanedbatelné interakce mezi relativně hydrofobním povrchem a fenolátovými aniony. Potenciál jejich oxidace je tedy ovlivněn převážně elektronickými efekty specifického substituentu. Naproti tomu silné interakce studovaných substituovaných fenolů (tj. malá míra Hammetovy korelace) byly rozpoznány pro O-BDD povrchy, který nese parciální záporný náboj díky přítomným kyslíkovým funkčním skupinám. Oxidační potenciály studovaných methoxyfenolů neodpovídaly předpokládaným hodnotám dle hodnoty Hammetovy substituční konstanty  $\sigma_p$  zřejmě v důsledku odlišného mechanismu oxidace.

### Závěr

Předkládaná studie ukazuje výrazný vliv stavu povrchu BDD, prostředí a substituentů na parametry oxidace derivátů fenolu, stejně jako na míru pasivace povrchu. Předpověď ochoty derivátů fenolu k oxidaci na základě Hammetových substitučních konstant  $\sigma_p$  jednotlivých substituentů je vhodná pro p- a H-BDD povrchy, na kterých není přenos elektronu komplikován přítomností polárních funkčních skupin vázaných na povrch BDD. Výsledky studie mohou být využity při vývoji elektroanalytických metod pro detekci fenolických sloučenin, kdy tyto jsou známy jako problematické analyty právě kvůli pasivaci elektrodových povrchů. Vhodná úprava

povrchu elektrody může být využita k posunu potenciálu jednotlivých fenolů ať pro detekci v jejich směsích, či při detekci v přítomnosti ostatních interferentů v reálných maticích.



**Obr. 1.** Cyklické voltamogramy (A)  $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$  fenolu měřené na H-BDD v BR pufru o pH 11,0 a (B)  $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$  4-chlorfenolu měřené na O-BDD v BR pufru o pH 11,0. Zobrazeno je 10 cyklů měřených rychlosti skenu  $100 \text{ mV.s}^{-1}$ .

#### Acknowledgments

This research has been supported by Specific University Research (SVV 260690) and the Czech Science Foundation (project No. 23-05688S).

#### References

1. Yang N., Yu S., Macpherson J. V., Einaga Y., Zhao H. Y., Zhao G. H., Swain G. M., Jiang X.: *Chem. Soc. Rev.* **48**, 157 (2019).
2. Yu S., Liu S., Jiang X., Yang N.: *Carbon* **200**, 517 (2022).
3. Baluchová S., Daňhel A., Dejmková H., Ostatná V., Fojta M., Schwarzová-Pecková K.: *Anal. Chim. Acta* **1077**, 30 (2019).
4. Lourenco B. C., Brocenschi C. F., Medeiros R. A., Fatibello-Filho O., Rocha-Filho R.C.: *ChemElectroChem* **7**, 1291 (2020).
5. Suffredini H. B., Pedrosa V. A., Codognato L., Machado S. A. S., Rocha-Filho R. C., Avaca L. A.: *Electrochim. Acta* **49**, 4021 (2004).
6. Zavazalova J., Prochazkova K., Schwarzova-Peckova K.: *Anal. Lett.* **49**, 80 (2016).
7. Hutton L. A., Jacobini J. G., Bitziou E., Channon R. B., Newton M. E., Macpherson J. V.: *Anal. Chem.* **85**, 7230 (2013).
8. Gattrell M., Kirk D. W.: *J. Electrochem. Soc.* **140**, 1534 (1993).
9. Iniesta J., Michaud P. A., Panizza M., Cerisola G., Aldaz A., Cominellis C.: *Electrochim. Acta* **46**, 3573 (2001).
10. Narmadha M., Noel M., Suryanarayanan V.: *J. Electroanal. Chem.* **655**, 103 (2011).
11. Vosahlova J., Sochr J., Baluchova S., Taylor A., Svorc L., Schwarzova-Peckova K.: *Electroanalysis* **32**, 2193 (2020).
12. Markova E., Smyslova P., Macikova P., Skopalova J., Bartak P., *Chem. Listy* **106**, 195 (2012).
13. Muna G.W., Tasheva N., Swain G. M.: *Environ. Sci. Technol.* **38**, 3674 (2004).
14. Musilova J., Berek J., Peckova K.: *Electroanalysis* **23**, 1236 (2011).
15. Zuman P.: *Substituent Effects in Organic Polarography*. Springer New York, NY 1967.

## Possible Use of the Special Interface for Effective Potentiometric Measurements (Možné využití speciálního rozhraní pro efektivní potenciometrická měření)

Ladislav Novotný, Simona Uchytílová, Gabriela Kuchtová, Lenka Svašková, and Libor Dušek

University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Institute of Environmental and Chemical Engineering, Studentská 95, 532 10 Pardubice, Czech Republic,  
E-mail: nvt.l@seznam.cz

### Abstract

The possible use of the special interface for effective potentiometric measurements was verified. Monitoring potential  $E$  of the glass pH-electrode vs. Ag/AgCl (sat. KCl) as the reference using a multimeter for a period of 120 sec. (by the step 1 sec.) after inserting the pH-electrode into the buffered solutions of pH from 1.68 to 11.88 was performed. The standard deviation of the obtained values of  $E$ -medians ( $E_{med}$ ) was less than  $\pm 1.5$  mV. As to the monotonously changing experimental data  $E$  vs. time  $t$ , their fitting using Novotný's isotherm (or related equations) provided reasonably high correlation coefficients  $R^2$ .

**Keywords:** Potentiometry, Interface, Glass pH-electrode.

### Úvod

Je známo, že potenciometrie<sup>1</sup> je zejména díky své dostupnosti a velkému rozsahu aplikací zejména nejrozšířenější elektrochemickou metodou<sup>2,3</sup>. V oblasti ochrany prostředí a zdraví<sup>4,5</sup> tomu není jinak. Historicky navázala na první vlnu potenciometrie s využitím redox reakcí vlna druhá, založená na principech spojených s membránovými procesy, tedy zvláště s iontově selektivními elektrodami (ISE)<sup>6</sup>. Nicméně oba zmíněné principy si vyžadovaly využití měřících systémů obvykle v podobě ionometrů s vysokým impedančním vstupem. Užití běžných voltmetrů, resp. multimetrů pro daný účel nestačí, neboť i při jejich megaohmových odporech mohou přes měrné elektrody procházet elektrické proudy řádově např. desetín mikroampér, což jsou z hlediska funkčnosti a životnosti ISE hodnoty stále příliš vysoké. Přitom by byla přinejmenším v mnoha provozech vítána i možnost využít voltmetr nebo multimetr podle potřeby též např. pro potenciometrii s ISE. Při současně dostupnosti elektronických zapojení je jednou z poměrně snadno proveditelných variant možnost vřadit mezi ISE a multimetr elektronické rozhraní (interface, INTER), nejlépe v přiměřeně miniaturizované podobě. Několik variant takových rozhraní<sup>7,8</sup>, které by vyhovovaly požadavkům provozní sféry (na přiměřenou přesnost, reprodukovatelnost, spolehlivost a jednoduchost využití) bylo sice již nedávno navrženo i vyzkoušeno, nicméně se stalo potřebným a užitečným ověřit funkčnost alespoň vybraného vzorku INTER (např. v rámci diplomové práce) provedením velkého souboru měření. Předmětem tohoto sdělení jsou informace o podmínkách zmíněných měření, příkladech výsledků a o získaných poznatcích.

### Experimentální část

Měření byla provedena se zakázkově zhotoveným zkušebním rozhraním (s asistencí Eco-Trend Plus s.r.o., Praha) buď s paměťovou kartou micro SD nebo samostatně, bez paměťové karty a po zabudování do malého napětového napáječe. Elektrické napětí bylo snímáno pomocí multimetru (Uni-Trend Technology Co., Čína). Elektrody byly spolu se zásuvným míchadlem zavedeny do nádobky s roztokem, upevněné ve stojanu Eco-Tribo Polarografu (Eco-Trend Plus s.r.o., Praha). Otáčky zásuvného míchadla bylo možno upravovat regulátorem napětí na míchadle. V případě potřeby bylo použito míchání magnetickým míchadlem (typ IKA Werke GmbH and Co., KG, Německo) pod nádobkou a s průměrem topné desky 135 mm. Výsledky

byly shromažďovány, vynášeny a vyhodnocovány pomocí notebooku Dell Vostro 15 (Dell Technology, USA). Mezi další materiály patřily: skleněná kombinovaná pH-elektroda typ 2+MV (Elektrochemické detektory s.r.o., Turnov), merkurosulfová referenční elektroda typ 19-35+ (Elektrochemické detektory s.r.o., Turnov), stříbrná ISE typ 47-37 (Monokrystaly s.r.o., Turnov), sada pufrů pH 1,68 až 11,88 (Elektrochemické detektory s.r.o., Turnov), roztok 3 M KCl (Elektrochemické detektory s.r.o., Turnov); pevný dusičnan stříbrný byl čistoty p.a. (Penta s.r.o., Praha) a používaná demineralizovaná voda připravovaná na Univerzitě Pardubice měla vodivost lepší než 1 mS/m. Měření probíhala při laboratorní teplotě 295 K.

### Výsledky a diskuse

Výše zmíněné rozhraní, resp. interface INTER byl použit ve dvou uspořádáních<sup>7,8</sup>: V případě INTER 1 tvořil s ním multimetr spolu s pamětí jeden blok, v případě uspořádání INTER 2 šlo o oddělené zapojení elektrod a multimetru. Po celou dobu práce bylo pracováno s objemem 10 ml jednotlivých pufrů. Během 2 minut po zanoření elektrod byla snímána data závislosti potenciálu  $E$  na čase  $t$  a ukládána na paměťovou kartu. Následovalo stažení dat, opláchnutí detekční elektrody demineralizovanou vodou a opakování měření ve stejném pufru za stejných podmínek jako při předchozím měření. Celkem bylo měření s každým druhem pufru opakováno vždy desetkrát. Experimenty začínaly vždy od pufru s nejnižším pH, tedy 1,68 a pokračovaly až k pH 11,88. Na začátku a na konci měření byla vždy kontrolována teplota, která byla po celou dobu práce udržována v rozmezí  $294,15 \pm 0,5$  K. Postup měření s využitím iontově selektivní stříbrné elektrody Ag-ISE byl obdobný jako v případě skleněné pH-elektrody. Ag-ISE nebyla konstruována výrobcem v kombinované (kompaktní) podobě s referenční elektrodou, a proto byla do měřených roztoků zasunuta vedle Ag-ISE i referenční merkurosulfová elektroda Hg/Hg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) se solným můstkem 1 M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

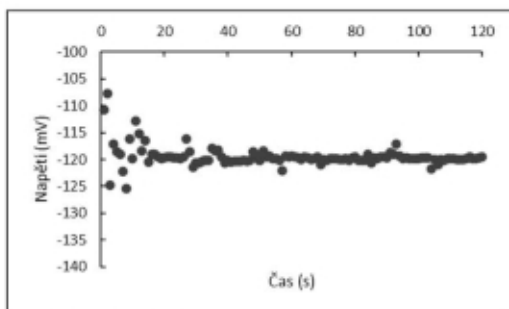
V souladu s předpoklady byly vždy bezprostředně po zasunutí pracovní (detekční) elektrody do roztoku pozorovány buď fluktuace nebo přibližně monotónní změny potenciálu  $E$  s časem  $t$  (Rovnice 1). To, která varianta nastane, záviselo mj. na historii využívání dané pracovní kombinované pH-elektrody.

$$E = E(t) \quad (1)$$

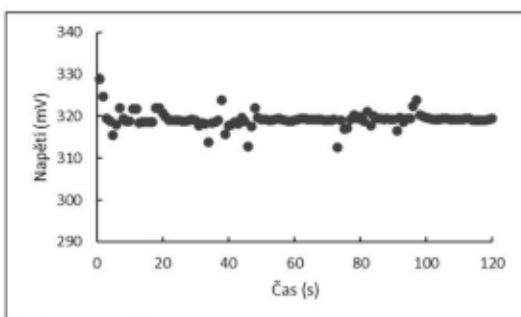
Jako příklad častého průběhu  $E$  vs.  $t$  lze uvést závislost na Obr. 1, zaznamenanou pro pH 9,18 (za podmínek uplatnění spodního magnetického míchadla při cca 6 otáček za 1 s).

K dosažení stavu, z něhož bylo pak možno snadno určit ustálenou hodnotu mediánu  $E_{med}$  stačilo počkat cca 20 s a  $E_{med}$  pak určit z hodnot mezi  $t = 20$  s a  $t = 120$  s. V řadě případů byl však během prvních 20 s patrný vliv monotónnějších změn hodnot  $E$  během jejich ustalování (Obr. 2).

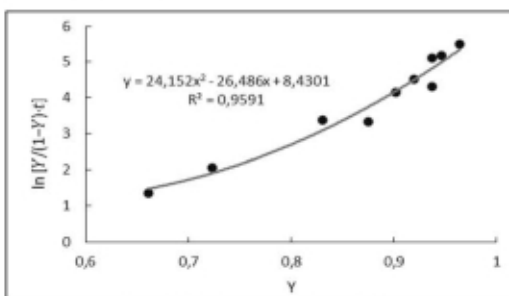
V případě výraznějšího monotónního průběhu  $E$ - $t$  během prvních 10-20 s bylo možné výsledky proložit např. zjednodušenou formou izotermie<sup>9</sup> dle rovnice (2), nebo „přibuzným“ vztahem dle rovnice (3). Tak tomu bylo např. při pH 10,01 za použití míchadla zasunutého shora. V tomto případě byly výsledky proloženy vyhovující jak rovnicí (2), tak rovnicí (3). Dokumentuje to i Obr. 3.



**Obr. 1.** Závislost  $E_i$  na  $t_i$  pro pH 9,18.



**Obr. 2.** Závislost  $E_i$  na  $t_i$  pro pH 1,68.



**Obr. 3.** Proložení dat za prvních 10 sekund pomocí Rovnice 2.

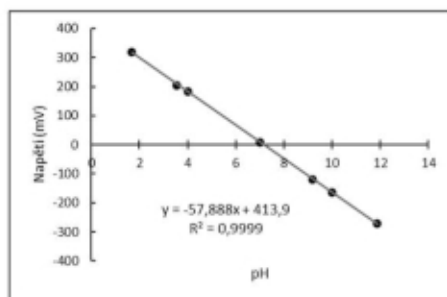
$$\ln \left[ \frac{Y}{(1-Y) \cdot t} \right] = A_0 + A_1 \cdot Y + A_2 \cdot Y^2 \quad (2)$$

kde  $Y = (E - E_1) / (E_m - E)$ ,  $E_1$  bylo  $E$  při  $t = 1$  s,  $E_m$  byl nastavený parametr (tj. limitní minimální nebo maximální hodnota  $E$  v čase  $t \rightarrow \infty$ ) a  $A_0$ ,  $A_1$ ,  $A_2$  byly optimalizované konstanty. V daném případě činily hodnoty  $E_1 = -157,3$  mV a  $E_m = -168,5$  mV.

$$\ln Y = \ln \frac{y}{y_m} = B_0 + B_1 \cdot \ln t + B_2 \cdot (\ln t)^2 \quad (3)$$

kde význam  $y_m$  a  $y = E_1$  (od  $E_1$  při  $t_1$ ) vs.  $t$  byl stejný jako u rovnice (2) a  $B_0$ ,  $B_1$ ,  $B_2$  byly rovněž vypočtené optimalizované parametry.

Správnou funkčnost celého uspořádání dokladovaly pak zejména lineární závislosti  $E_{med}$  na pH s absolutní hodnotou strmosti blízko 58 mV/pH (viz. Obr. 4). Podobné výsledky ověřující potřebnou funkčnost testovaného rozhraní byly získány i se stříbrnou ISE.



**Obr. 4.** Závislost  $E_{med}$  na pH s uvedením korelační rovnice a korelačního koeficientu.

### Závěr

Získané poznatky potvrdily provozní využitelnost rozhraní INTER. Snímání hodnot potenciálů  $E$  po dobu 120 sekund od ponoření pracovní elektrody (pH nebo Ag-ISE) umožňovalo velmi rychlé vyhodnocení ustálených mediánů potenciálů  $E_{med}$  s velmi dobrou opakovatelností do cca  $\pm 1,5$  mV, i při zahnutí neustálených hodnot  $E$  během prvních 20 s. Při vyhodnocování v oboru  $t \in (20; 120)$  byla tato opakovatelnost ještě výrazně lepší. Absolutní hodnoty strmosti  $E_{med}$  vs. pH byly nejčastěji mezi 57 a 58 mV/pH. Případně registrované monotónní změny  $E$  vs.  $t$  během prvních deseti až dvaceti sekund bylo možné proložit zjednodušenou izotermou nebo obdobnými závislostmi, při vysokých hodnotách korelačních koeficientů  $R^2$ .

### Acknowledgments

This research has been supported by the Student Grant Competition 2022 (SGS\_2023\_002), project SD373001/82/30352(2016) of the University Pardubice.

### References

1. Dvořák J., Koryta J., Boháčková V.: *Elektrochemie*. Academia, Praha 1975.
2. Scholz F.: *Electroanalytical Methods*. Springer, Berlin 2002.
3. Barek J., Opekar F., Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*. Karolinum, Praha 2005.
4. Pitter P.: *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT, Praha 1999.
5. Novotný L.: *Vztah zdraví a prostředí*. Výukové materiály, ÚEnviChI, FChT, Univerzita Pardubice, Pardubice 2022.
6. Koryta J., Štulík K.: *Iontové selektivní elektrody*. Academia, Praha 1984.
7. Novotný L.: Čs. Užitiný vzor, PUV 2014-30527, Praha 2014.
8. Novotný L., Petráňková R.: *Abalytical Lett.* 49, 161 (2016).
9. Novotný L.: *Dr.Sc.-Thesis*. AV ČR, Praha 1998.

**A Voltammetric Study of an Azo Dye Sudan I and its Metabolites in the Presence of NADPH**  
**(Voltametrická studie azo barvíva Sudan I a jeho metabolitů v přítomnosti NADPH)**

Anna Ondráčková<sup>a</sup>, Marie Stiborová<sup>†b</sup>, Helena Dračínská<sup>b</sup>, Luděk Havran<sup>a</sup>,  
Karolina Schwarzová-Pecková<sup>c</sup>, Miroslav Fojta<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic, e-mail: agna333@gmail.com

<sup>b</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Biochemistry, Albertov 6, 128 00 Prague 2, Czech Republic

<sup>c</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 6, 128 00 Prague 2, Czech Republic

<sup>†</sup> deceased (February 13<sup>th</sup>, 2020)

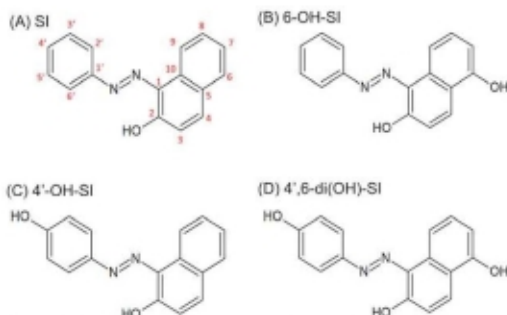
**Abstract**

Sudan I is metabolized via cytochrome P450-catalyzed hydroxylation in the presence of NADPH. In this work, we show that we can differentiate Sudan I from its hydroxylation metabolites (6-OH-SI, 4'-OH-SI and 4',6-di(OH)-SI) in the presence of NADPH using cyclic voltammetry on a basal plane pyrolytic graphite electrode.

**Keywords:** Sudan I, electrochemistry, voltammetry, pyrolytic graphite electrode, NADPH, hydroxylation, cytochrome P450

**Úvod**

Sudan I (SI; 1-phenylazo-2-naphthol, Obr. 1A) je azobarvivo, které je v průmyslu používáno jako oranžová barva pro vosky, plasty, oleje a leštidla<sup>1,2</sup>. U savců se SI metabolizuje v játrech pomocí mikrosomálního detoxikačního systému, během čehož je hydroxylováno cytochromem P450 (CYP) a cytochrom reduktázou za přítomnosti NADPH<sup>3</sup>. Během tohoto procesu vznikají různé hydroxylované metabolity, jako například 6-OH-Sudan I (6-OH-SI), 4'-OH-Sudan I (4'-OH-SI), a 4',6-diOH-Sudan I (4',6-di(OH)-SI); Obr. 1B-D.



**Obr. 1.** Chemické struktury Sudanu I a jeho hydroxylovaných metabolitů: (A) Sudan I, (B) 6-OH-Sudan I, (C) 4'-OH-Sudan I, (D) 4',6-di(OH)-Sudan I

**Experimentální část**

Sudan I (Merck, analytical standard grade) byl rozpuštěn a přechováván v ethanolu a uchováván v pokojové teplotě. Metabolity SI nám byly poskytnuty Katedrou biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova: 1-(4-hydroxyfenylazo)-naftalen-2-ol (4'-OH-SI), 1-(fenylazo)-naftalen-2,6-diol (6-OH-SI) a 1-(4-hydroxyfenylazo)-naftalen-2,6-diol (4',6-di(OH)-SI). Zásobní roztoky byly přechovávány v methanolu při 3 °C.

Pro elektrochemická měření byl použit Autolab analyzátor PGSTAT 20 (Ecochemie, Nizozemsko) v propojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) GPES 4.9 (Metrohm, Švýcarsko). Měřili jsme cyklickou voltametrií (CV) v tříelektrodeovém systému, kde jako pracovní elektroda sloužila na pracovišti vyrobená elektroda z pyrolytického grafitu v bazální orientaci ( $A = 4.00 \text{ mm}^2$ ), jako referenční elektroda Ag/AgCl/3 mol.l<sup>-1</sup> KCl a jako pomocná elektroda platinový drátek. Celkový objem měřeného roztoku byl 1.5 ml a pro každé měření bylo provedeno 5 skenů při rychlosti skenu 1 V.s<sup>-1</sup>.

SI a jeho metabolity byly změřeny zvlášť v BR pufru (pH 7) při finální koncentraci 5 μmol.l<sup>-1</sup>. Pak bylo přidáno do roztoku NADPH v konečné koncentraci 100 μmol.l<sup>-1</sup> a byla provedena další sada měření.

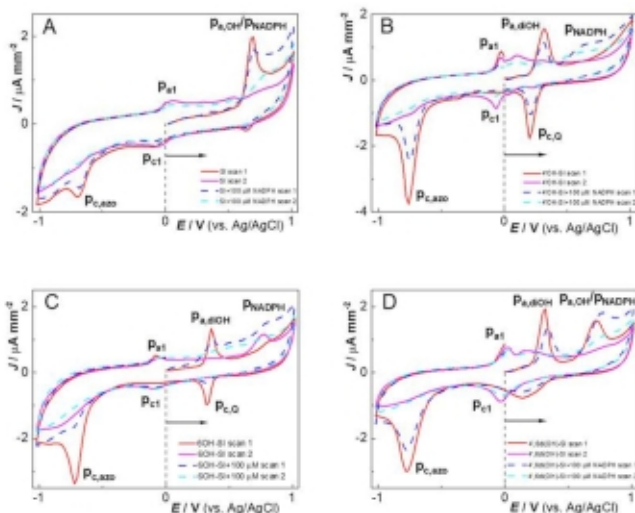
### Výsledky a diskuse

SI je v mikrozomech pod působením CYP/cytochrom reduktázy v přítomnosti NADPH přeměněn na 4'-OH-SI, 6-OH-SI (hlavní metabolity, 65% a 35%), a 4',6-di(OH)-SI (vedlejší metabolit, 5%). NADPH je na uhlíkových elektrodách oxidovatelný<sup>4</sup>, bylo tedy zapotřebí otestovat, zda by v případě analýzy produktů hydroxylačních procesů v reakčních směsích signál NADPH nezakrýval jejich specifické signály.

CV měření bylo započato anodickým skenem SI a/nebo jeho metabolitů bez a v přítomnosti 100 μmol.l<sup>-1</sup> NADPH (Obr.2). Anodický signál NADPH začínající přibližně při potenciálu +0.5 V různou měrou překrýval hlavní oxidační signály studovaných látek. Nejvýraznější interference byla pozorována mezi NADPH a SI, který je charakterizován oxidačním signálem v obr. 2A označeným jako  $p_{a,ox}$ . Ten byl, jakožto signál s nejvíce pozitivním potenciálem, v podstatě úplně překryt oxidačním píkem NADPH.

Nicméně všechny tři hydroxylované metabolity SI lze identifikovat i v přítomnosti NADPH, protože potenciál jejich hlavního oxidačního signálu  $p_{a,OH}$  (6-OH-SI) a  $p_{a,6OH}$  (ostatní dva) jsou pozorovatelné už okolo +0.4 V. Ostatní signály charakteristické pro tyto metabolity se také dají snadno identifikovat, protože NADPH za daných podmínek neposkytuje žádný další signál v měřeném potenciálovém okně bPGE, který by se signály studovaných metabolitů SI interferoval.





**Obr. 2.** Voltamtrické měření SI a jeho metabolitů bez a v přítomnosti NADPH (100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ): (A) Sudan I, (B) 6-OH-Sudan I, (C) 4'-OH-Sudan I, (D) 4',6-di(OH)-Sudan I

#### Závěr

V důsledku vzájemné interference (překryvu oxidačních potenciálů SI a NADPH) jsme v anodickém skenu nebyli schopni pozorovat signály SI a NADPH současně. Byli jsme však schopni detekovat hydroxylované produkty SI (které dávají oxidační piky v pozitivnějších potenciálech ve srovnání se SI a NADPH) v roztoku obsahujícím NADPH.

#### Acknowledgments

This work has been supported by a CSF grant No. 23-05688S.

#### References

1. Du Y. N., Li S. C., Mi X. X., Zheng X. C., Chen G.: *Asian J. Chem.* **26**, 951 (2014).
2. Chailapakul, O., Wongsawat W., Siangproh W., Grudpan K., Zhao Y., Zhu Z.: *Food Chem* **109**, 876 (2008).
3. Stiborová M., Martinek V., Rýdlová H. R., Hodek P., Frej, E.: *Cancer Research* **62**, 5678 (2002).
4. Braun R. D., Santhanam K. S. V., Elving, P. J.: *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 2591 (1975).

## Electromembrane Mini-extraction On-line Connected to Capillary Electrophoresis (Elektromembránová mini-extrakce přímo spojená s kapilární elektroforézou)

František Opekar<sup>a</sup> and Petr Tůma<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 2030,  
128 43 Prague 2, Czech Republic, E-mail: opekar@natur.cuni.cz

<sup>b</sup> Charles University, Third Faculty of Medicine, Department of Hygiene, Ruská 87,  
100 00 Prague 10, Czech Republic, E-mail: petr.tuma@lf3.cuni.cz

### Abstract

A flow-through probe with a small internal volume of 1.1  $\mu\text{L}$  for electromembrane extraction across a supported liquid membrane is described, allowing direct coupling to capillary electrophoresis with a short separation capillary. Basic metabolites such as creatinine, lysine, arginine, and the anesthetic ketamine are extracted from laboratory samples at different pHs of the donor and from human urine. The calibration dependencies for all substances are linear. Achieved enrichment factors, at an extraction voltage of 150 V and an extraction time of 300 s, were 6, 4, and 16 for creatinine, arginine, and ketamine, respectively. The extraction efficiency for ketamine does not depend on the pH of the sample solution, which allows direct extraction of the anesthetic from untreated urine. Inorganic ions from the urine matrix are effectively eliminated. The probe is reusable.

**Keywords:** Electromembrane extraction, Electrophoresis, Short capillary, Creatinine, Lysine, Arginine, Ketamine, Human urea.

### Úvod

Vzorky, především z oblasti biochemické, klinické, potravinářské a environmentální oblasti mají zpravidla složitou matici. Jejich instrumentální analýze je proto obvykle předřazena účinná extrakční technika, která odseparuje nežádoucí složky matrice. S výhodou jsou používány techniky, které současně umožní nakoncentrování analytu. Jednou z takových technik je Electro-Membrane Extraction (EME)<sup>1</sup>, zpravidla prováděná v uspořádání, kde uvnitř dutého vlákna z porézního polymerního materiálu s póry vyplněnými ve vodě nerozpustnou extrakční kapalinou, tzv. Supported Liquid Membrane (SLM), je akceptorový roztok. Trubička je ponořena do roztoku vzorku (donorový roztok). V donoru a akceptoru jsou elektrody na něž je vloženo extrakční napětí a látky podle svého charakteru (hydrofóbnost, rozpustnost ve vodě a v membránové kapalině, struktura, molekulová hmotnost) a podle pH donoru a akceptoru jsou více či méně transportovány přes SLM z donoru do akceptoru. V klasickém provedení, je ve většině aplikací EME ve formátu off-line, tj. po ukončení extrakce je akceptorový roztok manuálně převeden do analytické aparatury – viz přehledové články z poslední doby<sup>1,2</sup> a citace tam uvedené. Při extrakci za vhodně zvolených extrakčních podmínek dochází nejen k účinné separaci analytu, ale při extrakci do malého objemu akceptoru i k jeho nakoncentrování.

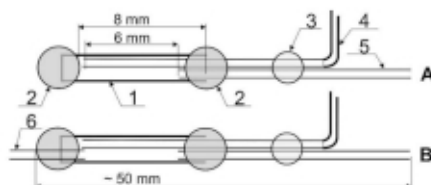
V předkládané práci je navržena a testována průtoková extrakční sonda, která umožňuje provedení EME ve formátu on-line, tj. extrakce je přímo spojena s kapilární elektroforézou (CE), a umožňuje i nakoncentrování analytu v akceptoru. Testovány byly vzorky obsahující a) kreatinin (Crea) a bazické aminokyseliny, lysin (Lys) a arginin (Arg), b) obsahující ketamin. Tyto látky byly extrahovány jak z vodných roztoků, tak i z lidské moči.

### Experimentální část

**Extrakční sonda:** Design sondy byl inspirován pasivní mikrodialyzační sondou používanou při klinických experimentech pro *in vivo* dialýzy<sup>3,4</sup>. Postup na její zhotovení je na obr. 1A. Membránou je porézní polypropylenová trubička (Accurel, Membrana GmbH, Německo), ID

600  $\mu\text{m}$ , tloušťka stěny 200  $\mu\text{m}$ , průměr pórů 0,2  $\mu\text{m}$ , délka 8 mm). Jeden její konec je uzavřen tavným lepidlem. Do druhého konce jsou vsunuty do hloubky asi 2 mm vstupní a výstupní kapilára (Composite Metal Services, UK), ID 220  $\mu\text{m}$ , OD 350  $\mu\text{m}$  tak, že vstupní kapilára je o 6 mm delší než kapilára výstupní. Kapiláry jsou v trubičce utěsněny rovněž tavným lepidlem. Vnitřní objem sondy určený z geometrických rozměrů je 1,1  $\mu\text{L}$ . SLM je vytvořena ponořením takto zhotovené sondy do membránové kapaliny na dobu 10 s, nadbytek roztoku byl oťfen netkanou tkaninou. Pro vzorky a) byla membránovou kapalinou směs 85 % nitrofenyl oktyl etheru (NPOE) a 15 % bis(2-ethylhexyl) fosfoniová kyselina (DEHP), a pro vzorky b) čistý NPOE.

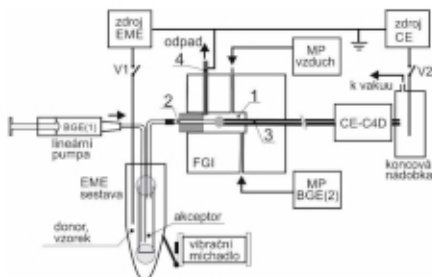
Obdobným způsobem byla připravena testovací sonda, obr. 1B, v níž je před uzavřením toho konce porézní trubičky, do nějž nejsou vsunuty vstupní a výstupní kapiláry, vložena kapilára pro přívod vzorku. Touto kapilárou lze plnit vnitřní prostor sondy (o stejném objemu jako má extrakční sonda) přímo roztokem vzorku např. pomocí injekční mikrostříkačky. Na porézní trubičku v tomto případě není aplikována membránová kapalina.



**Obr. 1.** Schéma průtokové extrakční sondy (A) a testovací sondy s přímým vstupem (B). 1 – extrakční membrána, 2 – tavné lepidlo, 3 – fixace kapilár, kapka UV tvrditelného lepidla, 4 – přívodní kapilára, 5 – výstupní kapilára, 6 – přímý vstup do testovací sondy.

*Aparatura a pracovní postup:* Schéma aparatury je na Obr. 2. Extrakční sonda je vstupní kapilárou je spojena s lineární pumpou a naplněna akceptorovým roztokem, který je zároveň základním elektrolytem (BGE) pro CE separace. Poté je vložena do nádobky s 1,5 ml roztoku vzorku. EME je zahájena zapnutím zdroje pro EME. Po dobu extrakce je nádobkou vibračně mícháno. Po uplynutí nastavené doby extrakce je extrakční napětí vypnuto a zapnuta lineární pumpa, která proudem BGE(1) vytlačuje výstupní kapilárou akceptorový roztok z extrakční sondy do Flow Gating Interface (FGI); je použito tzv. „air-assisted“ interface<sup>5</sup>. Po definované době (určeno experimentálně), kdy ze vstupní FGI kapiláry vytéká kolem vstupu separační CE kapiláry akceptorový roztok obsahující vyextrahovaný analyt, je z dávkovacího prostoru FGI vytlačen proudem vzduchu roztok do odpadu. V prázdném prostoru se mezi výstupem vstupní a vstupem separační kapiláry vytvoří kapka akceptorového roztoku, z níž je podtlakovým pulzem generovaným v koncové nádobce vzorek nadávkován. Lineární pumpa je poté zastavena, dávkovací prostor naplněn BGE(2) a zahájena CE separace zapnutím zdroje pro CE. Extrakce byly prováděny napětím 150 V a po dobu 300 s. Stejným způsobem byl vzorek dávkován do separační kapiláry i při použití testovací sondy plněné injekční stříkačkou, tj. bez EME.

