



**41.**

**MODERNÍ  
ELEKTROCHEMICKÉ  
METODY**

**SBORNÍK PŘEDNÁŠEK  
Květen 2022**



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**

## **41. Moderní Elektrochemické Metody**

Jetřichovice, 22. – 26. května 2022

Uspořádali:

Tomáš Navrátil, Miroslav Fojta a Karolína Schwarzová

ISBN 978-80-905221-9-0

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: 41. Moderní Elektrochemické Metody  
Vydal: Srsenová Lenka - Best servis Ústí nad Labem  
Autor: kolektiv autorů  
Počet stran: 234  
Náklad: 75  
Vydání 1.  
Formát: A5  
ISBN: 978-80-905221-9-0

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**

# **41<sup>st</sup> Modern Electrochemical Methods**

**Jetřichovice, Czech Republic**

**May 22<sup>nd</sup> - May 26<sup>th</sup>, 2022**

**Editors:**

**Tomáš Navrátil, Miroslav Fojta, and Karolína Schwarzová**

**ISBN 978-80-905221-9-0**

Poděkování partnerům konference  
41. Moderní Elektrochemické Metody



PŘÍRODOVĚDECKÁ  
FAKULTA  
Univerzita Karlova

 **Metrohm**  
Česká republika



 **fisher scientific**  
part of Thermo Fisher Scientific



**ECO-TREND PLUS s.r.o.**

<b>Obsah</b>	<b>Page</b>
<i>Eva Bláhová, Kristýna Jelšiková, Michal Zelenský, Jana Kubešová, and Karolina Schwarzová-Pecková</i> Voltammetry of Unsaturated Steroid Compounds	9
<i>Peter Čambal, Simona Baluchová, Karolina Schwarzová-Pecková, Andrew Taylor, Jan Fischer, Luděk Mika, and Vincent Mortet</i> Comparison of Plasma and Electrochemical Surface Rehydrogenation of Single-Crystal Boron-doped Diamond Electrodes	13
<i>Martina Čierna, Lucia Birošová, Olivia Dakošová, and Miroslav Gál</i> Peptide-membrane Interaction Studied by Electrochemical Techniques	17
<i>Olivia Dakošová, Miroslav Gál, and Eva Melníková,</i> Electrochemical Detection of Biologically Active Substances using a 3-D Printed Flow Cell	20
<i>Aleš Daňhel, Ondřej Chytrý, and Miroslav Fojta</i> Electrochemical Detection of Oligonucleotide Structural Changes	23
<i>Hana Dejmková and Luděk Mika</i> Principles of 3D Printing for the Application in the Electroanalytical Measurements	27
<i>Libor Dušek, Petr Herink, Ladislav Novotný, and Gabriela Kuchtová</i> Electro-Fenton Oxidation of Industrial Waters using a Sacrificial Anode	30
<i>Jan Fischer, Barbora Semkovičová, Petr Ashcheulov, and Karolina Schwarzová-Pecková</i> Characterization of Boron-Doped Diamond on Titanium Substrate for Electrochemical Analysis	35
<i>Lukáš Fojt, Stanislav Hasoň, Miroslav Kolíbal, and Miroslav Fojta</i> Utilization of Screen-Printed Electrodes as Disposable Electrochemical Sensors	38
<i>Miroslav Fojta, Hana Pivoňková, and Monika Hermanová</i> Reduction of Homocytosine Blocks in DNA oligonucleotides on Mercury Electrode	41
<i>Luděk Havran, Vojtěch Němec, and Miroslav Fojta</i> Aromatic Nitro compounds – Useful DNA Redox Labels	44
<i>Václav Helán and Ernest Beinrohr</i> Portable and Transportable Analyzers of Toxic Metals and Some Organic Compounds	47
<i>Monika Hermanová, Luděk Havran, Marcela Hrušková, and Miroslav Fojta</i> Thiopyrimidines as hydrogen evolution catalysts for electrochemical detection of DNA	51
<i>Lucia Hojová, Erika Mordačiková, Martin Vrška, Denis Voltman, Marian Vojs, and Andrea Vojs Staňová</i> Electrochemical Oxidation of Selected Antihypertensives with 2D and 3D Boron-doped Diamond Electrodes	55
<i>Marta Choínska-Młynarczyk and Tomáš Navrátil</i> Voltammetric Determination of Psilocin and Psilocybin at Carbon-fiber PLA Electrode	59
<i>Marta Choínska-Młynarczyk, Vojtěch Hrdlička, Jana Skopalová, Renáta Šelešiovská, Vilam Kolivoška, and Tomáš Navrátil</i> Electrochemical Techniques in Monitoring of Nervous System Drugs	64
<i>Jaromíra Chyčková, Alona Usenko, Miloš Sedláč, Jan Bartoček, Jiří Cuhorka, and Renáta Šelešiovská</i> Voltammetric Determination of Daminozide in Plant Material	69

<i>Granit Jashari, Ivan Švancara, and Milan Sýs</i> Carbon Paste Electrodes for Electroanalysis in Nonaqueous Media	73
<i>Granit Jashari, Michaela Fröhbauerová, Tomáš Mikysek, Ivan Švancara, Radovan Metelka, and Milan Sýs</i> Electroanalysis of trans-Anethole	77
<i>Kristýna Jelšiková, Eva Bláhová, Jana Kubešová, Karolina Petráňová, Jan Klouda, and Karolina Schwarzková-Pecková</i> Comparison of Electrochemical Behavior of Bile Acids and Their Conjugates on the Boron-Doped Diamond Electrode	81
<i>Leon Jenner, Dzmityr Pruchkouski, and Eva Sýkorová</i> Plant Telomerase RNA and its Protein Interactors	84
<i>Bohdan Josypčuk, Ivana Šestáková, and Sofita Tvorynska</i> Mercury Film Screen-Printed Electrodes	88
<i>Gylixhane Kastrati, Granit Jashari, Lucie Korecká, and Zuzana Bilková</i> Electrochemical Immunosensors for Clinical Diagnostics	92
<i>Jitka Kličarová, Milan Sýs, Anna Horská, Francesco Cacciola, Paola Dugo, and Luigi Mondello</i> Evaluation of Vegetable Oils: RP-HPLC vs. Voltammetry at Carbon Paste Electrodes	96
<i>Lucie Koláčná, Peter Polák, Tomáš Tobrman, and Jiří Ludvík</i> Redox Properties of Conjugated Phosphole Derivatives – Electrochemical Study	100
<i>Lucie Korecká, Marcela Slováková, Michaela Šislerová, and Zuzana Bilková</i> Electrochemical Detection of Enzyme Activity of Kinases Immobilized on Magnetic Particles	105
<i>Zuzana Kramplová, Andrea Purdešová, and Jozef Sokol</i> Properties of Boron-doped Diamond Electrode Affecting Electroanalytical Detection of Pesticides	110
<i>Gabriela Kuchtová, Ladislav Novotný, Aneta Karásková, and Libor Dušek</i> Energy Dependences Associated with Galvanostatic Removal of Zinc and Organic Components from Waste Water of Rayon Production	115
<i>Jiří Liška, Václav Červený, and Juraj Dian</i> Optimization of Anodic Etching of Crystalline Silicon for Fabrication of Luminescent Silicon Nanocrystals for Chemosensor Applications	120
<i>Anton Lytvynenko, Andrey Mishura, Agnieszka Brzózka, Grzegorz Sulka, and Sergey Kolotilov</i> Electrocatalytic Debromination of Organic Compounds on Electrodeposited Silver Nanofoam	125
<i>Vladimír Mareček, Zdeněk Samec, and Antonín Trojánek</i> Analysis of the Hydrated ions Clusters Impact on the Liquid/Liquid Interface	130
<i>Oleksandr Matvieiev, Renáta Šelešiovská, and Jaromíra Chýlková</i> Electrodeposition of Gold Nanoparticles to Modify the Boron-doped Diamond Electrode	135
<i>Eva Melniková, Olívia Dakošová, Miroslav Gál, and Filip Kieľar</i> Redox Behavior of Photoactive Iridium Complexes	140
<i>Erika Mordačková, Marian Marton, Pavol Michniak, Marian Vojs, Tomáš Mackuľák, and Andrea Vojs Staňová</i> Electrochemical Oxidation of Diclofenac on Boron-Doped Diamond Electrodes	143



<i>Nikola Mikulová, Radek Jerga, Monika Zajacová Cechová, Petr Cankař, Jakub Stýskala, Petr Barták, and Jana Skopalová</i> On the Electrochemical Oxidation of Morphine	147
<i>Tomáš Mikysek, Michaela Bártová, Milan Šys, and Miroslav Novák</i> Comparison of Catecholase Activity of Selected Copper(II)-based Catalysts	151
<i>Štěpánka Nováková Lachmanová, Jana Kocábová, František Vavrek, Táňa Sebechlebská, Jakub Šebera, Viliam Kolivoška, Jan Lukášek, Nico Balzer, Michal Valášek, Magdaléna Hromadová</i> Electrochemical characterization of self-assembled monolayers containing redox switching element	154
<i>Anna Ondráčková, Monika Hermanová, Hana Pivoňková, and Miroslav Fojta</i> Voltammetric Properties of DNA Oligonucleotides Containing Synthetic Components	159
<i>Eva Pospíšilová and Tatiana V. Shishkanova</i> 3-Aminobenzoic Acid Based Polymer as Scaffold for Electrochemical Recognition of Synthetic Cathinones	163
<i>Andrea Purdešová, Zuzana Kramplová, and Jozef Sokol</i> Detection of Selected Amino Acids using Electroanalytical Methods	168
<i>Egzontina Shabani, Vullnet Veseli, Zuzana Bilková, and Liridon Berisha</i> Voltammetric Determination of Ranitidine Based on Derivatization Reaction at Glassy Carbon Paste Electrode Modified with SDBS	171
<i>Tatiana V. Shishkanova, Jakub Marián Pálež, Karolína Salvadori, Radek Fajgar, Pavel Matějka, and Petra Cuřínová</i> Host-Guest Interaction onto Electrode Surface between Urea based Receptor and Neuroblastoma Metabolites	175
<i>Romana Sokolova, Jakub Wantulok, Jan Fiedler, Jacek Nycz, and Ilaria Degano</i> Spectroelectrochemistry of 1,10-phenantrolines Substituted by Pyrrolidine and Phenothiazine Redox-active Units	179
<i>Renáta Šelešová, Oleksandr Matvieiev, Kateřina Petříková, Marian Vojs, Marián Marton, Martin Vrška, Lenka Janíková, and Jaromíra Chýlková</i> Novel Screen-printed Sensors with Chemically Deposited Boron-doped Diamond Electrode Modified with Gold Nanoparticles for Point-of-care Testing	184
<i>Ludmila Šimková, Karol Lušpai, Jiří Klíma, and Jiří Ludvík</i> (Spectro) Electrochemical Study of Cibalackrot Derivatives – Potential Chromophores for Singlet Fission	189
<i>Oskar Štěrba, Eva Vaněčková, Marta Chojńska-Młynarczyk, Tomáš Navrátil, and Viliam Kolivoška</i> Manufacture of 3D Printed Microfluidic Channels and Their Characterization by Impedance Spectroscopy and Optical Microscopy Measurements	194
<i>Libuše Trnková, Iveta Třísková, Zdeněk Farka</i> Electrochemical Analysis of Insulin on Graphite Electrodes	199
<i>Petr Tůma and Vladimíra Fejfarová</i> Sensitive Electrophoretic Determination of Amoxicilline and Cefprozidime in Patients with Syndrome of Diabetic Foot	203
<i>Alona Usenko, Jaromíra Chýlková, Martin Kociárik, and Ondřej Slaviček</i> Voltammetric Analysis of Mixtures of Selected Plant Protection Products using a Boron-doped Diamond Electrode	208

<i>František Vavrek, Michal Valášek, Gábor Mészáros, Jindřich Gasior, and Magdaléna Hromadová</i>	212
Effect of 4-pyridyl and p-phenylenethioacetate Anchoring Groups on Electric Conductance of Anthraquinone-based Molecular Switch	
<i>Marian Vojs, Oleksandr Matvieiev, Michal Hatala, Renáta Šelešovská, Martin Vrška, Pavol Michniak, Miroslav Behül, and Marián Marton</i>	217
Electrochemical Deposition of Palladium Nanoparticles on a Boron-Doped Diamond Electrode	
<i>Michal Zelenský, Kristýna Jelšiková, and Karolína Schwarzová-Pecková</i>	222
Development of Voltammetric Methods for Detection of Phytosterols on Carbon-based Electrodes	
Rejstřík autorů	227

## Voltammetry of Unsaturated Steroid Compounds (Voltametrie nenasycených steroidních sloučenin)

Eva Bláhová, Kristýna Jelšíková, Michal Zelenský, Jana Kubešová, 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: karolina.schwarzova@natur.cuni.cz

### Abstract

Steroids are organic compounds derived from saturated cyclopentanoperhydrophenanthrene ring. This study is devoted to investigation of electrochemical behavior of sterols in dependence on various positioning and number of double bonds inside the steroid core using cyclic voltammetry in the media of an indifferent electrolyte or dehydrating inorganic acid in acetonitrile using carbon-based electrodes including the boron-doped diamond electrode. Steroids possessing one double bond in the steroid core (e.g., cholesterol) are oxidized at more positive potentials than steroids with conjugated double bonds (e.g., 7-dehydrocholesterol). Sufficient difference in oxidation potential provides base for the development of voltammetric methods for their detection.

**Keywords:** Boron-doped diamond electrode, Cholesterol, Cyclic voltammetry, Non-aqueous media, Oxidation, Steroids.

### Úvod

Steroidní sloučeniny jsou rozsáhlou skupinou fyziologicky významných látek, jejichž základní strukturální jednotkou je steran (cyklopentanoperhydrofenanthren, Obr. 1), a patří mezi ně např. žlučové kyseliny, vitaminy skupiny D, steroly, pohlavní hormony nebo hormony kůry nadledvin. Steroly jsou lipofilní látky vyskytující se přirozeně v buňkách živočichů, rostlin a hub. Mají hydroxylovou skupinu v poloze C3 a jejich variabilita je dána počtem a rozložením dvojných vazeb ve steroidním jádře a v postranním řetězci na C17. Steroly se podílejí na fluiditě a permeabilitě buněčných membrán. V malém množství se nacházejí též v endoplazmatickém retikulu, tonoplastech a mitochondriích. V těchto organelách se nemusejí nacházet pouze v membráně, ale i volně v intracelulární tekutině. Fytosteroly se v rostlinách vyskytují ve směsích. Ve srovnání rostlinných sterolů s cholesterolem jsou tyto ve svých postranních řetězcích rozmanitější. Nejběžnějšími fytosteroly jsou stigmasterol, který v buňce ovlivňuje její proliferaci a diferenciaci, a  $\beta$ -sitosterol, který ovlivňuje propustnost buněčné membrány. Ergosterol se nachází především v buněčné membráně hub. Zároveň je provitaminem D<sub>2</sub>. Biosyntéza cholesterolu (přes lathosterol a 7-dehydrocholesterol) a ergosterolu u savců a kvasinek vede přes lanosterol<sup>1,2</sup>.

Elektrochemická aktivita steroidních sloučenin neobsahujících konjugované dvojně vazby ve steroidním skeletu je velmi omezená<sup>3</sup>. Cholesterol, vybrané oxysteroly a fytosteroly s jednou dvojnou vazbou lze oxidovat při vysoce kladném potenciálu v nevodném prostředí, jak bylo publikováno pro jejich ampérometrickou detekci po HPLC separaci<sup>4,5</sup>. 7-dehydrocholesterol a ergosterol se dvěma konjugovanými vazbami mají v nevodném prostředí nižší oxidační potenciál<sup>6,7</sup>.

V této práci bylo systematicky studováno voltametrické chování výše uvedených sterolů s dvojnou vazbou  $\Delta^5$  (cholesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol),  $\Delta^7$  (lathosterol),  $\Delta^{8,14}$  (lanosterol) a s konjugovanými dvojnými vazbami  $\Delta^5, \Delta^7$  (ergosterol, 7-dehydrocholesterol) na elektrodě ze

skelného uhlíku (GCE) a borem dopované diamantové elektrodě (BDDE), která v porovnání s GCE vykazuje širší potenciálové okno v oblasti pozitivních potenciálů, nižší zbytkový proud a menší náchylnost k adsorpci jak analytů, tak produktů elektrochemických přeměn<sup>8,9</sup>. Studována byla možnost oxidace v prostředí acetonitrilu a indifferenčního základního elektrolytu s/bez přídavku vody a využití dehydratace sterolů v prostředí anorganická kyselina-acetonitril. Tento přístup je znám jako Liebermann-Burchardova reakce a je využíván pro kolorimetrickou detekci cholesterolu. Vede k zavedení dvojných vazeb do steroidního skeletu<sup>10</sup> a umožňuje následnou oxidaci na elektrodě, jak jsme ukázali pro primární žlučové kyseliny<sup>11</sup>.

### Experimentální část

Zásobní roztoky cholesterolu, stigmasterolu,  $\beta$ -sitosterolu, lanosterolu, lathosterolu a 7-dehydrocholesterolu byly připraveny o koncentraci  $1.10^{-3}$  mol  $l^{-1}$ , roztok ergosterolu o koncentraci  $1.10^{-4}$  mol  $l^{-1}$  (všechny od firmy Sigma-Aldrich) v acetonitrilu. Pro měření metodou cyklické voltametrie byl použit přístroj Eko-Tribo Polarograf (software Polar-Pro 5.1) od EcoTrend Plus, Praha. Pracovní BDDE (Windsor Scientific; Slough, Velká Británie) měla průměr 3 mm, pracovní GCE (Metrohm, Česká republika) měla průměr 2 mm. Elektrody byly před každým měřením leštěny pomocí suspenze aluminu (Elektrochemické detektory, Turnov) a destilované vody. Jako referenční elektroda byla použita nevodná referenční elektroda podle Pleskova (stříbrný drátek v roztoku  $0,01$  mol  $l^{-1}$   $AgNO_3$  v  $1$  mol  $l^{-1}$   $NaClO_4$  v acetonitrilu) a jako pomocná elektroda platinová (Elektrochemické detektory, Turnov).

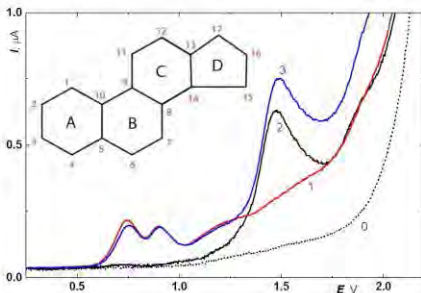
### Výsledky a diskuse

Elektrochemické chování sedmi sterolů bylo studováno v prostředí acetonitrilu při použití dvou typů základních elektrolytů: dehydratující anorganické kyseliny (kyselina chloristá, kyselina sírová) a chloristanu sodného. Cyklická voltametrie na BDD i GCE prokázala možnost oxidace všech sterolů s odlišnou polohou potenciálů v závislosti na počtu a poloze dvojných vazeb a ireversibilní charakter redoxního procesu. V bezvodném prostředí chloristanu sodného v acetonitrilu byl stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol a cholesterol (všechny dvojná vazba v poloze  $\Delta^5$ ) oxidovány při potenciálu *ca* +1,6 V na BDD elektrodě. Na GCE je oxidační signál nevýrazný, v oblasti úniku základního elektrolytu při potenciálu *ca* +1,4 V. Mechanismus oxidace těchto sterolů bude zřejmě obdobný jako byl popsán pro cholesterol, který se v acetonitrilu oxiduje v  $4e^-/4H^+$  procesu na cholesta-4,6-dien-3-on<sup>12</sup>. Lathosterol ( $\Delta^7$ ) je oxidován při nižším oxidačním potenciálu (+1,5 V na BDDE a +1,3 V na GCE) a u lanosterolu ( $\Delta^{8,14}$ ) dochází k dalšímu posunu do oblasti pozitivních potenciálů (+1,2 V na BDDE a +1,1 V na GCE). Pozitivnější oxidační potenciály na BDDE i v porovnání s GCE jsou důsledkem heterogenního povrchu BDDE, který způsobuje zpomalení kinetiky přenosu elektronu<sup>9</sup>. Steroly s konjugovanými dvojnými vazbami  $\Delta^5, \Delta^7$  (7-dehydrocholesterol, ergosterol) jsou oxidovány dvoustupňově při pozitivnější potenciálu +0,8 V a +1,25 V (nevýrazný signál) na obou elektrodách. Uvedené signály jsou stabilní.

V prostředí dehydratující kyseliny lze uvedené steroly také oxidovat, v roztocích je ale vždy přítomna voda vzhledem k jejímu obsahu v nasycených roztocích kyselin a v měřeném roztoku může probíhat dehydratační reakce, jejíž kinetika ovlivňuje následnou redoxní odezvu. Tento jev byl pozorován v případě sterolů s konjugovanými dvojnými vazbami  $\Delta^5, \Delta^7$  (7-dehydrocholesterol, ergosterol) v prostředí v  $0,1$  mol  $l^{-1}$  kyseliny chloristé v acetonitrilu (obsah vody 0,43 %), které poskytují dva oxidační signály a pozitivnější narůstá po dobu *ca* 60 min od přípravy roztoků. Tyto steroly také vykazují změny UV spekter v čase. U ostatních sterolů není závislost výrazná, oxidační signály se stabilizují do několika minut od přípravy roztoků. Stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol a cholesterol ( $\Delta^5$ ) se opět oxidují nejpozitivněji (+1,8 V (BDDE)), +

1,6 V (GCE), oxidace lathosterolu probíhá při pozitivnějších potenciálech (+1,6 V (BDDE), +1,3 V (GCE)) a lanosterol se na rozdíl od prostředí chloristanu sodného v acetonitrilu oxiduje dvoustupňově, při +1,1 V a +1,4 V. Na Obr. 1 je ukázána oxidace 7-dehydrocholesterolu a cholesterolu, kdy dostatečný rozdíl oxidačních potenciálů těchto sterolů je předpokladem pro vývoj voltametrické metody pro jejich detekci ve směsi.

**Obr. 1** Diferenční pulsní voltamogramy 7-dehydrocholesterolu (červená křivka, 1),



cholesterolu (černá křivka, 2) a jejich ekvimolární směsi (modrá křivka, 3) v 0,1 mol l<sup>-1</sup> HClO<sub>4</sub> v acetonitrilu (obsah vody 0,43 %; přerušovaná černá křivka, 0). Koncentrace každého sterolu 1.10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup>. Vložena struktura steroidního skeletu.

### Závěr

Steroly obsahující jednu dvojnou vazbu ve steroidním skeletu lze ireversibilně oxidovat na GCE a BDDE v prostředí acetonitrilu obsahujícím chloristan sodný nebo dehydratující kyselinu jako základní elektrolyt. Steroly s konjugovanými dvojnými vazbami se oxidují při méně pozitivním potenciálu a v přítomnosti kyseliny dochází v čase ke změnám ve výšce signálů vzhledem k probíhající dehydratační reakci. Předmětem dalšího studia bude objasnění mechanismu dehydratačního a oxidačního kroku pro vybrané steroly a vývoj elektrochemických metod pro jejich detekci ve směsích.

### Acknowledgments

The research was supported by the Czech Science Foundation (project GACR 19-11268S) and the Specific University Research (SVV260560).

### References

1. Nes W. D.: Chem. Rev. 111, 6423 (2011).
2. Ohyama K., Suzuki M., Kikuchi J., Saito K., Muranaka T.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 725 (2009).

3. Klouda J., Barek J., Nesmerak K., Schwarzova-Peckova K.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* *47*, 384 (2017).
4. Matsunaga I., Hakamata H., Sadohara K., Kakiuchi K., Kusu F.: *Anal. Biochem.* *393*, 222 (2009).
5. Ito N., Hakamata H., Kusu F.: *Anal. Methods* *2*, 174 (2010).
6. Vukojevic V., Djurdjic S., Svorc L., Velickovic T. C., Mutic J., Stankovic D. M.: *Food Anal. Meth.* *11*, 2590 (2018).
7. Klouda J., Benesova L., Kocovsky P., Schwarzova-Peckova K.: *Talanta* *229*, 122260 (2021).
8. Musilova J., Barek J., Peckova K.: *Chem. Listy* *103*, 469 (2009).
9. Baluchová S., Daňhel A., Dejmková H., Ostatná V., Fojta M., Schwarzová-Pecková K.: *Anal. Chim. Acta* *1077*, 30 (2019).
10. Xiong Q. B., Wilson W. K., Pang J. H.: *Lipids* *42*, 87 (2007).
11. Klouda J., Barek J., Kocovsky P., Herl T., Matysik F. M., Nesmerak K., Schwarzova-Peckova K.: *Electrochem. Commun.* *86*, 99 (2018).
12. Hosokawa Y. Y., Hakamata H., Murakami T., Aoyagi S., Kuroda M., Mimaki Y., Ito A., Morosawa S., Kusu F.: *Electrochim. Acta* *54*, 6412 (2009).

## Comparison of Plasma and Electrochemical Surface Rehydrogenation of Single-Crystal Boron-doped Diamond Electrodes (Porovnání plazmatické a elektrochemické rehydrogenace povrchu monokrystalických borem dopovaných diamantových elektrod)

Peter Čambal<sup>a</sup>, Simona Baluchová<sup>a</sup>, Karolina Schwarzová-Pecková<sup>a</sup>, Andrew Taylor<sup>b</sup>, Jan Fischer<sup>a</sup>, Luděk Mika<sup>c</sup>, and Vincent Mortet<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 6, 128 00 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, Czech Republic

<sup>c</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Chemistry Education, Albertov 6, 128 00 Prague 2, Czech Republic

### Abstract

Studies on single-crystal boron-doped diamonds (SC-BDDs) and their utilization as an electrode material are rare and focuses mainly on {111}, {110} and {100}-oriented surfaces. In this work, comparison of electrochemical behavior of {113}, {115} and {118}-oriented SC-BDDs deposited at B/C ratios of 250 – 2000 ppm, leading to boron concentrations in the solid from  $4 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$  up to  $1 \times 10^{21} \text{ cm}^{-3}$ , has been performed after exposure to hydrogen plasma and electrochemical rehydrogenation of O-terminated surfaces. In general, electrochemical rehydrogenation was more effective in comparison with the hydrogen plasma option. Further, the time stability of H-terminated surfaces in air examined using {113}-oriented SC-BDD electrodes with the lowest and the highest concentration of boron was investigated. The results were obtained by cyclic voltammetry using inner sphere (surface sensitive) redox markers.

**Keywords:** Cyclic voltammetry, Dopamine, Rehydrogenation, Single-crystal boron-doped diamond electrodes.

### Úvod

Borem dopovaný diamant (BDD) se často používá v elektroanalytické chemii jako elektrodový materiál díky výjimečným vlastnostem, mezi které patří široké potenciálové okno, nižší proud pozadí, odolnost vůči pasivaci, biokompatibilita a další<sup>1</sup>. Finální vlastnosti BDD elektrod závisí zejména na obsahu boru v diamantovém filmu, obsahu sp<sup>2</sup>-hybridizovaného (nediamantového) uhlíku a terminaci (H- vs. O-) povrchu. BDD je také vhodným substrátem pro různé modifikace povrchu, vedoucí k vylepšení jeho vlastností a možnosti konstrukce biosenzorů<sup>2</sup>.

Monokrystalické (single-crystal BDD (SC-BDD)) zatím byly velmi omezeně studovány. Elektrochemická data byla naměřena zejména pro elektrody s krystalovou orientací {111}, {110} a {100}<sup>3</sup>. Na rozdíl od polykrystalických BDD, kdy se jako nukleační centra používají nanočástice diamantu, u SC-BDD je jako substrát použit monokrystal diamantu s povrchem vyleštěným do jedné krystalografické roviny. Bylo zjištěno, že množství inkorporovaného boru závisí na krystalové orientaci<sup>4</sup>, přičemž nejvíce boru se inkorporuje při orientaci {113} a nejméně při orientaci {118}, což má významný vliv na elektrochemické chování těchto elektrod. V této práci bylo studováno dvanáct SC-BDD elektrod připravených technikou chemické depozice par, které se liší (i) krystalovou orientací {113}, {115} a {118} a (ii) koncentrací boru od  $4 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$  do  $1 \times 10^{21} \text{ cm}^{-3}$  (B/C poměr při depozici 250 ppm – 2000 ppm). Jejich povrch byl upravený na O-terminovaný pomocí horké směsi kyseliny sírové a dusičnanu draselného a následně ozonu, poté byla provedena elektrochemická oxidace.

Cílem práce bylo obnovit H-terminovaný povrch u všech studovaných O-terminovaných SC-BDD elektrod a prozkoumat jeho stabilitu u filmů s nižší i vyšší koncentrací boru. Byla porovnávána rehydrogenace povrchu pomocí vodíkového plazmatu a elektrochemická rehydrogenace katodickou polarizací konstantním záporným proudem.

### Experimentální část

Studované SC-BDD elektrody byly vyrobeny technikou chemické depozice par na substrát – syntetické diamantové krystaly vyleštěné do vicinálních krystalografických rovin pod správnými úhly ( $10^\circ$  pro {118},  $15,8^\circ$  pro {115} a  $25,2^\circ$  pro {113})<sup>4</sup>. Nově připravené SC-BDD byly H-terminované (H-t), následně byl jejich povrch převeden na O-terminovaný (O-t) pomocí horké směsi kyseliny sírové a dusičnanu draselného a následně ozonu. Další oxidace byla provedena elektrochemicky (+2,4 V, 10 min,  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  kyselina sírová, povrch O-t, AA). Všechny tři povrchy (H-t, O-t, O-t, AA) byly charakterizovány pomocí cyklických voltogramů redoxních markerů ( $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  hexakynoželeznan draselný v  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  chloridu draselném a  $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$  dopamin v  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfátovém pufru (pH = 7,40)). Dále byla provedena rehydrogenace povrchu pomocí vodíkového plazmatu po dobu 60 min (Re-HP<sub>60 min</sub>) a při druhém pokusu 90 min, tj. celkový čas rehydrogenace 150 min (Re-HP<sub>150 min</sub>). Jako poslední byla provedena elektrochemická rehydrogenace povrchu (Re-elch.). Při této rehydrogenaci v prostředí  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  kyseliny sírové byl používán konstantní proud  $-20 \text{ mA}$ , resp. proudová hustota asi  $0,5 \text{ A cm}^{-2}$ . Rehydrogenace probíhala vždy v časových intervalech (1 min intervaly pro SC-BDD s krystalovou orientací {113} a {115}, resp. 5 min pro {118}) až do bodu, kdy byl rozdíl potenciálů anodického a katodického píku obou markerů ( $\Delta E_p$ ) konstantní (měřeno pomocí cyklické voltametrie).

Při hodnocení stability H-terminovaného povrchu u filmů s krystalovou orientací {113} a rozdílnou koncentrací boru ( $1,0 \times 10^{20} \text{ cm}^{-3}$  a  $1,1 \times 10^{21} \text{ cm}^{-3}$ ) byly vždy po určitém počtu dnů změřeny cyklické voltogramy redoxních markerů citlivých ke stavu povrchu ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , dopamin / dopamin-o-chinon).

Chemikálie použité k přípravě roztoků redoxních markerů (hexakynoželeznan draselný, dopamin, Sigma-Aldrich) byly vysoké čistoty. Ostatní chemikálie byly analytické čistoty: chlorid draselný (Lach-Ner, Neratovice), dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner) a kyselina sírová (Lach-Ner).

K měření cyklických voltogramů byl používán potenciostat Autolab (Metrohm, ČR) řízený pomocí softwaru Nova (verze 2.1) a tříelektrodový systém s pracovní (SC-BDD), referenční (Ag/AgCl,  $3 \text{ mol dm}^{-3}$  KCl) a pomocnou (Pt) elektrodou. Při přípravě fosfátového pufru byl používán pH metr Jenway 3510 s kombinovanou skleněnou elektrodou.

### Výsledky a diskuse

U všech studovaných SC-BDD elektrod byl nejprve porovnáván rozdíl potenciálů anodického a katodického píku  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ( $\Delta E_p$ ) pro různé stavy povrchu: původní H-terminovaný (H-t), O-terminovaný (O-t) a O-terminovaný po anodické aktivaci (O-t, AA). Výsledky pro elektrody s krystalovou orientací {113}, {115} a {118} deponované při B/C = 2000 ppm jsou shrnuty v Tabulce I. Je evidentní, že elektrochemická oxidace je účinnější než kombinovaná oxidace v kyselině / ozonovém plazmatu a dochází k nárůstu  $\Delta E_p$ . Tentýž trend byl pozorován pro dopamin. Následně byla provedena rehydrogenace pomocí vodíkového plazmatu po dobu 60 min + 90 min. Postup byl opakován, z důvodu nízké účinnosti, jak je zřejmé z hodnot  $\Delta E_p$  pro  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  v Tabulce I. Byly vysledovány následující trendy: (i) u elektrod



s krystalovou orientací {113} rostla účinnost rehydrogenace s rostoucí koncentrací boru, (ii) u elektrod s krystalovou orientací {115} byl pozorován posun  $\Delta E_p$  k nižším hodnotám v případě  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , nikoliv však u dopaminu.

Naopak elektrochemická rehydrogenace povrchu byla úspěšná u všech studovaných SC-BDD elektrod. U elektrod s krystalovou orientací {118} byl tento způsob rehydrogenace nejméně účinný a rehydrogenace trvala výrazně delší dobu (celková doba elektrochemické rehydrogenace až 40 min) než v případě elektrod s krystalovou orientací {113} a {115} (2 až 3 min). Katodický pik byl v některých případech nevyhodnotitelný, proto je uvedený pouze potenciál anodického piků ( $E_{p,A}$ ).

### Tabulka I.

Naměřené hodnoty  $\Delta E_p$  pro  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  při různých stavech povrchu: původní H-terminovaný (H-t), O-terminovaný (O-t), O-terminovaný po anodické aktivaci (O-t, AA), po rehydrogenaci pomocí vodíkového plazmatu po dobu 60 min (Re-HP<sub>60 min</sub>) a následně 90 min (Re-HP<sub>150 min</sub>) a po elektrochemické rehydrogenaci (Re-elch).

SC-BDD	[B]/at. cm <sup>-3</sup>	$\Delta E_p$ / mV $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$					
		H-t	O-t	O-t, AA	Re-HP <sub>60 min</sub>	Re-HP <sub>150 min</sub>	Re-elch.
113C	$1,1 \times 10^{21}$	<b>88</b>	96	127	271	168	<b>85</b>
115C	$8,5 \times 10^{20}$	<b>78</b>	110	149	367	207	<b>74</b>
118C	$6,2 \times 10^{19}$	<b>100</b>	137	129	$E_{p,A}$ 581	$E_{p,A}$ 589	<b>101</b>

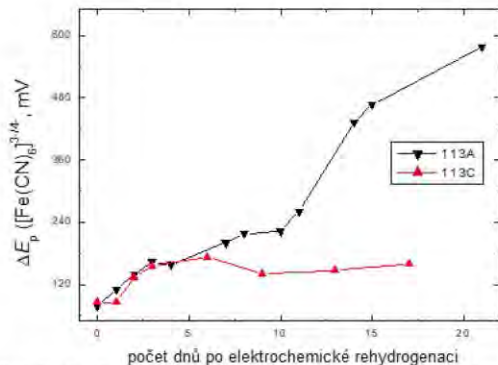
Následně byla u SC-BDD elektrod s krystalovou orientací {113} a koncentrací boru  $1,0 \times 10^{20}$  cm<sup>-3</sup> (113A, nejméně dopovaná) a  $1,1 \times 10^{21}$  cm<sup>-3</sup> (113C, nejvíce dopovaná) studována stabilita H-terminovaného povrchu na vzduchu po dobu dvaceti dnů. Z obr. 1 lze usoudit, že při nižší koncentraci boru dochází k poměrně rychlé oxidaci povrchu, jak je zřejmé z nárůstu  $\Delta E_p$  pro  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Na druhou stranu při vyšší koncentraci boru dochází k částečné oxidaci povrchu po několika prvních dnech a dále se stav povrchu již významně nemění. Toto pozorování je v souladu s chováním polykrystalických BDD filmů<sup>5,6,7</sup>. Experiment bude proveden i pro další vybrané SC-BDD elektrody.

### Závěr

Elektrochemická rehydrogenace H-terminovaného povrchu byla, na rozdíl od rehydrogenace pomocí vodíkového plazmatu, u všech studovaných SC-BDD elektrod úspěšná. Největší účinnost rehydrogenace povrchu byla dosažena u SC-BDD elektrod s krystalovou orientací {113} a {115}. U SC-BDD elektrod s krystalovou orientací {118} byla účinnost naopak nejhorší a rehydrogenace povrchu trvala nejdéle. Tento jev zřejmě souvisí s nižším obsahem boru u těchto elektrod v porovnání s {113} a {115} SC-BDD.

Bylo pozorováno, že SC-BDD elektroda s nižší koncentrací boru (113A) je náchylnější k spontánní oxidaci na vzduchu než elektroda s ca o 1 řád vyšším obsahem boru (113C), a dochází k výraznému zpomalení kinetiky elektronového přenosu pro  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , což je v souladu s dalšími pracemi provedenými na polykrystalických BDD filmech o rozdílné úrovni dopování<sup>5,6,7</sup>.

Výsledek je však založený na pouze jednom experimentu se dvěma SC-BDD elektrodami s krystalovou orientací {113} a bude proveden znovu i pro další vybrané SC-BDD elektrody.



**Obr. 1.** Závislost  $\Delta E_p$  pro  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ( $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) na čase uplynulém od elektrochemické rehydrogenace. Měřeno cyklickou voltametrií na SC-BDD (113) deponovaných při B/C = 250 ppm (113A) a 2000 ppm (113C).

#### Acknowledgments

This research has been supported by the Specific University Research (SVV 260560) and the Czech Science Foundation (project No. 20-031878).

#### References

- Balučová S., Daňhel A., Dejmková H., Ostatná V., Fojta M., Schwarzová-Pecková K.: *Anal. Chim. Acta.*, *1077*, 30-66 (2019).
- Szuneritz S., Nebel C. E., Hamers R. J.: *MRS Bull.*, *39*, 517-524 (2014).
- Pleskov Yu. V., Evstefeeva Yu. E., Krotova M. D., Varnin V. P., Teremetskaya I. G.: *J. Electroanal. Chem.*, *595*, 168-174 (2006).
- Taylor A., Balučová S., Fekete I., Klimša L., Kopeček J., Šimek D., Vondráček M., Mika L., Fischer J., Schwarzová-Pecková K., Mortet V.: *Diam. Relat. Mater.*, *123*, 108815 (2022).
- Salazar-Banda G. R., Andrade L. S., Nascente P. A. P., Pizani P. S., Rocha-Filho R. C., Avaca L. A.: *Electrochim. Acta*, *51*, 4612-4619 (2006).
- Balučová S., Taylor A., Mortet V., Sedláková S., Klimša L., Kopeček J., Hak O., Schwarzová-Pecková K.: *Electrochim. Acta*, *377*, 135025 (2019).
- Schwarzová-Pecková K., Vosáhlavá J., Barek J., Šloufová I., Pavlova E., V. Petrák, Závazalová J.: *Electrochim. Acta*, *243*, 170-182 (2017).

## Peptide-membrane Interaction Studied by Electrochemical Techniques

Martina Čierna <sup>a</sup>, Lucia Birošová <sup>b</sup>, Olívia Dakošová <sup>c</sup>, and Miroslav Gál <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University, Kateřinská 32, 12108 Praha 2, Czech Republic

<sup>b</sup>Institute of Biochemistry, microbiology and health protection, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia

<sup>c</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

### Abstract

*E. coli*, a gram-negative rod-shaped bacterium, is an important component of the mammalian intestinal microflora. Partial aim of this work was to identify  $\beta$ -galactosidase enzyme as one of the possible factors characterizing disintegration of bacterial membrane. The interaction of bacterial membrane with oligopeptide cathelicidin LL-37 and microwave radiation were studied using electrochemical methods. In the investigation of structural changes in the bacterial membrane, square-wave voltammetry and chronopotentiometric analysis at mercury electrode were used. UV/VIS spectrophotometry was used to indirectly track changes in bacterial cell structure.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Peptide interaction, Square-wave voltamperometry, Chronopotentiometric stripping analysis.

### Introduction

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

The aim of this contribution was to study the interaction of bacterial membrane with antimicrobial peptide by physico-chemical techniques. Cyclic voltammetry, square-wave voltammetry (SWV), and chronopotentiometric stripping analysis (CPSA) were used in order to examine the possible membrane interaction of two *E. coli* bacterial strains with antimicrobial peptide and microwave irradiation. Partial aim of this work was to identify  $\beta$ -galactosidase enzyme as one of the possible factors characterizing disintegration of bacterial membrane. UV/VIS spectrophotometry was also used to indirectly confirm changes in bacterial cell structure.

### Experimental

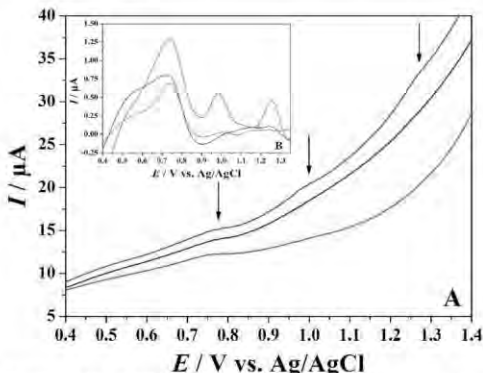
Two bacterial strains, *Escherichia coli* CCM3988 and *Escherichia coli* ML-35p, were studied. The cultivation process and  $\beta$ -galactosidase detection is in more details described in our previous reports<sup>3,4</sup>.

All electrochemical measurements were performed under semi-sterile conditions in a 6 mL degassed phosphate buffer solution. A platinum wire electrode and a 3M KCl solution saturated Ag/AgCl electrode were used as an auxiliary electrode (AE) and a reference electrode (RE), respectively. Two types of working electrodes (WE) were used, a hanging mercury drop electrode (HMDE WK2) and a glassy carbon electrode. Chronoamperometry served as a tool for electrochemical activation of the polished electrode, which was immersed in the supporting electrolyte of degassed phosphate buffer solution. Stepped potential of 1.7 V was applied to the graphite electrode for 90 s and the current was monitored as a function of time<sup>4</sup>.

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

### Results and discussion

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



**Fig. 1.** (A) SWV of *E. coli* CCM3988 strain accumulated on GCE after exposure to microwave radiation. (B) SWV after subtracting the baseline. Blue curve illustrates the supporting electrolyte (PB). Green curve represents native cells and red curve represents the effect of microwave radiation on bacterial cells. SWV parameters: start potential 0.3 V (electrode polarization for 300 s), stop potential 1.6 V, modulation amplitude 0.02 mV, frequency 75 Hz, step 5 mV<sup>-1</sup>.

Square-wave voltammograms of *E. coli* strain before and after exposure to cathelicidine LL-37 clearly show<sup>4</sup> the strong interaction between this oligopeptide and bacterial membrane. Based on the information in figures recorded during measurements it can be deduced that cathelicidin LL-37 has a strong impact on *E. coli* membrane. After addition of this antimicrobial peptide to the solution with *E. coli* strains clear differences on SW voltammograms observed. Very similar observation can be made after microwave irradiation<sup>3,4</sup>. All these data confirm that antimicrobial peptides are potential disruptors of several bacterial membranes. Based on our measurements and the available literature, we can conclude that the nature of these interactions lies in the charge interaction between the peptide and the membrane.

### Conclusion

It can be concluded that the cathelicidin LL-37 and microwave radiation have a significant effect on the electrochemical signal provided. In SWV, the curves representing the native form of the *E. coli* bacteria, in addition to the background peaks, exhibit two other peaks in the area of high positive potentials versus RE probably corresponding to oxidation of OH groups on bacterial membrane structures. The disappearance of these peaks in bacteria that have been exposed to the antimicrobial effect of cathelicidin or microwave radiation could be a result of a change in membrane structure. Differences observed on graphite electrodes between intact bacteria cells and cells with disrupted bacterial membrane due to microwave radiation are of different nature than due to LL-37 exposure<sup>3,4</sup>.

### Acknowledgments

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

### References

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

## Electrochemical Detection of Biologically Active Substances using a 3-D Printed Flow Cell

Olívia Dakošová, Miroslav Gál, Eva Melníková

Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology,  
Department of Inorganic Technologies and Materials, Radlinského 9, 812 37 Bratislava,  
Slovak Republic, E-mail: olivia.dakosova@stuba.sk

### Abstract

This work focuses on the voltammetric determination of ciprofloxacin in a 3-D printed flow cell using a boron-doped diamond electrode. Due to the incomplete degradation of these antibiotics in the host organism, they get excreted in urine and feces and subsequently reach the wastewater treatment plant, causing an increase in the concentration of antibiotic-resistant bacteria. So far there is no report on the determination of this antibiotic in the flow system. For this reason, in this work, we observed the effect of the flow regime, which turned out to be significant.

**Keywords:** Ciprofloxacin; Voltammetry; Flow cell; Wastewater; BDD electrode

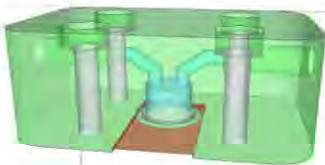
### Introduction

Various contaminants enter the municipal wastewater, including antibiotics, which are not completely degraded in the host organism and are excreted in urine and feces. It has been proved by several studies, that the wastewater treatment plants (WWTPs) are not efficient in removing various pharmaceuticals, which causes their increasing presence in the effluent wastewater.<sup>1</sup> The subinhibitory concentration of antibiotics affects the microbiota selectively, because of which mutations of bacterial DNA can occur, leading to antibiotic resistance.<sup>2</sup> Since water serves as a connection between the main reservoirs – humans, animals, and soil, through which microbial resistance can spread, it is important to understand the distribution of antibiotic resistant bacteria.<sup>3</sup> It would be ideal to deploy an online monitoring device in the wastewater treatment plant, with the help of which we could measure the concentration of not only antibiotics, but also other environmentally harmful substances. This study focuses on the determination of biologically active substances in the flow system. To achieve accurate results, the measurements were carried out in a 3D printed electrochemical flow cell.

### Experimental

In the work a 0.05M PBS, ciprofloxacin of various concentrations (both supplied by Merck), effluent wastewater sample (WWTP Trnava, Slovakia) and river water sample (Červené Pleso, Slovakia) were used. The electrochemical measurements were performed using an Autolab PGSTAT 302N potentiostat (Metrohm, Switzerland) controlled by NOVA 2.1 (Metrohm, Switzerland). The voltametric studies were carried out using a screen-printed electrode, which represents the three-electrode system, with BDD electrode as the working and counter electrode and Ag/AgCl as the reference electrode.

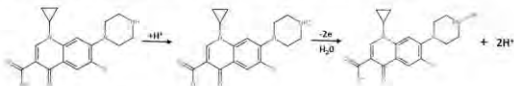
The measurements took place in an electrochemical flow cell, which was designed to imitate the real sewage system. The flow cell includes a chamber for the screen-printed electrode and an inflow and outflow opening, which are connected through a peristaltic pump Helago PCD1031 by tubes (Fig. 1). The printing itself was carried out using an FDM 3D printer.



**Fig. 1.** 3D model of the electrochemical flow cell used in the measurements.

### Results and discussion

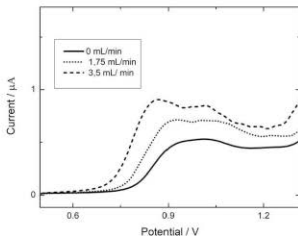
The redox behavior of ciprofloxacin (CIP) was studied by cyclic voltammetry (CV) and square wave voltammetry (SWV) in three different matrices: 0.05M PBS, effluent wastewater sample and river water sample using a screen-printed BDD electrode. Voltammograms of all studied matrices were characterized by two, irreversible oxidation peaks. This phenomenon was more visible in the case of the flow regime, compared to the non-flow regime. By analyzing the cyclic voltammograms we confirmed that the process of oxidation can be divided into two steps and that a chemical-electrochemical (CE) oxidation mechanism occurs. (Fig.2)



**Fig. 2.** Oxidation mechanism of ciprofloxacin.

Another important finding was that the position of individual peaks depends on the environment in which ciprofloxacin was studied. The results indicate that the effluent wastewater serves as a good electrolyte for the determination of ciprofloxacin. On the other hand, in the case of the river water sample, only very low and hardly detectable peaks were observed, probably due to its low conductivity.

Most importantly, the aim of this research was to observe the effect of flow regime. Fig.3 shows that with an increasing flow rate, the oxidation peak current in the case of both peaks increases as well. Moreover, with an increasing flow rate the peak potential of the 1<sup>st</sup> peak shifted to more negative values. As we can see on Fig.3, the effect of the flow rate on the electrochemical behavior of CIP is significant. By ignoring the effect of flow regime and by applying equations describing stationary solutions instead of a flow system, we could get false result.



**Fig. 3.** SW voltammograms of 50  $\mu\text{M}$  CIP in effluent wastewater at different flow rates ( $f = 10$  Hz,  $a = 10$  mV,  $E_{\text{STEP}} = 5$  mV).

### Conclusion

In this study, we focused on the determination of ciprofloxacin in a flow system, which was never studied before. For the measurements, we used an electrochemical flow cell, which simulated the real sewage system. The results clearly showed that the flow regime has a significant influence on the electrochemical behavior of ciprofloxacin. Therefore, in the case of the measurements that take place directly in the effluent wastewater, the effect of the flow regime must be considered. In order to deploy an online monitoring device, which could measure the concentration of antibiotics and other environmentally harmful substances directly in the sewage system, this finding is really important.

### Acknowledgments

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under contract No. APVV-17-0149.

### References

1. Mackulak T., et al.: *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 26, 31812 (2019).
2. Lepesova K., Mackul'ak T., Birosova L.: *Chem. Listy* 111, 374 (2017).
3. Maal-Bared R., Bartlett K. H., Bowie W. R., Hall E. R.: *Sci. Total Environ.* 443, 315 (2013).



## Electrochemical Detection of Oligonucleotide Structural Changes (Elektrochemická detekce strukturálních změn oligonukleotidů)

Aleš Daňhel, Ondřej Chytrý, and Miroslav Fojta

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

### Abstract

Secondary structures of nucleic acids (NAs) play important roles in their biological functions and stability. The possibility to study structural changes of NAs secondary structures using electroanalytical methods still remain challenging task. Discovery of electrochemical reducibility of NAs on basal-plane pyrolytic graphite electrode (bPGE) opened new possibilities for electroanalysis of NAs on negatively and positively charge surfaces. Here in, structural changes between non-canonical guanine quadruplex (G4) and single-strand (ss-) forms of model oligodeoxynucleotides (ODN) were studied by adsorptive transfer stripping linear scan voltammetry (AdTS-LSV). Parameters, such as constitution of the electrolyte and composition and ionic strength of the solution, from which the ODN is adsorbed on bPGE, together with ODN's concentration and adsorption time have been optimized. Deeper understanding of the electrochemical behavior of G4 and ss-ODN forms adsorbed on bPGE is essential for its further application in detection of NAs' structural changes.

**Keywords:** electrochemistry, guanine quadruplex, pyrolytic graphite electrode, non-canonical secondary structure, voltammetry.

### Introduction

Next to the well-known canonical double helix, DNA molecules are known to adopt alternative stable secondary structures. Among them, guanin quadruplexes (G4) are formed by tracts of several consecutive guanines. Four guanines are bound together through Hoogsteen hydrogen bonds, forming planar G-tetrads that stack on each other by  $\pi$ - $\pi$  stacking. An essential factor in the stability of G4 is the presence of monovalent cations ( $K^+ > Na^+ > NH_4^+$ ) occupying central cavities between two adjacent tetrads, with  $K^+$  generally providing the best stabilizing effect<sup>1</sup>. G4s play a significant role in biological processes of the *eukaryotic* and *prokaryotic* cells (regulation, transcription and translation)<sup>2</sup>. In genomic DNA, putative G4 forming sequences are overrepresented in functionally important regions, namely regulatory regions including gene promoters, and telomeres. Recently, G4s have been reported to be formed in higher quantities in cancer cells compared to normal cells, what makes them perspective targets in cancer treatment<sup>1</sup>.

In this work, we have studied the adsorption of ODNs, non-labelled and fluorescently labelled, on bPGE by adsorptive transfer stripping linear scan voltammetry (AdTS-LSV) and moreover optimized the adsorption conditions with the aim to distinguish between G4 form and ssODN structures.

### Experimental

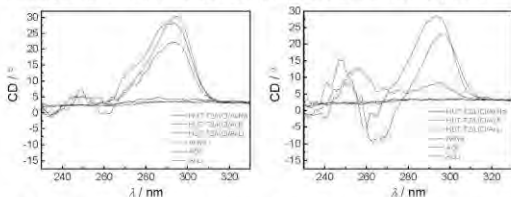
Voltammetric experiments were carried out by potentiostat Autolab 302N (Metrohm-Autolab) connected with VA Stand 663 in three-electrode setup including: bPGE (Danhle MEM 2021) (O.D. 3 mm, PGE supplied by Momentive, USA, preparation is described in Ref. <sup>3</sup>) as working electrode, platinum rod as counter electrode and Ag/AgCl/3M KCl as reference electrode (both Metrohm-Autolab). The electrode was briefly polished by twisting it on a paper towel and

peeling off 5–7-times using adhesive tape (Tesa). Immediately afterwards, ODNs were adsorbed at the PGE surface from 3  $\mu\text{L}$  aliquots of ODN containing specific amount of the salt ( $\text{K}^+$  or  $\text{Li}^+$ ) during adsorption time (*tab.*) 0–300 s. The electrode was then rinsed in distilled water ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) (other solutions did not influenced the results significantly) and placed into the electrochemical cell containing blank background electrolyte (0.2 M lithium/potassium/sodium acetate buffer pH 5.0). Oxygen was removed from the solution by 5 min passing a stream of argon (5.0 grade, SIAD) saturated with vapors of double distilled water in all voltammetric experiments. All the measurements were carried out at room temperature 25°C. Voltammograms were registered by multiple linear scan voltammetry (LSV) with scan rate 1 V/s, potential step 2.4 mV. A moving average (window size 1) was used for baseline correction<sup>3</sup>. CD spectra were measured by CD spectrometer (JASCO, USA) at 20°C.

ODNs: HUT-T2 ( $5'-(\text{AGG GTT})_3 \text{ AGG G-3}'$ ); HUT-T2-TAMRA ( $5'-(\text{AGG GTT})_3 \text{ AGG G-TAMRA}$ ); F-26 (Fluorescein-T TTT ( $(\text{AGG GTT})_3 \text{ AGG G-3}'$ ); and non-G4 forming 4BASII ( $5'-\text{CTAGCA TGA GCT CAG TCC CAT GCC GCC CAT G-3}'$ ), were purchased from Merck. Other chemicals were at least p.a. purity and purchased from Sigma-Aldrich. All the solutions and electrolytes were prepared from  $\text{ddH}_2\text{O}$  produced by distilled apparatus (type 2004, GFL),

## Results and Discussion

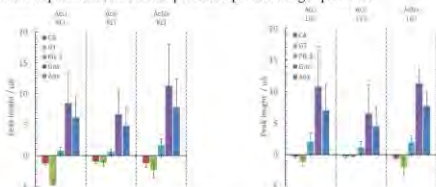
Since monovalent cations significantly influence formation of G4, all ODNs have been prepared in the 1 mM lithium phosphate buffer with 0.5 mM EDTA pH 7.0 with selected concentration of  $\text{Li}^+$  (not stabilizing G4 and keeping ss- form even for ODNs able to fold into the G4) and/or  $\text{K}^+$ , which strongly stabilizes G4 structure. Secondary structures of the ODNs in the selected solutions were confirmed by CD spectrometry, where typical signal at 290 nm appeared in the presence of G4. We have also studied a dilution and transfer effect of concentrated HUT-T2 in G4 and ss-, prepared in 0.3 M KCl and LiCl, respectively, after its dilution in electrolytes sodium-, potassium- and lithium acetates pH 5.0 (Fig. 1). What simulated transfer technique utilized during the voltammetric measurements. CD spectra confirmed, that once HUT-T2 is folded into G4, its 20-times dilution into the excess of other cations, does not influence its structure. On the other hand, when HUT-T2 was in ss- form in 0.3 M LiCl and 20-times diluted in 0.2 M lithium acetate buffer pH 5.0, ss-form prevails. However, it folded after the dilution in 0.2 M potassium- and sodium acetates pH 5.0,



**Fig 1.** CD spectra of 5  $\mu\text{M}$  HUT-T2 prepared as 100  $\mu\text{M}$  in 0.3 M KCl (left, G4) or 0.3 M LiCl (right, ss-) and 20-times diluted into 0.2 M sodium- (black), potassium- (blue) or lithium- (red) acetate buffer pH 5.0. Signals at 290 nm corresponds to the formation of G4 in the solution.

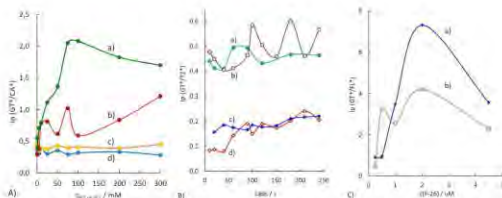
This effect was confirmed in the solution, but not in adsorbed state, when adsorbed ODN in G4 or ss- form is transferred into the acetate buffers. Thus, analogous experiments were carried out

including the voltammetric measurements of HUT-T2 with its cathodic reduction providing CA and GT signals, and anodic oxidation providing peak 3, and peaks  $G^{ox}$ ,  $A^{ox}$  (Fig. 2). While, anodic signals of HUT-T2 were similar without any significant difference between  $K^+$  and  $Li^+$ , cathodic peaks were found to be different in LiAc or KAc. In the respect of previous results of HUT-T2 dilution and possible structural changes, LiAc has been selected for further voltammetric experiments, since none post-adsorption folding is possible.



**Fig 2.** Evaluated peak heights of HUT-T2 (the same samples from Fig. 1) measured by AdST-LSV at bPGE using  $t_{ads} = 60$  s in 0.2 M potassium acetate (AcK) pH 5.0, scan rate 1 V/s.

During these experiments, we have found that resulting structural changes are also influenced by ionic strength of the solution from which ODN is being adsorb. The highest  $K^+$  or  $Li^+$  concentration caused folding of the HUT-T2 on the bPGE and resulting electrochemical signals were comparable and the concentration of  $K^+$  and  $Li^+$  had to be optimized (Fig. 3A).



**Fig 3.** Peak height ratio regulated to the number of presented bases or other redox centers ( $I_p(GT^*/X^*)$ ,  $X = CA, T2, F1$ ) in the studied ODNs: **A)** 5  $\mu M$  HUT-T2 (**a,b**) and 5  $\mu M$  4BASII (**c,d**) adsorbed 60 s on bPGE from 1 mM LiPh+0.5 mM EDTA pH 7.0 in dependence on concentration of presented KCl (**a,c**) or LiCl (**b,d**), measured by AdST-LSV in 0.2M AcK pH 5.0. **B)** 5  $\mu M$  4BASII (**a,b**) and 5  $\mu M$  HUT-T2-TAMRA (**c,d**) adsorbed on bPGE from 1 mM LiPh+0.5 mM EDTA pH 7.0+100 mM LiCl (**a,c**) or +100 mM KCl (**b,d**) in dependence on adsorption time (tads), measured by AdST-LSV in 0.2M AcLi pH 5.0. **C)** F-26 adsorbed on bPGE from 1 mM LiPh+0.5 mM EDTA pH 7.0+100 mM KCl (**a**) or +100 mM LiCl (**b**) in dependence on F-26 concentration (c(F-26)), measured by AdST-LSV in 0.2M AcLi pH 7.0, scan rate 1 V/s.

For better comparison, ratio of the peak currents regulated to the number of the bases in the ODNs were evaluated. Thus, deviation between the individual measurement caused by high variation of the bPGE surface morphology was eliminated. It is evident from the Fig. 3A, that significantly higher  $I_p(GT^*/CA^*)$  was observed in the case of HUT-T2 adsorption form  $K^+$  then  $Li^+$ , with significantly increasing ration from 0 to 100 mM KCl, due to stronger effect of  $K^+$  on the G4 stabilization and its adsorption on bPGE. Contrary, in the case of no-G4 forming sequence 4BASII, the ratio remains more or less constant and analogous in both  $K^+$  and  $Li^+$ . According to these results, 100 mM KCl and LiCl was used for further experiments, where an effect of the adsorption time (tads) has been studied. In this case 4BASII and HUT-T2 labelled by rhodamine derivative (TAMRA) have been used. In case of G4 forming sequence, significant differences were observed within the adsorption time from 5 to 60 s. The longer adsorption time probably leads to gradual unfolding of the G4 structure (Fig. 3B). Moreover concentration of the ODN has negative effect on the discrimination between the G4 and ss- forms, where concentration higher than 2  $\mu$ M of ODN caused gradual decrease of the  $I_p(GT^*/CA^*)$  ratio (Fig. 3C). Analogous results were observed also for the rest of the ODNs not shown above.

Thus, we have successfully optimized several parameters, which otherwise disabled successful study of ODNs' structural changes. More ODN structures will be studied in following research.

## Conclusion

Our systematic research revealed and optimized specific parameters which have to be taken into account during electroanalysis of ODNs adsorbed on bPGE. Thus, suitable electrolyte (0.2 M lithium acetate pH 5.0), concentration of the salts (lower than 100 mM), adsorption time (shorter than 60 s) and ODN concentration less than 2  $\mu$ M has to be used for successful studies of G4 and ss- structural changes.

## Acknowledgment

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

## References

1. Dobrovdsky D., Danhel A., Mothes-Martin E., Pratiel G., Mergny J.L., Fojta M.: *Electrochim. Acta.* 394, 139151 (2021).
2. Varshney D., Spiegel J., Zyner K., Tannahill D., Balasubramanian S.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21 (2021).
3. Danhel A., Fojta M.: *Mod. Electrochem. Methods XL* (Ed.: Schwarzova T. Navratil, M. Fojta), BEST Servis, Lenka Srsenová, Ústí nad Labem, Jetrichovice, Czech Republic, 2021, p. 47–50.
4. Spacek J., Danhel A., Hason S., Fojta M.: *Electrochem. Commun.* 82, 34 (2017).

## Principles of 3D Printing for the Application in the Electroanalytical Measurements (Základy 3D tisku pro aplikaci v elektroanalytických měřeních)

Hana Dejmková<sup>a</sup> and Luděk Míka<sup>b</sup>

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

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

### Abstract

This contribution introduces the basic information about 3D printing methods to electrochemists, to help them in the application of this fabrication method in their research. The principles of the main printing techniques are explained. Attention is paid to the structure of the resulting products, the chemical interaction of the printed items with common chemicals, and the possible combination of the printing materials.

**Keywords:** 3D printing, Polymers, Electrochemistry.

### Úvod

Výroba pomocí 3D tisku je stále častěji používanou technikou, protože jde o velmi efektivní a uživatelsky nenáročný způsob prototypování či malosériové výroby zejména drobných předmětů. Stranou tohoto trendu nezůstává ani elektrochemie; přitom zkušenosti s touto technikou jsou poměrně nepravidelně rozloženy. Tento příspěvek si proto klade za cíl seznámit zájemce s technikami, které 3D tisk používá, se specifiky, které tento postup výroby má, a omezení, která je nutno při používání této techniky respektovat.

### Tiskové techniky

*3D tisk používá tři hlavní, principiálně odlišné techniky pro vrstvení materiálů.*

Nejběžněji používaná technika je depozice tryskou, kdy se tiskový materiál v kapalně podobě nanáší na podklad v určeném vzoru; jeho ztuhnutím vzniká požadovaný předmět. Obvyklý způsob zkapalnění tiskového materiálu je roztavení, odpovídající technika se potom nazývá fused deposition modelling (FDM). Tavitelnost je tedy jeden z mála požadavků, kladených na materiál, což umožňuje používat mimo jiné širokou škálu polymerů, jakkoliv jejich zpracovatelnost může být různě obtížná – jako příklady používaných materiálů lze uvést kyselinu polymlečnou (PLA), akrylonitrilbutadienstyren (ABS), nylon či polypropylen.

Historicky nejstarší je skupina technik odvozená od stereolitografie (SLA). V tomto případě je kapalný polymerní prekursore osvětlován zářením o vhodné vlnové délce, které vyvolává polymerizační reakci. Tiskové materiály jsou tedy polymerní látky s radikálovou polymerizací, jako jsou akryláty, vinyl estery a epoxidové pryskyčky; k ovlivnění vlastností tiskového materiálu se obvykle používá vhodných směsí příslušných monomerů.

Třetí skupina technik vychází z práškového materiálu, který selektivně spéká. Oproti předchozím skupinám umožňuje i využití jinak obtížně zpracovatelných materiálů, například kovů, instrumentace pro tuto techniku je nicméně podstatně náročnější a její nasazení není úplně běžné. V dalším textu jí proto bude věnována pouze okrajová pozornost<sup>1-3</sup>.

### Vybrané vlastnosti 3D tištěných materiálů

#### *Struktura vytištěných předmětů*

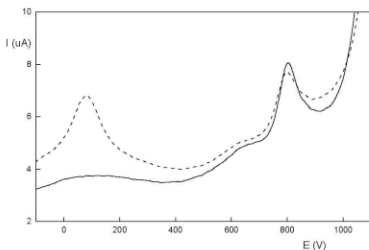
Všechny tiskové techniky nanášejí tištěný materiál ve vrstvách, vrstevnatost je tedy základní vlastností všech vytištěných předmětů; jakkoliv může být tloušťka vrstev i poměrně malá.

Složitější tvary navíc vyžadují při tisku podporu převislých částí. Výsledný vytištěný předmět proto obvykle vyžaduje dodatečnou povrchovou úpravu, spočívající v odstranění přebytečných částí a případném zaleštění. Větší předměty obvykle nejsou tištěny plně, ale duté s vnitřními podpůrnými lamelami; důvodem není jen úspora materiálu, ale zejména předcházení komplikacím spojeným s velkými bloky materiálu (nepravidelné tuhnutí, vnitřní prnutí apod.).

### **Chemická odolnost**

Polymery, které tvoří drtivou většinu používaných tiskových materiálů, mají sklony interagovat s mnoha chemickými sloučeninami, včetně těch běžně používaných. Odhlédneme-li od tiskových materiálů rozpustných ve vodě, většina běžně používaných materiálů není stabilní v organických rozpouštědlech. Přímé naleptání až odmytí povrchové vrstvy je znakem zjevným, méně nápadně je značně obvyklé bobtnání vytištěných předmětů v důsledku pohlcování příslušného rozpouštědla, které vede k mechanickým deformacím a poškozením. Z anorganických elektrolytů představují obvykle největší problém roztoky hydroxidů.

Kontakt zejména s organickými rozpouštědly může způsobit vymývání chemických látek z polymerních struktur do roztoku, včetně látek elektrochemicky aktivních nebo naopak látek, které mohou interagovat s analyty sledovanými pomocí elektrochemických metod (Obr. 1). Tento fakt je zapotřebí mít na paměti zejména při méně obvyklých kombinacích materiálů a rozpouštědel.



**Obr. 1.** DP voltamogramy elektrolytu složeného z 1M KCl a MeOH (1:9, V/V) po 24 hodinách kontaktu s resinem Clear (plná čára) a téhož roztoku obsahujícího  $10^{-3}\text{M} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ . Elektroda ze skelného uhlíku, rychlost skenu 20 mV/s, šířka pulsu 100 ms, výška pulsu 50 mV.

### **Kompoziční materiály**

Vlastnosti základních tiskových materiálů lze ovlivnit příměsí vhodné pevné složky, jemně rozptýlené v polymerním materiálu – zdaleka nejobvyklejší je tento postup pro probarvení pomocí přidavku pigmentů. Přidavek pevné složky s vhodnými vlastnostmi může ovšem ovlivnit i jiné parametry tiskového materiálu – přidavek uhlíkové složky například zajistí elektrickou vodivost polymeru a přidavek skleněných částic zvýší chemickou odolnost. Tento postup ovšem má svá omezení, jelikož přidavek pevné složky ovlivňuje viskozitu tiskového

materiálu a není tedy možné ho libovolně zvyšovat. Problémem je rovněž sedimentace pevné složky s příliš vysokou hustotou.

V souvislosti s kombinacemi materiálů je rovněž vhodné si uvědomit rozdíl mezi FDM a SLA – zatímco první z technik používá jako zdroj polymeru tiskovou vanu a výsledný výtisk tedy musí být pouze z jednoho tiskového materiálu, druhá umožňuje střídáním trysek kombinovat v jednom výrobku více různých tiskových materiálů.

### **Závěr**

3D tisk je velmi progresivní technika s mnoha výhodami při operativní výrobě součástí pro mnoho oblastí lidské činnosti, elektroanalytické aplikace nevyjímaje. Chemické vlastnosti tiskových materiálů vyžadují ovšem opatrný přístup, respektující zejména omezení daná vlastnostmi použité tiskové techniky a interakcemi tiskových materiálů s různými chemickými sloučeninami.

### **Acknowledgments**

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

### **References**

1. Ambrosi A., Pumera, M.: *Chem. Soc. Rev.* *45*, 2740 (2016).
2. Kumar M.B., Sathiya P.: *Thin-Walled Struct.* *159*, 107228 (2021).
3. Alghamdi S.S., John S., Choudhury N.R., Dutta N.K.: *Polymers* *13*, 753 (2021).

## Electro-Fenton Oxidation of Industrial Waters using a Sacrificial Anode (Elektro-Fentonova oxidace průmyslových vod s využitím obětované anody)

Libor Dušek, Petr Herink, Ladislav Novotný, and Gabriela Kuchtová  
University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Institute of Environmental and  
Chemical Engineering, Studentská 95, 532 10 Pardubice, Czech Republic,  
E-mail: libor.dusek@upce.cz

### Abstract

The subject of our study involved the treatment of real process wastewater from the production of rayon fiber. During the annual monitoring of the production facility, we performed a mass balance of three problematic sources of process wastewater and analyzed them repeatedly. All three sources showed high values of COD = 0.4-30 g/L, TOC = 0.09-7.1 g/L and the concentration of  $Zn^{2+}$  0.09-0.5 g/L. At a total volume of 1.84 million  $m^3$ , this represents a significant pollution source for the Elbe River. At lab scale, we tested a combination of filtration, microfiltration and oxidation using the electro-Fenton reaction. Using an optimized technological sequence, we have achieved a COD reduction of up to 98 %, and TOC reduction of 85 % g/L. The method was verified at a pilot scale.

**Keywords:** Electro-Fenton reaction, Sacrificial electrode, Industrial Waters, Viscose Production.

### Úvod

Cílem této práce bylo ve spolupráci s firmou Glanzstoff Bohemia s.r.o. nalézt hlavní zdroje znečištění technologické vody, nalézt v laboratorním měřítku vhodný postup pro jejich čištění a tento postup ověřit v poloprodučním měřítku<sup>1</sup>. V rámci monitoringu podniku byly vytypovány 3 hlavní zdroje znečištění technologických vod. Prvním zdrojem, dále označovaným jako OV1, je odpadní technologická voda z oplachu vyrobeného viskózního vlákna<sup>2</sup>. Tato voda obsahuje zředěnou kyselinu sírovou (pH= 2-2,5), siran sodný, siran zinečnatý<sup>3</sup>. Ten způsobuje emise  $Zn^{2+}$  ionu v koncentracích mezi 90-190 mg/L. Dále voda OV1 obsahuje organické znečištění, vyjádřené hodnotou CHSK či TOC ve stovkách, respektive desítek mg/L. Průtok činí cca 190-220  $m^3/h$ , 4560-5280  $m^3/den$ . Roční produkce těchto vod představuje v závislosti na objemu výroby cca 5,027 milionů  $m^3$ .

Druhým zdrojem odpadních vod, dále označovaným jako OV2, je proplachová voda z regeneračního vymývání pískových filtrů, kterými prochází technologická voda OV1. OV2 je znečištěna siranem zinečnatým, kyselinou sírovou, zbytky celulózy, hemicelulózy a povrchově aktivních látek. Prací voda OV2 je před vstupem do iontoměniče odplyněna od rozpuštěného sirouhlíku a sirovodíku ( $CS_2$  a  $H_2S$  je katalyticky oxidován technologií SULFOX) a následně je filtrována na pískových filtrech. Z technologické podstaty zdroje těchto vod je zřejmé, že OV2 jsou produkovány diskontinuálně v periodicky navazujících 4 h cyklech během protiproudniho praní pískových filtrů. To následuje po cca po 80 h kontinuálního procesu filtrace OV1. Roční objem vod OV2 je cca 400  $m^3$ , CHSK se pohybuje v rozmezí 5-10 g/L, čemuž odpovídají i koncentrace organického uhlíku (TOC) v rozmezí 1-3 500 mg/L. Poměr  $BSK_5/CHSK=0,29$ , vypovídá o obtížnější biologické odbouratelnosti. Emise  $Zn^{2+}$  se vyskytují v koncentracích 100-200 mg/L.