Elektroforetické separace byly prováděny v laboratoři zhotovené aparatuře v křemenné kapiláře, OD 380  $\mu\text{m}$ , ID 25  $\mu\text{m}$ , délka celková/k detektoru 22/11,5 cm, při napětí/proudu 10 kV/2,2  $\mu\text{A}$ . Koncová nádobka je spojena buď s atmosférou při separaci nebo s vakuovou pumpou při dávkování nebo promývání kapiláry. BGE byl vodný roztok 500 mM kyseliny octové (AcOH), pH 2,58.



**Obr. 2.** Schéma on-line EME-CE aparatury s „air-assisted“ FGI. 1 – dávkovací prostor, 2 – vstupní kapilára, 3 – separační kapilára, 4 – nerezová odpadní kapilára a současně společná (zemnicí) elektroda EME i CE systému. MP jsou membránové pumpy, BGE(1) a BGE(2) je stejný roztok, jehož průtok aparaturou je řízen dvěma pumpami. Popis činnosti viz text.

**Chemikálie a roztoky:** Kalibrační roztoky standardů Crea, Lys a Arg v koncentračním rozsahu 5 až 100  $\mu\text{M}$  byly připraveny v BGE, roztoky ketaminu byly připraveny v koncentračním rozsahu 5–80  $\mu\text{M}$  v maticích obsahujících nadbytek sodných iontů, jak tomu bývá často v biologických či fyziologických vzorcích – kyselá matrice 100 mM AcOH + 100 mM NaCl (pH 2,77), neutrální matrice 200 mM AcOH + 100 mM NaOH (pH 7,52) a bazická matrice 50 mM tetraboritan sodný (pH 9,18). Lidská moč získaná od dobrovolníka byla ihned po odběru zfiltrovaná PVDF filtrem o porozitě 0,45  $\mu\text{m}$  a před EME analýzou zředěna BGE 1:50 pro extrakci Crea a aminokyselin; pro EME ketaminu byla použita nefeděná moč. Veškerá měření probíhala při laboratorní teplotě. Statistická hodnocení byla zpravidla ze tří opakovaných měření na hladině významnosti 0,95.

## Výsledky a diskuse

**Extrakce látek z laboratorních vzorků:** Závislost ploch pík na koncentraci při přímém dávkování s použitím testovací cely a po EME byly pro všechny analyty lineární v celém testovaném koncentračním oboru. Parametry kalibračních rovnic pro kreatinin a aminokyseliny jsou shrnuty v Tabulce I. Faktor obohacení je podílem konečné koncentrace v akceptoru po provedené EME,  $c_a$ , a počáteční koncentrace v donoru,  $c_d$ .

### Tabulka I.

Parametry kalibračních závislostí kreatininu, argininu a lysinu při přímém dávkování s použitím testovací sondy a po EME 300 s, 150 V. Roztoky v koncentračním rozsahu 5 až 100  $\mu\text{M}$  byly připraveny v BGE, akceptorový roztok 500 mM AcOH.

Parametr	Crea	Arg	Lys
Přímé dávkování			
$10^3 \times$ směrnice, mVs	9,18 $\pm$ 0,14	12,94 $\pm$ 0,41	12,93 $\pm$ 0,41
$10^3 \times$ úsek, mV	29,12 $\pm$ 17,0	*	*
$R^2$	0,999	0,997	0,996
LOD, $\mu\text{M}$	5,2	7,4	8,4
EME			
$10^3 \times$ směrnice, mVs	44,49 $\pm$ 2,05	33,67 $\pm$ 0,16	11,66 $\pm$ 0,56
$10^3 \times$ úsek, mV	*	14,63 $\pm$ 0,92	*
$R^2$	0,994	0,991	0,991
LOD, $\mu\text{M}$	7,7	12,6	12,5
Faktor obohacení, $c_a/c_d$	6,4 $\pm$ 0,7	3,7 $\pm$ 0,9	$\approx$ 1

\*) Nulová hodnota úseku je uvnitř intervalu spolehlivosti.

Ketamin byl extrahován z kyselého, neutrálního a alkalického roztoku. Bylo zjištěno, že bez ohledu na to, zda je v donorovém roztoku ketamin protonizován nebo jako neutrální molekula, výsledky EME jsou v rámci intervalu spolehlivosti stejné, jak je patrné z Tabulky II. To je významné především při extrakcích látek z klinických či farmaceutických vzorků, protože vzorek nemusí být jakkoli upravován a riziko jeho případné modifikace přidanými činidly je vyloučeno. Parametry kalibračních závislosti ketaminu jsou v Tabulce III.

### Tabulka II.

Plochy piků a RSD (%) v závorce pro extrakci ketaminu z různých matic. Koncentrace ketaminu v donoru 20 μM, akceptorový roztok 500 mM AcOH.

Matrice vzorku	Přímé dávkování, mV.s	EME (300 s, 150 V), mV.s
100 mM AcOH + 100 mM NaCl, pH 2,77	0,34 ± 0,07 (8,7)	5,52 ± 0,85 (6,9)
200 mM AcOH + 100 mM NaOH, pH 7,52	0,26 ± 0,09 (16,6)	6,57 ± 1,03 (7,1)
50 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> , pH 9,18	0,25 ± 0,07 (12,3)	5,55 ± 1,10 (9,0)

### Tabulka III.

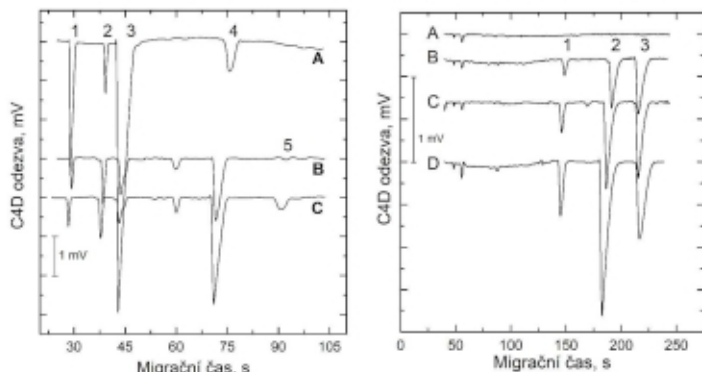
Parametry kalibračních závislosti ketaminu při přímém dávkování s použitím testovací sondy a po EME 300 s, 150 V. Roztoky v koncentračním rozsahu 2 až 80 μM byly připraveny ve 100 mM AcOH + 100 mM NaCl.

	Parametr	Ketamin
Přímé dávkování	10 <sup>3</sup> x směrnice, mVs	17,00 ± 0,10
	10 <sup>3</sup> x úsek, mV	*
	R <sup>2</sup>	0,997
	LOD, μM	5,7
EME	10 <sup>3</sup> x směrnice, mVs	245 ± 7
	10 <sup>3</sup> x úsek, mV	194 ± 168
	R <sup>2</sup>	0,997
	LOD, μM	1,06
Faktor obohacení, c <sub>2</sub> /c <sub>1</sub>		16,3 ± 3,3

\*) Nulová hodnota úseku je uvnitř intervalu spolehlivosti.

*Extrakce látek z lidské moči:* Elektroferogramy zředěné moči bez extrakce, tj. po přímém dávkování s použitím testovací sondy a po EME jsou na obr. 3. Evidentní je podstatné snížení koncentrace matričních anorganických kationtů a zvýšení koncentrace kreatininu a argininu. Metodou standardního přídatku byl stanoven kreatinin 1243 ± 134 mg L<sup>-1</sup> a arginin 12,9 ± 4,4 mg L<sup>-1</sup>. Obě nalezené hodnoty jsou v rozsahu koncentrací běžně se vyskytujících v lidské moči<sup>6</sup>, kreatinin 670–1250 a arginin 7–40 mg L<sup>-1</sup>. Za používaných experimentálních podmínek nedocházelo k obohacení akceptorového roztoku o lysin.

Elektroferogramy akceptorového roztoku po EME neupravené moči s přidavkem ketaminu – a pro ilustraci se dvěma dalšími bazickými drogami, které se při testování EME v biologických tekutinách často používají, jsou na obr. 4. Ve srovnání s výsledkem extrakcí na obr. 3 je zřejmé, že matriční anorganické ionty jsou zcela eliminovány. To je dáno tím, že membránová kapalina je v tomto případě čistý NPOE, který umožňuje transport hydrofobních drog (v závorkách jsou hodnoty log P) ketaminu (3,12), metadonu (3,93) a haloperidolu (4,3) a brání transportu iontů. Při EME výrazně hydrofilnějšího kreatininu (-1,76) a argininu (-4,2) musí být v membránové kapalině přítomno iontově párové činidlo (DEHP), které částečně zvyšuje propustnost membránové kapaliny pro anorganické ionty.



**Obr. 3.** Elektroferogram zředěné lidské moči po přímém dávkování (A), po EME 300 s, 150 V (B) a po standardním přidávku 1000 mg L<sup>-1</sup> kreatininu a 100 mg L<sup>-1</sup> argininu. Identifikace píků: 1 – K<sup>+</sup> + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 2 – Ca<sup>2+</sup>, 3 – Na<sup>+</sup> + Mg<sup>2+</sup>, 4 – Crea, 5 – Arg.

**Obr. 4.** Elektroferogram akceptorového roztoku po EME 300 s, 150 V neupravené lidské moči (A), a po přidání bazických drog o koncentraci 2,5 μM (B), 5 μM (C) a 10 μM (D). Identifikace píků: 1 – ketamin, 2 – metadon, 3 – haloperidol.

### Závěr

Z provedených měření je zřejmé, že popsaná sonda je použitelná pro EME látek se složitou maticí. Je použitelná opakovaně, např. pro celodenní měření. Paměťový efekt způsobený látkami zachycenými v membránové kapalině lze spolehlivě eliminovat jednorázovou několikaminutovou EME v čistém donorovém roztoku před následnou extrakcí. Průtokové uspořádání eliminuje možné problémy při manuálním přenášení akceptorového roztoku z EME aparatury do aparatury analytické. Vzhledem k malému objemu sondy dochází k nakoncentrování analytu, přičemž úbytek analytu z roztoku vzorku je kolem 1 %. Je tak splněna podmínka pro tzv. soft EME. Roztok vzorku tak může být analyzován opakovaně či použit pro další experimenty.

### Acknowledgments

The financial support from the Czech Science Foundation (22-22-398S) is gratefully acknowledged.

### References

- Huang C., Chen Z., Gjelstad A., Pedersen Bjergaard S., Shen X.: *Trends Anal. Chem.* **95**, 47 (2017).
- Drouin N., Kubáň P., Rudaz S., Pedersen-Bjergaard S., Schappler J.: *Trends Anal. Chem.* **113**, 357 (2019).
- Saylor R.A., Lunte S.M.: *J. Chromatogr. A* **1382**, 48 (2015).
- Nandi P., Lunte S.M.: *Anal. Chim. Acta* **651**, 1 (2009).
- Opekar F., Tůma P.: *Electrophoresis* **40**, 587 (2019).
- Putnam D.F., Report No. NASA CR-1802, McDonnell Douglas Astronautic company, Huntington Beach, California.

## Screen-Printed Electrodes Modified with Electrochemically Oxidized 3-Aminobenzoic Acid: Characterization and Application

Eva Pospíšilová <sup>a</sup>, Miroslava Trchová <sup>b</sup>, Radek Fajgar <sup>c</sup>, Jan Kočí <sup>d</sup>, and Tatiana V. Shishkanova <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Engineering, University of Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, 166 28 Praha 6, Czech Republic,  
E-mail: pospisae@vscht.cz

<sup>b</sup> Central Laboratory, University of Chemistry and Technology in Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic,

<sup>c</sup> Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Process Fundamentals of the Czech Academy of Sciences, Rozvojová 135, 165 02 Prague 6, Czech Republic

<sup>d</sup> Department of Electrotechnology, Faculty of Electrical Engineering, Czech Technical University in Prague, Technická 1902/2, 166 27 Prague 6, Czech Republic

### Abstract

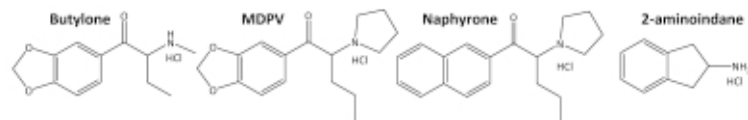
Screen-printed electrodes modified with an oligomeric film derived from 3-aminobenzoic acid (o-3ABA/SPEs) were characterized by imaging and spectroscopy techniques and applied for new psychoactive substances (NPSs) detection. Studies of o-3ABA/SPEs were carried out in comparison to polyaniline-modified ones (PANI/SPEs). It was found that *i*) the polymerization occurs through amino moiety, *ii*) the carboxylic group determines the selectivity of o-3ABA toward NPSs, *iii*) the highest affinity was obtained for o-3ABA - secondary cathinone ( $K_{\text{ads}}(\text{butylone})=6.12 \cdot 10^5$ ) and PANI - aminoindane ( $K_{\text{ads}}(2\text{-aminoindane})=1.07 \cdot 10^4$ ). This work presents the determination of butylone in oral fluid and demonstrates the advantages of the modified SPEs.

**Keywords:** Screen-printed electrodes, 3-Aminobenzoic acid, Characterization, Electrochemical impedance spectroscopy, New psychoactive substances.

### Introduction

Screen-printed electrodes (SPEs) play a major role in electroanalytical chemistry, as their production is inexpensive and offers a sensor design that is applicable outside the laboratory. Although SPE fabrication allows altering the composition of printing inks for improved detection of specific analytes, more frequently, the modification of the manufactured electrode is made in a laboratory <sup>1</sup>. The modified SPEs have been utilized in various fields <sup>2</sup>, including forensic ones for synthetic cathinone detection <sup>3,4</sup>. Synthetic cathinones are used as a 'legal' alternative to ecstasy and thus pose a significant threat to their users. For their detection, chromatography coupled with mass spectrometry is commonly deployed, but these methods are expensive, time-consuming, and difficult to apply outside the laboratory <sup>5</sup>. Electrochemical sensors based on SPEs might provide a fast and reliable alternative for their on-site detection. The successful development of a new sensor requires the choice of a suitable receptor that will provide selective responses to the analyte. Recently, the carboxylic groups of the electrochemically oxidized 3-aminobenzoic acid (3ABA) have been used for the detection of nitrogen compounds <sup>6,7</sup> and covalent binding of selective receptors <sup>8,9</sup>. Herein, we used the carboxylic groups of 3ABA oligomers (o-3ABA) deposited on the graphite SPE (G/SPE) as a binding scaffold for interaction with protonated amino derivatives of new psychoactive substances (NPS, Fig. 1). First, the repeatability of electrochemical deposition of o-3ABA on the surface of G/SPEs was investigated. Then scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive spectroscopy (EDS), and dispersive Raman spectroscopy were applied to

characterize the modified G/ and Au/SPE surface. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was used to detect two chosen NPSs in both model and/or oral fluid samples.



**Fig. 1.** Structure of the new psychoactive substances tested in this study.

## Experimental

Butylone, methylenedioxypyrovalerone (MDPV), and naphyrone, all in the forms of hydrochlorides, were acquired by Forensic Laboratory of Biologically Active Substances (University of Chemistry and Technology, Prague) from Alfarma s.r.o. 3-Aminobenzoic acid (98 %, 3ABA), aniline hydrochloride (97 %) and 2-aminoindane hydrochloride (98 %, 2-AI) were obtained from Sigma-Aldrich (USA). Inorganic compounds used for electrochemical measurements were from Lach-Ner, Czech Republic. The solutions were prepared using distilled water.

The voltammetric and impedance measurements were carried out using PalmSens 3 (PalmSens BV, Netherlands) with the PSTrace 5.4 program. Two kinds of SPEs were used, namely graphite (G/SPE) and gold (Au/SPE) for the electrochemical and spectroscopic studies (BVT Technologies, Czech Republic), respectively. Both SPEs used are composed of working (0.79 mm<sup>2</sup>) and auxiliary graphite/gold electrodes and Ag/AgCl pseudoreference electrode. Before use, the SPE electrodes were activated in phosphate buffer (pH 8) containing 0.1 M KCl by cyclic voltammetry (CV); potential window 0.0–1.5 V, scan rate 100 mV/s, 40 cycles. For the electrochemical modification, the SPEs were submerged in the polymerization mixture (50 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 10 mM 3ABA /or aniline hydrochloride) and the potential was scanned in the range from –0.1 V to 1.2 V with 50 mV/s scan rate for 5 scans.

The SEM images were recorded on a TESCAN Vega 3XMU InduSem (Tescan Orsay, Czech Republic) scanning electron microscope operating at the accelerating voltage of 30 kV with a tungsten electron gun at a chamber pressure of 7·10<sup>-3</sup> Pa. The SPEs were coated with a thin chromium film before the SEM measurements. The EDS measurements carried out with TESCAN Vega 3 LMU (Tescan Orsay, Czech Republic) were used to obtain micro-X-ray elemental map of un- and o-3ABA modified G/SPE (accelerating voltage of 10 kV, working distance 15 mm).

Raman spectra were collected using a Thermo Scientific DXR Raman microscope equipped with a 780 nm line. The spot size of the lasers was focused by 50× objective. The scattered light was analyzed by a spectrograph with holographic grating 1200 lines per mm and a pinhole width of 50 μm. The acquisition time was 10 s with 10 repetitions.

The EIS spectra of the modified G/SPEs were collected in 0.1 M KCl containing 5 mM[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> (redox couple), with/without analytes of interest at 0.0 V in the frequency range of 100 kHz to 100 mHz, with the amplitude of the applied sine-wave potential being 10 mV. For the fitting of the EIS spectra, the EIS Analyzer was used with the equivalent circuits consisting of the electrolyte resistance (*R<sub>s</sub>*) in series with the constant phase element (CPE) and the charge-transfer resistance (*R<sub>ct</sub>*) in parallel for polyaniline (PANI) modified G/SPE. In the case of o-3ABA/G/SPE, Warburg impedance (*W*) describing the



diffusional resistance element was added in parallel. The adsorption constant ( $K_{ads}$ ) values were calculated using the Langmuir adsorption model.

### Results and discussion

The selectivity of the unmodified G/SPE is restricted due to the overlap of the NPS signal that belongs to the same category<sup>10</sup>. To improve the G/SPE selectivity, their surface was modified with o-3ABA. In parallel, the surface of G/SPEs was modified with a polymeric film derived from aniline (PANI) for comparison. The CV-voltammograms of the polymerization are described in detail elsewhere<sup>11</sup>. To estimate the repeatability of the oxidation process on the electrode surface, the current densities of the individual peaks were calculated at the chosen potentials on the CV-voltammograms (Table I).

**Table I.**

Comparison of parameters obtained from cyclic voltammograms recorded at electrochemical oxidation of 3-aminobenzoic acid and aniline on the G/SPE ( $n \leq 9$ )

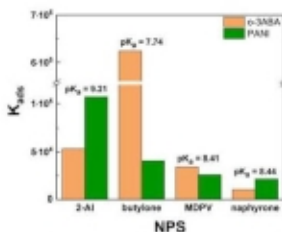
3-ABA	Anodic peaks				Cathodic peak	
	$E_1$		$E_2$		$E_3$	
	Scan 1	Scan 5	Scan 1	Scan 5	Scan 1	Scan 5
E (V); RDS (%)	0.88±0.03; 3.58	1.00±0.01; 1.37	–	0.47±0.02; 3.99	0.39±0.01; 2.26*	0.38±0.02; 5.49
Current density ( $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ ); RSD (%)	7.46±1.34; 17.98	1.44±0.42; 28.88	–	N <sup>b</sup>	N <sup>b</sup>	N <sup>b</sup>
Aniline	Anodic peaks				Cathodic peak	
	$E_1$		$E_2$		$E_3$	
	Scan 1	Scan 5	Scan 1	Scan 5	Scan 1	Scan 5
E (V); RDS (%)	0.94±0.02; 2.41*	0.96±0.02; 1.65	–	0.35±0.01; 2.37	0.29±0.01; 4.53	0.29±0.01; 3.85*
Current density ( $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ ); RSD (%)	18.48±4.50; 24.36	N <sup>b</sup>	–	N <sup>b</sup>	1.87±0.52; 27.97	2.68±0.62; 23.29

<sup>a</sup>  $n=8$ , one value was excluded after the application of the Dean-Dixon outlier test

<sup>b</sup> the obtained data were not repeatable

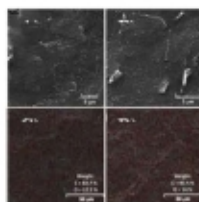
In the first scan, the peaks at  $E_1=+0.88\text{V}$  and  $+0.94\text{V}$  corresponded to oxidation of the amino moiety of 3ABA and aniline, respectively. In the following scans, one anodic peak ( $E_2=+0.47\text{V}$  for 3ABA and  $+0.35\text{V}$  for aniline) and one cathodic peak ( $E_3=0.39\text{V}$  for 3ABA and  $+0.29\text{V}$  for aniline) were observed. Obviously, the characteristic potentials for oxidation of both 3-ABA and aniline were repeatable, the current density values varied from electrode to electrode.

Next, the surface of o-3ABA and PANI modified G/SPEs was characterized using SEM and EDS techniques (Fig. 2). Both o-3ABA and PANI showed clustered grainy structure which has been noted in literature<sup>12,13</sup>. Measurements by EDS revealed a slight increase of oxygen content for o-3ABA/G/SPEs in comparison to unmodified G/SPE (Fig 3C, D) which might be pointing at the presence of carboxylic groups on the modified electrode surface. The dispersive Raman spectroscopy revealed that *i*) the polymerization of 3ABA and aniline occurred through the amino group, *ii*) the band at  $1386\text{ cm}^{-1}$  belongs to the  $\text{COO}^-$  symmetric stretching vibrations characteristic for undamaged carboxylic groups of 3ABA, *iii*) the result of electrochemical oxidation is the formation of a thin polymeric film of PANI and an oligomeric film of o-3ABA.



**Fig. 2.** The SEM micrographs of graphite screen-printed electrodes after deposition of o-3ABA (A) and PANI (B); Micro-X-ray elemental map of graphite screen-printed electrode before (C) and after deposition of o-3ABA (D).

Then the EIS technique was used to investigate the affinity between o-3ABA and various amino derivatives of chosen NPS using  $K_{ads}$  (Fig. 3). Unlike PANI, the o-3ABA layer was able to discriminate between all the chosen NPS and showed the highest affinity for secondary amine (butylone). The determination of both 2-AI and butylone was carried out in the spiked model and oral fluid samples (Table II). The determined concentration ( $c = 1.0 \cdot 10^{-6}$  M) corresponded to the real concentration of secondary synthetic cathinone (mephedrone) in oral fluid after consumption<sup>14</sup>. It was found that the determination of both butylone and 2-AI was possible with both o-3ABA and PANI-modified SPEs.



**Fig. 3.** Comparison of affinity between o-3ABA/PANI films deposited on graphite screen-printed electrode and the chosen NPS using adsorption constant values.

**Table II.**

The results of determination of the chosen psychoactive substances ( $c = 1.0 \cdot 10^{-6}$  M) using the EIS technique with the experimental modified SPEs ( $n=5$ ).

Sample	Electrode	NPS	Determined (M)	RSD (%)	Recovery (%)
Model sample	o-3ABA	2-aminoindane	$(9.95 \pm 0.40) 10^{-7}$	4.1	99.5
		Butylone	$(1.02 \pm 0.07) 10^{-6}$	6.4	102.0
	PANI	2-aminoindane	$(1.02 \pm 0.05) 10^{-6}$	5	102.4
		Butylone	$(1.10 \pm 0.18) 10^{-6}$	16	110.3
Oral fluid	o-3ABA	Butylone	$(1.03 \pm 0.05) 10^{-6}$	4.9	103.0
	PANI	Butylone	$(1.10 \pm 0.18) 10^{-6}$	3.9	99.1

Table III compares the proposed method and ones known from the literature for the determination of butylone in real samples. Undoubtedly, the UHPLC-MS/MS technique is capable to provide the lowest detection limits but is only applicable in a laboratory. The use of modified SPEs connected to portable instrumentation is a way for an on-site application.

**Table III.**

Comparison of the proposed sensors with the other electrochemical methods used for the detection of butylone.

No.	Detection method, sensor	Sample	Determined concentration ( $\mu\text{M}$ )	Reference
1	UHPLC-MS/MS	Oral fluid	0.003	15
2	SWV, G/SPE	Website samples	10.0	16
3	EIS, o-3ABA/ or PANI/G/SPE	Oral fluid	1.0	This work

### Conclusions

The SPEs were modified with o-3ABA and PANI films. The deposition of oligomers/polymer films on the G/SPE surface was confirmed by imaging and spectroscopy techniques. With the repetition of the polymerization process, characteristic potentials remained unchanged, while the current densities of these peaks varied. This might be attributed to the different properties of the formed layers (thickness, bond formation, and distribution on the electrode surface). The quality of the oligomers/polymer deposited might play a significant role at the NPSS detection. Nevertheless, the quantification of butylone at  $1.0 \cdot 10^{-6}$  M in oral fluids was demonstrated with both o-3ABA and PANI-modified G/SPEs.

### Acknowledgments

This work was supported by institutional resources (Department of Analytical Chemistry, UCT Prague, CZ; Grant Number: 402850061).

### References

- Renedo O. D., Alonso-Lomillo M. A., Martínez M. J. A.: *Talanta* **73**, 202 (2007).
- Paimard G., Ghasali E., Baeza M.: *Chemosensors* **11**, 113 (2023).
- Couto R. A. S., Coelho C., Mounsséf B., Morais S. F. d. A., Lima C. D., dos Santos W. T. P., Carvalho F., Rodrigues C. M. P., Braga A. A. C., Gonçalves L. M., Quinaz M. B.: *Nanomaterials* **11**, 353 (2021).
- Couto R. A. S., Mounsséf B., Carvalho F., Rodrigues C. M. P., Braga A. A. C., Aldous L., Gonçalves L. M., Quinaz M. B.: *Sens. Actuators B* **316**, 128133 (2020).
- Couto R. A. S., Gonçalves L. M., Carvalho F., Rodrigues J. A., Rodrigues C. M. P., Quinaz M. B.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* **48**, 372 (2018).
- Xu F., Gao M., Wang L., Shi G., Zhang W., Jin L., Jin J.: *Talanta* **55**, 329 (2001).
- Asiri A. M., Adeosun W. A., Marwani H. M., Rahman M. M.: *New J. Chem.* **44**, 2022 (2020).
- Pothipor C., Wiriyakun N., Putnin T., Ngamaroonchote A., Jakmunee J., Ounnunkad K., Laocharoensuk R., Aroonyadet N.: *Sens. Actuators B* **296**, 126657 (2019).
- Phetsang S., Jakmunee J., Mungkornasawakul P., Laocharoensuk R., Ounnunkad K.: *Bioelectrochemistry* **127**, 125 (2019).
- Smith J. P., Metters J. P., Irving C., Sutcliffe O. B., Banks C. E.: *Analyst* **139**, 389 (2014).
- Pospíšilová E., Shishkanova T. V.: *Proceedings of the International Conference 41<sup>st</sup> Modern Electrochemical Methods* (Navrátil T., Fojta M., Schwarzová K., ed.), str. 163, Jettichovice 2022
- Zare E. N., Lakouraj M. M., Moosavi E.: *Compos. Interfaces* **23**, 571 (2016).
- Saberi R.-S., Shahrokhian S., Marrazza G.: *Electroanalysis* **25**, 1373 (2013).
- Papaseit E., Olestí E., Pérez-Mañá C., Torrens M., Fonseca F., Grifell M., Ventura M., de la Torre R., Farré M.: *Pharmaceuticals* **14**, 100 (2021).
- Williams M., Martin J., Galetti P.: *J. Anal. Toxicol.* **41**, 659 (2017).
- Schram J., Parrilla M., Slegers N., Van Durme F., van den Berg J., van Nuijs A. L. N., De Wael K.: *Drug Test. Anal.* **13**, 1282 (2021).

## The Role of Electrochemistry in Degradation Studies (Role elektrochemie v degračních studiích)

Lucie Pražáková<sup>a</sup>, Jan Fischer<sup>a</sup>, Andrew Taylor<sup>b</sup>, and Anna Kubišková<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic, E-mail: prazakolu@natur.cuni.cz

<sup>b</sup> Institute of Physics of the Czech Academy of Sciences, Na Slovance 1999/2, 182 23 Prague 8, Czech Republic

### Abstract

Degradation studies are an essential part of the preformulations process of pharmaceuticals. These studies include oxidation stress, which is traditionally performed by hydrogen peroxide. Electrochemical degradation represents a novel and more effective tool with the possibility of using various electrode materials. In this study, the effect of oxidation on the model active pharmaceutical ingredient was investigated on two electrode materials and compared with the oxidation by hydrogen peroxide. Electrochemical degradation was much faster and more efficient and provided the same degradation products as chemical oxidation. The efficiency of electrochemical oxidation can be adjusted by selecting the appropriate potential and electrode material.

**Keywords:** Electrochemical degradation, Degradation of pharmaceuticals, Oxidation, Abacavir, Stress studies, Boron-doped diamond electrode, Platinum electrode.

### Úvod

Stabilitní testování léčiv je součástí procesu vývoje léčiv. Léčivá látka je vystavena extrémním podmínkám, které zahrnují působení UV záření, oxidačních činidel, tepla nebo vysokého/nizkého pH. Účelem degračních studií je zrychlit celý proces stabilitního testování na co nejkratší čas. Pro toto zrychlené stabilitní testování je míra degradace účinné látky doporučena do 15 %. Vzniklé degrační produkty se dále separují a charakterizují nejčastěji pomocí HPLC-MS analýzy. K oxidační degradaci se standardně používá 0,1-3,0 % peroxid vodíku. Degradace trvá řádově hodiny až dny v závislosti na struktuře a vlastnostech účinné látky<sup>1</sup>.

Elektrochemická degradace se zdá být vhodným prostředkem k urychlení degradací a zamezení vnesení externího činidla do roztoku. V literatuře bylo již popsáno několik studií popisujících elektrochemickou oxidaci účinných látek léčiv<sup>2,3</sup>. Elektrochemická degradace by měla poskytovat stejné degrační produkty jako při oxidaci pomocí peroxidu vodíku, ovšem v mnohem kratším čase.

Důležitým aspektem elektrochemické oxidace je výběr vhodného elektrodového materiálu a uspořádání degrační cely. Mezi elektrodové materiály používané pro oxidaci patří platina, skelný uhlík, Pb/PbO<sub>2</sub> nebo borem dopovaná diamantová elektroda (BDD). Právě zmiňovaná BDD elektroda se v poslední době velmi často používá pro oxidace organických látek díky jejímu širokému potenciálovému oknu a možnosti generování ·OH radikálů<sup>4</sup>.

V této studii byla jako modelová látka použita antiretrovirotická účinná látka zvaná abacavir. Oxidační degrační studie abacaviru popsané v literatuře převážně probíhaly pomocí peroxidu vodíku<sup>5-7</sup> a pouze jedna studie zmiňuje totální elektrochemickou degradaci pomocí Ti/SnO<sub>2</sub>-Sb anody<sup>8</sup>.

### Experimentální část

Chemická oxidace probíhala za použití 3,0 % peroxidu vodíku (Lach-Ner, ČR). Roztok abacavir sulfátu (Sigma-Aldrich, Nizozemsko) o koncentraci 1 mmol L<sup>-1</sup> byl vystaven oxidaci při teplotě 50 °C pro dobu 1, 2, 3, 5, a 24 h.

Cyklická voltametrie byla prováděna na potenciostatu Eco-Tribo Polarograph (Polaro-Sensors, ČR) s Multielchem softwarem (verze 3.2.1) v octanu amonném ( $c = 0,20 \text{ mol L}^{-1}$ , pH = 7,0). Elektrochemická oxidace probíhala na obou elektrodových materiálech v roztoku abacavir sulfátu o koncentraci 0,50 mmol L<sup>-1</sup> a octanu amonném (Sigma-Aldrich, Nizozemsko) o koncentraci 0,20 mol L<sup>-1</sup> o optimálním pH = 7,0.

Oxidace za použití platinové elektrody probíhala ve tříelektrodovém vsádkovém uspořádání s oddělenými elektrodovými prostory solným můstkem a mícháním magnetickým míchadlem. Jako pracovní elektroda byla použita platinová síťka o velikosti 53 cm<sup>2</sup>, jako pomocná elektroda také platinová a jako referenční elektroda stříbrná v roztoku 0,1 mol L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> (Lach-Ner, ČR). Objem použitého roztoku byl 25 mL. Oxidační potenciál byl vkládán pomocí potenciostatu/galvanostatu model 273 EG&G (Princeton applied research, USA) maximální a to +1,15 V.