Třetím významným zdrojem odpadních technologických vod v závodě Glanzstoff Bohemia s. r.o. jsou silně alkalické promývací vody OV3 z nápravné regenerace střídavě pracujících katexových filtrů. Ty jsou naplněné silně kyselým katexem Lewatit MonoPlus S108, pracujícím



v Na<sup>+</sup>-cyklu. Obvyklé regenerační cykly katexu probíhají po cca 10 h promýváním 10-14 % ním roztokem odpadního siranu sodného z výroby kalcinátu siranu sodného. Přibližně po 2 týdnech je povrch katexové náplně zanesen nerozpustným zbytkem viskózních vláken a kalu do té míry, že je nutné katex regenerovat 1 mol/L roztokem hydroxidu sodného (po průchodu náplní katexu OV3). Tento roztok je však připravován z vody již zatížené organickým znečištěním z uvedené technologie. To snižuje účinnost regenerace Na<sup>+</sup> ionu, a tedy i kapacitu katexu Lewatit MonoPlus S108. Objem OV3 během regeneračního cyklu je cca 20 m<sup>3</sup>, roční objem těchto vod činí tedy cca 500 m<sup>3</sup>. Pro OV3 jsou charakteristické hodnoty CHSK v rozmezí 12-30 g/L, těmto hodnotám odpovídají i koncentrace organického uhlíku TOC pohybující se v rozmezí 2,5-6 g/L. Zjištěný poměr BSK<sub>5</sub>/CHSK= 0,21, vypovídá o obtížné biologické odbouratelnosti. Emise Zn<sup>2+</sup> dosahují v OV3 koncentrací 100-500 mg/L.

### Experimentální část

Při všech laboratorních oxidačních experimentech byla použita voda předem přefiltrována přes 15 µm skleněnou fritu. V případě poloprovodních experimentů byla voda předem filtrována přes 10 µm potravní filtr. V laboratoři byl použit skleněný, magneticky míchaný 0,5 L duplikátor, temperovaný termostatem Julabo EH-5 na 25 °C.

Před elektro-Fentonovou reakcí<sup>4-6</sup> byla do reaktoru vložena obětovaná ocelová tyčová anoda z nízkouhlíkové konstrukční oceli třídy 11320 nebo nerezové austenitické oceli třídy AISI304 a ve vzdálenosti 20 mm tyčová titanová katoda. Elektrody s aktivní plochou 6 cm<sup>2</sup> byly připojeny na laboratorní zdroj DC Power Supply SDP-2210 (Manson, Kwai Chung, N.T., Hong Kong). Katodový a anodový prostor elektrolyzérů nebyl separován. Rychlost dávkování peroxidu vodíku byla konstantní a přizpůsobena rychlosti koroze obětované ocelové anody<sup>9</sup>, která probíhala za galvanostatických podmínek a byla řízena proudovou hustotou. Hmotnostní úbytek anody byl sledován gravimetricky. Množství peroxidu vodíku bylo vždy v 25 % molárním nadbytku, vypočteném z aktuální počáteční hodnoty CHSK příslušného vzorku čištěné vody. Pro hypotetický vzorek s CHSK = 1 g/L by objem obou činidel byl 7,965 mL. Doba dávkování činidel byla 6 h, (průtok byl volen s ohledem na celkový objem činidla) a ještě další 2 h byla oxidovaná voda míchána. Molární poměr H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:Fe<sup>2+</sup> byl během oxidace v případě oceli 11320 10±1:1, v případě anody z AISI304 byl tento poměr 100±2,5:1. Průběžně byla sledována časová změna vodivosti, teploty a pH a u vzorků byly analyzovány CHSK, TOC, TC, IC a TN. Kromě toho byl také pomocí ICP-AES stanovena koncentrace celkového zbylého železa, chromu, niklu a zinku.

### Výsledky a diskuse

Z průběžného ročního monitoringu a následně bilance výrobního provozu jsme zjistili, že odpadní technologická voda z oplachu vyrobeného viskózního vlákná OV1 je produkována nepřetržitě v průměrných denních objemech cca 4920 m<sup>3</sup>. Průměrná hodnota CHSK<sub>Cr</sub> = 422±32 mg/L vypočtená ze vzorků OV1-1 až OV1-3 představuje při roční produkci 1 796 mil. m<sup>3</sup> surové OV1 organické znečištění odpovídající cca 757.9 t CHSK<sub>Cr</sub> neboli 175,6 t organického uhlíku uvažujeme-li průměrnou hodnotu TOC=97,8±11,97 mg/L OV1-1 až OV1-3. Značná část tohoto znečištění přechází do pískových filtrů, které se regenerují cca 2x týdně 400 m<sup>3</sup> prací vody. To představuje cca 100 pracích cyklů/rok a produkci cca 40 000 m<sup>3</sup> OV2. Tento objem při průměrné hodnotě CHSK<sub>Cr</sub> = 10740±1319 mg/L představuje roční hodnotu organického znečištění CHSK<sub>Cr</sub>= 429,6 t. Tomu odpovídá 98,4 t organického uhlíku při průměrné hodnotě TOC=97,8±11,97 mg/L OV2-1 až OV2-3. Třetí diskontinuální odpadní proud technologických vod představují vody z nápravné regenerace katexových filtrů OV3 v ročním objemu cca 500 m<sup>3</sup>. Tomuto odpovídá při průměrné hodnotě CHSK<sub>Cr</sub>=

22 967±3981mg/L roční hodnota organického znečištění  $CHSK_{Cr} = 11,94$  t, neboli 2,9 t organického uhlíku, uvažujeme-li průměrnou hodnotu  $CHSK_{Cr} = 5776 \pm 869$  mg/L.

#### *Vliv filtrace a mikrofiltrace na organické znečištění odpadních technologických vod*

Účelem filtrační a mikrofiltrační předúpravy čistěných odpadních technologických vod OV1 – OV3 bylo především odstranění nerozpustných organických látek a tím pádem i snížení spotřeby oxidačního činidla a snížení s tím souvisejících nákladů. K předúpravě byly postupně použity filtry s porozitou 15  $\mu$ m, 5  $\mu$ m, 3  $\mu$ m, 1,2  $\mu$ m, 0,8  $\mu$ m, 0,45  $\mu$ m a 0,22  $\mu$ m. Základní filtrace OV1-1 přes 15  $\mu$ m filtr způsobila pokles CHSK o 9,39 % a TOC o 7,95 %. Následující filtrace přes 5  $\mu$ m filtr přispěla k celkovému poklesu CHSK o 13,38 %, respektive TOC o 21,20 %. Další snižování porozity filtrů na 3  $\mu$ m, 1,2  $\mu$ m, 0,8  $\mu$ m, 0,45  $\mu$ m a 0,22  $\mu$ m již prakticky nepřineslo další pokles těchto parametrů.

U OV-2-1 po filtraci přes 15  $\mu$ m filtr došlo k poklesu CHSK o 23,4 % a TOC o 8 %, následující filtrace přes 5  $\mu$ m filtr přispěla k celkovému poklesu CHSK o 37,1%, respektive TOC o 21,2 %. Postupné snižování porozity filtrů až na 0,22  $\mu$ m přineslo další pokles těchto parametrů až o 39 % respektive o 35,1 %. Poměr COD/TOC byl u vstupní vody OV2 roven 4,43 a po filtraci přes 0,22  $\mu$ m filtr pak klesl na hodnotu 4,16. Pro účinnou předúpravu eliminující cca 1/3 organického znečištění tedy naprosto dostačuje 5  $\mu$ m filtr. Předúprava silně alkalické OV-3 vyžadovala neutralizaci či lépe okyselení vstupní vody ředěnou kyselinou sírovou. Již po filtraci OV-3-1 přes 15  $\mu$ m filtr došlo k poklesu počáteční hodnoty CHSK = 28,5 g/L o 49,1 % a TOC o 50,1 %. Další snižování porozity filtrů až na 0,22  $\mu$ m již nepřineslo další významný pokles těchto parametrů.

#### *Vliv oxidace na odbourávání organického znečištění odpadních vod*

Elektro-Fentonova oxidace se ukázala jako účinný způsob eliminace organického znečištění u všech testovaných vzorků vod. Přihlédneme-li k počáteční hodnotě TOC, respektive poměru  $CHSK_{Cr}/TOC$  ze kterého lze určit hodnotu průměrného oxidačního čísla  $OX\check{C}^3$  ze vztahu 1):

$$OX\check{C} = 4 - 1,5 \frac{CHSK_{Cr}}{TOC} \quad 1)$$

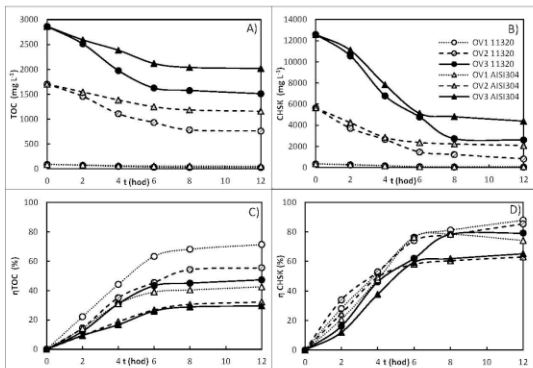
Poměr  $COD_{Cr}/TOC$  a hodnota  $OX\check{C}$  u OV1-F15 činí 5,06, respektive -3,59. Jde o hodnotu blízkou se maximálním teoretickým hodnotám nasycených uhlovodíků (maximální hodnota poměru  $COD_{Cr}/TOC$  je u metanu 5,34). Účinnosti elektrochemické oxidace u těchto vod  $\eta_{CHSK}$  respektive  $\eta_{TOC}$  <sup>7-8</sup>, vypočtené z hodnot chemické spotřeby kyslíku nebo koncentrací organického uhlíku podle vzorců 2) a 3):

$$\eta_{CHSK_{Cr}} = \frac{CHSK_0 - CHSK_t}{CHSK_0} \times 100\% \quad 2),$$

$$\eta_{TOC} = \frac{TOC_0 - TOC_t}{TOC_0} \times 100\% \quad 3).$$

Proces byl testován za použití nízkouhlíkové ocelové obětované anody <sup>9</sup> třídy 11320 a při poměru  $H_2O_2:Fe$  10:1, při předcházející úpravě pH na hodnotu 2,8. Anoda koroduje dostatečnou rychlostí již za nízké proudové hustoty  $i=15-25$  A/m<sup>2</sup>. V případě oxidovaných, filtrační předupravených vod, OV1-2 až OV2-3 to vedlo ke spotřebě elektrické energie 0,32-0,7 kWh/m<sup>3</sup> během 7 h oxidačního cyklu. Dalších 5 h bez dodávky elektriny, přidávaných k doreagování nadávkovaného peroxidu vodíku se již významně na poklesu CHSK ani TOC neprojevovalo, viz Obr. 4A a Obr. 4B. Po následné úpravě pH= 7,25-7,5 dochází k vysrážení hydroxidů železa a po jejich filtraci nepředstavuje koncentrace zbývajících železa <0,06 mg/L již ekologický ani technologický problém. Navíc nedochází oproti Fentonově reakci

dávkováním katalyzujícího  $\text{FeSO}_4$  k zvyšování zaslolení vlivem zanášení síranového iontu do čistěné vody. Současně při tomto srážení železa dochází i synergickému srážení  $\text{Zn}^{2+}$  iontu, jak dokázaly výsledky z ICP-AES analýz. Jeho koncentrace po vysrážení rovněž nepřesáhla koncentraci 1 mg/L. Účinnost elektro-Fentonovy oxidace  $\eta_{\text{CHSK}}$  se pohybovala v rozmezí 79-88 % a  $\eta_{\text{TOC}}$  47-71 %. To svědčí o tom, že mineralizace organických látek probíhá pouze parciálně. Obr. 4C a Obr. 4D. Náhraza nízkouhlikové ocelové obětované anody třídy 11320 anodou z austenitické nerezové oceli AISI304 vedla ke snížení korozní rychlosti a současně k poklesu molárního poměru peroxidu vodíku/ $\text{Fe}^{2+}$  z poměru 10:1 na 100:1. Snížení koncentrace katalyzujícího  $\text{Fe}^{2+}$  ionu vedlo následně k cca 40-55%nímu poklesu rychlosti oxidace a adekvátnímu poklesu účinnosti  $\eta_{\text{COD}}$  a  $\eta_{\text{TOC}}$ , viz Obr. 4C a Obr. 4D.



**Obr. 4.** Časové závislosti poklesu A)TOC, B)CHSK a účinnost oxidace C)TOC,D)CHSK během elektro-Fentonové oxidace OV1-2, OV2-2 a OV3-2 za použití obětované anody z oceli 11320 a AISI304.

### Závěr

Laboratorní a poloprovodní testy s reálnými průmyslovými vodami z výroby viskózy poskytly cenná data pro optimalizaci technologie snižující hodnoty CHSK a TOC z vypouštěných odpadních vod. Jednoznačně se ukazuje výhodnost aplikace nízkouhlikových oceli zaručujících výhodný reakční poměr  $\text{H}_2\text{O}_2:\text{Fe} = 10:1$  za relativně nízkých proudových hustot  $i = 15-25 \text{ A/m}^2$ . Rýsuje se zde možnost využití např. ocelového odpadu či šrotu jako obětovaného anody s velkým specifickým povrchem, což by dále umožnilo snížení proudové hustoty a tedy i nároky na spotřebovanou energii. Současné provedení vyžaduje cca 0,32-0,7 kWh/m<sup>3</sup> na 7 h oxidační cyklu, během něhož bylo dosaženo poklesu CHSK o 79-88 % a TOC o 47-71 %.

### Acknowledgments

This research has been supported by the Student Grant Competition 2022 (SGS\_2022\_001), project SD373001/82/30352(2016) of the University Pardubice.

### References

1. Kočanová V., Cuhorka J., Dušek L., Mikulášek P.: *Desalin. Water Treat.* **75**, 342 (2017).
2. Urakami Masaya, Sasaki Tsutomu Treatment of viscose fiber-scouring waste waters, Treatment of viscose fiber-scouring waste waters, Japan, JP50052316 A 1975-05-09
3. P. Pitter, *Hydrochemic*, VŠCHT Praha, 5th edition, 2015, ISBN 978-80-7080-928-0, p. 389.
4. Yeber M.C., Rodriguez J., Freer J., Baeza J., Duran N., Mansilla H.D.: *Chemosphere* **39**, 167 (1999).
5. Brillas E.: *Chemosphere* **250**, 126198 (2020).
6. Wang Q., Pang W., Y. Mao Y., Sun Q., Zhang P., Ke Q., Yu H., Dai C., Zhao M.: *Water JI*, 207 (2019).
7. Brillas E., Martinez-Huitle C.A.: *App. Catal. B: Environ.* **166-167**, 603 (2015).
8. Roudi R.A., Chelliapan S., Wan Mohtar W.H.M.: *Water JI*, 595 (2018).
9. Kočanová V., Dušek L.: *Monatshefte Chemie* **147**, 935 (2016).

# Characterization of Boron-Doped Diamond on Titanium Substrate for Electrochemical Analysis

## (Charakterizace borem dopovaného diamantu na titanovém substrátu pro elektrochemickou analýzu)

Jan Fischer<sup>a</sup>, Barbora Semkovičová<sup>a</sup>, Petr Ashcheulov<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: jan.fischer@natur.cuni.cz

<sup>b</sup> FZU – Institute of Physics of the Czech Academy of Sciences, Na Slovance 1999/2, 182 21 Prague, Czech Republic

### Abstract

The behavior of a laboratory-prepared boron-doped diamond electrode on a titanium substrate (BDD-Ti electrode) was compared with a commercially produced boron-doped diamond (BDD) electrode on a silicon substrate. At the same time, the voltammetric behavior of bare titanium as a working electrode was also investigated. The electrodes were studied after polishing with an alumina suspension and anodic oxidation. The electrochemical characterization was performed by cyclic voltammetry of the redox marker  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  and subsequently, the analytical properties were compared using serotonin as a model analyte.

**Keywords:** Boron-doped diamond electrode, Titanium substrate, Voltammetry, Serotonin.

### Úvod

Elektrody z borem dopovaného diamantu využívané pro elektrochemické analýzy většinou bývají naneseny na křemíkovém nebo keramickém podkladu<sup>1</sup>. Toto uspořádání ale není příliš vhodné pro následnou mechanickou přípravu povrchu elektrod, omezuje také možnosti kontaktování elektroaktivní plochy a také tvar elektrod je nutné volit s ohledem na možnosti zpracování podkladu, který je poměrně křehký. Proto se jako atraktivní varianta pro podkladový materiál jeví titan, který je vodivý i snadno obrobitelný a pro který jsou vyvinuty postupy depozice borem dopovaného diamantu<sup>2-4</sup>. Předběžné experimenty také naznačují, že povrch titanu se stává po anodické oxidaci nevodivým, takže by mělo být možné snadno izolovat části povrchu senzoru nepokryté diamantem. V této práci byly studovány elektrochemické vlastnosti BDD deponovaného na titanovou tyč (BDD-Ti elektroda) a porovnávány s vlastnostmi titanové elektrody a komerční BDD elektrody připravené depozicí na křemík (BDD-Si).

### Experimentální část

Všechny používané chemikálie měly čistotu p.a. Přesná hodnota pH byla stanovována pomocí digitálního pH metru s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, Essen, UK). Měření byla prováděna na přístroji Eco-Tribo polarograf řízeném počítačovým programem PolarPro 5.1. (Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Při samotném měření bylo využíváno třielektrodové uspořádání – referenční argentchloridová elektroda ( $\text{Ag}|\text{AgCl}|3 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$ ), pomocná platinová elektroda (obě Monokrystaly Turnov, ČR) a pracovní komerční disková BDD elektroda (BDD-Si) od společnosti BioLogic SAS (Francie) nebo pracovní testovaná BDD-Ti elektroda, která byla připravena na Fyzikálním ústavu Akademie věd České republiky a jako substrát použit titanový váleček o průměru 3 mm. BDD vrstva byla syntetizována na jedné podstavě Ti váleček pomocí chemické depozice par s aktivací pomocí mikrovlnně generované plazmy (MW-LA-PECVD) ze směsi vodíku, methanu, trimethylboranu a oxidu uhličitého, přičemž teplota povrchu Ti byla udržována na cca 750 °C (cit. 5). Výsledná tloušťka povlaku BDD byla cca 400 nm. Průměr geometrické plochy elektrody u obou typů elektrod byl 3,0 mm ( $A = 7,07 \text{ mm}^2$ ). Anodicky

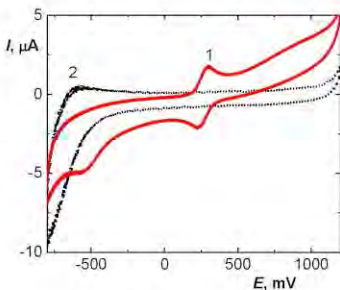
aktivovaný povrch byl připraven v samostatné měřicí cele v roztoku  $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  vložení vysokého aktivčního potenciálu  $E_{\text{akt}} = +2400 \text{ mV}$  za nepřetržitého míchání po dobu 20 min.

### Výsledky a diskuse

Pro ověření elektrochemických vlastností studovaných elektrod byly zaznamenány cyklické voltamogramy  $0,1 \text{ mol l}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  v prostředí  $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$ . Při porovnání s komerční BDD-Si elektrodou neposkytovala nemodifikovaná titanová elektroda žádný signál a BDD-Ti elektroda v neleštěném stavu poskytovala signál asi desetkrát menší. Po anodické oxidaci povrchu elektrod došlo u BDD-Ti elektrody k nárůstu signálu na podobnou úroveň jako u komerční BDD-Si elektrody, ale katodický pík byl hůře vyvinutý a rozdíl potenciálu katodického a anodického píku  $\Delta E_p$  vzrostl na více než 500 mV. Leštěním se signál BDD-Ti elektrody vrátil na předchozí pozici a mírně se snížil proud pozadí (Obr. 1). Z cyklických voltamogramů vyplývá, že BDD-Ti elektroda v obou variantách (tj. leštěná a anodicky aktivovaná) má vyšší proud pozadí a poskytuje menší signály oproti BDD elektrodám na křemikovém podkladu. Tato měření byla vždy provedena tak, aby v měřeném roztoku byla ponořena pouze část BDD-Ti elektrody kompletně pokrytá BDD (tj. čelo válce). Následně byly provedeny testy pro studium vlivu podkladového materiálu (tj. Ti nebo anodicky zoxidovaný Ti), pokud je exponován jako elektroda v měřeném roztoku (expozice pláště válce).

Odhalený titanový povrch BDD-Ti elektrody na plášti válce byl anodicky zoxidován a následně byl sledován vztah mezi voltametričtým signálem  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  a mírou ponoření elektrody do roztoku. Tato oxidace vede ke vzniku  $\text{Ti}_2\text{O}_3$ , který je prakticky elektricky nevodivý. S rostoucím podílem ponořeného zoxidovaného povrchu elektrody dochází jen k mírnému nárůstu signálu pozadí. Významný rozdíl nastává, je-li smočena i nezoxidovaná plocha titanu, kdy dochází ke značnému nárůstu proudu pozadí. Signál  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , který souvisí s konstantní plochou pokrytou BDD, se v rámci tohoto experimentu významně nemění. Pro zvýšení poměru signálu a šumu měření je tedy vhodné minimalizovat plochu zoxidovaného titanu v kontaktu s měřeným roztokem a vyhnout se kontaktu nezoxidovaného titanu a měřeného roztoku.

Po nalezeních těchto optimálních pracovních podmínek byla BDD-Ti po zoxidování a následném vyleštění použita pro získání kalibračních závislostí pro  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  v prostředí  $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$  a serotoninu v prostředí  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  fosfátového pufru (pH 7,0) pomocí diferenční pulzní voltametrie (mez stanovitelnosti (LOQ) pro oba analyty  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ ). Při porovnání s kalibračními závislostmi na komerční BDD-Si elektrodě (LOQ pro serotonin  $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ ) bylo na BDD-Ti elektrodě dosaženo vyšších mezí stanovitelnosti.



**Obr. 1.** Cyklický voltamogram  $0,1 \text{ mol l}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]\text{K}_4$  v prostředí  $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$ , měřené na BDD-Ti elektrodě po leštění (1) a cyklický voltamogram příslušného základního elektrolytu (2).

#### Závěr

BDD-Ti představuje použitelnou alternativu k běžně používaným BDD elektrodám. Její pozitivní vlastnosti jako flexibilita možných tvarů a snadná lešitelnost je však kompenzována sníženou citlivostí elektrody.

#### Acknowledgments

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

#### References

1. Baluchová S., Daňhel A., Dejmková H., Ostatná V., Fojta M., Schwarzová-Pecková K.: *Anal. Chim. Acta* *1077*, 30 (2019).
2. Pleskov Y. V., Evsteeva Y. E., Krotova M. D., Lim P. Y., Chu S. S., Račchenko V. G., Vlasov, II. Kononenko V. V., Varin V. P., Teremetskaya I. G., Shi H. C.: *Russ. J. Electrochem.* *41*, 337 (2005).
3. Lim P. Y., Lin F. Y., Shih H. C., Račchenko V. G., Varin V. P., Pleskov Y. V., Hsu S. F., Chou S. S., Hsu P. L.: *Thin Solid Films* *516*, 6125 (2008).
4. Sun J. R., Lu H. Y., Du L. L., Lin H. B., Li H. D.: *Appl. Surf. Sci.* *257*, 6667 (2011).
5. Ashcheulov P., Taylor A., Vlčková Živecová Z., Hubík P., Honolka J., Vondráček M., Remzová M., Kopeček J., Klíma L., Lorinčík J., Davydova M., Remeš Z., Kohout M., Beltran A. M., Mortet V.: *Appl. Mater. Today* *19*, 100633 (2020).

## Utilization of Screen-Printed Electrodes as Disposable Electrochemical Sensors

Lukáš Fojt<sup>a</sup>, Stanislav Hasoň<sup>a</sup>, Miroslav Kolíbal<sup>b,c</sup>, and Miroslav Fojta<sup>a</sup>

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

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

<sup>c</sup> CEITEC BUT, Brno University of Technology, Purkyňova 123, 612 00 Brno, Czech Republic.

### Abstract

Screen-printed electrodes are commonly used as disposable “single-shot” electrochemical sensors. We have developed special homemade screen-printed electrodes with the dimensions enabling electrochemical measurements in microliter sample volumes. In this work, we have tried to develop a method for their optimization from the points of view of reproducibility and background signal reduction. To reach the goal, we have used argon plasma treatment of the electrodes.

**Keywords:** Screen-printed electrodes, Disposable sensors, Plasma treatment.

### Introduction

In the 1990s, in-situ measurements of different electrochemically active compounds in biology, industry, environmental studies, etc., started to be in the focus of researchers. This trend was partially satisfied by the development of the screen-printed electrodes (SPEs) as disposable, single-shot electrochemical sensors<sup>1,2</sup>. Screen printing (thick-film) technology used to manufacture such electrodes was derived from the microelectronics industry. The SPEs are since then been widely used for electrochemical analysis and used in many commercial handheld instruments.

The SPEs may have a different composition; the electrode material is not only limited to the commercially available screen-printed ink but these inks can be made according to the needs of particular applications<sup>3</sup>. The SPE layout can be easily changed and miniaturized. Thus, the SPEs can be designed on demand of the end-user. We have already manufactured SPE specially designed to fit the 96-well plates and suitable for measurements in microliter volumes with different working electrodes<sup>4,5</sup>.

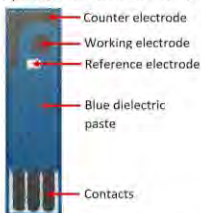
The optimization of homemade SPE for electrochemical measurements is always required if the background disables proper estimation of desired analyzed samples. In our case, we tried to use a method of the SPE plasma treatment with the low-power microwave argon plasma. This method was already used to enhance electrochemical signals of the SPEs<sup>6</sup>.

### Experimental

The SPEs were manufactured using the Horizon 8 screen printing machine (ASM DEK, Germany). We have used the following polymer-based inks for the printing process (all purchased from Gwent-Sun Chemicals, UK): C2030519P4 – Carbon Paste, used for the printing of all conductive parts, including the working and counter electrodes. It served as a connecting sublayer for the reference electrode paste. C2030519P4 – Silver/Silver Chloride Paste 60:40, used for the printing of reference electrode. D2140114D5 – Solvent Resistant Blue Dielectric Paste, used to cover the whole surface of the electrode except the surfaces of the used electrodes.



The support used for printing was the polycarbonate foil with a thickness of 0.375 mm with the matte surface (Vink, Czech Republic). For a closer view of the used SPE, please see Fig. 1.



**Fig. 1.** Home-made screen-printed electrode. The dimensions of the whole electrode is 15 x 4 mm, and the diameter of the working electrode is 2 mm.

The electrochemical measurements were done using an Autolab 302 potentiostat (Ecochemie, The Netherlands). The differential pulse voltammetry (DPV) was applied with the pulse amplitude of 0.025 V, pulse width of 50 ms, and a scan rate of 0.008 V.s<sup>-1</sup>. Measured data were normalized to the surface area of the used electrodes (diameter 2 mm). For electrochemical experiments, we used acetate buffer of pH = 5.5 and 5 mM tryptophan (TRP) as the model compound. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and were of the highest available purity.

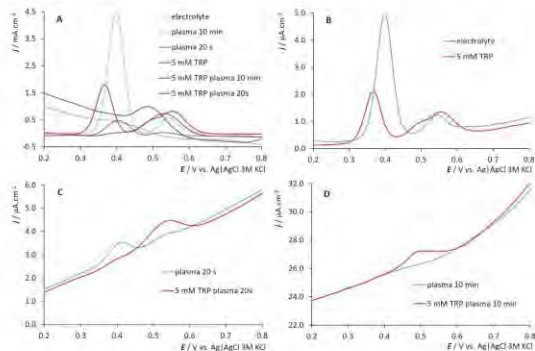
The plasma treatment was done at the Brno Technical University using the Diener Nano instrument (Diener Electronic, Germany) with the following setting: 0.04 mbar initial pressure in the plasma chamber, microwave plasma (2.45 GHz) with 180 W power output in a pure argon gas with 0.5 mbar pressure. The time of plasma treatment was 20 s and/or 10 min.

## Results and Discussion

In our present work, we have used plasma treatment of the homemade SPE to remove interfering peaks observed in background electrolyte (acetate buffer). As a model compound for the prospective use of SPE as an electrochemical biosensor, an electrochemically oxidizable aromatic amino acid tryptophan was chosen. Fig. 2 displays baselined curves (2A) and all results obtained with untreated SPE (2B), SPE plasma treated for 20 s (2C), and for 10 min (2D).

In the case of untreated SPE the detection of TRP was strongly influenced by the peak originating from the electrolyte/electrode interaction. After the plasma treatment, we were able to markedly diminish these background peaks (20 s treatment) or, in the case of the prolonged exposure, almost remove them. Nevertheless, the prolonged exposure time (10 min) led to markedly elevated background currents (compare Fig. 2D with 2B and 2C). The increase of the background current caused by the prolonged plasma treatment was probably caused by oxidation of the electrode surface layers. The reason for suppression of the background peaks may lay in the removal of interfering electrochemically active compounds present in the printing pastes (the printing pastes consist of about 40 % solid content, the rest is the binder – for example, different types of cellulose – and organic solvents).

Our results suggest that the plasma-treatment of the SPEs can be used to remove parasitic background signals.



**Fig. 2.** DPV of different plasma-treated homemade screen-printed electrodes in acetate buffer (electrolyte) containing 5 mM tryptophan (TRP). A – all samples with baselined curves; B – untreated SPE; C – SPE with plasma treatment for 20 s; D – SPE with plasma treatment for 10 min.

## Conclusions

Suppression of the parasitic background voltammetric peaks of carbon-based SPEs was attained by optimized plasma treatment SPEs. Exposure to argon plasma for 20 s was chosen as the optimum, enabling detection of an electrochemically active compound without the interference of undesired background currents.

## Acknowledgments

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

## References

1. Wang J.: *Analyst* 119, 763 (1994).
2. Renedo O.D., Alonso-Lomillo M.A., Martinez M.J.A.: *Talanta* 73, 202 (2007).
3. Majzlíková P., Prášek J., Eliáš M., Jašek O., Pekárek J., Hubálek J., Zajíčková L.: *Phys. Status Solidi A* 211, 2756 (2014).
4. Fojt L., Nekvinda J., El Anwar S., Grüner B., Havran L., Fojta M.: *Electroanalysis* 32, 1859 (2020).
5. Havranova P., Fojt L., Kejik L., Sikola, T., Fojta M., Danhel A.: *Sens. Actuator B-Chem.* 340, 129921 (2021).
6. Wang S.C., Chang K.S., Yuan C.J.: *Electrochim. Acta* 54, 4937 (2009).

## Reduction of Homocytosine Blocks in DNA oligonucleotides on Mercury Electrode (Redukce homocytosinových bloků v DNA oligonukleotidech na rtuťové elektrodě)

Miroslav Fojta, Hana Pivoňková, and Monika Hermanová

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

### Abstract

Cathodic reduction of nucleobases in DNA has been reported to require protonation of the base moieties. In this work, we studied effects of pH on the reduction of cytosine residues in dependence of lengths of homocytosine stretches. Our results revealed an easier reduction of cytosines in the blocks at pH values close to neutral, compared to reduction of isolated cytosines. Moreover, the facileness of cytosine reduction showed a clear dependence on the homocytosine block lengths. Our results thus suggest that reduction of cytosines in longer blocks is less demanding on the availability of protons in the background electrolyte, compared to reduction of isolated cytosines and of those arranged in shorter blocks. This phenomenon may be related to the ability of cytosine blocks to accumulate protons, whilst forming hemiprotonated C<sup>+</sup>•C pairs.

**Keywords:** Cytosine, Homonucleotide blocks, Mercury electrode, Cathodic reduction, Protonation.

### Úvod

Nukleové kyseliny jsou elektrochemicky aktivní <sup>1</sup> díky obsahu oxidovatelných (obvykle na uhlíkových elektrodách) nebo redukovatelných (tradičně na rtuťových, v posledních letech též na grafitových elektrodách <sup>2</sup>) bázi. Mezi báze redukovatelné na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) patří vedle adeninu a guaninu cytosin. Ireverzibilní redukce této báze (stejně jako primární redukce adeninu a guaninu) vyžaduje její protonaci a obvykle bývá pozorována v mírně kyselém prostředí nebo v neutrálním prostředí v přítomnosti proton-donorů, např. amoných kationtů. Redukční signál cytosinu na rtuťové elektrodě je ovlivněn nukleotidovou sekvencí, v níž se cytosinové zbytky nacházejí. Pokud jsou náhodně rozptýleny v „průměrné“ sekvenci, splývá redukční signál cytosinu s redukčním signálem adeninu a obě báze poskytují souhrnný signál označovaný jako pik CA <sup>1,2</sup>. V případě uspořádání cytosinových (a/nebo adeninových) zbytků do homonukleotidových bloků je pik CA rozdělen a lze rozlišit příspěvky obou bází, přičemž cytosin je redukován při méně negativním potenciálu. Tento jev může souviset s chováním homocytosinových bloků na negativně nabitým povrchu HMDE, kde tyto bloky (na rozdíl od homoadeninových) mají tendenci podléhat 2D kondenzaci a výrazně silněji se adsorbují na povrch elektrody <sup>3</sup>. V mírně kyselém prostředí se mohou tvořit semiprotonované C<sup>+</sup>•C páry a díky tomu mohou homocytosinové bloky zaujímat nekanonické sekundární struktury, zejména cytosinové kvadruplexy (i-motivy <sup>4</sup>). To může dále ovlivňovat jejich elektrochemické chování.

V této práci jsme se věnovali studiu vlivu pH základního elektrolytu na redukci homocytosinových bloků v závislosti na jejich délce.

### Experimentální část

**Materiál.** Syntetické oligodeoxynukleotidy (ODN; viz Tab. 1) byly dodány firmou VBC-BIOTECH (Rakousko). ODN byly rozpuštěny v deionizované vodě. Alikvoty o koncentraci 100 μmol L<sup>-1</sup> byly skladovány při -20 °C. Ostatní chemikálie byly použity v čistotě pro analýzu.



V důsledku zvýšení pH základního elektrolytu na 7,5 (pravý panel v Obr. 1) katodický signál CT14 zcela vymizel (ve shodě s chováním DNA o průměrné sekvenci, není ukázáno) a signály ostatních ODN byly potlačeny ve srovnání se signály příslušných ODN naměřenými při pH 7,0. Míra potlačení katodických piků zřetelně závisela na délce cytosinových bloků. Redukce CC19 byla při pH 7,5 potlačena téměř zcela a pro ostatní ODN byly pozorovány piky tím vyšší, čím delší byly homocytosinové bloky v nich obsažené. Další zvyšování pH vedlo k postupnému vymizení redukčních signálů všech ODN, opět v závislosti na počtu cytosinových zbytků v blocích. Z těchto výsledků vyplývá, že čím delší jsou homocytosinové bloky nepřerušené žádnou další bází, tím vyšší je pH, při kterém ještě lze pozorovat katodickou redukci cytosinových zbytků. Jinými slovy, redukce cytosinů v homonukleotidových blocích je méně náročná na dostupnost protonů v základním elektrolytu. Tento jev může souviset se schopností cytosinových bloků akumulovat protony při tvorbě C<sup>+</sup>C pářů.

### **Závěr**

V této práci jsme studovali redukci ODN obsahujících homocytosinové bloky na HMDE při různých hodnotách pH základního elektrolytu. Pozorovali jsme, že katodická redukce cytosinu v blocích může probíhat při vyšším pH, než redukce izolovaných cytosinů, a to v závislosti na délce homocytosinových bloků.

### **Acknowledgments**

Tato práce vznikla za podpory projektu SYMBIT reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15\_003/0000477 financovaného z ERDF a projektu GAČR č. 22-11252S.

### **References**

1. Paleček E., Bartošik M.: *Chem. Rev.* *112*, 3427 (2012).
2. Špaček J., Daňhel A., Hasoň S., Fojta M.: *Electrochem. Commun.* *82*, 34 (2017).
3. Hasoň S., Pivoňková H., Fojta M.: *J. Electroanal. Chem.* *849*, 113364 (2019).
4. Trnková L., Trísková I., Vorlíčková M., Kejnovská I., Dvořáková Z., Pivoňková H., Fiala R.: *Electroanalysis* *31*, 2081 (2019).

## Aromatic Nitro Compounds – Useful DNA Redox Labels (Aromatické nitrosloučeníny – užitečné redoxní značky DNA)

Luděk Havran, Vojtěch Němec, and Miroslav Fojta

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

### Abstract

Intrinsic DNA electroactivity has been utilized in several electroanalytical methods for the detection of DNA interactions or damage. For some applications it is advantageous to use redox active tags to improve specificity of the analysis. Among to-date redox labels, those containing organic nitro groups appeared to be particularly useful. Recently we have studied a new type of nitro group-containing DNA components, 5-hydroxymethyl deoxyuridine modified by a 4-nitrobenzyl group. Electrochemical behavior of the parent nucleoside, nucleoside monophosphate, triphosphate, and DNA with enzymatically incorporated nitrobenzyl-modified nucleosides at hanging mercury drop electrode are presented in this contribution.

**Keywords:** Chemically modified DNA, Nitro compound redox labels, Electroanalytical methods.

### Úvod

DNA jako elektroaktivní molekula poskytuje řadu analyticky využitelných elektrochemických signálů na různých pracovních elektrodách<sup>1</sup>. Tyto signály byly použity při vývoji různých elektroanalytických metod pro detekci interakcí a poškození DNA<sup>1</sup>. Pro některé aplikace, především ty zaměřené na analýzu nukleotidových sekvencí, je vhodné použít redox aktivní značky, které výrazně zvyšují specifitu analýzy<sup>2</sup>. Takovými značkami mohou být i aromatické nitrosloučeníny. Za vhodných podmínek je nitroskupina elektrochemicky redukována čtyřmi elektrony na hydroxylamin za vzniku ireverzibilního katodického píku. Při zpětném anodickém scanu hydroxylamin dává reverzibilní redox pár s příslušnou nitroso sloučeninou. Oba typy signálů lze detekovat jak na rtuťových, tak i na uhlíkových elektrodách. Kromě bázi DNA nesoucích nitrofenyl skupinu<sup>3</sup> byly v poslední době pro DNA redox značení použity také 2,4 – fenyldiazon a 7-nitrobenzofurazan diazodon<sup>4</sup>.

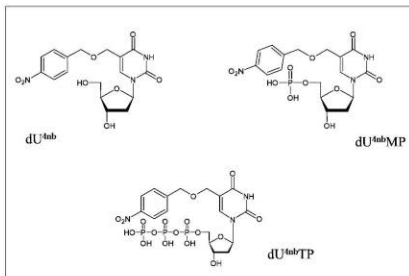
Pro přípravu chemicky modifikované DNA byla vyvinuta řada metod. Jednou z těchto technik je inkorporace modifikovaných nukleotidů pomocí enzymů – DNA polymeráz. Takovým přístupem může být metoda prodloužení primeru (primer extension method, PEX), kterou lze získat jedno- nebo dvou řetězcové molekuly DNA obsahující několik chemicky modifikovaných nukleobází.

Tento příspěvek zabývá studiem elektrochemického chování nově syntetizovaných 5-hydroxymethyl deoxyuridinů modifikovaných 4-nitrobenzylovou skupinou<sup>5</sup>. Příslušný nukleosid, nukleotid monofosfát a trifosfát byly studovány pomocí cyklické voltametrie (CV) na rtuťové kapkové elektrodě (HMDE). Takto modifikované nukleotidy byly inkorporovány do DNA pomocí PEX reakce. Reakční produkty byly rovněž studovány pomocí CV na HMDE.

### Experimentální část

Studované látky (5-hydroxymethyl 2'-deoxyuridin modifikovaný 4-nitrobenzylem (dU4<sup>nb</sup>), jeho monofosfát (dU4<sup>nb</sup>MP) a trifosfát (dU4<sup>nb</sup>TP) (Obr. 1)) byly syntetizovány v literatuře uvedeným postupem<sup>5</sup>. Značené nukleotidy byly do DNA inkorporovány pomocí PEX reakce za použití KOD XL DNA polymerázy (Novagen). Reakční produkty byly separovány pomocí

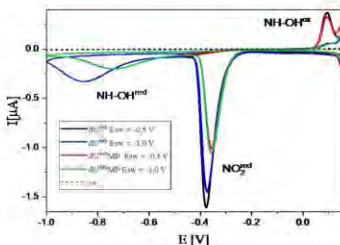
kolonek (QIAquick Nucleotide removal kit, QIAGEN). Výsledek inkorporace byl zkontrolován gelovou elektroforézou. Všechna voltametrická měření byla prováděna za použití potenciostatu/galvanostatu Autolab (Ecochemie, Holandsko) v kombinaci s elektrodovým systémem VA-stand 663 (Metrohm, Herisau, Švýcarsko) v třielektrodovém zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita HMDE, referenční elektroda byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocná elektroda platinový drát. Elektrochemické chování dU4<sup>nb</sup> a dU4<sup>nb</sup>MP bylo studováno pomocí konvenční CV na HMDE. Produkty PEX reakce byly analyzovány adsorptivní přenosovou rozpouštěcí CV (AdTS CV) na HMDE. Všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě a za nepřítomnosti kyslíku, který byl odstraněn vybubláváním argonem.



Obr. 1. Strukturální vzorce studovaných látek.

#### Výsledky a diskuse

Elektrochemické chování dU4<sup>nb</sup> a dU4<sup>nb</sup>MP bylo studováno na HMDE pomocí CV. Obě látky, v závislosti na zvolených experimentálních podmínkách (zejména hodnotě potenciálu bodu obratu (Esw)), poskytují katodické piky redukce nitroskupiny na hydroxylamin ( $\text{NO}_2^{\text{red}}$ ) a jeho následné redukce na amin ( $\text{NH-OH}^{\text{red}}$ ). Při voltametrických měřeních s Esw o hodnotách ležících mezi oběma signály, lze v anodickém scanu pozorovat pik odpovídající oxidaci vzniklého hydroxylaminu ( $\text{NH-OH}^{\text{ox}}$ ) (Obr. 2.). Tento pak tvoří v dalších následných scanech reverzibilní redox pár s příslušnou nitroso sloučeninou. Dále byl studován vliv některých experimentálních parametrů (rychlost posuvu potenciálu, Esw, počáteční potenciál). Výsledky těchto experimentů pro obě studované látky jsou velmi podobné.



**Obr. 2.** CV záznamy  $dU4^{nb}$  a  $dU4^{nb}MP$  na HMDE.  $C = 40 \mu M$ ,  $E_i = 0,15 V$ ,  $v = 1V/s$ , ze:  $0,2 M$  acetátový pufr  $pH = 5,0$ .

V dalších experimentech byly studovány produkty PEX reakce nesoucí 0 – 4 4-nitrobenzilem modifikované nukleobáze. Jejich elektrochemické chování bylo porovnáváno s chováním DNA obsahující 0 – 4 nukleobáze značené 3-nitrofenylem. Oba typy značené DNA vykazovaly srovnatelné elektrochemické chování. Vzorky značené 4 -nitrobenzilem poskytovaly při CV na HMDE lépe vyvinuté pky  $NH-OH^{ox}$ .

### Závěr

Pomocí CV na HMDE bylo studováno elektrochemické chování nově syntetizovaných 5-hydroxymethyl deoxyuridinů modifikovaných 4-nitrobenzylovou skupinou. Byly pozorovány elektrochemické signály odpovídající oxidačně-redukčním procesům nitroskupiny. Nukleotidy nesoucí 4-nitrobenzylovou skupinu byly úspěšně inkorporovány do DNA. Jejich elektrochemické chování bylo studováno ve srovnání s 3-nitrofenilem, který byl pro značení použit již dříve. Z výsledků těchto experimentů vyplývá, že 4-nitrobenzyl je vhodnou redox aktivní značkou aplikovatelnou v elektrochemické analýze DNA.

### Acknowledgments

This work was supported by the Czech Science Foundation (grant No. 22-11252S). The authors thank Dr. Boháčová and prof. Hocek (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the CAS) for providing labeled nucleos(t)ides.

### References

1. Paleček E., Bartošik M.: *Chem. Rev.* **112**, 3427 (2012).
2. Hocek M., Fojta M.: *Chem. Soc. Rev.* **40**, 5802 (2011).
3. Cahová H., Havran L., Brázdilová P., Pivoňková H., Pohl R., Fojta M., Hocek M.: *Angew. Chem. Int. Edit.* **47**, 2059 (2008).
4. Raindlová V., Pohl R., Klepetářová B., Havran L., Šimková E., Horáková P., Pivoňková H., Fojta M., Hocek M.: *ChemPlusChem* **77** 652 (2012).
5. Boháčová S., Vaníková Z., Poštová Slavětinská L., Hocek M.: *Org. Biomol. Chem.* **16** 5427 (2018).



## Portable and Transportable Analyzers of Toxic Metals and Some Organic Compounds (Přenosné a převozní analyzátoř toxických kovů a některých organických látek)

Václav Helán<sup>a</sup> and Ernest Beinrohr<sup>b</sup>

<sup>a</sup> 2 THETA ASE, s.r.o., Jasná 307, 735 62 Český Těšín, Czech Republic

<sup>b</sup> Slovak Technical University in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic

### Abstract

Electrochemical methods could be used as a complement or in competition to spectral methods. Flow-through coulometric analyzers are constructed as portable for fieldwork or transportable for work in a mobile laboratory.

**Keywords:** Flow-through coulometric analyzers, Portable, Mobile laboratory

### Úvod

Elektrochemické metody analýzy mohou být doplňkem nebo i konkurencí metod spektrálních. Průtokové coulometrické analyzátoř jsou konstruovány jako přenosné pro práci v terénu, nebo převozní pro práci v pojezděné laboratoři.

### Možnosti průtokové coulometrie

Přístroje jsou určeny pro stanovení stopových obsahů (od 0,1 µg/l) většiny kationtů i aniontů a některých organických látek v různých maticích. Některé vzorky (vody, tělní tekutiny, nápoje, galvanické lázně a různé výluhy...) se mohou analyzovat i bez úpravy, další (kaly, odpady, půdy, potraviny, klinické materiály, minerály, kovy, silikáty, plastické hmoty...) po vhodném rozkladu.

Přístroje jsou vhodné pro stanovení kovů jako Zn, Cd, Pb, Sn, Tl, Ga, Cu, Bi, Sb, Se, Mn, As, Cr, Ni, Fe, Ag, Au atd. a navíc i pro Hg, z nekovů Cl, Br a J, dále pak S<sup>2-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, celkový dusík po Kjeldahlizaci, kyseliny, zásady, rozpuštěný kyslík, celkový SO<sub>2</sub> v nápojích atd.

Zajímavou možností je speciace – stanovení Cr<sup>III</sup> a Cr<sup>VI</sup>, As<sup>III</sup> a As<sub>celk.</sub>, Fe<sup>II</sup> a Fe<sup>III</sup>.

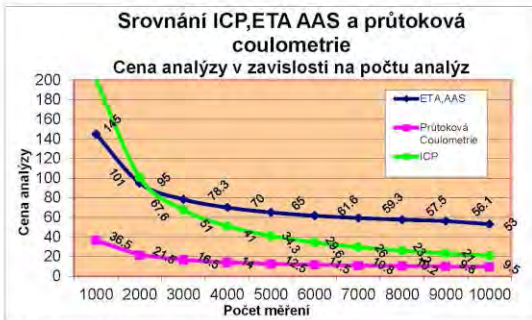
Z organických látek je vypracována metodika stanovení kyseliny askorbové v nápojích, zelenině, cereálních atd., stanovení alkoholu v nápojích, stanovení chelatonu, hydrazinu, formaldehydu. Metodiky dalších aplikací, anorganických i organických jsou stále doplňovány.

Koncentrační rozsah stanovení je velmi široký, od 0.1 do 10 000 µg/l bez nutnosti ředění. Dostatečný objem vzorku se pohybuje od 0,1 do 10 ml vzorku podle koncentrace stanovené složky.

Ve srovnání se spektrálními metodami, např. AAS, není coulometrie tak univerzální. Nestanovuje prvky první a druhé skupiny Mendělejevovy tabulky a některé další, ale jinými možnostmi zase AAS přesahuje.

Při volbě analytické metody musíme přihlížet také k ekonomice. V Obr. 1 jsou na ose y vyneseny náklady jako 1/10 pořizovací ceny přístroje + náklady na provoz. Je vidět, že při nízkém počtu stanovení analýza na ICP vychází velmi drahο vinou vysoké pořizovací ceny přístroje. Protože však provoz je levný (prakticky jen argon), od zhruba 2 500 měření vychází

analýza na ICP levnější než na AAS, která má dražší provozní náklady (grafitové kytvy...). Díky nízké pořizovací ceně i provozním nákladům (elektrody, elektrolyty) průtokového coulometru vychází coulometrická analýza nejlevněji.



Obr. 1. Ekonomické srovnání analytických metod.

#### Princip metody

Koncentrace analytu ve vzorku je úměrná prošlému náboji:

$$Q = It = z F n = z F c V \quad (1)$$

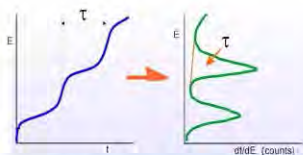
Q	elektrický náboj
I	proud
t	trvání elektrolyzy
z	nábojové číslo elektrodové reakce
n	látkové množství
c	koncentrace analytu
V	objem elektrolyzovaného roztoku

Technicky je jednodušší za konstantního proudu měřit čas, proto dále popisované přístroje pracují metodou chronopotenciometrickou.

Kovy se obvykle stanovují ve dvou krocích. Nejprve se na pracovní elektrodě kationty vyloučí jako kovy a poté se po změně potenciálu elektrochemicky rozpuštějí. Napětí, při kterém se to děje, charakterizuje daný analyt, doba, po kterou se to děje, jeho koncentraci.

Anionty a další analyty se stanovují vnitroelektrodovou coulometrickou titrací.

Pracuje se nejčastěji metodou přidavku standardu, ale také metodou kalibrace. V některých případech je možná i bezstandardová analýza.

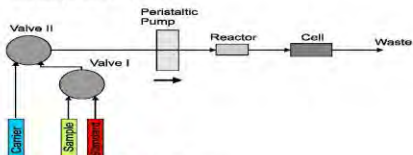


Obr. 2. Chronopotenciometrický signál.

### Laboratorní analyzátor EcaFlow 150 GLP



EcaSystem "FIA"



Obr. 3. Analyzátor EcaFlow 150 GLP a jeho schéma.

Uzavřený průtokový hydraulický systém s peristaltickou pumpou zajišťuje automatický odběr, přesné dávkování a transport analyzovaného vzorku a pomocných roztoků (základní elektrolyt, kalibrační roztok) bez zásahu obsluhy. Průběh analýzy až po vyhodnocení koncentrací stanovovaných látek je zcela automatický, řízen běžným osobním počítačem. Přístroj může být vybaven automatickým podavačem vzorků.

Průměrná doba celkové analýzy (i s korekcí na pozadí) je 5 minut. Při měření není nutno ze vzorku odstraňovat kyslík.

Tento přístroj může pracovat také v pojižděné laboratoři, napájen z autobaterie.

## Přenosný analyzátor PCA 2



Obr. 4. Přenosný analyzátor PCA 2.

Jeho konstrukce i možnosti vycházejí z osvědčených laboratorních přístrojů řady EcaFlow

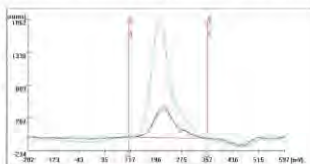
Přístroj je umístěn v robustním kufríku. Je vybaven nabíjecí baterií na 12 hodin provozu.

Přístroj se ovládá pomocí 4,3" dotykového displeje. Analýza probíhá automaticky. Háděčku vložíme do kádinky se vzorkem, který je peristaltickou pumpou čerpán do měřicí cely, kde proběhne analýza. Přístroj uchovává v paměti až 1 000 výsledků analýz. Komunikace s PC umožňuje přenos výsledků a změnu analytického programu. (Při určitém naprogramování se stanovuje vždy jen jeden analyt, změna programu je však otázkou několika minut.)

Jednoduchá konstrukce, nízká hmotnost (2,9 kg) a rozměry a nezávislost na zdroji proudu a počítači předurčují tento přístroj k měření ve výrobním provozu nebo v terénu, kde do 2 až 3 minut po odebrání vzorku známe výsledek analýzy. Pro transport elektrolytů a dalších čimidel je dodáván přídatný kufrík.

### Příklad analýzy

Při analýze arzenu průtokovou rozpouštěcí coulometrií na analyzátoru EcaFlow 150 GLP byl limit detekce 0,02 µg/l, mez stanovitelnosti 0,1 µg/l a lineární rozsah do 100 µg/l.



Obr. 5. Analýza arzenu

### Závěr

Průtoková coulometrie slouží pro analýzu většiny běžných kationtů a aniontů a některých organických látek. Může být vhodným doplňkem a někde i náhradou dražších a na provoz náročnějších metod spektrálních. Analyzátor EcaFlow 150 GLP mohou být používány i jako převozní, napájeny z autobaterií. Analyzátor PCA 2 jsou přenosné, určené pro práci v terénu.

# Thiopyrimidines as Hydrogen Evolution Catalysts for Electrochemical Detection of DNA (Využití thiopyrimidinů jako katalyzátorů vylučování vodíku pro elektrochemickou detekci DNA)

Monika Hermanová<sup>a</sup>, Luděk Havran<sup>a</sup>, Marcela Hrušková<sup>a,b</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

<sup>b</sup> Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 267/2, 602 00 Brno, Czech Republic  
E-mail: hermanova@ibp.cz

## Abstract

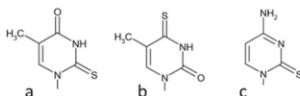
Approaches employing catalytic hydrogen evolution for detection of labeled DNA are very promising since they can achieve extremely sensitive detection rate. For example, hydrogen evolution catalyzed by sulfur-containing unnatural bases has recently been successfully used for detection of very low levels of DNA modification with these species. In presented pilot study, catalytic hydrogen evolution by three selected thiopyrimidines (2-thiocytosine, 2- and 4-thiothymine) at the HMDE and efficiency of their primer extension (PEX) incorporation by a DNA-dependent DNA polymerase were studied in order to select useful catalytic DNA labels.

**Keywords:** Catalytic hydrogen evolution, Thiopyrimidines, DNA labeling, Differential pulse voltammetry.

## Úvod

Nukleové kyseliny jsou elektrochemicky aktivní<sup>1</sup>, což umožňuje jejich elektrochemickou analýzu bez jakéhokoli značení. Značení DNA ale umožňuje zvýšit selektivitu a citlivost detekce, čehož bylo využito ve velkém množství různých analytických přístupů<sup>2</sup>. Převážná většina metod běžně užívaných pro elektroaktivní značení DNA je založena na reverzibilních nebo ireverzibilních redoxních systémech, nicméně systémy, ve kterých se uplatňuje katalytické vylučování vodíku (CHE), obvykle umožňují výrazně citlivější detekci. Nedávno jsme ukázali, že vylučování vodíku katalyzované určitou skupinou nepřirozených bází obsahujících síru, využívaných v rámci snah o expanzi genetického kódu, umožňuje detekci jediné této báze v molekule plasmidu, tedy ve velkém nadbytku přirozených bází<sup>3</sup>. Nemodifikovaná DNA za určitých podmínek také katalyzuje vylučování vodíku na rtuťové elektrodě<sup>4</sup>; jako báze zodpovědné za tuto reakci byly identifikovány cytosin a adenin, resp. jejich redukční produkty.

V této práci jsme se zabývali detekcí katalytického vylučování vodíku u tří vybraných thiopyrimidinů (2-thiocytosinu, 2- a 4-thiothyminu; Obr. 1) a možnosti jejich inkorporace do DNA pomocí metody prodlužování primeru (primer extension, PEX); takto připravené oligonukleotidy byly studovány pomocí diferenční pulzní voltametrie. Cílem práce bylo vyhodnotit možnost použití těchto thiopyrimidinů jako specifických katalytických značek DNA.



**Obr. 1.** Chemické struktury thiopyrimidinů: a – 2-thioT; b – 4-thioT; c – 2-thioC.

## Experimentální část

Oligodeoxynukleotidy (ODN) obsahující thiopyrimidinové báze byly připraveny pomocí PEX reakce. Pro PEX reakci byla použita 5  $\mu\text{M}$  jednořetězcová templátová DNA temp(2T), temp(4T), temp(2C) nebo temp(4C) a 5  $\mu\text{M}$  primer prim15 (Tab. 1), 100  $\mu\text{M}$  2-thio dTTP, 4-thio dTTP nebo 2-thio dCTP, 100  $\mu\text{M}$  dATP, dCTP (v případě použití 2-thio dTTP nebo 4-thio dTTP), dGTP a dTTP (v případě použití 2-thio dCTP) a 0,5 U KOD.XL polymerázy v celkovém objemu 20  $\mu\text{l}$ . Vzorky byly inkubovány na 72  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 20 min. Produkty PEX reakce byly purifikovány pomocí Nucleotide Removal Kit (Qiagen) a rozpuštěny v 30  $\mu\text{l}$  deionizované vody. Výsledná koncentrace ODN byla 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , vzorky, ze kterých byly ODN adsorbovány na povrch elektrody, obsahovaly 0,2 M NaCl.

**Tabulka 1.**

Sekvence použitých templátů a primeru.

Název	Sekvence	Délka
Temp(2T)	CATGCATCTCCTCTCTCCCAGTCCGCCCTG	31
Temp(4T)	CATGCATGACGTCAGTCCCAGTCCGCCCTG	31
Temp(2C)	CATGCATGACATCACTCCCAGTCCGCCCTG	31
Temp(4C)	CATGCATGACGTCAGTCCCAGTCCGCCCTG	31
Prim15	CTAGGGCGGACTGGG	15

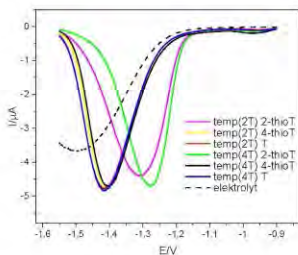
Všechna elektrochemická měření byla prováděna při laboratorní teplotě v tříelektrodovém zapojení (s visící rtuťovou kapkovou elektrodou, HMDE, jako pracovní elektrodou, Ag/AgCl/3 M KCl jako referenční elektrodou a platinovým drátkem jako pomocnou elektrodou) na přístroji Autolab (Ecochemie) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm). Měření byla provedena adsorptivní přenosovou rozpuštěcí (AdTS) technikou. DNA byla akumulována na povrchu elektrody ze 3- $\mu\text{l}$  alikvotů po dobu 60 s, poté byla elektroda opláchnuta v deionizované vodě a umístěna do elektrochemické cely obsahující čistý základní elektrolyt. Diferenční pulzní voltametrie (DPV) na HMDE byla prováděna v elektrolytu obsahujícím 10 mM HCl; nastavení pro DPV byla následující:  $v = 4,5 \text{ mV/s}$ ,  $E_i = -0,9 \text{ V}$ ,  $E_{\text{end}} = -1,55 \text{ V}$ ,  $a = 25 \text{ mV}$ .

## Výsledky a diskuse

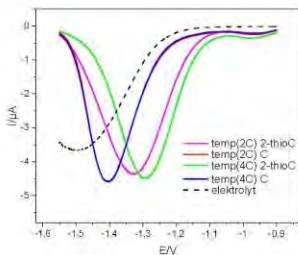
Pomocí PEX reakce byly připraveny oligonukleotidy s inkorporovanými thioderiváty bází, přičemž pro inkorporaci 2-thioT nebo 4-thioT byly použity templáty umožňující specifickou inkorporaci dvou nebo čtyř thyminů (temp(2T), temp(4T), viz Tab. 1). Analogicky pro inkorporaci 2-thioC byly použity templáty umožňující inkorporaci dvou nebo čtyř cytosinů (temp(2C), temp(4C)). Kromě oligonukleotidů modifikovaných thiopyrimidinů byly v kontrolních experimentech připraveny také oligonukleotidy s inkorporovanými nemodifikovanými bázemi, tedy thyminem nebo cytosinem.

Jak již bylo řečeno, samotná DNA může katalyzovat vylučování vodíku, což lze pozorovat na voltanogramech (Obr. 2 a 3) jako pík okolo -1,4 V u oligonukleotidů obsahujících pouze přirozené báze, tedy thymin pro temp(2T) a temp(4T) nebo cytosin pro temp(2C) a temp(4C). U oligonukleotidů, do nichž měl být inkorporován 4-thioT s využitím templátů temp(2T) a temp(4T), nevidíme proti nemodifikovaným oligonukleotidům žádný rozdíl. Z toho lze usuzovat, že inkorporace 4-thioT nebyla úspěšná a tento neúspěch lze vysvětlit přítomností thioketonové skupiny v poloze 4, která je u nemodifikovaného thyminu klíčová pro vytvoření jedné ze dvou vodíkových vazeb s protilehlým adeninem. Naproti tomu posun potenciálu DPV píku směrem k pozitivnějším potenciálům ukazuje na katalytický efekt inkorporovaných 2-thiopyrimidinů. Jak u 2-thioT, tak u 2-thioC dochází k výraznějšímu posunu potenciálu píku při vyšším počtu inkorporovaných modifikovaných bází, tedy u templátů temp(4T), resp.

temp(4C), ve srovnání s templáty temp(2T), resp. temp(2C). U obou z těchto bázi jsou zachovány přirozené funkční skupiny v poloze 4 a tedy i jejich schopnost normálního párování přinejmenším dvěma kanonickými vodíkovými vazbami.



**Obr. 2.** DP voltamogramy oligonukleotidů připravených PEX reakcí: templáty temp(2T) nebo temp(4T); inkorporace 2-thioT, 4-thioT nebo T. Parametry DPV:  $v = 4.5 \text{ mV/s}$ ,  $E_i = -0.9 \text{ V}$ ,  $E_{\text{oxid}} = -1.55 \text{ V}$ ;  $a = 25 \text{ mV}$ .



**Obr. 3.** DP voltamogramy oligonukleotidů připravených PEX reakcí: templáty temp(2C) nebo temp(4C); inkorporace 2-thioC nebo C. Parametry DPV stejné jako v Obr. 2.

### Závěr

V této pilotní práci jsme studovali možnost inkorporace tří vybraných thiopyrimidinů (2-thiocytosinu, 2- a 4-thiothyminu) do DNA pomocí PEX reakce. U takto připravených oligonukleotidů jsme sledovali vliv jejich modifikace thiopyrimidiny na katalytické vylučování

vodíku na rtuťové elektrodě. Výsledky naznačují, že 2-thiopyrimidiny jsou úspěšně inkorporovány do DNA a mohou tak být potenciálně využity jako značky fungující na principu katalýzy vylučování vodíku.

#### **Acknowledgments**

Tato práce vznikla za podpory projektu LA GAČR č. 21-46325L.

#### **References**

1. Paleček E., Bartošik M.: *Chem. Rev.* *112*, 3427 (2012).
2. Hocek M, Fojta M.: *Chem Soc Rev.* *40*, 5802 (2011).
3. Špaček J, Fojta M.: *Electrochim Acta.* *364*, 137298 (2020).
4. Řimánková L., Hasoň S., Daňhel A., Fojta M., Ostatná V.: *J. Electroanal. Chem.* *858*, 10 (2020).



**Electrochemical Oxidation of Selected Antihypertensives with 2D and 3D Boron-doped Diamond Electrodes**  
**(Elektrochemická oxidácia vybraných antihypertenzív na 2D a 3D bórom dopovanej diamantovej elektróde)**

Lucia Hojová<sup>a</sup>, Erika Mordačíková<sup>a</sup>, Martin Vrška<sup>b</sup>, Denis Voltman<sup>b</sup>, Marian Vojs<sup>b</sup>, and Andrea Vojs Staňová<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Analytical Chemistry, Mlynská Dolina, Ilkovičova 6, 84215, Bratislava, Slovak Republic,  
E-mail: hojova4@uniba.sk

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

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

**Abstract**

Advanced oxidation processes have gained a lot of attention, especially as an effective water treatment technique. The present work is focused on a comparison of removal efficiencies reached after electrochemical oxidation of selected antihypertensives (irbesartan, telmisartan, valsartan) with different types of BDD electrodes (2D silicon substrate and 3D porous ceramics) in a working electrolyte containing NaCl. The influence of the applied electrode type on the formation of degradation and transformation products was studied. Identification of degradation products was performed using a non-targeted approach to sample analysis by a combination of HPLC-HRMS.

**Keywords:** Sartans, 2D and 3D BDDE, Degradation and Transformation products, HPLC-HRMS.

**Úvod**

Antihypertenzíva zo skupiny sartanov (irbesartan, telmisartan a valsartan) sú liečivami, ktoré sú v nedostatočnej miere eliminované pomocou konvenčných metód v čistiarniach odpadových vôd. Pri použití biologického čistenia sa zaznamenali nízke účinnosti eliminácie najmä pre irbesartan (0±25 %) <sup>1</sup> a telmisartan (-7±18 %) <sup>2</sup>. Ich nedostatočná miera eliminácie a vysoká spotreba sú príčinami ich detekcie v rôznych zložkách ekosystému. Koncentrácie týchto liečiv v povrchových vodách dosahujú od desiatok až po niekoľko stoviek ng/L pre každý jeden zo spomínaných sartanov <sup>3</sup>. Z vybraných sartanov práve telmisartan vykazuje najvyššiu tendenciu k sorpcii na čistiarský kal, čo zároveň poukazuje na jeho vysoký bioakumulačný potenciál <sup>4</sup>.

V súčasnosti si pokročilé oxidačné procesy (AOP) získavajú veľkú pozornosť aj ako efektívna technika terciárneho (doplnkového) čistenia vôd <sup>5</sup>. Medzi AOP patrí aj elektrochemická oxidácia využívajúca bórom dopované diamantové elektródy (BDDE). Aplikovaním napätia na elektródu dochádza k oxidácii organických zlúčenín buď priamo na povrchu anódy (priama oxidácia) alebo sú kontaminanty oxidované *in situ* reaktívnymi časticami z roztoku elektrolytu (nepriama oxidácia). Počas elektrochemickej oxidácie prebieha konverzia pôvodných polutantov na organické zlúčeniny, ktoré sú ľahšie biologicky odbúrateľné, menej toxické alebo dochádza k ich čiastočnej/úplnej mineralizácii <sup>6,7</sup>.

Všeobecne BDDE v porovnaní s inými typmi elektród (Pt, RuO<sub>2</sub>, IrO<sub>2</sub> a pod.) disponujú niekoľkými prednosťami. V praxi sa BDD vrstva môže nanášať na substráty, ktoré sú: a) v plošnom 2D a b) objemovom (poréznom) 3D usporiadaní, kde elektróda je zväčša konštruovaná do trojrozmerného valcového tvaru. Porézna elektróda v porovnaní s 2D disponuje najmä otvorenou štruktúrou pórov, čím sa zvyšuje aktívna plocha povrchu elektródy. Zároveň je zabezpečené zvýšenie rýchlosti prenosu hmoty smerom k elektróde. Z teoretických poznatkov tiež vyplýva, že pri vyššej rýchlosti prenosu hmoty sa zvyšuje pravdepodobnosť interakcie OH radikálov a organického mikropolutantu a teda stúpa aj účinnosť degradácie<sup>8</sup>.

Pri zavádzaní nových technológií čistenia vôd je potrebné prihliadať nie len na účinnosť odbúrania polutantov ale aj na bezpečnosť, čo znamená identifikovať novovznikajúce degradačné a transformačné produkty. Pri tomto type analýz je však nevyhnutné siahnuť po inštrumentálnom vybavení s vysokým rozlíšením. Práve spojenie HPLC-IRMS predstavuje spojenie citlivej a selektívnej analytickej metódy, ktorá je vhodná na spoľahlivú identifikáciu známych aj neznámych látok, vrátane sartanov<sup>9</sup>.

Práca sa venovala porovnaniu dosiahnutej účinnosti odbúrania pomocou elektrochemickej oxidácie sartanov (irbesartan, valsartan a telmisartan) s využitím 2D a 3D BDDE a následnej identifikácii vzniknutých degradačných a transformačných produktov s využitím kombinácie vysokoúčinná kvapalinová chromatografia - vysokorozlišovacia hmotnostná spektrometria (HPLC-HRMS).

### Experimentálna časť

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

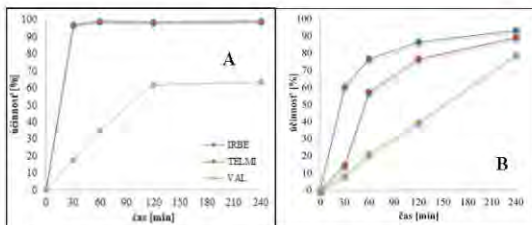
Na elektrochemickú oxidáciu boli použité dva typy BDD elektród. BDD film (2,5% CH<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>, 10 000 ppm B/C v plynnnej fáze) bol narastený pomocou techniky žeravených vlákien aktívovanej chemickej depozície z pár (HF CVD) na kremikový substrát v plošnom 2D usporiadaní. Na 3D poréznu keramiku (VUKOPOR®, Česko, 40 ppi (pores per inch), D=21 mm, h=10 mm) bola narastená diamantová vrstva pomocou veľkoplošnej, mikrovlnami aktívovanej chemickej depozície z pár (LA MWCVD) s parametrami (5 secm TMBT, 0,2 % CO<sub>2</sub>, B/C=312 500 ppm v plynnnej fáze). 3D BDDE bola v našom prípade konštruovaná ako prietokový systém. Na zhodnotenie účinnosti použitých BDDE boli vzorky z degradačných experimentov analyzované pomocou kvantitatívnej HPLC-MS/MS (Thermo Fisher Scientific San Jose, CA, USA). Identifikácia degradačných a transformačných produktov sa uskutočnila prostredníctvom HPLC-IRMS na prístroji LC-MS-IT-TOF™ (Shimadzu, Kyoto, Japonsko).

Na uskutočnenie experimentov a odber vzoriek sa použilo zariadenie Diawaster (vyvinuté na FEI STU, Bratislava), ktoré umožňuje automatizovane riadiť proces degradácie vôd. Degradačný systém umožňuje pripojenie jednej alebo dvoch pracovných elektrochemických ciel, v ktorých je možné realizovať elektrochemické degradačné experimenty. Systém napájania elektród pracoval pri konštantnom napätí 30 V, s maximálnym prúdom 0,2 A s online monitoringom V, I, P a prepínavaním elektród v 60s intervaloch.

## Výsledky a diskusia

Hlavným cieľom práce bolo sledovanie vplyvu použitej BDD elektródy na účinnosť elektrochemickej oxidácie. Pre tento účel boli na deštručné experimenty využité rôzne typy elektród (2D a 3D BDDE). Elektrochemická oxidácia sartanov sa realizovala v destilovanej vode s prídavkom soli a štandardu liečiva a koncentrácií 1 mg/L. Vzorky boli odoberané v časových intervaloch 0 min, 30 min, 60 min, 120 min a 240 min.

Zo získaných výsledkov vyplýva, že dosiahnutá účinnosť elektrochemickej oxidácie je ovplyvnená použitým typom BDDE. Vysoko účinná degradácia IRBE a TELMI bola dosiahnutá s použitím BDDE na kremíkovom substráte v 2D plošnom usporiadaní (IRBE 99 %, TELMI 98 %) už po 30 minútach. Na druhej strane účinnosť odstránenia VAL v tomto systéme bola za rovnakých podmienok len 18 %. Pri použití 3D BDDE bola dosiahnutá vysoká miera odstránenia všetkých troch sartanových liečiv (IRBE 93 %, TELMI 89 %, VAL 79 %). 3D porézna elektróda sa vďaka svojim prednostiam (väčšia aktívna plocha a zvýšená rýchlosť prenosu hmoty k elektróde) javí ako sľubná alternatíva pre univerzálnu degradáciu širokého spektra organických mikropolutantov.



Obr. 1. Priebeh elektrochemickej oxidácie sartanov s NaCl na: A) 2D, B) 3D BDDE.

Priložené grafické závislosti (Obr. 1) poukazujú na to, že použitý typ elektródy ovplyvňuje nielen samotnú rýchlosť odbúrania, ale aj priebeh elektrochemickej oxidácie. Vzniknuté rozdiely pri eliminácii liečiv sa dajú odôvodniť tým, že typ použitej BDDE určuje mechanizmus interakcie liečiv a reaktívnych radikálov ( $\text{OH}$  a  $\text{Cl}^\cdot$ ), a pravdepodobne sa tak podieľa na výslednej podobe deštručných a transformačných produktov.

Na základe uvedených skutočností je predpoklad vzniku rozdielnych deštručných a transformačných produktov. Identifikácia deštručných produktov bola uskutočnená s využitím nacieleného prístupu prostredníctvom kombinácie HPLC-HRMS. Výsledky analýzy preukázali, že počas elektrochemickej oxidácie na 2D a 3D BDDE dochádza ku generovaniu identických ale aj rozdielnych deštručných a transformačných produktov. V rámci práce bolo identifikovaných niekoľko deštručných produktov pre vybranú BDDE. Príkladom môže byť deštručný produkt telmisartanu (445 m/z v ESI-), ktorý bol detegovaný iba vo vzorkách po elektrochemickej oxidácii s využitím 2D BDDE.

## Záver

V práci bola porovnávaná účinnosť elektrochemickej oxidácie vybraných liečiv zo skupiny sartanov na 2D a 3D BDD elektródach. Sledoval sa vplyv použitej elektródy na účinnosť odstránenia vybraných antihypertenzív. Výsledky preukázali, že najúčinnější eliminácia IRBE a TELMI (98-99 %) sa dosiahla pri použití 2D BDDE nanosennej na kremíkovom substráte a v prípade VAL (79 %) na poréznej keramike. Vďaka spojeniu technik HPLC-HRMS bolo umožnené overiť hypotézu, že počas elektrochemickej oxidácie na 2D a 3D BDDE dochádza ku generovaniu rozdielnych degradačných a transformačných produktov. V rámci práce bolo identifikovaných niekoľko rozdielnych degradačných produktov pre vybranú BDDE.

## 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) a v rámci Operačního programu Integrovaná infrastruktúra pre projekt: „Strategický výskum v oblasti SMART monitoringu, liečby a preventívnej ochrany pred koronavírusom (SARS-CoV-2). Kód ITMS2014+: 313011ASS8, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.“

## References

1. Bourgin M., Beck B., Boehler M., Borowska E., Fleiner J., Sahli E., Teichler R., Von Gunten U., Siegrist H., McArdell S., Ch.: *Water Res.* 129, 486 (2018).
2. Ferreira, C., Gómez-Motos I., Lombrana I. J., Luis A., Villata N., Ros O., Etxebarria N.: *Sustainability* 12, 725 (2020).
3. Zhang H., Ihara O. M., Nakada N., Tanaka H., Ihara M.: *Environ. Sci. Technol.* 54, S(1), 1720 (2020).
4. Kodešová, R., Klement A., Golovko O., Fér M., Kočárek M., Nikodem A., Grabic R.: *J Environ Manage* 250, 109407 (2019).
5. Fernandes Joana, C. T. Water treatment with boron-doped diamond electrodes. A review on-by products formation. (2021). Available online on: [https://run.unl.pt/bitstream/10362/118277/1/Fernandes\\_2021.pdf](https://run.unl.pt/bitstream/10362/118277/1/Fernandes_2021.pdf)
6. Mackulák T., a kol. *Environmentálne vedy - výskyt a možnosti degradácie polutantov*. Bratislava: FCHPT STU, 2016.
7. Martínez-Pachón, D., Espinosa-Barrera P., Rincón-Ortiz J., Moncayo-Lasso A.: *Environ Sci Pollut Res.* 26, 4426 (2019).
8. Dongtian M., Zhishen L., Yinhao C., Guoshuai L., Zejun D., Yanglei Y., Songbo L., Kechao Z.: *Chem. Eng. J* 429, 132366 (2022).
9. Pourchet M., et al.: *Environ. Int.* 139, 105545 (2020).

## Voltammetric Determination of Psilocin and Psilocybin at Carbon-fiber PLA Electrode

Marta Chojńska-Młynarczyk<sup>a,b</sup>, Tomáš Navrátil<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: marta.chojnska@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

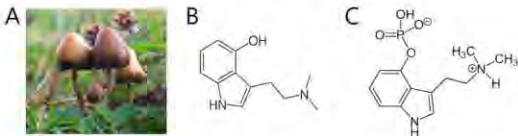
### Abstract

Psilocin and psilocybin are two neuroactive drugs. They can be used in experimental treatment in psychiatry, moreover, also as illicit drugs to achieve hallucinations and relaxation. Easy access to these two alkaloids indicates that their monitoring in the environment and the body fluids is necessary. Electrochemistry offers fast, simple, and easy methods of their determination using laboratory-manufactured electrodes from 3D printed carbon-fiber poly(lactic acid) materials. This technique of electrode fabrication can be characterized by many benefits, e.g., desired shape or diameter of the electrode, well-developed voltammetric signals, and low background currents.

**Keywords:** Psilocin, Psilocybin, Determination, Voltammetry, 3D printed electrodes.

### Introduction

Psilocin (4-hydroxy-*N,N*-dimethyltryptamine) and psilocybin (4-phosphoxy-*N,N*-dimethyltryptamine) are two alkaloids that can be obtained from many fungi of the species *Psilocybe* (Fig. 1). They are known in many regions of the world for their hallucinogenic properties and are used for religious purposes (especially in Latin America). In addition, these fungi are widely known in some subcultures and appear to be one of the most popular hallucinogenic drugs<sup>1-3</sup>.



**Fig. 1.** (A) *Psilocybe* mushrooms, (B) structure of psilocin, (C) structure of psilocybin.

Psilocybin is the natural alkaloid, which in the human body is metabolized into the psilocin. Due to their neuroactive properties, in the 1950s, they have been used for the experimental treatment of some psychiatric diseases. After a rapid increase in interest in its psychedelic properties, they have not been used for medical purposes for a long time. Recently, their potential as drugs in psychiatry is beginning to develop again<sup>3</sup>.

Psilocin and psilocybin can positively affect the human mind, which has been used to treat depression, anxiety, end-stage cancer-related mood swings, and obsessive-compulsive or post-traumatic stress disorders. They can create more confident and joyful feelings<sup>3,5</sup>.

Due to their use in psychiatry as well as the high potential for abuse, psilocin and psilocybin must be monitored in the environment. In experimental treatment, it is also necessary to monitor the amount of psilocin, psilocybin, and their derivatives in the body fluids (i.e., blood and urine). Therefore, fast, easy, selective, and sensitive methods of their determination are important for medical, toxicological, and environmental purposes.

### Experimental part

Our research was focused on the development of 3D-printed electrodes, which proved to be useful for the determination of illicit drugs. In our experiments, we used laboratory-made electrodes<sup>6</sup> (Ø 3 mm and 4.5 mm), made from carbon fiber polylactic acid (CF-PLA) filament ProtoPasta (ProtoPlant, USA). Electrodes were designed in Fusion360 (Autodesk, USA), sliced in KISSlicer v.2 (KISSlicer, USA), and printed on 3D printer DeltIQ 2 (Trilab, Czech Republic).

Psilocin and psilocybin were purchased from Lipomed, Switzerland. We prepared a stock solution with a concentration of 0.1 mmol/L. Stock solutions were stable for at least 1 month (stored in the dark at 8° C). A solution of psilocybin was prepared by its dissolving in methanol, p.a., (Penta, Czech Republic) and psilocybin solution in deionized water (Milli-Q-Gradient, Millipore, Czech Republic, conductivity <0.05 µS/cm). Britton-Robinson (BRB) buffer solutions of pH from 3 to 12 were prepared from 0.04 mol/L boric acid, 0.04 mol/L phosphoric acid, 0.04 mol/L acetic acid, and 0.2 mol/L hydroxide sodium (all Penta, Czech Republic).

Voltammetric measurements were performed using Eco-Tribe Polarograph (Polaro-Sensors, Czech Republic), controlled by the software MultiElChem 3.3 for Windows 10 (J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, Czech Republic). 3D printing electrodes were used as working electrodes, Ag/AgCl(3M KCl) was used as the reference, and platinum wire as the auxiliary electrode (both Elektrochemické Detektory, Czech Republic). pH values were measured using the pH-meter Jenway 3505 (Bibby Scientific Limited, UK).

Differential pulse voltammetry yielded well-developed peaks with relatively low background currents. The following parameters were optimized: pH of the solution, accumulation time ( $t_{acc}$ ), accumulation potential ( $E_{acc}$ ), initial potential ( $E_{in}$ ), and final potential ( $E_{fin}$ ), which values are summarized in Table I.

**Table I.**

Optimized parameters of the DPV determination of psilocin and psilocybin.

Parameter	Psilocin	Psilocybin
pH	3	3
Accumulation time, $t_{acc}$	60 s	60 s
Accumulation potential, $E_{acc}$	-500 mV	400 mV
Initial potential, $E_{in}$	-500 mV	400 mV
Final potential, $E_{fin}$	1200 mV	1200 mV

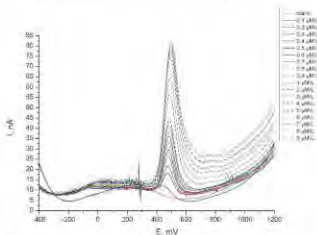
### Results and discussion

To receive the well-repeatable results, the CF-PLA electrode surfaces were renovated by the insertion of 20 cyclic voltammetric cycles, from -1000 mV to +1500 mV before each experiment.

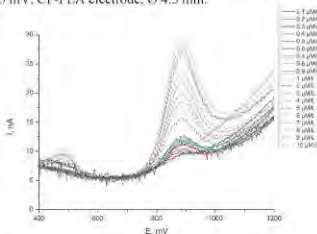
After three measurements, the electrode surface was partly destroyed, which caused background current increase, potential window narrowing, and signal development worsening. Therefore, the electrode has to be mechanically polished after every three measurements.

After parameter optimization, the calibration curves of both drugs could be recorded. Electrodes of two diameters were tested;  $\varnothing$  3 mm and  $\varnothing$  4.5 mm. Using each of them, well-developed signals of psilocin and psilocybin could be recorded. However, the 3-mm diameter electrode was very easy to destroy, especially to broke. Therefore, it was decided to use electrodes of 4.5-mm diameter.

In the case of both drugs, similar background currents were recorded (about 10-15 nA). The registered sensitivity to psilocin at the CF-PLA electrode was about three times higher (Fig. 2, signals at about +500 mV) than to psilocybin (Fig. 3, signals at about +880 mV).



**Fig. 2.** DPV signals of psilocin from 0.1 μmol/L to 9 μmol/L in pH 3,  $t_{acc} = 60$  s and  $E_{acc} = -500$  mV, CF-PLA electrode,  $\varnothing$  4.5 mm.

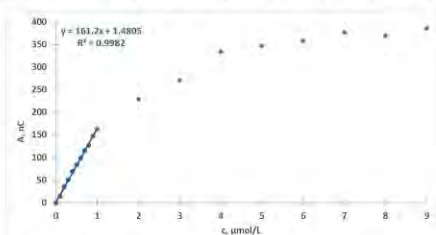


**Fig. 3.** DPV signals of psilocybin from 0.1 μmol/L to 10 μmol/L in pH 3,  $t_{acc} = 60$  s and  $E_{acc} = +400$  mV, CF-PLA electrode,  $\varnothing$  4.5 mm.

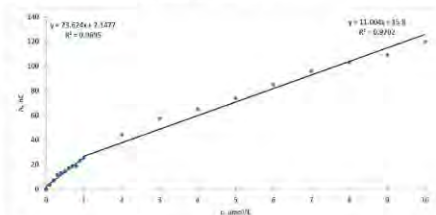
Using the optimized parameters, the signal of psilocin (visible at +500 mV) was relatively well-developed. However, another small signal was recorded at the potential of +790 mV, which height was independent of the psilocin concentrations. The background current after the psilocin signal increased. It indicates that the formed reaction products of psilocin were not completely desorbed from the electrode surface. In addition, the potential window narrowed with repeated measurements.

Psilocybin yielded only one voltammetric signal (at +880 mV) too. Its reaction products also affected the electrode surface in a similar way as in the case of psilocin, i.e., the background current after any measurement was always higher than the background current just before the signal too. It indicates a similar situation and the necessity to change the electrode after three realized measurements.

The calibration curves (peak area vs. concentration) were measured in the concentration range from 0.1  $\mu\text{mol/L}$  to 9  $\mu\text{mol/L}$  for psilocin and from 0.1  $\mu\text{mol/L}$  to 10  $\mu\text{mol/L}$  for psilocybin. These calibration curves are depicted in Fig. 4 (psilocin) and Fig. 5 (psilocybin), respectively.



**Fig. 4.** Calibration curves for psilocin, concentration range from 0.1  $\mu\text{mol/L}$  to 9  $\mu\text{mol/L}$ . For the experimental parameters see Fig. 2.



**Fig. 5.** Calibration curves for psilocybin: concentration range from 0.1  $\mu\text{mol/L}$  to 10  $\mu\text{mol/L}$ . For the experimental parameters see Fig. 3.



In the case of psilocin, the calibration curve could be approximated by a straight line in the lower concentration range (Fig. 4). In the case of psilocybin, the calibration line was approximated by two straight lines with different slopes, i.e., from 0.1  $\mu\text{mol/L}$  to 1  $\mu\text{mol/L}$  and from 1  $\mu\text{mol/L}$  to 10  $\mu\text{mol/L}$  (Fig. 5).

### Conclusion

Our research was focused on the application of 3D-printed electrodes for the determination of two neuroactive drugs: psilocin and psilocybin. The applicable voltammetric parameters were optimized in the preliminary experiments. The well-developed signals and linear calibration curves were achieved.

The experiments proved that the voltammetric methods based on the use of laboratory-made CF-PLA electrodes can be successfully used for drug determination. The possibility to modify the electrode surface offers a way for further development of the method and gaining more information about drug behavior. The electrode fabrication is easy, and cheap, and the electrode surface can be renovated, which may be advantageous in practical applications in medicine, toxicology, or environmental analysis.

### Acknowledgments

This research was funded by the project of the Czech Science Foundation (GA ĀR) No. 20-01589S, Specific University Research (SVV260560), and Grant Agency of Charles University No. 373521.

### References

1. Geiger H.A., Wurst M.G., Daniels R.N.: *ACS Chem. Neurosci.* *9*, 2438 (2018).
2. Fradkin D.: *Perspect. Psychiatry C I* (2021).
3. Zeiss R., Gahr M., Graf H.: *Pharmaceuticals* *14*, 985 (2021).
4. Heuschkel K., Kuypers K.P.C.: *Front Psychiatry* *11*, 224 (2020).
5. Johnson M.W., Griffiths R.R.: *Neurotherapeutics* *14*, 734 (2017).
6. Choinska M., Hrdlicka V., Sestakova I., Navratil T.: *Monatsh. Chem.* *152*, 35 (2021).

## Electrochemical Techniques in Monitoring of Nervous System Drugs Elektrochemické techniky při monitoringu léčiv nervového systému)

Marta Choínska-Młynarczyk <sup>a,b</sup>, Vojtěch Hrdlička <sup>a</sup>, Jana Skopalová <sup>c</sup>, Renáta Šelešovská <sup>d</sup>,  
Viliam Kolivoška <sup>a</sup>, and Tomáš Navrátil <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: navratil@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

<sup>c</sup> Palacký University Olomouc, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry,  
17. Listopadu 1192/12, 779 00 Olomouc, Czech Republic

<sup>d</sup> University of Pardubice, Faculty of chemical technology, Institute of Environmental and  
Chemical Engineering, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic

### Abstract

Drugs of the nervous system (ATC group N) belong generally to the most commonly (mis)used substances worldwide. Their determination and monitoring of these drugs and their metabolites in various body fluids or environmental matrices represent a challenge for analytical chemists. Our research is focused on the application of electrochemical methods in the monitoring of the most frequently prescribed and the newly introduced nervous system drugs of precisely specified structures and/or of defined properties. For toxicological and pharmacokinetic reasons, emphasis has been placed on investigating the reaction mechanisms of their metabolite formation. New or alternative to commonly used electroanalytical methods applicable for monitoring and characterization of target compounds in their pure state, in body fluids, wastewaters, and other environmental matrices, has been developed. To improve the chemometric parameters and sensing characteristics, attention was paid to the construction of new electrochemical sensors, detectors (e.g. screen-printed, 3D printed), or cells, based on (modified/unmodified) traditional or nontraditional materials, preferably usable at the point-of-care.

**Keywords:** Nervous system drugs, Active pharmaceutical ingredient, Metabolites, Electrochemistry, Electrode materials, Body fluids, Biologically active compounds.

### Introduction

The human nervous system can be affected by a wide range of diseases and medical conditions. For the treatment of psychiatric and neurologic patients, more than 200 drugs are available which have been discovered and developed during the last 60 years <sup>1</sup>. Due to different definitions of terms used in literature by various authors and in different laws, it is very complicated to differentiate between the terms „drug“ (defined in the US) and "medicinal product" (defined by EU laws). Nevertheless, in this text, the term "drug" can be used for the term "medicinal product" as well as "active pharmaceutical ingredient".

In psychiatry and neurology, patient populations that may particularly benefit from precise drug determination are children, adolescents, pregnant women, elderly patients, and individuals with intellectual disabilities, among others <sup>1</sup>. Therefore, monitoring and determination of drugs and their metabolites are relevant in many areas of medicinal, analytical, and environmental chemistry, biochemistry, pharmacy, etc., e.g.:

- a) In the field of drug development and production, where it is necessary to determine the precise content of active pharmaceutical ingredients (APIs) that a drug should contain.

- b) Another important area of drug analysis is “therapeutic drug monitoring” (TDM), i.e., the quantification and interpretation of drug and their metabolite concentrations in body fluids (urine, blood, etc.) to optimize pharmacotherapy. Information on doses of drugs in the human body is of high importance because it can be used to reduce side effects, in the case of antidepressants it is possible to mention: e.g., loss of libido, inability to orgasm, nausea, headache, apathy, loss of motivation, vivid dreams, nightmares, hypotension, dizziness or weight gain. TDM considers the interindividual variability of pharmacokinetics and thus enables personalized pharmacotherapy<sup>1, 2</sup>. Non-response at therapeutic doses, uncertain drug adherence, suboptimal tolerability, or pharmacokinetic drug-drug interactions are typical indications for TDM. However, the potential benefits of TDM to optimize pharmacotherapy can only be obtained if the method is adequately integrated into the clinical treatment process<sup>1</sup>.
- Moreover, many drug metabolites actively contribute to the overall clinical effect of the parent compound. Therefore, the knowledge of formed active and inactive metabolites and quantification of the parent drug, play important roles in TDM. In the case of many newly introduced drugs, the information about their metabolism is missing<sup>3</sup>.
- c) Determination of the selected APIs and/or of their metabolites in body fluids can provide an answer, to whether the desired drug has been administered or not (e.g. in the case of psychiatric patients who refuse drug administration).
- d) The last step in the fate of any drug consists in its release into the environment (via urine, feces, etc.) in unchanged form (e.g., in the USA, there were about 250 million antidepressant prescriptions in the year 2010, which represents a great environmental burden). Moreover, some of the investigated APIs or their combinations are toxic, mutagenic, or carcinogenic<sup>4</sup>. Therefore, it is necessary to monitor their levels in waste, rivers, and drinking waters.
- e) Drug and metabolite analyses play important role in toxicology too. According to the papers and annual reports of the Czech Toxicological Information Center (TIC)<sup>5, 6</sup>, the nervous system drugs (N group according to the Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification system<sup>7</sup>) have been the most frequent cause of calls to the Czech TIC, i.e., more than 12.2 % (ca. 29 200) of all calls (ca. 240 000) and 31.2 % of all calls dealing with drugs (ca. 93 000) since 2005. The drugs from the N group were (mis)used in suicide attempts in more than 55 % of cases, accidentally in 19.3 %, and in ca. 9 % of cases, it was a medical error. The importance of N-drug intoxications can be also documented by the number of calls made by physicians (86.4 %). Calls regarding groups N05 (psycholeptics) and N06 (psychoanaleptics), which will be investigated in this project, have represented more than 35 % of all N-group calls and 11 % of all drug calls. The seriousness of poisoning by drugs in these groups can be documented by the fact that ca. 90 % of calls have been done by physicians (lethal dose in ca. 250 cases, serious or very serious symptoms ca. 11 %).

The electrochemical methods (ECM) or electrochemical detectors have not been so widely used for the determination of N-group drugs in practice (excluding, e.g., benzodiazepines with reducible azomethine group, drugs containing other electrochemically active nitro groups, N-oxide and carbonyl groups<sup>8</sup>, which were previously studied).

## Experimental part

### Working electrodes

The material of the working electrode plays a crucial role across various electroanalytical techniques. Among others, we used the following types of electrodes:

- a) **3D printed electrodes.** 3D printing (or additive manufacturing) belongs to the most

promising approaches toward simple, rapid, and inexpensive production of various sensors, electrodes, and cells<sup>9-13</sup>, with prospective use for the determination of various nervous drugs and their metabolites<sup>14, 15</sup>. 3D printable sensors are highly customizable<sup>16</sup> and can be (mass)produced in many unique geometries. For electroanalytical applications, 3D printing has been used for the production of various electrodes, flow cells, channel-flow, and wall-jet electrodes, e.g., for trace analysis. 3D printed cells with low internal volume and large working electrode surface are worth as a tool for sensitive detection of electroactive drugs, for the study of electrochemically generated products of their redox reactions in EC-MS system<sup>17</sup>.

- b) **Boron-doped diamond electrodes.** Mercury-containing (liquid dropping, hanging, or solid amalgam) electrodes are limited in their application in the positive potential region. This disadvantage can be solved by their substitutions e.g. by boron-doped diamond electrodes (BDDE) with a wide potential window<sup>18-24</sup>. These electrodes can be successfully used for nervous drug determinations<sup>24, 25</sup>. Some properties (electron transfer, redox potential, complexation abilities) can be changed by their modifications (e.g., using nanoparticles of Au, Ag, Pd). The introduction of screen-printed boron-doped diamond electrodes (SP-BDDE) is a promising tool for medicinal purposes as well<sup>26, 27</sup>.
- c) **Mercury-based electrodes.** The application of electrodes based on liquid mercury in medicinal practice seems to be very complicated due to its toxicity. On the other hand, it has been undoubtedly scientifically proved that amalgam is not a toxic material. However, waste material from disposable amalgam SPEs could represent a significant environmental burden. Nevertheless, bare<sup>28</sup>, or modified<sup>29</sup> solid amalgam electrodes are suitable to replace (in most cases ideal) liquid mercury electrodes in research laboratories<sup>30</sup> in the elucidation of reaction mechanisms, metabolite formations, etc. Cheap amalgams could replace expensive gold in enzymatic reactors<sup>31, 32</sup> used for TDM too.

#### *Analysis of real samples, separation techniques - Hollow-fiber microextraction*

The added excipients can present a huge complication disturbing API determination. They must be filtrated or separated by similar processes. Either drugs or their metabolites can be bound to various proteins (enzymes, transporters, carrier proteins, etc.). We devoted our attention to the application of hollow-fiber microextraction (HF-LPME)<sup>33</sup> to pre-concentrate the analyte from a biological sample and remove interferences. Three-phase HF-LPME is used for extraction of ionizable analytes from donor solution in its neutral form across a supported liquid membrane to acceptor solution, where the analyte is present in its ionized form, entrapping and pre-concentrating the analyte<sup>34, 35</sup>. Acceptor solutions can be analyzed by voltammetric techniques without any additional treatment.

#### *Additional data on analytes - ion transfer voltammetry*

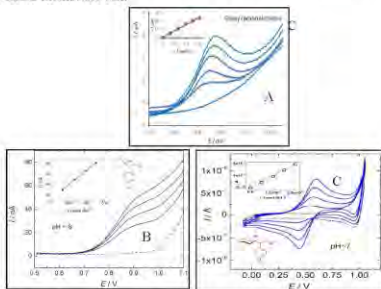
Protolytic and partitioning equilibria are essential for the evaluation of the bioavailability of drugs. There is a lack of information on experimental physicochemical parameters of some N-group drugs, especially of the atypical and newly introduced ones. The methodology based on ion transfer voltammetry (ITV) at supported room-temperature ionic liquids (RTILs) membrane, to the development of which the applicant's laboratory substantially has contributed, can provide a broad range of both theoretical and practical results of the electrochemical or analytical significance (estimation of the standard Gibbs energies of ion transfer from water to RTIL, to establish a scale of the absolute potential differences, etc.<sup>36, 37</sup>. The obtained results on N-drugs can be supported by available DFT calculations<sup>36</sup>.

#### *Investigated drugs*

We focus our attention on the most frequently prescribed nervous system drugs in the Czech Republic<sup>5</sup>, modern, newly introduced ones, and atypical antipsychotics<sup>38</sup>. We focused on the following APIs: a) Electrochemically active; b) containing nitrogen heterocycles, c) containing protonatable nitrogen; d) quaternary (nitrogen) bases; extractable using HIL-LPME; complexable (ionizable) using some heavy metal cations (e.g.,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Au}^+$ ,  $\text{Au}^{3+}$ ).

## Results and Discussions

As an example of realized experiments, we can demonstrate voltammograms of the drug venlafaxine, recorded using a glassy carbon electrode, the carbon filament electrode, and the TDMA-TFPB membrane cell.



**Fig. 1:** A) DP voltammograms of venlafaxine recorded using the glassy carbon electrode; B) DP voltammograms of venlafaxine recorded using the carbon filament electrode; C) Cyclic voltammograms of Venlafaxine recorded using the TDMA-TFPB membrane cell.

## Conclusions

The development of new sensors/electrodes/cells/systems and hyphenated systems for TDM and analysis of drugs and their metabolites is one of the most important trends in modern analytical chemistry. ECMs can be extremely useful not only as the alternative analytical methods, but e.g. in the elucidation of metabolites formation, and reaction mechanisms in human bodies. The main advantages of ECMs are low investment and running costs, simplicity, portability, and easy miniaturization and applicability at point-of-care. Therefore, great attention in this project will be focused on new electrode materials as well as on surface pretreatment or modification of traditional bare electrodes to improve their sensing properties.

## Acknowledgments

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

## References

- Hiemke C., et al: *Pharmacopsychiatry* 51, 9 (2018).
- Schoretsanitis G., et al: *World J. Biol. Psychia.* 19, 162 (2018).
- Peters F. T.: *Bioanalysis* 6, 2083 (2014).

4. <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/Classifications.AlphaOrder.pdf>
5. TIC; Toxicological Information Centre: Prague, 2022.
6. Urban M., Navrátil T., Pelcova D.: *Neuroendocrinol. Lett.* **34**, 25 (2013).
7. [https://www.whooc.no/ate/structure\\_and\\_principles/](https://www.whooc.no/ate/structure_and_principles/), Downloaded: 1.4.2021.
8. Kalvoda R.: *Anal. Chim. Acta* **162**, 197 (1984).
9. Escobar J. G., et al.: *Electrochim. Acta* **360**, 136984 (2020).
10. Poltorak L., Rudnicki K., Kolivoska V., Sebechlebska T., Krzyczmonik P., Skrzypek S.: *J. Hazard. Mater.* **402** (2021).
11. Vaneckova E., Bousa M., Lachmanova S. N., Rathousky J., Gal M., Sebechlebska T., Kolivoska V.: *J. Electroanal. Chem.* **857**, 113745 (2020).
12. Vaneckova E., et al.: *J. Electroanal. Chem.* **858**, 113763 (2020).
13. Vaneckova E., Bousa M., Vivaldi F., Gal M., Rathousky J., Kolivoska V., Sebechlebska T.: *J. Electroanal. Chem.* **857**, 113760 (2020).
14. Choinska M., Hrdlicka V., Sestakova L., Navratil T.: *Monatsh. Chem.* **152**, 35 (2021).
15. Palenzuela C. L. M., Pumera M.: *TrAC - Trends Anal. Chem.* **103**, 110 (2018).
16. Rusling J. F.: *ACS Sensors* **3**, 522 (2018).
17. Jaklova Dyrtrtova J., Jakl M., Navratil T., Cvačka J., Czech Republic.
18. Selesovska R., Krankova B., Stepankova M., Martinkova P., Janikova L., Chylkova J., Vojs M.: *J. Electroanal. Chem.* **821**, 2 (2018).
19. Swain G. M., Ramesham R.: *Anal. Chem.* **65**, 345 (1993).
20. Schwarzova-Peckova K., Vosahlova J., Berek J., Sloufova I., Pavlova E., Petrak V., Zavazalova J.: *Electrochim. Acta* **243**, 170 (2017).
21. Chylkova J., Tomaskova M., Janikova L., Selesovska R., Navratil T., Chudobova P.: *Chem. Pap.* **71**, 1047 (2017).
22. Nemeckova-Makrlikova A., Navratil T., Berek J., Stenclova P., Kromka A., Vyskocil V.: *Anal. Chim. Acta* **1087**, 44 (2019).
23. Samiec P., Svorec L., Stankovic D. M., Vojs M., Marton M., Navratilova Z.: *Sensor. Actuat. B-Chem.* **245**, 963 (2017).
24. Selesovska R., Krankova B., Stepankova M., Martinkova P., Janikova L., Chylkova J., Navratil T.: *Monatsh. Chem.* **149**, 1701 (2018).
25. Selesovska R., Hlobenova F., Skopalova J., Cankar P., Janikova L., Chylkova J.: *J. Electroanal. Chem.* **858** (2020).
26. Matvieiev O., et al.: *Biosensors* **12**, 241 (2022).
27. Selesovska R., et al.: *Electrochim. Acta* **403**, 139642 (2022).
28. Navratil T., Yosypchuk B., Fojta M., Czech Republic.
29. Yosypchuk B., Marecek V.: *J. Electroanal. Chem.* **653**, 7 (2011).
30. Yosypchuk B., Navratil T., Berek J., Peckova K., Fischer J., *Progress on Drinking Water Research*; (Lefebvre M. H., Roux M. M., Eds.), Nova Sci. Pub., New York, 2009.
31. Tvorynska S., Berek J., Josypchuk B.: *Electroanalysis* **31**, 1901 (2019).
32. Tvorynska S., Berek J., Josypchuk B.: *J. Electroanal. Chem.* **860**, 113883 (2020).
33. Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K. E.: *Anal. Chem.* **71**, 2650 (1999).
34. Hrdlicka V., Berek J., Navratil T.: *Talanta* **221**, 121594 (2021).
35. Hrdlicka V., Navratil T., Berek J.: *J. Electroanal. Chem.* **835**, 130 (2019).
36. Langmaier J., Zalis S., Samec Z.: *J. Electroanal. Chem.* **815**, 183 (2018).
37. Langmaier J., Skopalová J., Navrátil T., Samec Z.: *Electrochim. Acta* **304**, 54 (2019).
38. Kul D.: *Curr. Anal. Chem.* **15**, 240 (2019).

## Voltammetric Determination of Daminozide in Plant Material (Voltamtrické stanovení daminozidu v rostlinném materiálu)

Jaromíra Chýlková<sup>a</sup>, Alona Usenko<sup>a</sup>, Miloš Sedlák<sup>b</sup>, Jan Bartáček<sup>b</sup>, Jiří Cuhorka<sup>a</sup>, and Renáta Šelešová<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

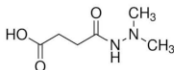
### Abstract

A new procedure for the determination of daminozide in plant material was proposed. The plant sample is dried in a vacuum oven at 50°C and 9 mbar pressure to constant weight. 96 % ethanol is used to isolate the analyte from the organic matrix under ultrasonication for 2 minutes. This is followed by filtration of the resulting suspension and isolation of the daminozide from the filtrate using Amberlite® IRC120 H catex in an H<sup>+</sup> cycle. The analyte is displaced from the ion exchange with a weakly alkaline NaCl solution at a concentration of 1 mol L<sup>-1</sup>. The voltammetric analysis of daminozide is performed by anodic oxidation in 0.1 mol L<sup>-1</sup> chloroacetate buffer of pH 3.2 using a boron-doped diamond electrode.

**Keywords:** Plant growth regulator, Daminozide, Voltammetry, Boron-doped diamond electrode.

### Úvod

V České republice lze používat k ošetření rostlin pouze ty přípravky, které jsou obsaženy v Registru povolených přípravků na ochranu rostlin<sup>1</sup>, který vede Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ). Tato databáze zahrnuje jednak přípravky registrované v České republice a souběžně také dovážené přípravky podle zákona č. 326/2004 Sb. o rostlinolékařské péči<sup>2</sup>. Databáze je pravidelně aktualizována. Použití daminozidu (Obr. 1, kyselina 4-(2,2-dimethylhydrazinyl)-4-oxobutanová) je povoleno ve formě dvou přípravků, a to Alar 85 SG a B-Nine SG. V zahradnické praxi se daminozid často používá, protože způsobuje retardaci růstu. Rostliny jsou silně, zdravě, odolné proti usychání a stresu vlivem transportu. Od roku 1963 se daminozid také používá v některých zemích pro zlepšení sklizně ovocných stromů (zejm. jabloní) nebo zeleniny (např. rajčat).



**Obr. 1.** Strukturní vzorec daminozidu.

Daminozid je ve vodě poměrně dobře rozpustný, a proto je v rostlinách velmi mobilní a snadno se dostává do všech jejích částí. Aplikace tohoto růstového regulátoru v případě jabloní podporuje růst květů, předchází předčasnému opadávání plodů a zlepšuje velikost, rozvoj barvy a skladovací vlastnosti jablek<sup>3-5</sup>. Bylo potvrzeno, že rezidua daminozidu mohou být v jablekách detekována až rok po jeho aplikaci<sup>6</sup>. Organizace EPA rozhodla již v roce 1989, že používání přípravků obsahujících daminozid u rostlin, které slouží ke konzumaci, je zakázáno s odůvodněním, že dlouhodobá expozice představuje nepřijatelné riziko pro veřejné zdraví<sup>7</sup>. V červnu 1989, předtím než předběžně rozhodnutí EPA o zákazu veškerého použití přípravku

Alar v potravinách vstoupilo v platnost, však společnost Uniroyal (jediný výrobce) souhlasila s dobrovolným zastavením veškerého domácího prodeje tohoto přípravku pro potravinářské účely.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem, je třeba mít k dispozici citlivou a operativní metodu stanovení daminozidu, a to i ve složitě rostlinné matici.

### Experimentální část

Ke stanovení daminozidu byl využíván elektrochemický analyzátor EP 10/VA (HSC servis, Bratislava). Měřicí článek se skládal s pracovní elektrody z borem dopovaného diamantu (BDDE, Windsor Scientific Ltd., Velká Británie), referenční argentchloridové 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 +1000 až +2000 mV při rychlosti polarizace 40 mV s<sup>-1</sup>. Tyto podmínky byly převzaty z práce<sup>8</sup>.

Reálné vzorky rostlinného materiálu byly připraveny z listů pelargónie. Ty byly předem vysušeny v sušárně Heraeus vacutherm VT 6025 (výrobce Kendro Laboratory Products LP, USA) při teplotě 50 °C za sníženého tlaku (9 mbar, membránová vývěva ILMVAC FB65453; ILMVAC GmbH, Německo). Sušení probíhalo do konstantní hmotnosti, která byla opakovaně ověřována na laboratorních vahách Ohaus pioneer PA2021C (OHAUS CORPORATION USA) do shody na 0,1 g ve třech po sobě jdoucích měřeních v rozmezí 1 h. Izolace daminozidu z rostlinných vzorků o hmotnosti cca 0,1 g sušených listů pelargónie byla prováděna pomocí čistého ethanolu (96 %). Lach-Ner, Česká republika) za působení ultrazvuku po dobu 2 min. Vzniklá suspenze byla po usazení filtrována přes skelnou vatu. Z alkalitní části výluhu byl daminozid získán pomocí 1 g katexu Amberlite<sup>®</sup> IRC120 H v H<sup>+</sup> cyklu ve statickém uspořádání. Záchyt probíhal při laboratorní teplotě 1 h za míchání rychlostí 250 ot/min. Poté byl ionex oddělen, promyt vodou a následně extrahován 5 ml 1 mol L<sup>-1</sup> NaCl s přísadou 0,01 mol L<sup>-1</sup> NaOH při teplotě 70 °C za míchání po dobu 20 min. Získaný výluh byl podroben voltametrické analýze.

Vodná suspenze rostlinné matrice o objemu cca 10 mL byla podrobena vsádkové nanofiltraci na membráně Nadir NP010, Microdyn-Nadir, MANN+HUMMEL Water & Fluid Solutions, G. Aktivní vrstva této membrány je vyrobená z polyethersulfonu a její rozdělovací schopnost (MWCO) je dle výrobce v rozmezí 1000 až 1200 g/mol. Experiment byl prováděn za účelem eliminace vlivu přírodních látek na stanovení daminozidu. Použitá aparatura byla tvořena válcovou nádobou, do které bylo odměřeno 10 mL suspenze. Na dno byla vložena kruhová membrána o ploše 20 cm<sup>2</sup> a k vrchní části byl přes redukční ventil přiveden tlakový vzduch. Na tlakovém ventilu byly nastaveny 2 bary. V důsledku zanášení membrány a nízké hodnoty tlakového rozdílu (zejména s ohledem na použitou nanofiltrační membránu) trvala separace přibližně 30 min. Vzorek permeátu byl následně analyzován.

### Výsledky a diskuse

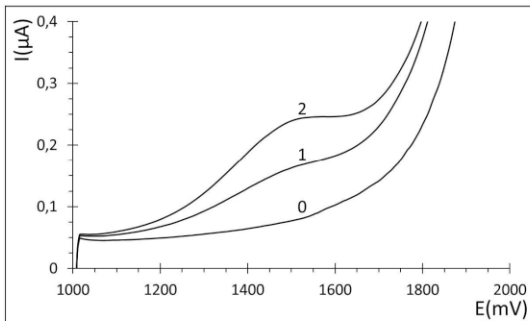
Prvotní experimenty ukázaly, že přímá analýza daminozidu ve vodném či ethanolickém výluhu listů pelargónie za podmínek publikovaných v práci<sup>8</sup> není možná, protože je ovlivňována přítomností rušivých složek pocházejících z rostlinné matrice. Jejich vlivem dochází ke změně polohy a tvaru oxidačního píku analytu, a to tím více, čím děle organická matrice v analyzovaném roztoku působí. Nakonec se záznam stane pro daminozid nevyhodnotitelný.



K přípravě modelových směsí byl použit vzorek B-Nine, který obsahuje daminozid ve formě rozpustné ve vodě.

Pokud se stanovení daminozidu provádí v prostředí slabě kyselém, například v  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  Brittonově-Robinsonově pufru o pH 3,5, posune se pik této látky k méně pozitivním potenciálům s maximem okolo 1390 mV a je dobře vyhodnotitelný. Přítomnost organické matrice opět posune signál k pozitivnějším hodnotám potenciálu, a navíc se tento stane nestabilní. Za účelem eliminace rušivého vlivu látek obsažených v rostlinném extraktu na stanovení daminozidu byly testovány možnosti jejich odstranění ze vzorku s využitím nanofiltrace. Ani v tomto případě nebylo dosaženo uspokojivých výsledků.

Výše diskutovaný problém se podařilo vyřešit až zavedením dalšího kroku do zpracování rostlinného materiálu, a to izolace daminozidu z ethanolického roztoku obsahujícího rozpuštěné a nerozpuštěné zbytky rostlinné hmoty pomocí silně kyselého katexu v  $\text{H}^+$  cyklu a následného vytěsnění analytu roztokem  $1 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl s přísadou  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH. Na uvedeném obrázku 2 jsou znázorněny křivky získané při voltametrické analýze 1 ml roztoku výluhu z ionexu pomocí přidavku standardu daminozidu. Při opakovaném stanovení obsahu pesticidu v modelových vzorech rostlinného materiálu, obohacených přidavkem standardu daminozidu na známou koncentraci, výše uvedeným postupem se výtěžnost navržené metody pohybovala v rozmezí od 99 % až 107,2 % což dává reálný předpoklad jejího využití v praxi.



**Obr. 2.** DP voltamogramy daminozidu po izolaci z organické matrice (elektrolyt –  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  chloroctanový pufr o pH 3,11,  $E_{\text{pot}} = +800 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{kon}} = +2200 \text{ mV}$ ,  $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$ , amplituda pulzu  $= +50 \text{ mV}$ , šířka pulzu 80 ms); 0 – křivka základního elektrolytu, 1 – křivka vzorku, 2 – křivka vzorku s přidavkem standardu.

### Závěr

V rámci této práce byl vypracován postup izolace daminozidu z rostlinné matrice za účelem následného voltametrického stanovení. Z ethanolického extraktu vysušené a rozemleté zelené matrice je daminozid izolován pomocí silně kyselého katexu v  $\text{H}^+$  cyklu ve statickém

uspořádání. Po izolaci ionexu je analyt vytěsněn pomocí koncentrovaného roztoku chloridu sodného. Tímto způsobem dojde nejen k nakoncentrování analyzované látky, ale také k eliminaci podstatné části rozpustných rušivých látek pocházejících z rostlinné matrice. Získaný roztok lze použít k voltametričkému stanovení daminozidu.

#### Acknowledgments

Tato práce byla vypracována za finanční podpory Grantové agentury ČR (projekt č. 20-01589S) a Univerzity Pardubice (projekt č. SGSFChT\_2022\_001).

#### References

1. Vyhláška č. 132/2018 Sb., o přípravcích a pomocných prostředcích na ochranu rostlin, Sbírka zákonů 2018, částka 67, str. 1714.
2. Zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a změně některých souvisejících zákonů, Sbírka zákonů 2018, částka 106, str. 6618.
3. Fan A.M., Jackson R.J.: Regul. Toxicol. Pharmacol. 9, 158 (1989).
4. Brinkman J.H.W., Dijk A.G., Wagenaar R., Quirijns J.K.: J. Chromatogr. A 723, 355 (1996).
5. Mol H.G.J., Dam R.C.J., Vreeken R.J., Steijger O.M.: J. Chromatogr. A 833, 53 (1999).
6. Drake S.R., Eisele T.A., Baranowski J.D.: J. Food Saf. 11, 247 (1991).
7. Environmental Regulation: Law, Science, & Policy by Percival, et al. 4, 391 (1989).
8. Usenko A., Chýlková J., Šelešovská R., Sedlák M., Vaňha J., Bartáček J., Mikysek T.: J. Electroanal. Chem. 904, 115857 (2022).

## Carbon Paste Electrodes for Electroanalysis in Nonaqueous Media

Granit Jashari, Ivan Švancara, and Milan Šýs

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

### Abstract

The aim of this special study was to find out the relationship between the composition of carbon pastes and their stability in purely organic solvents and aqueous-organic mixtures. Scanning electron microscopy and cyclic voltammetry of 1 mmol L<sup>-1</sup> ferrocenium/ferrocene redox couple served as the tools of choice for this purpose. The results obtained suggest one that it is not possible to prepare a universal carbon paste electrode that would be applicable in voltammetric measurements independently of the character and composition of the working medium.

**Keywords:** Carbon paste electrode; Organic solvent; Surfactant; Ferrocene

### Introduction

Carbon paste electrodes (CPEs) belong to a special group of heterogeneous carbon electrodes which are generally prepared by combining a carbonaceous material and an organic binder<sup>1</sup>. Their utilization in voltammetric measurements performed in purely organic solvents or aqueous-organic mixtures depends on the choice of both main components and eventual modifiers/stabilizers, especially surfactants<sup>2</sup>. Thus, the actual composition of carbon pastes has a fundamental influence upon their final mechanical and electrochemical properties<sup>3</sup>. The simplified classification of the type of CPEs according to their composition and possibilities of use is described below in the individual paragraphs. This work is devoted to the detailed characterization of CPEs for measurements in nonaqueous media.

Assuming an optimal ratio between the two main components, the mechanical stability of CPEs prepared from commercially marketed graphite powders depends only on the type of organic binder. If one considers that mineral (paraffin) or silicone oils represents the most frequently used organic binders, the properties and electrochemical performance of conventional CPEs are being tailored to measurements in purely aqueous media. Unfortunately, it is well known that the content of water-miscible organic solvents higher than *ca.* 5% (*v/v*) causes irreversible disintegration of the carbon paste electrode material<sup>4</sup>.

The required stability of CPEs in the working media can be achieved by simply replacing the sheets (almost planar particles) of natural or spectroscopic graphite powder with glassy carbon powder (spherical particles). Generally, glassy carbon paste electrodes (GCPEs) made of the latter type can be used for voltammetric measurements even in media with a high content of organic solvent (e.g., methanol) up to 90% (*v/v*)<sup>5</sup>.

Carbon pastes prepared by dispersion of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) or single-walled nanotubes (SWCNTs) in mineral oil represent yet another type of heterogeneous electrode material which resembles a glassy carbon paste in its consistency and mechanical properties<sup>6</sup>. Such carbon nanotubes paste electrodes (CNTPEs) exhibit an excellent electrocatalytic activity toward clinically important compounds due to unique properties of the nanomaterials present, which include high conductivity and specific surface area<sup>7</sup>. However, their mechanical and electrochemical properties in aqueous-organic mixtures and pure organic solvents have not been yet investigated in detail.

Electrodes obtained by homogenization of reduced graphene oxide with an organic binder (GrPEs) are characterized by similar mechanical and electrochemical properties like the previously introduced analogs with nanotubes. In general, it can be noted that conventional CPEs modified with a low content of these nanomaterials (usually ranging from 10 to 50%, w/w) are more preferred due to a relatively high acquisition cost of nanomaterials <sup>8</sup>.

As deduced, all the above-mentioned types of CPEs cannot be selected for voltammetric measurements in purely organic solvents. In the mid-1960s, a research team around Adams published a pioneering paper <sup>2</sup> describing a bulk-modification of conventional carbon pastes with high amount of sodium dodecyl sulfate (SDS) as a practical way to achieve the required stability and favorable electrochemical properties in pure organic solvents, such as acetonitrile, nitromethane, and propylene carbonate. Since then, however, other works of this focus have not appeared and these so-called nonaqueous carbon paste electrodes have been forgotten for a long time <sup>3,9</sup>.

### Experimental part

Ferrocene, pure acetonitrile (MeCN) for HPLC, anhydrous lithium perchlorate, SDS, and sodium dodecylbenzenesulfonate (SDBS), and mineral oil (MO) were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Glassy carbon powder with particle size of 5–20  $\mu\text{m}$  from HTW Hochtemperatur Werkstoffe (Thierhaupten, Germany) and graphite powder with particle sizes of  $\geq 5 \mu\text{m}$  from Graphite Týn, (Týn nad Vltavou, Czech Republic) were chosen for preparation of CPEs. A deionized water of resistivity 18.3 M $\Omega$  cm was obtained from Millipore Milli-Q<sup>®</sup> purification unit purchased also from Merck KGaA.

A set of carbon paste electrodes, differing in the type of carbon materials, organic binder, surfactants, and their contents, were prepared by homogenization in a ceramic mortar for 15 min. The resulting nonaqueous pastes were manually pushed into cavities of the corresponding Teflon<sup>®</sup>-piston holders. The surfaces of obtained CPEs were renewed by wiping with a dry filter paper.

Scanning electron microscopy (SEM) for imaging the microstructures of nonaqueous CPEs was carried out using Vega3 SBU from TESCAN Brno (Brno, Czech Republic). A conventional three-electrode cell, consisting of a glassy carbon electrode (GCE) or nonaqueous CPE (both of surface diameter 3 mm) (working), saturated calomel electrode (SCE) with 0.1 mol L<sup>-1</sup> LiClO<sub>4</sub> in MeCN as salt bridge (reference) and platinum sheet (auxiliary), were connected to the AUTOLAB PGSTAT101 potentiostat/galvanostat from Metrohm Česká republika s.r.o. (Prague, Czech Republic), which was operated through NOVA 1.11 software.

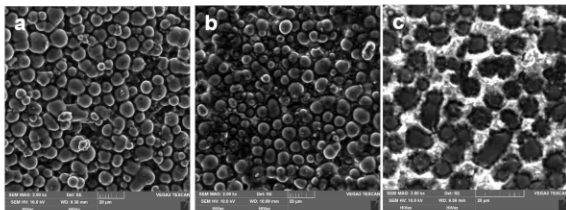
All voltammetric measurements were performed in pure MeCN and its mixtures with water, both containing 0.1 mol L<sup>-1</sup> LiClO<sub>4</sub>. Linear sweep voltammetry (LSV) with a scan rate ( $\nu$ ) of 50 mV s<sup>-1</sup> and potential step ( $E_{\text{step}}$ ) of 5 mV was employed for the determination of limiting values of the anodic ( $E_{\text{lim}}^{\text{a}}$ ) and cathodic potentials ( $E_{\text{lim}}^{\text{c}}$ ). Cyclic voltammetry of 1 mmol<sup>-1</sup> ferrocenium/ferrocene redox couple was carried out in a potential range from -0.4 to +1.0 V vs. SCE at a scan rate varying from 200 to 2000 mV s<sup>-1</sup> and the  $E_{\text{step}}$  of 5 mV.

### Results and discussion

As shown in Fig. 1, no difference in the structures of glassy carbon pastes containing only 20% (w/w) MO and 20% (w/w) MO with 10% (w/w) SDS was observed, when the individual carbon particles remained in intimate contact. Unlike the paste with a high SDS content (see Fig. 1c),

where the particles were evidently more scattered, which resulted in a low electrical resistance ( $R = 41 \Omega$ ) and high stability in organic solvents due to the presence of the surfactant.

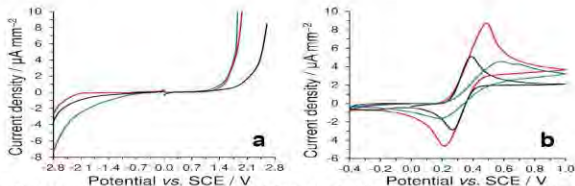
For comparison, a nearly identical resistance value of about  $40 \Omega$  was measured for a carbon paste prepared from natural (chemically purified) graphite<sup>4</sup>, 20% (w/w) MO and 30% (w/w) SDS. It is well-known from the literature that the limiting amount of organic binder in carbon pastes depends only on the type of carbon material used<sup>6,10</sup>. Because the surfactants dissolve in the organic binder, it should be clear that their amount is in close relation with the choice of carbon material.



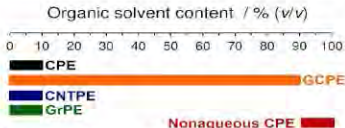
**Fig. 1.** SEM images of bare GCPE (a), GCPE modified with 10% (w/w) SDS (b), and GCPE modified with 30% (w/w) SDS, all containing the same amount of MO (20% w/w).

As evident from polarization curves in Fig. 2a, nonaqueous CPEs could be used for voltammetric measurements in a wide potential range, as well as commercially available GCE. In addition to the preferred SDS<sup>2,3</sup>, other surfactants can also be used as suitable modifiers (Fig. 2b). Generally, electrochemical inertness in the required potential range can be considered as the main criteria for the selection of a surfactant<sup>3</sup>.

To achieve optimum peak separation ( $\Delta E_p \leq 80$  mV) of ferrocenium/ferrocene redox couple<sup>3</sup>, different nonaqueous CPEs with constant content of MO (20% w/w) have to the following composition: 20% SDS for spectroscopic graphite, 10% SDS for glassy carbon powder, and 10% SDS for MWCNTs, all in w/w. Comparable electrochemical properties of nonaqueous CPEs with solid GCE was obtained for voltammetric measurements in purely pure organic solvents with a maximum water content up to 10% (v/v). An illustrative diagram of CPEs utilization according to the content of organic solvent in the working medium / electrolyte is shown in Fig. 3.



**Fig. 2.** **a)** Polarization curves obtained for GCE (black), GCPE modified with 15% (w/w) SDS (red), and CPE modified with 30% SDS (blue curves), both paste-based electrodes contained 20% (w/w) MO, in pure MeCN containing  $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ LiClO}_4$  at scan rate of  $50 \text{ mV s}^{-1}$  and potential step of 5 mV. **b)** Cyclic voltammograms of  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  ferrocenium/ferrocene redox couple recorded on GCE (black), GCPE modified with 15% (w/w) SDS (red), and CPE modified with 30% SDS (blue curves), both paste-based electrodes contained 20% (w/w) MO, in pure MeCN containing  $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ , scan rate  $50 \text{ mV s}^{-1}$  and potential step of 5 mV.



**Fig. 3.** Utilization of various carbon paste electrodes according to the content of organic solvent.

### Conclusions

Based on the observation and results presented above, it can be laconically stated that there is no (universal) carbon paste electrode that could be used simultaneously in both purely aqueous and non-aqueous environments.

### Acknowledgments

This work was financially supported by the Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice (project No. SGS-2022-002).

### References

- Adams R. N: *Anal. Chem.* **30**, 1576 (1958).
- Marcoux L. S., Prater, K. B., Prater, B. G., Adams R. N.: *Anal. Chem.* **37**, 1446 (1965).
- Jashari G., Švancara I., Šys M.: *Electrochim. Acta* **110**, 140047 (2022).
- Švancara I., Vytřas K., Renger F., Smyth M. R.: *Electrochim. Acta* **37**, 1355 (1992).
- Dejmková H., Zima J., Barek J., Mika J.: *Electroanalysis* **24**, 1766 (2012).
- Mikýšek T., Stožes M., Švancara I., Ludvík J.: *RSC Adv.* **2**, 3684 (2012).
- Rubianes M. D., Rivas G. A.: *Electrochem. Commun.* **5**, 689 (2003).
- Gasnier A., Pedano M. L., Rubianes M. D., Rivas G. A.: *Sens. Actuators B Chem.* **176**, 921 (2013).
- Žaběrková S., Mikýšek T., Červenka L., Šys M.: *Food Technol. Biotechnol.* **56**, 337 (2018).
- Mikýšek T., Švancara I., Kalcher K., Bartoš M., Vytřas K., Ludvík J.: *Anal. Chem.* **81**, 6327 (2009).

## Electroanalysis of *trans*-Anethole (Elektroanalýza *trans*-anetholu)

Granit Jashari, Michaela Frühbauerová, Tomáš Mikysek, Ivan Švancara, Radovan Metelka  
and Milan Sýs

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

### Abstract

A new electroanalytical procedure for the determination of *trans*-anethole was developed. The method is based on the anodic oxidation of the compound in acetonitrile at a carbon paste electrode modified with sodium dodecyl sulfate (40 % w/w). The mechanism of *trans*-anethole electrochemical oxidation was elucidated using a glassy carbon electrode. The voltammetric determination of *trans*-anethole under optimal conditions was characterized by the linear range of 2.3–196.1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , the sensitivity of 0.1122  $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ , and the detection limit of 0.7  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . The standard addition method was used to assay the analyte in spices and sweets and the results were in agreement with a reverse-phase HPLC.

**Keywords:** *trans*-Anethole, Carbon paste electrode, Sodium dodecyl sulfate, Differential pulse voltammetry.

### Úvod

Anethol (1-methoxy-4-(1-propenyl)benzen) je derivát fenypropenu, který se v přírodě vyskytuje v silicích aromatických rostlin. Jeho hlavním zdrojem je bedrník anýz (*Pimpinella anisum* L.), badyánik pravý (*Illicium verum*) a fenykl obecný (*Foeniculum vulgare*). Anethol tvoří dvě izomerní formy, kdy převažuje *trans*-anethol (90 %). Pouze tato forma se používá jako potravinářské aditivum, *cis*-anethol je prudce jedovatý<sup>1</sup>. Často se přidává do léčiv, kosmetiky, mýdel a do přípravků ústní hygieny. Uvádí se, že může pomáhat při léčbě autoimunitních onemocnění, revmatoidní artritidy, kornatění tepen, zánětlivých onemocnění střev, alergických onemocnění<sup>2</sup> a dokonce rakoviny<sup>3</sup>. *trans*-Anethol je považován za bezpečné potravinářské aditivum<sup>4</sup>, jeho denní dávka by neměla překročit 2 mg kg<sup>-1</sup>.

Analytické stanovení této látky ve vzorcích potravin, léčiv nebo kosmetiky se většinou provádí pomocí plynové<sup>5,6</sup> nebo kapalinové chromatografie<sup>7,8</sup>. Bylo popsáno pouze jedno voltamtrické stanovení *trans*-anetholu elektrochemickou oxidací na uhlíkové pastové elektrodě modifikované La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a borem dopované diamantové elektrodě<sup>9</sup>. V této práci autoři preferovali měření v octanovém pufru pH 6, i když rozpustnost *trans*-anetholu ve vodném prostředí je velmi malá, cca 750  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Z tohoto důvodu je vhodnější používat při extrakci vzorků čistá organická rozpouštědla, ve kterých se *trans*-anethol velmi dobře rozpouští. Předkládaný příspěvek popisuje využití uhlíkové pastové elektrody modifikované dodecylsíránem sodným (40 % hm.) pro elektroanalýzu *trans*-anetholu po jeho extrakci v čistém acetonitrilu s přídavkem 0,1 mol l<sup>-1</sup> LiClO<sub>4</sub>. Navržená metoda umožňuje jednodušší přípravu vzorků v porovnání s chromatografickými technikami, provedení analýzy na jednom povrchu elektrody bez další úpravy a kvantifikaci pomocí standardního přídatku. Elektrochemické stanovení *trans*-anetholu bylo provedeno ve vzorcích koření (fenykl a anýz) a cukrovinek (lékočicové pendreký a hašlerky) a porovnáno s referentní metodou RP-HPLC se spektrofotometrickou detekcí.

## Experimentální část

Pracovní uhlíková pastová elektroda CPE/SDS byla připravena homogenizací 0,4 g uhlíkového prášku s průměrem částic  $\geq 5 \mu\text{m}$  (Graphite Týn, Týn nad Vltavou, Česká republika), 0,2 g minerálního oleje a 0,4 g dodecylsírany sodného (vše Merck KGaA, Darmstadt, Německo). Uhlíková pasta byla poté vpravena do pístového teflonového držáku o průměru 3 mm. Před použitím byla elektroda obnovena vytlačněním menšího množství pasty a vyleštěním povrchu filtračním papírem. Mechanismus elektrochemické oxidace byl zkoumán s využitím rotační diskové elektrody ze skelného uhlíku o průměru 3 mm a cyklické voltametrie a lineární voltametrie v rozsahu 0 až +1,9 V v bezvodém acetonitrilu obsahujícím 500  $\mu\text{mol l}^{-1}$  *trans*-anetholu, 0,1 mol  $\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  nebo  $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$  při rychlosti skenu 100  $\text{mV s}^{-1}$  a otáčkách 500 a 1500. Reálné vzorky byly analyzovány diferenční pulzní voltmetrií (DPV) na CPE/SDS v čistém acetonitrilu s přidávkou 0,1 mol  $\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  v rozmezí 0 až +1,6 V ( $E_{\text{step}} = 10 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{amp}} = 60 \text{ mV}$ ,  $t_{\text{mod}} = 0,05 \text{ s}$  a  $t_{\text{int}} = 0,1 \text{ s}$ ). Pro kvantifikaci vzorků byla použita metoda vícenásobného standardního přidavku ze čtyřmi alikvoty 20  $\mu\text{l}$  0,01 mol  $\text{l}^{-1}$  *trans*-anetholu v čistém acetonitrilu. Všechna elektrochemická měření byla prováděna v tříelektrodeovém uspořádání společně s referenční nasycenou kalomelovou elektrodou s můstkem obsahující acetonitril s přidávkou 0,1 mol  $\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  nebo  $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$  a platinovou pomocnou elektrodou pomocí potenciostatu/galvanostatu PGSTAT101 a software Nova 1.11 (vše Metrohm Česká republika s.r.o., Praha, Česká republika).

Chromatografická sestava pro RP-HPLC analýzu obsahovala autosampler SIL 30AC, gradientovou pumpu LC 30AD, degasser DGU 20A5R, spektrofotometrický detektor s diodovým polem SPD M30A PDA a termostat kolony CTO 20AC (vše Shimadzu, Kjóto, Japonsko). Separace byla prováděna na koloně Ascentis® C18 (100 $\times$ 2,1 mm, velikost částic 3,0  $\mu\text{m}$ ) při teplotě 40 °C, mobilní fázi byla redestilovaná voda s kyselinou mravenčí (pH ~ 3,2) jako rozpouštědlo A a čistý acetonitril jako rozpouštědlo B s gradientovým profilem od 30 % do 90 % pro rozpouštědlo B s průtokem 0,5  $\text{ml min}^{-1}$ , nástřik vzorku 10  $\mu\text{l}$  a vlnová délka spektrofotometrické detekce 260 nm.

Reálné vzorky byly rozdrceny a homogenizovány v třecí misce po dobu 15 min. Poté byla navázka 1 g vzorku převedena do odměrné baňky a doplněna acetonitrilem s 0,1 mol  $\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$ . Vzorek byl extrahován v třepačce přes noc a výsledný extrakt byl přefiltrován přes skládaný filtr. Takto připravený roztok vzorku byl poté přímo bez dalšího ředění analyzován pomocí DPV. Pro chromatografickou analýzu byl extrakt ještě přefiltrován přes PTFE stríkačkový filtr s průměrem porů 0,22  $\mu\text{m}$ .

## Výsledky a diskuse

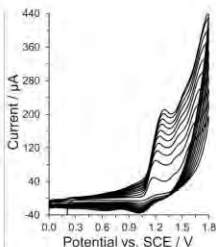
Elektrochemická oxidace *trans*-anetholu poskytuje dva irreverzibilní anodické signály při +1,29 V a +1,65 V (Obr. 1). Dále bylo zjištěno z měření na rotační diskové elektrodě, že oba signály představují jednoelektronové oxidační děje. Lze tedy říci, že *trans*-anethol se oxiduje dvěma po sobě jdoucími jednoelektronovými reakcemi s následnou chemickou přeměnou. V prvním kroku se *trans*-anethol oxiduje na radikál kation, který spontánně reaguje s přítomnými nukleofily za vzniku radikálu, schopného další oxidace s následnou chemickou reakcí, kdy vzniká elektrochemicky neaktivní produkt<sup>10</sup>. Závislost proudu prvního oxidačního signálu na odmocnině z rychlosti polarizace byla lineární, lze tak usuzovat na elektrodový děj řízený difúzí.

Dále bylo optimalizováno složení uhlíkové pastové elektrody pro co nejintenzivnější anodický pik *trans*-anetholu. Množství pastové kapaliny bylo ponecháno konstantní (20 % hm.) a měnil se pouze poměr uhlíkového prášku a surfaktantu. Bylo zjištěno, že na uhlíkových pastách



s obsahem 20 – 40 % SDS se oxidační signál už příliš neměnil a pro další experimenty byl použit maximální obsah SDS k zajištění co největší polarizace povrchu elektrody a tím udržení dostatečné stability materiálu pasty při experimentech v nevodném prostředí<sup>11</sup>. Parametry DPV byly voleny jako přijatelný kompromis mezi výškou píku, tvarem oxidačního signálu a intenzitou proudů pozadí. Jako optimální byl určen krok potenciálu 10 mV, amplituda pulzu 60 mV, doba pulzu 0,05 s a čas mezi pulzy 0,1 s.

Kalibrační závislost elektrochemického stanovení *trans*-anetholu za optimálních experimentálních podmínek byla lineární v rozmezí koncentrací 2,3–196,1  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Hodnoty LOD 0,7  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a LOQ 2,4  $\mu\text{mol l}^{-1}$  byly určeny podle vztahů  $3s/k$  a  $10s/k$ , kde  $s$  je směrodatná odchylka opakovaných měření ( $n = 10$ ) 10  $\mu\text{mol l}^{-1}$  *trans*-anetholu a  $k$  je směrnice kalibrační přímky. Opakovatelnost měření vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka byla 4 %.



**Obr. 1.** Cyklické voltamogramy 500  $\mu\text{mol l}^{-1}$  *trans*-anetholu na CPE/SDS v čistém acetonitrilu s přidávkou 0,1 mol  $\text{l}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  při rychlostech polarizace 50 – 500  $\text{mV s}^{-1}$ .

Analýza *trans*-anetholu v reálných maticích může být ztížena přítomností dalších elektroaktivních složek, které mohou rušit vlastní stanovení. Vzhledem k povaze analyzovaných vzorků se jedná hlavně o další silice, jako např. eugenol, fenchon, linalool, menthol nebo thymol. Z těchto látek pouze eugenol a thymol poskytují oxidační signály při potenciálech +1,05 V a +1,2 V, nicméně jejich elektrochemická oxidace není za použitých experimentálních podmínek příliš intenzivní a při poměru 1:1 neruší stanovení *trans*-anetholu. Tabulka I shrnuje výsledky analýz reálných vzorků koření a cukrovinek a porovnání s RP-HPLC jako referenční metodou.

#### Tabulka I.

Analýza *trans*-anetholu ve vzorcích koření a cukrovinek.

Vzorek	DPV, $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$	RP-HPLC, $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$
Semínka anýzu	1318,9 ± 8,3	1206,7 ± 0,2
Semínka fenyklu	—	—
Semínka fenyklu s přidávkou <i>trans</i> -anetholu	604,1 ± 23,4	575,1 ± 2,5
Lékořicové pendreký	4,1 ± 0,4	4,1 ± 0,1
Hašlerky	26,9 ± 0,8	24,7 ± 0,1

## Závěr

Byla vyvinuta nová elektroanalytická metoda pro stanovení *trans*-anetholu ve vzorcích koření a cukrovinek přímo v jejich extraktech bez dalších úprav vzorku. Modifikace pracovní uhlíkové pastové elektrody větším množstvím dodecylsiranu sodného umožňovala práci i v nevodném prostředí čistého acetonitrilu. Charakter elektrodového materiálu zároveň brání adsorpci produktů oxidace *trans*-anetholu, elektroda nevykazuje paměťový efekt a měření lze tak provádět bez nutnosti regenerace povrchu elektrody v průběhu analýzy. Výsledky elektrochemického stanovení jsou ve shodě se standardní RP-HPLC metodou se spektrofotometrickou detekcí. Navržené stanovení lze využít pro rychlé a nenákladné zjišťování obsahu *trans*-anetholu jako potravinářského aditiva.

## Acknowledgments

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

## References

1. Rovira D. D.: *Dictionary of Flavors*. John Wiley & Sons, Inc. 2017.
2. Sung B., Prasad S., Yadav R. V., Aggarwal B. B.: *Nutr. Cancer* *64*, 173 (2012).
3. Aprotosoaiă A. C., Costache I. I., Miron A.: *Drug Discovery from Mother Nature. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Gupta S., Prasad S., Aggarwal B., ed.), str. 247–267. Springer 2016.
4. Newberne P. et al.: *Food Chem. Toxicol.* *37*, 789 (1999).
5. Najdoska B. M., Bogdanov J. B., Stefova M.: *Nat. Prod. Commun.* *10*, 1619 (2015).
6. Leal P. F., Almeida T. S., Prado G. H. C., Prado J. M., Meireles M. A. A.: *Sep. Sci. Technol.* *46*, 1848 (2011).
7. Jurado J. M., Alcazar A., Pablos F., Martin M. J.: *Chromatographia* *64*, 223 (2006).
8. Pang X., Bai L., Wang Z., Yang H., Liu H., Yan H.: *Chromatographia* *82*, 1345 (2019).
9. Kowalczke M., Wyrwa J., Dziubaniuk M., Jakubowska M.: *J. Anal. Methods Chem.* 2158407 (2018).
10. Grimshaw, J.: *Electrochemical Reactions and Mechanisms in Organic Chemistry*. Elsevier Science 2000.
11. Jashari G., Švancara L., Sýs M.: *Electrochim. Acta* *410*, 140047 (2022).

## Comparison of Electrochemical Behavior of Bile Acids and Their Conjugates on the Boron-Doped Diamond Electrode

(Srovnání elektrochemického chování žlučových kyselin a jejich konjugátů na borem dopované diamantové elektrodě)

Kristýna Jelsíková, Eva Bláhová, Jana Kubešová, Karolína Petráňová, Jan Klouda, and  
Karolína Schwarzová-Pecková

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

### Abstract

The electrochemical behavior of bile acids (cholic and chenodeoxycholic acids) and their conjugates with taurine (taurocholic and taurochenodeoxycholic acids) and glycine (glycocholic and glycochenodeoxycholic acids) was studied using cyclic voltammetry on boron-doped diamond electrode. Specifically, the difference between the response of bile acids and their conjugates in the positive potential region was investigated in the media of acetonitrile – perchloric acid (water content 0.55 %). All the studied substances contain a 7 $\alpha$  hydroxyl group, and thus can undergo dehydration reaction, resulting in activation of the steroid core for electrochemical oxidation. It results in anodic irreversible signal at *ca* +1.2 V (vs. Ag/AgNO<sub>3</sub> in acetonitrile), providing a base for their electrochemical detection.

### Úvod

V organismu savců vznikají žlučové kyseliny jako konečné produkty metabolismu cholesterolu<sup>1</sup>. Jejich biosyntézou v játrech nedochází pouze k tvorbě samotných primárních žlučových kyselin, ale také jejich konjugátů s glycinem a taurinem. Díky této konjugaci je zvýšena jejich rozpustnost ve vodných roztocích a tím dochází k snadnějšímu vylučování těchto metabolitů cholesterolu do moči. Tento způsob vede v konečném důsledku k vylučování cholesterolu z organismu<sup>2,3</sup>.

Žlučové kyseliny patří mezi steroidní sloučeniny s nasyceným, elektrochemicky neaktivním steroidním jádrem. Elektrochemická aktivita steroidů závisí na přítomnosti dvojných vazeb v steroidním skeletu, popř. na funkčních skupinách, které jsou na něj navázány<sup>4</sup>. Přímou elektrochemickou oxidací žlučových kyselin v rámci potenciálového okna ve vodných roztocích na běžných elektrodochových materiálech nelze předpokládat z důvodu jejich nasyceného steroidního jádra a absenci funkčních skupin, které lze snadno oxidovat. V rámci skupiny UNESCO laboratoře elektrochemie životního prostředí na PřF UK bylo zjištěno, že žlučové kyseliny (cholová a chenodeoxycholová kyselina) poskytují v prostředí kyseliny chloristé a acetonitrilu (obsah vody *ca* 0,55 %) na uhlíkových elektrodách včetně borem dopované diamantové elektrody dobře vyvinutý anodický signál při potenciálu *ca* +1,2 V (vs. Ag/AgNO<sub>3</sub> v acetonitrilu)<sup>5</sup>. Tato elektrochemická oxidace žlučových kyselin je možná díky chemické dehydratační reakci, která je způsobena přítomností kyseliny chloristé v měřeném roztoku. Tato dehydratační reakce probíhá pouze v případech primárních kyselin. Ty ve své struktuře obsahují 7 $\alpha$ -hydroxylovou skupinu, která je důležitá pro vznik nenasyčeného produktu, který je elektrochemicky aktivní a umožňuje tak vznik signálu v anodické oblasti potenciálů.

Elektrochemickou detekcí žlučových kyselin se zabývá pouze několik studií. První možnost detekce žlučových kyselin je založena na elektrochemické oxidaci žlučových kyselin po

předchozí dehydratační reakci popsané výše. Tímto způsobem je možné detegovat žlučové kyseliny (cholovou a chenodeoxycholovou kyselinu) v umělem séru po extrakci na pevné fázi ( $LOD = 80 \mu\text{mol l}^{-1}$ )<sup>6</sup>. Další dvě studie využívají propojení RP-HPLC s pulsní amperometrickou detekcí, kdy byly použity tři pulsy o hodnotách  $E_1 = +0,03 \text{ V}$ ,  $E_2 = +0,60 \text{ V}$  a  $E_3 = -0,80 \text{ V}$  ( $LOD = 0,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ )<sup>7</sup>, resp.  $E_1 = +0,05 \text{ V}$ ,  $E_2 = +0,60 \text{ V}$  a  $E_3 = -0,60 \text{ V}$  ( $LOD = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$ )<sup>8</sup>. Další studie byla věnována stanovení ursodeoxycholové kyseliny propojením HPLC s UV detekcí a coulometrickou celou jako elektrochemických detektorem. Stanovení této žlučové kyseliny bylo vyvinuto pro farmaceutické preparáty<sup>9</sup>. Ve studii zabývající se propojením elektrochemického a hmotnostně spektrometrického systému byly generovány oxidační produkty cholové a chenodeoxycholové kyseliny, které byly identifikovány pomocí ESI-MS. Většina produktů byla pozorována při pH 6, pro cholovou kyselinu bylo největší množství produktů pozorováno při vložení potenciálu +3 V a pro chenodeoxycholovou kyselinu při vložení potenciálu +2,4 V<sup>10</sup>.