Oxidace za použití BDD elektrody probíhala ve tříelektrodovém uspořádání do potenciálu +2,50 V a ve dvouelektrodovém vsádkovém nad hodnotu vkládaného potenciálu +2,50 V. Obě uspořádání byly bez oddělených elektrodových prostor a roztoky míchány skleněným míchadlem. Jako pracovní elektroda byla použita BDD elektroda (Fyzikální ústav Akademie věd České republiky, ČR) o velikosti 0,20 cm<sup>2</sup> s B/C poměrem 4000 ppm, pomocná elektroda byla platinová (Elektrochemické detektory, ČR) a referenční Ag/AgCl/3,00 mol L<sup>-1</sup> KCl (Elektrochemické detektory, ČR). Objem použitého roztoku byl 1 mL. Oxidační potenciál byl vkládán od +0,40 V do potenciálu +2,50 V pomocí potenciostatu Eco-Tribo Polarograph a od +2,50 V do +4,50 V pomocí stabilizovaného zdroje napětí P4603 (Owon, Čína).

Analýza a charakterizace degradačních produktů probíhala pomocí Waters Acquity UPLC H Class (Waters, USA) s kolonou Kinetex C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) s mobilní fází složenou z acetonitrilu (LC-MS čistota, Honeywell, Německo) a octanu amonného ( $c = 20 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH = 7,0; čistota p.a., Sigma-Aldrich, Nizozemsko) s PDA detektorem a monokvadrupólovým hmotnostním detektorem QDa (Waters, USA). Všechny používané chemikálie byly v čistotě p.a.

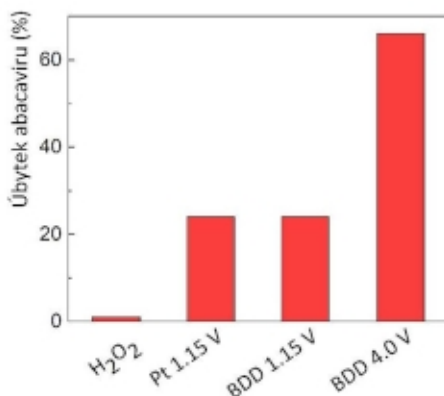
### Výsledky a diskuse

Chemická oxidace abacaviru probíhala za zvýšené teploty (50 °C). Abacavir zdegradoval z 15 % za cca 2 hodiny. Pomocí UHPLC-MS analýzy byl zjištěn jen jeden hlavní degradační produkt OP1 s  $m/z$  319,20.

Elektrochemická oxidace byla provedena na dvou elektrodových materiálech. Platinová elektroda byla vybrána jako zástupce klasického elektrodového materiálu, zatímco BDD elektroda jako moderní materiál poskytující účinnější oxidaci za hranou potenciálového okna. Potenciálové okno abacaviru bylo zkoumáno pomocí cyklické voltametrie. Na platinové elektrodě abacavir poskytuje jednu voltametrickou vlnu v rozmezí +0,80 V až +1,00 V. Na základě těchto výsledků byl jako oxidační potenciál pro platinovou elektrodu vybrán potenciál +1,15 V. Na BDD elektrodě abacavir poskytuje tři voltametrické vlny při potenciálech +0,85; +1,05 a +1,25 V. Na obou elektrodových materiálech s každým dalším cyklem docházelo k pasivaci elektrody a bylo tedy nutné povrch pracovních elektrod před každým novým

experimentem obnovit. U platinové elektrody se osvědčilo žihání a pro BDD elektrodu byla použita anodická aktivace<sup>9</sup>.

Abacavir při oxidaci na platinové elektrodě zdegradoval z 15 % za 7 minut. Vznikly dva hlavní degradační produkty OP1 s  $m/z$  319,20 a OP2 s  $m/z$  246,90. Vliv potenciálu na degradaci abacaviru byl zkoumán při rostoucím potenciálu od +0,30 V do +1,15 V a bylo potvrzeno, že abacavir nejrychleji degraduje při maximálním potenciálu +1,15 V. Na BDD elektrodě byl zkoumán vliv rostoucího potenciálu po dobu 10 minut od +0,40 V až za hranu potenciálového okna do +4,50 V. Vznikly stejné degradační produkty OP1 a OP2 jako na platinové elektrodě. Při potenciálu vyšším než +2,00 V docházelo k podstatně rychlejší degradaci abacaviru než při nižším potenciálu. Nejrychleji docházelo k degradaci abacaviru při potenciálu +4,00 V, kdy abacavir zdegradoval během 10 minut ze 43 %. Degradace na BDD elektrodě při vyšších potenciálech probíhá rychleji než na platinové elektrodě.



**Obr. 1.** Porovnání účinnosti degradace abacaviru po dobu 10 minut oxidací pomocí 3,0% peroxidu vodíku při 50 °C a elektrochemickou oxidací na platinové elektrodě při +1,15 V a BDD elektrodě při +1,15 V a +4,00 V (Převzato a upraveno z autorské práce<sup>9</sup>).

Elektrochemická degradace na rozdíl od chemické trvala podstatně kratší čas (Obr. 1.). Při chemické oxidaci peroxidem vodíku byl pozorován pouze jeden hlavní degradační produkt OP1 na rozdíl od oxidace na elektrodách. Tvorba většího množství OP2 může být ovlivněna různými mechanismy následné degradace vniklých produktů. Na elektrodách probíhá reakce pouze v okolí pracovní elektrody, zatímco při chemické degradaci probíhá reakce v celém objemu. Oba degradační produkty jsou shodné s produkty zmíněných v literatuře<sup>5,8</sup>.

Na základě výsledků lze tvrdit, že největší výhodou elektrochemické oxidace je výrazné urychlení stabilitního testování léčiv. Kromě toho elektrochemická oxidace produkuje více degradačních produktů než oxidace pomocí peroxidu vodíku a lze tedy přesněji předpovědět a následně charakterizovat degradační cesty účinných látek léčiv. V budoucnu by tato metoda mohla nahradit běžně používanou chemickou oxidací v dokumentaci předkládané farmaceutickými společnostmi při žádosti o registraci.

## Závěr

Elektrochemická oxidace na platinové a BDD elektrodě je vhodná jako nová efektivnější metoda pro studium oxidačních degradací léčiv. Největší benefit spočívá v urychlení stabilitních testů. V porovnání s chemickou oxidací, která trvala v řádech hodin, degradoval abacavir elektrochemicky výrazně rychleji (degradace z 15 % do 10 minut). Z výsledků plyne, že stěžejní je vybrat vhodný potenciál pro oxidaci. Optimální potenciál pro oxidaci abacaviru na platinové elektrodě je +1,15 V a na BDD elektrodě je oxidace abacaviru neefektivnější při potenciálu +4,00 V. Na obou elektrodových materiálech vznikly dva hlavní degradační produkty OPI s  $m/z$  319,20 a OP2 s  $m/z$  246,90, které jsou shodné s produkty chemické oxidace popsanými v literatuře.

## Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation (project No. 23-05688S) and Specific University Research at Charles University, Czech Republic (SVV260690).

## References

1. Venkataraman S., Manasa M.: *Drug. Invent. Today* 10, 137 (2018).
2. Vymyslicky F., Krizek T., Kozlik P., Kubickova A., Hert J., Bartosinska E.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 207, 114341 (2022).
3. Bartosinska E., Kozlik P., Kubickova A., Hert J., Fischer J., Krizek T.: *Talanta* 226, 122141 (2021).
4. Zhu X.Y., Chen X.J., Yang Z.M., Liu Y., Zhou Z.Y., Ren Z.Q.: *Chem. Eng. J.* 338, 46 (2018).
5. Vukkum P., Deshpande G.R., Babu J.M., Muralikrishna R., Jagu P.: *Sci. Pharm.* 80, 903 (2012).
6. Rao R.N., Vali R.M., Ramachandra B., Raju S.S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54, 279 (2011).
7. Kurmi M., Sahu A., Singh S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 134, 372 (2017).
8. Zhou C.Z., Wang Y.P., Chen J., Xu L., Huang H.M., Niu J.F.: *Chemosphere* 225, 304 (2019).
9. Pražáková L., Fischer J., Taylor A., Kubičková A.: *Sensors* 23, 2776 (2023).

## Molecularly Imprinted Polymer-based Sensor for Electrochemical Detection of Moxifloxacin

Arezoo Saadati<sup>a</sup>, Amir M. Ashrafi<sup>b</sup>, Vojtěch Adam<sup>b</sup>, and Lukáš Richtera<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, 612 00 Brno, Czech Republic, E-mail: saadati@vutbr.cz

<sup>b</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University in Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

### Abstract

A novel molecularly imprinted polymer (MIP)-based electrochemical sensor was assessed to detect Moxifloxacin (MFLX). MIP was prepared by the electropolymerization of DL-threonine as functional monomers in the presence of MFLX as the template molecule. The electrochemical properties of the MIP and non-molecularly imprinted polymer (NIP) sensors were investigated via cyclic voltammetry (CV) in  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  as an electrochemical active probe. The imprinted sensor had good linear current responses to moxifloxacin concentrations in a range of  $1\ \mu\text{M}$  to  $10\ \mu\text{M}$ , with a detection limit of  $0.093\ \mu\text{M}$ .

**Keywords:** Moxifloxacin, DL-threonine, Molecularly imprinted polymer, Sensor, Electrochemical detection.

### Introduction

Moxifloxacin (MFLX) is a fourth-generation fluoroquinolone antibacterial drug that is effective against a variety of common microorganisms, anaerobes, and Gram-positive and Gram-negative eye infections<sup>1</sup>. It functions primarily by inhibiting two crucial enzymes: topoisomerase II, which is required to unwind the DNA double helix, and topoisomerase IV, which is required to separate the daughter chromosomes. Moxifloxacin is primarily used to treat skin and soft tissue infections without problems, mild to moderate community intravenous pneumonia, acute bacterial chronic bronchitis, and acute bacterial sinusitis caused by sensitive germs<sup>2</sup>.

Due to MFLX's therapeutic significance, there has been a lot of interest in creating novel, easy-to-use techniques for analyzing it in pharmaceutical and biological materials. High-performance liquid chromatography (HPLC)<sup>3</sup>, high-performance thin layer chromatography (HPTLC)<sup>4</sup>, liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS)<sup>5</sup>, spectrophotometry<sup>6</sup>, and electrochemical methods are just a few of the techniques that have been reported in the literature for the analysis of MFLX<sup>7</sup>. In comparison to other conventional analytical techniques, electrochemical sensors, one of the electrochemical approaches, have been found to be environmentally safe and to be extremely sensitive, selective, and practical tools with quick reaction time. The measurement of moxifloxacin has been carried out using a variety of electrochemical sensors. Despite this, the recognition layer by which the electrode is modified has a significant impact on the sensitivity and, in reality, the selectivity of such manufactured sensors<sup>8</sup>.

Molecularly imprinted polymers (MIPs) have received a lot of attention recently and have been discovered to be particularly promising in the field of electrochemical sensors as a typical method for high affinity and specific identification<sup>9</sup>. MIPs, also known as plastic antibodies, identify certain molecules via steric and binding interactions. MIPs are created using a straightforward three-step procedure: first, target analytes are mixed with monomers, followed by the start of polymerization and, finally, analytes are removed from polymeric matrices using



the proper washing techniques, leaving complementary cavities inside the polymer that can be used to rebind the analyte selectively. MIPs are a viable substitute for natural antibodies due to their affordability, adaptability, and high stability. Therefore, they are finding use in all procedures that call for affinity interactions, such as solid phase extraction and/or sensing<sup>10</sup>. MIPs serve as recognition elements when integrated into sensors and must be situated on the surface of the transducer to achieve adequate sensor performance<sup>11</sup>. Most MIPs made using methods including bulk polymerization, precipitation polymerization, and sol-gels frequently have drawbacks such as delayed mass transfer, insufficient template removal, and heterogeneous binding site distribution<sup>12</sup>. Therefore, using electropolymerization to create a stiff, homogenous, and compact molecularly imprinted film with controlled thickness is an effective technique to overcome these restrictions in the right design of MIP-modified electrodes. For the construction of a molecularly imprinted polymer (MIP)-based sensor by an electropolymerization technique, the choice of functional monomer is important.

Here we presented a selective and sensitive MIP-based system for the determination of moxifloxacin. For this purpose, DL-threonine was used as a functional monomer, and moxifloxacin as a template molecule to make a MIP film on the surface of a glassy carbon electrode (GCE) through electropolymerization. Then moxifloxacin was removed using 70% ethanol solution extraction and the polymer sensor was obtained. The detection of moxifloxacin absorbed by the fabricated sensor was performed by the electrochemical signal of  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . The intensity of the signal is related to the concentration of moxifloxacin.

## Experimental

### *Reagents and apparatus*

Moxifloxacin, gemifloxacin, ofloxacin, DL-threonine were purchased from Sigma-Aldrich. To create the phosphate buffer solution, stock solutions of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  were combined. ultrapure water ( $\rho = 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ) was employed throughout the experiments and all chemicals utilized were of analytical grade purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Electrochemical experiments, including cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV), were carried out by potentiostat/galvanostat AUTOLAB PGSTAT12 controlled by the corresponding Nova 2.1 software (EcoChemie, Utrecht, Netherlands). The conventional three-electrode cell was used that consisted of an Ag/AgCl (3 mol/L KCl) electrode as a reference electrode, a platinum wire as an auxiliary electrode, and GCE as the working electrode.

### *Choice of electropolymerized monomer for MIP/GCE*

A major factor that contributes to the optimal performance of a molecularly imprinted polymer is the selection of an appropriate functional monomer<sup>13</sup>. This is important since MIP performance is mainly based on the specific interaction between the template molecule and functional monomer that helps to ascribe molecular memory into the imprinted matrix by a combination of both shape and arrangement of functional groups. In this work, several electropolymerizable monomers containing complementary functional groups (dopamine, tyrosine, histamine, and threonine) to that of MFLX were evaluated as potential monomers for MFLX-MIP synthesis.

### *Construction of MIP/GCE and NIP/GCE*

The bare GCE (3 mm in diameter) was polished with 0.5  $\mu\text{m}$   $\text{Al}_2\text{O}_3$  slurry and was rinsed ultrasonically with ethanol and was polished again with alumina until a mirror-like surface was obtained. After the treatment, the electrode was immersed in a 0.1 M solution of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and was cycled from -0.2 to +2 V at a scan rate of 100  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  until a steady state current was

reached. Finally, the electrode was rinsed ultrasonically with ultrapure water and was dried at room temperature. For the construction of MIP, GCE was immersed in phosphate buffer solution (pH=5.8) containing 1.0 mM DL-threonine and 0.10 mM of template MFLX, and electrochemical polymerization was carried out via CV in a potential range of  $-0.3$  to  $+1.4$  V at scan rate  $100 \text{ mV s}^{-1}$  for 10 cycles. Then, the polymer-modified electrode was incubated in 70% ethanol solution for 1 h to extract the template MFLX to obtain MIP/GCE. Non-imprinted polymer sensor (NIP/GCE) was also constructed as a control with the same procedure with MIP/GCE but without the addition of MFLX.

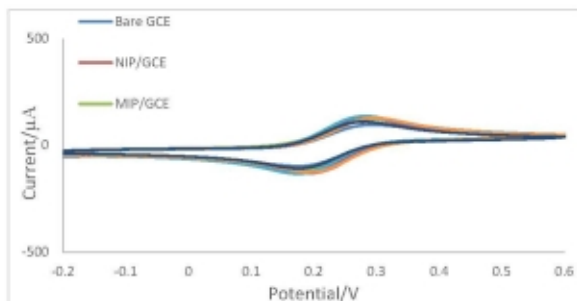
#### **Electrochemical characterization and measurements**

Different modified electrodes were characterized by CV in  $5.0 \text{ mM K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  containing  $0.10 \text{ M KCl}$  in a potential window between  $0.0$  to  $+0.6 \text{ V}$  with a scan rate of  $100 \text{ mV/s}$ . The recognition properties of prepared MFLX-MIP towards MFLX were investigated by DPV in the potential of  $-0.2$  to  $+0.6 \text{ V}$ . For that, the fabricated polymer sensor was incubated for 1 h in PBS solution (pH=7.0) containing MFLX. Then the electrochemically active probe of  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  was used to study its performance.

### **Results and discussion**

#### **Characterization of various modified electrodes**

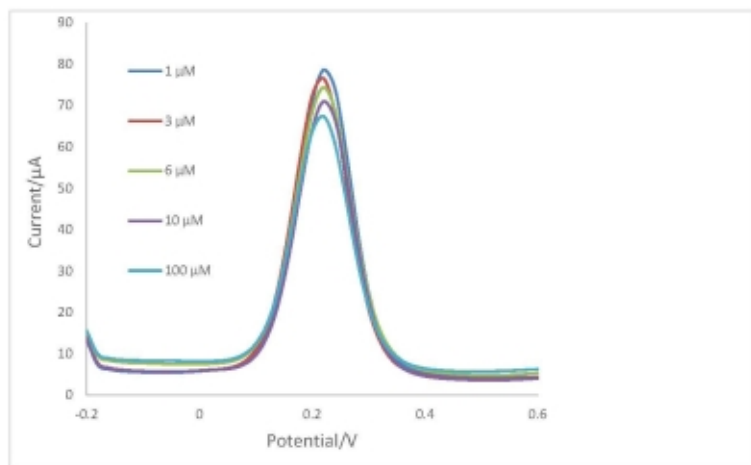
Electrochemical performance of different electrodes was characterized by  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  electrochemical active probe by CV due to poor electrochemical activity of MFLX. As can be seen in Fig. 1, the current response of CV of  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  at polymer-modified electrode is greater than bare electrode which can be attributed to the high conductivity of DL-threonine polymer generated on the electrode surface. The current response of MIP/GCE increases after elution of the template molecule, which approved the formation of cavities in the MIP membrane. The extraction of MFLX from the MIP layer on the surface of the electrode has resulted in the formation of imprinted cavities in MIP/GCE. Imprinted cavities formed in MIP can provide pathways for the diffusion of a probe into and out of the MIP matrix; the probe is then oxidized or reduced at the electrode and produces an electrochemical signal.



**Fig. 1.** CV measurements of bare GCE, MIP/GCE before and after elution, NIP/GCE before and after elution, MIP/GCE and NIP/GCE after incubation in (write the concentration) MFLX in  $5.0 \text{ mM K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  containing  $0.10 \text{ M KCl}$ .

### Analytical performance of MIP/GCE sensor

The electrochemical response and analytical performance of the MIP/GCE sensor was determined by a redox probe and evaluated with DPV analysis to assess the linearity range of the current response in MFLX quantification (Fig. 2A). The calibration curve for MFLX exhibited a concentration dependence behavior in a concentration range of 1  $\mu\text{M}$  to 10  $\mu\text{M}$ , with the calibration equation of  $\Delta I (\mu\text{A}) = -1.2717 C(\mu\text{M}) + 78.609$  ( $R^2 = 0.9993$ ). Within the concentration range indicated using the regression data, the LOD values was calculated as 0.093  $\mu\text{M}$ . The results obtained reveal that the current of the MIP/GCE increases with decrease the MFLX concentration. The results indicated that the prepared MIP/GCE possessed excellent sensitivity for MFLX detection.



**Fig. 2.** Differential pulse voltammograms of various MFLX concentrations (1, 3, 6, and 10  $\mu\text{M}$ ) on the MIP/GCE sensor in 5.0 mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  containing 0.10 M KCl.

### Selectivity of MIP/GCE

The selectivity of the constructed MIP platform was evaluated for the detection of moxifloxacin by DPV in the presence of compounds with similar structures such as ofloxacin and gemifloxacin. No significant changes were observed. Therefore, the fabricated MIP sensor is also able to detect the target analyte in the presence of similar structures.

### Conclusions

This paper presents an innovative electrochemical MFLX sensor based on electrochemically polymerized imprinted polythreonine. By integrating electrochemical characterization, a thorough analysis of polythreonine synthesis in the lack or presence of a template molecule has been carried out. The sensor demonstrated acceptable performance, a decent imprinting effect, and strong anti-interference characteristics under the chosen conditions. Therefore, molecularly imprinted polythreonine may offer a promising opportunity for the creation of reliable and affordable sensors for clinical analysis.

## References

1. de Miranda A. P., Silva C. B., Mimica L. M., Moscovici B. K., Malavazzi G. R., Hida R. Y.: *J. Cataract. Refract. Surg.* *41*, 135 (2015).
2. Gyssens I. C., Dryden M., Kujath P., Nathwani D., Schaper N., Hampel B., Reimnitz P., Alder J., Arvis P.: *J. Antimicrob. Chemother.* *66*, 2632 (2011).
3. Mangukiya R., Patel R., Shah P., Patel K.: *Acta Chromatogr.* *27*, 495 (2015).
4. Dhillon V., Chaudhary A. K.: *Pharm. Meth.* *1*, 54 (2010).
5. Vishwanathan K., Bartlett M. G., Stewart J. T.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* *30*, 961 (2002).
6. Hammam M. A., Wagdy H. A., El Nashar R. M.: *Sens. Actuator B-Chem.* *275*, 127 (2018).
7. Radi A. E., Wahdan T., Anwar Z., Mostafa H.: *Drug Test. Anal.* *2*, 397 (2010).
8. Zhou Q., Long N., Liu L., Zhai H., Zhu M.: *Int. J. Electrochem. Sci.* *10*, 5069 (2015).
9. Ye L., Mosbach K.: *Chem. Mater.* *20*, 859 (2008).
10. Sharma P. S., Pietrzyk-Le A., D'souza F., Kutner W.: *Anal. Bioanal. Chem.* *402*, 3177 (2012).
11. Mazzotta E., Turco A., Chianella I., Guerreiro A., Piletsky S. A., Malitesta C.: *Sens. Actuator B-Chem.* *229*, 174 (2016).
12. Sallacan N., Zayats M., Bourenko T., Kharitonov A. B., Willner I.: *Anal. Chem.* *74*, 702 (2002).
13. Ayankojo A. G., Tretjakov A., Reut J., Boroznjak R., Öpik A., Rappich J. r., Furchner A., Hinrichs K., Syritski V.: *Anal. Chem.* *88*, 1476 (2016).

## Electrochemical Oxidation of 1-Phenylpiperidine and 1-Phenylpiperazine (Elektrochemická oxidace 1-fenylpiperidinu a 1-fenylpiperazinu)

Jana Skopalová, Petra Doležalová, Radek Jerga, Petra Krejčí, and Petr Barták  
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

### Abstract

Electrochemical oxidation of 1-phenylpiperidine and 1-phenylpiperazine, which are substructures in many bioactive compounds, including illicit street drugs, was investigated using cyclic and square-wave voltammetry at a glassy carbon electrode. Similar voltammetric behavior of both compounds suggests a primary role of the substituted aniline moiety in the oxidation process. One-electron oxidation of the aniline nitrogen leads to the formation of a resonance-stabilized radical cation, which undergoes a coupling process. Dimeric products were detected by mass spectrometry in a solution of both substances electrolyzed on a carbon fiber brush electrode as well as on the electrode surface.

**Keywords:** 1-Phenylpiperidine, 1-Phenylpiperazine, Cyclic Voltammetry, Square-Wave Voltammetry, Electro-oxidation, Mass Spectrometry.

### Úvod

1-Phenylpiperazin (FPZ) a 1-fenylpiperidin (FPD) jsou strukturální složkami řady biologicky aktivních sloučenin. FPZ a jeho deriváty mají vliv na psychické funkce a často bývají zneužívány jako pouliční drogy zejména k zesílení nebo napodobení účinku dobře zavedených stimulantů amfetaminového typu, jako je MDMA. Ačkoliv mají fenylpiperazinové deriváty pověst „bezpečných“ drog, řada experimentálních a klinických studií poukazuje na možná zdravotní rizika související s jejich užíváním, jako jsou život ohrožující serotoninový syndrom, hepatotoxicita, neurotoxicita a rozvoj různých psychopatologických stavů<sup>1</sup>.

Monitorování psychoaktivních látek vyžaduje nové rychlé způsoby detekce a identifikace. Elektrochemie v tomto směru nabízí rychlé a instrumentálně nenáročné analytické metody, vhodné pro použití v terénních podmínkách. Pro vývoj elektroanalytických metod je nutná znalost podstaty elektrochemických reakcí analytů.

Cílem práce bylo prozkoumat základní elektrochemické chování FPZ a jeho strukturálního analogu FPD a identifikovat produkty jejich elektrochemické oxidace.

### Experimentální část

Zásobní roztoky FPD (BioSynth, Bratislava, Slovensko) a FPZ (Aldrich, Bangalore, Indie) byly připraveny v koncentraci 1 mmol/l v redestilované vodě (18,2 M $\Omega$ , Milipore, Merck). Kyseliny octová, fosforečná a boritá, hydroxid sodný, octan amonný a amoniak (25% vodný roztok) pro přípravu vodných roztoků indiferentních elektrolytů byly čistoty „pro analýzu“. Pro přípravu mobilní fáze byla použita mravenčí kyselina (>99%, Sigma-Aldrich) a acetonitril (HPLC grade, VWR Chemicals).

Elektrochemické experimenty byly prováděny na přístroji Autolab PGSTAT302N (Metrohm Autolab, Nizozemsko) v tříelektroodovém zapojení s referenční kalomelovou a pomocnou platinovou elektrodou. Cyklické voltamogramy byly zaznamenány s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku v roztocích Brittonova-Robinsonova pufru o různém pH. Obě látky byly anodičky oxidovány na elektrodě ze svazku uhlíkových vláken (CFBE)<sup>2</sup> v roztoku octanu

amonného/amoniaku (pH = 8,5) při potenciálech 0,65 V (FPD) a 0,75 V (FPZ) proti nasycené kalomelové elektrodě po dobu 30 minut. Pomocná platinová elektroda byla umístěna v odděleném katodovém prostoru naplněném roztokem základního elektrolytu.

Pro analýzu oxidačních produktů FPD a FPZ byl využit vysoko-rozlišující hmotnostní spektrometr s ESI a ASAP iontovým zdrojem a QqTOF analyzátozem s cyklickou iontovou mobilitní celou (Select Series Cyclic IMS, Waters, Milford, Massachusetts, USA). Kalibrace přístroje byla realizována s využitím mravenčanu sodného (0,5 mmol/l, ve směsi 90:10 2-propanol/voda). K externí kalibraci a korekci přesné hmoty (lock mass měření) byl využit leucin-enkefalin (50 pg/μl, rozpuštěný ve směsi 50:50 acetonitril/voda + 0,1% mravenčí kyselina). Jako desolvatační a zmlžovací plyn byl použit dusík. Ovládání přístroje a sběr dat byly prováděny pomocí softwaru MassLynx 4.1 (Waters).

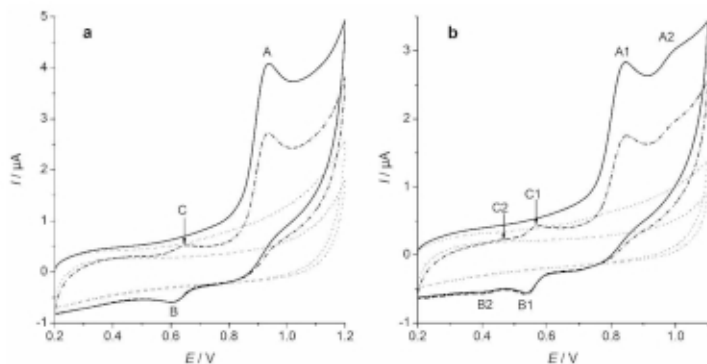
Produkty elektrolyzy adsorbované na CFBE byly analyzovány metodou ASAP-MS. CFBE zbavená elektrického kontaktu z měděného drátu byla vsunuta do držáku ASAP sondy, uhlíková vlákna byla zvlhčena vodou a sonda byla zasunuta do ionizačního zdroje. Analýza probíhala za následujících experimentálních podmínek: doba analýzy 3 min, pozitivní mód ionizace, hmotnostní rozsah 50–1200 m/z, doba skenu 1 s, napětí na kónusu 40 V, offset zdroje 10 V, teplota zdroje 100 °C, desolvatační teplota 600 °C, průtok desolvatačního plynu 500 l/h, průtok plynu kónusem 30 l/h, tlak zmlžovacího plynu 6 bar, napětí na srovnávací kapiláře 3,5 V, korónový proud 2 μA, kolizní energie 4 V (transfer cell) a 6 V (trap collision cell). Pro fragmentační experimenty (MS/MS) byla kolizní energie zvýšena na 40 V (trap collision cell). MS detekce při FIA a LC-MS analýzách využívala ionizace elektrosprejem v pozitivním módu při teplotě zdroje 120 °C a desolvatační teplotě 220 °C. Další parametry byly stejné jako v ASAP-MS.

K chromatografické separaci analytů na koloně Raptor ARC-18 (2,7 μm; 100 mm x 2,1 mm) byl využit Waters ACQUITY UPLC Systém. Gradientová eluce s mobilní fází tvořenou složkou A (0,1 % HCOOH ve vodě) a složkou B (0,1% HCOOH v acetonitrilu) byla provedena v programu: 0 min (0,1 % B), 14:50 min (100 % B), 14:51 min (0,1 % B). Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,2 ml/min, teplota kolony na 30 °C, dávkovaný objem vzorku byl 2 μl.

### Výsledky a diskuse

Na cyklickém voltamogramu FPZ (Obr. 1a) je patrný hlavní oxidační pik (A) při potenciálu kolem 0,93 V, v obráceném směru polarizace pik B ( $E_p = 0,612$  V), kterému v následném anodickém skenu přísluší pik C ( $E_p = 0,647$  V). Reverzibilní dvojice piků B a C náleží oxidačnímu produktu, který vniká anodickou oxidací FPZ při potenciálech piků A. Voltamogram FPD (Obr. 1b) má podobný průběh jako CV FPZ. Hlavní anodický pik A ( $E_p = 0,84$  V) je následovaný proudovou vlnou (A2) s maximem o 150 mV pozitivnějším. V obráceném směru polarizace lze pozorovat dva katodické piky B1 a B2, jimž odpovídají protipiky C2 a C1 v následujícím anodickém skenu. Diference potenciálů piků C1-B1 (32 mV) a C2-B2 (35 mV), nezávislé na rychlosti skenu, odpovídají dvou-elektronové reverzibilní reakci.

Směrnice závislosti potenciálu hlavních anodických piků na logaritmu rychlosti polarizace mají hodnotu 20,3 mV (pik A u FPZ) a 21,2 mV (pik A1 u FPD) při nárůstu rychlosti o 1 řád, což odpovídá teoretické hodnotě 20 mV pro elektrodový děj zahrnující reverzibilní přenos jednoho elektronu následovaný ireverzibilní dimerizací<sup>3</sup>.

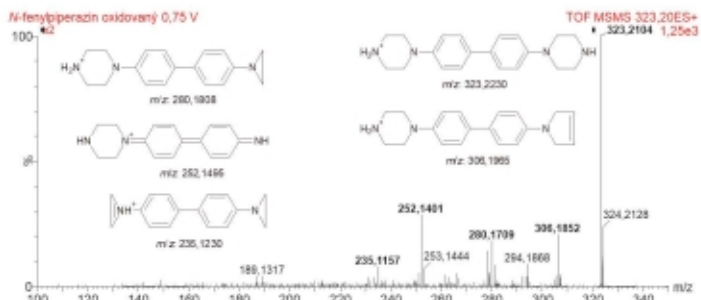


**Obr. 1.** Cyklické voltamogramy 1-fenylpiperazinu (a) a 1-fenylpiperidinu (b), koncentrace 0,1 mmol/l v B-R pufru (pH 1,8). GCE, rychlost polarizace 50 mV/s, 2 cykly.

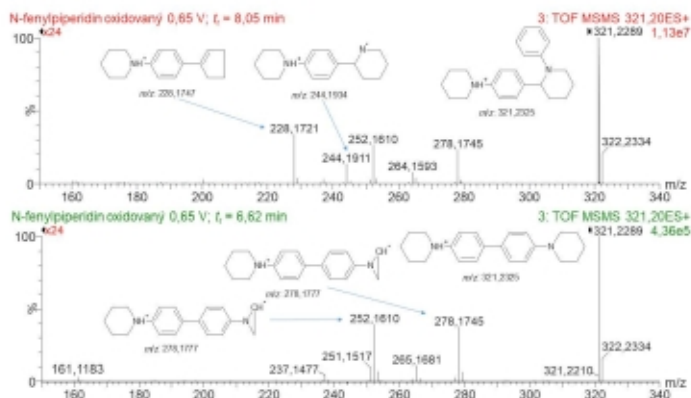
Potenciál anodického píku A byl v rozmezí pH 1,8 – 4 konstantní, mezi pH 4 a 10 se posouval k méně pozitivním hodnotám se směrnici  $-51 \text{ mV/pH}$  a v alkalických roztocích o pH 10 - 12 byl opět konstantní. Zlomový bod závislosti  $E_p = f(\text{pH})$  při pH = 9,75 souvisí s disociační konstantou  $pK_a(\text{FPZ}) = 9,02$  při 20 °C (cit. 4). Stejný posun potenciálu píku o  $-51 \text{ mV/pH}$  byl pozorován u FPD v rozmezí pH 1,8 – 6. V alkaličtějších roztocích potenciál píku nezávisel na pH. Bod zlomu v závislosti  $E_p - f(\text{pH})$  při pH = 6,14 odpovídá disociační konstantě FPD ( $pK_a = 6,22$ , cit. 5).