### Experimentální část

Studovány byly žlučové kyseliny cholová a chenodeoxycholová kyselina a jejich konjugáty taurocholová, taurochenodeoxycholová, glykocholová a glykochenodeoxycholová kyselina (všechny od Sigma-Aldrich). Dále byl použit acetonitril pro HPLC (Honeywell), kyselina chloristá 70% (Lach-Ner, Neratovice, ČR) a alumina o velikosti částic 0,5  $\mu\text{m}$  (Elektrochemické detektory, Turnov). Všechny chemikálie byly analytické čistoty.

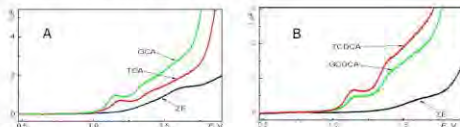
Měření byla prováděna metodou cyklické voltametrie (CV). K měření byl používán potenciostat Autolab se softwarem Nova 1.1/2.0/2.1.3. Používáno bylo tříelektroodvé zapojení. Jako pracovní elektroda byla používána borem dopovaná diamantová elektroda o průměru 3 mm (Windsor Scientific, Slough, Velká Británie). 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

Všechny žlučové kyseliny (cholová a chenodeoxycholová kyselina) a jejich konjugáty s taurinem (taurocholová a taurochenodeoxycholová kyselina) a glycinem (glykocholová a glykochenodeoxycholová kyselina) obsahují ve své struktuře 7 $\alpha$ -hydroxylovou skupinu, která umožňuje jejich dehydrataci a následnou elektrochemickou oxidaci<sup>7</sup>. V předchozích studiích<sup>5</sup> bylo zjištěno, že v prostředí kyseliny chloristé a acetonitrilu (obsah vody ca 0,55 %) cholová kyselina poskytuje v anodické oblasti signál při +1,2 V a chenodeoxycholová kyselina poskytuje v anodické oblasti dva signály při potenciálu +1,2 V a +1,4 V. Experimenty v této studii navázaly na předchozí zmíněné studie a zaměřily se na to, zda je možné za shodných podmínek elektrochemicky oxidovat i jejich konjugáty. Z proběhlých měření (obr. 1) bylo zjištěno, že konjugáty primárních žlučových kyselin je možné elektrochemicky oxidovat v prostředí kyseliny chloristé a acetonitrilu (obsah vody ca 0,55 %), kdy konjugáty cholové kyseliny (obr. 1A) poskytují odezvu při +1,15 V (glykocholová kyselina) a při +1,2 V (taurocholová kyselina) a oba konjugáty chenodeoxycholové kyseliny (obr. 1B) (glykochenodeoxycholová a taurochenodeoxycholová kyselina) poskytují dvě anodické odezvy při +1,2 V a +1,4 V.

Vzhledem k tomu, že potenciály signálů v anodické oblasti konjugátů žlučových kyselin, které byly studovány, se pouze minimálně liší od potenciálů samotných primárních žlučových kyselin, jejich stanovení elektrochemickou detekcí pouze na základě například multi-pulzní

amperometrické detekce není možné. Pro využití elektrochemické detekce bude muset být předřazen separační krok, např. HPLC nebo CE.



**Obr. 1.** Cyklické voltamogramy konjugátů A) cholové kyseliny – taurocholová (TCA) a glykocholová (GCA) kyselina ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) a B) chenodeoxycholové kyseliny – taurochenodeoxycholová (TCDCa) a glykochenodeoxycholová (GCDCA) kyselina ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v prostředí kyseliny chloristé ( $c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$ ) a acetonitrilu (obsah vody ca 0,55 %) na BDD elektrodě (rychlost skenu  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ ).

### Závěr

Předmětem studia bylo porovnání elektrochemického chování žlučových kyselin (cholové a chenodeoxycholové kyseliny) a jejich konjugátů s tauroinem (taurocholová a taurochenodeoxycholová kyselina) a glycinem (glykocholová a glykochenodeoxycholová kyselina). Bylo zjištěno, že konjugáty žlučových kyselin poskytují ireverzibilní odezvy při shodných potenciálech jako primární žlučové kyseliny, tj. cholová, glykocholová kyselina poskytují signál při +1,2 V, taurocholová kyselina poskytuje odezvu při +1,15 V; chenodeoxycholová, glykochenodeoxycholová a taurochenodeoxycholová kyselina poskytují dva signály a to při -1,2 V a +1,4 V. Dalším předmětem studia bude využití separačních technik (např. HPLC nebo CE), jakožto předřazeného kroku pro detekci žlučových kyselin a jejich konjugátů ve směsi.

### Acknowledgments

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

### References

1. Haslewood G. A.: *J. Lipid Res.* 8, 535 (1967).
2. Mukhopadhyay S., Maitra U.: *Curr. Sci.* 87, 1666 (2004).
3. Goldstein J. L., DeBose-Boyd R.A., Brown M. S.: *Cell.* 124, 35 (2006).
4. Klouda J., Barek J., Nesměrāk K., Schwarzová-Pecková K.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 47, 384 (2017).
5. Klouda J., Barek J., Kočovský P., Herl T., Matysik 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. Dekker R., Vandermeer R., Olieman C.: *Chromatographia.* 31, 549 (1991).
8. Chaplin M.: *J. Chromatogr. B-Biomed. Appl.* 664, 431 (1995).
9. Scalfi S., Tirendi S., Pazzi P., Bousquet E.: *Int. J. Pharm.* 115, 249 (1995).
10. Suarez L.N., Bruckner L., Rohm S.: *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2491 (2018).

## Plant Telomerase RNA and its Protein Interactors

Leon Jenner, Dzmityr Pruchkouski, and Eva Sýkorová

<sup>§</sup> Institute of Biophysics, Czech Academy of Sciences, Kralovopolská 135, CZ-61265, Brno, Czech Republic, E-mail: evin@ibp.cz

### Abstract

Telomerases are ribonucleoproteins that replace non-coding ends of chromosomes during cell replication. They are part of a highly complex and regulated cellular system that has implications in cancer and aging. Plants are a useful multi-cellular organism for telomerase study, but this area of research is still in its early stages. Assuming similarity with yeast or human systems, the telomerase RNA is key to interactions with other cellular proteins. Identifying protein-RNA interactors could be an important first step in untangling these complex relationships. Classical gel shift experiments of purified proteins and RNA have identified some initial interactors and obtained qualitative data on binding affinity and specificity. Circular dichroism (CD) spectroscopy was used to monitor a change in CD signal of RNA in solution in the presence of these proteins as the first step towards quantifying this interaction. These classic experiments were used to screen candidate proteins and act as benchmarks. Protein-RNA interactions might then be further characterised by more specialist techniques such as native RNA electrochemistry or atomic force microscopy (AFM). Research was supported by the Czech Science Foundation, project no. 20-01331X.

**Keywords:** telomerase, telomere, RNA-protein interactions.

### Introduction

One of the apparent problems of eukaryotic cell replication is that parts of the ends of linear chromosomes are lost after each end replication cycle. Repetitive non-coding sequences called telomeres act as a buffer to this in most eukaryotes, however both the repeating sequence and the proteins that interact with it vary between organisms <sup>1,2</sup>. In particular, the enzyme telomerase which synthesises new DNA repeats has a highly conserved catalytic protein domain (TERT) but an evolutionarily variable RNA subunit (TR) which seems an obvious biomacromolecule to focus on when exploring the differences in telomere maintenance between organisms. In plants there is considerable inter-species variation in TR <sup>3</sup> and much less is known about plant telomerases compared to better-characterised human and yeast models <sup>4</sup>. The TERT subunit for model plant *Arabidopsis thaliana* (*At*) has been known for some time <sup>5</sup>, however the true *At*TR has only recently been identified<sup>4</sup>. It is likely that either *At*TERT or *At*TR interact with many other proteins to regulate the function of telomerase within plant cells, considering how important it is for cells to maintain their DNA. TR is the larger of the two biomacromolecules and at least in human telomerase it is TR that interacts with the majority of proteins in the telomerase complexes characterized so far <sup>6,7</sup> (all the structures). As such, an obvious place to start for characterising the *At* system is to look for *At* proteins that bind to AT. Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) are a classic technique for identifying these interactions and have already been used to characterise CBF5/dyskerin binding to *At*TR <sup>8</sup>. It is expected that biologically relevant interactions would have a relatively high affinity and specificity, however, so further techniques will be necessary to differentiate adventitious RNA binding from promiscuous proteins from true parts of cellular mechanisms. As such, pilot experiments have used circular dichroism (CD) spectroscopy to monitor the change in chiral structure of *At*TR in solution. In future, atomic force microscopy (AFM) could be used to characterise the overall bulk structure of *At*TR molecules in solution. Similarly the native electrochemical signals of

*At*TR bases on mercury or pyrolytic graphite electrodes<sup>9</sup> may change in the presence of binding proteins in an informative way.

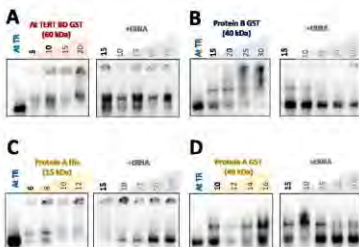
## Methods

Protein-encoding sequences were introduced into pDEST 15 and 17 vectors using the gateway cloning method (Invitrogen). These vectors introduce either a glutathione synthase transferase (GST) fusion to the resulting protein or a 6x histidine sequence for affinity purification. Plasmid vectors were transformed into *Escherichia coli* BL 21 pL<sub>ys</sub> S and successful transformations were selected for by Ampicillin and Chloramphenicol resistance present in the vector and the strain respectively. Cultures were grown in antibiotic-infused LB at 37 °C with 180 rpm shaking to an OD<sub>600</sub> ≈ 1 and induced for 3 hours with 1 mM isopropylthio-β-galactoside. Cell cultures were then harvested by centrifugation and frozen at -80 °C until needed. Frozen pellets were resuspended in 2 mL of 100 mM Tris-HCl, 100 mM (500 mM for p17) NaCl, 0.2% polyethyleneimine pH 8 with wide-spectrum EDTA-free protease inhibitors (Roche). This resuspension was then lysed by sonication and clarified by centrifugation at 20000g for 10 minutes. Soluble cell extracts were then bound to centrifugal GST or Ni-IMAC columns (Cytiva) and protein was eluted with 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl with 80 mM glutathione (p15) or 500 mM imidazole (p17) and frozen at -80 °C until needed. *At*TR was synthesised using PCR amplification of a plasmid-encoded DNA sequence to produce a complementary DNA template. This was then transcribed using a T7 RNA polymerase kit (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions. The RNA transcript was then purified from the PCR mix using SPRI magnetic beads according to the manufacturer's protocol, eluted in water and frozen at -80 °C until needed.

EMSA samples were prepared by incubating 0.3 μM <sup>32</sup>P-labelled *At*TR with the desired protein in 13.5 μL binding buffer for 30 minutes on ice. Competition experiments also included yeast transfer RNA (Sigma Aldrich) as annotated. Samples then had 2 μL RNA loading dye added and were loaded into lanes of a 6% polyacrylamide gel in Tris acetic acid (TAE) buffer. Gels were then run at 180 V for 30 min and then dried for phosphorimaging. CD spectroscopy was performed using 1.0 μM *At*TR after heating to 80 °C and cooling to 20 °C in binding buffer. This was then titrated with increasing molar excess of protein and the CD spectrum was recorded after each addition using a Jasco J-1500 spectropolarimeter.

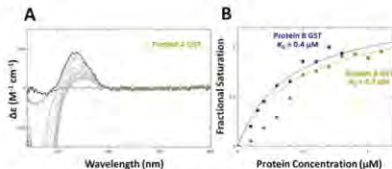
## Results and discussion

*At*TR in the absence of protein migrates as a single clear band (Fig. 1). Presence of a GST fusion protein with the RNA binding motif of *At*TERT (BD GST, Fig. 1 A) causes the appearance of a shifted band consistent with the presence of an RNA-protein complex as expected. The presence of tRNA does not modify this, consistent with a specific binding interaction between *At*TR and *At*TERT. Candidate *At* RNA-binding protein A (Fig. 1 C, D) gives rise to a similar shifted band, which is less with the lighter-mass polyhistidine tag, compared to GST giving further confidence that the gel shift arises from the additional mass of the protein. Protein B GST gives similar results to protein A GST, however the presence of tRNA decreases this band suggesting that the binding between protein A and *At*TR is more specific than that of protein B and *At*TR. In addition to the bands for free RNA and those assigned to shifted protein-RNA complexes, there is some evidence of non-migrated RNA in many of the EMSAs which complicate analysis. It is possible that these may arise from aggregation or low solubility of protein-RNA complexes. Further optimisation of experimental conditions may be able to eliminate these to allow for clear, quantifiable data. Alternatively, EMSAs may simply be useful as a qualitative indication of binding which can be supported with other techniques that provide quantitative data.



**Fig. 1.** RNA electrophoretic mobility shift assay.  $^{32}$ P-labelled AITR ( $0.3 \mu\text{M}$ ) incubated with **A)** AITERT binding domain or **B, D)** candidate RNA binding proteins fused to glutathione synthase transferase (GST) or **C)** polyhistidine, with protein or competitor tRNA concentrations given as an  $x$ -fold molar excess compared to RNA.

Binding of protein A and AITR was also monitored in solution using CD spectroscopy. Naked refolded AITR in solution gives rise to a positive dichroism feature centred on 267 nm (Fig. 2 A, black line), consistent with the chiral nature of the AITR structure in solution. The intensity of this feature decreases upon titration with Protein A GST (grey lines). The CD spectrum of Protein A GST alone has no dichroism in this region, suggesting that the change of dichroism is due to a change of AITR structure, rather than simply being just the sum of all spectral features present in solution. This change in structure is what might be expected from conformational changes upon binding, so the change in dichroism with increasing protein concentration was fitted to the equation for a theoretical first-order process. Both protein A and comparable experiments with protein B start to indicate an identical  $K_d$ , however more experiments are needed to obtain an accurate fit between recorded data and the theoretical relationship such that  $K_d$  can be determined.



**Fig. 2.** **A)** CD spectrum of  $1.0 \mu\text{M}$  AITR (black line) in binding buffer, titrated with increasing molar excess of protein A (grey lines). The spectrum of  $1.0 \mu\text{M}$  protein A is shown for comparison (dark yellow line). **B)** change in CD signal with increasing protein A (yellow squares) or protein B (blue squares) concentration, compared to theoretical binding relationships with a binding affinity ( $K_d$ ) of  $0.4 \mu\text{M}$  (blue line) or  $0.5 \mu\text{M}$  (yellow line).



## Conclusions

Continuing EMSA pilot experiments point towards a specific interaction between at least one candidate *At* RNA binding protein (A) and *At*TR as might be expected if these species interact as part of biological pathways within plant cells. Another related *At* protein (B) initially appears to have a similar interaction with *At*TR, however this interaction also occurs with abiological tRNA, suggesting that this interaction is not specific and may not be biologically relevant. EMSAs are a relatively easy way to get descriptive information of protein-RNA interactions, but suffer from a difficulty in optimisation of binding conditions to eliminate (artefactual) aggregation or precipitation of possible complexes. CD spectroscopy shows promising data towards obtaining a binding affinity for protein-RNA interactions, but would require control experiments with abiological RNA to determine if such interactions are specific and relevant to a biological process. AFM is a technique that might be useful for determining if aggregates of protein-RNA complexes form under the experimental conditions used for EMSAs. Similarly, native electrochemistry of RNA bases might be an alternative to CD if a change in electrochemical signal occurs due to conformational RNA changes or shielding of electroactive residues in the presence of RNA-binding proteins.

## Acknowledgments

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

## References

1. Chan H., Wang Y., Feigon J.: *Annu. Rev. Biophys.* **46**, 199 (2017).
2. Schmidt J. C., Cech T. R.: *Genes Dev.* **29**, 1095 (2015).
3. Fajkus P., Peška V., Závodník M., Fojtová M., Fušnečková J., Dobias Š., Kilar A., Dvořáčková M., Zachová D., Nečasová I., Sims J., Šýkorová E., Fajkus J.: *Nucleic Acids Res.* **47**, 9842 (2019).
4. Armstrong C. A., Tomita K.: *Open Biol.* **7**, 160338 (2017).
5. Fitzgerald M. S., Riha K., Gao F., Ren S., McKnight T. D., Shippen D. E.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96**, 14813 (1999).
6. Ghanim G. E., Fountain A. J., van Roon, A. M., Rangan R., Das R., Collins K., Nguyen T.: *Nature* (2021), <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03415-4>.
7. Liu B., He Y., Wang Y., Song H., Hong Zhou Z., Feigon J.: *Nature* (2022), <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04582-8>.
8. Song J., Castillo-González C., Ma Z., Shippen D. E.: *Nucleic Acids Res.* (2021) <https://doi.org/10.1093/nar/gkab699>.
9. Špaček J., Dánhel A., Hason S., Fojta M. *Electrochem. Commun.* **82**, 34 (2017).

## Mercury Film Screen-Printed Electrodes

Bohdan Josypčuk<sup>a</sup>, Ivana Šestáková<sup>a</sup>, and Soňa Tvorná<sup>a,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: josypcuk@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

Mercury film screen-printed electrodes (MF-SPEs) were designed, prepared and tested for the first time as perspective representatives among SPEs that allow measuring at high negative potentials. For this purpose, the precise electrochemical (coulometric) preparation procedure for mercury deposition at the working electrode surface of the commercial silver-SPE was developed and a universal method of preparing MF-electrodes from different metal-SPEs was described. An optimal electrolyzer construction for the mercury deposition, electrolyte composition, electrolysis potential, and an activation of electrode surfaces were proposed. Determination of the zinc content in food supplement tablets was used for the MF-SPEs practical testing.

**Keywords:** Electrochemistry, Screen-Printed Electrodes, Mercury Film, Flow Analysis, Zinc Determination.

### Introduction

Mercury electrodes in polarography<sup>1</sup> and related methods<sup>2</sup> are nearly ideal electrodes, especially for cathodic processes. The application of other electrode materials is complicated by lower overvoltage of hydrogen and worse reproducibility of measurements. Solid amalgam electrodes (SAE) do not contain liquid mercury, they exhibit high hydrogen overvoltage<sup>3,4</sup> and their surface is suitable for various chemical modifications<sup>5,6</sup> which can substantially broaden field of application of solid electrodes. One of possible ways of chemical modification of metal electrodes is their covering with a liquid mercury film<sup>7-10</sup>. The reasons for this kind of modification (i.e. preparation of mercury film electrodes (MFE)) are: i) to increase hydrogen overvoltage, i.e. to broaden available potential window; ii) to decrease limit of determination of metal ions by using anodic stripping voltammetry (ASV) at MFE, the volume of which is much smaller than the volume of HMDE or the volume of mercury meniscus of m-AgSAE resulting in higher and narrower peaks at MFE; iii) to increase resolution of close ASV peaks because of narrower peaks at MFE; iv) to increase mechanical stability of mercury surface for field measurements or for transfer adsorptive stripping voltammetry of nucleic acids, proteins and other biologically important substances, where limited mechanical stability of HMDE can be the source of problems; v) to obtain ideally smooth, stable in time, and easily renewable surface suitable for the preparation of monolayer or multilayer films of biologically important substances; vi) to minimize legal problems limiting the use of liquid mercury.

Real, ideally smooth mercury film can be prepared only at a conductive surface which can be wetted by mercury. Therefore, silver<sup>7,8,11</sup>, gold<sup>12</sup>, or platinum<sup>13,14</sup> are most frequently used supports for mercury films. Screen-printed electrodes (SPEs) have become a quite widespread substitute for classic electrodes in electrochemical analytical measurements, where results of the analysis may not have high accuracy. Some pilot experiments for creating of mercury films at SPEs with silver working electrode (Ag-SPE)<sup>15</sup> were carried out, but so far there was no attempt to investigate systematically the preparation and properties of these films at SPEs.

Therefore, a simple, reliable and environmentally friendly procedure for the preparation of stable and exactly defined mercury films at Ag-SPE was developed and described in this work.

### Experimental

All voltammetric and amperometric measurements were carried out at room temperature using computer-controlled analyzer with MultiElchem v. 3.1 software (J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of AS CR) and the electrochemical stand (Polaro-Sensors, Czech Republic). Silver screen-printed electrodes (Ag-SPE) (Metrohm DropSens Co., Spain, type DRP-C013, diameter of silver working disc 1.6 mm, carbon auxiliary electrode and silver pseudo-reference electrode; entire dimensions of DRP-C013 body:  $34 \times 10 \times 0.5$  mm (Length  $\times$  Width  $\times$  Height)<sup>16</sup>) were used as a basis for preparation of mercury film SPEs (MF-SPE). Additionally, Ag-SPE with diameter of silver working disc 4 mm (type DRP-010) and carbon-SPE with diameter of carbon working disc 4 mm (type DRP-110)<sup>16</sup> were used for some experiments. Cable connector for SPEs (Metrohm DropSens Co., Spain, type CAC;<sup>16</sup>) was used for connection of SPEs to the analyzer. The three-electrode batch system consisted of a working electrode of Ag-SPE or of MF-SPE, a saturated calomel reference electrode in which metallic mercury was replaced by silver paste amalgam (AgA-SCE, laboratory-made, having the same potential as a saturated calomel electrode<sup>17</sup>) and of the auxiliary Pt wire electrode (diameter 1.0 mm, length 10 mm).

The system for flow injection analysis with electrochemical detection (FIA-ED) was used for amperometric measurements with tested SPEs. FIA-ED consisted of linear syringe pump NE-1000 (New Era Pump Systems, USA), sample injector valve Rheodyne MXX 777-601 (IDEX Health & Science LLC, USA) and solenoid operated micro-pump 130SP1220-1TP (Bio-Chem Fluidics Inc., USA)<sup>18, 19</sup>. Flow-cell for screen-printed electrodes (Metrohm DropSens Co., Spain, type FLWCL<sup>16</sup>) was employed for all flow measurements. The injection loops and all connections in the flow system were made of PTFE and PEEK tubing with the inner diameter 0.50 mm and the outer diameter 1.59 mm.

Oxygen was removed from some analyzed solutions by 5 min bubbling with nitrogen. Deionized water was produced by Milli-Q<sub>plus</sub> system (Millipore). All chemicals used were of p.a. purity. Commercial food supplement tablets Zinek (Dr. Max Pharma, Czech Republic) containing zinc (15 mg in 1 tablet), served as the sample for testing analysis.

### Results and Discussion

*Electrochemical deposition of mercury film at silver or amalgam screen-printed electrode.* Method of a mercury deposition and a scheme of an electrolyzer used for this purpose are described in our previous publication<sup>15</sup>. Shortly, an exact amount of mercury for creating of the film with given thickness was electrochemically plated at silver or amalgam surface of printed electrode. In calculating the charge (number of micro-coulombs) required for deposition of precise weight of mercury on SPE, the current yield is assumed to be practically 100%. The procedure can be fully automated in most of modern analyzers and the program enables to stop the electrolysis after passage of a given number of micro-coulombs assuring thus the preparation of the mercury film with the exactly predetermined thickness.

*Optimization of plating electrolyte composition and mercury deposition potential.* Electrolysis of mercury on Ag- or AgA-SPE took place in a two-electrode system, where the anode was a large area of silver paste amalgam (12% (w/w) Ag) and the silver/amalgam disk of the working electrode at SPE served as the cathode. Solution of  $0.1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HgO}$  in  $2 \text{ mol l}^{-1} \text{ KI}$  was chosen as an optimal plating electrolyte. The current grows rapidly when the negative deposition

potential increases from -10 mV to -25 mV and then is quite stable up to -500 mV ( $I = -435.5 \pm 5.3 \mu\text{A}$ ; RSD = 1.2%;  $N = 6$ ). The deposition time of a certain amount of mercury depends on the electrolysis current and therefore the optimum potential  $E_{\text{electr}} = -200 \text{ mV}$  (vs. AgA-SCE) of this process was selected and applied in all other experiments<sup>15</sup>.

*Thickness of the mercury film at AgA-SPE and its lifetime.* Several silver amalgam SPEs which were prepared and employed early for other purposes were used for covering by mercury films. Surfaces of SPEs with 5 and 10  $\mu\text{m}$  mercury films were matted after about 2 hours and it can be said that such films are almost non-useful. AgA-SPEs covered by 15, 20, 30, 40, and 50  $\mu\text{m}$  were liquid and mirror shiny for all working day. All of these MF-SPEs were mechanically non-stable further day and they can only be used for reliable electrochemical measurements on the day of preparation.

*Thickness of the mercury film at AgA-SPE and its potential of hydrogen evolution (PHE).* PHE is one the most important parameter of each working electrode which shows at how high negative potentials the electrode can work. Values of PHE are given in **Table I** and they are very similar to those on pure mercury electrodes (e.g., HMDE – hanging mercury drop electrode).

**Table I.**

Potential of hydrogen evolution on SPEs with various thickness of mercury films ( $N = 5$ ).

Mercury film thickness, $\mu\text{m}$	PHE, mV	Confidential interval, mV	Relative standard deviation, %
5*	-1732	$\pm 2.9$	0.14
10*	-2051	$\pm 1.8$	0.07
15	-2052	$\pm 3.5$	0.15
20	-2079	$\pm 0.6$	0.03
30	-2068	$\pm 2.2$	0.09
40	-2070	$\pm 1.0$	0.04
50	-2051	$\pm 0.6$	0.03

\* - the working electrode surface was matted and covered by small shined crystals.

Based on the results described in the previous paragraphs, the film thickness of 15  $\mu\text{m}$  was selected as optimal.

*Determination of the zinc content in food supplement tablets with MF-SPEs.* To test the applicability of the proposed MF-SPEs, the determination of zinc cations was chosen because the reduction (accumulation) potential of which is so high that it can only be performed using mercury electrodes. Also anodic stripping differential pulse voltammetry (AS-DPV) was used, for which MF-electrodes are best suited. The AS-DPV measurement parameters were optimized for these determinations: accumulation potential  $E_{\text{ac}} = -1500 \text{ mV}$ ; initial potential  $E_{\text{in}} = -1600 \text{ mV}$ ; accumulation time  $t_{\text{ac}} = 60 \text{ s}$ ; final potential  $E_{\text{fin}} = -800 \text{ mV}$ ; flow rate  $v_{\text{flow}} = 0.1 \text{ ml min}^{-1}$ .

The whole analysis is very simple: 1 tablet of the analyzed food supplement (contains 15 mg of Zn) was placed into graduated flask (100 ml) with 2 ml 65 %  $\text{HNO}_3$ , this suspension was sonicated for 10 min and then  $\text{H}_2\text{O}$  was added to volume 100 ml ( $-0.2 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ ). For electrochemical measurements the following solution was prepared: 15 ml of  $1 \text{ mol l}^{-1}$  acetic buffer with pH 5.0 + 14.6 ml  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.4 ml of probe solution (finally solution:  $-2 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ ; pH 4.95). Oxygen was removed from analyzed solutions by 5 min bubbling with nitrogen.

Statistical processing of seven samples analyses that were carried out within one day with various MF-SPEs ( $14.5 \pm 0.39$  mg/tablet; SD = 0.43 mg; RSD = 2.97 %;  $N = 7$ ) confirms that the preparation of MF-SPEs and the measurements themselves are quite reproducible and that for the most cases the MF-SPE ensures sufficient precision of the zinc determination in the tested food supplement. These results of analyses agreed well with the zinc content declared by the manufacturer (15 mg/tablet).

### Conclusions

In this work, design of mercury film-SPEs based on the mercury electrodeposition on the commercially available silver-SPEs has been described. The procedure for the preparation of MF-SPEs is fast, easy, reproducible and actually universal, since the metal parts of metal-SPEs, (where metal is represented by Au, Pt, Pd, etc.) can be covered by mercury using the same technique as well. The main characteristics of mercury film-SPEs (MF thickness, lifetime, stability, PHE, etc.) and analytical dependencies for voltammetric determination of zinc cations in aqueous solutions using a flow system (dependences of peak current on: potential and time of accumulation, flow rate, scan rate, zinc concentration, etc.) were studied.

The practical applicability of the novel detection electrodes has been tested on voltammetric determination of zinc content in food supplement tablets using flow-through electrochemical cell arrangement. Results of analyses agreed well with the zinc content declared by the manufacturer.

### Acknowledgments

This work was financially supported by the Czech Science Foundation (Project 20-01589S) and it was carried out within the framework of Specific Charles University Research (SVV 260440).

### References

1. Heyrovský J., Kuřta J.: *Principles of Polarography*. Publishing House of the Czech Acad. Sci., Prague 1965.
2. Yosypchuk B., Novotný L.: *Chem. Listy* 96, 756 (2002).
3. Yosypchuk B., Barek J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 189 (2009).
4. Josypčuk O., Barek J., Josypčuk B.: *Electroanalysis* 27, 2559 (2015).
5. Josypčuk B., Fojta M., Yosypchuk O.: *J. Electroanal. Chem.* 694, 84 (2013).
6. Yosypchuk B., Mareček V.: *J. Electroanal. Chem.* 653, 7 (2011).
7. Ciszowska M., Donten M., Stojek Z.: *Anal. Chem.* 66, 4112 (1994).
8. Stojek Z., Kublik Z.: *J. Electroanal. Chem.* 60, 349 (1975).
9. Tvorynska S., Josypčuk B., Barek J., Dubenska L.: *Food Analytical Methods* 12, 409 (2019).
10. Tvorynska S., Barek J., Josypčuk B.: *Electroanalysis* 31, 1901 (2019).
11. Kapturski P., Bobrowski A.: *Electroanalysis* 19, 1863 (2007).
12. O'Shea T. J., Lunte S. M.: *Anal. Chem.* 65, 247 (1993).
13. Economou A., Fielden P. R.: *Analyst* 128, 205 (2003).
14. Baranski A. S.: *Anal. Chem.* 59, 662 (1987).
15. Josypčuk B., Langmaier J., Tvorynska S.: *Sensors and Actuators B: Chemical* 347, 130583 (2021).
16. <http://www.dropsens.com/en/home.html>. Downloaded:
17. Yosypchuk B., Barek J., Yosypchuk O.: *Electroanalysis* 23, 2226 (2011).
18. Josypčuk O., Barek J., Josypčuk B.: *Electroanalysis* 30, 1163 (2018).
19. Josypčuk O., Barek J., Josypčuk B.: *Electroanalysis* 28, 3028 (2016).

## Electrochemical Immunosensors for Clinical Diagnostics

Gylxhane Kastrati<sup>a</sup>, Granit Jashari<sup>b</sup>, Lucie Korecká<sup>a</sup>, and Zuzana Bílková<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 53210 Pardubice, Czech Republic

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

<sup>b</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 53210 Pardubice, Czech Republic

### Abstract

In recent years, immunoassays have been used to detect protein biomarkers that are the essential objective of diagnosing, treating, and prognosis of many genetic, metabolic, infectious diseases, and biowarfare agents. There is huge progress in developing immunoassays, especially nanoscale electrochemical biosensors, for clinical significance. Among the most important challenges in biosensors is the selection of metal nanoparticles and the achievement of high sensitivity. Thanks to its unique advantages in the fabrication of electroactive species with nanotechnology, the biofunctionalization of metal nanomaterials are available as a powerful label since they are ready to attach to proteins or other biological elements. This work investigated a new immunosensor with electrochemical detection of three proteins in amniotic fluid.

**Keywords:** Biomarkers, Nanoparticles, Electrochemical immunosensors; Multiplex assay.

### Introduction

A biosensor that can detect the interaction between antigen and antibody is known as an immunosensor. These species could be introduced to a transducer to detect them in different ways. One of the fastest and easiest ways to read the signal of this kind of interaction is the electrical signal produced on an electrochemical transducer. The specific interaction between the antigen and the antibody is not directly legible, so there are known labels such as enzymes (EIA), ELISA, chemiluminescent or fluorophore compounds. The most frequently used is ELISA, in two formats: sandwich and competitive. One of the advantages is that immunosensors offer good sensitivity and high selectivity, which gives them a great advantage over conventional methods<sup>1-3</sup>. Depending on what signal they read, they can be classified into optical, electrochemical, calorimetric, and mass variations. Immunoreaction in electrochemical converters can cause changes in potential, current, ion concentration, impedance, etc. These converters are cheap, robust, fast response time, and do not require large amounts of analyte. The disadvantage of immunoanalytical methods is that the analyte should be a large molecular mass with good sensitivity and essential stability<sup>4-5</sup>.

The antigen-antibody interaction is reversible with variable bond strength due to the value of the affinity constant. An ideal immunosensor should be able to detect in continuity and selectively. This study aimed to develop a rapid, sensitive, and specific simultaneous method to determine the inflammatory protein biomarkers occurring in amniotic fluid, specifically Pentraxin 3 (PTX-3), Interleukin 6 (IL-6), and Calreticulin (CALR). Our principle of operation was based on the electrochemical detection based on sandwich capture composed of immunosorbents consisting of specific primary antibodies for each targeted protein biomarker immobilized on magnetic particles and bioconjugate of antibodies labeled with electroactive species (quantum dots, gold nanoparticles) enabling to analyze simultaneously a mixture of these three biomarkers.

## Experimental part

### Preparation of immunosorbent

Prepared immunosorbent composed of specific monoclonal IgG raised against each analyzed protein (anti-PTX3, anti-CALR, anti-IL-6) immobilized on magnetic particles via carbodiimide-mediated binding. Briefly, 1 mg of magnetic particles (1  $\mu\text{m}$  in size) were incubated for 30 minutes with 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) and the sodium salt of N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS) to activate carboxylic groups and form a covalent bond between particles and antibodies. Covalent immobilization gives high stability to the prepared immunosorbent. The efficiency of immobilized antibodies was evaluated by electrophoretic separation with silver staining (SDS-PAGE), comparing the fractions before and after immobilization, which confirmed the optimal amount of immobilized antibodies.

### Preparation of bioconjugate

The secondary (anti-PTX3, anti-CALR, anti-IL-6) have been used along with the nanocomposite that forms the detectable bioconjugate. IgG antibodies used to prepare bioconjugate were of mono or polyclonal origin. The nanocomposite is composed of mesoporous silica nanoparticles (SiNPs) and electroactive species, nanoparticles of Au and quantum dots of CdTe and PbS. Firstly, 3 mg of silica nanoparticles (3-aminopropyl functionalized) were washed five times with 0.1 M phosphate buffer pH 7.3 before being mixed with electroactive particles, and subsequently, 0.5 mg of EDC was added in a reaction. Right after the reaction was incubated for one hour, it was washed three times with 0.1 M phosphate buffer pH 7.3 containing 1 M NaCl and two times with 0.1 M phosphate buffer pH 7.3. After the washing steps, nanocomposites were conjugated with 20  $\mu\text{g}$  of specific antibodies for each protein biomarker. Each bioconjugate is labeled with different detection particles, where the particles are bound to antibodies. For PTX-3, IL-6 and CALR as electroactive compounds are used CdTe with a potential peak around -0.9 V, PbS with a potential peak around -0.6 V and AuNPs with a potential peak of +0.2 V, respectively.

### Electrochemical detection

A multi-channel potentiostat (Multi EmStat 3, The Netherlands) was used for square wave voltammetry analysis controlled by MultiTrace 4.3 software. This portable device was able to connect with the screen-printed electrode, a three-electrode system with a silver pseudo-reference electrode (Ag/AgCl), carbon working electrode (C), and carbon auxiliary electrode (C) (Metrohm, Czech Republic), suitable for working with microvolumes. The released metal ions by 0.1 M HCl from the nucleus of quantum dots of CdTe and PbS and nanoparticles of Au were determined by Square Wave Anodic Stripping Voltammetry (SWASV) / Square Wave Cathodic Stripping (SWCSV) after the immunocomplex was dissolved in 100  $\mu\text{L}$  acid for 5 minutes. The measured signal is proportional to the amount of metal ion released, which correlates with the concentration of the analyte that is targeted to be determined. All conditions for electrochemical detection are summarized in Table I.

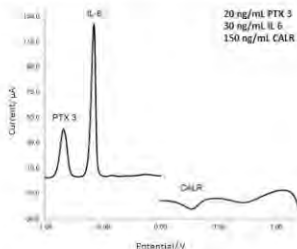
**Table I.** Parameters of Square Wave Voltammetry used for detection

Detection Method	SWASV(Conjugate of QDs)	SWCSV(Conjugate of AuNPs)
E cond	-0.15 V	0.15 V, 120 s
E dep	-1.0 V, 120 s	1.2 V for 180 s
Range of potential	-1.0 – -0.15 V	1.2 – 0.0 V
Amplitude		0.02805 V
Frequency		25 Hz
E step	0.003 V	-0.003 V

## Results and Discussion

The developed system is based on two steps. In the first step, the magneto-immune capture of the target protein biomarker occurs together with the specific labeling using an active electrochemical specie. In the second step, the formed immunocomplex anti-PTX3- IgG-PTX3<sup>SiNP<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>T<sub>8</sub></sup>, anti-IL-6 - IL-6 - anti-IL-6<sup>SiNP<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>S<sub>5</sub></sup>, and anti-CALR- IgG-CALR - anti-CALR<sup>SiNP<sub>3</sub>-AuNP<sub>10</sub></sup> were magnetically separated and finally analyzed by square wave voltammetry.

Optimal analytical performance for the system was achieved by investigating different conditions. The first experimental condition investigated was the influence of buffer, where for each protein biomarker system was checked the effect of three buffers individually, such as 0.1 M phosphate buffer (PB) pH 7.3, 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4, and 0.2 M TRIS-HCl buffer pH 8.0, all containing 1% Bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Tween 20. The obtained results show that TRIS provides better complex stability and lower negative control, unlike PB and PBS. The same strategy was followed after mixing these protein biomarkers for simultaneous detection, and almost similar behavior is acquired in 0.2 M TRIS + 1% BSA + 0.1% Tween 20 buffer with pH 8. In a time range from 10 to 120 minutes was investigated the incubation time of immunosorbent (IS) with antigen (Ag) (IS-Ag) and then IS-Ag with bioconjugate (BC). Increasing the incubation time resulted in a significant increase in antibody binding at 60 minutes of incubation, improving the sensitivity of detecting targeting protein biomarkers. As mentioned above, the metal ions released from electroactive species take time to dissolve into solution using 0.1 M HCl. The peak current increased with the increment of dissolution time, and the plateau was achieved for 5 minutes.



**Fig. 1.** Square wave voltammograms of three biomarkers anti-PTX3- IgG-PTX3<sup>SiNP<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>T<sub>8</sub></sup>, anti-IL-6 - IL-6 - anti-IL-6<sup>SiNP<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>S<sub>5</sub></sup>, and anti-CALR- IgG-CALR - anti-CALR<sup>SiNP<sub>3</sub>-AuNP<sub>10</sub></sup> measured simultaneously.

Satisfactory results were obtained using these optimized conditions to simultaneously determine referred proteins biomarkers. The results exhibited in Fig. 1 confirm that the determination of these protein biomarkers individually in a mixture can be done without the affection of the other.



### **Conclusion**

The sensitive electrochemical immunosensor for simultaneous determination of PTX3, IL-6, and CALR was successfully developed. This immunosensor will serve as a tool for rapid screening of the above-mentioned biomarkers in amniotic fluid. The next steps are planned to optimize the final conditions and the application of immunosensor in real amniotic fluid.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the project of the Faculty of Chemical Technology University of Pardubice (project No. SGS-2022-004) and OP RDE project, "Strengthening interdisciplinary cooperation in research of nanomaterials and their effects on living organisms" (reg. n.02.1.01/0.0/0.0/17\_048/0007421).

### **References**

1. Korecká L., Vytřas K., Bilková Z.: *Curr. Med. Chem.* 25, 1-15 (2018).
2. Zhang C., Du X.: *Front. Chem.* 8 (2020).
3. Chen Z., Lu.: *Anal. Chim. Acta*, 0003-2670 (2017)
4. Wang J., Liu G., Jan R.: *J. Am. Chem. Soc.* 126, 3010 (2004)
5. Lim S.A., Ahmed M.U.: *RSC Adv.* 6, 14995 (2016)

## Evaluation of Vegetable Oils: RP-HPLC vs. Voltammetry at Carbon Paste Electrodes

Jitka Klikarová <sup>a</sup>, Milan Sýs <sup>a</sup>, Anna Horská <sup>a</sup>, Francesco Cacciola <sup>b</sup>, Paola Dugo <sup>c</sup>, and Luigi Mondello <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 53210 Pardubice, Czech Republic,

E-mail: Jitka.Klikarova@upce.cz

<sup>b</sup> Department of Biomedical, Dental, Morphological and Functional Imaging Sciences, University of Messina, Messina, Italy

<sup>c</sup> Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Messina, Italy

### Abstract

The quality of Italian extra virgin olive oils (EVOOs) was evaluated based on the profile and quantity of phenolic compounds (PPs), providing a specific fingerprint. A total of 68 EVOOs from 11 Italian regions were analyzed using high-performance liquid chromatography coupled with a diode array detector and mass spectrometer. The obtained data were subjected to multivariate statistical methods. Further, PPs and lipophilic vitamins were analyzed in vegetable oils of 6 different kinds using square-wave voltammetry based on their anodic oxidation. Both analytical methods were compared and critically evaluated.

**Keywords:** Vegetable oils, Phenolic compounds, Lipophilic vitamins, Multivariate statistical analysis, High-performance liquid chromatography, Carbon paste electrodes, Square-wave voltammetry.

### Introduction

The composition and quality of extra virgin olive oils (EVOOs) is significantly influenced by the olive tree cultivar, the ripeness of the olive fruit, pedoclimatic conditions, and technological aspects of plant cultivation and oil processing (including also storage). Unfortunately, EVOOs are very often adulterated. Either good manufacturing practice is not followed or a false geographical origin is indicated. Therefore, many analytical methods have been developed for the differentiation and classification of EVOOs. The profile and composition of phenolic compounds (PPs) could help to distinguish the EVOOs authenticity. Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) coupled with mass spectrometric (MS), spectrophotometric (UV), or electrochemical detection is frequently used technique for this purpose. However, the separation is usually very long and requires a sample pre-treatment, which also prolongs the experiment <sup>1,2</sup>. On the other hand, carbon paste electroactive electrodes (CPEEs) in combination with square-wave voltammetry (SWV) seem to be a useful tool for simple, efficient, and low-cost assessment of the quality of various vegetable oils (VOs) without any sample pre-treatments <sup>3,4</sup>. Hence, the aim of this work was to compare these two approaches.

### Experimental

For SWV, different kinds of commercially available VOs, such as EVOOs, rapeseed, sunflower, linseed, pumpkin, and chia oils, were analyzed without any sample pre-treatment. Voltammetric measurements were carried out in the three-electrode system, comprising a working CPEE, an Ag/AgCl (3 mol L<sup>-1</sup> KCl) reference with salt bridge, and a Pt-sheet (auxiliary) electrodes. CPEE contained graphite powder (CR-2) together with mineral oil, and/or selected vegetable oil (20 %; w/w). The resulting carbon paste mixtures were packed into a cavity of electrode piston-holders and left for one day to self-homogenise under

laboratory conditions. All experiments were realized in 0.1 mol L<sup>-1</sup> acetate buffer with pH 4.5. The operating parameters of the SWV ramp were as follows: deposition potential of -0.4 V, deposition time of 30 s, potential range from -0.4 to +0.6 V, potential step of 5 mV, pulse amplitude of 25 mV, and frequency of 40 Hz<sup>-1</sup>.

A total of 68 EVOOs coming from various Italian regions were chromatographically analyzed. For statistical evaluation, the samples were divided into three supra-regions: northern Italy (samples from Lazio, Tuscany, Umbria, Lombardy, Veneto, Trentino-Alto Adige, and Liguria), southern Italy (samples from Apulia, Calabria, and Campania), and Sicily. The phenolic fraction was isolated by liquid-liquid extraction described in detail in the article of Klikarová et. al.<sup>2</sup>. Separations were performed on an Ascentis Express C18 (150 × 4.6 mm; 2.7 μm) column with a mobile phase composed of 0.1% aqueous HCOOH (A) and 0.1% acetonitrile HCOOH (B) with a flow rate of 1 mL/min and the following gradient program: 0 min, 10% B; 4 min, 35% B; 12 min, 47% B; 12.5 min, 60% B; 16 min, 75% B; 21 min, 100% B<sup>1,2</sup>.

### Results and Discussion

Electrochemical analysis of selected VO was carried out using solid phase voltammetry (SPV) at CPEEs. It was found that the profile of the obtained voltametric records is more important for the evaluation of oil quality than monitoring of the content of individual electroactive organic compounds, representing mainly hydroxytyrosol, tocopherols, tocotrienols, carotenoids, and tyrosol. Such a comparison of voltammograms seems to allow the determination of VO types, and thus works analogously to a fingerprint in forensic analyses (Fig. 1). Compared to other samples, rapeseed oils together with chia oils were significantly richer in tocopherols and phenolic compounds. However, samples of EVOOs and pumpkin oils had higher amounts of carotenoids and tyrosol.

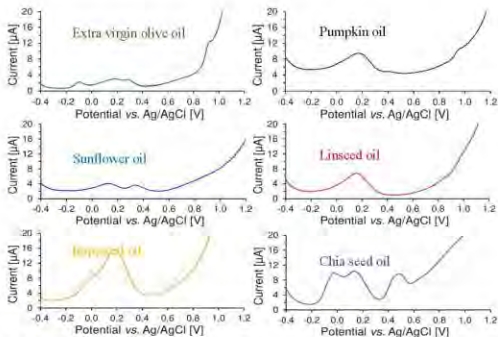


Fig. 1. Square-wave voltammograms obtained at CPEEs prepared from various vegetable oils; adopted from<sup>2</sup>.

In VO, mainly tocopherols are thermolabile<sup>3</sup>, which can be utilised to test the degradability of commercial products. The rapeseed oil was heated at 150 °C and an aliquot volume was analysed every 5 min. A typical decrease of the tocopherol anodic peak was observed. Thus, it can be argued that SPV at CPEEs can also detect the degradation of electroactive compounds in VOs, and therefore evaluate their freshness.

Unfortunately, the proposed electrochemical method is not able to detect specific features within oil of the same type and thus does not reveal more detailed information, such as its botanical and geographical origin. This was successfully achieved by RP-HPLC-DAD/MS method, where only EVOOs were investigated. The samples were extracted and analysed and the data obtained were subjected to factor analysis, principal component analysis, and linear discriminant analysis. Factor analysis, as well as principle component analysis divided the samples into two groups according to the total content of phenolic compounds present in the oils and the ripeness of olives used for production of the corresponding oil, while linear discriminant analysis clearly divided the EVOOs into three clusters without any outliers according to their geographical origin (Fig. 2). Thus, it can be claimed that the PPs fingerprint, together with multivariate statistical methods, can help to reveal non-compliance with good manufacturing practice and/or unauthorized use of certification labels (Protected Designation of Origin and Protected Geographical Indication) designating a higher quality product.

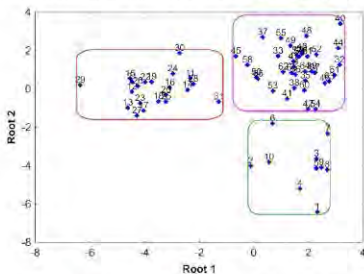


Fig. 2. Scatterplot of the linear discriminant score, adopted from<sup>1</sup>. Note: Northern Italy (purple), southern Italy (red), and Sicily (green).

## Conclusion

The results show that electroactive organic compounds present in vegetable oils provided a spectrum of anodic signals, the number and overall shape of which were specific to a certain type of oil, and thus served as "electrochemical fingerprints". Thus, SPV at CPEEs using SWV is able to distinguish only individual types of vegetable oils, while the use of RP-HPLC allows to determine even the botanical and geographical origin within oil of the same type. It follows that the SPV-SWV developed can serve as a useful and rapid method for revealing of counterfeit vegetable oils, including indicative assessment of their actual freshness; however, HPLC is a more powerful tool for controlling good manufacturing practices.

### Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the AGER2-Rif 2016-0169 and SGS-2022-002 projects.

### References

1. Klikarová J., Česlová L., Kalendová P., Dugo P., Mondello L., Cacciola F.: *Eur. Food Res. Technol.* *246*, 1241 (2020).
2. Klikarová J., Rotondo A., Cacciola F., Česlová L., Dugo P., Mondello L., Rigano F.: *Food Anal. Methods* *12*, 1759 (2019).
3. Horská A., Švancara I., Sýs M.: *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A, Fac. Chem. Technol.* *27*, 5 (2021).
4. Apetrei C., Rodríguez-Méndez M. L., de Saja J. D.: *Sens. Actuators B Chem.* *111–112*, 403 (2005).
5. Niki E., Abe K., in book: *Vitamin E: Chemistry and Nutritional Benefits* (Niki E., ed.), chapter 1, pp. 1. Royal Society of Chemistry, 2019.

## Redox Properties of Conjugated Phosphole Derivatives – Electrochemical Study (Redoxní vlastnosti konjugovaných derivátů fosfolů – elektrochemická studie)

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

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

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

### Abstract

The study describes pentasubstituted phospholes with a  $\pi$ -conjugated arms in positions 2 and 5 of the phosphole ring. According to the expectations, substituents with electron-donating groups led to lower oxidation potentials, the presence of electron-withdrawing groups shifts the reduction potential to less negative values. Because all studied phospholes have multiple substituents of both types, their resulting potentials represent the sum of their influences. Moreover, since many of the studied compounds have two redox centers (phosphole moiety itself and the  $\pi$ -conjugated arm), their locations were determined and intramolecular interactions were followed, because substituents which can be conjugated with the  $\pi$ -system of phosphole are able to extend the delocalized  $\pi$ -system resulting in stabilization of primary redox intermediates. Chemical modification of phospholes using various combinations of substituents can set the desired electrochemical properties of studied molecules.

**Keywords:** Phosphole, Conjugation, Electrochemical reduction and oxidation, Polarography, Cyclic voltammetry, Glassy carbon rotating disc electrode.

### Úvod

Fosfoly jsou pětičlenné heterocyklické sloučeniny obsahující dienový systém propojený atomem fosforu. V porovnání s ostatními pětičlennými nenasycenými heterocykly (thiofeny, pyroly, furany) vykazují odlišné vlastnosti. Mají nejnižší aromaticitu, která je vysoce ovlivněna substituenty, jak těmi přímo navázanými na fosfor, tak i těmi v polohách 2 a 5. Protože atom fosforu je vykloněn z roviny heterocyklu, jeho nezávislý elektronový pár se nezapojuje do konjugace a heterocykl vystupuje spíše jako dien, kde jsou možné [4+2] cykloadice. Reaktivita fosforu umožňuje nastavení požadovaných vlastností molekul jednoduchou chemickou modifikací<sup>1,2</sup>. Konjugací s areny v polohách 2 a 5 dochází k rozšíření delokalizace a často i ke změně polohy oxidačního či redukčního redox centra. Výše uvedené vlastnosti fosfolů umožňují nastavení požadovaných redox vlastností jednotlivých molekul a konjugátů u přípravy molekul s novými vlastnostmi. Rozdíl mezi potenciálem první oxidace a první redukce dobře koreluje s energetickými hladinami HOMO a LUMO (nejvyšší obsazený orbital resp. nejnižší neobsazený orbital) a tím určuje i fotofyzikální vlastnosti studovaných sloučenin, které jsou dány primárně rozdílem těchto hladin (HOMO-LUMO gap)<sup>3</sup>.

Fosfoly a jejich deriváty jsou často využívány jako stavební kameny v  $\pi$ -konjugovaných systémech. Nacházejí uplatnění v katalýze, bio-anorganické i materiálové chemii, např. jako OLED (Organic light-emitting diode – světlo vyzařující organické diody), OPV (Organic Photovoltaics – organické fotovoltaické články), OFET (Organic field-effect transistor – organické tranzistory řízené elektrickým polem), NLO (nelineární optické přístroje), luminescenční materiály, polovodiče, tekuté krystaly i molekulární stroje<sup>1,4,5</sup>.

Redoxní vlastnosti studovaných molekul byly sledovány v nevodném prostředí acetonitrilu (AN) na různých elektrodách pomocí oxidace a redukce. Vyhodnocení oxidačních a redukčních potenciálů a jejich interpretace, jejich posunů a rozdílů umožnilo určení tzv. "elektrochemického" HOMO-LUMO gap, studium podílu substituentů na celkových redoxních vlastnostech studovaných látek i ovlivnění planarity molekuly a míry delokalizace elektronů.

### Experimentální část

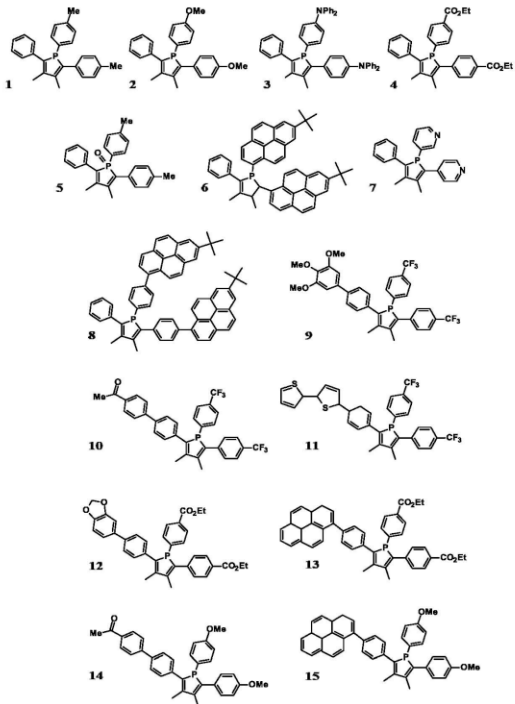
Všechna měření byla provedena v tříelektrodeovém uspořádání v nedělené elektrochemické cele v bezvodém prostředí AN. Koncentrace studovaných látek byla přibližně 0,5–1 mM, základním elektrolytem byl 0,1 M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>. Jako pracovní elektrody byly použity rtuťová kapající elektroda s dobou kapky 1 pro DC polarografii (DC-P), disková elektroda ze skelného uhlíku (GC) o průměru 3 mm jako rotující disková elektroda (RDE) i stacionární elektroda pro cyklickou voltametrii (CV), visící rtuťová kapka (80 ms) jako stacionární elektroda (HMDE) pro CV. Referenční elektrodou byla standardní kalomelová elektroda (SCE) oddělená solným můstkem obsahující bezvodý elektrolyt, pomocnou elektrodou platinový plíšek. Při DC-P a voltametii na RDE byla použita rychlost polarizace 10 mV s<sup>-1</sup>, pro CV pak 0,05–1 V s<sup>-1</sup>. Voltametrie na RDE byla měřena s rychlostí rotace 1000 rpm. Pro DC-P byl použit analogový potenciostat PA4 a XY zapisovač 4103 (Laboratorní přístroje Praha, ČR). CV na HMDE byla měřena pomocí SMDE 1 (Laboratorní přístroje Praha, ČR), voltametrie na RDE a CV na elektrodě z GC pomocí Autolab RDE 2 (Metrohm, Švýcarsko). Měření CV a RDE byla řízena potenciostatem Autolab PGSTAT101 (Metrohm, Švýcarsko) a softwarem Nova 1.11. Kyslík byl ze vzorků odstraněn probubláváním argonem.

### Výsledky a diskuse

Redukce molekul byla sledována v bezvodém prostředí AN pomocí DC-P, voltametrie na RDE a CV na HMDE a na elektrodě z GC; oxidace pouze pomocí voltametrie na RDE a CV na elektrodě z GC.

Námi studované látky látky (Obr. 1) – pentasubstituované fosfoly – obsahují v poloze 2 na fosfolu  $\pi$ -konjugované rameno (substituovaný fenyl). Na základě funkčních skupin mohou být rozděleny do šesti skupin: *I.* látky se skupinami s indukčním/mesomerním efektem a substitucí dvou fenylů (**1**, **2**, **3**, **4**, **7**, **8**); *II.* látky obsahující ethoxykarbonyl (**4**, **12**, **13**); *III.* látky obsahující acetofenon (**10**, **14**); *IV.* látky obsahující dvě methoxyskupiny (**2**, **14**, **15**); *V.* látky obsahující dva trifluormethylly (**9**, **10**, **11**); *VI.* fosfol oxid (**5**); *VII.* látky se dvěma *tert*-butylpyreny (**6**, **8**).

Vzhledem k často komplikovanému mechanismu redukce i oxidace studovaných látek se v tomto příspěvku věnujeme pouze prvním redukčním ( $E_{RED1}$ ) resp. oxidačním potenciálům ( $E_{OX1}$ ) a rozdílu mezi těmito hodnotami (Tabulka I). Potenciály nezávisí na materiálu elektrody, při oxidaci dochází při vyšších potenciálech k polymeraci aromátů. Substituenty systematicky posouvají oxidační a redukční potenciály v souladu s jejich indukčním/mesomerním efektem – substituenty s elektronakceptorním vlivem posouvají redukční potenciál k méně záporným hodnotám, substituenty s elektrondonorním vlivem oxidační potenciál naopak snižují. Elektrochemické vlastnosti odrážejí také míru delokalizace elektronů.  $E_{OX1}$  a  $E_{RED1}$  koreluje s HOMO, resp. LUMO, větší rozdíl jejich energií odpovídá nižší delokalizaci celého systému. S tím souvisí ireverzibilita/kvazireverzibilita redukce dané molekuly. Interpretace redukčních a oxidačních potenciálů a jejich posunů v rámci studované série příbuzných derivátů přispívá k určení vlivu substituce na redoxní chování molekul a umožňuje tak nastavení požadovaných vlastností.



Obr. 1. Studované látky – deriváty fosfolu.



**Tabulka I.**

Přehled potenciálů pro první redukční ( $E_{\text{RED1}}$ ) a oxidační ( $E_{\text{OX1}}$ ) kroky v různých systémech (V; vs SCE).

	AN, Hg (redukce)		AN, GC (redukce)		AN, GC (oxidace)		$\Delta E$
	DC-P $E_{1/2}$ $E_{\text{RED1}}$ [V]	CV(HMDE) $E^0, E_{\text{pc}}$ $E_{\text{RED1}}$ [V]	RDE(GC) $E_{1/2}$ $E_{\text{RED1}}$ [V]	CV(GC) $E^0, E_{\text{pc}}$ $E_{\text{RED1}}$ [V]	RDE(GC) $E_{1/2 \text{ ox}}$ $E_{\text{OX1}}$ [V]	CV(GC) $E^0, E_{\text{pa}}$ $E_{\text{OX1}}$ [V]	RDE (GC) [V]
1	-2,19	-2,24	-2,20	-2,24	1,11	1,13	3,31
2	-2,20	-2,24	-2,22	-2,28	1,02	1,06	3,24
3	-2,05	-2,16	-2,15	-2,19	0,78	0,8	2,93
4	-1,82	-1,86	-1,84	-1,89	1,27	1,30	3,11
5	-1,67	-1,72	-1,72	-1,76	1,48	1,51	3,20
6	-1,83	-1,89	-1,90	-1,95	1,01	1,02	2,91
7	-1,98	-2,00	-2,02	-2,05	1,30	1,33	3,32
8	-2,0	-2,07	-2,04	-2,07	1,09	1,12	3,13
9	-1,87	-1,93	-1,90	-1,92	1,20	1,19	3,10
10	-1,78	-1,82	-1,80	-1,83	1,28	1,31	3,08
11	-1,77	-1,82	-1,81	-1,86	1,08	1,07	2,89
12	-1,81	-1,86	-1,82	-1,87	1,18	1,19	3,00
13	-1,78	-1,83	-1,81	-1,83	1,20	1,12	3,01
14	-1,85	-1,78	-1,86	-1,89	0,99	1,02	2,85
15	-1,99	-2,08	-2,06	-2,12	0,97	0,98	3,03

$E_{\text{pc}}$  = potenciál katodického peaku;  $E_{\text{pa}}$  = potenciál anodického peaku;

$E^0$  = potenciál reverzibilního kroku ( $E^0 = (E_{\text{pa}} + E_{\text{pc}}) / 2$ );

$E_{1/2}$  = půlvlnový potenciál;

$\Delta E$  = "potential gap" =  $E_{1/2 \text{ red}} + E_{1/2 \text{ ox}}$  na RDE(GC)

Samotný fosfolový heterocykl je redukován v jednom reverzibilním redukčním kroku <sup>6</sup>. Námi studované deriváty fosfolu s elektrochemicky neaktivním substituentem (**1**, **2**, **3**) jsou redukovány v jednom reverzibilním redukčním kroku s potenciály ovlivněnými indukčním / mesomerním vlivem substituentu. V případě substituentu v polohách 2 nebo 5, který se sám oxiduje (redukuje) snadněji než fosfolové jádro, se poloha redox center posouvá na toto rameno, se na výsledném efektu podílejí opět všechny substituenty, ale jiným způsobem, který závisí na vzdálenosti od toho nového redox centra a na míře  $\pi$ -delokalizace mezi nimi. Vzhledem k tomu, že většina látek obsahovala více různých substituentů, je výsledné elektrochemické chování celé molekuly superpozicí chování fosfolu a všech substituentů.

Nejmenší rozdíl mezi hodnotami  $E_{ox1}$  a  $E_{red1}$  vykazovaly látky se substituentem konjugovaným s fosfolem, který rozšířil delokalizovaný systém. Jedná se např. karbonyl (**14**), bithiofen (**11**), dva difenylaminy (**3**) a dva *tert*-butylpyreny (**6**) přímo navázanými na fosfol. Molekula s *tert*-butylpyreny vázanými přes fenylový můstek (**8**) již vykazovala vyšší rozdíl mezi potenciály ukazující na nižší míru delokalizace způsobenou vykloněním fenylenového můstku z roviny.

### Závěr

Vhodná chemická modifikace fosfolů umožňuje "ladění" vlastností molekul i celých systémů. Z elektrochemického hlediska lze vhodnou kombinací elektronakceptorních a elektrondonorních substituentů řídit foto-elektrochemické vlastnosti fosfolů. Substituenty primárně posouvají oxidační a redukční potenciály v souladu s jejich indukčním efektem. Pokud ale umožňují mezomerní zapojení do elektronového systému, (např. po navázání substituentu konjugovaného s dienovým systémem fosfolu) dochází k rozšíření planárního systému, zvýšení elektronové delokalizace, zvýšení reverzibility prvního redukčního kroku a stabilizaci primárních redoxních meziproduktů. Elektrochemická data tak usnadňují další cílenou modifikaci derivátů fosfolu a přípravu látek s novými vlastnostmi požadovanými v materiálové chemii.

### Acknowledgments

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

### References

1. Matano Y.: Chem Rec 15, 636 (2015).
2. Duffy M. P., Delaunay W., Bouit P. A., Hissler M.: Chem. Soc. Rev. 45, 5296 (2016).
3. Matano Y.: Organic Redox Systems: Synthesis, Properties, and Applications, 477 (2016).
4. Dyer P. W., Reau R., v knize: *Functional Organic Materials*; (Muller T. J. J., Bunz U. H. F., Eds.), sv. Vol. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007.
5. Quin L. D.: Curr. Org. Chem. 10, 43 (2006).
6. Adkine P., Cantat T., Deschamps E., Ricard L., Mezailles N., Le Floch P., Geoffroy M.: Phys. Chem. Chem. Phys. 8, 862 (2006).

**Electrochemical Detection of Enzyme Activity of Kinases Immobilized on Magnetic Particles**  
**(Elektrochemická detekce enzymové aktivity kináz imobilizovaných na magnetické částice)**

Lucie Korecká, Marcela Slováková, Michaela Šislerová, and Zuzana Bilková  
Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology,  
University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail:  
lucie.korecka@upce.cz

**Abstract**

Protein kinases are enzymes providing one of the most important protein post-translational modifications, phosphorylation. Phosphorylation regulates not only physiological cell processes but also is involved in such pathological reactions associated with many diseases. Therefore, it is important to monitor the activity of kinase and inhibitors which is highlighted in the development of therapeutic targets. Protein kinase A was immobilized covalently on magnetic particles. For determination of enzyme activity, low-molecular-mass substrate Kemtide has been phosphorylated in presence of adenosine-thio triphosphate (ATP-S). Thiophosphorylated peptide subsequently spontaneously reacted with colloidal gold nanoparticles (AuNPs) followed by square-wave cathodic stripping voltammetric analysis on screen-printed carbon electrodes. Generated signal of  $[AuCl_4]^-$  corresponds to the level of phosphorylation and thus the activity of the enzyme.

**Keywords:** Protein kinase A, Enzyme activity, Square-wave cathodic stripping voltammetry, Phosphorylation, Screen-printed electrode.

**Úvod**

Fosforylace proteinů je jednou z nejčastějších a zároveň nejdůležitějších post-translačních modifikací proteinů, představující základ nejen řady buněčných procesů, ale také mnoha patologických stavů<sup>1,2</sup>. Během fosforylace je fosfátová skupina molekuly ATP, lokalizovaná v poloze  $\gamma$ , přenesena na specifické serinové, threoninové nebo tyrosinové zbytky proteinu<sup>3</sup>. Fosforylace proteinů je zajišťována enzymaticky protein kinázami<sup>4</sup>. Abnormální fosforylace a nadměrná exprese kináz je spojována s rozvojem některých onemocnění, jako rakovina, diabetes, Alzheimerova choroba<sup>5</sup>, či v poslední době také COVID-19<sup>6</sup>.

Nejen pro diagnostiku onemocnění a s tím souvisejícím vývojem nových léčiv založených na inhibici abnormální fosforylace je důležité monitorování enzymové aktivity<sup>2</sup>. Metody, které jsou běžně využívány pro stanovení aktivity kináz, zahrnují inkorporaci radioaktivně nebo fluorescenčně značeného ATP do molekuly proteinových nebo peptidových substrátů<sup>7</sup>, hmotnostní spektrometrii<sup>8,9</sup>, fluorescenční imunanalýzu<sup>10</sup>, průtokovou cytometrii<sup>11</sup> nebo povrchovou plasmonovou rezonanci s využitím fosfo-specifických protilátek<sup>12</sup>. Přes vysokou citlivost je hlavní nevýhodou těchto metod časová a přístrojová náročnost. V literatuře již byly popsány možnosti elektrochemického stanovení kinázové aktivity s využitím imobilizace inhibitorů<sup>6</sup>, receptorů<sup>1</sup> nebo proteinových substrátů<sup>2</sup> na povrch elektrody. Elektrochemické metody jsou levné, časově nenáročné, robustní, miniaturizovatelné a reprodukovatelné.

Zejména v oblasti vývoje léčiv je výhodná imobilizace enzymu na magnetické částice. Výhodou imobilizovaných enzymů je dlouhodobá stabilita a možnost opakovaného použití a snadná kontrolovatelnost enzymatické reakce<sup>9</sup>. Pro imobilizaci je důležité stanovit aktivitu

enzymu, aby bylo ověřeno, že proces imobilizace negativně neovlivnil jeho schopnost katalyzovat fosforylační reakci.

Protein kináza A (PKA) byla kovalentně imobilizována na magnetické částice s karboxylovými funkčními skupinami karbodiimidovou metodou. Pro ověření aktivity enzymu byl využit nízkomolekulární substrát, který byl fosforylován v přítomnosti adenosin-thio trifosfátu (ATP-S), který spontánně interaguje s nanočásticemi koloidního zlata přes thiolové skupiny ATP-S. Ty jsou analyzovány katodickou rozpouštěcí square-wave voltametrie na tištěných uhlíkových elektrodách (SPCE). Výsledný signál je úměrný stupni fosforylace a tedy aktivitě imobilizované kinázy.

## Experimentální část

### *Chemikálie*

Proteinkináza A (PKA) myši (rekombinantní, 15000000 U/mg, Biaffin GmbH & Co KG, Kassel, Německo), biotin-Kemptide (biotin-LRRASLG, Abbexa Ltd, Cambridge, UK), tetralitná sůl Adenosin 5'-[ $\gamma$ -thio]trifosfátu (Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Steinheim, Německo), Sera-Mag Speed Beads (0,816  $\mu$ m, -COOH, Metachem Diagnostics Ltd, Piddington Northampton, UK), Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 (1  $\mu$ m, Thermo Fisher Scientific, USA), koloidní zlaté nanočástice (10 nm, stabilizované v citrátovém pufru), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid, N-hydroxysulfosukcinimid sodný (Sigma-Aldrich, Kalifornie, USA), ostatní chemikálie čistoty p.a. (Penta, Chrudim, ČR).

### *Přístroje a pomůcky*

Pro elektrochemická měření byl používán kompaktní potenciostat PalmSens2 se software PStace5 (PalmSens BV, Houten, Nizozemsko). Měření probíhalo na tištěných tříelektrodových senzorech s uhlíkovou pracovní, Ag/AgCl referenční a uhlíkovou pomocnou elektrodou (SPCE) (C110 Metrohm, Herrisau, Švýcarsko; OHT-000, Orion HiTech, Španělsko).

### *Imobilizace PKA na magnetické částice a stanovení enzymové aktivity*

Na 1,2 mg magnetických částic bylo imobilizováno 6  $\mu$ g PKA, reakční objem byl 1,2 ml. Částice byly promyty 5x 50 mM MES pufrům pH 6,0. Pro aktivaci bylo přidáno 9 mg EDAC a 1,5 mg sulfo-NHS v MES pufru. Po inkubaci 30 min při laboratorní teplotě byl odstraněn supernatant a k magnetickým částicím byl přidán roztok PKA v MES pufru. Takto připravená směs byla inkubována přes noc při 4 °C na rotátoru. Po imobilizaci byly částice promyty 5x MES pufrům a 5x 40 mM HEPES pufrům pH 7,2. Nosič s imobilizovanou PKA je skladován v MES pufru 6,0 při 4 °C. Pro stanovení aktivity byl nosič 2x promyt HEPES pufrům a bylo odebráno takové množství magnetických částic s imobilizovaným enzymem, které odpovídalo 2  $\mu$ g PKA. K částicím bylo přidáno 94  $\mu$ l reakčního pufru (40 mM HEPES s 5 mM EGTA, 2 mM DTT a 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,2), 10  $\mu$ g substrátu biotin-Kemptid a 5  $\mu$ l ATP-S (0,5 mM v reakční směsi). Reakční směs byla inkubována 5 h při 30 °C na rotátoru. Fosforylovaný substrát byl izolován od nezreagovaných složek pomocí magnetických částic Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 (0,3 mg, v PBS pufru pH 7,4, 20 min inkubace na rotátoru). Po inkubaci byl supernatant odstraněn a k magnetickým částicím bylo přidáno 20  $\mu$ l 10 mM AuNPs a 80  $\mu$ l citranového pufru pH 3,0. Směs byla inkubována 20 min. Po inkubaci byly částice promyty 1x citranovým pufrům a bylo přidáno 100  $\mu$ l 0,1 M HCl a následovala inkubace 3 minuty na rotátoru. Supernatant byl analyzován pomocí SWCSV.

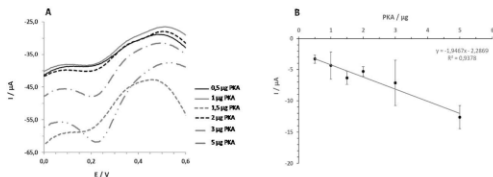
### *Podmínky elektrochemické detekce*

Byla měřena proudová odezva Au(III) iotnů po kyselé disoluci AuNPs pomocí square-wave katodické rozpouštěcí voltametrie (SWCSV) za následujících podmínek:  $E_{\text{cond}}$  0,15 V po dobu 120 s,  $E_{\text{dcp}}$  1,2 V po 180 s, rozsah potenciálu od 1,2 V do 0 V,  $E_{\text{step}}$  0,003 V, amplituda 0,02805 V, frekvence 25 Hz.

### **Výsledky a diskuse**

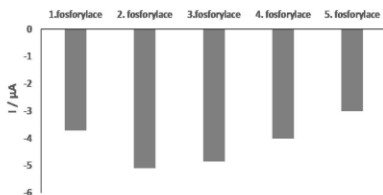
Cílem práce bylo zavést metodu elektrochemického stanovení aktivity solubilní a imobilizované proteinkinázy A (PKA) jako jednoduchou a rychlou metodu jako alternativu k dosud využívané hmotnostní spektrometrii (MALDI-LTQOrbitrap/MS). Při MS analýze je ve spektru pozorován posun  $m/z$  v důsledku přenosu fosfátové skupiny během fosforylace nízkomolekulárního substrátu Kemptide (LRRASLG). Tato metoda poskytuje informaci o proběhlé fosforylaci, nicméně neposkytuje informace, které charakterizují imobilizovaný enzym z pohledu změny enzymové aktivity po imobilizaci či kinetických parametrů imobilizované kinázy. Pro elektrochemické stanovení bylo třeba do reakce zavést elektroaktivní složku, která poskytovala výsledný signál, který koreluje s množstvím PKA v reakční směsi a její aktivitou. Podle literatury mohou být využity ferrocenem značené substráty<sup>1</sup>, redoxní mediátory<sup>6</sup> nebo elektroaktivní zlaté nanočástice<sup>4</sup>. Nanočástice koloidního zlata byly zvoleny v této práci pro elektrochemické stanovení aktivity solubilní a imobilizované PKA. Biosenzor využíval vlastnosti nanočástic koloidního zlata spontánně reagovat vazbou Au-S s thiolovými funkcemi skupinami. Ty poskytoval adenosin 5'-[ $\gamma$ -thio]trifosfát (ATP-S), který byl přidán jako ko-substrát pro fosforylační reakci. Jako specifický nízkomolekulární substrát pro PKA byl navíc použit biotinylovaný Kemptide (biotin- LRRASLG). Ten byl použit s ohledem na nutnost oddělení nezreagovaných složek před square-wave voltametrickou analýzou.