Potenciostatická elektrolyza obou látek byla provedena na CFBE s cílem detegovat oxidační produkty jak v elektrolyzovaných roztocích, tak i na povrchu elektrody. Potenciál elektrolyzy byl nastaven na hodnotu limitního proudu píku A pro FPZ (0,75 V) a píku A1 pro FPD (0,65V) při pH 8,5. V elektrolyzovaném roztoku FPZ byl metodou FIA-MS detegován oxidační produkt s  $[\text{M}+\text{H}]^+$  323,21  $m/z$ . Kolizní hmotnostní spektrum dimeru a navržené struktury fragmentových iontů jsou na Obr. 2. V elektrolyzovaném roztoku FPD byly pomocí LC-MS detegovány dva dimerní oxidační produkty v retenčních časech 6,62 min a 8,05 min se stejnou hodnotou  $m/z$  321,23. Kolizní hmotnostní spektra těchto produktů liší se v několika fragmentových iontech (Obr. 3) svědčí o různých strukturách obou izomerních produktů. Ion  $[\text{M}+\text{H}]^+$  s  $m/z$  321,23 byl metodou ASAP-MS detegován také na povrchu CFBE po 30min elektrolyze roztoku FPD.

Na základě výsledků voltametričeského studia a MS analýz elektrolyzovaných roztoků a povrchu pracovní elektrody po elektrolyze bylo zjištěno, že elektrochemická oxidace obou studovaných látek vede ke vzniku radikálových kationtů, které podléhají dimeraci. Schéma navrženého mechanismu oxidace FPD ukazuje Obr. 4.



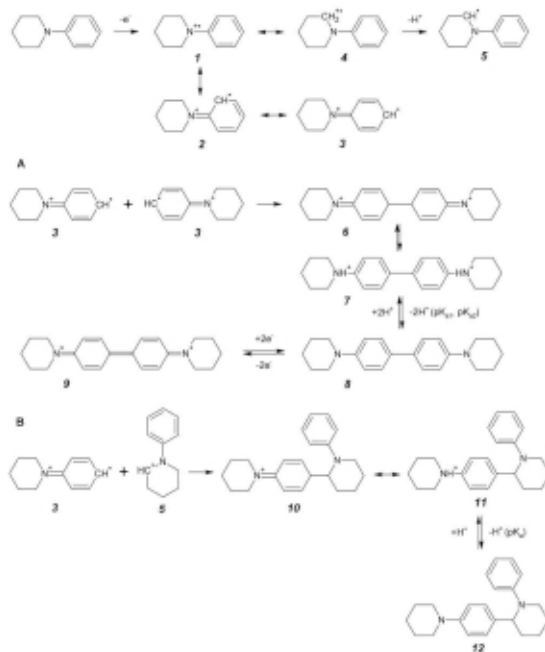
**Obr. 2.** Kolizní spektrum dimerního oxidačního produktu 1-fenylpiperazinu ( $[M+H]^+$  323,21  $m/z$ ) ve FIA-MS/MS a navržené struktury fragmentových iontů.



**Obr. 3.** Kolizní hmotnostní spektra dimerních oxidačních produktů 1-fenylpiperidinu ( $[M+H]^+$  321,23  $m/z$ ) v LC-MS/MS s retenčními časy  $t_r = 8,05$  min (nahore),  $t_r = 6,62$  min (dole) a navržené struktury klíčových iontů.

Jednoelektronovou oxidací molekuly FPD vzniká radikál kation **1**, který přechází na stabilnější rezonanční struktury **2** a **3**. Další možná rezonanční struktura **4** může odštěpit proton za vzniku radikálu **5**. Rekombinací radikálových kationtů **3** (cesta **A** ve schématu na Obr. 4) vzniká dimer **6**, který se stabilizuje tautomerií na benzidinový derivát **7**. Jeho deprotonizovaná forma **8** se může snadno elektrochemicky oxidovat na produkt **9**. Tato reakce je reverzibilní a projevuje se na voltamogramech dvojicí píků B a C (Obr. 1b). Rekombinace radikálů **2** resp. **5** je méně pravděpodobná ze sterických důvodů. Reakční cesta **B** předpokládá rekombinaci radikálů **3** a **5** za vzniku dimeru **10**, který přejde na stabilnější rezonanční strukturu **11**. Ta může po deprotonizaci (**12**) rovněž podléhat další oxidaci za vzniku oligomerních elektrochemicky aktivních produktů. Podobný mechanismus elektrochemické reakce lze navrhnout také u FPZ.





**Obr. 4.** Navržené schéma elektrochemické oxidace 1-fenylpiperidinu.

### Závěr

Studium elektrochemického chování FPD a FPZ ukázalo, že obě látky se poměrně snadno oxidují na uhlíkových elektrodách ve vodném prostředí v širokém rozmezí pH. Podobné elektrochemické vlastnosti obou látek jsou dány podobnou strukturou substituovaných aromatických aminů. V elektrolyzovaných roztocích a na povrchu pracovní elektrody byly pomocí hmotnostní spektrometrie identifikovány dimerní produkty s benzidinovou strukturou.

### Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation (project no. 20-07350S) and by Palacký University Olomouc (project IGA\_PrF\_2023\_027).

### References

1. Arbo M. D., Bastos M. L., Carmo H. F.: *Drug Alcohol Depend.* **122**, 174 (2012).
2. Skopalová J., Barták P., Bednář P., Tomková H., Ingr T., Lorencová I., Kučerová P., Papoušek R., Borovcová L., Lemr K.: *Anal. Chim. Acta* **999**, 60 (2018).
3. Scholz F. (ed.): *Electroanalytical Methods, Guide to Experiments and Application*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2010, str. 91.
4. Caecia S., Fong M. H., Urs R.: *J. Pharm. Pharmacol.* **37**, 567 (1985).
5. [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB6265588.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6265588.htm), staženo 19. 4. 2023.

## Application of *In situ* IR Spectroelectrochemical Techniques in Determination of Redox Mechanism of Bioactive Compounds

Romana Sokolová<sup>a</sup>, Eliška Jiroušková<sup>b</sup>, Ilaria Degano<sup>b</sup>, Jakub Wantulok<sup>c</sup>, and Jacek Nycz<sup>c</sup>

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

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

<sup>c</sup> Institute of Chemistry, University of Silesia in Katowice, ul. Szkolna 9; 40-007 Katowice, Poland

### Abstract

The electron transfer reactions play an important role in many natural processes. Reactions such as dissociation, protonation, and reactions with water and other small molecules often occur in biotransformation. The reaction schemes involving these chemical reactions coupled to the electron transfer can be determined by cyclic voltammetry. Additionally, *in situ* spectroelectrochemistry can efficiently contribute to the determination of oxidation or reduction mechanism. This technique provides information about the electroactive chromophore during the redox process allowing to identification the first reaction intermediates. The final reaction products were identified by chromatographic techniques. This study represents a key role of IR spectroelectrochemistry in the determination of reaction intermediates in the case of 1,10-phenanthroline derivative substituted by bioactive phenothiazine unit and drug 3-fluorophenmetrazine (2-(3-fluorophenyl)-3-methylmorpholine, 3-FPM). Compound 3-FPM have recently appeared as the new psychoactive substance in the drug market.

**Keywords:** Psychoactive substances, IR Spectroelectrochemistry, Oxidation mechanism, 3-fluorophenmetrazine, Amphetamine, Phenothiazine

### Introduction

New synthetic psychoactive substances (NPS) recently became available on the drug market. They can be divided into four main groups: synthetic hallucinogens, synthetic cannabinoids, synthetic stimulants, and synthetic depressants according to their mode of action<sup>1,2</sup>. Compound 3-fluorophenmetrazine (2-(3-fluorophenyl)-3-methylmorpholine, 3-FPM) is usually used as an alternative to amphetamine. The known effects of 3-FPM involve euphoria and libido increase, and stimulation<sup>3,4</sup>. The electrochemical methods significantly contribute to the determination of reaction products and intermediates of drug biotransformation, which includes oxidative and reductive processes<sup>4,6</sup>. 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<sup>5,7</sup>. The determination of the oxidation or reduction mechanisms requires the use of on-line spectroelectrochemical methods and HPLC-MS/MS techniques<sup>8,9</sup>. These techniques were efficient in studies of the oxidation mechanism of bioactive polyphenolic compounds<sup>10,11</sup>. Spectroelectrochemistry was also powerful tool in solving redox properties of derivatives of 1,10-phenanthroline substituted with pyrrolidine and phenothiazine bioactive units<sup>12,13</sup>.

## Experimental part

### Reagents

Compound 3-fluorophenmetrazine (FPM, 2-(3-fluorophenyl)-3-methylmorpholin, Scheme 1) was obtained from the Institute of Forensic Medicine and Toxicology, First Faculty of Medicine, Charles University. 4,7-di(phenothiazine)-1,10-phenanthroline was synthesized through the procedure described in literature<sup>14,15</sup>. Tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF<sub>6</sub>, 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

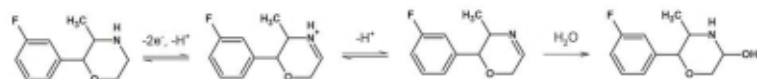
Electrochemical measurements were carried out in 0.1 M TBAPF<sub>6</sub> in acetonitrile. Cyclic voltammetry in the spectroelectrochemical cell was performed in an optically transparent thin-layer electrode cell using a PAR potentiostat (model 263, Princeton Applied Research, USA). The thickness of spacer between optical windows made of CaF<sub>2</sub> was 0.19 mm. The cell contains a three-electrode system (Ag/AgCl reference electrode, platinum working and auxiliary electrodes) mounted in a thin layer. IR spectra during the cyclic voltammetry with scan rate 5 mV/s were registered using a Nicolet iS50 FTIR spectrometer equipped with KBr beam splitter in the range of 4000-650 cm<sup>-1</sup>.

### Theoretical calculations

The theoretical calculations of spatial distribution of frontier orbitals for molecules in vacuum were performed using the DFT employing the B3LYP functional and 6-31G\* basis set (Spartan'14, Wavefunction, USA).

## Results and discussion

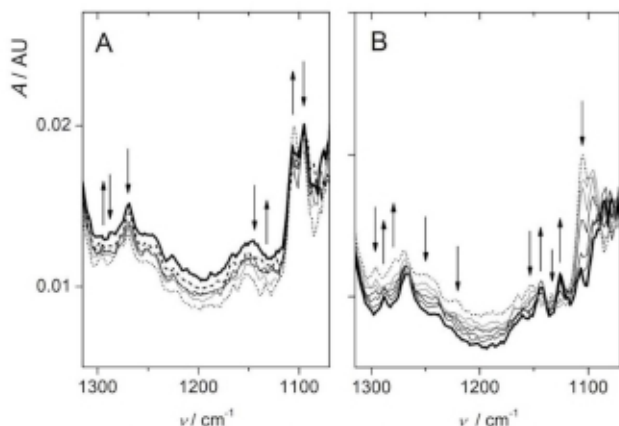
Theoretical calculations of spatial distribution of the highest occupied molecular orbitals (HOMO) were performed for neutral molecules of both studied compounds, 3-fluorophenmetrazine and 4,7-di(phenothiazine)-1,10-phenanthroline in vacuum. They showed that the electroactive site in molecule of 3-FPM is tetrahydro-1,4-oxazine ring. The removal of one electron from the nitrogen lone pair can be followed by deprotonation in alpha-position of the nitrogen atom and other one-electron oxidation leads to the cation (at nitrogen atom, see Scheme 1). This intermediate loses a proton and forms a neutral molecule. The subsequent nucleophilic addition of water leads further to the formation of hydroxylated compound. The cleavage of the proton from N-H bond during oxidation was confirmed by in situ IR spectroelectrochemistry, even if the change was only slightly pronounced. The absorption between 3300 and 3400 cm<sup>-1</sup> decreased during oxidation unusually and remained constant. Interestingly, absorption band at 3338 cm<sup>-1</sup> was registered in the backward scan. This band was attributed to N-H vibration of morpholine moiety (compare 3350 cm<sup>-1</sup> in CCl<sub>4</sub> reported in literature<sup>16</sup>).



**Scheme 1.** Oxidation mechanism of 3-fluorophenmetrazine<sup>7</sup>.

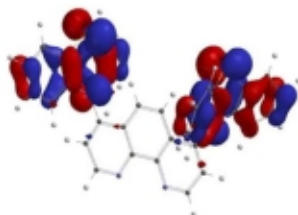
Fig. 1 shows that the absorption spectrum registered after oxidation in the range from 1350 cm<sup>-1</sup> to 1050 cm<sup>-1</sup> did not differ much from that of 3-FPM. Only, the absorption bands at 1296,

1134 and 1106  $\text{cm}^{-1}$  of final product increased (dotted curve), while bands at 1287 and 1096  $\text{cm}^{-1}$  of 3-FPM decreased <sup>7</sup>.

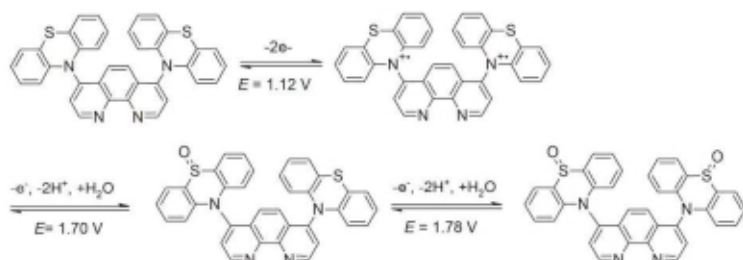


**Fig. 1.** IR spectroelectrochemistry of 3-fluorophenmetrazine (2-(3-fluorophenyl)-3-methylmorpholine, 3-FPM) at the potential of the oxidation wave (A). Panel B represents IR spectroelectrochemistry of reduction of the formed product.

The spatial distribution of HOMO orbitals in symmetric molecule 4,7-di(phenothiazine)-1,10-phenanthroline (Scheme 2) suggests that both phenothiazine units are redox active (Fig. 2). The molecule 4,7-di(phenothiazine)-1,10-phenanthroline yields in cyclic voltammetry four oxidation peaks at potentials 1.12, 1.70, 1.78 and 1.89 V <sup>13</sup>. The shape of the first oxidation wave indicates that two one-electron processes with their standard redox potential values spaced by 62 mV take place <sup>17</sup>. The  $1+1e^-$  oxidation processes occur on two almost independent phenothiazine redox centres attached to the 1,10-phenanthroline moiety in equivalent positions 4 and 7. Oxidation leads to formation of dication at the first oxidation peak. In-situ IR-spectroelectrochemistry at the second and third oxidation waves confirmed the subsequent formation of sulfoxide on phenothiazine moieties. This compound was identified also in solution after the oxidative electrolysis using HPLC-MS/MS. The latter oxidation wave corresponds to oxidation of 1,10-phenanthroline <sup>13</sup>.



**Fig. 2.** The spatial distribution of HOMO orbitals in 4,7-di(phenothiazine)-1,10-phenanthroline.



**Scheme 2.** Mechanism of oxidation of 4,7-di(phenothiazine)-1,10-phenanthroline at the potentials of the first, second, and third oxidation wave, respectively <sup>13</sup>.

### Conclusions

This research confirmed the importance of *in situ* IR spectroelectrochemical technique in the determination of the reaction redox mechanism. The selected parameters of the spectroelectrochemical setup and choice of measurement conditions, both can acquire the response, which successfully leads to identification of the short living intermediate. The final oxidation products were analyzed by means of HPLC-MS/MS after the oxidative electrolysis. Obtained electrochemical and spectroelectrochemical results lead to determination of the oxidation properties of both compounds, 3-FPM and 1,10-phenanthroline substituted with phenothiazine bioactive unit.

### Acknowledgments

This work has been supported by Czech Science (RVO 61388955).

### References

1. Wohlfarth A., Weinmann W.: *Bioanalysis* 2, 965 (2010).
2. Shafi A., Bery A. J., Summall H., Wood D. M., Tracy D. K.: *Ther. Adv. Psychopharmacol.* 10, 2045125320967197 (2020).
3. Mayer F. P., Burchardt N. V., Decker A. M., Partilla J. S., McLaughlin G., Kavanagh P. V., Sandtner W., Blough B. E., Brandt S. D., Baumann M. H., Sitte H. H., *Neuropharmacol.* 134, 149 (2018).
4. Mardal M., Miserezo B., Bade R., Portoles T., Bischoff M., Hernandez F., Meyer M. R., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 128, 485 (2016).
5. Jurva U., Weidolf L.: *Trends Anal. Chem.* 70, 92 (2015).
6. Gul T., Bischoff R., Permentier H. P.: *Trends Anal. Chem.* 70, 58 (2015).
7. Jirouskova, E., Cabala, R., Sokolova, R.: Voltammetric study of new psychoactive substance 3-fluorophenmetrazine. *Electrochem. Sci. Adv.* (2022) e2100223, pp.1-10..
8. Ramesova, S., Degano, I., Sokolova, R.: *Electrochim. Acta*, 133, 359 (2014).
9. Sokolova R., Nycz J. E., Ramesova S., Fiedler J., Degano I., Szala M., Kolivoska V., Gal. M.: *J. Phys. Chem. B* 119, 6074 (2015).
10. Ramesova S., Sokolova R., Degano I.: *Electrochim. Acta*, 182, 544 (2015).
11. Ramesova S., Degano I., Sokolova R.: *J. Electroanal. Chem.* 788, 125 (2017).
12. Wantalok, J., Sokolova, R., Degano, I., Kolivoska, V., Nycz, J. E.: *Electrochim. Acta* 370, 137674 (2021).
13. Wantalok, J., Sokolova, R., Degano, I., Kolivoska, V., Nycz, J. E., Fiedler, J.: *ChemElectroChem* 8, 2935 (2021).

14. Nycz J.E., Wantulok J., Sokolova R., Pajchel L., Stankevic M., Szala M., Malecki J.G., Swoboda D.: *Molecules* *24*, 4102 (2019).
15. Zucchi G., Murugesan V., Tondelier D., Aldakov D., Jeon T., Yang F., Thuery P., Ephritikhine M., Geffroy B., *Inorg. Chem.* *50*, 4851 (2011).
16. Barr D. A., Haszeldine R. N., *J. Chem. Soc.* 4169 (1955).
17. Bard A. J., Faulkner L. F., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* - 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, New York, 2001.

**Electrochemical and Electron Microscopic Characterization of Solid-Disk  
Shungite Electrodes**  
**(Elektrochemická a elektronově mikroskopická charakterizace pevných diskových  
šungitových elektrod)**

Milan Šýs, Michaela Bártová, Martin Bartoš, Tomáš Mikysek, and Ivan Švancara  
University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical  
Chemistry, Studentská 573, 53210 Pardubice, Czech Republic

**Abstract**

Two different types of shungites were tested as promising electrode materials for electroanalysis. Noble elite and black raw shungite stones were subjected to microscopic and elemental analysis using scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy, respectively. These stones were mechanically shaped into cylinders and then embedded into plastic tubes equipped with an electrical contact, giving rise to the appropriate solid-disk electrodes. Cyclic voltammetric measurements with pure 0.1 mol L<sup>-1</sup> Britton-Robinson buffer (pH 7) and 1 mmol L<sup>-1</sup> potassium ferrocyanide at scan rates ranging from 20 to 300 mV s<sup>-1</sup> were carried out to determine the corresponding double-layer capacitances, heterogeneous electron transfer rate constants, charge transfer coefficients, exchange-current densities, and electrochemically active surface areas. Compared to a commercially available glassy carbon electrode, only electrodes derived from carbon-rich elite shungite (90.6–94.1%) could eventually serve as several times cheaper alternatives.

**Keywords:** Shungite, Scanning electron microscopy, Energy-dispersive X-ray spectroscopy, Electrochemical kinetics, [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>/[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> redox couple.

**Introduction**

In general, shungite is defined as a unique Precambrian carbonaceous natural mineral of organic origin that can be found in its raw form only in the Republic of Karelia, the Russian Federation. This mineral received its name from a small village called Shunga where it was first discovered. Shungite stones are classified into five categories according to carbon content. However, a trivial division took hold in the lay public, namely to noble elite shungite with a silvery surface (≥90 % carbon; type I), gray Petrovsky shungite (50-70 % carbon; type II), and black regular shungite (30-50 % carbon; type III). The shungite represents a rather amorphous carbon in sp<sup>2</sup> and sp<sup>3</sup> types, with well-developed mono- or stacked graphene layers (≤200 nm) which form spatially arranged, curved, and bent fractals<sup>1</sup>. Besides, shungite contains (<0.001% w/w) multi-layered fullerene-like globules with a diameter of 10-30 nm. However, numerous impurities (mineral veins) of quartz (SiO<sub>2</sub>), aluminosilicates (NaAlSi<sub>3</sub>O<sub>8</sub>), feldspars, carbonates, mica, pyrite, and metal (Al, Mg, Ti, and Na) oxides can be visible to the naked eye in less noble shungites<sup>2</sup>. In this study, raw stones of regular and elite shungite were machined into cylindrical shapes to form the corresponding solid-disk elite shungite (EShE) and regular shungite (RShE) electrodes. The resulting shungite-based sensors with relatively low electrical resistivity (≥10 Ω cm)<sup>3</sup> were compared with the standard glassy carbon electrode (GCE) in the electrochemical behavior of ferro/ferricyanide redox couple. In addition, shungite stones were also subjected to microscopic and elemental analysis, whereas the obtained results were reflected in those from electrochemical kinetics studies.

## Experimental part

Potassium hexacyanoferrate(II) trihydrate ( $\geq 99.95\%$  trace metals basis) was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Sodium hydroxide, 98.5% boric acid, 85% phosphoric acid, and glacial acetic acid were from Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Czech Republic). A deionized water with a resistivity of  $18.3 \text{ M}\Omega \text{ cm}$  obtained from Milli-Q<sup>®</sup> deionization unit from Merck Millipore (Burlington, USA) was used for the preparation of  $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  stock solution, and  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  Britton–Robinson buffers (BRB) of different pH values.

Raw stones of elite and regular shungite were mechanically shaped into rollers (height 10 mm and diameter 8 mm) using EcoMet 30 manual grinding and polishing machine from Haryko Praha s.r.o. (Praha, Czech Republic), whereas self-stick sanding papers WS flex 18 C with silicon carbide of different grit levels (60–320) from Hermes Schleifmittel GmbH (Hamburg, Deutschland) were chosen. The obtained rollers were embedded into a cavity of plastic pipes with metal springs which served as electrical contact, as shown in Fig. 1.



**Fig. 1.** Image of homemade solid-disk elite shungite electrode.

Scanning electron microscopy (SEM) with the backscattered-electron (BSE) and secondary-electron (SE) modes for imaging raw shungite stones microstructures and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) for elemental analysis were performed by TESCAN VEGA3 SBU with EDX probe Bruker X-Flash Detector 410-M from TESCAN s.r.o. (Brno, Czech Republic).

Each electrochemical experiment was carried out in a glass voltammetric cell containing 10 mL of  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  BRB with immersed GCE, EShE, or RShE, followed by a silver chloride reference electrode with  $3 \text{ mol L}^{-1}$  KCl salt bridge from Metrohm (Herisau, Switzerland) and a platinum sheet from Elektrochemické detektory (Turnov, Czech Republic), acting as a counter electrode. The chosen variant of electrode setup was connected to a potentiostat/galvanostat Autolab (model PGSTAT101) operated through NOVA 1.11 software, both from Metrohm.

To compare values of double-layer capacitance ( $C_{DL}$ ), cyclic voltammetry (CV) measurements of pure  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  BRB (pH 7) were carried out at potential step ( $E_{step}$ ) of 5 mV and scan rate ( $\nu$ ) ranging from  $0.05$  to  $1.50 \text{ V s}^{-1}$ . To determine the electrochemically active surface areas ( $ECSA$ ), heterogeneous electron-transfer rate constants ( $k_c$ ), exchange-current densities ( $j_0$ ), and charge-transfer coefficients ( $\alpha$ ), similar electrochemical experiments with  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  potassium ferrocyanide in the same buffer at the potential step of 5 mV and scan rate ranging from  $0.02$  to  $0.3 \text{ V s}^{-1}$  were performed.



## Results and discussion

Microscopic and elemental analysis of elite and regular shungite stone helped to find out significant difference in their chemical compositions. Elite shungite (90.6–94.1 % C) resembled a smooth homogeneous carbonaceous material, very similar to glassy carbon. Unlike the previous case, the regular black shungite (62.3–64.2 % C) can be defined as a fragmented (rough surface) material with an admixture of many impurities (minerals) which form druses (pyrite and aluminosilicates) and veins (quartz)<sup>3</sup>, as seen in Fig. 2. According to this finding, the elite shungite should be preferred over regular shungite for the fabrication of solid disk electrodes applicable in the electroanalysis.

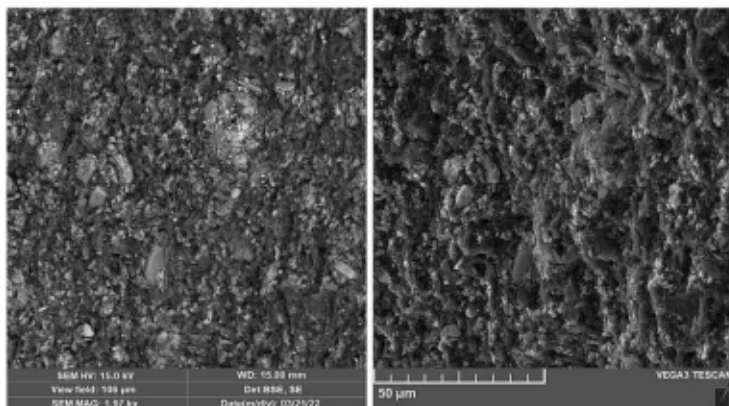
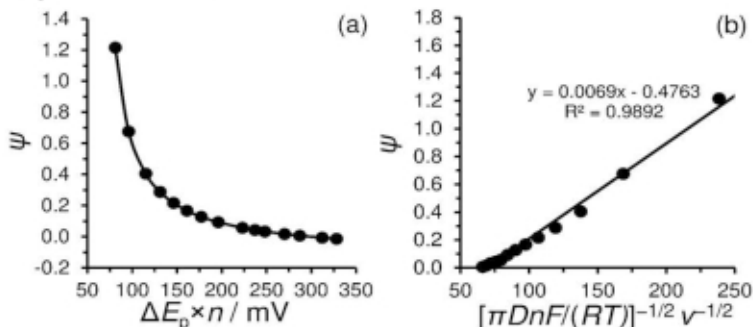


Fig. 2. Typical SEM images ( $\sim 1.97 \times 10^3$  magnification) of a regular shungite stone.

Compared to GCE, shungite-based electrodes can be characterized with a similarly broad cathodic and slightly shorter anodic range. A significant increase in double-layer capacitance in the case of the RShE ( $192.0 \mu\text{F cm}^{-2}$ ) in comparison with GCE ( $27.6 \mu\text{F cm}^{-2}$ ) and EShE ( $45.7 \mu\text{F cm}^{-2}$ ) was probably caused by the low content of carbon and the high proportion of impurities ( $\text{SiO}_2$  and  $\text{FeS}_2$ ). If their values of electrochemically active surfaces and geometrical surfaces are divided ( $\text{ECSA}/A_{\text{geo}}$ ), it will be found that ECSA decreases in this order EShE > GCE > RShE<sup>3</sup>.

The linear relationships of log current density ( $j$ ) on overpotential ( $\eta$ ), known also as Tafel behaviors, were extrapolated ( $R^2 > 0.9924$ ) to yield the values of the exchange-current densities ( $j_0$ ) and barrier-symmetry factor ( $\beta$ ), which could be replaced by the charge-transfer coefficients ( $\alpha$ ) for the investigated single-step reaction ( $\text{Fe}^{3+}$  to  $\text{Fe}^{2+}$ ). As the  $j_0$  value reflects the spontaneous reaction rate at equilibrium potential, it can be deduced that elite shungite ( $4.3 \times 10^{-6} \text{ A cm}^{-2}$ ) is preferable to regular black shungite ( $8.7 \times 10^{-7} \text{ A cm}^{-2}$ ). From the corresponding Tafel plots, the calculated  $\alpha$  values for the EShE and GCE were close to a theoretical value of 0.5, indicating the symmetry of the energy barrier. This fact was also confirmed by the calculated  $|j_0^{3+}/j_0^{2+}|$  values that varied from 1.018 to 0.976 for the EShE and from 0.986 to 1.090 for the GCE<sup>3</sup>.

A Nicholson method<sup>4</sup> based on kinetic parameter  $\Psi$  (dimensionless quantity) was used for the determination of heterogeneous electron-transfer rate constants ( $k_0$ ), as demonstrated for GCE in Fig. 3. The rate of electron-transfer was determined two times higher for RShE ( $0.0159 \text{ cm s}^{-1}$ ) than for GCE ( $0.0069 \text{ cm s}^{-1}$ ) and ESHE ( $0.0078 \text{ cm s}^{-1}$ ). A logical explanation can be seen in the presence of the above-mentioned conductive impurities ( $\geq 20.4\% \text{ Fe}$ ), which probably significantly compensate for a lower amount of carbon, as also evident from comparable ECSA values<sup>5</sup>.



**Fig. 3.** Plot of  $\psi$  values vs.  $\Delta E_p \times n$  for kinetics of ferro/ferricyanide redox couple at GCE with a diameter of 3 mm (a). The plot of  $\psi$  vs.  $[\pi D n F / (RT)]^{-1/2} v^{-1/2}$  for the oxidation of  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  potassium ferrocyanide in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  BRB (pH 7) where the used diffusion coefficient ( $D$ ) equal to  $7.2 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ s}$  for ferricyanide in an aqueous environment at  $25^\circ \text{C}$  was obtained from the literature<sup>5</sup>. The values of  $\psi$  were calculated from the experimental  $\Delta E_p$  values.

## Conclusions

From all the above-mentioned facts, it can be concluded that solid-disk electrodes manufactured from elite shungite stones represent a promising electrode material exhibiting similar electrochemical properties as many times expensive glassy carbon. On the other hand, limited utilization of regular shungite in electroanalytical applications can be assumed due to the presence of numerous electroactive impurities.

## Acknowledgments

Financial support from the Faculty of Chemical Technology, the University of Pardubice (project No. SGS-2023-001) is gratefully acknowledged.

## References

1. Kovalevski V.V., Buseck P.R., Cowley J.M.: *Carbon* **39**, 243 (2001).
2. Chou N.H., Pierce N., Lei Y., Perea-López N., Fujisawa K., Subramanian S., Robinson J.A., Chen G., Omichi K., Rozhkov S.S., Rozhkova N.N., Terrones M., Harutyunyan A.R.: *Carbon* **130**, 105 (2018).
3. Šýs M., Bártová M., Bartoš M., Švancara I., Mikysek T.: *Materials* **16**, 1217 (2023).
4. Nicholson R.S.: *Anal. Chem.* **37**, 1351 (1965).
5. Moldenhauer J., Meier M., Paul D.W.: *J. Electrochem. Soc.* **163**, H672 (2016).

**Electrochemical Oxidation of Systemic Fungicide Metalaxyl and its Determination in Natural Waters**  
**(Elektrochemická oxidace systémového fungicidu metalaxylu a jeho stanovení v přírodních vodách)**

Renáta Šelešovská, Oleksandr Matvieiev, Aneta Fendrichová, Lenka Janíková, and Jaromíra Chýlková

University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Institute of Environmental and Chemical Engineering, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic,  
E-mail: renata.selesovska@upce.cz

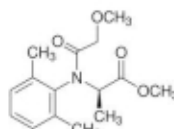
**Abstract**

Within the framework of this work, an electrochemical behavior of a systemic fungicide metalaxyl was studied for the first time using a boron-doped diamond electrode. A novel voltammetric method for its determination was developed and, due to low concentrations of pesticides in natural waters, a sample pre-concentration procedure was also proposed. In addition to the classic arrangement of an electrochemical cell with a bulk working electrode, the possibility of using screen-printed sensors and a flow system was also tested.

**Keywords:** Metalaxyl, Electrochemical oxidation, Boron-doped diamond electrode, Screen-printed sensor, Flow-injection analysis, Determination, Natural water.

**Úvod**

Metalaxyl (ML, methyl-2-(N-(2-methoxyacetyl)-2,6-(dimethylamino)propanoát,  $C_{15}H_{21}NO_4$ , CAS: 57837-19-1, Obr. 1) se řadí do skupiny systémových fungicidů<sup>1</sup>. Používá se k regulaci chorob rostlin způsobených houbami řádu *Peronosporales* a třídy *Oomycete*, které způsobují plísně, uvadnutí nebo hnilobu stonků a plodů<sup>1,2</sup>. ML inhibuje růst hub na dřevě, plstech, ale i např. v bazénech<sup>3</sup>. Díky své širokospektrální aktivitě se používá na různé plodiny po celém světě. ML má obecně nízkou akutní toxicitu, ale je středně dráždivý a byl zařazen do kategorie toxicity II (označující druhý nejvyšší stupeň akutní toxicity) pro účinky podráždění očí. Na základě řady studií na zvířatech lze předpokládat negativní vliv na játra. ML nevykazuje známky karcinogenity ani reprodukční toxicitu nebo mutagenitu<sup>4</sup>.



**Obr. 1.** Strukturní vzorec systémového fungicidu metalaxylu.

V literatuře byly popsány různé metody stanovení ML, nejčastěji kapalinová<sup>5,6</sup> a plynová chromatografie<sup>7</sup> ve spojení s různými detektory. Dále byla popsána metoda ELISA<sup>8</sup> nebo průtoková analýza s FTIR spektrometrií<sup>9</sup>. Voltametrické stanovení ML nebylo doposud popsáno. Vzhledem k tomu, že ML je elektrochemicky aktivní, nabízí se voltametrie jako alternativa k výše popsaným metodám. Hlavními výhodami jsou jednoduchost, cenová a časová nenáročnost, snadná obsluha a obvykle také jednoduchá příprava vzorku k analýze. Současně umožňuje miniaturizaci, a tedy využití v terénních analyzátoch a průtokových systémech.

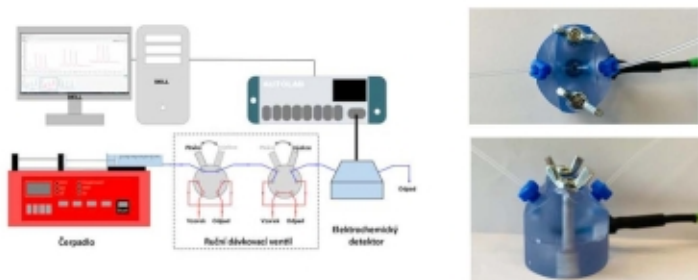
Vzhledem k širokému využitelnému potenciálovému rozsahu a dalším výjimečným elektrochemickým vlastnostem<sup>10-12</sup> byla pro studium voltametrického chování a vývoj metody

stanovení ML použita borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE). Vedle klasického tříelektrodeového uspořádání elektrochemického článku v polarografické nádobce byly použity rovněž nové tištěné senzory (SPE) s chemicky deponovanou BDDE (SP/BDDE)<sup>13, 14</sup>, které umožňují snazší převedení analýzy do průtokového systému. Výhodou SPE je jednoduchá a levná výroba velkého množství senzorů umožňující jednorázové využití, nebo možnost analýzy malých objemů vzorků. Použitelnost SPE je dána zejména materiálem pracovní elektrody<sup>15</sup>.

### Experimentální část

Standardní roztok ML (Sigma Aldrich) o koncentraci  $1 \times 10^{-3}$  mol/l byl připraven rozpuštěním navážky v acetonitrilu a uchován v lednici (4 °C) bez přístupu světla. Brittonův-Robinsonův pufr (BRB, pH 2-11) byl připraven mísením alkalické a kyselá složky s využitím pH-metru. Alkalickou složku tvořil roztok 0,2 mol/l NaOH a kyselá složka se skládala z 0,04 mol/l roztoku  $H_3PO_4$ ,  $H_3BO_3$  a  $CH_3COOH$ . Při analýze ML byly dále testovány elektrolyty 0,05 mol/l, 0,1 mol/l, 1 mol/l, 2 mol/l, 3 mol/l  $H_2SO_4$ , 0,1 mol/l  $HNO_3$ , 0,1 mol/l HCl, 0,1 mol/l  $HClO_4$ , 0,1 mol/l  $CH_3COOH$  a 0,1 mol/l  $H_3PO_4$  připravené naředěním zásobních roztoků jednotlivých kyselin. Všechny chemikálie byly dodány firmou Ing. Petr Švec – PENTA s.r.o. Praha.

Pro voltametrická měření byl použit Autolab PGSTAT 12 (Metrohm, Nizozemí) se softwarem Nova 2.1.5. V tříelektrodeovém uspořádání článku byla jako pracovní elektroda (WE) použita BDDE (BioLogic, Seyssinet-Pariset, Francie, povrch 7,07 mm<sup>2</sup>), nasycená argentchloridová elektroda (Ag/AgCl, KCl(sat.)) sloužila jako referenční (RE) a platinový drátek jako pomocná elektroda (CE) (Monokrystaly, Turnov). Dále byl používán SP/BDDE (SlovakDiamondGroup, FEI STU, Slovensko)<sup>14</sup> tvořený WE (povrch WE 7,07 mm<sup>2</sup>) i CE z BDD a Ag/AgCl jako RE. Systém průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí (FIA-ED) byl sestaven z programovatelné injekční pumpy (Protea, USA), injekční plastové stříkačky o objemu 50 ml (Steriwund, Polsko), dávkovací chromatografického šesticestného ventilu s dávkovací smýčkou, hadiček a průtokové cely vytisknuté na 3D tiskárně (SlovakDiamondGroup, FEI STU, Slovensko), v níž byl umístěn tištěný senzor SP/BDDE. Schéma použitého zařízení pro FIA-ED je uvedeno na Obr. 2 i s detailem průtokové elektrochemické cely.



Obr. 2. Schéma FIA-ED s detailem průtokové elektrochemické cely.

Aktivace BDDE byla realizována metodou cyklické voltametrie (CV) v prostředí 1 mol/l  $H_2SO_4$ . Bylo zařazeno 20 cyklických voltamogramů od počátečního potenciálu ( $E_{in}$ ) -1500 mV k potenciálu obratu ( $E_{switch}$ ) +2500 mV, konečný potenciál ( $E_{fin}$ ) byl +2500 mV a rychlost polarizace ( $v$ ) 100 mV/s. Pro SP/BDDE byly podmínky aktivace shodné, zařazených cyklů bylo obvykle 5-10 (stabilizace odezvy senzoru). Parametry voltametrických metod byly následující: CV:  $E_{in} = -1500$  mV,  $E_{switch} = +2500$  mV,  $E_{fin} = +2500$  mV,  $v = 100$  mV/s; DPV:  $v = 40$  mV/s,

výška pulzu ( $A$ , amplituda) = 50 mV, šířka pulzu ( $t$ , doba trvání pulzu) = 10 ms; SWV:  $v$  = 40 mV/s,  $A$  = 30 mV, frekvence ( $f$ ) = 20 Hz. Aktivace systému FIA-ED probíhala promytím 50 ml 1 mol/l  $H_2SO_4$  rychlostí 1,5 ml/min. Jako mobilní fáze, resp. základní elektrolyt byl používán roztok 0,1 mol/l  $H_2SO_4$  umístěný v 50 ml injekční stříkačce. Parametry měření byly následující: průtok elektrolytu ( $F_m$ ) = 1,5 ml/min, dávkovaný objem vzorku ( $V_{inj}$ ) = 50  $\mu$ l, potenciál detekce ( $E$ ) = 1,8 V. Vzorkovací smyčka se promývala a plnila vzorkem pomocí 5 ml plastové injekční stříkačky. Po každém měření se systém FIA promyl 50 ml destilované vody a ethanolem rychlostí 4 ml/min.

Pro extrakci tuhou fází (SPE) byly použity kolony Chromabond C18ec (500 mg sorbentu, ref.730014, Lot.53.246) naplněné 500 mg silikagelu s navázanou fází C18. Kolonka byla napojena na extraktor (Visiprep SPE Vakuum Manifold) a přes pojistnou nádobu na membránovou vývěvu, která zajišťovala podtlak (5 kPa). Kolonka byla aktivována promytím 10 ml acetonitrilu a následně 10 ml deionizované vody. Poté byl přes kolonku přesát vzorek vody o objemu 100 ml. Celkem bylo k analýze odebráno 500 ml vody a extrakce probíhala s využitím 5 extrakčních kolonek současně. Získáno bylo 100 ml eluátu, který byl následně odpařen do sucha na vakuové rotační odparce při teplotě 45 °C a tlaku 25 kPa. Odparek byl poté rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu a použit pro voltametriickou analýzu. Druhý postup zakoncentrování byl založen na adsorpci ML na aktivní uhlí (AU) a následné eluci. Do Erlenmeyerovy baňky k 500 ml vody bylo přidáno 0,5 g aktivního uhlí Filtrasorb 400 (velikost částic v rozsahu 0,425-1,7 mm, Chemviron, Feluy, Belgie). Baňka byla umístěna na 2 hodiny do třepačky. Poté byla provedena filtrace, oddělené aktivní uhlí bylo převedeno do baňky se 100 ml acetonitrilu a baňka byla opět na 1 hodinu umístěna do třepačky. Po eluci ML do acetonitrilu bylo aktivní uhlí odfiltrováno. Následovalo odpaření acetonitrilu do sucha na vakuové rotační odparce a rozpuštění odparu v 1 ml acetonitrilu.

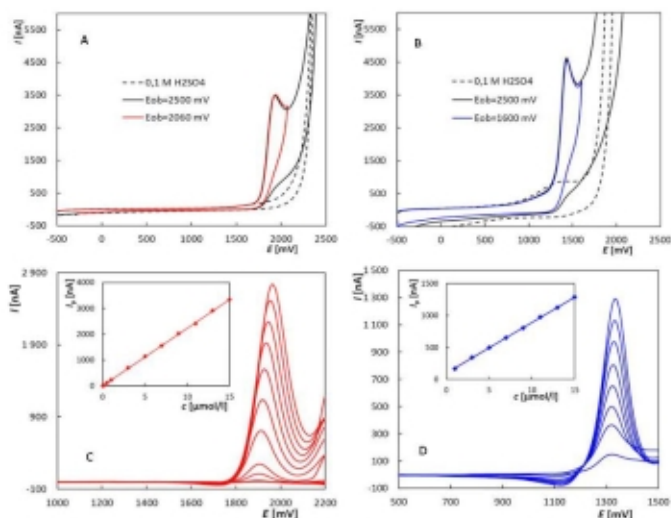
### Výsledky a diskuse

Na obrázku 3A a B jsou uvedeny cyklické voltagramy ML zaznamenané na BDDE i SP/BDDE v prostředí 0,1 mol/l  $H_2SO_4$ , která byla na základě studie vlivu pH na voltametriické chování ML zvolena jako vhodný základní elektrolyt. Je zřejmé, že analyt poskytuje jeden anodický pik, který je v případě SP/BDDE posunut k méně pozitivním potenciálům v souvislosti s použitou quazi-referentní elektrodou. Jedná se o chemicky ireversibilní reakce, které jsou řízeny difúzí, což potvrzují hodnoty směrnice logaritmických závislostí výšky piku ( $I_p$ ) na rychlosti polarizace ( $v$ ) popsané rovnicemi (1) pro BDDE a (2) pro SP/BDDE.

$$\log(I_p[\text{nA}]) = (0,4901 \pm 0,0038) \log(v[\text{mV/s}]) + (1,6810 \pm 0,0075), r = 0,9998 \quad (1)$$

$$\log(I_p[\text{nA}]) = (0,5002 \pm 0,0051) \log(v[\text{mV/s}]) + (2,920 \pm 0,010), r = 0,9997 \quad (2)$$

Pro stanovení ML byly testovány diferenční pulzní (DPV) a square wave (SWV) voltametrie. Nejprve byly optimalizovány parametry metod a na základě porovnání  $I_p$ , resp. parametrů změřených koncentračních závislostí, byla vybrána DPV. Součástí optimalizace byla rovněž předúprava povrchu BDDE. Byl testován anodický a katodický pretreatment, cyklování v určitém rozsahu potenciálů a mechanické leštění povrchu na alumině. V případě cyklování a anodické předúpravy byly získány velmi dobře opakovatelné signály (RSD < 2 %). Nejvyšší proudová odezva byla zaznamenaná po cyklování. V případě leštění a katodické předúpravy byl výsledný pik srovnatelný s anodickou, ale opakovatelnost byla horší, trvalo několik měření, než došlo k ustálení odezvy. Pro další měření byla používána aktivace/předúprava povrchu BDDE cyklováním, které bylo zařazeno pouze na začátek práce. V průběhu měření nebylo nutné elektrodu regenerovat. V případě SP/BDDE byla tato procedura převzata, ale bylo aplikováno jen 5-10 cyklů potřebných pro ustálení odezvy senzoru.



**Obr. 3.** Cyklické voltamogramy ML ( $5 \times 10^{-5}$  mol/l) zaznamenané na BDDE (A) a SP/BDDE (B) a DP voltamogramy ML zaznamenané na BDDE (C) a SP/BDDE (D) v závislosti na koncentraci analytu ( $2,5 \times 10^{-6} - 1,5 \times 10^{-5}$  (C) a  $1 \times 10^{-6} - 1,5 \times 10^{-5}$  mol/l (D)), DP křivky uvedeny po odečtu základního elektrolytu.

Na Obr. 3C a D jsou uvedeny DP voltamogramy ML zaznamenané na obou testovaných senzorech v závislosti na koncentraci. Ze závislosti  $I_p$  na  $c_{ML}$  je zřejmé, že výška piku roste lineárně s rostoucí koncentrací. V Tabulce I jsou uvedeny vypočtené statistické parametry. Metoda byla rovněž ověřena při analýze modelových roztoků, kdy byly stanoveny správné výsledky s velmi dobrou výtěžností (93-107 %) a opakovatelností (RSD < 5 %). Vzhledem k reálným koncentracím pesticidů v přírodních vodách však nebyly dosažené meze stanovitelnosti dostatečné a muselo být zařazeno zakonzentrování vzorku. Byly testovány dva postupy využívající adsorpci na aktivní uhlí s následnou elucí acetonitrilem a SPE kolonky naplněné silikagelem s navázanou fází C18. V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky stanovení ML o koncentraci  $5,0 \times 10^{-6}$  mol/l v modelových roztocích s využitím BDDE. Ukázalo se, že oba postupy vykazují dostatečnou výtěžnost (cca 93 %). Pro analýzu říční vody byl aplikován postup s aktivním uhlím, a i v tomto případě bylo dosaženo uspokojivých výsledků.

Poslední experimenty byly zaměřeny na aplikaci vyvinuté metody v FIA-ED. V tomto případě se osvědčilo použití SP/BDDE. Jako u každé analytické metody bylo potřeba nejprve optimalizovat parametry. V případě FIA-ED se jednalo o potenciál oxidace analytu ( $E$ ), průtok mobilní fáze ( $F_m$ ) a objem dávkovaného vzorku ( $V_{inj}$ ). Stejně jako při klasické voltametii byla jako elektrolyt použita  $H_2SO_4$  o koncentraci 0,1 mol/l. Opakovatelnost měření s využitím navržené metody byla velmi dobrá (RSD = 2,05 %). Výška piku roste lineárně v širokém koncentračním rozsahu (LDR =  $1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$  mol/l).

**Tabulka I.**

Shrnutí statistických parametrů pro stanovení ML s využitím BDDE i SP/BDDE

Elektroda	Elektrolyt	LOD [mol/l]	LOQ [mol/l]	LDR [mol/l]
BDDE	0,1 mol/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	$1,6 \times 10^{-8}$	$5,5 \times 10^{-8}$	$2,5 \times 10^{-8} - 4,0 \times 10^{-5}$
SP/BDDE	0,1 mol/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> BRB (pH 9)	$3,5 \times 10^{-7}$ $7,7 \times 10^{-7}$	$1,2 \times 10^{-6}$ $2,6 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-7} - 4,0 \times 10^{-5}$ $5,0 \times 10^{-7} - 6,1 \times 10^{-5}$

**Tabulka II.**Výsledky stanovení ML ( $5,0 \times 10^{-8}$  mol/l) pomocí BDDE v modelových vzorcích a říční vodě po zakoncentrování vzorků.

Typ vzorku	Postup	Stanoveno [mol/l]	Výtěžnost [%]
Modelový roztok	AU	$4,69 \times 10^{-8}$	93,7
	SPE	$4,66 \times 10^{-8}$	93,2
Říční voda	AU	$4,59 \times 10^{-8}$	91,8

AU – postup s využitím aktivního uhlí, SPE – extrakce tuhou fází

**Závěr**

V rámci této práce bylo studováno voltametrické chování fungicidu metalaxylu a byla vyvinuta metoda jeho stanovení, včetně zakoncentrování vzorků při nízkých koncentracích analytu. Navržená metoda byla úspěšně aplikována rovněž v průtokové analýze.

**Acknowledgments**

This research has been supported by the Czech Science Foundation (Project No. 20-01589S) and The University of Pardubice (Project No. SGSFChT\_2023\_002).

**References**

- Sukul P., Spiteller M.: *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **164**, 1 (2000).
- Monkiedje A., Spiteller M.: *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2**, 272 (2005).
- Panek M., Ali A., Helmer S.: *Plant Prot. Sci.* **58**, 92 (2022).
- [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/reregistration/fs\\_PC-113501\\_1-Sep-94.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-113501_1-Sep-94.pdf), Downloaded April 20<sup>th</sup> 2023.
- Jankulovská M.S., Velkoska-Markovská L., Petanovska-Ilievska B., Ilievski U.: *J. Anal. Chem.* **74**, 339 (2019).
- Yu W., Luo X., Qin X., Huang M., Li J., Zeng S., Zhang K., Hu D.: *Environ. Monit. Assess.* **192**, 1 (2018).
- Vuik J., Brouwer W., Krishnadath G.J.N., Van de Lagemaat D.: *J. Agri. Food Chem.* **37**, 88 (1989).
- Bushway R.J., Thome E.: *Food Agri. Immun.* **10**, 23 (1998).
- Quintas G., Armenta S., Morales-Noe A., Garrigues S., De La Guardia M.: *Anal. Chim. Acta* **480**, 11 (2003).
- Patel K., Hashimoto K., Fujishima A.: *Denki Kagaku* **60**, 659 (1992).
- Schwarzova-Peckova K., Vosahlova J., Barek J., Sloufova I., Pavlova E., Petrak V., Zavazalova J.: *Electrochim. Acta* **243**, 170 (2017).
- Selesovska R., Krankova B., Stepankova M., Martinkova P., Janikova L., Chylkova J., Vojs M.: *J. Electroanal. Chem.* **821**, 2 (2018).
- Šešlovská R., Navrátil T., Hrdlička V., Michniak P., Hatala M., Vojs M., Marton M., Matvieiev O., Janiková L., Chýlková J.: *Electrochim. Acta* **403**, 139642 (2022).
- Matvieiev O., Šešlovská R., Vojs M., Marton M., Michniak P., Hrdlička V., Hatala M., Janiková L., Chýlková J., Skopalová J., Cankář P., Navrátil T.: *Biosensors* **12**, 241 (2022).
- Metters J.P., Kadara R.O., Banks C.E.: *Analyst* **136**, 1067 (2011).

### 3D Printed Microfluidic Cell for Spectroelectrochemical Analysis

Martin Šikula, Eva Vaněčková, Magdaléna Hromadová, and Viliam Kolivoška  
J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences,  
Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: viliam.kolivoska@jh-inst.cas.cz

#### Abstract

Recent advances in fused deposition modeling 3D printing (FDM 3DP) enabled the manufacture of customized spectroelectrochemical (SEC) devices. Despite significant progress, reported designs still rely on conventional optical components (windows and cuvettes). In this work, we apply bi-material FDM 3DP combining electrically conductive and optically translucent filaments to manufacture a fully integrated microfluidic SEC device. Employing cyclic voltammetric measurements with redox probes, we demonstrate that the platform allows SEC sensing of reactants, intermediates, and products of charge transfer reactions in an oxygen-free environment. Developed approaches pave the way for SEC devices with dramatically reduced costs compared to currently available commercial platforms.

**Keywords:** Spectroelectrochemistry, Three-dimensional printing, Fused deposition modeling, Computer-assisted design, Microfluidics.

#### Introduction

Past years have seen an unprecedented boom in the application of 3D printing (3DP) approaches in all disciplines of sciences involving electrochemistry<sup>1-4</sup>. Fused deposition modeling (FDM) is the most commonly employed 3DP technique, relying on melting thermoplastic filaments and their layer-by-layer deposition employing a moving nozzle. Materials used in FDM 3DP include polylactic acid (PLA), acrylonitrile butadiene styrene (ABS), and polyethylene terephthalate (PET). Recently developed composites of thermoplastic materials and allotropes of carbon show sufficient electric conductivity and have allowed the manufacture of 3DP electrodes for diverse electrochemistry-related applications such as voltammetric sensing of various analytes<sup>2-4</sup>, water electrolysis<sup>5</sup>, reduction of carbon dioxide<sup>6</sup>, organic electrosynthesis<sup>7</sup>, pH measurements<sup>8</sup>, direct impedimetric sensing of electrolyte conductivity<sup>9,10</sup>, and capacitively coupled contactless conductivity detectors<sup>11,12</sup>. Several works reported that 3DP electrodes have charge transfer characteristics comparable to properties of conventional electrodes<sup>13-19</sup>.

FDM 3DP has also gained importance in spectroelectrochemistry (SEC)<sup>20</sup>. This technique enables the detection and analysis of in-situ electrogenerated intermediates and products of charge transfer reactions and is instrumental in determining the reaction mechanism and charge consumption in these processes<sup>21,22</sup>. The first application of FDM 3DP in SEC was reported in 2010 by Wilson et al., describing a holder to accommodate conventional quartz windows and optically transparent electrodes<sup>23</sup>. Two years later, Symes et al. presented a similar design with quartz replaced by glass<sup>24</sup>. In 2013, Brisendine et al. developed an insert to a standard cuvette equipped with conventional electrodes, making a thin-layer SEC cell<sup>25</sup>. In 2016, Achilli et al. employed stereolithographic 3DP to manufacture a SEC cell with integrated optical windows and conventional electrodes<sup>26</sup>. In 2019, Wirth et al. reported the first use of 3DP electrodes in SEC, made of either PLA/graphene or PLA/carbon black (PLA-CB) composites, and integrated them in the housing printed from insulating PLA<sup>27</sup>. In the same year, dos Santos et al. reported the manufacture of a Raman SEC device composed of PLA/graphene working electrode and insulating ABS housing<sup>28</sup>. In 2020, Vaněčková et al. printed working electrodes from PLA/carbon nanotube composite and used them to perform SEC analysis in a quartz cuvette<sup>19</sup>.

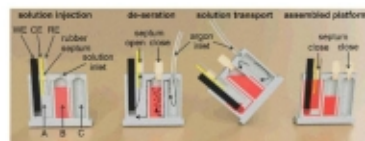


Above-listed SEC devices include non-3DP optical components (cuvettes or windows), making their manufacture partially reliant on conventional techniques. In this work, we present a fully 3DP SEC platform, with a built-in apparatus for purging inspected solutions by an inert gas. Electrically conductive PLA-CB composite is employed to print the working electrode, while optically translucent PET filament is used to print the cell. The applicability of the platform is demonstrated by in-situ UV-Vis absorption spectroscopic sensing of charge transfer reactions in ruthenium acetylacetonate, ethylviologen dibromide, and ferrocenemethanol redox probes.

### Experimental part

The design and printing of the SEC platform follow approaches developed for the manufacture of 3DP electrochemical reaction ware presented in our recent works<sup>6-10,15,17-19,29-31</sup>. Geometries of the cell and the working electrode (see Fig. 1) were devised in Fusion 360 (Autodesk Inc., USA) program. The cell contains an electrochemical compartment (denoted as A in Fig. 1) for housing electrodes, connected to a pair of vessels (B and C) serving for de-aeration of the solution prior to the analysis. At the bottom, the electrochemical compartment has a groove to accommodate the end fork-shaped part of the working electrode, in which inspected charge transfer processes and spectroscopic sensing take place. The electrochemical compartment has two top openings, one for the 3DP working electrode and another one for a rubber band with a reference electrode (silver wire with AgCl layer) and a counter electrode (gold wire). Designs of the SEC cell and working electrode were exported from Fusion 360 as stl files and processed in Prusa Slicer 2.3.0, where instructions for 3D printing were generated.

Prusa I3 MK3S (Prusa Research s.r.o., Prague, Czech Republic) FDM 3D printer was used for the manufacture. The SEC cell was printed from translucent PET filament (HDglass Clear, Formfutura, The Netherlands) employing a 0.40 mm nozzle and layer height of 0.20 mm. The nozzle and the pad temperature were set to 220 and 80 °C. Working electrodes were printed from the PLA-CB composite (Proto-Pasta, ProtoPlant Inc., USA) employing a 0.25 mm nozzle and layer height of 0.15 mm. The nozzle and the pad temperature were set to 230 and 60 °C. All objects were printed with a unity extrusion multiplier and printing speed set to 45 mm/s for internal perimeters, 25 mm/s for small and external perimeters, 80 mm/s for infill, and 180 mm/s for non-printing moves. The SEC cell was printed with two perimeters and 100 % infill. Working electrodes were printed with perimeters completely filling their internal volume.



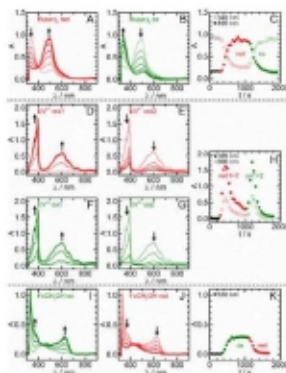
**Fig. 1.** Design of the platform. Cross-sectional computer-assisted design image of the SEC platform developed and utilized in this work, depicting the workflow of its assembly.

All solutions were prepared employing de-ionized water (resistivity 18.2 M $\Omega$  cm, TOC 3 ppb, Millipore). Ruthenium(III) acetylacetonate (97 %), ethylviologen dibromide (99 %), and ferrocenemethanol (97 %) were purchased from Sigma-Aldrich. Their solutions additionally contained 0.1 M potassium chloride (Sigma-Aldrich, 99.5 %) as a supporting electrolyte. The working electrode was masked by nail varnish except for void segments in the fork-shaped part and a small area on the top used as a contact. Upon drying, the working electrode was inserted into the electrochemical compartment. The solution to be inspected was introduced to vessel B.

It was de-aerated by argon gas flowing from vessel C. While pressurized, the cell was rotated allowing the solution to be transported to the electrochemical compartment. The cell assembly was completed by placing a rubber band with counter and reference electrodes. Spectra were obtained with a diode array detector Agilent 8453 UV-Vis-NIR spectrometer. SEC measurements were realized in staircase cyclic voltammetric regime at the polarization rate of  $2 \text{ mV s}^{-1}$  employing Autolab potentiostat (Metrohm). Spectra were recorded in  $0.1 \text{ V}$  intervals.

## Results and Discussion

We have selected three redox probes – ruthenium(III) acetylacetonate ( $\text{Ru}(\text{ac})_3$ ), ethylviologen ( $\text{EV}^{2+}$ ) dibromide, and ferrocenemethanol ( $\text{FcCH}_2\text{OH}$ ) – as model analytes to demonstrate the applicability of the developed SEC platform. All three probes have reversible charge transfer reactions rendering them suitable test beds for long-term monitoring of involved redox forms. SEC experiments were performed at a voltammetric polarization rate set to as low as  $2 \text{ mV s}^{-1}$ , to provide sufficient time for the diffusional mass transport of reacting species between the working electrode and the solution bulk. Upon each experiment, the absorption spectrum of water was recorded in the 3DP platform and was mathematically subtracted from SEC spectra. This approach filters out losses due to light scattering, reflection, and refraction in cell walls and enables net spectral characteristics of sensed redox forms to be presented (Fig. 2).



**Fig. 2.** Representative baseline-corrected absorption UV-Vis spectra recorded in SEC performed with  $0.5 \text{ mM}$   $\text{Ru}(\text{ac})_3$  (A,B),  $0.5 \text{ mM}$   $\text{EV}^{2+}$  dibromide (D to G), and  $4 \text{ mM}$   $\text{FcCH}_2\text{OH}$  (I,J) in de-aerated aqueous  $0.1 \text{ M}$  KCl solution at  $2 \text{ mV s}^{-1}$ . Panels C, H, and K show absorbance transients.

For  $\text{Ru}(\text{ac})_3$ , the initial spectrum (Fig. 2A, light curve) shows a dominant absorption band centered at  $340 \text{ nm}$ . Upon reduction, this feature decreases, while initially subtle band becomes pronounced at  $490 \text{ nm}$ , being characteristic of the radical anion  $\text{Ru}(\text{ac})_3^-$ . In the re-oxidation step (Fig. 2B), the band at  $490 \text{ nm}$  disappears while the original band at  $340 \text{ nm}$  is completely regained. Full restoration of the original spectrum indicates that the entire amount of the electrogenerated radical anion  $\text{Ru}(\text{ac})_3^-$  is converted back to the original form  $\text{Ru}(\text{ac})_3$ . An isosbestic point may be noticed at  $400 \text{ nm}$  corroborating the chemical reversibility of the charge transfer process. Fig. 2C shows absorbance transients evaluated at absorption maxima ( $340$  and  $490 \text{ nm}$ ). In both the reduction and re-oxidation steps, absorbance values reach plateaus indicating that the reaction conversion of the charge transfer process approaches unity.

The electrochemical reduction of  $EV^{2+}$  proceeds via two consecutive one-electron steps (denoted as red1/red2 and ox1/ox2 in Fig. 2D to H). This probe was selected to inspect the ability of the presented SEC platform to sense a radical cation  $EV^+$  as a reactive intermediate (maxima at 395 and 600 nm). Found chemical reversibility (compare Fig. 2D and F) confirms that the presented platform allows SEC sensing under strictly oxygen-free conditions.

We have further chosen  $FeCH_2OH$  probe to explore the functionality of the SEC platform in the anodic potential range (Fig. 2I,J). The signal of the electrogenerated radical cation product evaluated at 630 nm (Fig. 2K) reaches a plateau and is maintained for several hundreds of seconds, implying complete reaction conversion and high product stability.

## Conclusions

The combination of computer-assisted design and fused deposition modeling 3D printing was employed to devise and manufacture a microfluidic platform for absorption spectroelectrochemical measurements in the UV-Vis range. The device contains no conventional optical elements (cuvettes or windows) and involves an integrated facility for de-aerating solutions. The functionality of the device was successfully demonstrated by cyclic voltammetric spectroelectrochemical measurements employing three redox probes. The presented platform will be further employed for obtaining spectroelectrochemical characteristics of biologically active compounds<sup>31</sup> and building blocks of molecular electronic devices<sup>32,33</sup> and will be integrated as a sensing element in lab-on-a-chip separation methods<sup>34,35</sup>.

## Acknowledgments

The work was supported by the Czech Academy of Sciences (grant number L200402251) and the Czech Science Foundation (grant numbers 21-13458S and 23-07292S).

## References

1. Browne M. P., Redondo E., Pumera M.: *Chem. Rev.* *120*, 2783 (2020).
2. Omar M. H., Razak K. A., Wahab M. N. A., Hamzah H. H.: *RSC Adv.* *11*, 16557 (2021).
3. Cardoso R. M., Kalinke C., Rocha R. G., dos Santos P. L., Rocha D. P., Oliveira P. R., Janegitz B. C., Bonacin J.A., Richter E.M., Munoz R.A.A.: *Anal. Chim. Acta* *1118*, 73 (2020).
4. Stefano J. S., Kalinke C., da Rocha R. G., Rocha D. P., da Silva V. A. O. P., Bonacin J. A., Angnes L., Richter E. M., Janegitz B. C., Muñoz R. A. A.: *Anal. Chem.* *94*, 6417 (2022).
5. Hudkins J. R., Wheeler D. G., Peña B., Berlinguette C. P.: *Energy Environ. Sci.* *9*, 3417 (2016).
6. Vančková E., Bouša M., Shestivska V., Kubišta J., Moreno-García P., Broekmann P., Rahaman M., Zlámal M., Heyda J., Bernauer M., Sebechlebská T., Kolivoška V.: *ChemElectroChem* *8*, 2137 (2021).
7. Guima K. E., Souza V. H. R., Martins C. A.: *RSC Adv.* *9*, 15158 (2019).
8. Rabboh F. M., O'Neil G. D.: *Anal. Chem.* *92*, 14999 (2020).
9. Vivaldi F., Sebechlebská T., Vančková E., Biagini D., Bonini A., Kolivoška V.: *Anal. Chim. Acta* *1203*, 339600 (2022).
10. Sebechlebská T., Vančková E., Choińska-Młynarczyk M. K., Navrátil T., Poltorak L., Bonini A., Vivaldi F., Kolivoška V.: *Anal. Chem.* *94*, 14426 (2022).
11. Duarte L. C., Figueredo F., Ribeiro L. E. B., Cortón E., Coltro W. K. T.: *Anal. Chim. Acta* *1071*, 36 (2019).