Účinnost fosforylace solubilní kinázou a stanovení fosforylovaných peptidů pomocí MS byla již potvrzena v rámci naší předešlé práce<sup>9</sup>. Vzhledem k záměně reagentů potřebných pro elektrochemickou detekci, byla v prvních experimentech porovnávána účinnost fosforylace biotinylovaného a nebiotinylovaného substrátu a v přítomnosti ATP či ATP-S a byly testovány reakční časy od 1 do 24 hodin. MALDI-LTQOrbitrap/MS analýza potvrdila téměř 90% účinnost fosforylace obou substrátů, pouze v přítomnosti ATP-S bylo nezbytné prodloužit reakční čas na 3 hodiny, zatímco pro ATP byla dostačující 1 hodina. Pro imobilizaci PKA kinázy byly testovány dva typy magnetických částic, Dynabeads® MyOne™ o velikosti částic 1  $\mu\text{m}$  a Sera-Mag Speed Beads o velikosti 0,816  $\mu\text{m}$ , které vykazovaly vyšší účinnost imobilizace PKA. Imobilizace byla provedena standardní dvoutokovou karbodiimidovou metodou a bylo optimalizováno množství enzymu, které bylo použito pro vazbu. Jako optimální množství bylo stanoveno 6  $\mu\text{g}$  PKA/1,2 mg částic. Pro ověření aktivity byl pro fosforylaci použit substrát biotin-kemptide v přítomnosti ATP-S. Fosforylace probíhala v reakčním prostředí 40 mM HEPES s 5 mM EGTA, 2 mM DTT a 5 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,2), po dobu 5 hodin při 30°C. Pro kalibrační závislost byla použita solubilní PKA kináza v rozmezí 0,5 – 5  $\mu\text{g}$ . Množství navázaného enzymu bylo vypočítáno ze získané kalibrační závislosti (viz obr. 1) a odpovídalo 1,5  $\mu\text{g}$  PKA.



**Obr. 1.** Kalibrační řada PKA. **A** - SWCSV voltamogram, **B** - kalibrační závislost proudové odezvy na koncentraci PKA,  $n=3$ , použité elektrody - SPCE.

Pro sestavení kalibrační závislosti i stanovení množství imobilizované PKA byla použita metoda elektrochemické detekce. Pro její zavedení byly nejprve výtýpovány nevhodnější nanočástice koloidního zlata (AuNPs), byly testovány částice o velikostech 5, 10, 20 a 50 nm. Měření probíhalo pomocí SWCSV na uhlíkových tištěných elektrodách a nejvyšší proudové odezvy byly dosaženy při použití AuNPs o velikosti 10 nm, které byly následně používány ve všech experimentech. Pro oddělení nezreagovaných složek po fosforylaci, které by mohly ovlivňovat výsledný signál, bylo využito biotinylace substrátu použitého pro fosforylaci. Byly zkušeny dva způsoby oddělení, a to s využitím komerčních tištěných uhlíkových elektrod s pracovní elektrodou modifikovanou streptavidinem (DRP-11STR, Metrohm, Švýcarsko) a streptavidinem modifikovaných magnetických částic (Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1, ThermoFisher Scientific, USA). Tištěné elektrody vykazovaly velice nízkou účinnost vazby biotinylovaného substrátu a z dalších experimentů byly vyřazeny. Naopak izolace pomocí streptavidinem modifikovaných částic byla účinná a reprodukovatelná. Reakční směs po fosforylaci byla s částicemi inkubována po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. V posledním kroku byly přidány detekční zlaté nanočástice, po promytí následovala disoluce v kyselém prostředí 0,1 M HCl a elektrochemická detekce square-wave katodickou rozpouštěcí voltametrií na uhlíkových tištěných elektrodách (OHT-000, Orion HiTechnologies, Španělsko).



**Obr. 2.** Operační stabilita imobilizované PKA. SWCSV analýza na tištěných uhlíkových elektrodách (SPCE).

Magnetický nosič s imobilizovanou PKA kinázou byl charakterizován z pohledu operační stability, kdy bylo prokázáno, že nosič lze použít minimálně 4x bez výraznější ztráty enzymové aktivity (viz obr. 2).

## Závěr

Byl zavedena metoda elektrochemického stanovení aktivity solubilní a imobilizované PKA kinázy pomocí square-wave voltametrie s využitím tištěných uhlíkových elektrod jako alternativa k náročnější MS analýze. Pomocí elektrochemické detekce byla pro imobilizovanou PKA stanovena operační stabilita, v současné době jsou sledovány kinetické parametry imobilizované PKA.

## Acknowledgments

The OP RDE project „Strengthening interdisciplinary cooperation in research of nanomaterials and their effects on living organisms“, Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17\_048/0007421 and the project of the Czech Science Foundation (No. 20-01589S) are gratefully acknowledged.

## References

1. Shin I-S., Chand R., Lee S. W., Rhee H-W., Kim Y-S., Hong J-L: *Anal. Chem.* *86*, 10992. (2014).
2. Kerman K., Song H., Duncan J. S., Litchfield D. W., Kraatz H-B: *Anal. Chem.* *80*, 9395 (2008).
3. Kerman K., Kraatz H-B: *Biosens. Bioelectron.* *24*, 1484 (2009).
4. Kerman K., Kraatz H-B: *Chem. Commun.* *5019* (2007).
5. Ou L., Chen Y., Xia N.: *Int. J. Electrochem. Sci* *16*, ID210740 (2021)
6. Cho H., Lee Ch-S., Kim T. H.: *Biomedicines* *9*, 423 (2021).
7. Hastie C. J., McLauchlan H. J., Cohen P.: *Nat. Protoc.* *1*, 968 (2006).
8. Deng Z., Ye M., Bian Y., Liu Z., Liu F., Wang C., Qin H., Zou H.: *Chem. Commun.* *50*, 13960 (2014).
9. Hromadkova L., Kupcik R., Vajrychova M., Prikryl P., Charvatova A., Jankovicova B., Ripova D., Bilkova Z., Slovakova M.: *Analyst* *143*, 466 (2018).
10. Jia C., Bai J., Liu Z., Gao S., Han Y., Yan H.: *Anal. Chim. Acta* *99*, 1128 (2020).
11. Ren W., Liu C., Lian S., Li Z.: *Anal. Chem.* *85*, 10956 (2013).
12. Sun L., Liu D., Wang Z.: *Anal. Chem.* *79*, 773 (2007).

## Properties of Boron-doped Diamond Electrode Affecting Electroanalytical Detection of Pesticides

(Vlastnosti borem dopované diamanťové elektrody ovplyvňujúcej elektroanalytickou detekciou pesticídov)

Zuzana Kramplová, Andrea Purdešová, and Jozef Sokol

Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, University of Ss. Cyril and Methodius in Trnava, Nám. J. Herdu 2, SK-917 01 Trnava, Slovak Republic, E-mail:

zuzana.kramplova@fpvucm.sk

### Abstract

Thanks to simple application and excellent properties, the boron-doped diamond electrode (BDDE) has been proven for many electrochemical applications, as well as pesticide detection. BDDE meets the requirements for applications in electrochemical sensors, since it is chemically and temporally stable, allows the detection in a wide potential window, and the pretreatments are minimal. As pesticide monitoring requires very sensitive and reliable detection techniques, BDDE applied for such purposes should have good conductivity, and specificity to the analyte and should not adsorb undesirable substances to its surface. Many properties can be affected by its synthesis or by simple electrochemical surface pretreatment before application.

**Keywords:** Pesticide, Boron-doped diamond electrode, Voltammetry, Surface pretreatment.

### Úvod

V diamante je uhlík prítomný C-sp<sup>3</sup> hybridizácií, z čoho vyplývajú jeho prirodzené vlastnosti ako chemická inertnosť, extrémna tvrdosť, tepelná vodivosť, nízke koeficienty trenia a vysoká mobilita nosiča náboja<sup>1</sup>. Diamant je preto veľmi zaujímavý pre rôzne aplikácie, avšak ako polovodič s veľmi vysokým elektrickým odporom nemôže byť použitý ako elektrodový materiál. Keďže výnimočné vlastnosti uhlíkových materiálov (napr. sklovitý uhlík tzv. glassy-carbon (GCE), ceruzkový grafit (PGE) alebo grafénové nanomateriály) majú v elektrochemickej detekcii nezastupiteľné miesto, riešením slabšej vodivosti diamantu pre elektrochemické aplikácie bolo zavedenie nosičov náboja do jeho štruktúry. Bór má o jeden elektrón menej ako uhlík, vďaka čomu je jeho zabaďovanie do diamantu relatívne jednoduché<sup>2</sup>. Bórom dopovaný diamanť (BDD) má zaujímavé vlastnosti v porovnaní s inými bežne používanými uhlíkovými materiálmi. Široké potenciálové okno umožňuje detekciu oxidácie pri veľmi vysokých potenciáloch, ako aj redukciu pri nízkych potenciáloch, BDD má vynikajúce mechanické vlastnosti, chemickú stabilitu v extrémne kyslých a alkalických roztokoch, je biokompatibilný, dobre vodivý a poskytuje nízky prúd pozadia<sup>3-6</sup>. Vďaka takýmto výhodným vlastnostiam sa BDDE využívajú aj na detekciu pesticídov ako súčasť senzorov.

### Príprava BDD

Najobľúbenejšou technológiou prípravy takéhoto filmu pre komerčne využívané elektrody je syntéza z plynnej fázy („chemical vapor deposition“; CVD), ktorá obsahuje uhlík (zvyčajne CH<sub>4</sub> alebo zmes acetón/CH<sub>4</sub> a H<sub>2</sub>) a bór (vo forme diboránu (B<sub>2</sub>H<sub>6</sub>) v koncentráciách od 1 000 do 10 000 ppm alebo vo forme trimetylbóru (B(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)<sup>7</sup>. Táto zmes môže byť aktivovaná tepelne pomocou horúceho vlákna (hot-filament CVD) alebo plazmou (mikrovlnná CVD)<sup>8</sup>. Túto zmes je možné nanášať na rôzne tepelne stabilné substráty (kremik, oxid hlinitý, sklo vopred upravené diamanťovými nanočasticami alebo samopasivujúce kovy). Výsledkom je vytvorenie tenkého filmu polykryštalického diamantu s hrúbkou 1–10 μm a koncentráciou bóru 1 × 10<sup>20</sup> cm<sup>-3</sup> alebo aj viac. Vlastnosti výsledného filmu sú výrazne ovplyvnené atómovým



vodíkom a kyslíkom v zmesi použitej plynnej fázy. Funkciou vodíka je ukončiť uhlíkové väzby a zabrániť tvorbe aromatických látok, ktoré vedú k tvorbe grafitu na povrchu BDD<sup>9</sup>. Takáto povrchová terminácia BDD je faktorom, ktorý silne ovplyvňuje kinetiku prenosu elektrónov na rozhraní elektrolytu/elektroda<sup>7</sup>. Prídavok kyslíka do vodíkovej plazmy má zas za následok zvýšenie veľkosti zrna diamantu<sup>1</sup>.

### Úroveň dopovania bórom

Táto úroveň je vyjadrovaná najčastejšie ako pomer bóru k uhlíku [B]/[C] a pohybuje sa od 100 do 15 000 ppm<sup>1</sup>. Spravidla 1 z 1000 atómov uhlíka musí byť nahradený bórom – bór v rozsahu  $10^{19}$ – $10^{21}$  atómov na  $\text{cm}^3$ . So zvyšujúcou sa koncentráciou bóru sa zvyšuje aj elektrická vodivosť<sup>10</sup>, čo máva zvyčajne za následok vyššiu citlivosť a nižšie detekčné limity (LOD)<sup>9</sup>. Zvýšený obsah bóru súčasne posúva signály k negatívnejším hodnotám potenciálu. Množstvo kyslíka na povrchu vznikajúceho BDD sa zvyšuje s úrovňou dopovania bórom, čo má za následok negatívne elektrónové afinity pre menej dopované elektrody a pozitívne elektrónové afinity pre vysoko dopované elektrody<sup>10,11</sup>. Pre elektrochemické aplikácie je zvyčajne výhodnejšia BDDE s vysokou koncentráciou bóru v diamante kvôli vyššej vodivosti, no pri nadmerných koncentráciách bóru sa môže kvalita filmu zhoršovať, a to v dôsledku vzniku klastrov bóru a  $\text{sp}^2$ -hybridizovaných uhlíkových nečistôt. Ich prítomnosť vedie k degradácii elektrokatalytickej schopnosti, a preto bežne používané komerčné BDDE sú väčšinou vyrábané s úrovňou dopovania bórom okolo 8000 ppm (film má kovovú vodivosť), čo sa zdá byť vhodným kompromisom medzi polovodičovými a silne dopovanými BDDE<sup>9</sup>.

### Pomer uhlíka v $\text{sp}^3/\text{sp}^2$ hybridizácii

Počas rastu BDD sa tvoria aj nediamantové  $\text{sp}^2$  uhlíkové nečistoty, ktoré sú začlenené hlavne na okrajoch zŕn. Ako bolo vyššie spomenuté, úroveň dopovania bórom ovplyvňuje distribúciu uhlíka  $\text{sp}^3$  a  $\text{sp}^2$  v konečnej štruktúre kryštálov BDD filmov. Síce vyššia úroveň dopovania má za následok zvýšenie vodivosti, pri vyšších úrovniach dopovania BDD sa zvýši počet  $\text{sp}^2$  miest. Nediamantový uhlík sa správa ako „aktívna anóda“, pretože tieto nečistoty spôsobujú vyššiu zmáčavosť elektrod a hydrofilnú povahu, čo zvyšuje adsorpciu organických materiálov na povrch elektrody, a tiež zvyšuje prúdu pozadia<sup>12</sup>. Keďže uhlík  $\text{sp}^2$  predstavuje aktívne miesto pre adsorpciu, podporuje sa tvorba molekulárneho kyslíka a priama elektrochemická konverzia/oxidácia organických zlúčenín na povrchu elektrody<sup>13,14</sup>. To znamená, že vyšší obsah uhlíka  $\text{sp}^2$  v diamantovej mriežke spôsobí zúženie potenciálového okna (rozsah medzi reálnym potenciálom pre vývoj kyslíka a vodíka)<sup>15</sup>.

### Terminácia povrchu BDD

Elektroanalytickú detekciu analytov pomocou BDDE ovplyvňuje jej povrchová terminácia, a preto je jej povrch často upravený pre daný účel, zvyčajne pomocou elektrochemických metód. Katodickou predúpravou sa vytvára H-terminácia povrchu a anodickou predúpravou O-terminácia. Okrem elektrochemických metód možno využiť aj úpravu pomocou plazmy<sup>5</sup>. Natívna mikrokryštalická BDDE pripravená metódami CVD je H-terminovaná, kvôli veľkému množstvu vodíka prítomného v plynnej fáze privádzanej pre rast filmu BDD<sup>9</sup>. Takýto povrch zakončený vodíkom má negatívnu elektrónovú afinitu, je hydrofóbny, majú vysokú vodivosť, nižší odpor voči prenosu elektrónov. Nevýhodou však môže byť vyšší prúd pozadia vo voltampérometrickej odozve<sup>11,16</sup>. Vodíkom ukončený povrch býva stabilný po dobu niekoľkých mesiacov, no po čase sa mení na kyslíkom terminovaný povrch v dôsledku anodických oxidácií (napr. vývoja kyslíka) vo vodných elektrolytoch. Kyslíkom terminovaný povrch má odlišné vlastnosti – je hydrofilný s pozitívnu elektrónovú afinitou a má nízku vodivosť.

Elektrochemicky upravené BDDE sa použili na vývoj niekoľkých elektroanalytických postupov na stanovenie pesticidov (Tabuľka 1). Ako vidieť elektrochemická predúprava bola väčšinou dvojkroková. V prvom kroku bola BDDE predupravená anodicky (ATP) a následne katodicky (CTP), takže povrch takýchto elektród bol H-termínovaný. Iba v prípade dinoterbu<sup>17</sup>, itraconazolu<sup>18</sup>, posakonazolu<sup>18</sup> a triklosanu<sup>19</sup> bola použitá priamo len katodická predúprava BDD bez ATP. Výnimkou, kedy sa osvedčila viac ATP než CTP, bolo stanovenie pikloramu vo vzorke vody z Amazonky<sup>20</sup>.

**Tabuľka 1.**

Elektrochemická predúprava povrchu BDDE na detekciu pesticidov.

Pesticid	Elektrochemická predúprava BDDE	LOD/ $\mu\text{M}$	Ref
karbendazím	ATP (+3 V; 10 min), CTP (-3V; 10 min)	1,600	21
dimetomorf	ATP (+3 V; 120 s), CTP (-2 V; 120 s)	1,040	22
dinoterb	CTP (-1,6 V; 180 s, 60 s)	$91,6 \times 10^{-4}$	17
dikvát	ATP (+3 V; 3 min), CTP (-3V; 3 min)	$1,6 \times 10^{-4}$	23
fenamifos	ATP (-3 V; 10 min), CTP (-3V; 10 min)	4,100	21
formetamát	ATP (3V; 30 s), CTP (-3 V; 60 s)	0,370	24
itraconazol	CTP (pot. cyklus od -2,9 do 0,3 V)	0,018	18
krezoxim-metyl	APT (0,01 A; 1000 s), CTP (-0,01 A; 1000 s)	0,260	25
maneb	ATP (2V; 180 s), CTP (-2 V; 180s)	0,024	26
metylpáratión	ATP (+3 V; 5s), CTP (-3V; 30 s)	0,018	27
metomyl	ATP (+3 V; 120 s), CTP (-3 V; 240 s)	1,200	28
pikloram	ATP (+400 mA/cm <sup>2</sup> ; 50 s)	0,390	20
pirimikarb	ATP (+3V; 5 s), CTP (-3V; 60 s)	1,240	29
posakonazol	CTP (pot. cyklus od -2,9 do 0,3 V)	$78 \times 10^{-4}$	18
pyrakrostrobín	APT (0,01 A; 1000 s), CTP (-0,01 A; 1000 s)	0,250	30
tiabendazol	ATP (+3 V; 30 s), CTP (-3 V; 60 s)	0,127	31
triklopyr	ATP (+2 V; 60 s), CTP (-2V; 60 s)	0,820	32
triklosan	CTP (-1,5 V; 180 s)	$79 \times 10^{-4}$	19
2,4,6-trichlórfenol	ATP (+3 V; 60 s), CTP (-3V; 60 s)	0,150	33

Pre zvýšenie citlivosti a selektivity elektroanalytických meraní s BDDE využili rôzne dostupné stratégie jej úpravy, ako je ošetrovanie plazmou, úprava povrchu chemickou reakciou, dlhodobé vystavenie vzduchu, zavedenie povrchovo aktívnych látok (tenzidov), mechanické leštenie s využitím látok na báze oxidu hlinitého alebo hodvábnnej tkaniny, štruktúrovanie povrchu BDD, výroba poréznych diamantov<sup>14</sup>, fotochemická úprava, či konštrukcia miniaturizovaných BDDE, či sieťotlačených BDDE a iné<sup>35</sup>.

## Záver

Mnohé kľúčové vlastnosti BDDE ovplyvňujúce detekciu pesticidov závisia od samotnej prípravy BDD filmu. Množstvo bóru je v procese prípravy veľmi dôležité navrhnúť tak, aby bola zabezpečená dobrá vodivosť materiálu, no pri vysokých koncentráciách bóru je potrebné kontrolovať množstvo vznikajúcich sp<sup>2</sup> uhlíkových inklúzií, ktoré sú nežiaduce kvôli svojim adsorpčným vlastnostiam a zníženiu hydrofóbného charakteru diamantu. Ďalšou kľúčovou vlastnosťou BDDE je charakter povrchu. Pri stanoveniach pesticidov sa povrch BDDE predupravil najčastejšie katodicky, čím sa zvýšil signál a znížilo LOD. Ďalšie úpravy syntézy BDDE, vrátane mikro-, nano-štruktúrovania povrchu, leštenia povrchu iných modifikácií povrchu môžu viesť tiež k zlepšeniu výkonu BDDE, preto sú predmetom výskumu aj v súčasnosti.

## Acknowledgments

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

## References

1. Luong J. H., Male K. B., Glennon J. D.: *The Analyst* 134, 1965 (2009).
2. Salazar-Banda G. R., Andrade L. S., Nascence P. A. P., Pizani P. S., Rocha-Filho R. C., Avaca L. A.: *Electrochim. Acta* 51, 4612 (2006).
3. Lee C.-H., Lim Y.-K., Lee E.-S., Lee H.-J., Park H.-D., Lim D.-S.: *RSC Advances* 8, 11102 (2018).
4. Szunerits S., Boukherroub R.: *J. Solid State Electrochem.* 12, 1205 (2007).
5. Duarte E. H., Casarin J., Sartori E. R., Tarley C. R. T.: *Sensors and Actuators B: Chemical* 255, 166 (2018).
6. Simon N., Girard H., Ballutaud D., Ghodbane S., Deneuille A., Herlem M., Etcheberry A.: *Diamond Rel. Mat.* 14, 1179 (2005).
7. Rehacek V., Hotovy I., Marton M., Mikolasek M., Michniak P., Vincze A., Kromka A., Vojs M.: *J. Electroanal. Chem.* 862, 114020 (2020).
8. Butler J. E., Mankelevich Y. A., Cheesman A., Ma J., Ashford M. N.: *J. Phys.: Cond. Mat.* 21, 364201 (2009).
9. Sarakhman O., Svore L.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1 (2020).
10. Xu J., Natsui K., Naoi S., Nakata K., Einaga Y.: *Diamond Rel. Mat.* 86, 167 (2018).
11. Kuang P., Natsui K., Feng C., Einaga Y.: *Chemosphere* 251, 126364 (2020).
12. Freitas J. M., Oliveira T. D. C., Munoz R. A. A., Richter E. M.: *Frontiers Chem.* 7, 190 (2019).
13. He Y., Lin H., Guo Z., Zhang W., Li H., Huang W.: *Sep. Purif. Technol.* 212, 802 (2019).
14. Espinoza L. C., Aranda M., Contreras D., Henriquez A., Salazar R.: *ChemElectroChem* 6, 4801 (2019).
15. Nidheesh P. V., Divyapriya G., Oturan N., Trelu C., Oturan M. A.: *ChemElectroChem* 6, 2124 (2019).
16. Živcová Z. V., Petrák V., Frank O., Kavan L.: *Diamond Rel. Mat.* 55, 70 (2015).
17. Pinar P. T., Allahverdiyeva S., Yardim Y., Şentürk Z.: *Microchem. J.* 155, 104772 (2020).
18. Mielech L., Starczewska: *Water* 11, 1595 (2019).
19. Yardim Y., Alpar N., Şentürk Z.: *International J. Environ. Anal. Chem.* 98, 1226 (2018).
20. da Silva J. I. L., dos Santos V. B., Neves C. A., de Souza J. P. I.: *Chem. Papers* 75, 1055 (2020).
21. Lima T., Silva H. T. D., Labuto G., Simões F. R., Codognoto L.: *Electroanalysis* 28, 817 (2016).
22. de Souza Lucas F. W., do Nascimento J. M., Nogueira Freire V., Melo Camelo A. L., Longhinotti E., de Lima-Neto P., Nunes Correia A.: *Electrochim. Acta* 107, 350 (2013).
23. Melo L. C., De Souza D., de Lima-Neto P., Correia A. N.: *Electroanalysis* 22, 2502 (2010).
24. Ribeiro F. W. P., Sousa C. P., Morais S., de Lima-Neto P., Correia A. N.: *Microchem. J.* 142, 24 (2018).
25. Dornellas R. M., Franchini R. A. A., da Silva A. R., Matos R. C., Aucelio R. Q.: *J. Electroanal. Chem.* 708, 46 (2013).
26. Stanković D. M.: *Electroanalysis* 29, 352 (2017).
27. Garbellini G. S., Salazar-Banda G. R., Avaca L. A.: *Food Chem.* 116, 1029 (2009).
28. Costa D. J. E., Santos J. C. S., Sanches-Brandão F. A. C., Ribeiro W. F., Salazar-Banda G. R., Araujo M. C. U.: *J. Electroanal. Chem.* 789, 100 (2017).
29. Selva T. M. G., de Araujo W. R., Bacil R. P., Paixão T. R. L. C.: *Electrochim. Acta* 246, 588 (2017).

30. Dornellas R. M., Nogueira D. B., Aucélio R. Q.: *Anal. Met.* *6*, 944 (2014).
31. Ribeiro F. W. P., de Oliveira R. C., de Oliveira A. G., Nascimento R. F., Becker H., de Lima-Neto P., Correia A. N.: *J. Electroanal. Chem.* *866*, 114179 (2020).
32. Janíková-Bandžuchová L., Šelešovská R., Schwarzová-Pecková K., Chýlková J.: *Electrochim. Acta* *154*, 421 (2015).
33. Schwab E. D. P., de Almeida S. V., Felsner M. L., de Castro E. G., Galli A.: *Food Anal. Met.* *13*, 1000 (2020).
34. Gao F., Nebel C.: *Micro- and Nanostructured Diamond in Electrochemistry: Fabrication and Application* 2020.
35. Baluchova S., Danhel A., Dejmkoval H., Ostatna V., Fojta M., Schwarzova-Peckova K.: *Anal. Chim. Acta* *1077*, 30 (2019).

**Energy Dependences Associated with Galvanostatic Removal of Zinc and Organic Components from Waste Water of Rayon Production**  
**(Energetické závislosti spojené s galvanostatickým odstraňováním zinku a organických složek z odpadních vod z výroby viskózy)**

Gabriela Kuchtová, Ladislav Novotný, Aneta Karásková, 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: gabriela.kuchtova@student.upce.cz

**Abstract**

The communication provided information on the energy consumption  $E_e$  by direct current galvano-static separation of zinc from solutions containing  $ZnSO_4$  under conditions close to the electrodeposition of zinc from viscose production wastewaters. The  $E_e$  values were displayed depending on the corresponding values of current densities  $i$  and electrical conductivities of solutions  $\kappa$ . The diagrams showed that  $E_e$  grew significantly with increasing  $i$ , with a significant influence of  $\kappa$ .

**Keywords:** Direct Current Galvanostatic Deposition, Zinc, Industrial Waters, Viscose Production.

**Úvod**

Je známo, že zinek je velmi významný jak pro živé organismy, tak pro jeho využití v různých oblastech lidské činnosti<sup>1-5</sup>. Nicméně jeho akutní nebo dlouhodobě zvýšené koncentrace ohrožují životní prostředí. Mezi významné zdroje znečišťování životního prostředí patří výrobní procesy, při nichž se ve velkých objemech pracuje s roztoky obsahujícími v různých formách vysoké koncentrace tohoto těžkého kovu. Proto je například ve nařízení vlády č. 401/2015 Sb.<sup>2</sup> vyžadováno dodržování jeho emisních standardů, které v závislosti na průmyslovém odvětví činí 0.5-3 mg L<sup>-1</sup>. Kromě toho jsou např. pro různé druhy vod pro specifické účely stanoveny jednotlivými předpisy a normami maximální povolené obsahy Zn na úrovni deseti nebo desítek µg L<sup>-1</sup>. Souběžně s těmito opatřeními<sup>6</sup> je dlouhodobě vyvíjena snaha zavádět technologie zahrnující recyklaci zinku z odpadních vod. Mezi zmíněné typy technologií s výrazným dopadem na životní prostředí patří i výroba viskózy<sup>7</sup>. Využívají se při ní relativně vysoké koncentrace síranu zinečnatého  $ZnSO_4$ , který je pak adekvátně obsažen v příslušných oplachových a jiných průmyslových vodách přibližně v koncentracích desítek až sto mg L<sup>-1</sup>. Pro recyklování se tak nabízejí elektrolytické postupy založené na deponování zinku na katodách, s jeho následným rozpouštěním kyselinou sírovou. Pro dočišťování zbytkových koncentrací Zn v odpadních vodách před jejich vypouštěním do povrchových toků může pak sloužit například nanofiltrace<sup>8,9</sup>, popřípadě i elektrokoagulace<sup>10</sup>. Mezi přednosti elektrolyzy patří možnost jejího uplatnění už i v relativně jednoduchém dvouelektrodovém galvanostatickém uspořádání, při aplikaci stejnosměrného elektrického proudu. V poslední době roste v oblasti elektroseparačních technologií zájem i o složitější technická řešení založená nejen např. na starších metodách s aplikací měřících nebo čistících potenciostatických i galvanostatických pulzů poměrně rozsáhlé studovaných a využívaných např. v polarografické/voltametrové analýze už od 50. let minulého století<sup>3</sup>, ale zejména i o nedávno a nově vyvíjených specifických sekvencích pulzů<sup>11,12</sup> podle potřeby v kombinaci s dalšími faktory a podmínkami, které byly dříve technicky nedosažitelné. O výsledné efektivitě elektrolyzy rozhoduje tedy též řada dalších faktorů a podmínek, zejména volba materiálů elektrod, použitých proudových hustot, elektrických vodivostí roztoků a dalších<sup>13-15</sup>.

Významnými informacemi alespoň na orientační úrovni přitom jsou též údaje o energetické náročnosti těchto technik. Cílem předloženého sdělení bylo shromáždit informativní údaje o energetické náročnosti vybraných příkladů galvanostatického dvouelektrodeového uspořádání, za využití režimu stejnosměrného proudu. V daném případě bylo pro zvolený materiál cílem tyto informativní údaje shromáždit v závislosti na proudových hustotách a na elektrických vodivostech roztoků pro modelové a i některé provozní roztoky.

### Experimentální část

Podmínky měření odpovídaly potřebám doporučeným výrobcem (Glanzstoff-Bohemia, Co). Modelové vodné vzorky obsahovaly (podobně jako i reálné provozní vzorky) cca  $100 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4$ , při výchozím pH roztoku 6,2, které nebylo během elektrodepozice upravováno. Dvouelektrodeové uspořádání s aktivní plochou rovnoběžných elektrod  $37 \text{ cm}^2$  (tj.  $6 \times 6,15 \text{ cm}^2$ ) bylo umístěno ve vzájemné vzdálenosti 25 mm, v reaktoru temperovaném na 298 K. Na dně reaktoru bylo magnetické míchadlo. Použité proudové hustoty byly mezi 0 a  $50 \text{ mA cm}^{-2}$ . Elektrická vodivost roztoků mezi  $0,5$  a  $5 \text{ mS cm}^{-1}$  byla upravována přidávkou  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . V případě anodické oxidace reálných odpadních vod z oplachu vlákna ( $\text{TOC} = 72 \text{ mg L}^{-1}$ ) na BDD elektrodách s aktivní plochou  $5,34 \pm 0,12 \text{ m}^2$  se proudové hustoty pohybovali mezi  $7,5 \times 10^{-4}$  a  $1,3 \times 10^{-3} \text{ mA cm}^{-2}$ . Součástí vybavení byly též laboratorní lineární stabilizovaný zdroj SDP 2210 (MANSON) v galvanostatickém režimu, multimetr DT-9929 (CEM, Čínská lidová republika), digitální analytické váhy ME2014 (Mettler Toledo, Švýcarsko), konduktometr inoLab Cond730 VWR (VWR International, USA), Accumet AB15 Basic pH meter (Fisher Scientific, USA) a magnetické míchadlo se zahříváním MR Hei-Standard (Heidolph, Německo). V průběhu depozice byl odebírán 1 mL vzorku v hodinových intervalech.

### Výsledky a diskuse

Elektrodepozice kovů má dlouhou historii sahající až k prvním experimentům s elektrickým napětím a proudem. Systematický výzkum těchto dějů a souvisejících procesů začal však až v minulém století a pokračuje i dnes. Mezi metody, které k tomu významně přispěly, patří polarografie, voltmetrie a příbuzné metody<sup>3</sup>. Věnovaly se a dosud věnují mimo jiné studiu mechanismů přenosu náboje a vlivu tomu předcházejících nebo návazných procesů, jakož i vlivům dalších experimentálních podmínek (proudových hustot, přepětí, pH, transportních podmínek, elektrické vodivosti, teploty ad.) na sledované redoxní děje. V případě iontů kovů a jejich komplexů se často jednalo právě o jejich depozici.

Pro energetickou náročnost depozice zinku v uvedeném dvouelektrodeovém zapojení z toho vyplývá, že ke spotřebě dodávané energie dochází zejména v oblasti katodického rozhraní, dále uvnitř roztoku a v oblasti anodického rozhraní. Schematicky zobrazuje energetickou náročnost katodického přenosu náboje čísel v exponenciálním výrazu pro proud v rov. (1)

$$i = \frac{I}{A} = nFk_c c_{ox} \exp\left(-\frac{\Delta G_{ac} + \alpha nFE_c}{RT}\right) \quad (1)$$

kde  $c_{ox}$  vyjadřuje koncentraci oxidované formy,  $\alpha$  je tzv. koeficient přenosu náboje (s hodnotou 0 až 1),  $E_c$  představuje potenciálový rozdíl vůči referenční elektrodě,  $k_c$  rychlostní konstantu katodického (redukčního) děje,  $\Delta G_{ac}$  dodatečnou (aktivační) katodickou energii,  $n$  počet elektronů a  $T$ ,  $R$ ,  $F$  v pořadí absolutní teplotu, univerzální plynovou konstantu a Faradayovu konstantu. Tudíž polarizační odpor  $R_p$  v rovnovážném potenciálu při  $i=i_0$  odpovídá vztahu (2)

$$R_p = \frac{RT}{nFi_0} \quad (2)$$

Pro energetickou náročnost anodického přenosu náboje lze analogicky k výrazu (1) psát rov. (3)

$$i = nFk_a c_{red} \exp\left(-\frac{\Delta G_{aa} - (1 - \alpha)nFE_a}{RT}\right) \quad (3)$$

kde  $c_{red}$  je koncentrace redukované formy a  $E_a$  potenciál anody.

Na katodě je dominantní depolarizace iontů  $Zn^{2+}$  doprovázena případně i paralelní redukcí dalších minoritních složek roztoku. Svou roli přitom schrávají jak faktory související s použitým materiálem katody (specifický katodový polarizační odpor  $R_{pc}$ , katodické přepětí  $\eta_c$ , tj.  $E_c$  vůči reverzibilnímu potenciálu redox reakce  $E_r$ , kinetika elektrokrystalizace, aj.), tak mechanismus redukce  $Zn^{2+}$  i dalších složek a mechanismus jejich transportu k povrchu katody. Obdobná situace je i u povrchu anody s tím, že se zde zpravidla uplatňuje polarizační odpor anodový  $R_{pas}$ , přepětí anodické  $\eta_a = E_a - E_r$  a elektrooxidační a transportní procesy spojené se složkami roztoku podléhajícími anodické oxidaci. Jejich součástí bývá např. i vylučování kyslíku rozkladem vody, změny „ $\phi_2$ - potenciálů“<sup>13</sup> na povrchu elektrod, apod. Významnou roli dále hraje i difuze a iontová vodivost roztoku. Jeho odpor  $R_s$  vyvolává jeho ohřívání, tepelné, a tudíž i energetické ztráty. V těchto případech jsou tedy spojeny i s přítomností koncentračních gradientů (grad  $c_i$ ). Tok iontů  $j$  uvnitř roztoku je výslednicí difuzního toku  $j_{dif}$  spojeného s grad  $c_i$  a toku ohmického  $j_{ohm}$  odpovídajícího ohmickému gradientu potenciálu grad  $E_{ohm}$  uvnitř roztoku v nepřítomnosti grad  $c_i$ , pro které platí vztahy (4) a (5)

$$j_{dif} = - \sum_{i=1}^m z_i F D_i \text{grad} c_i \quad (4)$$

$$j_{ohm} = -\kappa \text{grad} E_{ohm} \quad (5)$$

kde  $z_i$ ,  $D_i$  a  $c_i$  značí počet nábojů, difuzní koeficienty a koncentrace i-té složky ze všech takových m-složek roztoku  $\kappa$  elektrickou vodivost roztoku a  $E_{ohm}$  ohmický potenciálový spád v roztoku.

Celkově se proto ukázalo vhodným využít pro informativní znázornění energetické náročnosti v jednotlivých případech 3D diagramy dodané energie  $E_e$  v závislosti na proudové hustotě  $i$  a na elektrolytické vodivosti  $\kappa$ .

V následující tabulce Tab. I je naznačen příklad podmínek, za nichž byly elektrolyzovány modelové roztoky cca 100 mg L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub> buď po dobu 2 hod. nebo 5 hod. Hodnoty dodané elektrické energie  $E_e$  byly určeny z příslušných dat vždy za nastavené proudové hustoty  $i$  v principu podle rov. (6)

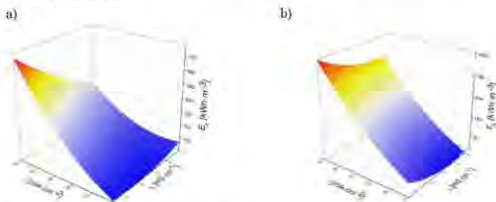
$$E_e = A i \int_0^t U dt = A i \bar{U} \quad (6)$$

kde značí  $A$  plochu elektrod,  $i$  proudové hustoty,  $U$  příslušná napětí a  $t$  čas elektrolyzy. Tabulka I se vztahuje k použití měděné Cu-katody vůči platinové Pt-anodě.

**Tabulka I.** Hodnoty  $\kappa$ ,  $i_{prům}$ ,  $E_e$  získané během galvanostatické depozice zinku po 2 a 5 hodinách na Cu-katodě vs. Pt-anodě.

Č.	$\kappa$ [mS·cm <sup>-1</sup> ]	$i_{prům}$ [mA·cm <sup>-2</sup> ]	$E_e$ 2 hod [kWh·m <sup>-3</sup> ]	$E_e$ 5 hod [kWh·m <sup>-3</sup> ]
1.	1.16	7.52	69.68	177.18
2.	1.16	18.86	178.92	465.11
3.	4.34	8.19	35.38	88.97
4.	4.34	42.83	259.88	625.55
5.	0.50	8.39	62.37	214.05
6.	5.00	25.50	118.88	300.42
7.	2.75	0.98	1.46	3.65
8.	2.75	44.90	428.17	1093.91
9.	2.75	25.50	165.72	424.33
10.	2.75	25.48	149.70	401.65
11.	2.00	35.05	298.65	743.30

Výsledky na obr. 1 se týkají depozice Zn během 2hod pro dvojici elektrod: Pt(anoda) vs. a) Cu (katoda) b) Ti(katoda)



**Obr. 1.** Závislosti dodané energie  $E_e$  pro depozici Zn na proudové hustotě  $i$  a vodivosti  $\kappa$  během 2hod pro dvojici elektrod: Pt(anoda) vs. a) Cu (katoda) b) Ti(katoda).

Obdobné diagramy  $E_e$  vs.  $i$ ,  $\kappa$  byly postupně získány i pro případy použití dalších katodových materiálů. Z porovnání diagramů vyplývá, že za podobných experimentálních podmínek je jejich charakter stejný. Nejvyšší hodnoty  $E_e$  odpovídaly oblastem, kdy byly současně jak hodnoty  $i$  vysoké tak  $\kappa$  nízké. Tehdy se patrně významně uplatňovaly příspěvky gradientů dle rovnic rov 4-6. Naopak oblast nízkých hodnot  $i$  a vysokých  $\kappa$  odpovídala relativně větší možnosti uplatnění polarizačních odporů, elektrodových rozhraní a mechanismů mimo jiné dle rovnic 1-3. Určité vzájemné rozdíly mezi diagramy v obou zmíněných oblastech hodnot  $i$  a  $\kappa$  lze připsat též různým materiálovým složením katod.

V případě reálných vzorků je třeba počítat i s přítomností významného množství organických sloučenin a jejich reziduí v technologických a odpadních vodách při diskutované výrobě viskózy. V důsledku toho lze očekávat tudíž i zvýšené energetické nároky při depozici zinku z těchto vod v porovnání s modelovými vodami. Příklad energetické spotřeby potřebné k odstranění organických látek o 3-50% je uveden v Tabulce I.



**Tabulka II.** Hodnoty  $\kappa$ ,  $i_{\text{prům.}}$ ,  $E_e$  získané během galvanostatické oxidace organických látek po 2 a 5 hodinách na průtokové BDD anodě.

Č.	$\kappa$ [mS·cm <sup>-1</sup> ]	$i_{\text{prům.}}$ [mA·cm <sup>-2</sup> ]	$E_e$ 2 hod [kWh·m <sup>-3</sup> ]	$E_e$ 5 hod [kWh·m <sup>-3</sup> ]
1.	3.58	$7.5 \times 10^{-4}$	0.8	2.0
2.	3.67	$3.0 \times 10^{-3}$	7.7	19.2
3.	3.65	$1.3 \times 10^{-2}$	84.0	210.0

### Závěr

Tato práce poskytla údaje o energetické náročnosti stejnosměrné galvanostatické depozice zinku z roztoků ZnSO<sub>4</sub> v souvislosti s výrobou viskózy. Bylo zjištěno, že spotřeba energie výrazně roste zejména s rostoucí proudovou hustotou, za výrazného vlivu vodivosti roztoku. Při analýze a diskusi řady významných faktorů ve vztahu k této práci i k dalšímu žádoucímu výzkumu (směrem k vyšší efektivitě) byly využity jak dřívější zkušenosti (např. z polarografické/voltametrické elektrolyzy, prováděné obvykle při nižších proudových hustotách) tak i nové přístupy k elektrolyze naopak (za vyšších proudových hustot) odpovídající současným i budoucím potřebám praxe.

### Acknowledgments

This research has been supported by the Student Grant Competition 2022 (SGS\_2022\_001), project SD373001/82/30352(2016) of the University Pardubice, and project NFP313010/ASS8.

### References

- Booran S. K., Doan H. D., Lohi A.: *Clean- Soil, Air, Water* 43, 368 (2015).
- Nařízení vlády č. 401/2015 Sb. *o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech*.
- Heyrovský J., Kůta J.: *Principles of Polarography*. Publishing House of the Czech. Acad. Sci., Prague 1965.
- Novotný L., Heyrovský M.: *Croat. Chem. Acta* 70, 151 (1997).
- Šestáková I., Míhlová D., Vodičková H., Mader P.: *Electroanalysis* 7, 237 (1995).
- Kočanová V., Dušek L.: *Chem. Listy* 110, 554 (2016).
- Dušek L., Kočanová V., Novotný L.: *XXXVII. Modern Electrochemical Methods* (Srsenová L. ed.), str. 31. Best Servis, Ústí nad Labem 2017.
- Gherasim C. V., Mikulášek P.: *Desalination* 343, 67 (2014).
- Kočanová V., Cuhorka J., Dušek L., Mikulášek P.: *Desalin. Water Treat.* 75, 342 (2017).
- Kumar J., Joshi H., Malyan S. K.: *Appl. Sci.* 12, 280 (2022).
- Novotný L.: *Dr. Sc. Thesis*. Acad.Sci. of the Czech.Rep., Prague 1998.
- Novotný L.: PV 2006-599, Prague, 2006.
- Dušek L., Karásková A., Kočanová V., Novotný L., Mikulášek P.: *J. Electroanal. Chem.* 864, 114069 (2020).
- Kuchtová G., Mikulášek P., Dušek L.: *Monatsh. Chem.* 153, 237 (2022).
- Novotný L., Karásková A., Kuchtová G., Mikulášek P., Dušek L.: *Monatsh. Chem.*, v tisku. doi: 10.1007/s00706-022-02915-x

**Optimization of Anodic Etching of Crystalline Silicon for Fabrication of Luminescent Silicon Nanocrystals for Chemosensor Applications**  
**(Optimalizace podmínek anodického leptání krystalického křemíku pro přípravu luminescentních křemíkových nanokrystalů pro chemosenzorové aplikace)**

Jiří Liška <sup>a</sup>, Václav Červený <sup>a</sup>, and Juraj Dian <sup>a,b</sup>

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

<sup>b</sup> Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, Department of Chemical Physics and Optics, Ke Karlovu 3, 121 16 Prague 2, Czech Republic

**Abstract**

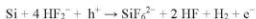
Anodic etching of crystalline silicon in fluoride-based electrolyte and optimization of the etching conditions aimed at the fabrication of porous silicon for gas chemosensors applications are presented. The main goal of the study was to prepare mechanically stable material containing luminescent silicon nanocrystals. The main optimization parameters were anodic current density, etching electrolyte composition, and the silicon wafer properties (type of doping, resistivity, crystallographic orientation). The optimized fabrication parameters were determined from gravimetry, linear voltammetry of silicon wafer in the fluoride-based electrolytes, and characterization techniques like infrared and photoluminescence spectroscopy and scanning electron microscopy.

**Keywords:** Silicon, porous silicon, Silicon nanocrystals, Anodic etching, dissolution valence, Linear voltammetry, Photoluminescence, Chemosensor.

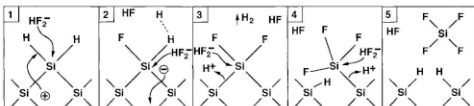
**Úvod**

Porézni křemík je materiál, který byl poprvé připraven anodickým leptáním krystalického křemíku v počátcích rozvoje křemíkové mikroelektroniky v polovině 20. století <sup>1</sup>. Tento zpočátku nepříliš zajímavý materiál byl znovuobjeven začátkem 90. let, kdy byla poprvé pozorována viditelná fotoluminiscence materiálu na bázi křemíku <sup>2</sup>. Původ fotoluminiscence byl vysvětlen přítomností křemíkových nanokrystalů v porézni matici a následně byla navržena řada mechanismů této fotoluminiscence, z nichž nejvýznamnější zahrnují kvantový rozměrový jev v Si nanokrystalech a vliv povrchových stavů <sup>3</sup>.

Anodické leptání krystalického křemíku se provádí v přítomnosti fluoridových iontů, nejčastěji ve vodném prostředí s přidávkou detergentu. Úplný mechanismus anodického leptání a vznik porézniho křemíku prozatím není potvrzen, nejpřesnější popis představují modely Turnera <sup>4</sup> a Lehmana a Göseleho <sup>5</sup>. Oba modely vycházejí z faktu, že k samotnému procesu leptání jsou potřeba fluoridové ionty a kladně nabitě nosiče náboje – díry (h<sup>+</sup>). Celkový elektrochemický děj při vzniku porézniho křemíku v Lehmannově modelu lze zapsat rovnicí:



Rozpouštěcí valence je definována jako počet vyměněných nosičů náboje na jeden rozpuštěný atom Si a při vzniku porézni vrstvy je rovna dvěma (čtyřelektronová výměna nosičů náboje vede k úplnému odleptání vrstvy). Mechanismus anodického rozpouštění za vzniku vrstvy porézniho křemíku je naznačen na obr. 1 <sup>6</sup>.



**Obr. 1.** Mechanismus anodického leptání křemíku dle Lehmana a Göseleho<sup>6</sup>: zachycení dírý atomem Si a nukleofilní atak  $\text{HF}_2^-$  (1), postupná fluorace atomu Si za oslabení Si-Si vazeb (2 – 4) a následné odtržení částice  $\text{SiF}_4$  (5).

Porozitu  $P$  a tloušťku  $T$  vrstvy porézního křemíku lze učit gravimetricky:

$$P = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_3} \quad T = \frac{m_1 - m_3}{\rho S}$$

kde  $m_1$  je hmotnost křemíkové desky před leptáním,  $m_2$  je hmotnost desky a vrstvy porézního křemíku po anodickém leptání a  $m_3$  je hmotnost substrátu po odleptání porézní vrstvy 1 M roztokem NaOH,  $\rho$  je hustota porézního křemíku ( $\sim 2,2 \text{ g cm}^{-3}$ ) a  $S$  je plocha leptané vrstvy. Rozpouštěcí valenci  $n_v$  lze určit pomocí Faradayova zákona elektrolýzy a hmotnosti odleptané vrstvy při anodickém leptání při prošlém náboji  $It$ .

$$n_v = \frac{n_{he}}{n_{\text{Si}}} = \frac{It/e}{(m_1 - m_2)/M_{\text{Si}}}$$

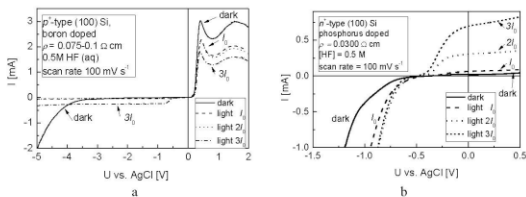
Pro chemosenzorové aplikace jsou od připravené vrstvy porézního křemíku požadovány: mechanická odolnost (porozita max. 90%), vysokou intenzitu fotoluminiscence (vhodná velikost Si nanokrystalů) a vysoký podíl vazeb Si-H na povrchu porézní vrstvy (zejména pro následné funkcionalizace povrchu s cílem zvýšení rozpoznávacích vlastností). Cílem této studie byla kontrola a optimalizace podmínek anodického leptání – proudové hustoty a složení elektrolytu a parametrů křemíkových desek.

### Experimentální část

Vzorky porézního křemíku byly připraveny anodickým leptáním různých křemíkových substrátů (Terosil):  $p$ - a  $p^+$ -typ (bor),  $n$ - a  $n^-$ -typ (fosfor), měrný odpor  $\sim 10 \Omega \text{ cm}$  ( $p$ - a  $n$ -typ) a  $\sim 0,01 \Omega \text{ cm}$  ( $p^+$ - a  $n^-$ -typ), krystalografická orientace (100) a (111). Jako elektrolyt byly použity roztoky kyseliny fluorovodíkové (40% nebo 50% vodný roztok), fluoridu amonného a ethanolu o různých poměrech. Anodické leptání bylo prováděno v teflonové cele vlastní výroby. Při přípravě vrstev porézního křemíku v galvanostatickém režimu bylo použito dvouelektrobové uspořádání s rotační Pt elektrodou jako katodou. Lineární voltametrie krystalického Si byla prováděna v tříelektrobovém uspořádání s referenční AgCl elektrodou (vlastní výroba) s použitím potenciostatu PGSTAT101 (Metrohm). Pro gravimetrické stanovení porozity a tloušťky vrstvy porézního křemíku byly použity přesné analytické váhy (Sartorius 2004 MP, přesnost 0,01 mg). FTIR spektra připravených vzorků byla měřena pomocí mikroskopu-spektrometru (Nicolet iN10) v transmisním modu v rozmezí  $4000\text{--}675 \text{ cm}^{-1}$  (chlazený MTC detektor) a rozlišením  $8 \text{ cm}^{-1}$ . SEM snímky povrchu porézního křemíku byly pořízeny pomocí mikroskopu Mira I (TESCAN) v kolmém směru a v příčném řezu.

### Výsledky a diskuse

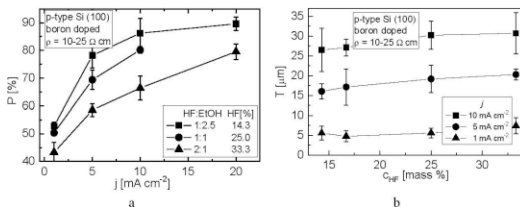
Pro přípravu porézního křemíku je důležitý režim dvouelektrobové výměny nosičů náboje. Tento režim se uplatňuje při nižších proudových hustotách a je pro něj charakteristická lineární závislost proudu na vloženém napětí. Příklady lineárních voltamogramů krystalického Si pro  $p^+$ - a  $n^-$ -typ jsou na obr. 2.



**Obr. 2.** Lineární voltamogramy krystalického křemíku (a)  $p^+$ -typu (b) a  $n^+$ -typu bez osvětlení a pro tři různé hladiny intenzity osvětlení povrchu Si

Z lineárních voltamogramů plyne, že zatímco pro  $p^+$ -typ Si docházelo k anodickému leptání i bez osvětlení povrchu křemíkové desky, pro pozorování anodického proudu (a přípravu porézního křemíku) u  $n^+$ -typu křemíku bylo nezbytné použití osvětlení. Pro vznik vrstvy porézního křemíku dvouvalenčním mechanismem <sup>6</sup> je nezbytná přítomnost  $h^+$ . Při přípravě porézních vrstev z  $p$ -typu křemíku jsou v substrátu kladně nabitě díry již přítomny (díky přítomnosti akceptorů, které přijímají elektrony z valenčního pásu), u vrstev připravovaných z  $n$ -typu křemíku jsou v substrátu přítomny volné elektrony (díky přítomnosti donorových atomů, které dodávají elektrony do vodivostního pásu) a je proto nezbytné osvětlování substrátu v průběhu anodického leptání, kdy dochází ke generování elektron-děrových párů. Osvětlování Si substrátu se u obou typů dopantů projevilo zvýšením proudu minoritních nosičů náboje.

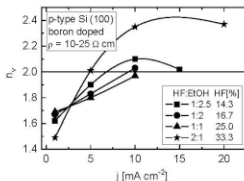
U  $p^+$ - a  $n^+$ -typu Si byla v anodické oblasti pozorována lineární oblast, u  $p^+$ -typu navíc se tzv. „electropolishing“ přikem odpovídajícího proudu  $i_{ps}$ . Lineární oblast proudu pod hodnotou  $i_{ps}$  odpovídá režimu tvorby porézního křemíku; nad touto hodnotou dochází již k odtrhávání připravené porézní vrstvy od Si substrátu a přechodu k režimu s hodnotou rozpouštěcí valence čtyři. U  $p$ - a  $n$ -typu Si substrátů ( $\rho=10\text{-}25 \Omega \text{ cm}$ ) nebylo možné změřit voltametrické křivky se stávajícím experimentálním vybavením a režim dvouvalenčního rozpouštění křemíku byl ověřen gravimetricky a pomocí FTIR spektroskopie při optimalizaci podmínek přípravy.



**Obr. 3.** (a) Závislost porozity porézního křemíku na proudové hustotě pro různé složení elektrolytu. (b) Závislost tloušťky porézní vrstvy na hmotnostní koncentraci HF v elektrolytu pro různé proudové hustoty.

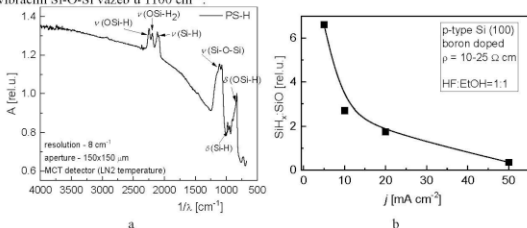
U *p*-typu substrátu byla provedena podrobná gravimetrická studie stanovení porozity, tloušťky vrstvy a rozpouštěcí valence pro různé podmínky přípravy. Na obr. 3a a 3b jsou uvedeny závislosti porozity *P* a tloušťky porézni vrstvy na proudové hustotě pro různé složení leptacího elektrolytu. Z obrázku je zřejmé, že porozita vrstvy roste s proudovou hustotou a s klesající koncentrací HF v elektrolytu a tloušťka vrstvy roste s proudovou hustotou (celkovým nábojem prošlým Si substrátem), přičemž na složení elektrolytu příliš nezávisí.

Na obr. 4 je závislost rozpouštěcí valence pro *p*-typ křemíkového substrátu pro zvolené podmínky přípravy. Z obrázku plyne, že rozpouštěcí valence roste s rostoucí proudovou hustotou. Závislost na koncentraci HF v leptacím elektrolytu nebyla monotónní a pozorovaný průběh je ovlivněn značnou experimentální chybou stanovení (~30 %).



**Obr. 4.** Závislost rozpouštěcí valence při anodickém leptání krystalického křemíku na proudové hustotě pro různé složení leptacího elektrolytu.

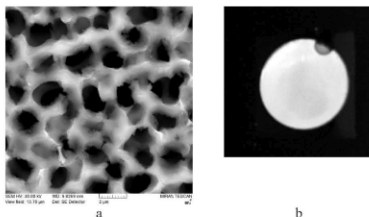
Nárůst rozpouštěcí valence s proudovou hustotou při přípravě porézni Si vrstvy souvisí s postupným přechodem od dvouvalenčního mechanismu anodického leptání, kdy se na povrchu vrstvy tvoří přednostně vazby SiH<sub>x</sub> (x=1-3), k čtyřvalenčnímu mechanismu, kdy narůstá podíl Si-O-Si a Si-OH vazeb. Zastoupení typu povrchových vazeb bylo pro připravené vzorky sledováno pomocí FTIR spektroskopie. Na obr. 5a je typické FTIR absorpční spektrum čerstvě připravené vrstvy porézniho křemíku. Ve spektru jsou charakteristické pásy odpovídající valenčním vibracím Si-H vazeb v okolí 2100 cm<sup>-1</sup> a pás odpovídající valenčním vibracím Si-O-Si vazeb u 1100 cm<sup>-1</sup>.



**Obr. 5.** (a) FTIR absorpční spektrum vzorku porézniho křemíku, (b) Závislost poměru plochy pásů SiH a SiO povrchových vazeb porézniho křemíku na proudové hustotě.

FTIR spektra naměřená pro (100) Si *p*-typu pro leptací elektrolyt o složení HF:EtOH=1:1 byla vyhodnocena a byly stanoveny plochy, které odpovídají jednotlivým typům vazeb. Při vyhodnocení bylo nutné odečíst velikost plochy piku SiO vazeb v čistém Si substrátu (Si monokrystal vyrobený Czochralského metodou obsahuje relativně značné množství kyslíku). Závislost poměru ploch píků, odpovídajících SiH<sub>x</sub> a SiO vazbám je na obr. 5b. Z obrázku je zřejmý monotónní pokles tohoto poměru s rostoucí proudovou hustotou. Pro proudovou hustotu  $j=50 \text{ mA cm}^{-2}$  bylo zastoupení SiO vazeb na povrchu anodické vrstvy vyšší než SiH<sub>x</sub> vazeb a v mechanismu anodického leptání již převažovala rozpouštěcí valence čtyři.

Připravené porézní vrstvy byly charakterizovány skenovacím elektronovým mikroskopem, na obr. 6 jsou viditelné póry o velikosti 1-2  $\mu\text{m}$ . Tento typ porézní vrstvy porézního křemíku se nazývá makroporézní křemík a vykazuje (na rozdíl od vrstev s menší velikostí pórů a z toho plynoucí nižší porozitou) intenzivní fotoluminiscenci při pokojové teplotě (obr. 6b).



**Obr. 6.** (a) SEM obrázek povrchu porézního křemíku, (b) fotografie vrstvy porézního křemíku při ozáření UV světlem <sup>7</sup>.

### Závěr

Byly studovány podmínky anodického leptání křemíkových desek různého typu v elektrolytech na bázi fluoridových iontů pro přípravu fotoluminiscenčních vrstev porézního křemíku pro chemosenzorové aplikace. Pro *p*-typ křemíkových desek s orientací (100) byla provedena optimalizace parametrů anodického leptání a z gravimetrických stanovení byly získány závislosti porozity a tloušťky vrstev na proudové hustotě a koncentraci HF v leptacím elektrolytu. Voltametrické studium *p*<sup>+</sup> a *n*<sup>-</sup>-typu Si v elektrolytech na bázi fluoridových iontů ukázalo proudové rozsahy tvorby vrstvy porézního Si (rozpouštěcí valence dva) a úplného odleptávání povrchu Si (rozpouštěcí valence čtyři). Vrstvy porézního křemíku připravené za optimalizovaných podmínek vykazují makroporézní morfologii o velikosti pórů 1-2  $\mu\text{m}$  a intenzivní fotoluminiscenci při pokojové teplotě.

### References

1. Uhlir A.: Bell Syst. Tech. J. 35, 333 (1956).
2. Canham, L.T.: Appl. Phys. Lett. 57, 1046 (1991).
3. Canham, L.T.: Properties of Porous Silicon, INSPEC, London 1997.
4. Turner D.R.: J. Electrochem. Soc. 105, 402 (1958).
5. Lehmann V., Gösele U.: Appl. Phys. Lett. 58, 856 (1991).
6. Lehmann V., Electrochemistry of Silicon. Wiley-VCH, Weinheim 2002.
7. Liška J.: Bachelor Thesis. Charles University, Prague 2019.

## Electrocatalytic Debromination of Organic Compounds on Electrodeposited Silver Nanofoam

Anton Lytvynenko<sup>a,b</sup>, Andrey Mishura<sup>b</sup>, Agnieszka Brzózka<sup>c</sup>, Grzegorz Sulka<sup>c</sup>, and Sergey Kolotilov<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: lytvynean@natur.cuni.cz

<sup>b</sup> L.V. Piszarzhevskii Institute of Physical Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Nauky av. 31, Kyiv, 03028, Ukraine

<sup>c</sup> Jagiellonian University, Faculty of Chemistry, Gronostajowa 2, 30-387 Kraków, Poland

### Abstract

Silver nanofoams were obtained via electrodeposition from acidic aqueous electrolytes at high current densities. The nanofoams exhibited superior electrocatalytic activity toward reductive debromination of organic halides compared to a smooth silver electrode. Variation of electrodeposition conditions influenced the sizes of both micro- and nanosized structural elements of the nanofoam, but led only to limited changes in the electrocatalytic performance. Formation of active centers facilitating the debromination on the facets of silver nanocrystals forming the nanofoam was hypothesized. Less than 1 mg of the nanofoam performed comparably to 500 mg of silver wire in the debromination of 1-fluoro-4-bromobenzene.

**Keywords:** Dehalogenation, Electrocatalyst, Electrodeposition, Nanofoam, Silver.

### Introduction

Nanostructured electrode surfaces are promising for a number of electrochemical applications, including, in particular, electrochemical sensors<sup>1</sup> as well as preparative electrosynthesis of valuable chemicals<sup>2</sup>. The nanostructuring could improve the energy efficiency, the yield of the desired product, sensitivity and efficiency of utilization of precious materials (such as noble metals, which are often efficient electrocatalysts for valuable processes, *e.g.* water splitting). Nanostructured surfaces could be also prospective as carriers of catalysts, SERS substrates, heat sinks, photocatalysts *etc.* Electrodeposition of so called metal nanofoams from acidic electrolytes under high current densities (order of units of amperes per a square centimeter) accompanied by vigorous hydrogen evolution (ensuring the “foaming” of metal) is a convenient and cheap route to such novel electrode materials<sup>3</sup>. The nanofoam deposits consist of metal nanoparticles and/or nanorods interconnected in a way which retains interparticle porosity and lead to a self-supported coating.

Electrochemical reductive dehalogenation (Fig. 1) is considered as an efficient way for degradation of halogen-containing organic compounds, including persistent organic pollutants<sup>4</sup> (such as polyhalogenated biphenyls, freons, insecticides *etc.*), which, due to their chemical inertness, are hard to be destructed by conventional chemical means. Within the electrochemical processes, this inertness is manifested in high overpotentials on commonly employed electrodes. Such overpotentials could be mitigated by selection of electrocatalytically active electrode materials, and elemental silver was found to be one of the most efficient ones<sup>5</sup>. Nanostructuring of silver can further improve its electrocatalytic activity and ensure more efficient utilization of the same mass of this expensive material.

The aim of this work was to elucidate the influence of the silver nanofoam deposition conditions on its structure and electrocatalytic activity in reductive dehalogenation of organic halides.

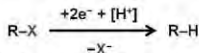


Fig. 1. A typical scheme of the electrochemical reductive dehalogenation of an organic halide. X = Cl, Br, I; R – the rest of the molecule, [H<sup>+</sup>] denotes the “acidic” hydrogen (usually not dissociated).

### Experimental

Silver nanofoams were deposited as electrode coatings onto smooth glassy carbon or silver electrodes with surface area of 0.03–1.0 cm<sup>2</sup> from aqueous electrolytes containing (0.5–2.0) · 10<sup>-2</sup> mol/L of AgNO<sub>3</sub> or AgBF<sub>4</sub> and 1–3 mol/L of HBF<sub>4</sub>. A 2-electrode cell was utilized for the electrodeposition; a glassy carbon plate with a significantly larger surface area was employed as the counter electrode. Before the deposition, the surface of the support was polished with the alumina powder, rinsed with water and isopropyl alcohol, sponged with filter paper and dried in air. Constant current density of 3–6 A/cm<sup>2</sup> was imposed for 60–120 s via EA-PS 2084-10 B (Elektro-Automatik, Germany) power supply. After the deposition, the support with the deposited coating was thoroughly washed with isopropanol and dried in air.

The morphology of the coatings was assessed via scanning electron microscopy (SEM) and optical microscopy employing a field-emission scanning electron microscope (FE-SEM Hitachi S-4700, Tokyo, Japan) and Delta Optical Evolution 100 Trino Plan optical microscope, respectively. The phase purity was confirmed via X-ray diffraction (XRD) measurements (via Bruker D8 Advance instrument with CuK $\alpha$  radiation,  $\lambda$  = 1.54056 Å, in the 2 $\theta$  range of 5–90 $^\circ$ ), only the reflexes corresponding to elemental silver were found on the diffractograms.

Electrocatalytic performance of the silver nanofoams was characterized by the means of cyclic voltammetry (CV). The CV measurements were performed employing a Gamry Reference 3000 potentiostat at 100 mV/s sweep rate (unless explicitly mentioned otherwise). A 3-electrode cell with a glassy carbon plate as the counter electrode and a silver wire immersed into a 0.1 mol/L AgNO<sub>3</sub> solution in acetonitrile as the reference electrode were used. The electrolyte was 0.1 mol/L (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>NBF<sub>4</sub> in dry acetonitrile or dimethylformamide, thoroughly deaerated before the measurements via with argon bubbling, argon was kept flowing over the electrolyte during the entire measurement to avoid the intrusion of the air into the cell. The potentials and currents of peaks corresponding to the reduction of the studied organic halides on glassy carbon, smooth silver and silver nanofoam were compared in order to assess the electrocatalytic performance.

The preparative electrolysis experiments were performed in the potentiostatic mode in an undivided 3-electrode cell with a magnesium sacrificial anode (the anode was activated immediately before each experiment by immersing into a diluted HCl solution followed by rapid washing in water, isopropyl alcohol, sponging with filter paper and drying on air). The electrolyte was the same as for the CV measurements (the dimethylformamide-based one was chosen). Prior to the experiment the cell was deaerated by the argon flow and sealed. The choice of the process potential was governed by the results of the CV measurements. After the electrolysis, an aliquot of the electrolyte was mixed with deuterated dimethylsulfoxide and analyzed via NMR spectroscopy on <sup>19</sup>F nuclei (employing Varian Unity Plus 400 spectrometer).

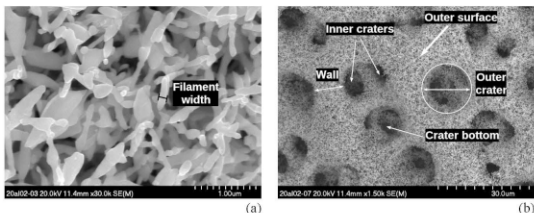
### Results and discussion

The electrodeposition from the acidic aqueous electrolytes under high current densities led to the formation of hierarchically structured foam-like silver deposits with two levels of the structure: nanoscale silver filaments (mean width varied within 100–450 nm in response to



tuning the deposition conditions) arranged in microsized walls surrounding empty craters (with mean diameter varied in range 7–40  $\mu\text{m}$ ) formed by hydrogen bubbles (Fig. 2). The electrochemically accessible surface areas of the deposits, estimated through the double layer charging currents within CV experiments, were 2–8 times higher compared to a smooth silver electrode with the same area (this ratio was further referred as roughness). The filaments had irregular shape, which implied they were results of aggregation of lesser single crystals of silver. The sizes of the latter, roughly estimated as the sizes of coherent scattering regions deduced from the XRD data, were within 13–60 nm. The structure of the resulting nanofoam was consistent with the previous reports for the electrodeposited nanofoams of other metals <sup>6</sup> and the nanofoams of silver, deposited from other kinds of electrolytes <sup>7</sup>.

Higher  $\text{Ag}^+$  concentration resulted in higher mean crater diameter, mean filament width and roughness of the nanofoam. Higher deposition time and current density led to increase in the mean crater diameter and roughness, but not in the mean filament width. The increase in the concentration of the acid, on the contrary, was associated with only a slight increase in mean crater diameter without notable systematic changes in other parameters. These findings suggest that the peculiarities of the nanofoam structure are results of a fine interplay between two parallel processes taking place upon its formation: metal deposition and hydrogen evolution.



**Fig. 2.** SEM image of an example of silver nanofoam obtained by us with all principal structure features described: nanoscale (a) and microscale (b) view. The original versions of the images were published by us in ref. <sup>8</sup>.

Electrocatalytic performance of the silver nanofoams deposited under a selected procedure ( $[\text{Ag}^+] = 0.01 \text{ mol/L}$ ,  $[\text{HBF}_4] = 2 \text{ mol/L}$ , deposited for 60 s at 3  $\text{A/cm}^2$  onto glassy carbon) was compared to smooth silver and glassy carbon for a set of organic halides of different structure (Fig. 3). For all compounds except 1-bromo-4-fluoro-2-nitrobenzene, the nanofoam exhibited anodic shifts of the corresponding reduction peaks (up to 345 mV for bromobenzene in the dimethylformamide-based electrolyte, the exact values for all studied compounds were provided by us in ref. <sup>9</sup>) on the voltammograms recorded on the nanofoams compared to that recorded on smooth silver, evidencing for higher electrocatalytic activity of the nanofoam than the activity of smooth silver. Absence of the effect for the nitro-compound could be explained by the supposition that the nature of the process was actually the reduction of the nitro-group rather than debromination.

Disregard notable variation of the sizes of the structural elements of the nanofoam upon change of the deposition conditions, the potentials of the bromobenzene reduction peak on the

nanofoams prepared under different conditions varied within a relatively narrow range of 60 mV, while no sample had the potential shift less than 200 mV (in acetonitrile-based electrolytes, vs 295 mV in the dimethylformamide-based ones) compared to the smooth silver. The results on the electrocatalytic performance could be explained only with the suggestion that the reaction proceeded primarily on the defects of the flat surfaces (facets) of the silver particles forming the nanofoam, and such defects were the intrinsic feature of any silver nanofoam sample formed via electrodeposition. Suppositions about other possible origins of the higher electrocatalytic activity, such as involvement of the silver atoms at the edges and vertices of the nanocrystals, redistribution of the potential on the curved metallic surface or apparent effect of the surface area increase were not consistent with the experimental results.

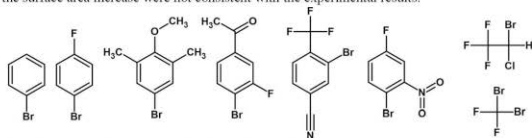


Fig. 3. Formulae of the organic halides studied in this work.

A long-term preparative-scale performance of a selected sample of the silver nanofoam was assessed in the preparative electrolysis of 1-bromo-4-fluorobenzene and  $\text{CF}_3\text{CHClBr}$ . The reduction of the latter was accompanied by destruction of the nanofoam, presumably due to the formation of soluble complexes with the  $\text{CF}_2=\text{CHCl}$  alkene – one of the possible reaction products. However, the performance of the nanofoam in the debromination of 1-bromo-4-fluorobenzene (yielding fluorobenzene) was comparable to the performance of a bulk silver wire with the same electrochemically active surface – which, in turn, allowed to achieve the same results employing more than 500 times lesser amount of silver.

### Conclusions

Electrodeposition of silver from acidic aqueous electrolytes under high current density resulted in formation of foam-like deposit (nanofoam) with 2-level hierarchical structure (microscale and nanoscale). The resulting material exhibited superior electrocatalytic activity in reductive dehalogenation of organic halides of various structure compared to smooth silver electrodes, which manifested itself in less negative potentials of the cyclic voltammetry peaks corresponding to the reduction of the organic halides. Variation of the deposition conditions (concentration of electrolyte components, deposition time and current density) allowed to tune the sizes of the structural elements of the nanofoam, but only slightly influenced the electrocatalytic performance. Such superior electrocatalytic activity could originate from some kind of active centers on the surfaces of the crystals, and this could be an intrinsic feature of the silver deposits formed under high current densities. The nanofoam electrode coating performed similarly to smooth silver electrode with the same surface area in preparative-scale debromination of 1-bromo-4-fluorobenzene yielding fluorobenzene, allowing to achieve the same results employing more than 500 times lesser amount of silver.