12. Duarte L. C., Chagas C. L. S., Ribeiro L. E. B., Coltro W. K. T.: *Sens. Actuators B Chem.* 251, 427 (2017).
13. O'Neil G. D., Ahmed S., Halloran K., Janusz J. N., Rodriguez A., Rodriguez I. M. T.: *Electrochem. Commun.* 99, 56 (2019).
14. Cardoso R. M., Mendonça D. M. H., Silva W. P., Silva M. N. T., Nossol E., da Silva R. A. B., Richter E. M., Muñoz R. A. A.: *Anal. Chim. Acta* 1033, 49 (2018).
15. 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* 360, 136984 (2020).
16. Rymansaib Z., Irvani P., Emslie E., Medvidović-Kosanović M., Sak-Bosnar M., Verdejo R., Marken F.: *Electroanalysis* 28, 1517 (2016).
17. Vaněčková E., Bouša M., Nováková Lachmanová Š., Rathouský J., Gál M., Sebechlebská T., Kolivoška V.: *J. Electroanal. Chem.* 857, 113745 (2020).
18. Vaněčková E., Bouša M., Sokolová R., Moreno-García P., Broekmann P., Shestivska V., Rathouský J., Gál M., Sebechlebská T., Kolivoška V.: *J. Electroanal. Chem.* 858, 113763 (2020).
19. Vaněčková E., Bouša M., Vivaldi F., Gál M., Rathouský J., Kolivoška V., Sebechlebská T.: *J. Electroanal. Chem.* 857, 113760 (2020).
20. Pereira M. V., Datti E., Alvarenga G. R., Janegitz B. C., Bonacin J. A.: *Microchem. J.* 183, 108083 (2022).
21. Kaim W., Fiedler J.: *Chem. Soc. Rev.* 38, 3373 (2009).
22. Kolivoška V., Gál M., Lachmanová Š., Valášek M., Hromadová M., Pospíšil L.: *Anal. Chim. Acta* 697, 23 (2011).
23. Wilson R. A., Pinyayev T. S., Membreno N., Heineman W. R.: *Electroanalysis* 22, 2162 (2010).
24. Symes M. D., Kitson P. J., Yan J., Richmond C. J., Cooper G. J. T., Bowman R. W., Vilbrandt T., Cronin L.: *Nat. Chem.* 4, 349 (2012).
25. Brisendine J. M., Mutter A. C., Cerda J. F., Koder R. L.: *Anal. Biochem.* 439, 1 (2013).
26. Achilli E., Minguzzi A., Visibile A., Locatelli C., Vertova A., Naldoni A., Rondinini S., Auricchio F., Marconi S., Fracchia M., Ghigna P.: *J. Synchrotron Rad.* 23, 622 (2016).
27. 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).
28. 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).
29. Poltorak L., Rudnicki K., Kolivoška V., Sebechlebská T., Krzyczmonik P., Skrzypek S.: *J. Hazard. Mater.* 402, 123411 (2021).
30. Dakořová O., Melniková E., Naumowicz M., Kolivoška V., Vaněčková E., Navrátil T., Labuda J., Veteška P., Gál M.: *Chemosphere* 313, 137517 (2023).
31. Gál M., Hivěš J., Sokolová R., Hromadová M., Kolivoška V., Pospíšil L.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 1571 (2009).
32. Sebechlebská T., Šebera J., Kolivoška V., Lindner M., Gasior J., Mészáros G., Valášek M., Mayor M., Hromadová M.: *Electrochim. Acta* 258, 1191 (2017).
33. Pospíšil L., Hromadová M., Gál M., Valášek M., Fanelli N., Kolivoška V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 1559 (2009).
34. Weiss V. U., Kolivoška V., Kremser L., Gaš B., Blaas D., Kenndler E.: *J. Chromatogr. B* 860, 173 (2007).
35. Findeisen A., Kolivoška V., Kaml I., Baatz W., Kenndler E.: *J. Chromatogr. A* 1157, 454 (2007).

## A Detailed Analysis of the Electron Transfer *via* Elimination Voltammetry

Libuše Trnková, Xiaochun Li, and Iveta Trísková

Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic, E-mail: libuse@chemi.muni.cz

### Abstract

The paper deals with a detailed study of the electrode/electrolyte interface *via* CV data processing by elimination voltammetry with linear scan (EVLS). Using the example of a diffusion-controlled one-electron reversible system and selected elimination functions, the contribution of the charging and kinetic current components to the total voltammetric current can be observed in detail and concluded on how various experimental parameters affect the electrode process.

**Keywords:** Pencil graphite electrode, Cyclic voltammetry,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , Electron transfer, Elimination voltammetry with linear scan, Electrical double layer.

### Introduction

Cyclic voltammetry (CV) is one of the most widely used electrochemical methods to investigate both the reduction and oxidation processes of molecular species. It provides rapid information about a properly functioning electrode setup and the initial data on the reversibility, irreversibility, and kinetics of the electrode process<sup>1</sup>. CV is popular and highly useful for monitoring the proper functioning of an electrochemical set-up led by a working electrode. Potassium ferro/ferricyanide electrolyte ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ) is most often used as a standard redox probe in this test, representing a diffusion-controlled one-electron process in an aqueous salt solution (KCl)<sup>2,3</sup>. The pure reversibility of the process can be argued, as it depends on many parameters, but mostly on the chemical composition and morphology of the surface of the working electrode. In recent testing of graphite electrodes, we have revealed that such a polymer pencil electrode (Tombow) with an anodic and cathodic peak difference of around 70 mV has the high electron transfer rate of the above-mentioned ferro/ferricyanide complex<sup>4</sup>.

Elimination voltammetry with linear scan (EVLS)<sup>5,6</sup> was derived in the past precisely for reversible electrochemical processes. If the diffusion component of the current is eliminated by means of elimination functions, the EVLS function conserving a kinetic current component (E5) or charging current component (E6) would have to have a zero value for the reversible system. Our experiments have shown that this is not the case and that it does not have to be a simple electron transfer (ET) labeled an outer-sphere electron transfer. In other words, EVLS is able to show how the redox signals are influenced by many experimental parameters<sup>7</sup>. Our contribution shows how EVLS can be useful in this direction and can test the influence of capacity and kinetics on corresponding electrochemical processes.

### Experimental

The cyclic voltammetry was measured by using a  $\mu$ AUTOLAB (Metrohm, Herisau, Switzerland), connected to the electrochemical cell with a three-electrode setup. The graphite electrode acted as a working electrode, the Ag/AgCl/3M KCl electrode serves as a reference one and the Pt plate functions as a counter electrode. The range of the scan rates comprised values from 2 mV/s to 800 mV/s, and the potential window was set up for the region from -0.3 V to 0.8 V. The experiments were all conducted at a constant room temperature (23 °C). It should be noted that the three polarization rates were invariably measured on the same electrode. Electrodes (0.5 HB Tombow or Staedtler) are commercially accessible pencil leads

(Ultra-polymer, Tombow, Japan; Staedtler Mars GmbH & Co). To compute the EVLS functions we used the Maple Calculator. All of the EVLS data (the functions E4, E5, E6) were processed for the integer 2 ( $1/2v_{ref}$ ,  $v_{ref}$ ,  $2v_{ref}$  scan rates) by using Microsoft Excel, and the graphical design was delivered with Origin.

### Results and discussion

All CV data of the ferro-ferric complex in aqueous KCl solutions were processed using an EVLS procedure to obtain the E4, E5, and E6 functions:

$$f(I) = -11.6570I_{1/2} + 17.4850I - 5.8284I_2, \quad (\text{---E4})$$

which eliminates the charging current ( $I_c$ ) and the kinetic current ( $I_k$ ) and conserves the diffusion current ( $I_d$ );

$$f(I) = 6.8284I_{1/2} - 8.2426I + 2.4142I_2, \quad (\text{---E5})$$

which eliminates the charging current ( $I_c$ ) and the diffusion current ( $I_d$ ) and conserves the kinetic current ( $I_k$ ); and

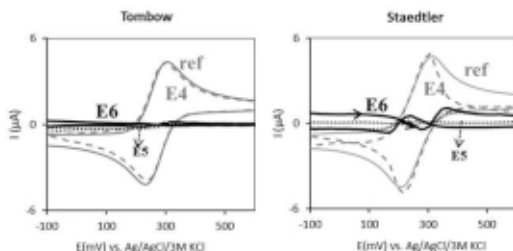
$$f(I) = 4.8284I_{1/2} - 8.2426I + 3.4142I_2, \quad (\text{---E6})$$

which eliminates the kinetic current ( $I_k$ ) and the diffusion current ( $I_d$ ) and conserves the charge current ( $I_c$ ).

The three total voltammetric currents (measured at  $1/2v_{ref}$ ,  $v_{ref}$ ,  $2v_{ref}$  scan rates) were invariably measured on the same electrode.

According to EVLS theory, E5 only applies to the kinetic current in EVLS, while E6 is only responsible for the charging current. Diffusion is a factor that confirms the diffusion-controlled electrochemical process of the  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3+/4-}$  redox couple. Consequently, after EVLS is eliminated, E5 and E6 should be close to the zero line. Based on these EVLS functions which eliminate the diffusion and charging current components or the diffusion and kinetic current components, we performed a detailed analysis of the state where the electronics meet ionic. An emphasis was placed on the relationship between the dynamic response of the electric double layer and (i) the material of the graphite electrode, (ii) the concentration of the  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3+/4-}$ , (iii) the concentration of the KCl, and (iv) the presence or absence of oxygen in the solution.

It should be emphasized once more that all three total voltammetric currents were measured on the same electrode because EVLS is very sensitive to changes in the EVLS surface. Two pencil graphite electrodes (Tombow and Staedtler) were tested by elimination (Fig. 1). While the CV records show no significant difference, the EVLS E6 with charge current conservation shows a distinct and reproducible signal that shows a depression in both directions of electrode polarization (forward and reverse) and produces a drop-shaped current record (drop-shaped depression - DSD).



**Fig. 1.** A comparison of the recordings: the CV and the calculated elimination functions (--- E4, ---- E5, and — E6) of the 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  in the 0.1M KCl, relating to the electrodes pPeGE Tombow and pPeGE Staedtler. The reference scan rate (—) was 40 mV/s.

The mentioned DSD elimination signal (EVLS E6) was dependent on other experimental conditions, such as the concentration of the complex and the supporting electrolyte, the range of scan rates, and the presence of oxygen in the solution. With the increasing concentration of the complex, the DSD increased, but in the case of the increasing concentration of the supporting electrolyte, it was the opposite. It was interesting to find that the presence of oxygen in the solution is a favorable parameter for the  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  redox process; without oxygen, DSD is prominent.

To explain the DSD signals we simulated voltammetric curves for scan rates of 10, 20, 40, and 80 mV/s by using the Nernst equation and Fick's second law. It was found that the DSD signal is closely related to the iso-current point<sup>7</sup>.

## Conclusions

Our new electrochemical approach in the form of EVLS helps to understand electrode processes at the nanoscale. It can be useful not only in the solution of mechanistic studies of molecular electrochemistry but also in the study of electrical double layers in interfacial electrochemistry.

## Acknowledgments

The authors greatly appreciate the financial support provided by Masaryk University (project: Development of methods and instrumentation for the analysis of biologically important substances (MUNI/A/1539/2021 and MUNI/A/1421/2022). The research was supported by the project Barrande No. 8J21FR023 (Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic).

## References

1. Bard A. J., Faulkner L.R.: *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*. 2<sup>nd</sup> ed. JohnWiley&Sons, Inc. New York 2001.
2. Tanimoto S., Ichimura A.: *J. Chem. Educ.* **90**, 778 (2013).
3. Ji X. B., Banks C. E., Crossley A., Compton R. G.: *ChemPhysChem*. **7**, 1337 (2006).
4. Trnkova L., Triskova I., Cechal J., Farka Z.: *Electrochem. Commun.* **126**, 107018 (2021).
5. Trnkova L.: *J. Electroanal. Chem.* **552**, 258 (2005).
6. Trnkova L.: *J. Electroanal. Chem.* **905**, 115961 (2022).
7. Li X., Triskova I., Trnkova L.: *Electrochim. Acta* **442**, 141921 (2023).

**Electrophoretic Monitoring of 3-hydroxybutyrate as an Indicator of Starvation with Inverse Tunable Electroosmotic Flow**  
**(Elektroforetické monitorování 3-hydroxybutyrátu jako indikátoru hladovění s obráceným laditelným elektroosmotickým tokem)**

Petr Tůma

Charles University, Third Faculty of Medicine, Department of Hygiene, Ruská 87,  
100 00 Prague 10, Czech Republic, E-mail: petr.tuma@lf3.cuni.cz

**Abstract**

Electrophoretic determination of 3-hydroxybutyrate (3HB) as an indicator of ketogenesis in human serum is performed in fused silica capillary covalently coated by anionic copolymer of poly(acrylamide-co-sodium-2-acrylamido-2-methylpropanesulphonate) (PAMAMPS). A 20  $\mu\text{m}$  capillary with an effective length of 16.5 cm covered by 4% PAMAMPS coating generates in 80 mM MES/His as background electrolyte a cathodic EOF of  $8.3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ . 15  $\mu\text{L}$  of serum is mixed with 45  $\mu\text{L}$  of acetonitrile, and after shaking, subjected to CE analysis. The achieved LOD and LOQ are 0.43  $\mu\text{M}$  and 1.44  $\mu\text{M}$ , respectively, in combination with universal contactless conductivity detection, and are low enough to monitor physiological 3HB levels. A clinical study revealed that serum 3HB increases from a concentration of 71  $\mu\text{M}$  corresponding to a normal diet to a level of 1924  $\mu\text{M}$  after 60 h of fasting, and a return to physiological concentrations occurs as early as 48 h after initiation of the high carbohydrate diet.

**Keywords:** Clinical analysis; Capillary electrophoresis; Coating; Contactless conductivity detection; Ketogenesis; Stacking.

**Úvod**

V průběhu hladovění klesá dostupnost volné glukózy včetně glukogenních substrátů a převládajícím zdrojem energie se pro lidské tělo stávají tuky. Za tohoto stavu dochází v játrech ke zvýšené degradaci mastných kyselin na acetyl-koenzym A, ze kterého se tvoří ketolátky. Primárně vzniká acetoacetát, který je ovšem jako ketokyselina nestabilní a redukuje se na 3-hydroxybutyrát (3HB) <sup>1,2</sup>. 3HB je hlavní transportní formou ketolátek a je vychytáván extrahepatálními tkáněmi, pro něž se stává významným zdrojem energie jako náhrada za glukózu, která je šetřena především pro mozek. Vedle toho samovolnou dekarboxylací acetoacetátu vzniká třetí ketolátka aceton, jež je odpadním produktem metabolismu a je v nezměněné formě vylučován z těla plicemi a ledvinami. Právě 3HB představuje hlavní indikátor ketogeneze. Podáním jednorázové dávky glukózy např. prostřednictvím orálního glukózového tolerančního testu (oGTT) se tvorba ketolátek potlačí, metabolismus se překlápí na glukogenní, jehož hlavním metabolickým indikátorem je hladina plasmatického laktátu (Lac). Stanovení laktátu v krvi se provádí v rámci klinické biochemie pomocí enzymatických metod v kombinaci se spektrofotometrií nebo ampérometrií <sup>3</sup>, dále plynovou chromatografií, kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou (CE) <sup>4</sup>. Vzhledem k tomu, že se koncentrace plasmatického laktátu pohybuje na milimolárních koncentračních hladinách, tak není potřeba vyvíjet vysoce citlivá stanovení. Naopak pro stanovení 3HB v krvi se v klinické biochemii využívá několika enzymatických kinetických metod, popřípadě kombinace enzymatických metod a ampérometrie. Dolní stanovená mez 3HB se pohybuje kolem 0,3 mmol/L a uvádí se, že validní data o analytických znacích těchto metod a ukazatelích analytické kvality nejsou dosud k dispozici nebo jsou kontroverzní. Fyziologické hladiny krevního 3HB jsou ovšem na mikroolárních hladinách a tím vzniká potřeba provádět citlivé a spolehlivé stanovení 3HB <sup>1,2</sup>.



Pro dosažení vysokého elektroforetického rozlišení v CE je výhodné provádět separaci s protisměrným elektroosmotickým tokem (EOF), jehož velikost je v absolutní hodnotě menší než elektroforetická mobilita analytů<sup>5,6</sup>. Pozorovaná rychlost pohybu analytu je za těchto podmínek úměrná rozdílu mezi elektroforetickou a elektroosmotickou mobilitou, což jednoznačně přispívá k vzájemné separaci látek s velmi blízkými hodnotami elektroforetických mobilit. Tento koncept je založen na generování laditelného EOF, který je nezávislý na složení a pH základního elektrolytu<sup>7-10</sup>. Katodické pokrytí křemene bylo dosud realizováno prostřednictvím kovalentně navázaného kopolymeru poly(acrylamide-co-(3-acrylamidopropyl)trimethylammonium chloride) (PAMAPTAC) s proměnlivým zastoupením katodické složky představované kvarterní amoniou solí, který generuje laditelný anodický EOF<sup>5</sup>. PAMAPTAC pokrytí bylo dosud použito pro separaci anestetika ketaminu a jeho derivátů<sup>6</sup>, aminokyselin s větveným postranním řetězcem<sup>11</sup>, methylhistidinů<sup>12</sup> a antiepileptik<sup>13</sup>. Obdobný způsob řešení je navržen pro oddělení 3HB od ostatních organických kyselin přítomných v lidském séru. CE separace je tentokrát prováděna v křemenné kovalentně pokryté aniontovým kopolymerem polyacrylamide-co-sodium-2-acrylamido-2-methylpropanosulphonate (PAMAMPS) s proměnlivým zastoupením aniontové složky sodium-2-acrylamido-2-methylpropanosulphonate (AMPS), který generuje laditelný katodický EOF směřující proti migraci aniontů organických kyselin<sup>14,15</sup>.

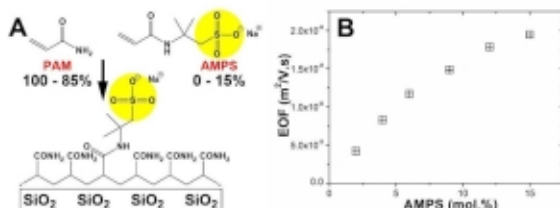
### Experimentální část

**Kapilární elektroforéza:** Všechny CE analýzy byly prováděny na elektroforetickém přístroji HP<sup>3D</sup> CE (Agilent Technologies) vybaveným bezkontaktním vodivostním detektorem (C4D)<sup>16</sup>. CE separace organických kyselin je prováděna v kapiláře se 4% PAMAPMS kapiláře a v polyakrylamidem pokryté kapiláře (PAM) s potlačeným EOF. Obě kapiláry mají vnitřní a vnější průměr 20  $\mu\text{m}$ /360  $\mu\text{m}$ , celková délka k C4D 31,5 cm/16,5 cm (Polymicro Technologies). Jako základní elektrolyt byl použit 80 mM MES/80 mM His, pH 6,0. Vzorky jsou do kapiláry dávkovány tlakem 50 mbar po dobu 120 s. Separace je řízena napětím -20 kV. **Zpracování vzorků séra:** 15  $\mu\text{L}$  rozmraženého séra je smícháno s 45  $\mu\text{L}$  acetonitrilu a 2 min vortexováno pro odstranění proteinů. Po centrifugaci je 50  $\mu\text{L}$  supernatantu použito k analýze. **Výroba PAMAMPS kapiláry:** Nová kapilára je nejprve promyta 1 M roztokem NaOH a poté silanizována 3-(trimethoxysilyl)propyl methakrylátem. Následně je kapilára naplněna polymerizační směsí tvořené anodickým 0,7 mol/L AMPS a neutrálním 0,7 mol/L akrylamidem s tím, že zastoupení iontové složky AMPS je v rozmezí 0 – 15% mol (Obr. 1). Následně je provedena teplem řízená polymerace a jejím dokončení je zbytek polymerační směsi vytlačen z kapiláry. **Klinická studie:** Do studie je zahrnuto 10 zdravých žen s průměrným věkem  $39,7 \pm 5,2$  (SD) let a BMI  $32,7 \pm 4,4$  kg/m<sup>2</sup>, které dlouhodobě přijímají běžnou omnivorní stravu. Při vstupu do studie byl nalačno odebrán vzorek krve (D0/basal – základní odběr v nultý den), poté proveden orální glukózový toleranční test (oGTT) a po 2 h odebrán druhý vzorek krve (D0/oGTT). Poté dobrovolnice po dobu 60 h nepřijímaly žádnou stravu a třetí den ráno jim bylo odebráno sérum nalačno (D3/basal – základní odběr ve 3. den) a po oGTT (D3/oGTT). V následné refeeding fázi dobrovolníci konzumovali vysokosacharidovou stravu po dobu 48 h zakončenou odběrem séra nalačno (D5/basal – základní odběr v 5. den) a 2 h po provedení oGTT (D5/oGTT).

### Výsledky a diskuse

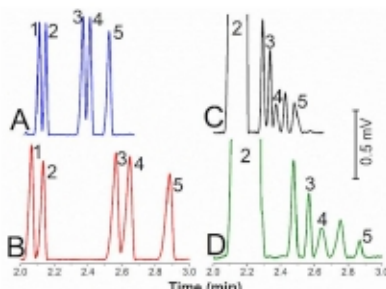
**Protisměrná CE separace organických kyselin v PAMAMPS:** Separace modelové směsi pěti organických kyselin byly provedeny v 4% PAMAMPS kapiláře a výsledky porovnány s neutrální PAM kapilárou, Tabulka I. Katodický EOF v 4% PAMAMPS o velikosti  $8,30 \pm 0,00 \cdot 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/V.s směřuje proti elektromigraci organických kyselin, což vede k prodloužení migračních časů v porovnání s PAM s potlačeným EOF. Prodloužení migračního času se

projeví vyšším rozmytím piků vlivem difúze i elektrodisperze, což má za následek nižší separační účinnost a nižší výšku piků. Hlavní separační parametr tj. elektroforetické rozlišení ( $R$ ) naopak vzrostá, u kritických párů acetoacetát/laktát z hodnoty 1,22 pro PAM na 1,40 pro 4% PAMAMPS a pro pár pyroglutamát/3HB z hodnoty 1,03 na 1,25 (Obr. 2). Zvýšení elektroforetického rozlišení lze vysvětlit tím, že analyt setrvává v kapiláře po delší dobu pod působením separačního pole.



**Obr. 1.** (A) Schéma přípravy polymerizační směsi tvořené neutrálním monomerem akrylamidem a anodičnou složkou AMPS; (B) Závislost velikosti katodického EOF na molárním zastoupení AMPS v polymerační směsi.

*Monitorování 3HB v lidském séru v průběhu hladovění:* Fyziologické sérum bylo spikováno 3HB v koncentračním intervalu 2–10000  $\mu\text{M}$  (Tabulka I). Kalibrační závislost plochy piků na koncentraci je lineární se směrnicí  $28,2 \pm 0,0 \mu\text{V}\cdot\text{min}\cdot\mu\text{M}^{-1}$  a koeficientem determinace 0,9999. Ze směrnic závislosti výšky piků na koncentraci 3HB je určen LOD jako  $3\times$  šum  $\text{C}^{13}$  směrnic a LOQ jako  $10\times$  šum/směrnice. Stanovená hodnota LOD je  $0,43 \mu\text{M}$  a LOQ  $1,44 \mu\text{M}$ , což jsou hodnoty minimálně o řád nižší, než byly dosud pomocí elektromigračních metod dosaženy. Intra-day repeatability byla určena pro deset po sobě následujících analýz jednoho séra, které bylo opakovaně zpracováno, a RSD pro plochu piků je 3,1% a pro migrační čas 1,5%. Inter-day reproducibility pro provedení z analýzy jednoho vzorku séra, které bylo v průběhu tří následujících dní měřeno každý den pět-krát s RSD pro plochu piků 6,5% a pro migrační čas 3,1%. Současně s 3HB byly ve vzorcích séra stanoveny i vysoké hladiny laktátu.



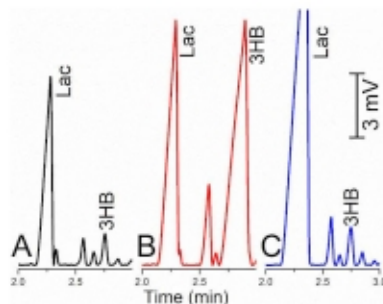
**Obr. 2.** Separace modelové směsi organických kyselin (A, B) a lidského séra (C, D) prováděná v PAM-kapiláře (A,C) versus v 4% PAMAMPS (B,D). Identifikace piků: 1 – acetoacetát, 2 – laktát, 3 – pyroglutamát, 4 – 3HB, 5 – aspartát.

**Tabulka I.**

Parametry lineárních regresních závislostí pro plochu a výšku piků 3HB a laktátu při spikování neupraveného séra. SD v závorkách

	3HB	Laktát
Interval, $\mu\text{M}$	2 - 10000	2 - 10000
Směrnice – plocha piků, $\mu\text{V}\cdot\text{min}\cdot\mu\text{M}^{-1}$	28,17 (0,08)	16,64 (0,05)
$R^2$	0,9999	0,9999
Interval, $\mu\text{M}$	2 - 100	2 - 100
Směrnice – výška piků, $\mu\text{V}\cdot\mu\text{M}^{-1}$	13,90 (0,20)	12,71 (0,10)
$R^2$	0,9987	0,9997
LOD, $\mu\text{M}$ (ng/mL)	0,43 (44,7)	0,47 (42,3)
LOQ, $\mu\text{M}$ (ng/mL)	1,44 (149,8)	1,57 (141,4)

Na CE/C4D záznamu fyziologického séra je patrný dominantní pik chloridů a dále druhý výrazný pik laktátu. Za pikem laktátu následuje série malých piků mezi nimiž je identifikován 3HB, který je od ostatních složek séra oddělen až na základní linii. Změny v sérových hladinách 3HB a laktátu v průběhu fyziologické studie jsou dokumentovány na Obr. 3. Ze stanovených hodnot 3HB v průběhu klinického experimentu provedeného na 10ti jedincích vyplývá: při normálním výživovém stavu je bazální hladina 3HB na úrovni  $71 \mu\text{M}$ , 60 h trvajícím hladověním vyvolá intenzivní ketogenezi a hladina 3HB 27ti násobně vzroste až na  $1924 \mu\text{M}$  a po obnovení příjmu potravy vysokosacharidovou stravou klesne za 48 h na  $28 \mu\text{M}$ . Jednorázová aplikace 75 g glukózy snižá již po 2 h hladinu 3HB dle fáze intervence 10ti, 22ti a 3,3ti násobně (D0, D3, D5), Tabulka II. Naopak bazální sérová hladina laktátu se v důsledku hladovění výrazně nemění ( $1266 \mu\text{M}$  při vstupu a  $1174 \mu\text{M}$  po 60 h hladovění) a vzrůst na  $1820 \mu\text{M}$  vyvolá až následný refeeding vysokosacharidovou stravou. Sérový laktát ale citlivě reaguje na příjem glukózy po aplikaci oGTT, kdy jeho hladina vzroste o 29 až 74% v závislosti na fázi intervence. Provedená studie jasně ukazuje, že pro nastoupení intenzivní ketogeneze je dostatečných 60 h hladovění, stejně tak 48 h po návratu k běžné stravě se metabolismus vrací do normálního stavu. Současně s tím se prokázalo, že jednorázový příjem 75 g glukózy perorálně snižá během 2 h vysokou hladinu 3HB až 22ti násobně a zároveň zvýší hladiny laktátu téměř dvojnásobně.



**Obr. 3.** Electropherogramy séra jednoho dobrovolníka v průběhu klinického experimentu. A – vstupní odběr séra jedince stravovaného běžnou dietou, B – odběr po 60 hod hladovění, C – následný odběr provedený 2 hod po perorálním příjmu 75 g glukózy aplikované po 60 hod hladovění.

**Tabulka II.**

Sérové hladiny 3HB a laktátu při normální/rutině dietě (D0), po 60 h hladovění (D3) a následně 48 h refeedingu (D5), základní odběr (basal) a 2 h po oGTT. Data představují průměr 10 vzorků ± SD.

	3HB, $\mu\text{M}$	3HB – Poměr basal/oGTT	Laktát, $\mu\text{M}$	Laktát – Poměr oGTT/basal
D0/basal - vstup	71,4 ± 34,9	10,5	1266 ± 438	1,38
D0/oGTT - vstup	6,8 ± 2,5		1746 ± 101	
D3/basal - hladovění	1924 ± 901	22,5	1174 ± 320	1,74
D3/oGTT - hladovění	85,6 ± 36,7		2047 ± 490	
D5/basal - refeeding	28 ± 10,4	3,3	1820 ± 450	1,29
D5/oGTT - refeeding	8,4 ± 2,3		2340 ± 580	

### Závěr

Pro separaci indikátoru ketogeneze 3HB v lidském séru od ostatních organických kyselin lze s výhodou využít PAMAMPS kapiláru. PAMAMPS pokrytí s proměnlivých složením iontové složky AMPS generuje laditelný katodický EOF o mobilitách v rozmezí  $4 - 20 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$  a separace směsi organických kyselin se provádí v protisměrném režimu, což prokazatelně zvyšuje elektroforetické rozlišení. Counter-current separace v kombinaci s univerzální C4D představuje silný analytický nástroj pro citlivé monitorování 3HB v krevním séru bez potřeby provádět laboratorní prekoncentraci nebo derivatizaci vzorku. K 15  $\mu\text{L}$  séra je přidán trojnásobný objem ACN, vzorek je protřepán a supernatant přímo dávkován do kapiláry. Všechny ostatní operace probíhají plně automaticky a jsou řízeny běžným softwarem přístroje.

### Acknowledgments

Autoři děkují Grantové agentuře České republiky za poskytnutou finanční podporu, grant GAČR 22-22-3988.

### References

- Guerci B., Tubiana-Rufi N., et al. *Diabetes Metab. J.* 31, 401-406 (2005).
- Meas T., Taboulet P., Sobngwi E., Gautier J. F.: *Diabetes Metabol. J.* 31, 299-303 (2005).
- Medbo J. I., Mamen A., Olsen O. H., Evertsen F.: *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* 60, 367-379 (2000).
- Ewaschuk J. B., Zello G. A., Naylor J. A., Brocks D. R.: *J. Chromatogr. B* 781, 39-56 (2002).
- Konašová R., Butnariu M., Šolinová V., Kašička V., Koval D.: *Anal. Chim. Acta* 1178 (2021).
- Tůma P., Koval D., Sommerová B., Vaculin S.: *Talanta* 217, 1-8 (2020).
- Horvath J., Dolnik V.: *Electrophoresis* 22, 644-655 (2001).
- El Rassi Z.: *Electrophoresis* 31, 174-191 (2010).
- Bekri S., Leclercq L., Cottet H.: *J. Chromatogr. A* 1399, 80-87 (2015).
- Leclercq L., Morvan M., Koch J., Neuss C., Cottet H.: *Anal. Chim. Acta* 1057, 152-161 (2019).
- Tůma P., Gojda J., Sommerová B., Koval D.: *J. Electroanal. Chem.* 857, 1-6 (2020).
- Tůma P., Sommerová B., Koval D., Couderc F.: *Inter. J. Mol. Sci.* 22, 1-14 (2021).
- Tůma P., Hložek T., Sommerová B., Koval D.: *Talanta* 221, 1-8 (2021).
- Šolinová V., Tůma P., Butnariu M., Kašička V., Koval D.: *Electrophoresis* 43, 1953-1962 (2022).
- Tůma P., Sommerová B., Koval D., Šiklová M., Koc M.: *Talanta* 247 (2022).
- Tůma P.: *J. Sep. Sci.* 40, 940-947 (2017).

## An Enzymatic Biosensor with Amperometric Detection in a Flow Injection Analysis for the Determination of L-lactic Acid: Development and Application

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

<sup>a</sup> J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences,

Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: sofia.tvorynska@jh-inst.cas.cz

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

### Abstract

An amperometric biosensor consisting of an enzymatic mini-reactor (lactate oxidase covalently attached to  $-NH_2$  functionalized mesoporous silica powder SBA-15 using glutaraldehyde) and a silver amalgam-based screen-printed electrode acting as a transducer was developed for the determination of L-lactic acid (LA) in FIA. The detection potential of  $-0.9$  V vs. Ag pseudo-reference electrode was applied for cathodic detection of enzymatically consumed oxygen. Under the optimized conditions, the constructed biosensor enabled selective determination of LA with a micromolar limit of detection. Importantly, the proposed biosensor represented excellent operational stability after  $\geq 350$  measurements. Finally, it was successfully applied to real sample analysis.

**Keywords:** L-lactic acid, Lactate oxidase, Amperometric biosensor, Flow injection analysis, Screen-printed electrode, Silver amalgam, Enzymatic mini-reactor, Covalent enzyme immobilization, Glutaraldehyde, Mesoporous silica powder.

### Introduction

L-lactic acid (2-hydroxypropanoic acid) is the final product of glycolysis and is generated from pyruvic acid under anaerobic conditions in skeletal muscles, the brain, red blood cells, and the kidney<sup>1</sup>. The baseline LA level in blood ranges from 0.5 to 1.5 mM at rest and rises to 25 mM during intense exertion<sup>2</sup>. In healthy people, LA is rapidly excreted from the body by the metabolism in the liver and kidney<sup>1</sup> at a rate of 320 mM h<sup>-1</sup>. Any disorder that causes an imbalance between LA production and LA clearance may lead to lactic acidosis<sup>3</sup>. Clinically, causes of lactic acidosis can be divided into two types: type *I* disorders, in which there is decreased tissue oxygenation, such as with shock, left ventricular failure, sepsis, and poisoning with carbon monoxide and cyanide; and type *II* disorders, which are caused by certain drugs/toxins along with systemic diseases, including renal and hepatic failure, diabetes, or inborn error metabolism<sup>2</sup>. Moreover, clinical studies of prostate and breast cancer have shown that the malignant transformation of normal cells into tumor cells often leads to an increased accumulation of LA concentration in most solid tumors<sup>4</sup>. Therefore, LA monitoring as a significant biomarker has been widely used in clinical analysis for the diagnosis of a wide range of diseases, including cancer.

Additionally, LA level is monitored in the fermentation of dairy products to indicate their freshness, stability, and quality<sup>1</sup>. The increasing concentration of LA is monitored for assessment of the course of malolactic fermentation in the wine industry, where tart-tasting malic acid, naturally present in grape must, is converted into softer- and creamier-tasting LA, leading to a lowering of overall acidity and tartness of the wine (the content of LA in wine can be increased up to 3 g L<sup>-1</sup>)<sup>5</sup>.

The development of amperometric biosensors for LA determination has gained increased research interest due to their simplicity, high specificity, good repeatability, and rapid response.

Despite the fact that a large number of LA biosensors based on lactate dehydrogenase or lactate oxidase (LOx) have been proposed, the main problem related to low stability/short lifetime inherent in the biosensing approach remains unresolved<sup>6,7</sup>. In addition, many biosensors are still complex in design and require a long and cumbersome fabrication procedure.

One of the approaches to improve the stability/reusability of enzymatic biosensors is to increase the amount of immobilized enzyme. In the case of enzymatic electrodes, the enzyme loading is limited by the surface area of the electrode. In flow injection analysis (FIA), however, it is possible to spatially separate the biorecognition part from the transducer. In this case, the enzyme is attached to a support forming a mini-reactor that is placed in the flow system upstream of the transducer. This approach allows for the immobilization of a notably larger amount of enzyme, which leads to an improvement in biosensor lifetime/reusability. Furthermore, the biorecognition part is independent of the transducer, i.e. the mini-reactor can be easily and quickly exchanged without changing the transducer. Besides, biosensors with FIA mode offer additional advantages such as high sample throughput, less severe detector fouling problem than in batch mode, low substrate consumption, automatized measurements, and low instrumentation costs<sup>8</sup>.

Therefore, in this work, we have proposed a LA biosensor that couples the principle of a spatially segregated biorecognition and detection part with a principle of monitoring oxygen consumption (instead of hydrogen peroxide formation), which solves the issue of low stability and avoids interference from the oxidizing compounds.

### Experimental

Sodium L-lactate ( $\geq 99.0\%$ ), lactate oxidase from *Aerococcus viridans* (LOx, EC 1.1.3.2; 45 U mg<sup>-1</sup>), glutaraldehyde (GA, 25% aqueous solution), (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES,  $\geq 98.0\%$ ), mesoporous silica powder SBA-15 (surface area  $\approx 600\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ , particle size 2–6  $\mu\text{m}$ , pore size  $\approx 7\text{ nm}$ ) were purchased from Sigma-Aldrich®. All other chemicals were of p.a. or higher grade.

Amperometric measurements were implemented with a computer-controlled electrochemical stand (Polaro-Sensors, Czech Republic), equipped with MultiElchem v. 3.1 software (J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the CAS). All experiments were performed at the laboratory temperature of  $25 \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$  maintained with air conditioning. The flow injection system with electrochemical detection consisted of a linear syringe pump NE-1000 (New Era Pump Systems, USA), a 2-position 6-port sample injector valve Rheodyne MXX 777-601 (IDEX Health & Science LLC, USA), an injection loop (laboratory-made of Teflon® (PTFE) tubing (100 or 200  $\mu\text{L}$ )), a solenoid operated micropump 130SP1220-1TP (Bio-Chem Fluidics Inc., USA), the LOx-based mini-reactor, and a commercially available flow wall-jet cell for screen-printed electrodes (type FLWCL, Metrohm DropSens Co., Spain) with a laboratory-made silver amalgam-based screen-printed electrode (AgA-SPE) including a disc of silver amalgam (AgA) with a diameter 1.6 mm as a working electrode (WE), a carbon and a silver as the auxiliary electrode(AE) and pseudo-reference electrode (pseudo-RE), respectively. A cable connector (type CAC, Metrohm DropSens Co., Spain) was used to connect the SPE to the analyzer. The individual components in FIA were connected by means of PTFE and PEEK capillaries (inner diameter of 0.5 mm and outer diameter of 1.6 mm) purchased from ECOM Ltd. (Czech Republic).

## Results and discussion

The principle for the determination of LA in the flow injection analysis using the proposed biosensor<sup>8</sup>, based on the spatially separated parts of biorecognition (LOx-based mini-reactor) and detection (AgA-SPE), is depicted in Fig.1. The enzymatic mini-reactor is represented by LOx covalently immobilized via GA technique, which, based on our previous researches<sup>9,10</sup>, proved to be the most favorable, on mesoporous silica powder SBA-15 pre-treated with APTES to form surface -NH<sub>2</sub> groups. The LOx immobilized amount was found to be 0.016 g per 1 g of SBA-15. The AgA-SPE, constructed by electrochemical deposition of the mercury on commercially available Ag-SPE<sup>13</sup> to obtain a 1:1 mass ratio of Ag: Hg, was proposed to be used as a transducer for amperometric monitoring of enzymatically consumed oxygen by its four-electron reduction (see Fig. 1).

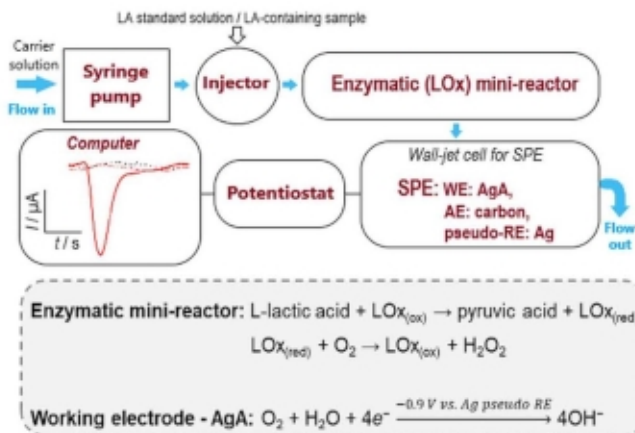


Fig. 1. Schematic diagram of LA determination in flow injection analysis by the developed amperometric biosensor (LA – L-lactic acid, LOx – lactate oxidase, SPE – a screen-printed 3-electrode system including the silver amalgam as a working electrode (WE), carbon and silver as the auxiliary electrode (AE), and pseudo-reference electrode (pseudo-RE), respectively).

The optimization of the biosensor response by investigating the parameters, such as the pH of the carrier solution (pHcs, 6.0 – 9.0), the detection potential ( $E_{det}$ , from -0.2 to -1.4 V), the flow rate of the carrier solution ( $v_{flow}$ , 0.05 – 0.45 mL min<sup>-1</sup>), and the injection volume ( $V$ , 20 – 200 μL), was performed utilizing a standard solution of 500.0 μM LA. Accordingly, the optimal values were established as follows: pHcs of 7.4 (0.1 M phosphate buffer, 1.0 mM Na<sub>2</sub>EDTA),  $E_{det}$  of -0.9 V (vs. pseudo-RE),  $v_{flow}$  of 0.2 mL min<sup>-1</sup>, and  $V$  of 60 μL.

Next, under the optimized conditions, the concentration dependence of LA was recorded to verify the applicability of the developed biosensor, and the attained figures of merit are summarized in Table I along with the estimated limit of detection (LOQ) and limit of quantification (LOQ). The proposed biosensor fulfills the requirements regarding the LA analysis in biological fluids (e.g., saliva, sweat, and blood serum), wine, and dairy products in terms of sensitivity, as it provides sufficient LOD/LOQ values. Moreover, during the interference test, no significant alterations (less than ±5.0 %), in the biosensor response to

200.0  $\mu\text{M}$  LA in the presence of glucose (1.0 mM), ascorbic acid (200  $\mu\text{M}$ ), uric acid (200  $\mu\text{M}$ ), urea (200  $\mu\text{M}$ ), or dopamine (200  $\mu\text{M}$ ) were detected, either alone or in their mixture. The RSD values, shown in Table I, reflect the fact that the measurements with the proposed biosensor as well as both procedures – the preparation of LOx-based mini-reactors and construction of AgA-SPEs – demonstrate excellent repeatability.

**Table I.**

Analytical figures of merit attained for LA by utilizing the developed biosensor and the calculated LOD, the LOQ, and relative standard deviation (RSD) values (all uncertainties denote standard deviations (SD)).

Parameter	Value
Linear range, $\mu\text{M}$	40.0 – 500.0
Intercept ( $a \pm \text{SD}_a$ ), $\mu\text{A}$	$0.0847 \pm 0.0187$
Slope ( $b \pm \text{SD}_b$ ), $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$	$0.0047 \pm 0.0001$
Correlation coefficient ( $R$ )	0.9985
LOD ( $3\text{SD}_a / b$ ), $\mu\text{M}$	12.0
LOQ ( $10\text{SD}_a / b$ ), $\mu\text{M}$	40.0
RSD* (11 parallel measurements), %	2.3
RSD* (two independently prepared LOx-based mini-reactors), %	4.1
RSD* (two independently prepared AgA-SPEs), %	3.5

\*500.0  $\mu\text{M}$  LA

Nevertheless, the most impressive outcomes were achieved in terms of operational stability, as two independently prepared LA biosensors demonstrated 93.8% and 89.5% of the signals after each being used for 350 measurements over 120 days (the biosensor response of the first measurement was taken as 100%).

The proposed biosensor was successfully tested for LA determination in human saliva, red wine, and dairy products (yogurt and kefir) using the method of multiple standard additions. The recoveries in the range of 95.0 – 105.1 % attained in the estimation of LA contents pre-added to saliva indicated the correctness and reliability of the analysis using the constructed biosensor.

## Conclusions

A simple and cost-effective biosensor was developed for the amperometric determination of LA in FIA. The biosensor configuration includes the spatially separated biorecognition and detection part: an easily replaceable LOx-based mini-reactor is connected in front of the flow wall-jet cell equipped with the AgA-SPE acting as a transducer. The enzymatic mini-reactor is based on the covalent attachment of LOx via GA to mesoporous silica powder SBA-15, pre-coated with  $-\text{NH}_2$  groups using the silanization technique (APTES). Oxygen consumption as the result of the enzymatic reaction was monitored amperometrically by applying the detection potential of  $-0.9 \text{ V vs. Ag pseudo-RE}$ . The developed biosensor exhibits sufficient sensitivity, high repeatability, good selectivity, remarkable reusability, and promising practical applicability. In addition, the simplicity of preparation of both the LOx-based mini-reactor and the AgA-SPE as well as the easy replacement of the enzymatic reactor are other advantages. Thus, this research represents new prospects in the development of simple, low-cost, and highly stable enzymatic biosensors.



### Acknowledgments

The research was carried out within the framework of Specific Charles University Research (SVV 260690). The funding provided by the Grand Agency of the Czech Republic (project 20-07350S) is gratefully acknowledged.

### References

1. Pundir C.S., Narwal V., Batra B.: *Biosens. Bioelecton.* *86*, 777 (2016).
2. Rathee K., Dhull V., Singh S.: *Biochem. Biophys. Rep.* *5*, 35 (2016).
3. Rassaei L., Olthuis W., Tsujimura S., Sudholter E.J.R., van der Berg A.: *Anal. Bioanal. Chem.* *406*, 123 (2014).
4. Hirschhaeuser F., Sattler U.G.A., Mueller-Klieser W.: *Cancer Res.* *71*, 6921 (2011).
5. Vicente J., Baran Y., Navascues E., Santos A., Calderon F., Marquina D., Rauhut D., Benito S.: *Int. J. Food Microbiol.* *375*, 109726 (2022).
6. Kucherenko I.S., Topolnikova Ya.V., Soldatkin O.O.: *Trends Anal. Chem.* *110*, 160 (2019).
7. Nikolaus N., Strehlitz B.: *Microchim. Acta* *160*, 15 (2008).
8. Tvorynska S., Barek J., Josypčuk B.: *Electrochim. Acta* *445*, 142033 (2023).
9. Tvorynska S., Barek J., Josypčuk B.: *Sens. Actuators B Chem.* *344*, 130252 (2021).
10. Tvorynska S., Barek J., Josypčuk B.: *Bioelectrochemistry* *148*, 108223 (2022).
11. Josypčuk B., Langmaier J., Tvorynska S.: *Sens. Actuators B Chem.* *347*, 130583 (2021).

**Effect of Functional Group Stabilization on Charge Transport Properties of  
4,4'-Biphenol-based Molecular Switch**  
(Efekt stabilizácie funkčných skupín na vlastnosti transportu náboja u molekulového  
prepínača na báze 4,4'-bifenolu)

František Vavrek <sup>a</sup>, Michal Valášek <sup>b</sup>, Gábor Mészáros <sup>c</sup>, Jindřich Gasior <sup>a</sup>,  
and Magdaléna Hromadová <sup>a</sup>

<sup>a</sup> J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences,  
Dolejškova 3, 182 00 Prague 8, Czech Republic, E-mail: frantisek.vavrek@jh-inst.cas.cz

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

<sup>c</sup> Institute of Materials and Environmental Chemistry, Research Center for Natural Sciences,  
Hungarian Academy of Sciences, Magyar tudósok körútja 2, 1117 Budapest, Hungary

### Abstract

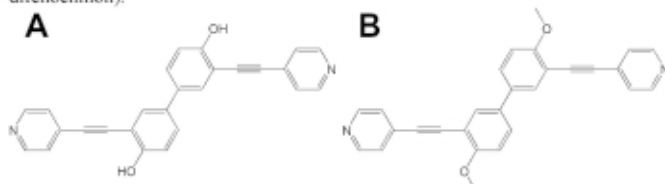
In this work, we present the results of an experimental study concerning the stabilization of functional groups on charge transport properties of a 4,4'-biphenol-based molecular switch. We performed the conductance measurements by applying the technique of breaking the metal-molecule-metal junctions with a scanning tunneling microscope setup. Presented data summarize the single-molecule conductance values of a molecular switch with the central unit being either in oxidatively active or a stabilized form, providing important information about molecular junction formation and similarities between both systems in terms of charge transport properties. A brief suggestion about the next course of investigation is also included.

**Keywords:** Molecular electronics, Molecular switches, 4,4'-Biphenol, Single-molecule conductance, Scanning tunneling microscope-based break junction technique (STM-BJ).

### Úvod

Molekulárne prepínače na báze organických molekúl patria v rámci oblasti molekulárnej elektroniky medzi dôsledne skúmané systémy <sup>1</sup>. Jedná sa o molekuly, v ktorých je možné pomocou vonkajších stimulov reverzibilne prepínať medzi dvoma, prípadne viacerými (meta)stabilnými stavmi. Jednotlivé stavy danej molekuly sa následne vyznačujú odlišnými hodnotami molekulovej elektrickej vodivosti  $G$ , ktorá sa v konkrétnych prípadoch môže líšiť aj o niekoľko rádov <sup>2</sup>. Tieto látky predstavujú jednu z potenciálnych aplikácií organických molekúl ako aktívnych elektronických prvkov v súčiastkach a komponentoch elektronických zariadení budúcnosti. Zvláštna pozornosť je v posledných rokoch venovaná najmä redoxne aktívnym zlúčeninám, u ktorých je zmena elektrickej vodivosti indukovaná zmenou elektrónovej štruktúry v dôsledku redoxných reakcií vyvolaných elektrochemicky <sup>3-6</sup>. Ich najväčší prínos na poli molekulárnej (organickéj) elektroniky spočíva v potenciálnom použití ako molekulové diódy, tranzistory, či prvky molekulovej pamäte <sup>7</sup>. Naším dlhodobým prioritným cieľom je štúdium elektrických vlastností molekulárnych prepínačov s centrálnou funkčnou jednotkou na báze 4,4'-bifenolu, so 4-pyridylovými kotviacimi skupinami naviazanými v polohách 3 a 5' cez etinylénovú konjugovanú spojku (A, Obr. 1A). 4,4'-bifénol má cross-konjugovanú elektrónovú štruktúru, čomu odpovedá nízka hodnota molekulovej elektrickej vodivosti  $G$  v dôsledku deštruktívnej kvantovej interferencie. V čistej forme je 4,4'-bifénol možné elektrochemicky reverzibilne oxidovať na zlúčeninu 4,4'-difénochinón <sup>8</sup>. Pri tomto dejí dochádza k zmene elektrónovej štruktúry na konjugovanú a teda k eliminácii interferencie, čo vedie k nárastu hodnoty molekulovej vodivosti. Mechanizmus zmeny vodivosti je analogický s prípadom redoxného páru antrachinón/antracén-9,10-diol, predstaveným v predchádzajúcej autorskej štúdií <sup>9</sup>. V tejto práci sme sa však zamerali na

porovnanie vlastností molekulového prepínača **A** s jeho elektrochemicky stabilizovanou formou, čo bolo dosiahnuté nahradením hydroxylových vodíkov v pôvodnej zlúčenine metylovými skupinami (**B**, Obr. 1B). Stabilizácia prináša výhody v podobe jednoduchšej organickej syntézy výsledného produktu (i produktov s prídavnými substituentmi od neho odvodených), lepšiu rozpustnosť produktu, a zároveň ochranu redoxne aktívnych kyslíkových atómov pred nežiadúcimi chemickými a elektrochemickými vplyvmi, za súčasného zachovania cross-konjugovanej štruktúry centrálnej jednotky. Takýto zásah do molekulovej štruktúry však môže ovplyvniť hodnotu vodivosti, nakoľko je potrebné zohľadniť odlišnú mieru tzv. „electron donating“ efektu funkčných hydroxylových a metoxylových skupín v polohách 4 a 4' na centrálnej jednotke (viď Obr.1). Z tohto dôvodu je porovnanie hodnôt molekulovej elektrickej vodivosti *G* u oboch systémov **A** a **B** viac než žiaduce. V prípade, že sú tieto systémy z hľadiska elektrickej vodivosti *G* ekvivalentné, štúdium stabilizovaných systémov na báze 4,4'-dimetoxybifenylu môže poskytnúť cenné informácie o transporte náboja v analogických systémoch so zachovanou schopnosťou centrálnej jednotky oxidovať sa do konjugovanej formy (4,4'-difenochinón).



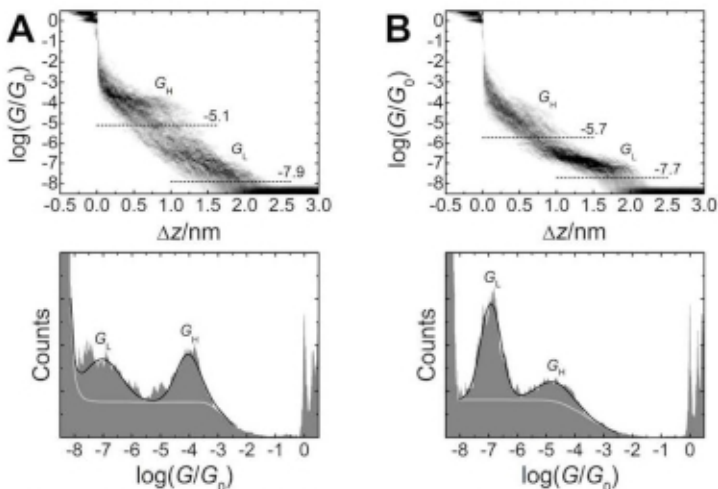
**Obr. 1.** Chemická štruktúra skúmaných molekúl s centrálnymi jednotkami tvorenými 4,4'-bifenolom (**A**) a 4,4'-dimetoxybifenylom (**B**).

### Experimentálna časť

Merania boli vykonané metódou merania elektrického prúdu *I* prostredníctvom STM-BJ techniky<sup>10</sup> na modifikovanom prístroji Agilent 5500SPM (Agilent Technologies). Pri tejto technike merania je zlatý STM hrot periodicky približovaný k a odťahovaný od zlatého substrátu s aplikovanou vzorkou. Medzi hrotom a substrátom je naložené jednosmerné napätie  $U_{bias}$  a počas pohybu hrotu je kontinuálne zaznamenávaný elektrický prúd *I* v meracom obvode. Pri splnení podmienky aproximácie nízkeho potenciálového rozdielu, definovaného formou energie ako  $eU_{bias} < E_F - E^*$  (*e* je elementárny náboj,  $E_F$  je Fermiho hladina elektrónov v materiáli meracích elektród, a  $E^*$  je energia najbližšieho frontálneho molekulového orbitálu skúmanej molekuly vzhľadom k hodnote  $E_F$ ), môže byť hodnota prúdu *I* prepočítaná na vodivosť *G* aplikovaním Ohmovho zákona. V prípade premostenia hrotu a substrátu skúmanou molekulou je na záznamej krivke prúdu (vodivosti) zaznamenané platô, ktorého stredná hodnota zodpovedá hodnote elektrickej vodivosti *G* daného molekulového spojenia. V experimente bol použitý elektrochemicky leptaný STM hrot vlastnej výroby zhotovený zo zlatého drôtu s priemerom 0,25 mm (99,99+ %, Goodfellow), a zlatý polykrystalický substrát s rozmermi 10 mm × 10 mm × 1 mm (99,999 %, Goodfellow) s priletovaným prívodným vodičom zo zlatého drôtu o priemere 0,5 mm (99,99 %, Goodfellow). Vzorky skúmaných látok **A** a **B** boli pripravené vo forme roztokov s koncentráciou 0,2 mM v 1,3,5-trimetylbenzéne (98 %, Sigma-Aldrich). Zostavenie experimentu, ako aj príprava a čistiace procedúry pre laboratórne sklo na prípravu vzoriek, zlatý substrát, PTFE meracie cely vlastnej výroby a tesniace O-krúžky Kalrez® (Dupont) používané počas experimentálnych meraní, boli podrobne opísané v predchádzajúcej autorskej štúdií<sup>9</sup>.

### Výsledky a diskusia

Na Obr. 2 sú v horných grafoch znázornené 2D histogramy kriviek elektrickej vodivosti  $G$  vynesené v závislosti od vzdialenosti  $\Delta z$  STM hrotu od substrátu. Experimentálne dáta boli získané kontinuálnou STM-BJ metódou s rýchlosťou odťahovania STM hrotu  $0,92 \text{ nm s}^{-1}$ . Vodivosť  $G$  je v histogramoch škálovaná na hodnotu  $\log(G/G_0)$  kde  $G_0 = 77,5 \mu\text{S}$  je kvantum elektrickej vodivosti, a jeho hodnota je stotožnená s hodnotou vodivosti jednoatómového kontaktu zlato-zlato medzi STM hrotom a substrátom. Z vyobrazených histogramov je zrejmé, že molekuly látok **A** aj **B** ochotne tvoria molekulové spojenia premostením elektrod STM-BJ prístroja. U oboch molekúl bola pozorovaná dvojica charakteristických vodivostných plat, ktoré sme označili  $G_H$  a  $G_L$  vzhľadom na ich vysokú (*high* – H) respektive nízku (*low* – L) strednú hodnotu vodivosti. Čierne prerušované línie v 2D histogramoch znázorňujú dátové segmenty pri vybraných hodnotách  $\log(G/G_0)$ , z ktorých boli zistené experimentálne hodnoty dĺžok  $\Delta z^{\text{exp}}$  príslušných plat spolu so smerodajnými odchýlkami, následne prepočítané na dĺžky  $z^{\text{exp}}$  molekulových spojení. Teoretické aproximácie dĺžok  $z^{\text{th}}$  boli získané zo simulácie energeticky minimalizovaných štruktúr molekúl **A** a **B** v programe Wavefunction Spartan'08. Stredné hodnoty elektrických vodivosti  $G_H$  a  $G_L$  vrátane smerodajných odchýlok boli u oboch molekúl **A** a **B** určené z fitov príslúchajúcich pikov v 1D histogramoch elektrickej vodivosti (Obr. 2, dolné grafy). Ako fitovacu funkciu sme použili kumulatívny fit vo forme dvoch nezávislých Gaussových funkcií so spoločnou nekonštantnou základnou líniou. Všetky namerané experimentálne i teoretické hodnoty sú prehľadne zhrnuté v Tabuľke I.



**Obr. 2.** Znáoznenie výsledkov experimentálnych meraní, vykonaných na vzorkách skúmaných molekúl **A** a **B**. (Hore) 2D histogramy vodivostných kriviek, s charakteristickými platami vodivosti označenými  $G_H$  a  $G_L$ . (Dole) 1D histogramy elektrickej vodivosti  $G$ , s pikmi príslúchajúcimi platám s vodivosťami  $G_H$  a  $G_L$  z horných grafov. Čierne krivky reprezentujú fity experimentálnych dát kumulatívnu fitovacou funkciou, svetložedé krivky znázorňujú nekonštantné základné línie použité pri fitovaní.

**Tabuľka I.**

Prehľad experimentálnych hodnôt elektrických vodivostí  $G_H$  a  $G_L$  a im prislúchajúcich experimentálnych ( $z^{exp}$ ) a teoretických ( $z^{th}$ ) hodnôt dĺžok molekulového spojenia.

Molekula	$\log(G_H/G_0)$	$\log(G_L/G_0)$	$z_H^{exp}/nm$	$z_L^{exp}/nm$	$z_H^{th}/nm$	$z_L^{th}/nm$
<b>A</b>	$-4,01 \pm 0,44$	$-7,03 \pm 0,61$	$1,2 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,3$	1,3	1,9
<b>B</b>	$-4,72 \pm 0,63$	$-6,93 \pm 0,36$	$1,1 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$	1,3	1,9

Na základe prezentovaných výsledkov sme hodnoty  $G_L$  a  $z_L^{exp}$  u oboch skúmaných molekúl stotožnili s hodnotami vodivosti a dĺžok molekulového spojenia, kedy molekula **A** alebo **B** premostí elektródy po celej svojej dĺžke, kontaktovaná cez atómy dusika na 4-pyridylových kotviacich skupinách. Z hodnôt  $G_L$  je zrejme, že aj napriek odlišným funkčným skupinám na centrálnej jednotke, s ohľadom na smerodajné odchýlky obe skúmané molekuly vykazujú totožnú hodnotu molekulovej elektrickej vodivosti. Odchýlky teoretických hodnôt dĺžok  $z_L^{th}$  od hodnôt získaných v experimente si vysvetľujeme tým, že energeticky minimalizované štruktúry molekúl **A** respektíve **B**, z ktorých boli hodnoty  $z_L^{th}$  odčítané, vykazovali odchýlky  $36,3^\circ$  respektíve  $35,7^\circ$  medzi rovinami benzénových kruhov v centrálnej jednotke. V experimente pri tvorbe spojení elektróda–molekula–elektróda tak zrejme dochádza k natiahnutiu skúmaných molekúl v smere pohybu elektród do planárnej formy a teda k efektívnemu predĺženiu molekulového spojenia, čo pozorujeme vo forme vyšších hodnôt dĺžok  $z_L^{exp}$ . Na základe týchto výsledkov konštatujeme, že látky **A** a **B** sú z hľadiska hodnoty molekulovej elektrickej vodivosti  $G_L$  ekvivalentné.

Molekuly **A** aj **B** sú na oboch koncoch zakončené 4-pyridylovými kotviacimi skupinami. Pri meraní vodivosti molekúl terminovaných touto skupinou sú často v experimente pozorované dve vodivostné platá. Prícom platá s vyššou hodnotou vodivosti zodpovedá molekulovému spojeniu, pri ktorom na oboch koncoch dochádza k prekrytiu  $\pi$ -orbitálu na pyridylovom kruhu s vodivostným orbitálom kontaktného atómu zlata<sup>11</sup>. Prítomnosť dvoch vodivostných plat v našom experimente bola teda predpokladaná. Hodnoty vodivosti  $G_H$  namerané u oboch látok však boli značne odlišné ( $G_H(A)/G_H(B) \approx 5$ ), čo bolo vzhľadom na veľmi dobrú zhodu pri hodnotách  $G_L$  prekvapivé. Analýzou hodnôt  $G_H$  a  $z_H^{exp}$  s ohľadom na energeticky minimalizované štruktúry skúmaných molekúl sme dospeli k záveru, že v prípade molekúl **A** a **B** nedochádza k spomínanému prekrytiu pyridylového  $\pi$ -orbitálu s orbitálom atómu zlata ani na jednej z elektród. Namerané hodnoty  $G_H$  zodpovedajú molekulovému spojeniu v ktorom je molekula **A** respektíve **B** na jednej elektróde kotvená skrz atóm dusika na 4-pyridylovej kotviacej skupine, a na druhej elektróde skrz atóm kyslíka protiahlej hydroxylovej respektíve metoxylovej funkčnej skupiny na centrálnej jednotke. Rozdiel v nameraných hodnotách  $G_H$  si tak vysvetľujeme rozdielnou interakciou medzi hydroxylovoú respektíve metoxylovoú skupinou a zlatou elektródou. Túto hypotézu podporuje aj fakt, že teoretické hodnoty dĺžok  $z_H^{th}$  uvedené v Tabuľke I odpovedajú vzdialenostiam vyššie spomínaných atómov dusika a kyslíka v energeticky minimalizovaných štruktúrach molekúl **A** a **B**, pričom sú vo veľmi dobrej zhode s nameranými experimentálnymi hodnotami dĺžok  $z_H^{exp}$ .

### Záver

4,4'-bifenol má značný aplikačný potenciál v oblasti redoxne aktívnych molekulových prepínačov vďaka jeho schopnosti oxidovať sa do konjugovanej formy 4,4'-difenochinónu. Cieľom tejto práce bolo skúmať vplyv stabilizácie hydroxylových skupín u syntetizovanej organickej látky s centrálnou 4,4'-bifenolovou jednotkou (**A**) výmenou za metylové skupiny (**B**). Pomocou meraní vodivosti vykonaných STM-BJ metódou sme stanovili hodnoty elektrických vodivosti  $G_H$  a  $G_L$  a tiež príslušné dĺžky molekulových spojení  $z_H^{exp}$  a  $z_L^{exp}$

u oboch skúmaných látok. Hodnoty  $G_L(\mathbf{A})$  a  $G_L(\mathbf{B})$  boli stotožnené s hodnotami molekulových elektrických vodivostí látok **A** a **B** ukotvených medzi elektródami STM-BJ prístroja po celej svojej dĺžke, pričom s veľkou presnosťou platí  $G_L(\mathbf{A}) = G_L(\mathbf{B})$  a teda obe látky sú z hľadiska transportu náboja skrz celú dĺžku molekuly ekvivalentné. Odchýlky v hodnotách  $z_1^{\text{exp}}$  oproti teoretickým hodnotám  $z_1^{\text{th}}$  získaným analýzou štruktúr molekúl **A** a **B** v programe Wavform Spartan'08 boli vysvetlené ťahom spôsobenou zmenou konfigurácie molekúl v spojeniach elektróda–molekula–elektróda. Nerovnosť medzi hodnotami vodivosti  $G_{ii}$  u oboch skúmaných molekúl bola vysvetlená tvorbou kratších mostíkov zapojením hydroxylovej skupiny v prípade látky **A** a metoxylovej skupiny v prípade látky **B**.

### Acknowledgments

The authors of this work hereby gratefully acknowledge the financial support of the Czech Science Foundation (project No. 21-13458S and Mobility Plus project No. MTA-22-02).

### References

1. Fuentes N., Martín-Lasanta A., Álvarez de Cienfuegos L., Ribagorda M., Parra A., Cuerva J. M.: *Nanoscale* **3**, 4003 (2011).
2. Smaali K., Lenfant S., Karpe S., Oçafraïn M., Blanchard P., Deresmes D., Godey S., Rochefort A., Roncali J., Vuillaume D.: *ACS Nano* **4**, 2411 (2010).
3. Huang C., Rudnev A. V., Hong W., Wandlowski T.: *Chem. Soc. Rev.* **44**, 889 (2015).
4. Yin X., Zang Y., Zhu L., Low J. Z., Liu Z.-F., Cui J., Neaton J. B., Venkataraman L., Campos L. M.: *Sci. Adv.* **3**, eaao2615 (2017).
5. Hromadová M., Vavrek F.: *Curr. Opin. Electrochem.* **19**, 63 (2020).
6. Li J., Pudar S., Yu H., Li S., Moore J. S., Rodríguez-López J., Jackson N. E., Schroeder C. M.: *J. Phys. Chem. C* **125**, 21862 (2021).
7. Han Y., Nijhuis C. A.: *Chem. Asian J.* **15**, 3752 (2020).
8. Néron S., Morency M., Chen L., Maris T., Rochefort D., Ifimie R., Wuest J. D.: *J. Org. Chem.* **87**, 7673 (2022).
9. Vavrek F., Valášek M., Mészáros G., Gasior J., Hromadová M.: *Proceedings of the International Conference 41<sup>st</sup> Modern Electrochemical Methods* (Navrátil T., Fojta M., Schwarzková K., ed.), str. 212. Lenka Srsenová – BEST Servis, Ústí nad Labem 2022.
10. Xu B., Tao N. J.: *Science* **301**, 1221 (2003).
11. Kamenetska M., Quek S. Y., Whalley A. C., Steigerwald M. L., Choi H. J., Louie S. G., Nuckolls C., Hybertsen M. S., Neaton J. B., Venkataraman L.: *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 6817 (2010).