### Acknowledgments

This research has been supported by the Governments of Czechia, Hungary, Poland and Slovakia through Visegrad Grants from International Visegrad Fund (the Visegrad Scholarship granted to Anton Lytvynenko in 2018, contract number 51810453) and by President's of Ukraine grant for competitive projects (project number F82/227-2019). SEM imaging was

performed in the Laboratory of Field Emission Scanning Electron Microscopy and Microanalysis at the Institute of Geological Sciences, Jagiellonian University, Poland. The authors thank to Prof. L. Zaraska (Faculty of Chemistry, Jagiellonian University), Dr. M. Kurmach, Mgr. N. Grabovaya (L.V.Pisarzhevskii Institute of Physical Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine) and Dr. K. Gavrilenko (Enamine Ltd., Kyiv, Ukraine) for their assistance in the experimental work.

## References

1. An C.Y., Zhuo K., Kim W.-J., Chung C.-H.: *Sens. Actuators B Chem.* *213*, 329 (2015).
2. Du D., Lan R., Humphreys J., Sengodan S., Xie K., Wang H., Tao S.: *ChemistrySelect.* *1*, 1711 (2016).
3. Yang G.-M., Chen X., Li J., Guo Z., Liu J.-H., Huang X.-J.: *Electrochim. Acta.* *56*, 6771 (2011).
4. Martin E. T., McGuire C. M., Mubarak M. S., Peters D. G.: *Chem. Rev.* *116*, 15198 (2016).
5. Neukermans S., Vorobjov F., Kenis T., De Wolf R., Hereijgers J., Breugelmans T.: *Electrochim. Acta.* *332*, 135484 (2020).
6. Sen S., Liu D., Palmore G.T.R.: *ACS Catal.* *4*, 3091 (2014).
7. Cherevko S., Chung C.-H.: *Electrochim. Acta.* *55*, 6383 (2010).
8. Lytvynenko A. S., Brzózka A., Mishura A. M., Kolotilov S.V., Sulka G. D.: *Appl. Surf. Sci.* *579*, 152131 (2022).
9. Mishura A. M., Lytvynenko A. S., Gavrilenko K. S., Baranchikov A. E., Grabovaya N. V., Kiskin M. A., Kolotilov S. V.: *New J. Chem.* *42*, 17499 (2018).

## Analysis of the Hydrated ions Clusters Impact on the Liquid/Liquid Interface

Vladimír Mareček, Zdeněk Samec, and Antonín Trojánek

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

Open circuit potential (OCP) measurements of the partition of tetrapentylammonium chloride (TPeACl) at the water/1,2-dichloroethane (DCE) interface reveal two remarkable processes. The first one is characterized by a decay of the OCP from its expected equilibrium value. This process has been ascribed to the extraction of the salt driven by its accumulation in the hydrated salt clusters in the DCE phase. The second process is characterized by the short-term potential spikes overlapping the long-term OCP records. These spikes are assumed to be associated with the collision and fusion of the hydrated salt clusters produced by the former process with the water/DCE interface.

**Keywords:** Water/1,2-dichloroethane interface, Salt partition, Open circuit potential, Potential spike, Hydrated salt cluster.

### Introduction

Recently, we have proposed<sup>1</sup> and reconsidered<sup>2</sup> a model of the salt partition at a water/organic solvent interface emphasizing the role of the hydrated salt clusters in the organic solvent phase<sup>3</sup>. Essentially, we have shown that the amount of the extracted TPeA<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions exceeds considerably the limit imposed by the equilibrium concentration of the Cl<sup>-</sup> ions in DCE and the electroneutrality condition<sup>2</sup>. The excessive TPeACl was assumed to be accumulated in the hydrated salt clusters in DCE, the formation of which thus represents the driving force of the anomalous salt extraction<sup>2</sup>.

Here we provide evidence of the reverse process comprising a spontaneous transfer of the hydrated TPeACl clusters from the organic to the aqueous phase and their dissolution. Evidence is based on the observation of the potential spikes overlapping the long-term OCP record. In the previous studies<sup>1,2</sup> these spikes were not observed probably due to much lower initial concentration of TPeACl in the aqueous phase, and thereby much lower amount of the salt transferred to the organic solvent phase. The impact of the hydrated salt clusters can be treated as a self-perturbation of the salt partition at a liquid/liquid interface<sup>4</sup>.

### Experimental

Reagent grade tetrapentylammonium chloride (TPeACl) was supplied by Fluka AG, and used as received. Tetrapentylammonium tetraphenylborate (TPeATPB) was prepared by metathesis of TPeACl and NaTPB. Electrolyte solutions were prepared using deionized water (< 0.1 μS cm<sup>-1</sup>, GORO system, Czech Republic), and 1,2-dichloroethane (1,2-DCE, 99%, Penta).

A two-electrode cell was used throughout, the scheme of which can be described by  
Ag/AgCl/ 39 mM TPeACl(w)/ 5 mM TPeATPB(o)/ 5 mM TPeATPB(o<sup>-</sup>)/ 5 mM TPeACl(w<sup>-</sup>)/  
AgCl/Ag<sup>-</sup>  
(1)

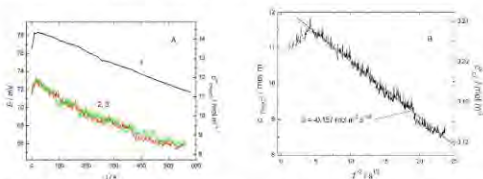
The liquid/liquid interface with the area  $A = 1.77 \times 10^{-6} \text{ m}^2$  was supported at the tip of an L-shaped glass capillary with the inner diameter of the orifice of 1.5 mm. The capillary was filled with the aqueous phase (w) and immersed in the organic phase (o) (volume < 2 mL). A small

air bubble was left at the capillary tip to prevent contact between the phases before starting the first OCP measurement. At the start, the air bubble was ejected by a syringe connected to the capillary. This procedure enabled us to initiate the OCP measurement under the defined initial conditions, in particular with the chloride concentration in the organic phase being equal to zero. A syringe was also used to refresh the interface by renewing the aqueous phase. In all experiments, the DCE phase ( $\alpha$ ) was equilibrated with pure water before preparing the cell. The solutions forming the reference interface  $w'/\alpha'$  were mutually equilibrated. The organic solvent phases ( $\alpha$ ) and ( $\alpha'$ ) were separated by a sintered glass. The detailed description of the cell has been presented in the previous communications<sup>1,2</sup>.

The battery-operated high-input impedance preamplifier (amplification 5.22) constructed using an operational amplifier INA116 (Texas Instruments) and the cell were placed within a grounded Faraday cage. The Solartron SI 1287 Electrochemical Interface (England) or Hewlett Packard 3458A Multimeter (U.S.A.) were used to record the cell OCP. The latter one operated by a computer was used for a fast acquisition data sampling. All measurements were conducted at a temperature of  $295 \pm 2$  K.

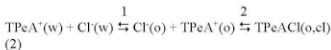
### Results and discussion

Fig. 1A shows three OCP records in the time interval 0 - 600 s. The very first OCP record was measured immediately after bringing the phase ( $w$ ) and the phase ( $\alpha$ ) saturated with pure water into a contact. This record is represented by a smooth curve exhibiting a maximum followed by a slow potential decay, cf. curve 1. The subsequent records, each obtained after renewing the interface by a syringe connected to the capillary, have a similar shape, but the records are overlapped by small potential spikes oriented towards more positive potentials, cf. curves 2 and 3. These spikes have not been observed in the previous studies<sup>1,2</sup>, which were carried out with 4 to 10 times lower concentrations of TPeACl in the aqueous phase ( $w$ ).



**Fig. 1.** (A) OCP records for the electrolytic cell described by Scheme 1. Curve 1 was obtained immediately after the phases ( $w$ ) and ( $\alpha$ ) were brought into a contact. Curves 2 and 3 were obtained subsequently after renewing the interface. (B) Plot of the transient concentration  $c_{\text{TPeACl}}^w(t) = c_{\text{TPeA}^+}^w(t) = c_{\text{Cl}^-}^w(t)$  of TPeACl on the aqueous side of the interface vs.  $t^{1/2}$  evaluated from the second OCP record depicted as curve 2 in Fig. 1A.

The OCP measurements thus reveal two remarkable processes occurring at the water/DCE interface. The first one that has been previously reported<sup>2</sup> is characterized by the substantial drop of the interfacial potential from the expected value of 0.105 V to the value of about 0.08 V, and its further decay, cf. Fig. 1A. This decay has been ascribed to the extraction of TPeACl from water to the organic solvent phase driven by the accumulation of TPeACl in the hydrated salt clusters following the reaction scheme<sup>2</sup>.



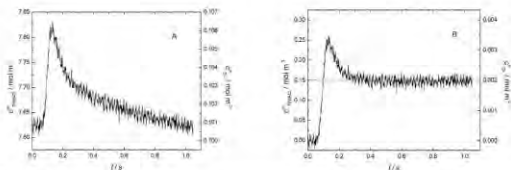
where (o,cl) represents the hydrated TPeACl cluster phase in the organic solvent.. The step 2 can be preceded by the reversible formation of the ion pair  $\text{TPeA}^+\text{Cl}^-$ . The OCP transient was transformed into the time dependence of the TPeACl concentration  $c_{\text{TPeACl}}^{\text{w}}(0, t) = c_{\text{TPeA}^+}^{\text{w}}(0, t) = c_{\text{Cl}^-}^{\text{w}}(0, t)$  on the aqueous side of the w/DCE interface ions using a Nernst-type equation. Fig. 1B shows that the plot of  $c_{\text{TPeACl}}^{\text{w}}(0, t)$  vs. the square root of time  $t$  is linear over almost entire period of time of the OCP measurements indicating that the concentration decay is controlled by diffusion.

The second process is observed when the two liquid phases are in contact for a longer time, and the TPeACl concentration in the aqueous phase is high enough. This process is characterized by the positive potential spikes overlapping the long-term OCP records; cf. Fig. 1A, curves 2 and 3. These spikes correspond to a sudden increase of the  $\text{TPeA}^+$  concentration on the aqueous side of the interface. We assume that this new effect is associated with the collision and fusion of the hydrated TPeACl clusters or their aggregates previously formed in the organic phase with the water/DCE interface. Obviously, the amount of TPeACl released from a single cluster must be sufficient to cause an observable increase in the concentration of TPeACl on the aqueous side of the interface.

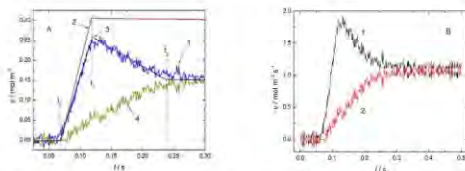
The potential spikes on the OCP record can be treated as a response to a perturbation of the steady-state diffusion process underlying the long-term potential decay. The potential spikes were converted to the concentration transients. An example of the concentration transient corresponding to a single potential spike is shown in Fig. 2A. After the period of time of 0.4 s from the onset of the spike, the plot of the concentration  $c_{\text{TPeACl}}^{\text{w}}(t)$  vs. the square root of time  $t$  becomes linear with a slope of  $-0.15 \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1/2}$  which is almost identical to the slope of the overall steady-state process, cf. Fig. 1B. For the purpose of an analysis of the potential spike itself, the concentration transient shown in Fig. 2A was corrected for the contribution from the long-term TPeACl concentration decay shown in Fig. 1B. The corrected transient of the concentration increment  $\Delta c_{\text{TPeACl}}^{\text{w}}(0, t)$  with the onset concentration set to zero is shown in Fig. 2B.

We assume that part 1 of the concentration transient corresponds to the impact of the hydrated TPeACl cluster from the organic side of the interface followed by its dissolution and ion dissociation in the aqueous phase. This process occurs as a zero-order reaction, i.e., the increment of the concentration of the dissociated TPeACl on the aqueous side of the interface is proportional to time  $t$ ,  $\Delta c_{\text{TPeACl}}^{\text{w}}(0, t) = k_1 t$ , where  $k_1$  is the zero-order rate constant. The concentration increment  $\Delta c_{\text{TPeACl}}^{\text{w}}(0, t)$  reaches a maximum after the period of time  $t_1 - t_0 \approx 50$  ms, cf. Fig.3A. In the second part, the increment  $\Delta c_{\text{TPeACl}}^{\text{w}}(0, t)$  decreases due to the ongoing transfer of TPeACl to the organic solvent phase and the formation of the hydrated TPeACl clusters, according to the Scheme 2. Since both processes occur simultaneously, their resolution can be only tentative. The maximum increment  $(\Delta c_{\text{TPeACl}}^{\text{w}})_{\text{max}}$  of the TPeACl concentration, which is unaffected by the following ion pairs formation, can be estimated by extrapolating the linear concentration plot in the part 2 of the concentration transient to the time  $t = t_0$ , yielding  $(\Delta c_{\text{TPeACl}}^{\text{w}})_{\text{max}} = 0.304 \text{ mol m}^{-3}$ . Fig. 3A (line 2) shows the dependence of the hypothetical concentration increment  $(\Delta c_{\text{TPeACl}}^{\text{w}})_{\text{hyp}}$  on time unaffected by the step 2 in Scheme 2, with the initial slope  $s_1 (= k_1) = 6.2 \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$ . The difference of the hypothetical concentration increment  $(\Delta c_{\text{TPeACl}}^{\text{w}})_{\text{hyp}}$  and the experimental concentration increment  $\Delta c_{\text{TPeACl}}^{\text{w}}$  (curve 1 in

Fig. 3A) is shown by curve 4 in Fig. 3A. This difference is a measure of the amount of TPeACl transferred to the organic phase. Finally, in part 3 of the concentration transient, the concentration increment  $\Delta c_{\text{TPeACl}}^w(t)$  becomes independent of time, which indicates that an equilibrium at the interface has been reached, step 2 in Scheme 2.



**Fig. 2.** (A) Concentration transient corresponding to the single cluster impact (B) Concentration transient corresponding to the single cluster impact shown in Fig. 2A corrected for the long-term concentration decay depicted in Fig. 1B. The initial concentration  $c_{\text{TPeACl}}^{w,0}$  was set to zero.



**Fig. 3.** (A) Analysis of the concentration transient displayed in Fig. 2B: experimental data (curve 1), plot of the hypothetical concentration increment ( $\Delta c_{\text{TPeACl}}^w$ )<sub>hyp</sub> vs. time  $t$  unaffected by step 2 in Scheme 2 (curve 2), a fit of the experimental concentration transient (curve 3), difference of curve 2 and curve 1 (curve 4). (B) Time dependences of the forward (curve 1) and the backward (curve 2) reaction rates in Fig. (3).

According to the Scheme 2, the kinetics of the hydrated cluster formation is controlled by the second-order kinetic law,

$$\frac{d\Delta c_{\text{TPeACl}(os)}(0,t)}{dt} = \bar{k} c_{\text{Cl}^-}^o(0,t) c_{\text{TPeA}^+}^o(0,t) - \bar{k} \Delta c_{\text{TPeACl}(os)}(0,t) \quad (3)$$

where  $\bar{k}$  and  $\bar{k}$  are the forward and backward rate constants for the step 2. The concentrations  $c_{\text{Cl}^-}^o(0,t)$  and  $c_{\text{TPeA}^+}^o(0,t) = c_{\text{TPeACl}}^o(0,t) + c_{\text{Cl}^-}^o(0,t)$  (the initial concentration  $c_{\text{TPeATPB}}^o = 5 \text{ mol m}^{-3}$ ) of the Cl<sup>-</sup> and TPeA<sup>+</sup> ions on the organic side of the interface, respectively, can be evaluated as the functions of time  $t$  from the OCP transients. The dependence of the chloride concentration

$c_{\text{Cl}^-}^0(0, t)$  on time has the same shape as the concentration increment  $\Delta c_{\text{TPeACl}}^w(0, t)$ , though the values of  $c_{\text{Cl}^-}^0(0, t)$  are two orders of magnitude lower, cf. the  $y$ -coordinate on the right-hand side of the plot shown in Fig. 2B. Eq. (3) was used to evaluate the equilibrium constant  $K = \bar{k}/\bar{k}$  and the rate constants  $\bar{k}$  and  $\bar{k}$ , assuming that the volumes of the boundary layers occupied by the reactants in the aqueous and the organic solvent phase are equal. The equilibrium constant  $K = (0.304 - 0.15 - 0.002)/(0.002 \times 5.002) = 15.2 \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1}$  was evaluated directly from Eq. (3) upon the substitution of the corresponding concentrations attained at a sufficiently long time, when the rate  $(d\Delta c_{\text{TPeACl}(0,s)})/dt$  approaches zero. The value of the second-order rate constant  $\bar{k} = 109 \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  was obtained by fitting Eq. (3) to the experimental time dependence  $\Delta c_{\text{TPeACl}(0,s)}(0, t)$  (Fig. 4A, curve 4) after substituting  $\bar{k}$  by  $\bar{k}/K$ . The rate constant  $\bar{k}$  is then evaluated as  $\bar{k} = \bar{k}/K = 7 \text{ s}^{-1}$ . The time dependences of the forward and the backward reaction rates in Eq. (3) are shown by curves 1 and 2 in Fig. 3B, respectively.

### Conclusions

The detection of the self-perturbation of the steady-state salt partition at the ITIES offers a novel tool to study its kinetics and mechanism. In principle, this approach has all advantages of the traditional electrochemical perturbation techniques and, moreover, this kind of perturbation is introduced by the electrochemical process itself. In contrast to the perturbation signal from an external source, this perturbation is caused by a small electrically neutral particle, the impact of which does not induce any measurable mechanical instability of the interface. An analysis of the potential response of the electrochemical system to the perturbation of the steady-state process provides a unique possibility to infer the kinetic and equilibrium data from single cluster impact measurements.

### Acknowledgments

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

### References

1. Mareček V.: *Electrochem. Commun.* *88*, 57 (2018).
2. Holub K., Samec Z., Mareček V.: *Electrochim. Acta* *306*, 541 (2019).
3. Wang L., Kikkawa N., Morita A.: *J. Phys. Chem. B* *122*, 3562 (2018).
4. Trojáněk A., Samec Z., Mareček V.: *Electrochim. Acta* *361*, 137059 (2020).



## Electrodeposition of Gold Nanoparticles to Modify the Boron-doped Diamond Electrode

Oleksandr Matvieiev, Renáta Šelešiovská, 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: oleksandr.matvieiev@student.upce.cz

### Abstract

This work shows a method of modifying the boron-doped diamond electrode (BDDE) with gold nanoparticles (AuNPs) using electrodeposition. The optimization of the potential and time of electrodeposition of AuNPs was carried out. The obtained modified material of the working electrode was examined using scanning electron microscopy (SEM). The electrochemical properties were investigated using conventional inner sphere and outer-sphere redox markers. An example of the use of a modified BDDE and lab-made screen-printed sensor (SPS) with a modified BDD working electrode for dopamine neurotransmitter analysis is shown.

**Keywords:** boron-doped diamond electrode, gold nanoparticles, electrodeposition, modification, application, dopamine.

### Introduction

The boron-doped diamond electrode (BDDE) was introduced into electroanalytical practice almost 30 years ago and established very well due to its excellent electrochemical properties, such as wide available potential window (up to 3 V), low background currents (low current noise), good chemical resistance (corrosion resistance even at anodic polarization), the resistance to passivation, high hardness, and thermal conductivity<sup>1-4</sup>. BDDE was used in the analysis of various biologically active substances important for environmental protection and human health<sup>5-6</sup>. In recent years, current electroanalytical chemistry has required miniaturization, acceleration of analysis, and reduction of sample volume. These criteria are met by screen-printed sensors (SPE) which enable rapid and accurate in-situ analyses and the development of portable devices for the quantitation of various substances<sup>7</sup>. Combining the technology of printed sensors with their specific advantages and a BDDE with its unique electrochemical properties can lead to a significant improvement or expansion of the possibilities of application of electroanalytical methods in practice<sup>8</sup>. Moreover, the modification of the BDDE surface, e.g., with metals or metal oxides nanoparticles, organic molecules, biomolecules, and carbon materials, can lead to further improvement of SPE properties or application possibilities.

Many biologically active substances can be determined at the positive potential values. The modification of BDDE with gold nanoparticles (AuNPs) was chosen because gold has a much more positive oxidation potential (+1.5 V) compared to other metals and thus allows the use of a wider anodic range. It has been shown that modification of carbon-based electrodes with AuNPs leads to an increase in the selectivity of the determination of, e.g., dopamine in the presence of various interfering substances<sup>9</sup>. In this work, the procedure of electrodeposition of gold from a solution, that is simple, much faster, and more accessible than other methods was used to prepare modified sensors that were characterized and applied in dopamine analysis.

### Experimental

Britton-Robinson buffer (BRB, pH 5.5) was prepared by mixing the acidic and alkaline components under a pH meter. The acidic component was a 0.04 M solution of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> and CH<sub>3</sub>COOH (all from Ing. Petr Švec-PENTA s.r.o., Czech Republic). The alkaline

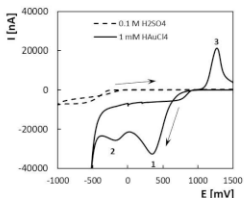
component was created by 0.2 M NaOH (from Ing. Petr Švec-PENTA s.r.o., Czech Republic).  $1 \times 10^{-3}$  M solution of dopamine hydrochloride (Sigma-Aldrich) was prepared by dissolving the appropriate batch in water and stored in a refrigerator. The electrolyte for electrodeposition consisted of  $1 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich) in a solution of 0.1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (from Ing. Petr Švec-PENTA s.r.o., Czech Republic).

Voltammetric measurements were performed using Autolab PGSTAT204 (Metrohm Autolab, Netherlands) equipped with software Nova 2.1. Measurements were performed in a three-electrode set up with bulk BDDE (BioLogic, active surface area of  $7.07 \text{ mm}^2$ , the inner diameter of 3 mm, B/C ration during deposition 1000 ppm) as a working electrode (WE), saturated argenchloride electrode (Ag/AgCl (KCl, sat.)) as a reference (RE) and platinum wire as a counter (CE) electrode (both Monokrystal, CZ). The lab-made (LM) SP/BDDE was the second one consisting of BDD as WE as well as CE and Ag/AgCl RE (active surface area of  $7.07 \text{ mm}^2$ , inner diameter of 3 mm, B/C 312 500 ppm). In all cases, BDDs were activated at the beginning of the working day by performing 20 cyclic voltammograms in the potential range from initial potential ( $E_{in}$ ) of  $-1000 \text{ mV}$  to switching potential ( $E_{switch}$ ) of  $+2200 \text{ mV}$  directly in the supporting electrolyte used. 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.

Parameters of calibration curves and confidence intervals were calculated on the level of significance of 0.05. Limit of detection (LOD) and 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

As can be seen from Fig. 1, three peaks (two reduction and one oxidation) were observed on the cyclic voltammogram measured on the BDDE in the electrolyte ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  in  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) for electrodeposition of AuNPs. Electrodeposition of gold runs through three stages, the first of which is the chemical conversion of the gold complex in the electrolyte, the other two steps, which belong to peaks 1 and 2, represent the electrochemical reduction of ions to metallic gold. Peak 3 corresponds to the reverse oxidation process of metallic gold<sup>10</sup>.



**Fig. 1.** Cyclic voltammograms of  $1 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  in 0.1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  recorded on the BDDE: Method – CV,  $E_{in} = E_{fin} = +1500 \text{ mV}$ ,  $E_{switch} = -1500 \text{ mV}$ ,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ ; supporting electrolyte – 0.1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Dopamine was used as a biologically active substance to optimize the electrodeposition process. The first step for optimization was the deposition potential. The values of +100, 0, -100, and -200 mV were tested. For this purpose, the electrodeposition time was constant ( $t_{\text{dep}} = 50$  s). As can be seen from the voltammograms (Fig. 2A), there was a significant shift in peak potentials to less positive values, and the potential difference between the anodic and cathodic peaks was greatly reduced when using the modified BDDE. Compared with the unmodified BDDE, there is observed also a significant increase in the height of the oxidation as well as reduction peak. The voltammetric curve recorded on the gold electrode (AuE) does not provide significant peaks of dopamine (results are not shown). It can be assumed that the combination of AuNPs and BDDE has significant advantages over a bare BDDE and AuE. The highest and best repeatable signal was obtained at an electrodeposition potential of 0 mV.

The next step was to optimize the deposition time while keeping the potential constant ( $E_{\text{dep}} = 0$  mV). The electrodeposition time varied from 10 to 50 s and the obtained CV curves are shown in Fig. 2B. An increase in the height of the redox peaks of dopamine depending on the deposition time was observed. The deposition duration of 50 s was chosen as optimal. Further prolongation of the time was not appropriate, because the background current increased extensively.

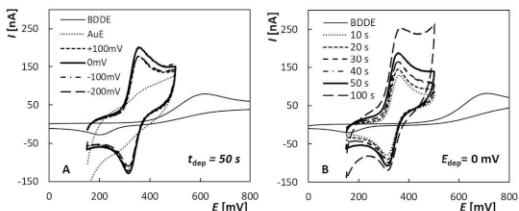
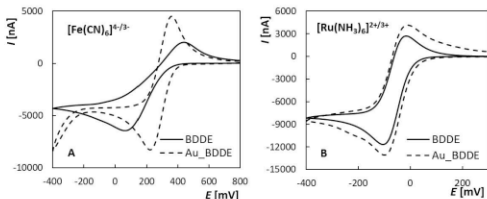


Fig. 2. Cyclic voltammograms of  $1.0 \times 10^{-5}$  mol  $L^{-1}$  dopamine recorded on the bulk BDDE and Au BDDE depending on the potential (A) and time (B) of electrodeposition: Method - CV,  $E_{\text{in}} = E_{\text{fin}} = +150$  mV,  $E_{\text{switch}} = +500$  mV,  $\nu = 10$  mV  $s^{-1}$ ; supporting electrolyte - BRB (pH 5.5).

Redox markers  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  and  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  were used to compare the electrochemical properties of the bare and the modified BDDE. Fig. 3A shows cyclic voltammograms of  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  belonging to an inner sphere redox markers, for which the electrochemical reaction is significantly affected by the electrode surface material and its quality. After modification, a decrease in the separation of the oxidation and reduction peak potentials ( $\Delta E_p$ ) from 339.2 mV to 132.9 mV and a significant increase in peaks height was observed. Similar experiments for the Ru complex are documented in Fig. 3B. In contrast to  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ , in the case of  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ ,  $\Delta E_p$  values were found to approach the theoretical value of 59 mV which is typical for the one-electron reversible electrode reaction. The lower values of  $\Delta E_p$  (71.4 mV for BDDE and 73.4 mV for Au BDDE) for this redox probe could be explained by the nature of the electrode reaction. The outer sphere reaction pathway and the electron transfer as well is in general not influenced by the physicochemical properties of the working surface of the electrode<sup>11</sup>.



**Fig. 3.** Cyclic voltammograms of  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  (A) and  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  (B) recorded on the BDDE before and after modification with AuNPs (electrolyte  $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ ,  $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $c([\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}) = 2.5 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $c([\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}) = 2.5 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

The applicability of the modified BDDE was verified in dopamine analysis. For this purpose, BRB (pH 5.5) was used as the supporting electrolyte and square wave voltammetry (SWV) with the following optimized parameters  $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $A = +80 \text{ mV}$ ,  $f = 10 \text{ Hz}$  was applied. In addition to bare and modified BDDE, printed sensors with chemically deposited BDDE modified with gold nanoparticles by electrodeposition (our optimized conditions) or physical deposition (research group of Dr. Vojs, STU Bratislava) were also tested. Concentration dependence was measured in the range from 1 to 10  $\mu\text{M}$  solution of dopamine using all investigated systems. The obtained statistical data on the linear concentration dependence of dopamine are summarized in Table I. The table shows that using sensors with an electrochemically modified surface, a much higher sensitivity was achieved, resulting from a 25 times higher value of the slope than for bare BDDE. The increase in the sensor with physical deposition was not so significant, the directive increased approximately 3 times.

**Table I.** Statistical parameters of voltammetric determination of dopamine using SWV in connection with all tested sensors.

Electrode	Slope [nA L $\mu\text{mol}^{-1}$ ]	Intercept [nA]	$r$	LOD [ $\mu\text{M}$ ]	LOQ [ $\mu\text{M}$ ]
BDDE	(7.871 $\pm$ 0.060)	-(4.43 $\pm$ 0.35)	0.9998	0.13	0.44
Au_BDDE	(189.3 $\pm$ 1.4)	(25.8 $\pm$ 8.9)	0.9998	0.14	0.47
Au_SP/BDDE	(184.8 $\pm$ 2.7)	(53 $\pm$ 17)	0.9991	0.27	0.91
50nmAu SP/BDDE	(24.38 $\pm$ 0.18)	(0.6 $\pm$ 1.1)	0.9998	0.14	0.47

## Conclusion

In this work, the electrodeposition of gold nanoparticles was optimized to modify the BDDE. Morphological characteristics were studied by applying scanning electron microscopy. The electrochemical properties of the electrode before and after modification were investigated using cyclic voltammetry. The applicability of these modified sensors for voltammetric determination of biologically active substance – dopamine was shown when the modification led to a significant improvement compared to the BDDE bar.

## Acknowledgments

This work was supported by the grant project of The Czech Science Foundation (project No. 20-01589S) and by The University of Pardubice (projects No. SGSFChT\_2022\_001).

## References

1. Fujishima A., Einaga Y., Rao T.N., Tryk D.A.: *Diamond Electrochemistry*. Elsevier, Amsterdam 2005.
2. Kraft A.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 2, 355, (2007).
3. Luong J.H.T., Male K.B., Glennon J.D.: *Analyst*, 134, 1965 (2009).
4. Xu J., Granger M.C., Chen Q., Strojek J.W., Lister T.E., Swain G.M.: *Anal. Chem.* 69, 591A (1997).
5. Baluchova S., Danhel A., Dejmekova H., Ostatna V., Fojta M., Schwarzova-Peckova K.: *Anal. Chim. Acta* 1077, 30 (2019).
6. Selesovska R., Krankova B., Stepankova M., Martinkova P., Janikova L., Chylkova J., Vojs M.: *J. Electroanal. Chem.* 821, 2 (2018).
7. Li M., Li Y.T., Li D.W., Long Y.T.: *Anal. Chim. Acta* 734, 31 (2012).
8. Selesovska R., Navratil T., Hrdlicka V., Michniak P., Hatala M., Vojs M., Marton M., Matvieiev O., Janikova L., Chylkova J.: *Electrochim. Acta* 40, (2022).
9. Abdelwahab A.A., Elseman A.M., Alotaibi N.F., Nassar A.M.: *Microchem. J.* 156, 04927 (2020).
10. Bagheri Hariri M., Dolati A., Siavash Moakhar, M.: *J. Electrochem. Soc.* 160, D279 (2013).
11. Macpherson J.V.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 2935 (2015).

## Redox Behavior of Photoactive Iridium Complexes

Eva Melníková<sup>a</sup>, Olívia Dakošová<sup>a</sup>, Miroslav Gál<sup>a</sup>, and Filip Kíelar<sup>b</sup>

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

<sup>b</sup> Naresuan University, Tha Pho, Mueang Phitsanulok District, Phitsanulok 65000, Thailand

### Abstract

The light-emitting electrochemical cell (LEC) is one of the most promising technologies for solid-state lighting. Cationic Iridium (III) complexes represent the single largest class of emitters used in light-emitting electrochemical cells. Therefore, systematic control and identification of different structures of Iridium complexes are needed to achieve even better performance of LEC devices. This work studied the electrochemical behavior of the selected Iridium (III) complexes by cyclic voltammetry.

**Keywords:** electrochemistry, redox reaction, cyclic voltammetry, Iridium (III) complexes.

### Introduction

Light-emitting electrochemical cells (LECs) are among the most promising technologies for solid-state lighting. LECs based on phosphorescent Iridium (III) complexes have attracted significant research interest in the past 15 years because of their high efficiency and tunable emission color across the entire visible spectrum<sup>1</sup>. Large majority of the reported LECs containing iridium complexes are based on the cationic bis-cyclometalated iridium complexes because they can act as the electrolytes needed for the operation of the LEC device. As well as photophysical properties, it is necessary to characterize the substances and determine the electrochemical properties of these complexes. An important feature to look for when characterizing the electrochemical properties of the emitter is reversible oxidation and reduction waves since good reversibility suggests that the emitter might be more resilient to electrochemical degradation when operating in the device<sup>2,3</sup>. This work was dedicated to the study of electrochemical behavior using cyclic voltammetry. The selected Iridium (III) complexes were studied in non-aqueous media. Recorded voltammograms were characterized by a reversible one-electron wave, which differed according to the structure of the complex.

### Experimental

#### Materials

The samples of Iridium (III) complexes were supplied by Dr. Kíelar. Tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF<sub>6</sub>) and anhydrous acetonitrile (dried over activated molecular sieves) were supplied by Sigma–Aldrich.

#### Methods

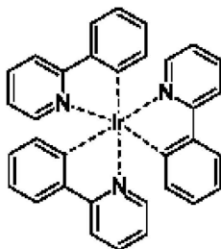
Electrochemical measurements were performed using AUTOLAB instrument PGSTAT 302N (Metrohm). Screen printed three-electrode electrochemical system that consisted of boron-doped diamond (BDD) as working electrode (WE) as well as a counter electrode (CE) and Ag/AgCl as reference electrode (RE). Oxygen was purged from the solution by a stream of argon saturated with vapors of the solvent.

### Results and Discussion

In this work, the electrochemical behavior of five selected iridium (III) complexes, namely 8B, AM17, 7B, 7A, and 8A was studied by cyclic voltammetry. The voltammetric measurements

were performed from -1.5 V to 1.5 V at a scan rate 100 mV/s, and the results are summarized in Table I.

The basic structure characteristic of all complexes was Tris(2-phenylpyridine)iridium(III) depicted in Fig. 1. This substance is widely used in organic light-emitting diodes (OLEDs), due to its high quantum yields and thermal stability.



**Fig. 1.** The basic structure of Ir (III) complexes

**Table I.** Positions of the respective oxidation ( $E_{pa}$ ) and reduction ( $E_{pc}$ ) peaks, peak potential separation  $\Delta E_p$ , and the ratio between respective peak heights,  $i_{pa}/i_{pc}$ .

compound	$E_{pa}$	$E_{pc}$	$\Delta E_p$	$i_{pa}/i_{pc}$
8B	0.829	0.596	0.233	-1.74
AM17	0.835	0.714	0.121	-2.03
7B	0.839	0.709	0.13	-1.84
7A	0.837	0.72	0.117	-1.17
8A	0.888	0.692	0.196	-1.51

The most negative oxidation potential was measured for compound **8B** and the most positive potential for compound **8A**. It means that Ir ion in compound **8B** can be oxidized easier than in other compounds, or the amount of energy required for the oxidation of Ir ion in compound **8B** is the least compared to the other studied compounds. From the peak separation,  $\Delta E_p$  and the ratio between respective peak heights,  $i_{pa}/i_{pc}$ , one can conclude that the redox reaction is not fully reversible in the case of all compounds. The highest values of peak separation are found for compounds **8A** and **8B**. These values are ca a hundred volts lower for compounds **7A** and **7B**. Results indicate that the redox process in the case of compounds **8A** and **8B** is less reversible than in the case of compounds **7A** and **7B**. The theoretical values equal to  $\Delta E_p=60\text{mV}$  and  $i_{pa}/i_{pc}=1$  are expected in the case of fast reversible reactions.

In the case of compounds **7A**, **7B**, **8A** and **8B** a small pre-wave of the iridium oxidation is visible. This pre-wave is more visible for compounds **7A** and **7B** compared to compounds **8A** and **8B**. This pre-wave is not observed in the case of compound **AMI17**, since the ligand field in the case of this compound is significantly different in comparison to other compounds.

### Conclusion

The main purpose of this work was to characterize the redox behavior of Iridium complexes. All voltammograms were characterized by a reversible one-electron wave at  $E_{p2}$  around 770 mV vs RE. The position of the peak differed based on the structure of the individual compounds.

### Acknowledgments

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract APVV-17-0149 and VEGA 1/0343/19.

### References

1. Bai R., Meng X., Wang X., He L.: *Adv. Func. Mat.* 1907169 (2020).
2. Henwood A.F., Zysman-Colman E.: *Topics Curr. Chem.* 374 (2016).
3. Tang S., Sandström A., Lundberg P., Lanz T., Larsen C., van Reenen S., Kemerink M., Edman L.: *Nature Commun.* 8, 1190 (2017).



## Electrochemical Oxidation of Diclofenac on Boron-Doped Diamond Electrodes (Elektrochemická oxidácia diklofenaku na bóróm dopovaných diamantových elektrodách)

Erika Mordačíková<sup>a</sup>, Marián Marton<sup>b</sup>, Pavol Michniak<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 Hydrocosenoses,  
Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany,  
Czech Republic

### Abstract

The occurrence of persistent organic micropollutants (pharmaceuticals, drugs, pesticides, personal care products, etc.) in various parts of the environment is an actual global problem. The presence of contaminants in the environment is associated with the risk of adverse effects on living organisms and therefore advanced water treatment technologies are intensively studied.

The aim of the present work was to use electrochemical advanced oxidation processes (EAOPs) using a different type of boron-doped diamond electrodes (BDDE) under different working conditions for removal of diclofenac from water and to identify degradation and transformation products formed during the degradation process by a combination of HPLC-IRMS.

**Keywords:** Non-steroidal anti-inflammatory drugs, Planar and porous BDDE, Identification of degradation products.

### Úvod

Diklofenak (DCF) je syntetické nesteroidné protizápalové liečivo (NSAID), ktoré má okrem protizápalového účinku aj analgetické a antipyretické účinky. DCF patrí do skupiny najčastejšie predpisovaných liekov na liečbu reumatoidnej artritídy, osteoartritídy, poranení pohybového ústrojenstva a pooperačných analgézií v humánnej a veterinárnej medicíne. Mechanizmus účinku NSAID je založený na supresii syntézy prostaglandínov prostredníctvom inhibície dvoch foriem cyklooxygenázových enzýmov (COX-1 a COX-2)<sup>1</sup>. DCF a jeho metabolity sú prítomné v odpadových vodách na výstupe z konvenčných čistiarní odpadových vôd, kde nie sú úplne eliminované, čoho dôsledkom je ich prítomnosť v celom vodnom prostredí<sup>2</sup>. Nakoľko sa vo vodnom prostredí DCF nachádza v relatívne vysokých koncentráciách (rádovo µg/L)<sup>3,4</sup>, Európska únia ho v roku 2013 zaradila do prvého kontrolného zoznamu prioritných látok (smernica 39/3013/EÚ; rozhodnutie EÚ 2015/495) rámcovej smernice o vode s cieľom získať dostatočné monitorovacie údaje na účely identifikácie potenciálneho rizika<sup>5</sup>.

Konvenčné čistiare odpadových vôd nie sú schopné DCF dostatočne eliminovať (priemerná účinnosť odstránenia je 20-36 %) a umožňujú jeho vstup do životného prostredia <sup>6</sup>. Z uvedených dôvodov sa vo všeobecnosti hľadajú nové pristupy k efektívnemu odstraňovaniu perzistentných polutantov. Jedným zo skúmaných procesov je elektrochemická (anodická) oxidácia s využitím bórom dopovaných diamantových (BDD) elektród založená na generovaní OH radikálov. Účinnosť a rýchlosť anodickej oxidácie na BDDE je silne ovplyvnená charakteristikami BDD vrstvy, napr. úrovňou dopácie bórom alebo pomerom sp<sup>3</sup>/sp<sup>2</sup> a tiež drsnosťou povrchu <sup>7,8</sup>. Použitím trojrozmerných BDD elektród je možné výrazne zvýšiť účinnosť odstraňovania prostredníctvom rovnomerne rozložených pórov, čím sa zníži odpor prenosu elektrónov <sup>9</sup>. Tvorba aktívnych oxidantov/radikálov závisí aj od obsahu soli a komplexnosti matrice. Na druhej strane, uvedené charakteristiky môžu okrem účinnosti odstraňovania ovplyvniť aj tvorbu vedľajších produktov oxidácie <sup>10</sup>.

Práca sa venovala porovnaniu účinnosti anodickej oxidácie diklofenaku dosiahnutej s využitím rôznych typov BDD elektród a rôznych soli 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), sodná soľ diklofenaku a izotopicky značený štandard diklofenaku (13C6) zakúpené od Sigma-Aldrich (Nemecko). Všetky roztoky boli pripravené z dvojstupňovo čistenej vody systémami Labconco a Millipore Simplicity (Lambda Life, Slovensko).

Na elektrochemickú oxidáciu boli použité BDD elektródy (2,5% CH<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>, 10 000 ppm B/C) rastené na leštenom kremíku, štrukturovanom kremíku a poréznej keramike (40ppi, r=2,5cm).

Elektrochemická oxidácia sa uskutočňovala v 4 L nádobách s elektrolytom (NaCl alebo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) s prídavkom DCF (1 mg/L). Vzorky boli odobierané v čase 0, 10, 20, 30, 60, 120 a 240 minút elektrochemickej oxidácie.

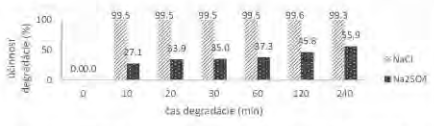
Kvantitatívna LC-MS/MS analýza bola uskutočnená pomocou kombinácie HPLC-MS/MS, s využitím trojitého kvadrupólového hmotnostného spektrometra TSQ Quantiva s vyhrievaným elektrosprejom v pozitívnom ionizačnom móde (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). Identifikácia degradačných a transformačných produktov sa uskutočnila prostredníctvom HPLC-HRMS na prístrojovom vybavení LC-MS-IT-TOF™ (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a QExactiv (Thermo Fisher Scientific, CA, USA).

### Výsledky a diskusia

Cieľom práce bolo sledovanie vplyvu typu substrátu použitej BDD elektródy a pracovných elektrolytov na účinnosť elektrochemickej oxidácie diklofenaku ako aj na vplyv typu BDDE na tvorbu degradačných a transformačných produktov v deionizovanej a odpadovej vode. Pre tento účel boli na degradačné experimenty využité rôzne typy elektród (2D a 3D BDDE) a elektrolyty pripravené prídavkami soli (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

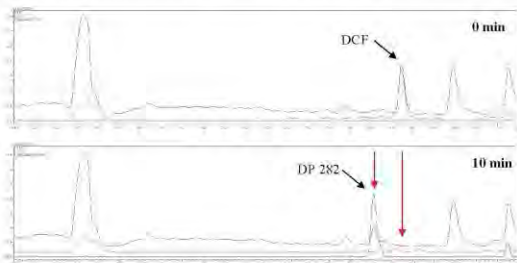
Najvýraznejší vplyv sledovaných premenných sa prejavil pri porovnaní vplyvu soli tvoriacej reakčný elektrolyt. Pri každej z testovaných elektród bola pri použití NaCl elektrolytu dosiahnutá výrazne vyššia (takmer 100%) účinnosť eliminácie DCF. Príkladom je porovnanie účinnosti eliminácie s použitím sSi/BDDE (Obr. 1). Zatiaľ čo pri použití NaCl bolo možné

eliminovať až 99,5% už po 10 minútach oxidácie, pri  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  bolo možné eliminovať len necelých 56% v priebehu 240 minút oxidácie. Vplyv typu substrátu BDDE sa neprejavil tak výraznými rozdielmi v efektívnosti, avšak z výsledkov vyplynulo, že elektroda pripravená na sSi substráte vykazovala vyššiu účinnosť v porovnaní so Si/BDD, čo je výsledkom zvýšenia aktívneho povrchu elektródy. V NaCl reakčnom elektrolyte však použitie všetkých troch testovaných elektród malo za následok odstránenie DCF na úrovni >99% po 240 minútach degračného procesu.

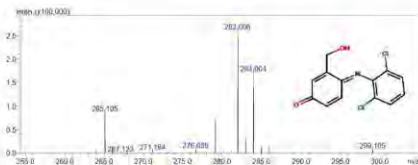


**Obr. 1.** Porovnanie účinnosti elektrochemickej oxidácie pri použití sSi/BDD v elektrolytoch s prídavkami rôznych solí.

Na identifikáciu vedľajších produktov oxidácie diklofenaku boli použité dva prístupy – analýza očakávaných látok (na základe publikovaných dát vytvorený zoznam 64 degračných a transformačných produktov) a necieľená analýza. S využitím oboch prístupov bolo možné identifikovať vznikajúce produkty oxidácie DCF na BDDE. Identifikácia prebiehala na základe záznamu presnej hodnoty  $m/z$ , sledovania izotopových pomerov, retenčných charakteristík a MS/MS záznamov. Na základe zoznamu očakávaných produktov bolo identifikovaných 6 degračných produktov diklofenaku. Príkladom je degračný produkt  $m/z$  282, ktorého prítomnosť bola potvrdená už po 10 minútach oxidácie. Záznam (TIC a FIC) potvrdzujúci vznik tohto produktu ako jeho hmotnostné spektrum a predpokladaná štruktúra sú zobrazené na Obr. 2 a Obr. 3. Na základe publikovanej literatúry bol vznik tohto produktu pozorovaný aj pri procesoch chlorácie, ozonizácia alebo v priebehu foto-Fentonovho procesu.



**Obr. 2:** Generovanie degračného produktu  $m/z$  282 počas elektrochemickej oxidácie na sSi/BDD v roztoku elektrolytu s prídavkom NaCl.



**Obr. 3:** Hmotnostné spektrum degradačného produktu m/z 282.

### Záver

V práci bola porovnávaná účinnosť elektrochemickej oxidácie diklofenaku na 2D a 3D BDD elektródach. Sledoval sa vplyv použitej elektródy a pracovného elektrolytu na účinnosť a rýchlosť odstránenia diklofenaku. Výsledky preukázali, že typ soli použitej pri elektrochemickej oxidácii výrazne vplyva na účinnosť odstránenia diklofenaku. Miera eliminácie pri použití rôznych elektród sa prejavila len minimálnymi rozdielmi v celkovej účinnosti, avšak z pohľadu kinetiky možno za najvýhodnejšie považovať použitie sSi/BDD. Analýzou očakávaných zlúčenín a nečistenou analýzou pomocou HPLC-IRMS bolo umožnené overiť hypotézu, že počas elektrochemickej oxidácie na 2D a 3D BDD dochádza pri použití rozdielnych elektród, pracovných elektrolytov a rôznych komplexnej matrice (destilovaná a odpadová voda) ku generovaniu rozdielnych degradačných a transformačných produktov. V rámci práce bolo identifikovaných 8 degradačných produktov diklofenaku.

### 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 školstva, mládeže a telovýchovy Českej republiky - projekt „CENAKVA“ (LM2018099) a v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: „Strategický výskum v oblasti SMART monitoringu, liečby a preventívnej ochrany pred koronavírusom (SARS-CoV-2). Kód ITMS2014-: 313011ASS8, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu reg. rozvoja.“

### References

1. Vane J. R., Botting R.M., *Am J Med* 104, 3, 2 (1998).
2. Golovkó O., Kumar V., Fedorova G., Randak T., Grabic R.: *Environ Sci Pollut Res* 21, 7578 (2014).
3. Vergeynst L., Haeck A., De Wispelaere P., Van Langenhove H., Demeestere K.: *Chemosphere* 119 (2015).
4. Sathishkumar P., Anu R., Meena A., Palanisami T.: *Sci. Total Environ.* 698 (2020).
5. Barbosa M.O., Moreira N.F.F., Ribeiro A.R., Pereira M.F.R.: *Water Res.* 94, 257 (2016).
6. Vieno N., Sillanpää M.: *Environ. Int.* 69 28 (2014).
7. García-Segura S., dos Santos E.V., Martínez-Huitle C.A.: *Electrochem. Commun.* 59, 52 (2015).
8. Mordaciukova E., Vojs M., Grabicova K., Marton M., Michniak P., Rehacek V., Borik A., Grabic R., Bruncko J., Vojs Stanova A.: *J. Electroanal. Chem.* 862, 114007 (2020).
9. Mei R., Wei Q., Zhu C., Ye W., Zhou B., Ma L., Yu Z., Zhou K.: *Appl. Catal. B Environ.* 245, 420 (2019).
10. Medeiros De Araújo D., Cañizares P., Martínez-Huitle C.A., Rodrigo M.A.: *Electrochem. Commun.* 47, 37 (2014).

## On the Electrochemical Oxidation of Morphine (O elektrochemické oxidaci morfinu)

Nikola Mikulová<sup>a</sup>, Radek Jerga<sup>a</sup>, Monika Zajacová Cechová<sup>a</sup>, Petr Cankar<sup>b</sup>,  
Jakub Stýskala<sup>b</sup>, Petr Barták<sup>a</sup>, and Jana Skopalová<sup>a</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: jana.skopalova@upol.cz

<sup>b</sup> Palacký University Olomouc, Faculty of Science, Department of Organic Chemistry,  
17. Listopadu 1192/12, 779 00 Olomouc, Czech Republic

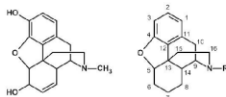
### Abstract

Electrolytic oxidation of morphine in acidic aqueous solutions on a platinum gauze electrode was studied. HPLC-MS analysis of samples electrolyzed at 1.1 V (vs. SCE) in acetic acid/ammonium acetate solution of pH 3 revealed several monomer products. One of the main products, *o*-quinone, is formed by the two-electron oxidation of morphine to a phenoxy cation which reacts subsequently with water to form an easily oxidizable hydroxy morphine. Dihydroxy morphine has been found to be the most abundant stable reaction product under the above conditions.

**Keywords:** Morphine, Oxidation, Voltammetry, Electrolysis, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry.

### Úvod

Morfin (Obr. 1) je hlavní alkaloid obsažený v opiu, které se získává z máku setého (*Papaverum somniferum*). Opium bylo tisíce let využíváno pro mírnění bolesti. V roce 1805 byla popsána izolace samotného morfinu, který se stal vhodnou a čistou alternativou pro použití v medicíně<sup>1</sup>. V dnešní době se stále častěji setkáváme spíše se syntetickými opioidy, například fentanylly, které mají vyšší účinnost, ale přesto je morfin stále používán jako analgetikum, např. při léčbě pacientů s rakovinou<sup>2</sup>. Nelegálně je morfin zneužíván jako droga, zejména pro výrobu heroinu (diacetylmorfin).



**Obr. 1.** Molekula morfinu a morfinový skelet

Analýza morfinu se nejčastěji provádí v biologických vzorcích, kde se nejlépe uplatní separační techniky, především HPLC s UV nebo hmotnostní detekcí<sup>3-6</sup>. Elektrochemická aktivita morfinu, a opíatů obecně, dovoluje využít elektrochemické detektory jako možnou alternativu<sup>6</sup>. Elektroanalytické metody lze využít pro analýzu morfinu i přímo, bez předchozí separace. Hlavní výhodou je možná miniaturizace senzorů. Nevýhodou elektrochemických měření je jejich špatná selektivita pro látky s podobným oxidačním potenciálem, tu však lze zlepšit modifikací elektrody. Oblíbené jsou uhlíkové pastové elektrody, které mají snadno obnovitelný povrch. Pro zlepšení selektivity při stanovení morfinu lze tyto elektrody modifikovat například vícečlennými uhlíkovými nanotrubičkami nebo Zn<sub>2</sub>SnO<sub>4</sub>-grafenovým kompozitem, který zvyšuje odezvu morfinu. Takto modifikovanou elektrodu lze použít k současnému stanovení morfinu a kodeinu<sup>7,8</sup>.

Mechanismus elektrochemické oxidace morfinu ve vodných roztocích byl již v minulosti podrobně studován pomocí voltametrických technik<sup>9</sup>. V kyselých roztocích o pH 1,2–4 se anodická oxidace morfinu projevila na diferenčním pulzním voltamogramu jedním proudovým pikem (při potenciálu kolem 0,7 V proti Ag/AgCl v roztoku o pH 3). V rozmezí pH 4–12 poskytoval morfin dva anodické DPV-píky. První proudový signál byl přisouzen jednoelektronové oxidaci fenolové skupiny morfinu za tvorby dimerní struktury pseudomorfinu, druhý dvoelektronové oxidativní *N*-demethylaci na normorfin<sup>9</sup>. V prezentovaném příspěvku jsme se zaměřili na identifikaci produktů elektrochemické oxidace morfinu ve vodných roztocích o pH = 3. Produkty potenciostatické elektrolyzy byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí s vysokým rozlišením.

### Experimentální část

Zásobní roztok morfinu (Lipomed, Švýcarsko) hydrochloridu v deionizované vodě (18,2 MΩ, Milipore, Merck) byl připraven v koncentraci  $1,88 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Kyselina octová a octan amonný pro přípravu roztoku základního elektrolytu byly čistoty „pro analýzu“, pro přípravu mobilní fáze byla použita mravenčí kyselina (>99%, Sigma-Aldrich) a acetonitril (HPLC grade, VWR Chemicals).

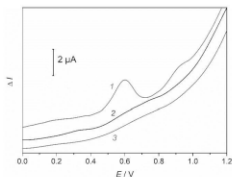
Elektrochemické experimenty byly prováděny na přístroji Autolab PGSTAT128N (Metrohm Autolab, Nizozemsko) v tříelektrodevém zapojení s referenční kalomelovou a pomocnou platinovou elektrodou. Diferenční pulzní voltamogramy byly zaznamenány s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku polarizovanou rychlostí 0,03 V/s v rozsahu 0 až 1,4 V, s amplitudou pulzu 0,1 V a dobou pulzu 50 ms. Elektrolyza morfinu ( $c = 5 \cdot 10^{-5}$  mol/l) na platinové síťkové elektrodě za konstantního potenciálu 1,1 V proti nasycené kalomelové elektrodě byla prováděna po dobu 10 minut. Pomocná platinová elektroda byla umístěna v odděleném katodovém prostoru naplněném roztokem octanu amonného (0,2 mol/l). Základním elektrolytem byl roztok octanu amonného, jehož acidita byla upravena na pH = 3 přidávkem octové kyseliny.

K separaci elektrolyzovaných roztoků morfinu v UPLC systému Acquity (Waters, USA) s tandemovým hmotnostním spektrometrem Select Series Cyclic IMS Q-TOF (Waters, Velká Británie) byla použita kolona Raptor ARC-18 (100 × 2,1mm; 2,7μm; Restek) a mobilní fáze složená z 0,1% vodného roztoku mravenčí kyseliny (složka A) a 0,1% roztoku mravenčí kyseliny v acetonitrilu (složka B). Gradientová eluce byla provedena v programu: 0–2 min 2 % B, 2–10 min 2–100 % B, 10–11,5 min 100 % B, 11,5–13 min 2% B. Průtoková rychlost byla nastavena na 0,4 ml/min, dávkovaný objem vzorku byl 5 μl. Hmotnostně spektrometrické podmínky byly následující: kladný mód ESI, napětí na kapiláře 2 kV, napětí na kónu 60 V, teplota zdroje 100 °C, průtok desolvatačního plynu 800 l/hod, desolvatační teplota 250 °C a tlak změkovačeho plynu 6 barů. LC-MS data byla zpracována v softwaru MassLynx 4.1 (Waters, Velká Británie).

### Výsledky a diskuse

Elektrochemická oxidace morfinu v kyselém prostředí (pH = 3) se projevuje na diferenčním pulzním voltamogramu dvěma anodickými proudovými píky při potenciálech 0,6 a 0,9 V (Obr. 2, křivka 1). Předběžné výsledky analýz roztoků elektrolyzovaných při nižších potenciálech (odpovídajících prvnímu anodickému piku) potvrdily tvorbu pseudomorfinu jako hlavního reakčního produktu. V této studii byl pro elektrolytickou oxidaci morfinu nastaven pozitivnější potenciál 1,1 V, který odpovídá limitnímu proudu druhého proudového signálu morfinu v kyselém prostředí. Na DP voltamogramu roztoku morfinu elektrolyzovaného

10 minut na velkoplošné Pt síťkové elektrodě při 1,1 V se již nevyskytoval žádný z původních piků morfinu (Obr. 2, křivka 2).



**Obr. 2.** Diferenční pulzní voltamogramy morfinu ( $c = 5 \cdot 10^{-5}$  mol/l) před elektrolyzou (křivka 1) a po elektrolyze při potenciálu 1,1 V proti SCE (křivka 2) ve vodném roztoku octanu amoněného o pH = 3 (křivka 3).

LC-MS analýza elektrolyzovaného roztoku ukázala, že při vyšším potenciálu elektrochemické oxidace vzniká dimerní pseudomorfin pouze jako minoritní produkt. Hlavními produkty jsou látky poskytující protonované molekuly s  $m/z$  300 a 318 (Tabulka I). Podle přesné hmoty, získané hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením, a z ní určeného elementárního složení jde pravděpodobně o chinon a dihydroxy derivát morfinu (Obr. 3).

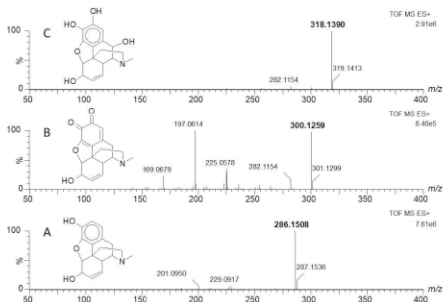
#### Tabulka I.

Výsledky LC-MS analýzy vzorku morfinu elektrolyzovaného ve vodném roztoku octanu amoněného/kyseliny octové (pH = 3).

Látka	$t_R$ (min)	$m/z$ $[M+H]^+$	dtm* (mDa)	Plocha piku extrahovaného iontu
Morfin	4,08	286,1484	4,1	6 610
<i>o</i> -Chinon	2,06	300,1259	2,3	26 580
Hydroxymorfin	3,82	302,1433	4,1	1 698
Hydroxy- <i>o</i> -chinon	4,88	316,1235	5,0	2 197
Dihydroxymorfin	3,25	318,1390	4,9	77 196
Pseudomorfin	4,28	569,2714	6,2	283

\*dtm = odchylka experimentálně zjištěné hodnoty  $m/z$  od teoretické hodnoty

Z výsledků LC-MS analýzy a nalezených reakčních produktů je možné vyvodit, že v prvním kroku elektrochemické reakce morfinu dochází k jednoelektronové oxidaci fenolové skupiny v poloze C3 za vzniku radikálu, který může tvořit dimery (pseudomorfin s  $[M+H]^+$   $m/z$  569) nebo se při vyšším potenciálu dále oxiduje na reaktivní fenoxylový kation. Tento kation snadno podléhá nukleofilnímu útoku vody za vzniku 2-hydroxymorfinu ( $[M+H]^+$  s  $m/z$  302), jenž se může dále dvoelektronově oxidovat na *o*-chinon ( $[M+H]^+$  s  $m/z$  300). Tautomerií forma tohoto produktu může podléhat dvoelektronové oxidaci a následně hydroxylaci za vzniku 10-hydroxy-*o*-chinonu s  $[M+H]^+$  o  $m/z$  316. Nestabilní hydroxy-*o*-chinon může být v roztoku redukován další molekulou hydroxymorfinu za vzniku hlavního reakčního produktu, 2,10-dihydroxymorfinu, s  $[M+H]^+$  o  $m/z$  318.



**Obr. 3.** Hmotnostní spektra morfinu (A) a hlavních produktů jeho elektrolytické oxidace: chinonu (B) a dihydroxymorfinu (C) zaznamenaná v kladném módu elektrosprejové ionizace.

### Závěr

LC-MS analýzou roztoku morfinu elektrolyticky oxidovaného při potenciálu 1,1 V na Pt síťkové elektrodě v roztoku o pH 3 byla nalezena řada monomerních produktů postupné oxidace a hydroxylace původní molekuly. Dimer pseudomorfinu vznikal pouze jako minoritní produkt. Hlavním a zřejmě nejstabilnějším produktem byl 2,10-dihydroxymorfin. Produkt oxidativní *N*-dealkylace, normorfin, za těchto elektrolytických podmínek nevznikal.

### Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation (project no. 20-07350S) and Palacký University Olomouc (project IGA\_PrF\_2022\_023).

### References

- Kozák J., Lejčko J., Vrba I.: *Opioidy*. Mladá fronta, Praha 2018.
- Lee Y. J., Suh S. Y., Song J., Lee S. S., Seo A. R., Ahn H. Y., Lee M. A., Kim C. M., Klepstad P.: *BMC Palliat. Care* 14, 53 (2015).
- Marchei E., Escuder D., Pallas C. R., Garcia-Algar O., Gómez A., Friguls B., Pellegrini M., Pichini S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55, 309 (2011).
- Lin H. R., Choi K. I., Lin T. C., Hu A.: *J. Chromatogr. B* 929, 133 (2013).
- Dienes-Nagy A., Rivier L., Giroud C., Augsburg M., Mangin P.: *J. Chromatogr. A* 854, 109 (1999).
- Gerostamoulos J., Crump K., McIntyre I. M., Drummer O. H.: *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 617, 152 (1993).
- Barthwal S., Singh B., Singh N. B.: *Mater. Today Proc.* 5, 9061 (2018).
- Bagheri H., Khoshshafar H., Afkhami A., Amidi S.: *New J. Chem.* 40, 7102 (2016).
- Garrido J. M. P. J., Delerue-Matos C., Borges F., Macedo T. R. A., Oliveira-Brett A. M.: *Electroanalysis* 16, 1419 (2004).



## Comparison of Catecholase Activity of Selected Copper(II) based Catalysts (Porovnání katecholázové aktivity vybraných katalyzátorů na bázi mědi)

Tomáš Mikysek<sup>a</sup>, Michaela Bártová<sup>a</sup>, Milan Sýs<sup>a</sup>, and Miroslav Novák<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 53210 Pardubice, Czech Republic,  
E-mail: tomas.mikysek@upce.cz

<sup>b</sup> Institute of Chemistry and Technology of Macromolecular Materials, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 53210, Pardubice, Czech Republic.

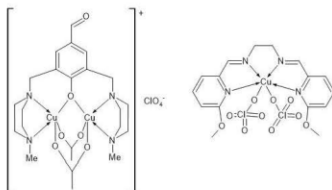
### Abstract

In his contribution, a comparison of catecholase activity of recently synthesized mono- and binuclear copper(II) complexes towards selected substrates (3,5-DTBC and neurotransmitters) is presented. The Michaelis-Menten kinetics model was applied for such description. Besides a finding of comparable catalytic activity for the copper complexes tested, the measurements have been performed in methanol as well as in phosphate buffer pH 7 where the measurements can be compared with enzyme tyrosinase.

**Keywords:** UV-VIS spectrophotometry; dopamine; amperometry, copper complexes; Tyrosinase.

### Úvod

Příprava a charakterizace umělých enzymů jsou v popředí zájmu v oblasti katalýzy. Jejich možné využití je zkoumáno jak v reakcích při syntéze tak i v elektroanalýze<sup>1,2</sup>. Většinou se jedná o jedno nebo vícejaderné komplexy mědi. Jedním z celé řady příkladů je zapojení komplexů mědi coby náhrady enzymu tyrosináza, který lze s úspěchem využít v biosenzorech sloužících ke stanovení obsahu polyfenolických resp. biologicky aktivních látek (např. neurotransmiterů)<sup>3</sup>. Nicméně stabilita biosenzoru obsahujícího enzym tyrosináza je bohužel omezena pouze na několik týdnů v závislosti na jeho konstrukci a skladování<sup>4-6</sup>. To je jedním z důvodů, proč je část výzkumu věnována syntéze biomimetických katalyzátorů, tedy především komplexů mědi s cílem napodobit chování tyrosinázy. Nově syntetizované komplexy jsou sice příslibem v této oblasti, avšak jejich problémem je nízká rozpustnost a tak se celá řada měření popisující katecholázovou aktivitu příslušného komplexu odehrává v prostředí methanolu či jiného nevodného rozpouštědla a jako modelový substrát je obvykle použit 3,5-di-terc-butylkatechol (3,5-DTBC) za tvorby definovaného produktu 3,5-di-terc-butylchinonu s charakteristickým absorpčním maximem v UV-VIS (400 nm)<sup>7</sup>. Tyto podmínky jsou však obtížně srovnatelné s tyrosinázou katalyzovanou přeměnou substrátu, která probíhá výhradně ve vodném prostředí. Navíc produktem tyrosinázou katalyzované oxidace celé řady substrátů mj. neurotransmiterů je sice příslušný chinon avšak ten podléhá následně reakci v podobě tvorby polymeru<sup>8</sup>. Relativní porovnání připravených katalyzátorů, v rámci jejich charakterizace, nabízí parametry, které jsou typické pro popis enzymem katalyzovaných reakcí. Tedy srovnání pomocí parametrů modelu Michaelis-Mentenové. K tomuto popisu se nejčastěji používá UV-VIS spektrofotometrie, ale lze s úspěchem využít i elektrochemických technik např. amperometrie. V tomto příspěvku je dále uvedeno, diskutováno porovnání katalytické aktivity jedno a dvoujaderných komplexů mědi (viz. Obr.1) pro různé substráty a rovněž s katalytickou aktivitou enzymu tyrosináza.



Obr. 1. Příklad struktur studovaných komplexů mědi, K1 (vlevo) a K2 (vpravo).

## Experimentální část

### Chemikálie

Dopamin, 3,5-di-*tert*-butylcatechol (3,5-DTBC), enzym tyrosináza (EC 1.14.18.1 z *Agaricus biosporus*), a chloristan lithný byly získány od Sigma-Aldrich (Praha, ČR) stejně tak acetonitril (kvalita pro HPLC). Deionizovaná voda (odpor >18 MΩ cm) byla připravena z demineralizované vody pomocí systému Milli-Q systému od firmy Merck Millipore (Darmstadt, Německo) soli pro přípravu 0,1 M fosfátového pufru byly zakoupeny v Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, ČR). Studované komplexy mědi K1:  $[Cu_2L(OAc)_2(H_2O)](ClO_4)$  s ligandem: 2,6-bis[*N*-methyl piperazine-1-yl)methyl]-4-formyl phenol (HL) a K2:  $[Cu(ClO_4)_2(L_2)]$  s ligandem 1,2-(*C*<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N-6-OCH<sub>3</sub>-2-CH=N)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> (HL2) byly syntetizovány na Ústavu chemie a technologie makromolekulárních látek Univerzity Pardubice.

### Instrumentace

Amperometrická měření byla prováděna v klasickém tři-elektrodeovém uspořádání, kde pracovní elektrodou byl disk ze skelného uhlíku (o průměru 3 mm), dále jako referenční byla zvolena chlorido-sříbrná elektroda s 3 M KCl (Pozn.: pro měření v bezvodém methanolu byla použita kalomelová elektroda s můstkem) a jako pomocná byl použit platinový plíšek. Elektrody byly připojeny k potenciostatu AUTOLAB PGSTAT101 of firmy Metrohm Česká republika s.r.o., s ovládáním prostřednictvím software NOVA 1.11.

Spektrofotometrické experimenty byly prováděny na přístroji V2450 firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko) v 1 cm kremenné kytvě od firmy Fisher Scientific (Pardubice, ČR) v rozmezí vlnových délek od 800 do 200 nm rychlostí 0,5 nm s<sup>-1</sup>.

### Výsledky a diskuse

Katalytická aktivita komplexů mědi uvedených na obrázku 1 byla studována jak pomocí amperometrie tak pro srovnání i pomocí spektrofotometrie a to pro různé substráty: 3,5-DTBC a dopamin. Kinetické parametry získané pomocí amperometrie ve vsádkovém uspořádání (kde na pracovní elektrodě byla sledována redukce příslušného *o*-chinonu, který vznikl katalytickou přeměnou substrátu) odpovídaly hodnotám získaným ze spektrofotometrických měření.

Porovnáme-li hodnoty jednoho z kinetických parametrů ( $K_m$ ) u obou studovaných komplexů s využitím 3,5-DTBC jako substrátu, dojdeme k hodnotám 0,22 mM vs 1,6 mM, kde nižší hodnota získaná pro acetátový komplex ukazuje na lepší afinitu tohoto katalyzátoru k danému substrátu. Zároveň porovnáním struktur obou komplexů můžeme usoudit, že svou roli zde hraje

rozdílné uspořádání z hlediska koordinace a také přítomnost druhého atomu mědi, navíc potřebujeme dvojnásobnou koncentraci komplexu K2, což z něj činí v tomto případě „horší“ katalyzátor. Nutno podotknout, že látka 3,5-DTBC není rozpustná ve vodě, proto měření probíhalo v acetonitrilu. V tabulce I jsou uvedeny i další kinetické parametry, např. hodnoty rychlostní konstanty  $K_{cat}$ , udávající počet molekul substrátu přeměněných jednou molekulou komplexu/enzymu za jednotku času, kde jednojaderný komplex K2 není významně horší. Navíc oba komplexy se liší i v rozpustnosti, jednojaderný komplex je rozpustný ve vodě, a lze tedy provést měření ve fosfátovém pufru pH 7. Porovnáme-li dále hodnotu  $K_m$  (2,1 mM) s hodnotou tabelovanou pro enzym tyrosináza (0,84-1,1 mM) dostupnou v databázi BRENDA <sup>8</sup>, pak vidíme, že tyto hodnoty jsou vesměs srovnatelné.

**Tabulka I.** Hodnoty kinetických parametrů popisující katalytickou aktivitu komplexů **K1** (150  $\mu$ M) a **K2** (300  $\mu$ M) pro vybrané substráty.

Substrát	K1			K2		
	$K_m$ [mM]	$V_{max}$ [mAU s <sup>-1</sup> ]	$K_{cat}$ [h <sup>-1</sup> ]	$K_m$ [mM]	$V_{max}$ [mAU s <sup>-1</sup> ]	$K_{cat}$ [h <sup>-1</sup> ]
3,5-DTBC	0,22	1,6 <sup>a</sup>	38,8	1,6	1,7 <sup>a</sup>	20,3
Dopamin	0,73	1,129	-	2,1 <sup>b</sup>	0,19 <sup>b</sup>	-

Pozn.: <sup>a</sup>  $V_{max}$  [ $\mu$ M s<sup>-1</sup>], v prostředí acetonitrilu; <sup>b</sup> v prostředí 0,1 M fosfátového pufru

### Závěr

Tento příspěvek nabízí srovnání katalytické aktivity studovaných komplexů mědi v porovnání s enzymem tyrosinázou.

### Acknowledgments

The support received from the Czech Science Foundation (Project No. 19-03160S) and University of Pardubice (Project No. SGS-2022-011) is gratefully acknowledged.

### References

- Serrano-Plana J., Garcia-Bosch I., Company A., Costas M.: *Acc. Chem. Res.* **48**, 2397 (2015).
- Mobin S. M., Sanghavi B. J., Srivastava A. K., Mathur P., Lahiri G. K.: *Anal. Chem.* **82**, 5983 (2010).
- Sýs M., Vytřas K.: *Curr. Med. Chem.* **25**, 3988 (2018).
- Wang Y., Zhang X., Chen Y., Xu H., Tan Y., Wang S.: *Am. J. Biomed. Sci* **2**, 209 (2010).
- Fritea L., Tertiş M., Cosnier S., Cristea C., Săndulescu R.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **10**, 7292 (2015).
- Njagi J., Chernov M. M., Leiter J., Andreescu S.: *Anal. chem.* **82**, 989 (2010).
- Kumari S., Mahato A. K., Maurya A., Singh V. K., Kesharwani N., Kachhap P., Koshevoy I. O., Haldar C.: *New J Chem* **41**, 13625 (2017).
- Sýs M., Obluková M., Kolivoška V., Sokolová R., Korecká L., Mikysek T.: *J. Electroanal. Chem.* **864**, 114066 (2020).

**Electrochemical Characterization of Self-Assembled Monolayers Containing Redox Switching Element**  
**(Elektrochemická charakterizace samoorganizovaných monovrstev obsahujících prvek elektrochemického přepínání)**

Štěpánka Nováková Lachmanová <sup>a</sup>, Jana Kocábová <sup>a</sup>, František Vavrek <sup>a</sup>, Táňa Sebechlebská <sup>a,b</sup>, Jakub Šebera <sup>a</sup>, Viliam Kolivoška <sup>a</sup>, Jan Lukášek <sup>c</sup>, Nico Balzer <sup>c</sup>, Michal Valášek <sup>c</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 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: hromadom@jh-inst.cas.cz

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

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

**Abstract**

Adsorption properties of molecules containing [Ru(terpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> and [Os(terpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> redox switching element connected to the electrode surface by tripodal thiolate anchoring groups have been studied together with their charge transfer properties in the adsorbed form. STM-based current-voltage measurements confirmed that the conductance of self-assembled monolayer containing [Os(terpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> redox switching element is lower than that containing [Ru(terpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> element. This observation agrees with previously observed differences in the electron transfer rate constants of these molecules in their adsorbed state.

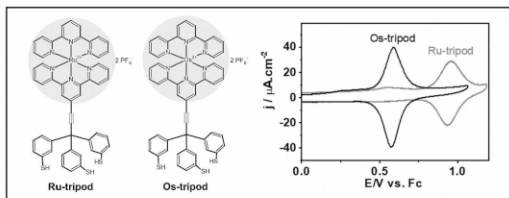
**Keywords:** [Ru(terpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, [Os(terpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, Tripodal Anchor, Self-Assembled Monolayer, Cyclic Voltammetry, Electrochemical Impedance Spectroscopy, STM-based Conductance

**Introduction**

Molecular switches represent an important group of building blocks for the development of the future molecular electronic devices <sup>1-6</sup>. Such molecules can alternate between two redox states providing different values of the detected signal, in this case different molecular conductances <sup>7</sup>. In our previous work <sup>8-15</sup> we developed new multipodal anchors with the aim to increase the conductivity of molecules from which the self-assembled monolayers (SAMs) are formed. Multipodal platforms can also increase the stability of such structures and lead to desired geometry of the redox switching elements within the SAMs.

Molecules studied in this work are shown in Fig. 1 (left). They consist of the [Ru(terpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> or [Os(terpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> redox active element that is connected to a tripodal anchoring platform via ethynylene linker. Their electrochemical properties have been already studied in the organic solvent <sup>16</sup> and cyclic voltammetry confirmed a one-electron reversible oxidation wave at E<sup>0</sup> = 0.562 V for **Os-tripod** and E<sup>0</sup> = 0.910 V for **Ru-tripod** versus ferrocene/ferrocenium couple without any subsequent chemical degradation step. Both molecules were studied in their thioacetate-protected form, which should have a negligible effect on their redox properties. Further experimental work focused on the determination of the electron transfer rate constants in their adsorbed form <sup>17</sup>. For this purpose cyclic voltammetry at high scan rates and electrochemical impedance spectroscopy were used. This work suggested that at the electrode potentials close to E<sup>0</sup> of the adsorbed species **Os-tripod** SAM forms more compact layer compared to **Ru-tripod** SAM. The electron transfer rate constant of 1.4 × 10<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> was obtained for **Os-tripod** SAM and 1.6 × 10<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> for **Ru-tripod** SAM, respectively. These values are almost

one order of magnitude higher than those reported in the literature for osmium and ruthenium dipodal thiol-based anchors.



**Fig. 1.** Chemical structure of molecules Ru-tripod and Os-tripod (left). Representative cyclic voltammogram of Ru-tripod and Os-tripod SAM on the gold bead electrode (right).

### Experimental

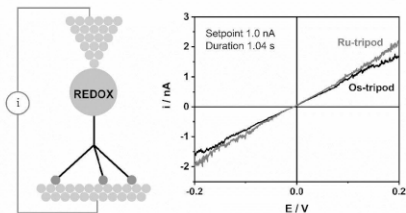
Transition metal complexes **Ru-tripod** and **Os-tripod** were synthesized in the laboratory of Dr. Valášek in Germany. Ethanol (99.8%, molecular biology grade, AppliChem GmbH), triethylamine ( $\geq 99.5\%$ , BioUltra, Sigma Aldrich), ferrocene (98%, Sigma Aldrich), nitric acid (65%, p. a., Lach-Ner), sulfuric acid (96%, p. a., Lach-Ner), hydrogen peroxide (30%, p. a., unstabilized) and argon gas (99.998%, Messer) were used as received. Tetrabutylammonium hexafluorophosphate TBAPF<sub>6</sub> ( $\geq 99.9\%$ , p. a. for electrochemical analysis, Sigma Aldrich) was dried in the oven at 80 °C before use. Acetonitrile (99.8%, anhydrous, Sigma Aldrich) was dried with activated sieves (0.3 nm, Lachema), and the alumina powder activated in the oven at 200 °C which was added to the electrochemical cell before the measurements. All glassware and PTFE chambers were cleaned by boiling in 25% nitric acid and by repeated boiling in ultrapure deionized water with a maximum resistivity of 18.2 MΩ cm and maximum TOC of 3 ppb obtained by Milli-Q Integral 5 water purification system (Merck Millipore).

Electrochemical experiments were done in the electrochemical cell using a three-electrode arrangement: gold bead working electrode, gold wire auxiliary electrode, and Ag/AgCl|1M LiCl reference electrode separated from the measuring solution by a double-fritted compartment containing the supporting electrolyte solution only. Ferrocene was employed as an internal standard. Cyclic voltammetry was used to determine the formation of the compact SAM for each compound using PGSTAT30 potentiostat (Metrohm, Switzerland). Scanning Tunneling Microscopy (STM) was used for the determination of the current-voltage curves in the gold substrate-SAM-gold tip arrangement. Atomic force microscopy (AFM) was used for the structural characterization of the redox-active SAMs. Both STM and AFM experiments were performed using Agilent 5500 Scanning Probe Microscope (Agilent Technologies, USA).

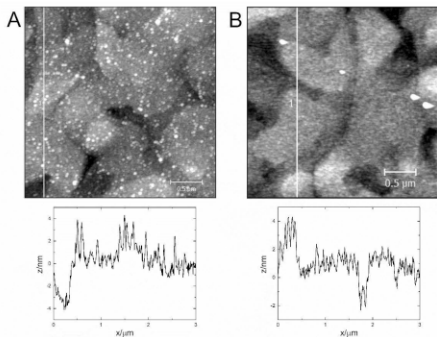
SAMs were prepared by immersion of the gold bead electrodes into the  $5 \times 10^{-5}$  M solution of studied compounds in absolute ethanol that was degassed by a stream of argon to remove any traces of oxygen. Triethylamine (10% v/v) was added as a deprotecting agent and the electrodes were incubated in the deposition solution overnight in a tight-sealed PTFE chambers at 60°C. Physisorbed molecules were removed by copious rinsing with absolute ethanol.

## Results and discussion

Fig. 1 (right) shows typical cyclic voltammograms corresponding to reversible one electron redox process of the  $[\text{Ru}(\text{terpy})_2]^{2+/3+}$  or  $[\text{Os}(\text{terpy})_2]^{2+/3+}$  couple in the adsorbed state. The peak current for both oxidation and reduction process scales linearly with the scan rate. In our previous work<sup>17</sup> we have analyzed such voltammograms by three independent methods to obtain the surface concentrations of molecules in SAM as well as the electron transfer rate constants ( $k^0 = 1.4 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$  for **Os-tripod** SAM and  $k^0 = 1.6 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$  for **Ru-tripod** SAM).



**Fig. 2.** Representative STM-based electrode-SAM-electrode arrangement (left) and representative current/voltage curves (right) for **Ru-tripod** (gray) and **Os-tripod** (black) SAM. Setpoint current was 1 nA and the feedback duration time was 1.04 s.



**Fig. 3.** AFM topography images of (A) **Ru-tripod** and (B) **Os-tripod** SAMs, image size  $3 \times 3 \mu\text{m}$ . The panel below each image shows the height profile along the white line provided.

In this contribution, we continued studies of the charge transport properties of these SAMs and performed conductance measurements of **Ru-tripod** and **Os-tripod** SAMs using STM. Fig. 2 shows the electrode-molecule-substrate arrangement in the STM experiment (left) and representative current-voltage curves (right) for each SAM. Two different values of the setpoint current have been used for the specification of the distance between the SAM and the gold tip electrode, namely 1.0 nA and 0.5 nA. Each setpoint current value determines how close the gold tip is with respect to the SAM surface. Even though both settings do not allow for contact-mode measurements the higher the setpoint current the closer to the SAM surface the gold tip is. The dependence is exponential. We have observed that in both cases the conductance value was lower for **Os-tripod** SAM compared to **Ru-tripod** SAM. The current-voltage curves at setpoint current 1.0 nA are shown in Fig. 2 (right), the conductance  $G$  is a reciprocal of the resistance  $R$ , *i.e.*  $G = 1/R = i/E$ .

Fig. 3 shows the AFM topography images of these SAMs with the height profiles obtained along the lines indicated by a white line in the image. The main difference between the images is that the **Os-tripod** SAM has a small amount of physisorbed material deposited on the SAM. This observation may explain the fact that the first cyclic voltammogram of the **Os-tripod** SAM has an unusual shape (not shown) and then the voltammograms are identical to the one shown in Fig. 1 (right). Nevertheless, it has been confirmed that even after the electrochemical pretreatment the areas under the cathodic or anodic peaks in Fig. 1 (right) are higher for **Os-tripod** SAM compared to **Ru-tripod** SAM. Molecules in the **Os-tripod** SAM form more compact layers with higher surface concentration.

### Conclusion

We have studied the adsorption properties of **Os-tripod** and **Ru-tripod** molecules at the gold electrode surface. The compact films were characterized by a combined AFM and STM methodology in addition to electrochemical charge transfer characterization in the adsorbed state. It was confirmed that the charge transport (conductance) to **Ru-tripod** molecules in SAM is easier compared to **Os-tripod** molecules in the self-assembled monolayers. This result is in accord with the observation that the charge transfer (electron transfer rate constant) to a redox-active  $[\text{Ru}(\text{terpy})_2]^{2+}$  element is faster than to the  $[\text{Os}(\text{terpy})_2]^{2+}$  center in the SAM.

### Acknowledgments

Financial support by the Czech Science Foundation (21-13458S) is gratefully acknowledged.

### References

1. Albrecht T., Guckian A., Ulstrup J., Vos J. G.: *Nano Lett.* **5**, 1451 (2005).
2. Tuccitto N., Ferri V., Cavazzini M., Quici S., Zhavnerko G., Licciardello A., Rampi M. A.: *Nat. Mater.* **8**, 41 (2009).
3. Sakamoto R., Wu K. H., Matsuoka R., Maeda H., Nishihara H.: *Chem. Soc. Rev.* **44**, 7698 (2015).
4. Davidson R., Al-Owaedi O. A., Milan D. C., Zeng Q., Tory J., Hartl F., Higgins S. J., Nichols R. J., Lambert C. J., Low P. J.: *Inorg. Chem.* **55**, 2691 (2016).
5. Ozawa H., Baghernejad M., Al-Owaedi O. A., Kaliginedi V., Nagashima T., Ferrer J., Wandlowski T., García-Suárez V. M., Broekmann P., Lambert C. J., Haga M.: *Chem. Eur. J.* **22**, 12732 (2016).
6. Higgins S. J., Nichols R. J.: *Polyhedron* **140**, 25 (2018).
7. Davis J. J., Peters B., Xi W., Appel J., Kros A., Aartsma T. J., Stan R., Canters G. W.: *J. Phys. Chem. Lett.* **1**, 1541 (2010).

8. Lindner M., Valášek M., Homberg J., Edelmann K., Gerhard L., Wulfhekel W., Fuhr O., Wächter T., Zharnikov M., Kolivoška V., Pospíšil L., Mészáros G., Hromadová M., Mayor M.: Chem. Eur. J. 22, 13218 (2016).
9. Hromadová M., Kolivoška V., Sokolová R., Šebera J., Mészáros G., Valášek M., Mayor M.: *XXXVI. Modern Electrochemical Methods, Jetřichovice, May 23<sup>rd</sup> – 27<sup>th</sup>, 2016*, Book of Abstracts (Navrátil T., Schwarzová, K., Fojta M. eds.) p. 78.
10. Kolivoška V., Šebera J., Lindner M., Valášek M., Mayor M., Mészáros G., Gasior J., Hromadová M.: *XXXVII. Modern Electrochemical Methods, Jetřichovice, May 15<sup>th</sup> – 19<sup>th</sup>, 2017, Jetřichovice*, Book of Abstracts (Navrátil T., Schwarzová, K., Fojta M. eds.) p. 99.
11. Sebechlebská T., Šebera J., Kolivoška V., Lindner M., Gasior J., Mészáros G., Valášek M., Mayor M., Hromadová M.: *Electrochim. Acta* 258, 1191 (2017).
12. Kolivoška V., Sebechlebská T., Šebera J., Gasior J., Lindner M., Lukášek J., Valášek M., Mayor M., Mészáros G., Hromadová M.: *XXXVIII. Modern Electrochemical Methods, Jetřichovice, May 21<sup>st</sup> – 25<sup>th</sup>, 2018, Jetřichovice*, Book of Abstracts (Navrátil T., Schwarzová, K., Fojta M. eds.) p. 132.
13. Hromadová M., Kolivoška V., Šebera J., Sebechlebská T., Gasior J., Nováková Lachmanová Š., Mészáros G., Lindner M., Mayor M., Valášek M.: *XXXIX. Modern Electrochemical Methods, Jetřichovice, May 20<sup>th</sup> – 24<sup>th</sup>, 2019, Jetřichovice*, Book of Abstracts (Navrátil T., Schwarzová, K., Fojta M. eds.) p. 96.
14. Kolivoška V., Šebera J., Sebechlebská T., Lindner M., Gasior J., Mészáros G., Mayor M., Valášek M., Hromadová M.: *Chem. Commun.* 55, 3351 (2019).
15. Šebera J., Lindner M., Gasior J., Mészáros G., Fuhr O., Mayor M., Valášek M., Kolivoška V., Hromadová M.: *Nanoscale* 11, 12959 (2019).
16. Nováková Lachmanová Š., Vavrek F., Sebechlebská T., Šebera J., Kolivoška V., Lukášek J., Balzer N., Valášek M., Mayor M., Hromadová M.: *XL. Modern Electrochemical Methods, Jetřichovice, November 8<sup>th</sup> – 12<sup>th</sup>, 2021, Jetřichovice*, Book of Abstracts (Navrátil T., Schwarzová, K., Fojta M. eds.) p. 188.
17. Nováková Lachmanová Š., Vavrek F., Sebechlebská T., Kolivoška V., Valášek M., Hromadová M.: *Electrochim. Acta* 384, 138302 (2021).



## Voltammetric Properties of DNA Oligonucleotides Containing Synthetic Components (Voltametrické vlastnosti DNA oligonukleotidů obsahujících syntetické složky)

Anna Ondráčková, Monika Hermanová, Hana Pivoňková, and Miroslav Fojta  
Institute of Biophysics, Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, CZ-61265, Brno,  
Czech Republic, E-mail: agna333@gmail.com

### Abstract

Expansion of the genetic alphabet by the design of unnatural bases has been one of the important directions in synthetic biology research. The unnatural base pairs often differ in their chemical properties from the canonical ones which can be utilized in the design of specific analytical methods for their determination. Electrochemical approaches have been successfully used for the detection of low levels of DNA modification with various extrinsic species, including unnatural bases. This work has been focused on the characterization of voltammetric properties of oligonucleotides derived from the C-rich strand of human telomeric repeat modified with a synthetic nucleobase "Z" bearing an electrochemically reducible nitro group. We have been able to differentiate between oligonucleotides composed of solely natural nucleotides and those bearing one or two substitutions of thymine or cytosine residues for the Z base.

**Keywords:** Unnatural base, Voltammetry, Mercury, Oligonucleotide, „Artificially Expanded Genetic Information System“ (AEGIS).

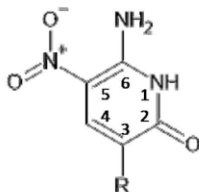
### Úvod

AEGIS („Artificially Expanded Genetic Information System“) <sup>3,4</sup>, tedy uměle rozšířený systém genetické informace, je představuje jednu z cest k vývoji nových nepřírozených bází DNA, které nejen mohou vytvořit stabilní a nepřerušenu komplementární DNA dvoušroubovici, ale mohou v ní být i replikovány a transkribovány. Hlavním záměrem vývoje nových nepřírozených DNA bází je vývoj nových genů a proteinů, které mohou fungovat v živých organismech, jako např. nosiče léčiv, nebo napomoci vývoji nových přístupů k vývoji diagnostiky závažných onemocnění <sup>1</sup>. Jedním ze systémů využívajících nepřírozené báze pro rozšíření genetické abecedy jsou syntetické báze, které díky své struktuře tvoří páry bází s podobnou geometrií jako přírozené A:T a G:C páry <sup>3</sup>. Tyto báze se mohou párovat se svými nepřírozenými komplementárními protějškem, ale díky permutovanému systému donorových a akceptorových skupin vodíkových vazeb nikoli s přírodními bázemi. DNA nebo RNA, která tyto báze obsahuje, se následně může účastnit replikace, transkripce, reverzní transkripce nebo translace <sup>4</sup>.

Vybrané báze ze systému AEGIS nabízejí možnost jejich studia prostřednictvím redoxních signálů. Pro účely této práce byla vybrána nepřírozená báze označená jako „Z“ (systematicky 6-amino-5-nitro-2(H)-pyridon; Obr. 1). Dále jsme využili oligonukleotidy odvozené z C-bohatého řetězce lidské telomerní sekvence, které nesly modifikaci bází na jedné či dvou pozicích (v jednom případě záměnou T za Z a ve druhém dvou C za dvě Z, Tab. I).

### Experimentální část

Pro měření byly použity oligonukleotidy shrnuté v Tab. I. Koncentrace oligonukleotidů byla 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , rozpuštěny byly v 1 mM sodnofosfátovém pufru (pH 7) +0,3 mM EDTA. Mezi experimenty byl roztok skladován při -10 °C.



**Obr. 1.** Chemická struktura nepřirozené báze Z (6-amino-5-nitro-2(1H)-pyridon).

Všechna elektrochemická měření byla prováděna při laboratorní teplotě v tříelektroodovém zapojení (s visící rtuťovou kapkovou elektrodou, HMDE jako pracovní elektrodou, Ag/AgCl/3 M KCl jako referenční elektrodou a platinovým drátkem jako pomocnou elektrodou) na přístroji Autolab (Ecochemie) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm). Měření byla provedena adsorptivní přenosovou rozpouštěcí voltametrií (AdTS). DNA byla akumulována na povrchu elektrody ze 3- $\mu$ l alikvotů po dobu 60 s, poté byla elektroda opláchnuta v deionizované vodě a umístěna do elektrochemické cely obsahující čistý elektrolyt. Cyklická voltametrie (CV) na HMDE byla prováděna v elektrolytu obsahujícím 0,3 M mravenčan amonný a 0,05 M fosforečnan sodný, pH 6,9; nastavení pro cyklickou voltametrii byla následující: počáteční potenciál 0 V, potenciál bodu obratu -1,85 V, koncový potenciál 0 V, rychlost polarizace 1 V.s<sup>-1</sup>. Pro každé měření bylo provedeno 5 skenů.

#### **Tabulka I.**

Sekvence použitých oligonukleotidů.

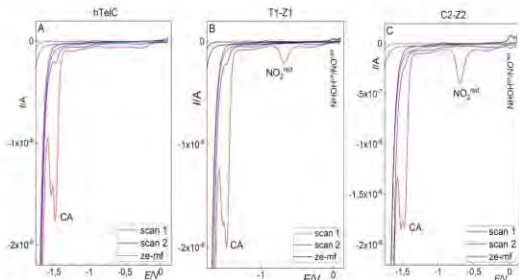
Sekvence	Název	Délka	$\epsilon$
CCCTAACCCCTAACCCZAACCC	T1-Z1	21	8988
CCZTAACCCCTAACCCZTAACCC	C2-Z2	21	8988
CCCTAACCCCTAACCCCTAACCC	hTelC	21	8988

#### **Výsledky a diskuse**

Při redukci kteréhokoliv ze zkoumaných oligonukleotidů jsme na cyklických voltamogramech (Obr. 2) pozorovali redukční signály bázi cytosinu a adeninu. Oba píky se značně překrývají a v Obr. 2 jsou označeny jako jeden signál – pik CA, zatímco v Tab. II jsou označeny odděleně jako pik CA(1) odpovídající redukci adeninu okolo -1,55 V a pik CA(2) (redukce cytosinu okolo -1,47 V). Rozlišitelnost obou signálů pomocí CV odpovídá tomu, že adenin a cytosin jsou v oligonukleotidech uspořádány v blocích (zatímco v DNA s náhodnou (průměrnou) sekvencí bázi tyto dvě báze dávají společný nerozlišitelný CA pik<sup>9</sup>).

Další dobře vyvinutý signál, který pozorujeme na voltamogramech oligonukleotidů T1-Z1 a C2-Z2, je katodický pik nacházející se okolo -0,6 V, označený jako pik NO<sub>2</sub><sup>red</sup> ve shodě s jeho přiřazením ireverzibilní čtyřelektronové redukci nitroskupin obsažených v bázi Z (Obr. 1) na příslušný hydroxylamin. Již dříve bylo potvrzeno, že elektrochemickou redukci nitroskupiny lze pozorovat i u jiných typů modifikovaných bázi, respektive konjugátů kanonických bázi s aromatickými nitroderiváty, které byly enzymaticky inkorporovány do DNA<sup>10</sup>. Pik NO<sub>2</sub><sup>red</sup> oligonukleotidu C2-Z2 byl v porovnání s oligonukleotidem T1-Z1 přibližně dvakrát vyšší, což

odpovídá tomu, že v jeho sekvenci se nachází dvě báze Z oproti jedné v T1-Z1. Dalším charakteristickým signálem oligonukleotidů nesoucích báze Z je reverzibilní pár  $\text{NHOH}^{\text{ox}}/\text{NO}^{\text{red}}$  okolo  $+0,03$  V. Jde o oxidaci hydroxylaminu jako produktu redukce nitroskupiny na příslušný nitrosoderivát a jeho zpětná redukce na hydroxylamin. Pouze tyto signály jsou viditelné i při druhém cyklu měření (modré křivky), což odpovídá reverzibilitě poslední zmíněné reakce (ostatní zmíněné děje jsou ireverzibilní). Bez zajímavosti není ani viditelný relativní pokles výšky piku redukce cytosinu (tj. pík CA(2)) v případě oligonukleotidů C2-Z2 oproti hTelC jakožto důsledek snížení počtu cytosinových zbytků (z 9 na 7). V oligonukleotidu T2-Z2 je stejný počet cytosinů jako v hTelC a odpovídá tomu i tvar příslušného voltamogramu.



**Obr. 2.** Cyklické voltamogramy oligonukleotidů: hTelC (A); T1-Z1 (B); a C2-Z2 (C). Počáteční potenciál  $+0,1$  V, potenciály obrátu v  $-1,85$  V a  $+0,1$  V. Celkem měřeno 5 cyklů, zobrazeny první dva cykly pro každý oligonukleotid (červená – první cyklus, modrá – druhý cyklus; černá – základní elektrolyt, první cyklus).

### Tabulka II.

Tabulka potenciálů pozorovaných voltametričeských signálů.

	CA(1)	CA(2)	$\text{NO}_2^{\text{red}}$	$\text{NHOH}^{\text{ox}}/\text{NO}^{\text{red}}$
hTelC	-1.54 V	-1.47 V	x	x
T1-Z1	-1.55 V	-1.47 V	-0.67 V	+0.03 V
C2-Z2	-1.54 V	-1.47 V	-0.69 V	+0.03 V

### Závěr

Ukázali jsme, že s využitím elektrochemické analýzy je možno rozpoznat oligonukleotidy obsahující nepřírozenou bázi jako minoritní složku a rozlišit oligonukleotidy lišící se počtem nepřírozených i přírozených bází.

### Acknowledgments

Tato práce vznikla za podpory projektu SYMBIT reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15\_003/0000477 financovaného z ERDF a projektu LA GAČR č. 21-46325L.

## References

1. Jena N. R.: *ChemPhysChem* 23, e202100908 (2022).
2. Malyshev D. A., Dhimi K., Lavergne T., Chen T., Dai N., Foster J. M., Corrêa I. R., Romesberg F. E.: *Nature* 509, 385 (2014).
3. Yang Z., Chen F., Chamberlin S. G., Benner S. A.: *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 177 (2011).
4. Kim H.-J., Leal N. A., Hoshika S., Benner S. A.: *J Org Chem* 79, 3194 (2014).
5. Paleček E., Bartošik M.: *Chem Rev* 112, 3427 (2012).
6. Špaček J., Daňhel A., Hason S., Fojta M.: *Electrochem commun* 82, 34 (2017).
7. Hocek M., Fojta M.: *Chem Soc Rev* 40, 5802 (2011).
8. Špaček J., Fojta M.: *Electrochim. Acta* 364, 137298 (2020).
9. Trnková L., Jelen F., Postbieglová I.: *Electroanalysis* 15, 1529 (2003).
10. Horáková P., Macíčková-Cahová H., Pivoňková H., Špaček J., Havran L., Hocek M., Fojta M.: *Org Biomol Chem* 9, 1366 (2011).

### 3-Aminobenzoic Acid Based Polymer as Scaffold for Electrochemical Recognition of Synthetic Cathinones

Eva Pospíšilová and Tatiana V. Shishkanova

<sup>a</sup>University of Chemistry and Technology, Prague, Faculty of Chemical Engineering,  
Department of Analytical Chemistry, Technická 5, 166 28 Praha 6, Czech Republic,  
E-mail: pospisae@vscht.cz

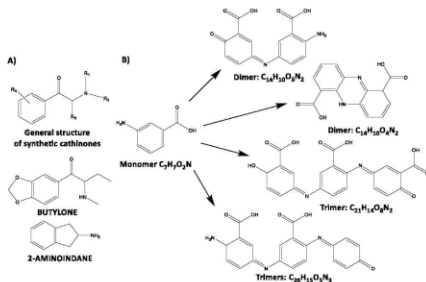
#### Abstract

3-Aminobenzoic acid electrochemically deposited (p3ABA) on the graphite electrode was used as a selective layer for recognition of butylone (synthetic cathinone). Changes in the electrochemical properties of the p3ABA layer were monitored by electrochemical impedance spectroscopy. Butylone binding influences the charge-transfer resistance of a redox couple  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  from 1  $\mu\text{M}$  up to 91  $\mu\text{M}$  range. A comparison of the equilibrium adsorption constants obtained for the p3ABA layer indicates its capability to discriminate between butylone (secondary amine) and 2-aminoindane (primary amine). This discrimination can be attributed to the combination of coulombic and hydrogen interactions that could be offered by electrochemically oxidized 3ABA.

**Keywords:** 3-Aminobenzoic acid, Electrochemical polymerization, Electrochemical impedance spectroscopy, Synthetic cathinones.

#### Introduction

Synthetic cathinones are derived from (S)-(-)-2-amino-1-phenylpropan-1-one (cathinone), which is naturally found in the khat plant. Consumption of these substances is associated with positive stimulating effects, such as increased energy, increased self-confidence, openness, sociability and talkativeness, improved mood, and intensification of sensory experiences. However, these positive effects can quickly be replaced by negative ones, such as anxiety, paranoia, and psychosis <sup>1</sup>. Because the structure of cathinone can be modified fairly easily through the amino group (R1, R2), the alkyl chain (R3), or the aromatic ring (R4) (Scheme 1A), hundreds of its synthetic derivatives can be formed <sup>2</sup>. The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) currently monitors more than 150 substances derived from cathinone <sup>3</sup>. The rapid spread of synthetic cathinones on the drug market requires the development of fast and reliable techniques for their monitoring. Liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometry belong among the laboratory techniques most commonly used for synthetic cathinones analysis <sup>4</sup>. Recently, voltammetric techniques have been proposed to monitor synthetic cathinones in both seized and biological samples <sup>5-7</sup>. The working electrodes modified with a selective polymeric film play an important role in the voltammetric analysis. The product of electrochemical oxidation of 3-aminobenzoic acid (3ABA) may be suitable for electrode surface modification. The spectroscopic findings have shown that the attachment of 3ABA to the electrode surface is realized through an amino group similarly to the aniline polymerization mechanism with the formation of oligomers (Scheme 1B) <sup>8</sup>. Moreover, the carboxylic group present in oligomers was not significantly damaged. Therefore, undamaged carboxylic group that is capable to combine both coulombic and hydrogen interactions, might be used for binding of synthetic cathinones. Herein, the main aim is to investigate the interaction between 3ABA modified electrode surface and butylone (Scheme 1A) and to show the recognizing properties of 3ABA in contrary to the polyaniline (PANI) film.



**Scheme 1.** Structure of synthetic cathinones (A) and the structures of oligomers formed from electrochemically oxidized 3-aminobenzoic acid (B).

## Experimental

Butylone hydrochloride, was obtained from Alfarma s.r.o. 3-Aminobenzoic acid (98 %, 3ABA), 2-aminoindane hydrochloride (2-AI, 98%), and aniline hydrochloride (97 %) were obtained from Sigma-Aldrich (USA). The inorganic compounds used for voltammetric measurements were from Lach-Ner, Czech Republic. The solutions were prepared using distilled water.

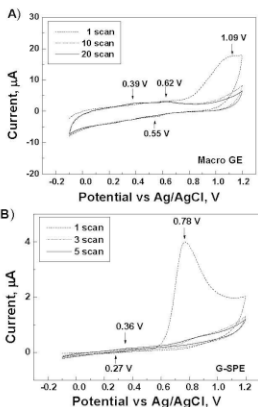
Voltammetric and electrochemical impedance spectroscopic (EIS) measurements were carried out using PalmSens 3 (PalmSens BV, Netherlands), controlled by the PSTrace 5.4 program in classic three-electrode set up. Two kinds of working electrodes were used, namely macro graphite electrode (GE) (Elektrochemická detektor, s. r. o., Czech Republic) and screen-printed electrode, namely graphite (G-SPE) (BVT Technologies, Czech Republic). The modified G-SPE used for electrochemical studies is composed of a graphite working electrode ( $0.25 \text{ mm}^2$ ) and Ag/AgCl pseudoreference electrode. For the measurement with macro GE-electrode, argentochloride electrode (Ag/AgCl, 3 M KCl) and a platinum plate ( $81 \text{ mm}^2$ ) were used as a reference and a counter electrodes, respectively. A priori the application, the G-SPE electrodes were activated by cycling potential from 0.0 V to 1.5 V (40 cycles) in 0.1 M KCl phosphate buffer with pH 8 (PBS).

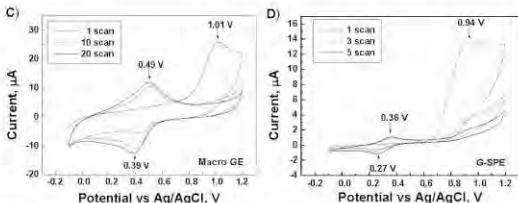
Electrochemical modification of electrode surface was carried out by cyclic voltammetry (CV) from the polymerization mixture, which consisted of 50 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and 10 mM 3ABA /or aniline. The experimental condition were the following: potential range from -0.1 V to 1.2 V, potential step 0.01 V, scan rate of 50 mV/s, 20 scans (for GE), and 5 scans (for G-SPE).

The EIS measurements with both un- and modified electrodes were carried out in 0.1 M KCl solution containing 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  (redox marker) with/without analytes of interest. The EIS spectra were collected at a potential of 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. The Randles circuits (Fig. 2A) were used for the curve fitting of impedance spectra in the software package PSTrace 5.4.

## Results and discussion

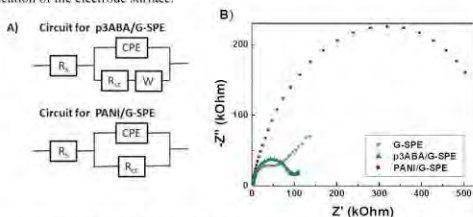
The application of screen-printed electrodes in forensic analysis is a way to minimize the sensor devices and transfer the analysis outside the laboratory. The conditions of electrochemical polymerization of both 3ABA and aniline found on the macro GE-electrode were then used for modification of the G-SPE electrodes. The appearance of the intensive anodic peaks at 1.09 V and 1.01 V (Fig. 1A,C) can indicate that the electrochemical oxidation occurred through amino group<sup>9-11</sup>. Brett et al.<sup>12</sup> have observed that the oxidation of amino group of aminobenzoic acid requires a slightly more positive potential than that of aniline (Fig. 1A). In addition, there is a shift in the position of the peaks observed on GE- and G-SPE electrodes (compare Fig. 1A and 1B, Fig. 1C and 1D). Such a behavior could be due to the variation in the composition of the electrode material, in particular GE and G-SPE. The anodic and cathodic peaks marked on CV-voltammogram for p3ABA and polyaniline can be a result of oxidation and reduction processes of the polymer deposited on the electrode surface.





**Fig. 1.** Cyclic voltammograms obtained at electrochemical oxidation 3-aminobenzoic acid (A, B) and aniline (C, D) carried out on macro (GE) and G-SPE electrodes.

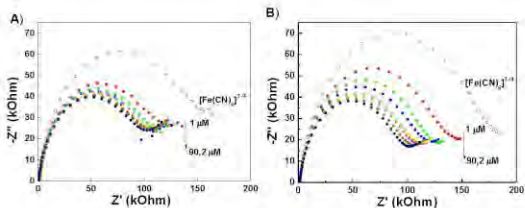
The un- and modified G-SPE (both with 3ABA and aniline) were then characterized by the EIS technique. Obviously, there is a significant difference in resistance after deposition of the p3ABA and PANI layer. Such difference can be the result of the thickness of the deposited layer and its conductivity (Fig. 2B). Additionally, it is a confirmation of the attained modification of the electrode surface.



**Fig. 2.** A) Equivalent electrical circuit used for characterization of the modified graphite screen-printed electrode and B) impedance spectra measured before and after modification of electrode surface.

In order to verify the affinity of p3ABA layer, the EIS-responses toward butylone (Fig. 3A) and 2-AI (Fig. 3B) were recorded. Butylone, which includes the secondary amine group, belongs to the category of synthetic cathinones. 2-Aminoindane is a structural analogue of amphetamine that includes the primary amino group. The fact that changes of resistance for p3ABA/G-SPE and the PANI/G-SPE modified electrodes were opposite (Table I) can indicate on their different mechanism of interaction with the tested analytes. Namely, it can be a combination of coulombic and hydrogen interactions in the case of the p3ABA/G-SPE layer and nonspecific adsorption in the case of the PANI layer.





**Fig. 3.** The EIS-responses of p3ABA modified electrode towards butylone (A) and 2-aminoindane (B).

The equilibrium adsorption constant ( $K_{ads}$ ) obtained from CPE =  $f(C(\text{analyte}))$  dependences provides additional insight into the affinity between the modified surface and the analytes. The electrode modified with p3ABA showed higher affinity towards butylone and lesser one towards 2-AI:  $K_{ads}(\text{butylone}) = 8.9 \times 10^5$  and  $K_{ads}(2\text{-AI}) = 2.9 \times 10^5$ . As expected, the electrode modified with PANI did not discriminate butylone from 2-AI:  $K_{ads}(\text{butylone}) = K_{ads}(2\text{-AI}) = 4.9 \times 10^5$ . These data additionally confirm our hypothesis that p3ABA can serve as a scaffold for the electrochemical recognition of synthetic cationics.

**Table 1.** The calibration dependences from EIS-measurements obtained with the modified electrodes for butylone and 2-aminoindane.

NPS	p3ABA/G-SPE	PANI/G-SPE
BUTYLONE	$R_{ct} = -13.0 \log C - 33.3$ ( $R^2 = 0.8968$ )	$R_{ct} = 66.7 \log C + 1070.0$ ( $R^2 = 0.8578$ )
2-AMINOINDANE	$R_{ct} = -31.3 \log C - 57.2$ ( $R^2 = 0.9948$ )	$R_{ct} = 124.5 \log C + 1612.1$ ( $R^2 = 0.9847$ )

## Conclusion

The surface of graphite electrodes was modified with a layer derived from 3-aminobenzoic acid and aniline by cyclic voltammetry. A comparison of the EIS responses of these layers showed the specificity of 3ABA towards butylone. This indicates that electrochemically oxidized 3ABA can bind amino derivatives of new psychoactive substances by a different mechanism than the PANI layer. Furthermore, the equilibrium adsorption constants can help to evaluate the interaction between the modified electrode surface and the analyte of interest.

## Acknowledgment

This work was supported by the grant of Specific university research – grant No A2 FCHI 2022 009 and 402850061.

## References

- Karila L., Billieux J., Benyamina A., Lançon C., Cottencin O.: *Brain Res. Bull.* /26, 61 (2016).
- Leffler A. M., Smith P. B., de Armas A., Dorman F. L.: *Forensic Sci. Int.* 234, 50 (2014).

3. EMCDDA: European Drug Report 2021: Trends and Developments. Publications Office of the European Union, Luxembourg 2021.
4. 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).
5. Couto R. A. S., Mounssef 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).
6. Lima C. D., Couto R. A. S., Arantes L. C., Marinho P. A., Pimentel D. M., Quinaz M. B., da Silva R. A. B., Richter E. M., Barbosa S. L., dos Santos W. T. P.: *Electrochim. Acta* *354*, 136728 (2020).
7. 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).
8. Shishkanova T. V., Broncová G., Němečková Z., Vrkoslav V., Král V., Matějka P.: *J. Electroanal. Chem.* *832*, 321 (2019).
9. Heydari M. H., Zebhi H., Farhadi K., Moghadam P. N.: *Synth. Met.* *220*, 78 (2016).
10. Benyoucef A., Huerta F., Vázquez J. L., Morallon E.: *Eur. Polym. J.* *41*, 843 (2005).
11. Alkhami A., Nematollahi D., Madrakian T., Khalafi L.: *Electrochim. Acta* *50*, 5633 (2005).
12. Thiemann C., Brett C. M. A.: *Synth. Met.* *123*, 1 (2001).

## Detection of Selected Amino Acids using Electroanalytical Methods (Detekce vybraných aminokyselin pomocí elektroanalytických metod)

Andrea Purdešová, Zuzana Kramplová, and Jozef Sokol

Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, University of Ss. Cyril and Methodius  
in Trnava, Nám. J. Herdu 2, SK-917 01 Trnava, Slovak Republic,  
E-mail: andrea.purdesova@ucm.sk

### Abstract

Since iron and substances that can interact negatively with iron are electroactive, such as several neurotransmitters, these pathological changes can be very effectively demonstrated using electrochemical methods that are highly sensitive, simple, and effective. Voltammetry methods are most suitable for this purpose, especially cyclic voltammetry, but also differential pulse voltammetry or square wave voltammetry.

**Keywords:** Iron, Amino acids, Neurodegenerative diseases, Voltammetric methods.

### Introduction

Iron is one of the essential elements on Earth. This fact can also be reflected in iron deficiency-related disease syndromes, such as anemic syndrome. The ability of iron to change its oxidation state between ferrous and ferric forms by receiving or transferring electrons is very important for the proper functioning of the human body (hemoglobin). Due to this property, it must be tightly regulated, as it can catalyze the formation of free radicals.

In the human brain, iron is the trace element with the highest concentration depending on the individual areas, and therefore attention is currently being paid to the pathological effects of iron present in the human body due to its potential role in the progression of neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's. These effects are very closely linked to dysfunctional iron metabolism, whether in the form of ferritin or in other forms, as well as dopamine, which are able to interact negatively in the human body. Ultimately, these phenomena can result in specific pathological abnormalities, such as the presence of iron deposits in brain tissue, the onset and development of neurodegenerative diseases, or even death.

Deposits of iron oxide minerals have been identified in the human brain of various individuals in the form of single crystals of between 10 and 50 nm size; these were assigned as magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) and/or maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Such kinds of deposits have been investigated in detail by electron microscopy in scanning and transmission mode, Mössbauer spectroscopy, and magnetometry. The size of single crystals varies from 10 to 1,000 nm, and they contain magnetite, maghemite, hematite ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), and other minerals such as polymorphs of  $\text{FeOOH}$ .

The mechanism of the formation of the iron oxide deposits in the intracellular matter is unknown so far; there are indications that they are associated with the dysfunction of the normal metabolism of ferritin and dopamine. A ferritin globule contains approximately 4,500 atoms of  $\text{Fe(III)}$  in the safe form of ferrihydrite.

Using reducing agents, dangerous soluble  $\text{Fe(II)}$  ions are released, and these can initiate a number of oxidative stress reactions resulting in irreversible damage.

Despite that, iron is essential for the proper functioning of the human, the body is becoming increasingly clear that even a small increase in the concentration of iron in the brain can cause a large number of disorders of the central nervous system, mostly in the nervous system age-related links, as iron gradually accumulates in the brain with age. Dysfunction of ferritin metabolism, which is the basic storage of iron in living organisms, either in the case of iron intake or release, leads to the existence of free iron (II), which can cause many neurological pathologies. These negative effects are often associated with defective dopamine mechanisms several oxidative intermediates are neurotoxic.

Since both iron and substances that can interact negatively with iron are electroactive, such as multiple neurotransmitters, these pathological changes can be demonstrated using electrochemical methods that are highly sensitive, simple, and effective.

A neurotransmitter is a chemical released from a nerve ending at a synapse. It serves to transmit the impulse through the synaptic cleft and thus allows the further spread of irritation (in the nervous system) or the induction of a certain reaction (muscle contraction, emptying the gland).

Currently, 50-100 substances from different chemical groups are known to meet some or all of the criteria needed to be classified as neurotransmitters. One of the classifications classifies neurotransmitters according to their affiliation to chemical groups (e.g. steroids, peptides, amino acids, catecholamines, purines).

Voltammetry methods are most suitable for this purpose, especially cyclic voltammetry, but also differential pulse voltammetry or square wave voltammetry.

### **Electroanalytical methods**

Electrochemical methods may be used as a tool for monitoring and understanding the redox mechanisms that take place in organisms<sup>1,2</sup>. They are simple, portable, and relatively cheap<sup>3</sup>. Since many diseases are associated with dysfunction in proteins<sup>4</sup>, properties of electroactive amino acids in their side chains (direct protein electrochemistry) are investigated.

In nature, 20 different amino acids (AMA) are most commonly found in proteins and for many years since work of Brabec and Mornstein<sup>5</sup> it is general knowledge that only six amino acids are „electroactive“ at the bare of carbon electrodes: methionine (Met), cysteine (Cys), glycine (Gly), tyrosine (Tyr), tryptophan (Trp) and cystine (Cys-Cys). Surface treatment of the working electrode helps to monitor the electroactivity of almost all proteinogenic amino acids. Success in the electrochemical detection of AMA strongly depends on the working electrode material. Detection of traditionally “nonelectroactive” amino acids was demonstrated with a glassy carbon electrode modified with single-wall carbon nanotubes<sup>6</sup>, incorporated copper microparticles within the multi-wall carbon nanotubes within a mineral oil binder<sup>7</sup>, at the carbon paste electrode modified with multiwall carbon nanotubes and copper(I) oxide<sup>8</sup>.

Alternative detection that avoids procedure of derivatization with electroactive reagents and the use of chemical and/or enzyme modified electrodes is usage a plastic formed carbon working electrode by means of voltametric reduction of 3,5-di-tert-butyl-1,2-benzoquinone coupled with a concept of acid-based back titration<sup>9</sup>.

Recently, all protein amino acids, except for glutamic acid were electrochemically oxidized with flow injection analysis on bare carbon screen printed electrodes. It was also found that Prussian Blue catalyzed this electrooxidation<sup>10</sup>.

Increasingly amino acid electrooxidation signals opens new ways for electrochemical studies with protein or peptide conformational changes, AMA substitutions, ligand binding, oxidative damage, and post-translational modifications which are associated with diseases.

### Conclusion

The toxicity of free iron and its potential role in the progression of neurodegenerative diseases is well known, but there is still a lack of essential physicochemical information on substances that may interact with iron, such as amino acids and neurotransmitters.

The study of the electrochemical properties of the Fe (III) / Fe (II) redox pair could not be carried out using electrochemical methods at pH > 4, because above this value Fe (III) / Fe (II) becomes insoluble.

### Acknowledgments

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

### References

1. Enache T.A., Oliveira-Brett A.M.: *Bioelectrochemistry* 114, 13 (2017).
2. Masek A., Chrzescijanska E., Zaborski M.: *J. Electrochem. Sci.* 9, 7904 (2014).
3. Herzog G., Arrigan D.W.M.: *The Analyst* 132, 613 (2007).
4. Dourado A.H.B., Pastrian F.C., De Torresi S.I.C.: *Anais Acad. Brasil. Ciênc.* 90 (Suppl. 1), 607 (2018).
5. Brabec V., Mornstein V.: *Biophys. Chemistry* 12, 159 (1980).
6. Deo, R.P., Lawrence, N.S., Wang J.: *The Analyst* 129 (11), 1076 (2004).
7. Luque G.L., Ferreyra N.F., Rivas G.A.: *Talanta* 71, 1282 (2007).
8. Dong S., Zhang S., Chi L., He P., Wang Q., Fang Y.: *Anal. Biochemistry* 381, 199 (2008).
9. Kotani A., Kitamura K., Kusu F., Yamamoto K., Hakamata H.: *Electroanalysis* 30, 2988 (2018).
10. Suprun E.V., Karpova V.V., Radko S.P., Karyakin A. A.: *Electrochimica Acta* 331 (2020).

## Voltammetric Determination of Ranitidine Based on Derivatization Reaction at Glassy Carbon Paste Electrode Modified with SDBS

Egzontina Shabani<sup>a</sup>, Vullnet Veseli<sup>a,b</sup>, Zuzana Bilková<sup>a</sup>, and Liridon Berisha<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic.

E-mail: [egzontinashabani.@student.upce.cz](mailto:egzontinashabani@student.upce.cz)

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Prishtina, Str. Mother Teresa, 10000 Prishtina, Kosovo

### Abstract

Ranitidine is a potent H<sub>2</sub>-receptor antagonist commonly used in treating duodenal and gastric ulceration, gastroesophageal reflux disease, Zollinger-Ellison syndrome, and other diseases involving high gastric acid secretion, and due to the importance of ranitidine, several analytical methods have been reported for its determination. A new electroanalytical method has been developed for the determination of ranitidine in pharmaceutical products. This method is based on the reduction of 2-methylfuran cation-product of the reaction of ranitidine with sodium nitrite in 0.05 M Britton-Robinson buffer pH 2, whose sensitivity is based on the use of sodium dodecylbenzenesulfonate (SDBS) as a surface modifier at glassy carbon paste electrodes using differential pulse voltammetry. At lower concentrations, sodium dodecylbenzenesulfonate formed a negatively charged monolayer on the glassy carbon electrode surface because of hydrophobic interactions of the hydrophobic chain of the surfactant and silicon oil of GCPE. The optimum voltammetric response was obtained when dropping ten  $\mu\text{L}$  of SDBS 2 mM on GCPE's surface. The developed method is characterized by a wide linear range from 0.3 to 254  $\mu\text{M}$ , with a detection limit of 18.6 nM. The built platform is used to determine ranitidine in pharmaceutical formulations with acceptable recovery, thus demonstrating the practical application of this method in fundamental analysis.

**Keywords:** Ranitidine; Glassy Carbon Electrode, Surfactants, Voltammetric determination.

### Introduction

Ranitidine, known as one of the histamine H<sub>2</sub> receptor antagonists, is widely used to treat gastric ulcers, duodenal ulcers, gastroesophageal reflux disease, and gastric acidity, accompanied by various effects of Zollinger-Ellison syndrome. However, ranitidine overdose can cause severe hepatotoxicity as well as hepatitis<sup>1,2</sup>. The need to quantify ranitidine was felt based on these effects mentioned above, both positive and negative. Nowadays, numerous methods for determining ranitidine are known, including high-performance liquid chromatography<sup>3</sup>, fluorometry<sup>4</sup>, titrimetry<sup>5</sup>, etc.

Since the determinations with most of the methods mentioned earlier and others require quite costly equipment and a long time of analysis, special attention has been paid to the determination of these substances by electroanalytical methods, as fast, high sensitivity, and low cost. In this study, the use of electrodes of various forms of carbon is successful in the determination of ranitidine, the modification of the electrodes has been found to be quite effective during the determinations, as well as the formation of the product between ranitidine and sodium nitrite<sup>6</sup>. To achieve a signal with the highest intensity and determination at lower ranitidine concentrations, it was used the electrode constructed with glassy carbon paste and modified on the surface with sodium dodecylbenzenesulfant surfactant. The developed electrode showed good sensitivity, low limit of detection, and high linearity toward the ranitidine + sodium nitrite product.

## Experimental

Ranitidine hydrochloride, sodium nitrite, boric acid, glacial acetic acid, 85% phosphoric acid, disodium hydrogen phosphate, sodium dihydrogen phosphate, sodium dodecyl sulfate (SDS), and dodecylbenzene sulfonate (SDBS) were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Britton-Robinson buffer (BRB) solution of concentration 0.1 mol/L was prepared by mixing phosphoric acid, glacial acetic acid, and boric acid. The desired pH was adjusted by adding 0.2 mol/L sodium hydroxide. The aqueous solutions were prepared with deionized water (18.3 M $\Omega$  cm) obtained from Merck Millipore Milli-Q™ reference ultrapure water purification system (Burlington, USA).

Glassy carbon powder of carbon particle size 10–20  $\mu$ m, from HTW Hochttemperatur-Werkstoffe GmbH (Thierhaupten, Germany) and silicon oil MV 8000 from Lučební závody a.s. (Kolin, Czech Republic) were used to prepare the GCP.

### *Preparation of electrodes*

A **glassy carbon paste electrode (GCPE)** is prepared by packing a glassy carbon paste in a Teflon tube, pre-prepared with a mixture of glassy carbon (size 20-20  $\mu$ m) silicone oil in proportion 85% / 15%. This mixture was homogenized by mixing lightly for 30 minutes and after letting it stay for 24 hours, the paste was ready for use.

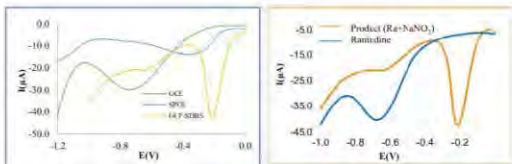
**GCPE modified with SDBS (GCP + SDBS)** - modification of the glassy carbon paste electrode with SDBS as surfactant is achieved by dripping on the working electrode's surface 10  $\mu$ L of SDBS solution with a concentration of 2 mM.

### *Instrumentation*

Voltammetric measurements were carried out utilizing potentiostat/galvanostat from PalmSens BV (Houten, The Netherlands) connected to a personal computer and controlled by corresponding software PStTrace 5.2. The electrochemical setup was composed of a conventional electrochemical glass cell with GCPE or GCPE+SDBS(working), Ag/AgCl with a 3 mol/L salt bridge (reference), and a platinum wire (counter) electrode. The pH of prepared BRBs was controlled with a pH meter (model 781) from Metrohm (Herisau, Switzerland).

## Results and Discussion

Aiming to develop a suitable sensor for the determination of ranitidine, we have tested the possibility of using several types of carbon-based materials. Thus, we tested the screen-printed carbon electrode, the glassy carbon electrode, and the glassy carbon paste electrode, unmodified and modified with SDBS, for their electrochemical response to the analyte. Based on the results obtained, it is reasonable that the GCPE should continue to be used as the working electrode and SDBS as its surface modifier when determining ranitidine. It has also experimented with the determination of pure ranitidine and the colored product ranitidine + sodium nitrite. Also, due to the higher intensity and smaller peak width, it was decided to work with the product ranitidine + sodium nitrite.

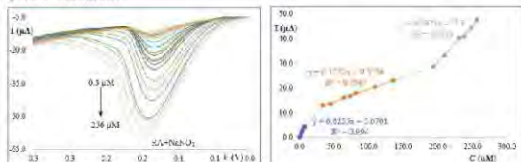


**Fig. 1.** a) Differential pulse voltammograms with electrodes GCE, SPCE, and GCPE-SDBS for the product ranitidine + sodium nitrite in buffer BR 0.05M pH 3, scan rate 50mV/s b) Voltammograms obtained by scanning pure ranitidine and product ranitidine + sodium nitrite, with concentration on 1431.28μM, buffer BR 0.05M pH 3, scan rate 50mV/s.

The parameters optimized when using the GCPE modified on the surface with SDBS to determine ranitidine utilizing differential pulse voltammetry include optimal working parameters: pH 2, surfactant concentration on 2mM, and equilibrium time 100 seconds.

#### Analytical performance of the developed voltammetric method

After optimizing the parameters mentioned above, we created the working conditions to determine ranitidine.



**Fig. 2.** a) Voltammogram obtained during differential pulse voltammetry of the product (ranitidine + sodium nitrite), starting from very small to high concentrations, in buffer BR 0.05M pH 2, scan rate 50mV/s b) Calibration curves of the dependence of signal intensity on the product (ranitidine + sodium nitrite) concentration.

In the obtained results, it is noticed a very wide dynamic order, while regarding the linearity of the dependence of the concentration on the signal intensity, three levels of concentration are observed in which this dependence has shown linearity. These three levels show different sensitivities, where maximum sensitivity is observed at low ranitidine concentrations (0.30-7.320 μM). The graph shown in Fig. 2b shows the calibration curves for the linearity of the signal to concentration for the three orders of concentration, from which it is observed that they have shown quite high correlation coefficients.

Using this electrode enabled the determination of ranitidine in tablets with a recovery of 103.3%, and the method has good sensitivity with a detection limit of 18.6 nM and linearity up to 254 μM.



## Conclusions

This research shows that the surfactant used for the electrode modification significantly improves the electrode performance in determining ranitidine in interaction with sodium nitrite. The electrode modification process is simple and the electrode thus developed has high sensitivity and reproducibility of results. The modified electrode shows better sensitivity than the unmodified one based on the increase in base current. Using this electrode enabled the determination of ranitidine in tablets, and the method has good sensitivity with a detection limit of 18.6 nM and linearity up to 254  $\mu$ M. Based on the results obtained for the recovery test, it is seen that the value of the relative standard deviation enables its quantitative determination and the application of the method in the determination of ranitidine in real samples.

## Acknowledgment

This work was supported by the project of the Faculty of Chemical Technology University of Pardubice (project No. SGS-2022-004) and OP RDE project, "Strengthening interdisciplinary cooperation in research of nanomaterials and their effects on living organisms" (reg. n.02.1.01/0.0/0.0/17\_048/0007421).

## References

1. Talay Pinar P., Yardım Y., Entürk Z. S.: *Sensor. Actuator. B Chem.* 273, 1463 (2018).
2. Toh S.Y., Loh K.S., Kamarudin S.K., Daud W.R.W.: *Chem. Eng. J.* 251, 422 (2014).
3. Ulu S.T, Tuncel. M.: *J. Chromtogr. Sci.* 50, 301 (2012).
4. Basavaiah K., Nagegowda P.: *Farmaco* 59, 147 (2004).
5. Darwish I.A., Hussein S.A., Mahmoud A.M., Hassan A.I.: *Spectrochim. Acta, Part A*: 69, 33 (2007).
6. Berisha L., Maloku A., Haliti M., Jashari G., Ukmata A., Sÿs M.: *Microchem. J.* 159, 105403 (2020).

## Host-Guest Interaction onto Electrode Surface between Urea based Receptor and Neuroblastoma Metabolites

Tatiana V. Shishkanova<sup>a</sup>, Jakub Marián Páleš<sup>b</sup>, Karolína Salvadori<sup>a,b</sup>, Radek Fajgar<sup>b</sup>, Pavel Matějka<sup>a</sup>, and Petra Cufinová<sup>b</sup>

<sup>a</sup> University of Chemistry and Technology Prague, Technická 5, 16628 Prague 6, Czech Republic, E-mail: tatiana.shishkanova@vscht.cz

<sup>b</sup> Institute of Chemical Process Fundamentals of the Czech Academy of Sciences, Rozvojová 135, Prague 6, 165 02 Czech Republic

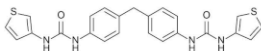
### Abstract

Vanillylmandelic acid (VMA) and homovanillic acid (HVA) are markers of childhood diseases such as neuroblastoma. In order to increase the electrochemical selectivity to these metabolites, the urea receptor was deposited onto the electrode surface through a polymerizable thiophene unit. The modified electrode surface was characterized using infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, and electrochemical impedance spectroscopy. Spectroscopic studies of the modified electrode surface confirmed the formation of the polymeric films derived from the urea-based receptor and its attachment through thiophene. Impedimetric detection of the metabolite of interest showed the medicinal significance and applicability of the proposed modified electrode.

**Keywords:** Neuroblastoma metabolite, Urea-based receptor, Electrochemical Impedance Spectroscopy.

### Introduction

Supramolecular receptors and their application in sensor analysis are able to help in the monitoring of biologically important analytes<sup>1</sup>. With the help of selective sensor devices, markers of cancer, and infectious and cardiovascular diseases can be diagnosed early and treatment can be initiated in time. Metabolites of catecholamine are analytes that signal severe child disease known as neuroblastoma. Abnormally high levels of these metabolites in biological urine samples may be the primary signal of the disease onset.



**Fig. 1.** Chemical structure of urea-derivative used for electrochemical modification of electrode surfaces.

An effective hydrogen bond donor for carboxylate recognition is a urea group, offering highly directional and very predictable mode of anion binding. Although urea-based receptor molecules vary considerably depending on the attempted application, some features can be found that are characteristic for this group of compounds. For example, while complexed by ureido receptors, the oxo-anions are discriminated on the base of the negative charge concentration on the oxygen atoms involved in hydrogen bonding<sup>2</sup>. It can be assumed, that the designed urea-based receptor is extraordinarily suitable for complexation of carboxylates (Fig. 1). Moreover, it can be designed to be complementary to the target substrate enabling its recognition among similar substrates. In addition, there is a possibility of receptor efficiency/selectivity tuning via easily accessible derivatization.

This work deals with the electrochemical study of the interaction between urea-based receptor electrochemically deposited on the platinum electrode surface and mandelic acid derivatives, namely homovanillic acid (HVK) and vanillic acid (VMK), as catecholamine metabolites.

### Experimental part

Urea-based receptor was synthesized according to the procedure<sup>3</sup> starting from 3-aminothiophene and methylene(diphenylene) diisocyanate according to the general procedure. The final product was obtained as a grey powder, in 87% yield. Homovanillic acid (HVA, 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid) and vanillylmandelic acid (VMA, DL-4 hydroxy-3-methoxymandelic acid, 99%) were purchased from TCI (Belgium) and Sigma-Aldrich (USA), respectively. The inorganic reagents and solvents used were of analytical grade and did not need further purification unless otherwise specified (Lachema, Czech Republic). Double distilled water was used throughout the experiment. Unless otherwise stated, a 0.1 mol.L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 7.2) was used for all the electrochemical measurements.

All electrochemical experiments were performed with a PGSTAT-12 potentiostat/galvanostat supplied with FRA 2 modules for impedance measurements (Eco-Chemie, The Netherlands). The electrochemical measurements were carried out with a three-electrode system, which has platinum plate as the counter electrode, Ag/AgCl (3 mol.L<sup>-1</sup> KCl) as the reference electrode and platinum disc electrodes as the working electrodes.

The electrochemical oxidation and deposition of receptor to the surface of working electrodes was carried out using cyclic voltammetry technique. The bare working electrode was immersed in 2mM receptor dissolved in mixture (ACN/DMSO + 0.05 mol.L<sup>-1</sup> TBA BF<sub>4</sub>) and potential scanned in range from -0.2 up to + 1.9 V at a scan rate of 50 mV s<sup>-1</sup>, 5 cycles. The electrochemical impedance spectroscopy (EIS) experiments were carried out under potential of 0 V, amplitude of 10 mV, and in the frequency range of 100 kHz to 100 mHz (50 points). The EIS signal of the modified Pt disc electrodes was recorded in 5mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] : K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (1:1) with the addition of 0.05 mol.L<sup>-1</sup> KCl. The experimental Nyquist plots were fitted in the Nova1.11 Autolab software. To eliminate electrode-to-electrode variation in the background signal at evaluation of electrode sensitivity, the following equation was used:

$$EIS\ signal = ((R_n - R_0) / R_0) \times 1000 \quad (\text{equation 1}),$$

where  $R_0$  and  $R_n$  are the resistances to charge transfer ( $R_{ct}$ ) of the tested Pt-electrodes recorded in the supporting electrolyte before and after adding of different concentrations of the tested analytes, respectively. The concentration of the tested analytes was quantified based on the value of  $R_{ct}$ . Additionally, the surface of the urea-modified electrodes was characterized using infrared spectroscopic (IR) and scanning electron microscopy (SEM) techniques.

### Results and Discussion

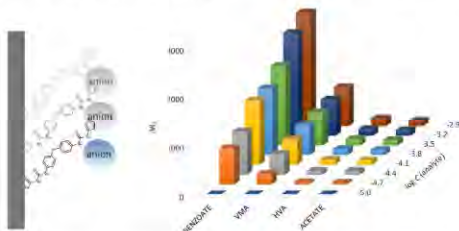
Application of the receptor for analyte in question recognition require its immobilization on an electrode surface. An immobilization of a receptor may affect its binding properties. Therefore it was primarily important to verify receptor-analyte binding on electrode surface and to compare with data obtained in bulk phases. The electrochemical deposition of urea-derivative was carried out using cyclic voltammetry on surface of both, graphite (**C/Receptor**) and platinum (**Pt/Receptor**) electrodes. As can be seen from Table I, a correspondence of affinity measured in the bulk phase and phase boundary was observed. For the electrochemical measurements, the urea-modified Pt electrode was chosen due to its relatively highest affinity to carboxylates.

**Table I**

Affinity of receptor to the tested analytes obtained in bulk phase and on the modified electrode surface.

Analyte	Receptor		C/Receptor	Pt/Receptor
	UV-Vis <sup>(a)</sup> /NMR	UV-Vis <sup>(a)</sup> /NMR	EIS	EIS
	$K_{dis} 1:1$	$\beta_{dis} 1:2$		
Acetate	$1.97 \cdot 10^3$ <sup>a1</sup>	$9.65 \cdot 10^3$ <sup>a1</sup>	$4.66 \cdot 10^5$	$5.17 \cdot 10^5$
Benzoate	$1.01 \cdot 10^3$	$2.53 \cdot 10^3$	$8.89 \cdot 10^4$	$3.60 \cdot 10^5$
VMA	$4.20 \cdot 10^2$	$4.41 \cdot 10^1$	$4.91 \cdot 10^1$	$1.35 \cdot 10^3$
HVA	$1.72 \cdot 10^3$	$7.40 \cdot 10^3$	$1.78 \cdot 10^5$	$2.18 \cdot 10^5$

FTIR-measurements indicated the presence of the salt added to the supporting electrolyte during electrochemical polymerization and significantly broadened bands characteristic for urea-receptor monomer. These spectroscopic findings confirmed the formation of the polymeric film based on urea-thophene derivative on the Pt-electrode surface. Moreover, SEM-micrographs revealed the highly organized polymeric structures of several micrometers.



**Fig. 2.** Comparison of sensor EIS responses to the presence of anions; experimental conditions: aqueous solutions of  $5 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ;  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (1:1),  $0.05 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KCl}$ ;  $\Delta R_{\text{e}} = (R_{\text{e}} - R_{\text{e,blank}}) / R_{\text{e}} \approx 1000$ .

The electrochemically urea-modified Pt-electrodes were tested for impedimetric detection of two metabolites, VMA and HVA. In the concentration range from  $9.9 \cdot 10^{-6}$  up to  $1.2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , the EIS-signal was highest for VMA (362) and lowest for HVA (75) (**Fig. 2**). This phenomenon could be caused by different values of association constant of the receptor towards HVA and VMA (**Table I**). Taking into account the highest sensitivity for VMA, this metabolite was determined in model and artificial urine samples (**Table II**).

**Table II.** EIS determination of VMA in model and urea samples by the standard addition method using platinum disc electrode coated with polymeric film derived from urea-based receptor (n=3).

Sample	Introduced, $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Found, $\mu\text{mol.L}^{-1}$	$S_r$
Model sample	VMA / HVA (15 / 16)	$16 \pm 4$	0.11
Artificial urine (phosphate)	120	$110 \pm 50$	0.17
Artificial urine (without phosphate)	120	$120 \pm 30$	0.09

Because of phosphates are the main interfering anions in urine, the impedimetric determination was carried out in the absence and the presence of phosphates. These results indicated that phosphates interfere ( $S_r=0.17$ ). The elimination of phosphates from the analyzed samples lead to accuracy improvement ( $S_r=0.09$ ).

### Conclusion

Receptor based on sensing urea and polymerizable thiophene units were designed and characterized both, as a monomer in solution and as polymeric film on electrode surface. The experimental findings were *i*) electrochemically deposited polymeric film consisted of the well-arranged micrometer-scaled structures formed in the polymeric film, *ii*) attachment to the electrode surface occurs through polymerizable thiophene units, *iii*) practically important level of VMA can be detected in the presence of its structural analog and artificial human urine. The found principles of molecular recognition lead to an increase in the selectivity of electrochemical sensors.

### Acknowledgments

This work was supported by the Czech Science Foundation (project No. 20-07833S) and by a specific University research grant from the Ministry of Education, Youth and Sports (UCT Prague, CZ 402850061). The authors are grateful to M. Trchová for spectroscopic measurements.

### References

1. Wang Y., Xu H., Zhang J., Li G.: *Sensors* 8, (2008).
2. Boiocchi M., Del Boca L., Esteban-Gómez D., Fabbrizzi L., Licchelli M., Monzani E.: *J. Am. Chem. Soc.* 126(50), 16507 (2004).
3. Páeš J. M., Salvadori K., Shishkanova T. V., Trchová M., Fajgar R., Matějka P., Cuřinová P.: *J. Electrochim. Acta*, (2021) *in reduction*

## Spectroelectrochemistry of 1,10-phenanthrolines Substituted by Pyrrolidine and Phenothiazine Redox-active Units

Romana Sokolova <sup>a</sup>, Jakub Wantulok <sup>b</sup>, Jan Fiedler <sup>a</sup>, Jacek Nycz <sup>b</sup>, and Ilaria Degano <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> Institute of Chemistry, University of Silesia in Katowice, Szkolna 9; PL-40007 Katowice, Poland

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

### Abstract

Compounds based on 1,10-phenanthroline (Phen) and their complexes are used in many fields, such as a stabilizing agent in the synthesis of nanoparticles, catalysts in homogeneous catalysis and as a semiconductor in organic light-emitting diodes (OLED) due to their coordination abilities. In this work, 1,10-phenanthrolines functionalized by pyrrolidine and phenothiazine units were studied by electrochemical methods. Cyclic voltammetry resulted in several oxidation and reduction voltammetric peaks. Structure-activity relationship was investigated using *in situ* spectroelectrochemistry, spectrophotometry, infrared spectroscopy and chromatography.

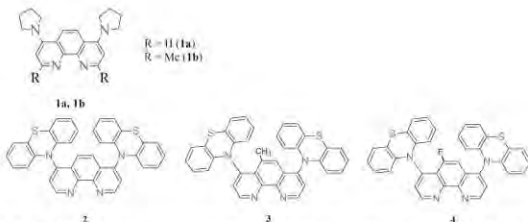
**Keywords:** 1,10-phenanthroline, Electrochemistry, Oxidation mechanism, Reduction mechanism, pyrrolidine, phenothiazine.

### Introduction

Diamino-1,10-phenanthrolines are promising compounds for a broad range of applications, mostly due to their coordination abilities. They form complexes with metal cations as Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ir<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> or Re<sup>+</sup> <sup>1-3</sup>. Derivatives of 4,7-dichloro-1,10-phenanthroline or their complexes found their application in synthesis of compounds, where built-in chlorine atoms in the 1,10-phenanthroline heterocyclic rings were substituted with various biologically active groups. In this case phenothiazine and pyrrolidine structures were selected <sup>4-6</sup>. Reduction properties of Phen are known in literature <sup>7</sup>.

Electrochemical methods are increasingly used to study oxidation and reduction mechanisms of new compounds <sup>8,9</sup>. It allows to predict the possible processes of their oxidation or reduction and to indicate further possible paths of their functionalization. Additionally, spectroelectrochemical methods and electrolysis followed by HPLC-MS/MS identification of products are efficient techniques for oxidation and reduction mechanism determination for identification of final products. UV-Vis spectroelectrochemistry is used with advantage for short living intermediates detection and for elucidation of the chemical reversibility of electrolytic process. IR spectroelectrochemistry is helpful determining the electroactive site in a molecule when recording changes of intensity of absorption bands attributed to specific functional groups <sup>4-6,9,10</sup>. Determination of redox mechanism can be performed on electrodes integrated with advantage in 3D-printed electrochemical cells <sup>11-13</sup>.

The aim of this contribution was to investigate the oxidation and reduction mechanism of 4,7-di(pyrrolidine-1-yl)-1,10-phenanthrolines substituted with hydrogen (**1a**) or methyl (**1b**) at positions 2 and 9, respectively, and 4,7-di(phenothiazine)-1,10-phenanthrolines substituted with hydrogen (**2**), methyl (**3**) or fluorine (**4**) at position 5.



**Scheme 1.** Chemical structure of 4,7-di(pyrrolidine-1-yl)-1,10-phenanthrolines (**1**), 4,7-di(phenothiazine)-1,10-phenanthroline (**2**), 5-methyl-4,7-di(phenothiazine)-1,10-phenanthroline (**3**), 5-fluoro-4,7-di(phenothiazine)-1,10-phenanthroline (**4**).

## Experimental

### Reagents

Derivatives of 4,7-di(pyrrolidine-1-yl)-1,10-phenanthroline (**1a**) and 4,7-di(pyrrolidine-1-yl)-2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline (**1b**), 4,7-di(phenothiazine)-1,10-phenanthroline (**2**), 5-methyl-4,7-di(phenothiazine)-1,10-phenanthroline (**3**), 5-fluoro-4,7-di(phenothiazine)-1,10-phenanthroline (**4**) were synthesized through procedure described in literature<sup>14,15</sup>. Acetonitrile (anhydrous, 99.8%), and 1,10-phenanthroline (**Phen**) were purchased from Sigma Aldrich, Germany. Tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF<sub>6</sub>), which was used as supporting electrolyte for electrochemical measurements in acetonitrile, was obtained from Sigma Aldrich and was dried before its use.

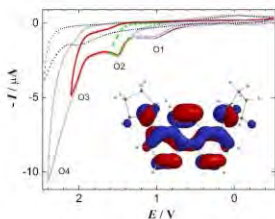
### Electrochemical setup

Electrochemical measurements were carried out in 0.1 M TBAPF<sub>6</sub> in acetonitrile. Cyclic voltammetry as well as the exhaustive electrolysis were performed using a PGSTAT 12 AUTOLAB potentiostat (Metrohm, Czech Republic). A three electrode electrochemical cell was used with an Ag/AgCl|1M LiCl reference electrode separated from the test solution by a salt bridge. The working electrode was a glassy carbon electrode with diameter 0.9 mm. The auxiliary electrode was the platinum net. Oxygen was removed from the solution by passing a stream of argon (99.998%, Messer).

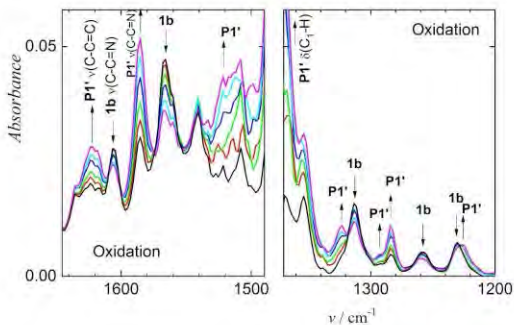
## Results and discussion

Four oxidation waves (O1 – O4) of compound **1a** were registered in the potential range from -0.5 V to 2.2 V on glassy carbon electrode (Fig. 1). Similar cyclic voltammogram was obtained for compound **1b**. The first oxidation wave occurred at 1.02 V for **1a** and at 0.93 V for **1b**.

Compound **1a** yields an irreversible reduction wave at -1.39 V. The second reduction wave is found almost 700 mV negatively at potential -2.082 V. Similarly, compound **1b** yields two irreversible reduction waves at -1.54 V and -2.21 V. In situ IR-spectroelectrochemistry of **1b** (Fig. 2) during oxidation led to the absorption spectrum related to a product hydroxylated at pyrrolidine ring<sup>5</sup>.



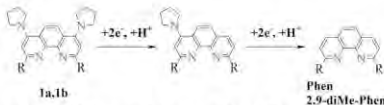
**Fig. 1.** Cyclic voltammograms of 0.63 mM **1a** in 0.1M TBAPF<sub>6</sub> in acetonitrile recorded on glassy carbon electrode. Scan rate was 0.1 V/s. The inset shows HOMO spatial distribution calculated for neutral **1a** molecule.



**Fig. 2.** IR spectroelectrochemistry of 2.9 mM compound **1b** recorded while sweeping the electrode potential through the first oxidation wave in 0.1 M TBAPF<sub>6</sub> in acetonitrile.