## Electroanalysis of Dopamine on Bare and Chem-mechanically Polished BDD Electrodes (Elektroanalýza dopaminu na BDD elektrodách s neleštěným a chemicky-mechanicky leštěným povrchem)

Michal Zelenský<sup>a</sup>, Jan Fischer<sup>a</sup>, Simona Baluchová<sup>a</sup>, Andrew Taylor<sup>b</sup>, and Karolina  
Schwarzová-Pecková<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry,  
Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic, E-mail: zelenskm@natur.cuni.cz

<sup>b</sup> Institute of Physics of the Czech Academy of Sciences, Na Slovance 2, 182 21 Prague 8,  
Czech Republic

### Abstract

A large variety of boron-doped diamond electrodes has been widely used in the electrochemical detection of neurotransmitters mainly dopamine. The aim of this study was the comparison of analytical parameters for dopamine detection on two sets of boron-doped diamond electrodes which were prepared by microwave plasma-enhanced chemical vapor deposition with different B/C ratios in the gas phase during the growth (500-8000 ppm). One set of the electrodes was left as-grown and the second set was chem-mechanically polished. Calibration dependencies for all electrodes were obtained by square wave voltammetry under optimized parameters in 0.1 mol l<sup>-1</sup> phosphate buffer pH 7.4. Overall better analytical parameters were obtained on chem-mechanically polished electrodes.

**Keywords:** Boron-doped diamond electrode, Chem-mechanical polishing, Dopamine, Voltammetry.

### Úvod

Borem dopované diamantové (BDD) elektrody jsou v posledních letech jedním z nejpoužívanějších elektrodových materiálů v elektroanalýze, a to pro detekci velmi širokého rozpětí jak anorganických, tak i organických molekul. Hlavní benefity BDD elektrod ve srovnání s konvenčními sp<sup>2</sup> uhlíkovými či kovovými elektrodami spočívají v jejich velmi širokém potenciálovém okně, nízkém nabíjecím proudu a malé náchylnosti k adsorpčním jevům<sup>1,2</sup>. Další užitečné vlastnosti těchto elektrod pramení z sp<sup>3</sup> hybridizace uhlíku, díky němuž jsou BDD elektrody chemicky inertní a mechanicky odolné<sup>3</sup>. Nicméně elektrochemické vlastnosti BDD elektrod jsou ovlivněny mnohými faktory, mezi které například řadíme poměr B/C v plynné fázi během růstu, množství sp<sup>2</sup> uhlíkových nečistot, zakončení elektrodového povrchu, velikost krystalových zrn či krystalografickou orientaci polykrystalického filmu BDD elektrody<sup>1,4</sup>.

Hlavním parametrem, který určuje vodivost BDD elektrod, je množství inkorporovaného boru v elektrodě, který je určen poměrem B/C v plynné fázi během růstu BDD filmu. Je známo, že BDD elektrody se mohou chovat jako polovodiče, ale pokud koncentrace boru ve filmu přesáhne  $c_0[\text{B}] = 2 \times 10^{20}$  atomů boru cm<sup>-3</sup>, začne elektroda vykazovat vlastnosti příslušející kovové vodivosti<sup>5</sup>. Neoddělitelně se zvyšující se koncentrací boru je spjata i snižující se velikost krystalových zrn a tím i zvýšení množství sp<sup>2</sup> uhlíku, který se vyskytuje hlavně na hranách těchto zrn<sup>6</sup>. Přítomnost sp<sup>2</sup> uhlíku na elektrochemické parametry BDD elektrod se projevuje zejména zužováním potenciálového okna, zvyšováním nabíjecího proudu a zvýšenou adsorpcí (mezi)produktů redoxních reakcí a interferentů, které mohou elektrodu pasivovat<sup>7,8</sup>. Dalším zásadním faktorem ovlivňujícím detekci mnoha sloučenin na BDD elektrodách je zakončení (terminace) elektrodového povrchu. Na BDD elektrodách rozpoznáváme hlavní dva typy zakončení povrchu: H-terminovaný, který můžeme získat například po katodické

předúpravě povrchu a O-terminovaný, například po anodické předúpravě. Stojí za zmínku, že BDD elektrody jsou po přípravě H-terminované a jejich povrch je silně hydrofobní. Kinetika heterogenního přenosu elektronu (heterogenous electron transfer, HET) je na takovém povrchu zrychlena, zatímco O-terminované elektrody jsou hydrofilní a HET kinetika je zpomalena přítomností nepárových  $\pi$ -elektronů pocházejících z kyslíkatých funkčních skupina na povrchu elektrody<sup>9,10</sup>. Další používanou metodou regenerace povrchu BDD elektrod je leštění pomocí suspenze aluminu. Tato metoda vede k odstranění  $sp^2$  uhlíku ve formě -COOH skupin a dále adsorbovaných molekul z povrchu elektrody<sup>11</sup>. Leštěním pomocí aluminu ale nelze dosáhnout změny morfologie povrchu. Za tímto účelem se používá chemické mechanické (CM) leštění, kterým je možno vyhlazovat krystaly diamantu, a to jak polykrystalických tak monokrystalických BDD elektrod<sup>12,13</sup>. Bylo dokázáno, že pomocí CM leštění se povrch elektrody částečně oxiduje. Touto metodou je možné připravit povrchy o hrubosti méně jak 2 nm. V naší předchozí studii<sup>4</sup> bylo dokázáno, že elektrody po CM leštění vykazují uniformnější vodivost napříč povrchem elektrody a také lepší elektrochemické parametry pro sondy vnitřní a vnější sféry. V této práci byl studován vliv CM leštění na analytické parametry získané z kalibračních závislostí pro oxidaci dopaminu na BDD elektrodách v závislosti na obsahu boru (B/C v plynné fázi: 500, 1000, 2000, 4000, 8000 ppm).

### Experimentální část

Polykrystalický BDD film byl deponován na  $ca$  25 cm<sup>2</sup> křemíkové destičky pomocí chemické depozice par s mikrovlnným plazmatem (AX5010, Seki Diamond Systems), které byly následně nařezány pro přípravu jednotlivých elektrod. Elektroaktivní plocha elektrody byla  $A = 3,5$  mm<sup>2</sup>. Podrobné informace o parametrech použitých pro růst BDD filmů jsou k dispozici v práci<sup>4</sup>. Tímto způsobem byly připraveny vždy dvě BDD elektrody za použití B/C v plynné fázi 500, 1000, 2000, 4000 a 8000 ppm (BDD<sub>500</sub> – BDD<sub>8000</sub>). Jeden set elektrod byl ponechán v nezměněném stavu a druhý set byl chemicky-mechanicky leštěn pomocí už dříve zavedené metody<sup>12</sup>. Vzorky byly vždy leštěny až do hrubosti povrchu, která nepřesahovala 2 nm (vypočítáno z mikroskopie atomových sil). Doba leštění a následně čistící kroky jsou opět uvedeny v ref.<sup>4</sup>. Chemikálie použité pro studium byly dopamin hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Německo), dihydrogen fosforečnan sodný (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika), hydroxid sodný (Penta Chrudim, Česká republika). Všechny chemikálie byly analyticky čisté. Deionizovaná voda (Milipore Mili plus Q systém, Billerica, USA) s měrným elektrickým odporem menším než 18,2 M $\Omega$  cm byla použita pro přípravu všech roztoků. K dosažení požadovaného pH fosfátového pufru (pH 7,4) o koncentraci 0,1 mol l<sup>-1</sup> byl postupně přidáván 0,5 mol l<sup>-1</sup> roztok NaOH.

Square wave voltametrie (SWV) byla měřena na potenciostatu Palm-Sens se softwarem PSTrace 5.8 (PalmSens BV, Houten, Nizozemsko). Měření byla provedena za optimalizovaných podmínek: (amplituda  $A$ , frekvence  $f$ , potenciálový krok  $\Delta E_s$ ) pro (i) neleštěnou BDD<sub>500</sub> a BDD<sub>1000</sub> elektrodu:  $A = 60$  mV,  $f = 20$  Hz,  $\Delta E_s = 8$  mV, (ii) neleštěnou BDD<sub>2000</sub>, BDD<sub>4000</sub> a BDD<sub>8000</sub>:  $A = 50$  mV,  $f = 10$  Hz,  $\Delta E_s = 4$  mV, (iii) CM leštěnou BDD<sub>500</sub> a BDD<sub>1000</sub>:  $A = 120$  mV,  $f = 10$  Hz,  $\Delta E_s = 8$  mV a (iv) CM leštěnou BDD<sub>2000</sub>, BDD<sub>4000</sub> a BDD<sub>8000</sub>:  $A = 220$  mV,  $f = 20$  Hz,  $\Delta E_s = 3$  mV. Limity stanovitelnosti ( $LOQ$ ) byly poté spočítány jako desetinásobek směrodatné odchylky výšky piku ( $\sigma = 7$ ) nejnižší měřitelné koncentrace podělený hodnotou směrnice koncentrační závislosti.

### Výsledky a diskuse

Dopamin lze na BDD elektrodách zařadit mezi takzvané sondy vnitřní sféry, jelikož je citlivý na chemické změny zakončení povrchu elektrod. Při zvoleném pH 7,4 je molekula dopaminu v roztoku pozitivně nabitá ( $pK_a = 8,93$ ) a redoxní pár dopamin/dopamin-*o*-chinon vyměňuje



2 H<sup>+</sup> ionty a 2 elektrony<sup>9,14,15</sup>. Porovnání analytických parametrů pro detekci dopaminu bylo publikováno v naší předěšlé práci pro elektrody BDD<sub>500</sub> a BDD<sub>1000</sub> z obou setů<sup>4</sup>. V této práci byla studie rozšířena o CM leštěné a neleštěné BDD<sub>1000</sub>, BDD<sub>2000</sub> a BDD<sub>8000</sub> elektrody a použita zavedená a velmi citlivá metoda SWV. Získané parametry kalibračních závislostí, lineární dynamický rozsah (*LDR*) a vypočítané hodnoty *LOQ* jsou uvedeny v Tabulce I.

**Tabulka I.**

Rovnice kalibrační přímky pro určený *LDR* a vypočítané *LOQ* pro detekci dopaminu metodou SWV na CM leštěných a polykrystalických BDD elektrodách.

	<i>LDR</i> (μmol l <sup>-1</sup> )	Rovnice kalibrační přímky	<i>R</i>	<i>LOQ</i> (μmol l <sup>-1</sup> )
<b>Leštěné BDD</b>				
BDD <sub>500</sub> <sup>a</sup>	4-10	$I_p(nA) = 3,6.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 8,0$	0,9964	2,77
	10-80	$I_p(nA) = 11,2.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 85,7$	0,9976	
BDD <sub>1000</sub>	4-20	$I_p(nA) = 9,4.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 36,9$	0,9807	1,39
	20-100	$I_p(nA) = 12,5.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 89,6$	0,9985	
BDD <sub>2000</sub>	1-60	$I_p(nA) = 28,3.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 10,2$	0,9995	0,73
	60-100	$I_p(nA) = 47,6.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 1127$	0,9991	
BDD <sub>4000</sub> <sup>a</sup>	1-100	$I_p(nA) = 52,6.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 20,0$	0,9987	0,76
BDD <sub>8000</sub>	1-100	$I_p(nA) = 35,3.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 22,2$	0,9977	0,66
<b>Polykrystalické BDD</b>				
BDD <sub>500</sub> <sup>a</sup>	6-20	$I_p(nA) = 4,9.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 20$	0,9899	6,06
	20-100	$I_p(nA) = 11,8.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 133$	0,9931	
BDD <sub>1000</sub>	6-20	$I_p(nA) = 4,2.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 20$	0,9952	
	20-100	$I_p(nA) = 7,6.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 87,6$	0,9983	5,62
BDD <sub>2000</sub>	8-60	$I_p(nA) = 5,3.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 39,0$	0,9860	4,29
	60-100	$I_p(nA) = 11,9.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 432$	0,9280	
BDD <sub>4000</sub> <sup>a</sup>	2-10	$I_p(nA) = 3,7.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 4,0$	0,9940	3,50
	10-80	$I_p(nA) = 6,8.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 44,0$	0,9976	
BDD <sub>8000</sub>	2-40	$I_p(nA) = 22,4.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 41,4$	0,9948	1,35
	40-100	$I_p(nA) = 56,2.c (\mu\text{mol l}^{-1}) - 1377$	0,9982	

<sup>a</sup> Parametry koncentračních závislostí publikované v práci<sup>4</sup>.

Nejrozsáhlejší *LDR*, a to v celém zvoleném rozsahu koncentrací (1–100 μmol l<sup>-1</sup>), byl získán pouze pro elektrody s vysokým obsahem boru (BDD<sub>4000</sub> a BDD<sub>8000</sub>) a pouze pro CM leštění. Na všech ostatních BDD elektrodách se vyskytují dva *LDR*, kdy směrnice pro *LDR* vyšších koncentrací dosahuje vyšších hodnot. Dva *LDR* byly už dříve zaznamenány na BDD elektrodách, ale bohužel zatím nebyly nikdy patřičně vysvětleny<sup>16</sup>. Tento jev byl popsán jak pro dopamin, tak i pro jiné neurotransmitery na nediamantových sp<sup>2</sup> uhlíkových elektrodách s tím rozdílem, že na těchto elektrodách měl *LDR* pro vyšší koncentrace nižší hodnoty směrnice. Tento trend může být vysvětlen vyšší elektrochemickou aktivitou sp<sup>2</sup> uhlíkových elektrod přes celý povrch, což vede k jeho rychlé pasivaci. Dopamin je oxidován na dopamin-*o*-chinon, který se dále cyklizuje na leucodopaminochrom. Ten se snadno oxiduje na dopaminochrom, který radikálovou polymerací reaguje s dopaminem za vzniku polymeru melaninu pasivujícího elektrodu<sup>17–19</sup>. Z tabulky I vyplývá, že na obou sadách BDD elektrod byly získány nižší *LOQ* pro vyšší obsahy boru, ale porovnání obou sad BDD elektrod ukazuje, že nižší hodnoty *LOQ* byly dosaženy na CM leštěných BDD elektrodách. Nejnižší *LOQ* pro BDD<sub>8000</sub> elektrodu byly na CM leštěné elektrodě 0,66 μmol l<sup>-1</sup> a na neleštěné polykrystalické elektrodě 1,35 μmol l<sup>-1</sup>. Je evidentní, že hladší povrch s více uniformní vodivostí povrchu (větší přístup

k elektroaktivním místům na povrchu elektrody) významně přispívá ke zlepšení analytických parametrů BDD elektrod pro detekci dopaminu.

### Závěr

Analytické parametry pro detekci dopaminu ve fosfátovém pufru pH 7,4 ukazují, že CM leštěné BDD elektrody jsou z hlediska citlivosti výhodnější než elektrody s neleštěným povrchem. Nejnižší hodnoty  $LOQ$  ( $0,66 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) a zároveň i nejšířší lineární dynamické rozsahy byly zjištěny u CM leštěných elektrod s dopováním  $\geq 2000$  ppm.

### Acknowledgments

This research was funded by the Czech Science Foundation (GACR 20-03187S) and Specific University Research at Charles University, Czech Republic (project SVV 260690). S. Mandal and O.A. Williams from the School of Physics and Astronomy, Cardiff University are gratefully acknowledged for the chem-mechanical polishing of the BDD samples.

### References

1. Baluchová S., Daňhel A., Dejmková H., Ostatná V., Fojta M., Schwarzová-Pecková K.: *Anal. Chim. Acta* **1077**, 30 (2019).
2. Yang Z., Li M., Li H., Li H., Li C., Yang B.: *Anal. Chim. Acta* **1135**, 73 (2020).
3. Muzyka K., Sun J., Fereja T. H., Lan Y., Zhang W., Xu G.: *Anal. Methods* **11**, 397 (2019).
4. Zelenský M., Fischer J., Baluchová S., Klimša L., Kopeček J., Vondráček M., Fekete L., Eidenschink J., Matysik F.-M., Mandal S., Williams O. A., Hromadová M., Mortet V., Schwarzová-Pecková K., Taylor A.: *Carbon* **203**, 363 (2023).
5. Schwarzová-Pecková K., Vosáhlavá J., Berek J., Šloufová I., Pavlova E., Petrák V., Zavázalová J.: *Electrochim. Acta* **243**, 170 (2017).
6. Bennett J. A., Wang J., Show Y., Swain G. M.: *J. Electrochem. Soc.* **151**, E306 (2004).
7. Watanabe T., Honda Y., Kanda K., Einaga Y.: *Phys. Status Solidi A* **211**, 2709 (2014).
8. Šelešovská R., Kráňková B., Štěpánková M., Martinková P., Janíková L., Chýlková J., Vojs M.: *J. Electroanal. Chem.* **821**, 2 (2018).
9. Trouillon R., Einaga Y., Gijs M. A. M.: *Electrochem. Commun.* **47**, 92 (2014).
10. Baldan M. R., Azevedo A. F., Couto A. B., Ferreira N. G.: *J. Phys. Chem. Solids* **74**, 1830 (2013).
11. Hutton L. A., Iacobini J. G., Bitziou E., Channon R. B., Newton M. E., Macpherson J. V.: *Anal. Chem.* **85**, 7230 (2013).
12. Thomas E. L. H., Nelson G. W., Mandal S., Foord J. S., Williams O. A.: *Carbon* **68**, 473 (2014).
13. Thomas E. L. H., Mandal S., Brousseau E. B., Williams O. A.: *Sci. Technol. Adv. Mater.* **15**, 035013 (2014).
14. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/681>, Downloaded April 18<sup>th</sup> 2023.
15. Patel A. N., Tan S., Miller T. S., Macpherson J. V., Unwin P. R.: *Anal. Chem.* **85**, 11755 (2013).
16. Brycht M., Baluchová S., Taylor A., Mortet V., Sedláková S., Klimša L., Kopeček J., Schwarzová-Pecková K.: *Bioelectrochemistry* **137**, 107646 (2021).
17. Gorle D. B., Kulandainathan M. A.: *RSC Adv.* **6**, 19982 (2016).
18. Liu X., Ye D., Luo L., Ding Y., Wang Y., Chu Y.: *J. Electroanal. Chem.* **665**, 1 (2012).
19. Harreither W., Trouillon R., Poulin P., Neri W., Ewing A. G., Safina G.: *Anal. Chem.* **85**, 7447 (2013).

## Voltammetry of Organometallic Glycomimetics

Lucie Žaloudková<sup>a</sup>, Vojtěch Halama<sup>b</sup>, Jindřich Karban<sup>b</sup>, Veronika Ostatná<sup>a</sup>, Aleš Danhel<sup>a</sup>  
<sup>a</sup> Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, 612 00 Brno,  
Czech Republic, E-mail: danhel@ibp.cz

<sup>b</sup> Institute of Chemical Process Fundamentals of the Czech Academy of Sciences,  
Rozvojová 1, 165 02 Prague 6, Czech Republic

### Abstract

New organometallic glycomimetics based on ferrocene and carbohydrate centers are potential anti-tumor drugs with the ability to interact with galectins, which participate in important biological processes (such as adhesion and communication of cells). Their presence is also associated with the occurrence of serious diseases (such as cancer). Therefore, finding a fast and reliable method for measuring these interactions in an essential step and electrochemistry appears to be an excellent candidate for this task. This work focuses on the electrochemical study of organometallic glycomimetics at basal- and edge-pyrolytic graphite electrodes (b-/ePGE) using cyclic voltammetry (CV) and square wave voltammetry (SWV). The electrode reaction mechanism, adsorption on the electrode surface, and concentration dependence alongside the limit of detection (LOD) were characterized. Furthermore, the interaction of the studied substances with galectin-1 on bPGE and ePGE has been observed.

**Keywords:** Electrochemistry, Ferrocene, Galectins, Glycomimetics, Organometals, Pyrolytic graphite electrode, Voltammetry.

### Introduction

The elucidation of the protein-carbohydrate interactions is essential for understanding their biological functions and is very promising in the design of novel anticancer drugs based on carbohydrate derivatives. This work is focused on ferrocene arene organometallic galectin ligands. Together with the basic electrochemical (EC) characterization of new organometallic glycomimetics by voltammetric methods may help in the development of novel anticancer drugs or following research of galectins.

Carbohydrates are electro-inactive at mercury or pyrolytic graphite-based electrodes (PGE). However, recently designed and synthesized Fe-based organometallic complexes can be, thanks to the presence of the metal part, directly detected by EC methods.<sup>[1]</sup> Thus electroanalytical methods offer simple, rapid and inexpensive instrumentation not only for their detection in solution but also for their interaction studies with other even electrochemically inactive molecules. In this case, the organometallic compounds serve as redox labels. It has been shown that cytotoxic ferrocene analogs are electroactive and their cell localization can be determined using differential pulse voltammetry<sup>1</sup>.

In this work, basic electrochemical characterizations of novel organometallic glycomimetics have been carried out by cyclic voltammetry (CV) and square-wave voltammetry (SWV) on bPGE and ePGE.

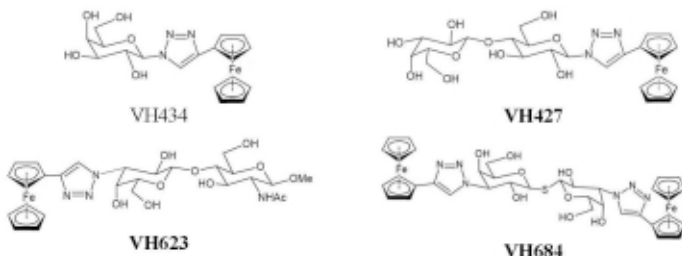
### Experimental

Voltammetric experiments were carried out by potentiostat Autolab 302N (Metrohm-Autolab) connected with VA Stand 663 in a three-electrode setup including bPGE (O.D. 3 mm, PGE supplied by Momentive, USA, preparation is described in Ref. <sup>2</sup>) as working electrode, platinum foil (99.999%, Merck) as counter electrode and Ag/AgCl/3M KCl as reference mini electrode

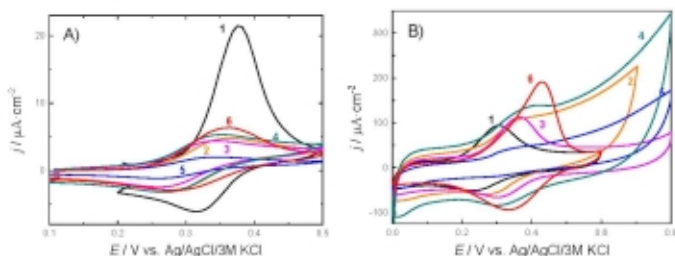
(both Metrohm-Autolab). Studied compounds were purchased from Sigma-Aldrich (Merck) or VH434, VH427, VH623, and VH684 (Fig. 1) synthesized by co-author V.H. from J. K. research group. All the solutions and electrolytes were prepared from ddH<sub>2</sub>O) produced by distilled apparatus (type 2004, GFL).

## Results and Discussion

Herein studied glycomimetics (Fig. 1) could be studied by CV and SWV at b- and ePGE thank to the presence of an electroactive center, ferrocene. Methylmethanolferrocene and ferrocenecarboxylic acid have also been studied as model compounds (Fig. 2).



**Fig 1.** Chemical structures of herein studied organometallic glycomimetics.



**Fig 2.** Cyclic voltammograms of: 100  $\mu$ M methylferrocenemethanol (1), 100  $\mu$ M ferrocenecarboxylic acid (2), 100  $\mu$ M VH434 (3), 216  $\mu$ M VH427 (4), 100  $\mu$ M VH623 (5), 100  $\mu$ M VH684 (6), measured at bPGE (A) and ePGE (B) in 50 mM NaPh pH 7.0, scan rate 0.1 V/s.

Next to the basic characterization of the redox potentials, currents, and reversibility of the analytes, electrode processes and adsorption capability have been observed. Obtained results give us data for the calculation of diffusion coefficients of these novel perspective anticancer drugs.

Utilizing CV and SWV concentration dependences have been measured from which the limits of detection could be determined for both electrodes (Tab. I).

**Table I.**

Summary of reached LODs (S/N = 3).

Ligand	Method	Electrode	c [ $\mu$ M]	LOD [ $\mu$ M]
VH434	CV	bPGE	1-100	1
		ePGE	10-100	10
	SWV	bPGE	0.25-100	0.25
		ePGE	10-100	10
VH427	CV	bPGE	2-216	2
		ePGE	25-216	25
	SWV	bPGE	0.5-216	0.5
		ePGE	10-216	10
VH623	CV	bPGE	1-50	1
		ePGE	25-125	25
	SWV	bPGE	0.25-50	0.1
		ePGE	10-100	10
VH684	CV	bPGE	0.25-100	0.1
		ePGE	20-100	20
	SWV	bPGE	0.25-50	0.1
		ePGE	5-100	5

Last but not least, SWV has been used for the determination of the glycomimetics interaction with galectin-1 and compared with the results obtained from fluorescent anisotropy.

### Conclusions

The electrochemical behavior of novel organometallic ligands of galectins bearing ferrocene tag was studied in this work. Cyclic voltammetry was used in combination with basal- and/or edge-pyrolytic graphite electrodes in 50mM sodium phosphate buffer pH 7.0. Square-wave voltammetry has further been used for the determination of LOD and an attempt to study the interaction of the ligands with galectin-1 by SWV has also been done.

### Acknowledgments

This work was supported by The Czech Science Foundation (grant 23-06115S). Vojtěch Hamala is grateful for the financial support of the Martina Roeselová Memorial Fellowship granted by the IOCB Tech Foundation.

### References

- Bartošík M., Koubková L., Karban J., Červenková Šťastná L., Hodík T., Lamač M., Pinkas J., Hrstka R., *Analyst* 140, 5864 (2015).
- Spacek J., Danhel A., Hason S., Fojta M.: *Electrochem. Commun.* 82, 34 (2017).

# 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, Praha1, [www.csch.cz](http://www.csch.cz)

## Členské výhody:

- Možnost zařadění 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 společností 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.).



230



## Author Index

- Adam Vojtěch, 72, 176  
Anthi Judita, 9  
Arbneshi Tahir, 138  
Ashrafí Amir M., 72, 176  
Baluchová Simona, 47, 124, 223  
Baranová Tímea, 69  
Barek Jiří, 213  
Baroch Martin, 14, 52, 55  
Bartáček Jan, 18, 91  
Barták Petr, 21, 181  
Bartoš Martin, 191  
Bártová Michaela, 26, 191  
Belbasi Zeynab, 31  
Bělušová Anna, 35  
Bláhová Eva, 39, 95  
Broncová Gabriela, 43  
Čambal Peter, 47, 95  
Červený Václav, 55  
Daňhel Aleš, 59, 227  
Degano Ilaria, 186  
Dejmková Hana, 14, 52  
Dian Juraj, 55  
Dobrovodský Daniel, 59  
Doležalová Petra, 181  
Dračínská Helena, 159  
Dušek Libor, 155  
Fajgar Radek, 167  
Fendrichová Aneta, 195  
Fischer Jan, 63, 172, 223  
Fojta Miroslav, 59, 66, 75, 159  
Fořtová Lucie, 63  
Gál Miroslav, 69  
Garehbaghi Sanam, 72  
Gasior Jindřich, 218  
Grapci Vjosa, 138  
Halama Vojtěch, 227  
Hana Vaisocherová-Lisalová, 9  
Havlová Šárka, 43  
Havran Luděk, 66, 75, 159  
Hermanová Monika, 66, 75  
Hermostová Sára, 43  
Hlavín Petr, 43  
Hojová Lucia, 79  
Holubová Barbora, 9  
Houska Milan, 9  
Hrbáč Jan, 31, 84  
Hrdlička Vojtěch, 146  
Hromadová Magdaléna, 111, 200, 218  
Hrušková Marcela, 75  
Choiňska Marta, 87  
Chýlková Jaromíra, 18, 91, 133, 195  
Indruchová Barbora, 142  
Jan Langmaier, 21  
Janíková Lenka, 195  
Jehlička Vladimír, 91  
Jelšiková Kristýna, 95, 151  
Jenner Leon, 99  
Jerga Radek, 21, 103, 181  
Jindřich Jindřich, 55  
Jiroušková Eliška, 186  
Jirovský David, 31  
Josypčuk Bohdan, 213  
Karban Jindřich, 227  
Klikarová Jitka, 107  
Klusáček Martin, 35  
Kocábová Jana, 111  
Kocúrik Martin, 18  
Kočí Jan, 167  
Koláčná Lucie, 116  
Kolivoška Viliam, 9, 200  
Krahulec Ján, 69  
Krejčí Jan, 35  
Krejčí Petra, 181  
Krůšek Jan, 124  
Křížek Tomáš, 121  
Kubiček Vojtěch, 116  
Kubičková Anna, 121, 172  
Kučerová Radka, 35  
Kuchtová Gabriela, 155  
Li Xiaochun, 146, 205  
Ludvík Jiří, 116  
Lytvynenko Anton, 124  
Mačkulák Tomáš, 79  
Mařar Milan, 116  
Mareček Vladimír, 129  
Marton Marian, 79  
Marton Marián, 133  
Matvieiev Oleksandr, 91, 133, 195  
Mészáros Gábor, 218  
Metelka Radovan, 138  
Míka Luděk, 14  
Mikysek Tomáš, 26, 142, 191  
Milan Šys, 191  
Navrátil Tomáš, 21, 87, 146  
Nedvěd Michal, 151  
Nesměrák Karel, 151

- Nováková Lachmanová Štěpánka, 111  
 Novotný Ladislav, 155  
 Novotný Michal, 43  
 Nycz Jacek, 186  
 Ondráčková Anna, 159  
 Opekar František, 162  
 Ostatná Veronika, 227  
 Pecák Jakub, 52  
 Petlák Matouš, 99  
 PISOŇOVÁ Simona, 79  
 Pivoňková Hana, 66  
 Pochobradský Jaroslav, 18  
 Poláková Jana, 47  
 Pospíšilová Eva, 167  
 Pražáková Lucie, 172  
 Pruchkouski Dzmitry, 99  
 Pšenčík Jakub, 55  
 Renčíuk Daniel, 59  
 Richter Lukáš, 72, 176  
 Saadati Arezo, 176  
 Sedlák Miloš, 18  
 Serbanová Lucie, 39  
 Shishkanova Tatiana V., 167  
 Schwarzová-Pecková Karolína, 39, 47, 63, 95,  
 124, 151, 159, 223  
 Skopalová Jana, 21, 181  
 Smrž Dominik, 121  
 Sokolová Romana, 186  
 Soldánová Zuzana, 66  
 Spasovová Monika, 9  
 Stiborová Marie, 159  
 Straus Jiří, 43  
 Svašková Lenka, 155  
 Svitáková Martina, 138  
 Svoboda Jan, 18  
 Sýkorová Eva, 99  
 Sýs Milan, 107  
 Šantrůčková Veronika, 107  
 Šelešovská Renáta, 91, 133, 195  
 Šestáková Ivana, 87  
 Šíkula Martin, 200  
 Štolbová Dana, 21  
 Švancara Ivan, 191  
 Taylor Andrew, 47, 172, 223  
 Tomnikova Alice, 121  
 Toušková Monika, 107  
 Trehová Miroslava, 43, 167  
 Trnková Libuše, 146, 205  
 Trisková Iveta, 205  
 Tůma Petr, 162, 208  
 Tvorynska Sofiia, 213  
 Uchytílová Simona, 155  
 Usenko Alona, 91  
 Valášek Michal, 111, 218  
 Vaněčková Eva, 9, 200  
 Vavrek František, 111, 218  
 Víkartovský Andrej, 52  
 Vogelová Eva, 9  
 Vojs Marian, 79, 133  
 Vojs Staňová Andrea, 79  
 Vrabcová Markéta, 9  
 Vrablie Petr, 43  
 Vrška Martin, 79  
 Wantulok Jakub, 186  
 Zelenský Michal, 223  
 Žaloudková Lucie, 227



Chem  
Electro  
Chem

Chemistry  
Methods

Chem  
Phys  
Chem



Chemistry  
Europe

## ISE sponsored Meeting



# CHEMAGAZÍN



# 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 speciál
- 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 (polarografii a voltametrii)

ve vodách, v roztocích a v různých materiálech (podle ČSN, DIN apod.),  
v běžných podmínkách pro vysoké obsahy i pro stopové koncentrace  
 $10^{-10}$  až  $10^{-11}$  mol/l

- **stanovení kovů** (Pb, Cd, Zn, Cu, Fe, Ni, Al, Cr, Hg, As, Mn, Mo, Be), resp. většiny prvků Mendělejevovy tabulky
- **stanovení aniontů (dusičnanů, dusitanů, Cl<sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, J<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, S<sup>2-</sup>)**
- **sledování velkého množství org. látek a škodlivin** (saponátů, herbicidů, pesticidů, insekticidů, nitrolátek, barviv, biologicky aktivních látek, surfaktantů atd.).

#### Hodnocení stavu a stupně opotřebení motorů, ropných olejů a maziv

v běžných podmínkách, bez demontáže

**Oblasti aplikací - dosud nejširší laboratorní, provozní, dílenská i terénní praxe**  
vodo hospodářství, 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 půd; 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 pogaranní servis, odbornou pomoc a vývoj analytických metodik. Celý systém je, pro svou jednoduchou obsluhu, vhodný pro výukové účely.**

## Metrohm demonstrační laboratoř na Univerzitě Karlově



 **Metrohm**  
Česká republika



[www.metrohm.cz](http://www.metrohm.cz)



# COMARR PARDUBICE



*Jsme ryze česká společnost pracující v oboru výpočetní techniky, programování aplikací, projekcí 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 heldeskový 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



© Best servis Ústí nad Labem

ISBN 978-80-908947-0-9

ISBN 978-80-908947-0-9



9 788947 089470