R= H, CH<sub>3</sub>



**Scheme 2.** Mechanism of reduction of **1a** and **1b** at the first and second reduction wave.

The symmetric molecule **2** yields in cyclic voltammetry four oxidation peaks at potentials 1.12, 1.70, 1.78 and 1.89 V. 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>16</sup>. The 1 + 1e<sup>-</sup> oxidation processes occur on two almost independent phenothiazine redox centres attached to the 1,10-phenanthroline moiety in equivalent positions 4 and 7. Cyclic voltammetry of compounds **3** and **4** gives the first oxidation wave at 1.09 and 1.05 V, respectively. The potential values are both slightly negatively shifted compared to the oxidation potential of **2**. Such shifts, being in the same direction for both **3** and **4**, cannot be ascribed to an electron withdrawing or electron donating effect of fluorine and methyl substituents on the 1,10-phenanthroline unit, respectively<sup>6</sup>. The oxidation mechanism of **3** and **4** can be better described as a stepwise formation of radical cations and dication in the contrary to **2** as reported in literature<sup>6</sup>.



**Scheme 3.** Mechanism of oxidation of **2**, leading to dication  $2^{2+}$  at the first oxidation peak and sulfoxide.

### Conclusions

Obtained electrochemical and spectroelectrochemical results lead to determination of the oxidation and reduction mechanism of 1,10-phenanthrolines substituted with pyrrolidine and phenothiazine bioactive units. Concerning oxidation of compounds **1a** and **1b**, the influence of the presence of methyl functional group is negligible. In the case of phenothiazine compounds **2**, **3** and **4**, the role of functional groups methyl and fluorine was following: compound **4** containing F in its chemical structure at position 5 was oxidized at the lowest potential, the order of compounds in the direction to the most difficult oxidation was **2** < **3** < **4**. It means, that compound **4** is due to the presence of fluorine substituent more stable against oxidation than compound **2**.

The reduction of **1a** and **1b** was influenced by the presence of methyl group in molecule **1b** more significantly, reduction of **1b** proceeded at lower potential than for **1a**. The reduction potentials of all compounds **2** - **4** were found experimentally similar to each other.

UV-Vis and IR spectroelectrochemistry and exhaustive electrolysis accompanied with the analytical chromatographic techniques contributed to the determination of final oxidation and reduction mechanisms.

## Acknowledgments

This work has been supported by the Czech Science (RVO 61388955).

## References

1. Zhanga H.-G., Taoa X.-T., Chenb K.-S., Yuana C.-X., Jianga M.-H.: *Synthetic Met.* 161, 354 (2011).
2. Tong L., Duan L., Xu Y., Privalov T., Sun L.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 445 (2011).
3. Swietlicka A., Klemens T., Machura B., Schab-Balcerzak E., Laba K., Lapkowski M., Grucela M., Nycz J., Szala M., Kania M., *RSC Adv.* 6, 112908 (2016).
4. Wantulok J., Degano I., Gal M., Nycz J. E., Sokolova R.: *J. Electroanal. Chem.* 859, 113888, 1-10 (2020).
5. Wantulok J., Sokolova R., Degano I., Kolivoska V., Nycz J. E.: *Electrochim. Acta* 370, 137674 (2021).
6. Wantulok J., Sokolova R., Degano I., Kolivoska V., Nycz J. E., Fiedler J.: *ChemElectroChem.* 8, 2935 (2021).
7. Gayathri P., Senthil Kumar A., *Langmuir* 30, 10513 (2014).
8. Sokolova R., Nycz J. E., Ramesova S., Fiedler J., Degano I., Szala M., Kolivoska V., Gal, M.: *J. Phys. Chem. B* 119, 6074 (2015).
9. Ramesová S., Degano I., Sokolova R.: *J. Electroanal. Chem.* 788, 125-130 (2017).
10. Sokolova, R., Ramesova, S., Degano, I., Hromadova, M., Szala, M., Wantulok, J., Nycz, J. E., Valasek, M.: *Electrochim. Acta* 270, 509 (2018).
11. Vaneckova E., Bousa M., Shestivska V., Kubista J., Moreno-Garcia P., Broekmann P., Rahaman M., Zlamal M., Heyda J., Bernauer M., Sebechlebska T., Kolivoska V.: *ChemElectroChem* 8, 2137 (2021).
12. Poltorak L., Rudnicki K., Kolivoska V., Sebechlebska T., Krzyczmonik P., Skrzypek S.: *J. Hazard. Mater.* 402, 123411 (2021).
13. Vivaldi F., Sebechlebska T., Vaneckova E., Biagini D., Bonini A., Kolivoska V.: *Anal. Chim. Acta* 1203, 339600 (2022).
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. Bard A. J., Faulkner L. F., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications - 2nd ed.*, John Wiley & Sons, New York, 2001.

**Novel Screen-printed Sensors with Chemically Deposited Boron-doped Diamond Electrode Modified with Gold Nanoparticles for Point-of-care Testing**  
**(Nové tištěné senzory s chemicky deponovanou borem dopovanou diamantovou elektrodou modifikovanou zlatými nanočásticemi pro point-of-care-testování)**

Renáta Šelešovská <sup>a</sup>, Oleksandr Matvieiev <sup>a</sup>, Kateřina Petříková <sup>a</sup>, Marian Vojs <sup>b</sup>, Marián Marton <sup>b</sup>, Martin Vrška <sup>b</sup>, Lenka Janíková <sup>a</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: renata.selesovska@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 aim of this work was the investigation of electrochemical properties of new screen-printed sensors (SPE) with the chemically deposited boron-doped diamond working electrode (BDDE) modified with gold nanoparticles (AuNPs). Using  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  and dopamine redox probes, these sensors were tested in comparison with bulk un-modified BDDE in a standard arrangement of three-electrode cell and un-modified SP/BDDE. At the same time, the novel sensors were applied for the determination of dopamine and other substances significant from the point of view of the environment and human health.

**Keywords:** Screen-printed sensors, Boron-doped diamond electrode, Gold nanoparticles, Electrochemical characterization, Electroanalysis.

### Úvod

Jedním z hlavních trendů ve výzkumu v oblasti elektroanalytické chemie je vývoj nových elektrodoových materiálů, jejich úprava a modifikace nebo vývoj celých senzorů a inovativních uspořádání elektrochemických cel. Cílem je zvýšení citlivosti a zejména selektivity stanovení biologicky aktivních látek významných jak z hlediska ochrany životního prostředí, tak z hlediska zdraví člověka. Velkou výhodou elektroanalytických metod je možnost miniaturizace a využití v přenosných analyzátoch, což směřuje k vývoji tzv. point-of-care (POC)<sup>1,2</sup> nástrojů umožňujících analýzy „v místě péče“ například přímo v ordinacích lékařů při terapeutickém monitorování hladiny léčiv a jejich metabolitů v krvi/moči pacientů. Obecně tento pojem zahrnuje možnost analýzy v místě odběru vzorku bez nutnosti transportu do laboratorní (konkrétně v oblasti medicíny, toxikologie, ochrany životního prostředí aj.). V takovém případě jde o vývoj jednoduchých senzorů a jednoduchých metod, které nevyžadují obsluhu kvalifikovaným analytickým chemikem.

Tištěné senzory (SPE) představují jednoduché řešení miniaturizace elektrochemické analýzy. Výhodou SPE je zejména možnost levné výroby velkého počtu senzorů libovolných tvarů a parametrů jednotlivých elektrod, což umožňuje jejich využití jako jednorázových senzorů. Dále je možné provádět analýzy ve velmi malých objemech vzorku (50-100  $\mu\text{l}$ ). Podmínkou pro jednorázové senzory je velmi dobrá opakovatelnost jejich přípravy<sup>3-5</sup>. Rozhodující vzhledem k vlastnostem SPE je volba vhodné pracovní elektrody. Kombinace zmíněných výhod tištěných senzorů s výjimečnými elektrochemickými vlastnostmi borem dopované diamantové elektrody (BDDE)<sup>6-8</sup> představuje perspektivní nástroj pro POC testování<sup>9,10</sup>. Další možnosti, jak zvýšit citlivost nebo selektivitu elektrochemických metod je modifikace povrchu běžně používaných pracovních elektrod<sup>11</sup>, např. nanočásticemi kovů a jejich oxidů, uhlikovými nanomateriály,

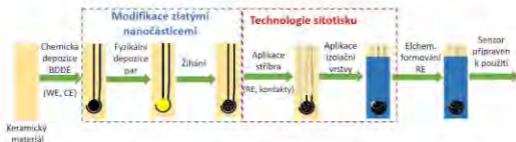
organickými molekulami nebo polymery, či biomolekulami jako jsou různé enzymy nebo DNA. Přehled možných postupů modifikace, nejčastěji používaných modifikátorů a následných aplikací modifikovaných BDDE v elektroanalýze představuje Matvejev a kol.<sup>12</sup>

Předmětem této práce je studium elektrochemických vlastností a možnosti aplikace nového laboratorně připraveného tlustého senzoru s pracovní elektrodou z BDD modifikovanou zlatými nanočásticemi (AuNPs).

### Experimentální část

Brittonův-Robinsonův pufr (BRB, pH 2-12) byl připravován mícháním kyselá a alkalické složky pod pH-metrem. Kyselou složku tvořil 0,04M roztok  $H_3PO_4$ ,  $H_2BO_3$  a  $CH_3COOH$ . Alkalickou složkou byl 0,2M NaOH. Roztok KCl (Penta-Švec, Praha) byl připraven rozpustěním navážky v destilované vodě a roztoky  $K_4[Fe(CN)_6]$  a  $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$  (oba Sigma-Aldrich) byly připraveny rozpustěním vhodné navážky v roztoku KCl.  $1 \times 10^{-3}M$  roztok dopaminu (Sigma-Aldrich) byl připraven rozpustěním příslušné navážky v destilované vodě. Roztoky s nižší koncentrací byly připravovány ředěním základním elektrolytem.

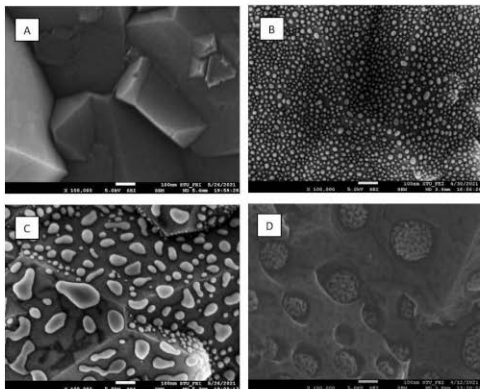
Pro voltametrická měření byl používán Autolab PGSTAT204 (Metrohm Autolab, Netherlands) vybavený software Nova 2.1. Ve standardním trielektrodeovém uspořádání elektrochemické články byla jako pracovní elektroda (WE) použita BDDE (BioLogic, aktivní plocha  $7,07 \text{ mm}^2$ , B/C během depozice 1000 ppm), referentní (RE) byla nasycená argenchloridová elektroda ( $Ag/AgCl/KCl(\text{sat.})$ ) a pomocnou elektrodu (CE) tvořil platinový drátek (obě Monokrystaly, ČR). Dále byly použity laboratorně připravené tlusté senzory SP/BDDE (aktivní plocha  $7,07 \text{ mm}^2$ , vnitřní průměr 3 mm, B/C 312 500 ppm) tvořené WE a CE z BDD a  $Ag/AgCl$  quazi-referentní elektrodou. Postup přípravy tohoto senzoru byl popsán v literatuře<sup>10</sup>. Poprvé byly testovány také SP/BDDE modifikované zlatými nanočásticemi (nAu-SP/BDDE) o různé velikosti ( $n = 5, 15$  a  $50 \text{ nm}$ ) a porézními nanočásticemi zlata (pAu-SP/BDDE), kdy modifikace byla realizována fyzikální depozicí Au s následným žháním. Postup přípravy senzoru je uveden na Obr. 1. Pro porovnání byly používány i SP/BDDE modifikované zlatými nanočásticemi elektrochemickou depozicí AuNPs z roztoku  $H[AuCl_4] \cdot 4H_2O$  o koncentraci 1 mM v 0,5M  $H_2SO_4$ , kdy byly na začátku používány 2 časy depozice 50 a 100 s při potenciálu  $-200 \text{ mV}$ . Tyto podmínky byly převzaty z literatury<sup>13-16</sup>.



**Obr. 1.** Schéma výroby SP/BDDE modifikovaných zlatými nanočásticemi; WE – pracovní elektroda, CE – pomocná elektroda, RE – referentní elektroda

## Výsledky a diskuse

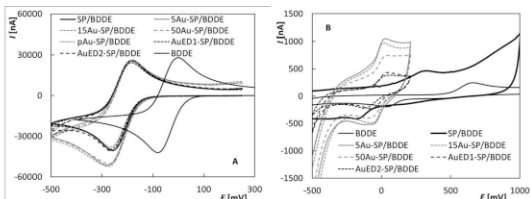
Na obrázku 2 jsou uvedeny příklady snímků ze skenovací elektronové mikroskopie (SEM) zachycující povrch nemodifikované pracovní elektrody SP/BDDE (A) a vybraných modifikovaných elektrod po fyzikální deposici AuNPs (B-D). Z obrázků je zřejmé, že u všech použitých typů Au-SP/BDDE bylo pokrytí nanočásticemi rovnoměrné po celé ploše elektrody. Totéž lze říci o elektrodách, jejichž modifikace probíhala elektrochemickou deposicí zlata z roztoku (výsledky nejsou uvedeny).



**Obr. 2.** SEM záznamy povrchu nemodifikované SP/BDDE (A), SP/BDDE modifikované fyzikální deposicí nanočásticemi o velikosti 5 nm (5Au-SP/BDDE, B), 15 nm (15Au-SP/BDDE, C) a porézními AuNPs (pAu-SP/BDDE, D).

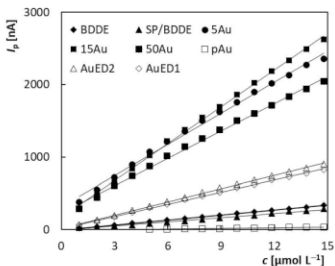
Elektrochemické vlastnosti testovaných senzorů byly studovány pomocí cyklické voltametrie (CV) redoxních systémů  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  a dopaminu (DA). Na obrázku 3 jsou uvedeny získané voltametrické křivky pro obě látky zaznamenané na klasické BDDE, SP/BDDE i všech typech testovaných Au-SP/BDDE. Z obrázků je zřejmé, že při práci s SPE senzory došlo k posunu potenciálů naměřených píků směrem k méně pozitivním hodnotám oproti klasickému uspořádání. Bylo experimentálně potvrzeno, že tento posun je způsoben použitím tzv. quazi-referenční elektrody. V případě outer-sphere redoxního markeru  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  byly získány velice podobné voltamogramy (Obr. 3A) svědčící o dobré reversibilitě systému (tj. poměr proudu ( $I_p$ ) anodického a katodického píku se blíží 1 a rozdíl potenciálů anodického a katodického píku ( $\Delta E_p$ ) se blíží teoretické hodnotě 59 mV) pro všechny testované senzory. Rovněž vypočtené hodnoty zdánlivé rychlostní konstanty ( $k^0_{app}$ ) byly velice podobné ( $2,31 \times 10^{-3}$ – $2,56 \times 10^{-3}$   $\text{cm s}^{-1}$ ). Všechny testované elektrody vykazují dobré elektrochemické vlastnosti a poskytují dobře opakovatelné reversibilní signály pro Ru komplex. V případě dopaminu byly zaznamenány velké rozdíly mezi jednotlivými typy senzorů. Z obrázku 3B je

zřejmě, že  $\Delta E_p$  se po modifikaci AuNPs výrazně snížil a nejmenší (60-90 mV) byl pro Au-SP/BDDE modifikované fyzikální depozicí během výroby senzoru. S využitím pAu-SP/BDDE nebyl za daných podmínek zaznamenán žádný odpovídající signál dopaminu.



**Obr. 3.** Cyklické voltamogramy 2,5mM  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$  v 0,1M KCl (A) a 10 $\mu\text{M}$  dopaminu v BRB (pH 5,5) (B) zaznamenané na všech testovaných senzorech ( $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ ).

Dopamin byl rovněž použit jako jeden z modelových analytů pro ověření aplikačních možností modifikovaných senzorů. Pomocí BDDE v klasickém uspořádání byla optimalizována metoda stanovení dopaminu s využitím square wave voltmetrie (SWV) v prostředí BRB o pH 5,5. Na obrázku 4 jsou uvedeny koncentrační závislosti získané pro jednotlivé senzory v rozsahu 1-15  $\mu\text{M}$ . Je zřejmé, že nejvyšší hodnota směrnice byla získána pro 15Au-SP/BDDE (169,7) a velice blízká byla i pro ostatní senzory z dané skupiny. Tato hodnota byla téměř 8 $\times$  vyšší než pro nemodifikované BDDE a SP/BDDE. Směrnice pro AuED-SP/BDDE byly přibližně 3 $\times$  vyšší. Nejhorší výsledky byly za daných podmínek zaznamenány pro pAu-SP/BDDE, kde dopamin poskytoval velice malé proudové odezvy.



**Obr. 4.** Závislosti výšky piku na koncentraci dopaminu získané pro všechny testované senzory (SWV, elektrolyt – BRB (pH 5,5),  $c_{\text{DA}} = 1,0 \times 10^{-6}$ - $1,5 \times 10^{-5}$  M).

## Závěr

V rámci této práce byly studovány elektrochemické vlastnosti a aplikační možnosti nově připraveného tištěného senzoru s chemicky deponovanou BDDE modifikovanou zlatými nanočásticemi. Bylo zjištěno, že s výjimkou p-Au-SP/BDDE vykazují všechny typy testovaných senzorů lepší elektrochemické vlastnosti než nemodifikované elektrody. V další fázi bude pozornost zaměřena na konkrétní využití modifikovaných BDDE při analýze biologicky aktivních látek a látek významných z hlediska ochrany životního prostředí. Předmětem zkoumání bude rovněž senzor modifikovaný porézními nanočásticemi Au a možnosti zlepšení získaných výsledků.

## Acknowledgments

Tato práce byla vypracována za finanční podpory Grantové agentury ČR (projekt č. 20-01589S), Univerzity Pardubice (projekt č. SGSFChT\_2022\_001) a Operačního programu Integrovaná infrastruktura pro projekt: Strategický výzkum v oblasti SMART monitoringu, léčby a preventivní ochrany před koronavirem (SARS-CoV-2), Kód ITMS2014+: NFP313011ASS8, spolufinancovaný ze zdrojů Evropského fondu regionálního rozvoje.“

## References

1. Crapnell R.D., Dempsey N.C., Sigley E., Tridente A., Banks C. E.: *Microchim. Acta* **189**, 142 (2022).
2. Surucu O., Ozturk E., Kuralay F.: *Electroanalysis* **34**, 148 (2021).
3. Taleat Z., Khoshroo A., Mazloum-Ardakani M.: *Microchim. Acta* **181**, 865 (2014).
4. Li M., Li Y.T., Li D.W., Long Y.T.: *Anal. Chim. Acta* **734**, 31 (2012).
5. Niu X.H., Lan M.B., Zhao H.L., Chen C., Li Y.X., Zhu X.: *Analytical letters* **46**, 2479 (2013).
6. Patel K., Hashimoto K., Fujishima A.: *Denki Kagaku* **60**, 659 (1992).
7. Schwarzova-Peckova K., Vosahlova J., Barek J., Sloufova I., Pavlova E., Petrak V., Zavazalova J.: *Electrochim. Acta* **243**, 170 (2017).
8. Selesovska R., Krankova B., Stepankova M., Martinkova P., Janikova L., Chylkova J., Vojs M.: *J. Electroanal. Chem.* **821**, 2 (2018).
9. Šešesovská R., Navrátil T., Hrdlička V., Michniak P., Hatala M., Vojs M., Marton M., Matvieiev O., Janiková L., Chýlková J.: *Electrochim. Acta* **403**, 139642 (2022).
10. Matvieiev O., Šešesovská R., Vojs M., Marton M., Michniak P., Hrdlička V., Hatala M., Janiková L., Chýlková J., Skopalová J., Cankař P., Navrátil T.: *Biosensors* **12**, 241 (2022).
11. Tanner E.E.L., Compton R.G.: *Electroanalysis* **30**, 1336 (2018).
12. Matvieiev O., Šešesovská R., Janiková L.: *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A* **27**, 73 (2021).
13. Pungjunun K., Chaiyo S., Jantrahong I., Nantaphol S., Siangproh W., Chailapakul O.: *Microchim Acta* **185**, 324 (2018).
14. Wahyuni W.T., Ivandini T.A., Jiwanti P.K., Saepudin E., Gunlazuardi J., Einaga Y.: *Electrochemistry* **83**, 357 (2015).
15. Bottari F., de Wael K.: *J. Electroanal. Chem.* **801**, 521 (2017).
16. Szemerits S., Boukherroub R.: *C. R. Chim.* **11**, 1004 (2008).

**(Spectro) Electrochemical Study of Cibalackrot Derivatives – Potential Chromophores for Singlet Fission**  
**((Spektr) Elektrochemická studie derivátů cibalackrotu – potenciální chromofory pro singletové štěpení)**

Ludmila Šimková<sup>a</sup>, Karol Lušpai<sup>a,b</sup>, Jiří Klíma<sup>a</sup>, and Jiří Ludvík<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> Institute of Physical Chemistry and Chemical Physics, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, SK-812 37 Bratislava, Slovak Republic

**Abstract**

Recently, substantial attention has been paid to the search for suitable chromophores for singlet fission. This photophysical effect promises to increase the maximum of theoretical efficiency of solar cells. One type of candidates are derivatives of cibalackrot. Redox properties are critical for their use. Our electrochemical work is focused on the study of oxidation and reduction of a series of substituted cibalackrot derivatives using classic voltammetric techniques and their combination with *in situ* UV-vis and EPR spectroscopy. The results show the reversible formation of the radical anion (cation) in the first reduction (oxidation) step enabling determination of "electrochemical" HOMO-LUMO gap.

**Keywords:** Cibalackrot, Singlet fission, Reduction, Oxidation, UV-vis, EPR, Spectroelectrochemistry.

**Úvod**

V posledních letech je věnována velká pozornost zvýšení účinnosti solárních článků. Jednou z uvažovaných možností je využití fotofyzikálního procesu označovaného jako singlet fission (SF), neboli štěpení singletu<sup>1</sup>. Jedná se o děj, v jehož průběhu jedna molekula v excitovaném singletovém stavu předá polovinu své energie druhé, sousední molekule v základním stavu za vzniku dvou tripletově excitovaných molekul<sup>2</sup>. Takto se po separaci nábojů mohou generovat z jednoho fotonu dva elektrony, což představuje nadějný směr pro zvýšení účinnosti solárních článků. Tento efekt je laboratorně prokázán i teoreticky ověřen, ale k uvedení do praxe dosud chybí vhodný, dostatečně stabilní materiál. V současné době probíhá syntéza a studium několik typů chromoforů pro SF. Slibnými kandidáty se ukázaly velké aromatické uhlovodíky biradikaloidů například substituované difenylisobenzofurany<sup>3</sup> a cibalackrot, sloučeniny blízké indigu, kterým jsme se nově začali věnovat.

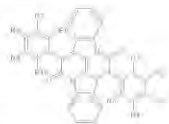
Molekula indiga je považována za hlavní příklad biradikaloidu s vhodnou singletovou a tripletovou excitační energií pro singletové štěpení<sup>2</sup>. Jako kandidát na SF je ale vyřazen kvůli rychlému podléhání fotochemické cis-trans izomeraci dvojné vazby a přenosu protonu z dusíku na kyslík. Naopak průmyslově užívané barvivo cibalackrot odvozené od indiga by mohlo představovat vhodného kandidáta pro SF. Stejně jako indigo splňuje energetické podmínky pro SF a navíc má obě zmíněné deaktivací cesty blokovány.

Pro případné použití nového chromoforu v solárních člancích je nezbytné studium redoxních vlastností v souvislosti s UV-vis a EPR spektry. S využitím skutečnosti, že určitý substituent má malý vliv na elektronové excitační energie a pravděpodobně další vlastnosti relevantní pro štěpení singletu, vybrali jsme řadu derivátů cibalackrotu syntetizovaných pro případné využití v praktických aplikacích singletového štěpení a lišících se strukturálními aspekty (Obr. 1) s cílem nalézt pravidlo pro návrh nejslibnějšího chromoforu pro SF. Svoji pozornost jsme proto



zaměřili nejen na studium oxidace a redukce ale zapojili jsme i *in situ* UV-vis a EPR spektroelektrochemické metody za účelem charakterizace struktury a stability elektrochemicky generovaných aktivovaných (vč. radikálových) částic.

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
1	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
2	H	H	OBu	H	H	H	H	OBu	H	H
3	H	t-Bu	H	t-Bu	H	H	t-Bu	H	t-Bu	H
4	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
5	H	H	OBu	H	H	H	t-Bu	H	t-Bu	H
6	H	H	OBu	H	H	F	F	F	F	F
7	H	t-Bu	H	t-Bu	H	F	F	F	F	F



Obr. 1. Studované deriváty cibalackrotu.

### Experimentální část

K elektrochemickému studiu derivátů cibalackrotu byly použity jak de-polarografie (doba kapky 1 s, rychlost scanu 10 mV/s) tak i cyklická voltametrie na různých elektrodách (rychlost polarizace: 100, 200, 500 a 1000 mV/s). Všechna elektrochemická měření probíhala jednak v předsušeném a argonem vyhublaném dichlormethanu (DCM), případně v N,N-dimethylformamidu (DMF) obsahujícím jako základní elektrolyt 0,1 M tetrabutylamoniem hexafluorofosfát (Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>) (TCL, >98,0%). Látky byly studovány ve třech koncentracích: 1; 5 a 10 · 10<sup>-4</sup> M. Všechny experimenty byly provedeny v nedělené 10 ml nádobce v tříelektrodovém systému. Jako pracovní elektroda byla použita: kapající rtuťová elektroda (DME), visící rtuťová kapková elektroda (HMDE), případně elektroda ze skelného uhlíku (GCE, ø 3 mm). Pomocná elektroda byla vyrobena z platinového drátu. Jako referenční elektroda sloužila nasycená kalomelová elektroda (SCE) oddělená od roztoku vodivým můstkem naplněným základním elektrolytem. De-polarografické experimenty byly prováděny za použití analogového potenciostatu PA4 s XY zapisovačem, oba Laboratorní přístroje Praha. Potenciál v průběhu cyklické voltametrie byl řízen digitálním potenciostatem PGSTAT101 (Autolab-Metrohm) a zaznamenáván softwarem NOVA 1.11.

*In situ* UV-vis spektroelektrochemická měření probíhala v nedělené elektrochemické tenkostěnné křemenné kvyetě s vnitřní tloušťkou 1 mm. Jako pracovní elektroda sloužila platinová síťka. Druhá platinová síťka byla použita jako pomocná elektroda. Jako pseudo-referenční elektroda posloužil stříbrný drátek. Spektroelektrochemická měření probíhala v DCM, případně v DMF s 0,1 M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> jako základním elektrolytem v argonové atmosféře. Potenciál byl kontrolován digitálním potenciostatem PGSTAT101 (Autolab-Metrohm) a zaznamenáván softwarem NOVA 1.11. Koncentrace sledovaného vzorku byla 5 · 10<sup>-4</sup> M. Změna UV-vis spekter v průběhu cyklické voltametrie byla sledována pomocí UV-vis spektrometru Shimadzu UV-1800 (Japan) v rozsahu 1100–236 nm (DCM), respektive 1100–262 nm (DMF). Světelný paprsek šel skrz pracovní elektrodu.

Anion-radikál, respektive kation-radikál vznikající v průběhu elektrochemické redukce, respektive oxidace byl detegován a charakterizován pomocí elektronové paramagnetické rezonance (EPR). Radikál byl generovaný elektrochemicky *in situ* v ploché křemenné spektroelektrochemické kvyetě (0,5 mm) za pomoci 3-elektrodového systému. Pracovní platinová elektroda byla umístěna doprostřed EPR rezonátoru do ploché části kvyety. Stříbrná pseudoreferenční elektroda byla umístěna zespoda. Jako pomocná elektroda sloužila platinová mížka v horní části kvyety, tedy na opačné straně k pracovní elektrodě než referenční elektroda, tudíž v nejlépeším uspořádání z hlediska kompenzace IR spádu. Pro elektrochemickou generaci

radikálu byl u všech experimentů použitý potenciostat PGSTAT101 (Autolab-Metrohm) ovládaný softwarem NOVA 1.11. Roztoky byly připravené z předsušeného DCM vyhublaného argonem a 0,1 M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> předsušeného ve vakuu. Studované látky byly rozpuštěné v koncentraci přibližně 1x10<sup>-4</sup> M.

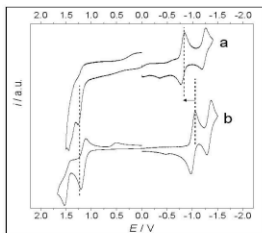
EPR spektra byla zaznamenávána pomocí X-pásmového CW-ESR spektrometru Bruker EMX micro (Bruker, Germany) s použitím vysoce citlivého cylindrického rezonátoru Bruker ER4119HS. Pro měření optimalizovaná na citlivost byla použita modulace magnetického pole o frekvenci 100 kHz, pro lepší rozlišení byla tato frekvence ve specifických případech (pro štěpená spektra) snížena na 10 kHz i za cenu zhoršení poměru signál/šum. Hodnota g-faktoru radikálové částice byla vypočítána za pomoci externího standartu BDPA a následně kalibrace odchylky měřiče magnetického pole. Pro zpracování experimentálních EPR spekter byl použit Bruker Xenon a/anebo EasySpin software<sup>4</sup>.

### Výsledky a diskuse

Pro elektrochemické studium byla použita dvě rozpouštědla, abychom pokryli co největší potenciálové okno a vyloučili případný vliv rozpouštědla. Dichlormethan (DCM) má použitelný rozsah +2,2 až -2,2 V a dimethylformamid (DMF) má rozsah +1,8 až -2,9 V (potenciály oproti SCE). Vedle toho je DMF díky své mírné zásaditosti velmi vhodný pro redukce, protože je potlačena aktivita kationtů H<sup>+</sup> a meziproducty radikálových aniontů jsou stabilnější. Naopak pro oxidace je vhodnější DCM.

Polarografie s kapající rtuťovou elektrodou a cyklická voltametrie na visící rtuťové kapece a na diskové elektrodě ze skelného uhlíku ukázala, že všechny deriváty jsou redukovány v obou rozpouštědlech a na obou elektrodách ve dvou reverzibilních jednoelektronových krocích. Oxidace těchto sloučenin probíhá obecně také ve dvou reverzibilních krocích, nicméně druhá oxidace vykazuje známky reverzibility pouze při vysokých rychlostech skenu – nejspíše v důsledku relativně rychlé následné reakce.

Výsledky obou rozpouštědel a obou elektrod byly velmi podobné, nicméně zatímco oxidační potenciály v DCM a DMF byly prakticky totožné, redukční potenciály v DCM byly systematicky o cca 210 mV zápornější (Obr. 2).



**Obr. 2.** Porovnání cyklické voltametrie cibalekrotu **5** v DMF (křivka **a**) a v DCM (křivka **b**) + 0,1 M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> na glassy carbonu.

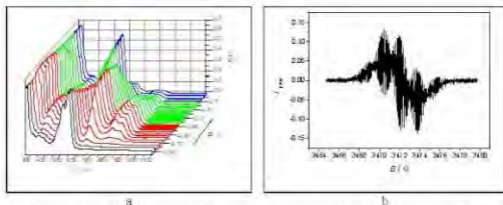
Přítomnost butoxy a t-butyl substituentů má jen nepatrný vliv na redukční potenciál. Naopak oxidaci přítomnost butoxy skupiny v para poloze výrazně ulehčuje. Opačný vliv na oxidační potenciály má přítomnost fluorových atomů v molekule. U molekul obsahující perfluorované fenylové jádro pozorujeme ulehčení redukce o 140 mV a ztížení oxidace o 190 mV.

Největší rozdíl prvního redukčního a prvního oxidačního potenciálu, tedy nejslibnější cílalackrot deriváty pro SF, jsou cílalackrotů **4**, **1**, **7**, **3**. Pozorovaný trend dokonale koreluje posun hlavního absorpčního pásu v UV-vis spektrech.

U všech studovaných sloučenin byla v průběhu prvního redukčního, respektive oxidačního kroku sledována změna na UV-vis spektrech. U všech sloučenin bylo pozorováno velmi podobné chování. Během prvního redukčního kroku se objevil nový absorpční pás v oblasti 600–900 nm, který při zpětném skenování zmizel a obnovil se výchozí stav (Obr. 3a). Při potenciálu druhého redukčního kroku pásy mezi 600–900 nm téměř mizí. Během zpětného skenování se obnoví primární spektrum. Toto chování jasně naznačuje reverzibilní tvorbu radikálového anionu v prvním kroku a jeho redukci na dianion ve druhém kroku.

Oxidace nevykazuje oproti redukci u všech sloučenin reverzibilní charakter na UV-vis spektrech. V některých případech je pozorován nový pás v oblasti 600–900 nm. U některých látek byl patrný pouze při elektrolýze při výrazně vyšším potenciálu odpovídajícímu druhému stupni oxidace.

U všech studovaných látek byl v průběhu prvního redukčního kroku pozorován stabilní signál EPR radikálového anionu. Při zvýšení potenciálu nad druhý redukční stupeň signál EPR klesá. Celé spektrum je velmi úzké (kolem 10 G). U většiny látek se spektrum skládá z jedné široké čáry jen přibližně gaussovského tvaru s peak-to-peak šířkou asi 3,5 G. Zřetelná odchylka od čistě gaussovského tvaru svědčí o nerozlišené hyperjemné struktuře (HFS). Při snížení modulační amplitudy pod 0,1 G, mikrovlnný výkon na 0,2 mW se u některých objevuje hyperjemná struktura. Dostatečně rozlišenou hyperjemnou strukturu jsme dostali jen u nesubstituovaného cílalackrotu (Obr. 3b).



**Obr. 3.** a) Změna UV-vis spektra v průběhu prvního redukčního kroku cílalackrotu **6** v DMF + 0,1 M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>. b) EPR spektrum anion-radikálu pozorovaného v průběhu prvního redukčního kroku nesubstituovaného cílalackrotu **1** v DCM + 0,1 M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>.

K analýze EPR spekter výrazně pomohlo naměření vybraných deuterovaných cílalackrotů. Nahrazení protonu deuteriem může jen nepatrně změnit štipící konstanty v ostatních polohách. Štipící konstanta je ovlivněna pohyby protonů – zejména oscilací nad a pod uzlovou rovinu  $\pi$ .

orbitalu, ale změna hmotnosti je malá. Může tedy dojít k malé změně štipicích konstant nenahrazených protonů na fenylu, ale změna štipicích konstant protonů na centrální (imidazolové) části molekuly je nulová či zanedbatelná.

Elektrochemická oxidace vede k tvorbě stabilních radikálových kationtů. Opět byl u některých látek pozorován náznak hyperjemného štěpení. Ale u žádné z látek se nepodařilo získat spektrum s rozlišením umožňujícím analýzu HFS. Překvapivé ale je, že všechny získané radikálové kationty mají poněkud vyšší g-faktor. Pro radikálové anionty je  $g = 2,0029 \pm 0,0001$ , kdežto pro radikálové kationty je  $g = 2,0040 \pm 0,0001$ . Rozdíl je velmi malý, ale zřetelně větší, než experimentální chyba.

### Závěr

S cílem nalezení pravidla pro návrh nejslibnějšího chromoforu pro SF byly nasyntetizovány různé deriváty cibalackrotu lišící se substitucí na fenylových jádrech a popsány jejich redoxní vlastnosti. Hlavní důraz byl kladen na indukční/mezomerní/sterický vliv substituce na redoxní vlastnosti, na reverzibilitu a stabilitu. Ke studiu byly použity především standardní elektrochemické techniky (de-polarografie, cyklická voltametrie). Elektrochemicky generovaný anion-, respektive kation-radikál pozorovaný v průběhu prvního oxidačního, respektive redukčního kroku byl popsán s pomocí *in situ* UV-vis a EPR. Analýza anion-radikálu se nakonec podařila s pomocí porovnání EPR spekter se spektry deuterovaných derivátů cibalackrotu.

Pro případné využití derivátů cibalackrotu pro SF všechny studované deriváty splňují reverzibilní oxidaci a redukci, respektive tvorbu stabilního kation- a anion-radikálu. Nejslibnějším kandidátem pro SF se ukazuje cibalackrot s perfluorovanými fenylovými jádry, který má největší elektrochemický HOMO-LUMO gap (rozdíl prvního oxidačního a prvního redukčního potenciálu).

### Acknowledgments

The financial support of the grant 19-22806S (Czech Science Foundation - GAČR) and the institutional support RVO: 61388955 are highly appreciated. The authors are grateful to dr. J. Kaleta and dr. M. Dudič for granting the substances and to prof. J. Michl for valuable discussions.

### References

1. Howard J. A., Mendenhall G. D.: *Can. J. Chem.* **53**, 2199 (1975).
2. Smith M. B., Michl J.: *J. Chem. Rev.* **110**, 6891 (2010).
3. Kaleta J., Šimková L., Liška A., Bím D., Madridejos J. M. L., Pohl R., Rulišek L., Michl J., Ludvík J.: *Electrochimica Acta* **321**, 134659 (2019).
4. Stoll S., Schweiger A.: *J. Magn. Reson.* **178**, 42 (2006).

## Manufacture of 3D Printed Microfluidic Channels and Their Characterization by Impedance Spectroscopy and Optical Microscopy Measurements

Oskar Štěrba <sup>a,b</sup>, Eva Vaněčková <sup>a</sup>, Marta Chojnínska-Młynarczyk <sup>a</sup>, Tomáš Navrátil <sup>a</sup>, and Viliam Kolivoška <sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> Gymnázium Aloise Jiráka, T. G. Masaryka 590, 570 01 Litomyšl, Czech Republic

### Abstract

Fused deposition modeling 3D printing employing high-resolution extrusion nozzles and specialized manufacturing protocols have recently attracted attention as an inexpensive tool to create microfluidic devices. In this work, we have applied such an approach to create measurement cells with integrated microchannels of systematically varied dimensions. The real width of channels was inspected by two techniques, namely (A) impedance spectroscopy employing an aqueous sensing electrolyte and (B) optical microscopic imaging of silicone imprints hardened in the interior of printed structures. Both techniques have demonstrated that fused deposition modeling 3D printing enables precise manufacturing of channels with truly microfluidic dimensions.

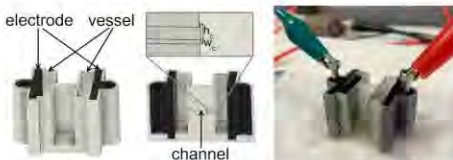
**Keywords:** Fused deposition modeling 3D printing, Lab-on-a-chip devices, Microfluidic channels, Impedance spectroscopy, Optical microscopy

### Introduction

Efforts aiming at minimizing the consumption of samples, solvents, and reagents in analytical chemistry applications have resulted in the ongoing development of microfluidic lab-on-a-chip devices. Manufacturing based on 3D printing (3DP) has been recently seen as a particularly attractive tool to create these platforms <sup>1-3</sup>. Structures common to all microfluidic devices are channels as conduits for the transport of liquids and gases. Recent five years have witnessed significant developments in stereolithographic and digital light processing 3DP, allowing channels to be manufactured with dimensions below 200  $\mu\text{m}$  <sup>4-14</sup>. These two techniques are based on hardening liquid resins by a precisely targeted beam of light. Printed microstructures must be immediately rinsed with organic solvents to remove unreacted resin from their interior, making the entire process relatively costly and waste generating. Such a post-processing step is not required in the case of fused deposition modeling (FDM) 3DP, which creates microfluidic features as voids in the pattern of precisely extruded material. Up to date, only three works were successful in applying FDM to print microchannels with dimensions below 200  $\mu\text{m}$  <sup>15-17</sup>. Such a low number of contributions indicates that the capabilities of this technique to create microfluidic structures have been severely underexplored. In the above-mentioned works, microfluidic channels were scrutinized by optical microscopy, which can access their interior only when translucent materials are used in their manufacture.

In this work, we utilize FDM 3DP employing a common desktop printer and polylactic acid (PLA) as the most frequently used material to create microfluidic channels with a nominal width of 100  $\mu\text{m}$  and height ranging from 100 to 500  $\mu\text{m}$ . Channels are designed as integral parts of measurement cells involving two vessels for the introduction of the sensing electrolyte, each of them equipped with a conductive 3D printed electrode (Fig. 1). The real width of printed channels is determined by impedance spectroscopy measurements based on circuit analysis presented in this work. This inspection is complemented by optical microscopic imaging of silicone imprints hardened in the interior of microchannels. Such a combined approach

constitutes a powerful experimental platform for sensing microfluidic channels and other structures.



**Fig. 1** Left: Design of cell with microchannel (full view and cross-section). Right: Photograph of a cell filled with sensing electrolyte and connected by alligator clips to the measurement circuit.

### Experimental part

Measurement cells with integrated microfluidic channels and electrodes used in this work were devised in Fusion 360 (Autodesk Inc., USA) computer-assisted design. Microfluidic channels have a nominal width ( $W_c$ ) of 100  $\mu\text{m}$ , length ( $L_c$ ) of 10 mm, and height ( $H_c$ ) being varied from 100 to 500  $\mu\text{m}$  in increments of 100  $\mu\text{m}$ . Vessels to support the sensing electrolyte have internal width ( $W_v$ ) of 20 mm, height ( $H_v$ ) of 20 mm, and length ( $L_v$ ) of 5 mm and are equipped with a groove to place the electrode. Cell walls have a thickness of 0.90 mm. The cell is supported by a platform with a height of 3 mm to prevent its mechanical deformation during measurements. Electrodes have a thickness of 2.5 mm and have a semi-circular handle with a hole for installing a steel bolt as a contact to the measurement circuit.

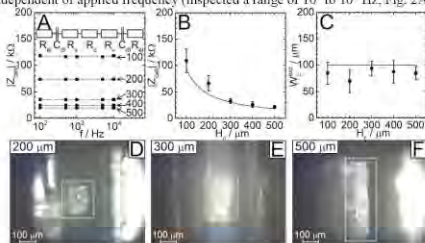
Cells and electrodes were manufactured employing a Prusa I3 MK3 3D printer equipped with a brass extrusion nozzle (0.25 mm diameter) and smooth polyetherimide-coated steel spring printing pads (all items purchased from Prusa Research a.s., Czech Republic) following approaches presented in our recently published works<sup>18-21</sup>. Cells were printed from electrically insulating transparent PLA filament (1.75 mm diameter, Gembird, The Netherlands), while electrodes were printed from electrically conductive composite filament based on PLA and carbon nanotubes (1.75 mm diameter, FiloAlfa, AlfaOhm, Italy). Just before printing, the extruder was copiously rinsed at 250 °C with the filament to be used to remove remnants of previously used materials. To minimize ambient contamination, printing pads were cleaned with acetone at room temperature. Designs of cells and electrodes were exported as STL files and processed in Simplify 3D software to generate instructions for the 3D printer. For cells, the layer height was set to 0.05 mm, while for electrodes was 0.20 mm. The extrusion multiplier was kept at unity. The temperature of the extruder and the printing pad was 225 and 60 °C. Two perimeters and rectangular 100 % infill were applied in the cell platform, while cell walls and electrodes were completely printed from perimeters. The printing speed was 20 mm s<sup>-1</sup>. Retraction settings were set default for unmodified PLA. Seams were placed beyond microchannels and sensing parts of electrodes. M6x25 bolts were installed to electrodes.

Aqueous 1 mol kg<sup>-1</sup> (molality) KCl solution prepared from MilliQ deionized water (Millipore, France, maximum total organic carbon 3 ppb, minimum electric resistivity 18.2 M $\Omega$  cm) and solid KCl (p.a., 99.5 %, Sigma Aldrich) was used as the sensing electrolyte. It was introduced to one of the vessels and was pressurized through the microchannel employing an external pump (Sera air 550 R plus) and a custom-design 3D printed valve (not shown in Fig. 1). Subsequently,

electrodes were introduced and both vessels were completely filled with the electrolyte. Electrodes were connected to the measurement circuit composed of a commercial function generator (UTG1010A, UNI-T) and two multimeters (UT71B, UNI-T) operating as the voltmeter and the ammeter. AC voltage perturbation with the frequency being varied in the range from  $10^2$  to  $10^4$  Hz was applied. The amplitude of the resulting voltage drop and the current flowing through the cell were measured and converted to the impedance magnitude. In all experiments, the amplitude of the voltage perturbation was adjusted so that the current amplitude was larger than  $5 \mu\text{A}$ , found as the minimum of the reliably measurable current range determined by control experiments employing standard resistors. After such performed characterization, microchannels were copiously rinsed with deionized water by applying pressure and left to dry in a closed container under ambient conditions. Freshly mixed silicone rubber (Mold Star 15 Slow, Smooth-On, USA) was introduced to one vessel and was pressurized to the microchannel by the pump. Upon curing, cells were gently disintegrated. Silicone hardened in the interior of microchannels was cut by a scalpel blade to reveal its cross-section. Such profiles were examined by optical microscopy (NMM800TR, Microteb).

## Results and discussion

The work aims at determining the real width of microfluidic channels in cells manufactured by FDM 3DP employing impedance spectroscopy measurements and optical microscopy imaging. For the former approach, the theoretical analysis of cell impedance  $Z_{\text{cell}}$  is based on the equivalent circuit (Fig. 2A) taking into account all cell components. Serial resistive contributions originating from electrodes ( $R_e$ ) and the sensing electrolyte in vessels ( $R_v$ ) and the microchannel ( $R_c$ ) are considered, together with frequency-dependent capacitive reactance due to charging of electrode/electrolyte interfaces ( $-j/2\pi f C_{dl}$ ), where  $C_{dl}$  is the interfacial double-layer capacitance. For all five cells designed and manufactured in this work (channel height  $H_c$  being varied from 100 to 500  $\mu\text{m}$ ) obtained impedance magnitude  $|Z_{\text{cell}}|$  was found to be independent of applied frequency (inspected a range of  $10^2$  to  $10^4$  Hz, Fig. 2A).



**Fig. 2** (A) Equivalent circuit and impedance spectra of cells with varied  $H_c$  values (in  $\mu\text{m}$ ), (B)  $|Z_{\text{cell}}|$  and (C)  $W_c^{\text{exp}}$  as a function of  $H_c$ , (D) to (F) Images of silicone imprints of channels.

This indicates that the contribution of double-layer charging may be neglected under such selected measurements conditions, allowing straightforward interpretation of  $|Z_{\text{cell}}|$  values as the sum of resistive contributions,  $2R_e + 2R_v + R_c$ . Found values of  $|Z_{\text{cell}}|$  are on the order of  $10^1$  to  $10^5 \Omega$ . The value of  $R_e$  was determined by control impedance spectroscopy measurements in single-compartment cells (data not shown) and equals to 35  $\Omega$ . The  $R_v$  and  $R_c$  terms reflect the

dimensions of vessels and the channel and depend on the conductivity of the sensing electrolyte  $\kappa_{el}$ , which, for aqueous 1 mol kg<sup>-1</sup> KCl equals 10.861 S m (at 25 °C). For vessel dimensions as selected in this work (see Experimental details) the  $R_v$  term equals to 1.15  $\Omega$ . Importantly, low values of  $R_{el}$  and  $R_v$  in comparison with  $|Z_{cell}|$  values enable precise impedimetric sensing of microchannel dimensions. Values of  $|Z_{cell}|$  plotted as a function of  $H_c$  are shown as circles in Fig. 2B. Theoretical values of  $|Z_{cell}|$  calculated based on nominal dimensions of vessels and the channel are shown as the solid curve. The real channel width may be determined based on experimental  $|Z_{cell}|$  values employing the relationship

$$W_c^{exp} = \frac{L_c / \kappa_{el} H_c}{|Z_{cell}| - 2R_{el} - 2L_v / \kappa_{el} H_v W_v}$$

Values of  $W_c^{exp}$  obtained for all five cells are presented as circles in Fig. 2C. All of them are close to the nominal value (100  $\mu$ m, shown as a solid black line), indicating that FDM 3DP is capable of creating precise channels with truly microfluidic dimensions.

Upon impedimetric characterization of microchannels, we further introduced liquid resin to their interior, with the goal of inspecting their shape. Upon hardening, the cross-sectional profile of the resin was inspected by optical microscopic imaging. Fig. 2 shows representative images of resin originating from channels with  $H_c$  of 200 (D), 300 (E), and 500  $\mu$ m (F). Structures due to individually printed layers (layer height of 50  $\mu$ m) are seen. The width of cross-sectional profiles is close to 100  $\mu$ m and the height scales with the  $H_c$  value.

## Conclusions

In this work, microfluidic channels integrated to measurement cells equipped with conductive electrodes were manufactured by fused deposition modeling 3D printing. Cells were filled with the sensing electrolyte and investigated by impedance spectroscopy measurements to determine the real width of microchannels. Obtained values (70 to 95  $\mu$ m) are very close to the nominal value set in the computer-assisted design (100  $\mu$ m). These findings were corroborated by the results of optical microscopic imaging. Our work demonstrates that fused deposition modeling 3D printing is capable of forming precise channels with truly microfluidic dimensions. Developed approaches will be utilized in the construction of lab-on-a-chip devices for the electrophoretic analysis of viruses<sup>25,26</sup>, and reaction platforms for (spectro)electrochemical analysis of biologically relevant compounds<sup>27-33</sup>.

## Acknowledgments

This research has been supported by the Czech Science Foundation (20-01589S) (M. C., T. N.) and Specific University Research (SVV260560) (M. C.).

## References

- Nielsen A. V., Beauchamp M. J., Nordin G. P., Woolley A. T.: *Ann. Rev. Anal. Chem.* **13**, 45 (2020).
- Balakrishnan H. K., Badar F., Doeven E. H., Novak J. I., Merenda A., Dumee L. F., Loy J., Guijt R. M.: *Anal. Chem.* **93**, 350 (2021).
- Mehta V., Rath S. N.: *Bio-Des. Manuf.* **4**, 311 (2021).
- Costa B. M. C., Coelho A. G., Beauchamp M. J., Nielsen J. B., Nordin G. P., Woolley A. T., da Silva J. A. F.: *Anal. Bioanal. Chem.* **414**, 545 (2022).
- Gong H., Bickham B. P., Woolley A. T., Nordin G. P.: *Lab. Chip* **17**, 2899 (2017).
- Gong H., Woolley A. T., Nordin G. P.: *Lab. Chip* **18**, 639 (2018).
- Kamperman T., Teixeira L. M., Salehi S. S., Kerekhofs G., Guyot Y., Geven M., Geris L., Grijpma D., Blanquer S., Leijten J.: *Lab. Chip* **20**, 490 (2020).
- Kim Y. T., Bohjanen S., Bhattacharjee N., Folch A.: *Lab. Chip* **19**, 3086 (2019).



9. Kuo A. P., Bhattacharjee N., Lee Y.-S., Castro K., Kim Y. T., Folch A.: *Adv. Mater. Technol.* **4**, 1800395 (2019).
10. Parker E. K., Nielsen A. V., Beauchamp M. J., Almughamsi H. M., Nielsen J. B., Sonker M., Gong H., Nordin G. P., Woolley A. T.: *Anal. Bioanal. Chem.* **411**, 5405 (2019).
11. van der Linden P. J. E. M., Popov A. M., Pontoni D.: *Lab. Chip* **20**, 4128 (2020).
12. Weigel N., Maennel M. J., Thiele J.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* **13**, 31086 (2021).
13. Gong H., Beauchamp M., Perry S., Woolley A. T., Nordin G. P.: *RSC Adv.* **5**, 106621 (2015).
14. Gong H., Woolley A. T., Nordin G. P.: *Lab Chip* **16**, 2450 (2016).
15. He Y., Gao Q., Wu W.-B., Nie J., Fu J.-Z.: *Micromachines* **7**, 108 (2016).
16. Nelson M. D., Ramkumar N., Gale B. K.: *J. Micromech. Microeng.* **29**, 095010 (2019).
17. Bressan L. P., Adamo C. B., Quero R. F., de Jesus D. P., da Silva J. A. F.: *Anal. Method.* **11**, 1014 (2019).
18. Vaneckova E., Bousa M., Shestivska V., Kubista J., Moreno-Garcia P., Broekmann P., Rahaman M., Zlamal M., Heyda J., Bernauer M., Sebechlebska T., Kolivoska V.: *ChemElectroChem* **8**, 2137 (2021).
19. Poltorak L., Rudnicki K., Kolivoska V., Sebechlebska T., Krzyczmonik P., Skrzypek S.: *J. Hazard. Mater.* **402**, 123411 (2021).
20. Escobar J. G., Vaneckova E., Novakova-Lachmanova S., Vivaldi F., Heyda J., Kubista J., Shestivska V., Spanel P., Schwarzova-Peckova K., Rathousky J., Sebechlebska T., Kolivoska V.: *Electrochim. Acta* **360**, 136984 (2020).
21. Vivaldi F., Sebechlebska T., Vaneckova E., Biagini D., Bonini A., Kolivoska V.: *Anal. Chim. Acta* **1203**, 339600 (2022).
22. Vaneckova E., Bousa M., Vivaldi F., Gal M., Rathousky J., Kolivoska V., Sebechlebska T.: *J. Electroanal. Chem.* **857**, 113760 (2020).
23. Vaneckova E., Bousa M., Novakova-Lachmanova S., Rathousky J., Gal M., Sebechlebska T., Kolivoska V.: *J. Electroanal. Chem.* **857**, 113745 (2020).
24. Vaneckova E., Bousa M., Sokolova R., Moreno-Garcia P., Broekmann P., Shestivska V., Rathousky J., Gal M., Sebechlebska T., Kolivoska V.: *J. Electroanal. Chem.* **858**, 113763 (2020).
25. Kolivoska V., Weiss V. U., Kremser L., Gas B., Blaas D., Kenndler E.: *Electrophoresis* **28**, 4734 (2007).
26. Weiss V. U., Kolivoska V., Kremser L., Gas B., Blaas D., Kenndler E.: *J. Chromatogr. B* **860**, 173 (2007).
27. Sokolova R., Ramesova S., Kocabova J., Kolivoska V., Degano I., Pitzalis E.: *Monatsh. Chem.* **147**, 1375 (2016).
28. Gal M., Hives J., Sokolova R., Hromadova M., Kolivoska V., Pospisil L.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **74**, 1571 (2009).
29. Wantulok J., Sokolova R., Degano I., Kolivoska V., Nycz J. E., Fiedler, J.: *ChemElectroChem* **8**, 2935 (2021).
30. Wantulok J., Sokolova R., Degano I., Kolivoska V., Nycz, J. E.: *Electrochim. Acta*, **370**, 137674 (2021).
31. Wantulok, J., Degano, I., Gal, M., Nycz, J. E., Sokolova, R.: *J. Electroanal. Chem.* **859**, 113888, (2020).
32. Sokolova R., Ramesova S., Degano I., Hromadova M., Szala M., Wantulok J., Nycz J. E., Valasek M.: *Electrochim. Acta* **270**, 509 (2018).
33. Chionska M., Hrdlicka V., Sestakova I., Navratil T.: *Monatsh. Chem.* **152**, 35 (2021).

# Electrochemical Analysis of Insulin on Graphite Electrodes

Libuše Trnková<sup>a</sup>, Iveta Trísková<sup>a</sup>, Zdeněk Farkaš<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5,  
625 00 Brno, Czech Republic, E-mail: libuse@chemi.muni.cz

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

## Abstract

Electrochemical study of insulin on non-modified and nanoparticle-modified graphite electrodes was performed. The insulin oxidation signal, for which tyrosine is responsible, has been investigated not only in terms of insulin forms (native, denatured, dimeric, monomeric) and adjustable solution parameters (pH, concentration, ionic strength, and buffer) but also in terms of the modification of electrode surface. It was found that all the above-mentioned parameters have effect on insulin oxidation, but the greatest changes in voltammetric signals were caused by the nano-modification of electrode surfaces and the structure of insulin. The information about the secondary structure of insulin in solutions was obtained by measuring circular dichroism spectra and their subsequent evaluation using a novel method for secondary structure determination of proteins BeStSel (Beta Structure Selection).

**Keywords:** Insulin, Tyrosine, Screen-printed graphite electrode, Pencil graphite electrodes, Voltammetry, Circular dichroism, Denaturation, BeStSel.

## Introduction

Insulin has been at the forefront of scientific interest for many years and serves as a model polypeptide in biochemistry, pharmacology, cell signaling, structural biology, and medicine<sup>1</sup>. Recently, this polypeptide hormone, which regulates blood glucose levels, is often mentioned in connection with Covid-19 disease, as it has been found that patients with diabetes mellitus (DM) have a significantly higher risk of this disease. In this context, researchers are trying not only to develop a low-cost, non-enzymatic, and sensitive sensor with a rapid response to insulin, but also study how insulin behaves in solution and at the charged phase interface.

Insulin is composed of two peptide chains, the A chain (21 AAs) and the B chain (30 AAs), which are linked together by two disulfide bonds (Fig.1). One disulfide bond is located in the A chain at positions 6–11. Chain A can be separated from chain B by reducing agents to break the disulfide bonds between A7–B7 and A20–B19. Biochemical and medical research shows that three shorter regions of the A chain (1–3; 12–17; 19) and one longer region with an amino acid sequence from position 8 to 25 in the B chain is essential for proper insulin function<sup>2</sup>. From the point of view of electro-activity, not only disulfide bonds are important, which can be reduced, and insulin subsequently finds itself in denatured form, but also 2 histidines and 4 tyrosines can show electroactive properties.



Fig. 1. Human insulin (primary and secondary structure).

Graphite is the most commonly used electrode material for the research of redox processes<sup>3</sup>. Different types of graphite electrodes, such as glassy carbon electrodes<sup>4,5</sup>, screen-printed graphite electrodes (SPGEs)<sup>6,7</sup>, pencil graphite electrodes<sup>8</sup>, and carbon paste electrodes<sup>9</sup> have been used for insulin determination. Most published communications are focused on analytical characterization of insulin without a detailed explanation of how the designed electrode system works and which processes are behind the nano-bio material hybrid system, including interactions between their components. The aim of this study is to refine the existing findings on the electrochemical processes of insulin on graphite electrodes of various types and to clarify the existing information on the relationship between the structure of insulin in solutions and its electrochemical oxidation.

## Experimental

### Chemicals and material

Human insulin, components for phosphate buffered saline (PBS) or phosphate-acetate buffer (FAB) were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Polymer pencil graphite electrodes (pPeGEs) with the diameter of 0.5 mm and the HB softness were obtained from Tombow (Japan), screen-printed graphite electrodes (SPCEs) were purchased from Metrohm.

### Procedure

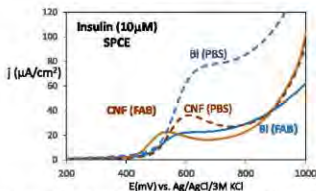
Voltammetric experiments were carried out using the electrochemical analyzer  $\mu$ AUTOLAB TYPE III (Metrohm, Switzerland). The conventional three electrode set-up was used: pPeGE or SPCE as a working electrode, the platinum wire as a counter electrode, and the Ag/AgCl/3M KCl as a reference electrode. CD Spectra were measured on the CD spectrophotometer Jasco J-810 (Tokyo, Japan) with 0.1 cm quartz cuvette at room temperature (23 °C).

## Results and discussion

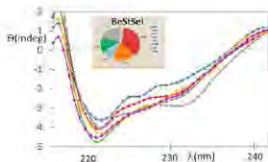
From the electrochemical point of view, direct and efficient oxidation of insulin can play the key role in construction of fast and sensitive electrochemical sensors of this hormone. It was found that the oxidation process of insulin on bare graphite electrodes is limited by the very slow electron transfer kinetics. Due to this fact, various electrode surface modifications with suitable catalysts reducing the value of the polarization overvoltage and allowing measuring the oxidation signals in the potential window area of the treated electrode are applied<sup>4</sup>. To realize our idea to catalyze the direct oxidation process of insulin, the two types of surface modifications of the graphite electrode were chosen: the screen-printed carbon electrodes (SPCEs) modified with bismuth oxide or carbon nanofibers (NF). The linear sweep voltammetric (LSV) signals of human insulin on both nanostructured SPCE in different buffers are shown in Fig. 2.

Oxidation processes on nanostructured electrodes with bismuth (BiNP) or carbon nanofibers (CNF) reflect the conformational dynamics of insulin observed by circular dichroism spectra. Both electroanalytical parameters, such as the potential position ( $E_p$ ) of the oxidation peak and its height ( $I_p$ ), were investigated as a function of the insulin concentration, its native and/or denatured states, pH, and buffer composition. All the obtained functional dependencies and their comparisons, which were aided by the results of the BeStSel method analysis<sup>10</sup> and the results of molecular dynamics from the protein database<sup>11</sup>, provided new findings, such as: (a) tyrosin with the loss of two electrons and two protons is responsible for the oxidation process of insulin but with the difference that the electrochemical behavior of insulin on both nanostructured screen printed electrodes (Bi-SPCE and CNF-SPCE) is different; (b) the effect of pH and buffer composition (PBS and FAB) are reflected in both experimental approaches:

voltammetry and CD spectra; (c) based on CD spectra it is evident that with increasing insulin concentration the content of helix is decreasing; and (d) for the visualization of the tyrosin position in the insulin molecule, YASARA can be suitable<sup>11</sup>.



**Fig. 2.** Voltammetric oxidation signals of human insulin on different SPCE modified by bismuth nanoparticles or carbon nanofibers (CNF) in phosphate buffered saline (PBS) or phosphate-acetate buffer (FAB). No voltammetric oxidation signal of insulin was observed on non-modified SPCEs (data not shown).



**Fig. 3.** CD spectra of human insulin at different pH (from 1.82 to 8.60). Zoom: the diagram of the BeStSel evaluation for 10  $\mu$ M insulin in PBS, pH 7 (the representation of  $\alpha$ -helix1 and  $\alpha$ -helix2, parallel and antiparallel  $\beta$ -sheets, different twists, and others).

In order to understand the catalytic effect of nanoparticles modifying the surface of an electrochemical sensor, our research is also focused on the study of the chemical properties and morphology of electrode surfaces in relation to the catalytic effect of nanoparticles on the electron transfer in the oxidation process of insulin.

## Conclusions

This research is the starting point for the development of a nanostructured non-enzymatic insulin sensor. Oxidation processes of insulin on nanostructured bismuth (BiNP) and carbon nanofiber (CNF) electrodes are a reflection of the conformational dynamics of insulin observed by circular dichroism spectra. The different mechanism of insulin oxidation processes on unmodified and nanoparticle-modified electrodes is discussed, along with the question of which and how many amino acids are subject to the insulin oxidation process. So far, no investigations have been done discussing the nanoscale design of the electrode interface and possible structural changes of insulin when exposed to a charged phase interface or an active group of

the drug. Therefore, the results of our study can be helpful for the development of non-enzymatic insulin-sensitive sensors as well as for further biochemical insulin research in medicine and pharmacy.

#### Acknowledgments

This research has been financially supported by the project MUNI/A/1192/2020 of Ministry of Education, Youth and Sports (MEYS) of the Czech Republic and by the Visegrad project 22020140 (International Visegrad Fund). The authors thank bachelor students Nikola Nosková, Pavla Seveldová, Miroslava Velecká, and Alžbeta Brezanová for the participation in this research.

#### References

1. Krieger E., Koraimann G., Vriend G.: *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*. 47,393 (2002).
2. Mayer J. P., Zhang F., DiMarchi R. D.: *Peptide Sci.* 88, 587 (2007).
3. McCreery R. L.: *Chem. Rev.* 108, 2646 (2008).
4. Luong A.-D., Roy I., Malhotra B.D., Luong J.H.T.: *Sensors and Actuators* 3, 10 (2021).
5. Wang J., Musameh M.: *Anal.Chim.Acta* 511, 33 (2004).
6. Rafiee B., Fakhari A.R.: *Biosensors & Bioelectronics* 46, 130 (2013).
7. Sisolakova I., Hovancova J., Orinakova R., Orinak A., Trmkova L., Garcia D.R., Radonak J.: *Bioelectrochemistry* 130, 107326 (2019).
8. Sisolakova I., Hovancova J., Orinakova R., Gilbert E., Orinak A., Garcia D., Shylenko O., Radonak J.: *Electroanalysis* 31 10 (2019).
9. Jaafariasl M., Shams E., Amini M.K.: *Electrochim. Acta* 56, 4390 (2011).
10. A. Micsonai, F. Wien, E. Bulyaki, J. Kun, E. Moussong, Y.H. Lee, Y. Goto, M. Refregiers, J. Kardos, *Nucleic Acids Res.* 46, W315 (2018).
11. Krieger E., Vriend G.: *J. Comput. Chem.* 36, 996 (2015).

**Sensitive Electrophoretic Determination of Amoxicilline and Ceftazidime in Patients with Syndrome of Diabetic Foot**

**(Citlivé elektroforetické stanovení amoxicilinu a ceftazidimu u pacientů se syndromem diabetické nohy)**

Petr Tůma<sup>a</sup> and Vladimíra Fejfarová<sup>b</sup>

<sup>a</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

<sup>b</sup>Diabetes Centre, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Vídeňská 1958, 140 21 Prague 4, Czech Republic

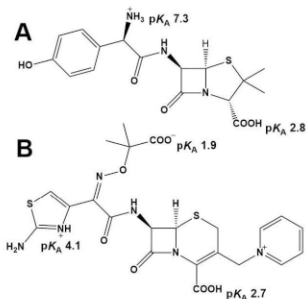
**Abstract**

Determination of amoxicillin (AMX) and ceftazidime (CTZ) in blood serum and microdialysates of the diabetic foot tissue is performed by capillary electrophoresis (CE) with contactless conductivity detection (C4D). Baseline separation of AMX is achieved in 0.5 M acetic acid and separation of CTZ in 3.2 M acetic acid with the addition of 13 % v/v MeOH. CE/C4D determination is performed in a 25  $\mu$ m capillary with the suppressed electroosmotic flow on the 18 cm capillary length and the achieved migration time for AMX and CTZ is 4.2 min and 4.4 min, respectively. The analysis is performed with 20  $\mu$ L of serum or 15  $\mu$ L of microdialysate treated with acetonitrile, and the achieved LOQ in serum and microdialysate is 148 ng/mL for AMX and 339 ng/mL for CTZ. The CE/C4D method is used to monitor the entrance of AMX and CTZ from the bloodstream into the subcutaneous tissue in patients with diabetic foot syndrome and to measure the pharmacokinetics after intravenous administration of a bolus and continual dose of antibiotic.

**Keywords:** Antibiotics, Capillary electrophoresis, Contactless conductivity detection, Microdialysis, Stacking.

**Úvod**

Diabetická noha (DF) je pozdní komplikace diabetes mellitus (DM), definovaná jako infekce, ulcerace nebo destrukce tkání dolní končetiny<sup>1</sup>. Jedná se o častou komplikaci DM s incidencí 19 – 34 % a ročním nárůstem 2 %. Např. v ČR jsou k dispozici pouze data o prevalenci, která se pohybuje kolem 41 000 nemocných s DF. V současnosti je v klinické podiatrické praxi nejvíce vyhledáván amoxicilin a ceftazidim jako účinná antibiotika (ATB), Obr. 1. Amoxicilin (AMX) je zástupce širokospektrých  $\beta$ -laktamových ATB, jejichž baktericidní účinek funguje na principu blokáce proteosyntézy v buněčných stěnách bakterií<sup>2</sup>. Také ceftazidim (CTZ) je  $\beta$ -laktamové ATB, které patří do třetí generace cefalosporinů s baktericidními účinky<sup>3</sup>. Pro kontrolu úspěšné terapie DF je účelné monitorovat distribuci ATB v periferních tkáních. Za tímto účelem je potřeba zavést málo invazivní, sekvenční a zároveň humánně příznivou diagnostickou techniku<sup>4</sup>. Odběr vzorku z podkožní tkáně se proto provádí pomocí mikrodialýzy (MD), kdy je do podkožní tkáně implementována miniaturní MD sonda<sup>5</sup>.



**Obr. 1.** Struktura AMX (A) a CTZ (B) s vyznačením  $\text{p}K_A$  konstant a uvedením majoritní disociované formy při hodnotě pH pufru použitého k separaci.

### Experimentální část

Veškerá elektroforetická měření byla provedena na přístroji kapilární elektroforézy Agilent HP<sup>3D</sup> (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) vybaveném bezkontaktním vodivostním detektorem (ADMET, ČR), který je společně s kapilárou vložen do kazety a termostatován na 20 °C. CE separace jsou prováděny v 25  $\mu\text{m}$  křemenné kapiláře pokryté INST-coating solution<sup>6</sup>, efektivní a celková délka 16,6/31,4 cm (Composite Metal Services, UK). Vzorek je do kapiláry dávkován hydrodynamicky tlakem 50 mbar po 60 s. Sérum i mikrodialyzáty z podkoží diabetické nohy jsou ředěny acetonitrem v poměru 1:3 v/v, následně třepáno, centrifugováno a získaný supernatant použit k CE analýze. Separace je prováděna při napětí 30 kV. Všechny použité chemikálie dosahovaly analytického stupně čistoty a pro přípravu základních elektrolytů (BGE) a dalších roztoků byla použita deionizovaná voda.

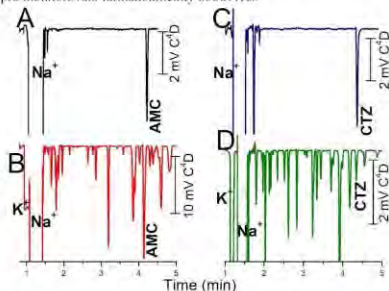
### Výsledky a diskuze

AMX má kyselý karboxyl s  $\text{p}K_A$  2,7, slabě kyselý fenol s  $\text{p}K_A$  9,0 a bazickou aminoskupinu s  $\text{p}K_A$  7,3<sup>2</sup>, Obr. 1. Dosud bylo popsáno CE/C4D stanovení AMX v bazickém BGE, kdy AMX migruje jako anion proti směru rychlého elektroosmotického toku (EOF) generovaného v křemenné kapiláře, který dotáhne AMX do detektoru. Z důvodu aplikace stackingu spojeného s velkým dávkováním vzorku je potřeba separaci provádět v kyselém BGE s potlačeným EOF<sup>7</sup>. Pro tyto účely byly testovány vodné roztoky kyseliny octové (AcOH) v širokém rozmezí koncentrací od 0,2 do 4,0 M AcOH, ve kterých je zajištěna vysoká stabilita C4D baseliny<sup>8</sup>. Baseline separace AMX od ostatních složek séra a MD se podařilo dosáhnout v 0,5 M AcOH, pH 2,55. Z porovnání elektroferogramu séra a farmakologického preparátu jednoznačně vyplývá, jak složitý je klinický vzorek oproti farmakologickému (Obr. 2A a B). Na elektroferogramu preparátu je pouze pík AMX a pík  $\text{Na}^+$  a baseline separaci takto jednoduchého vzorku by bylo možné provést v širokém rozmezí koncentrací AcOH.

CTZ obsahuje silně bazický pyrimidin, slabě bazický thiazol s  $\text{p}K_A$  4,1 a dva slabě kyselý karboxyly s  $\text{p}K_A$  1,9 a 2,7<sup>3</sup>, Obr. 1B. Optimalizace BGE opět směřovala k provádění separace v kyselém prostředí s potlačeným BGE. V tomto případě byl do AcOH jako BGE přidáván

MeOH, který výrazně ovlivňuje migrační pořadí aminokyselin vlivem jejich selektivní solvatace, jak bylo prokázáno v naší předchozí studii<sup>9</sup>. Baseline separace CTZ od ostatních složek séra a MD bylo dosaženo v 3,2 M AcOH (pH 2,0) s 13% v/v přídavkem MeOH. Za těchto podmínek je pyrimidin i thiazol protonizován, kyselější karboxyl disociován a slabší karboxyl nedisociován (viz. Obr. 1B), a výslednou převažující formou CTZ je jednonoentý kation, který se v C4D zobrazuje jako záporný pik. Elektroferogram farmaceutického preparátu CTZ je opět velmi jednoduchý a oddělení CTZ od Na<sup>+</sup> by bylo možné dosáhnout v širokém rozmezí koncentrace AcOH aniž by byl přidáván MeOH (Obr. 2C). Oproti tomu elektroferogram MD je obdobně komplexní jako v případě séra a pro dosažení baseline separace je nutné volit vysoce specifické složení BGE (Obr. 2D).

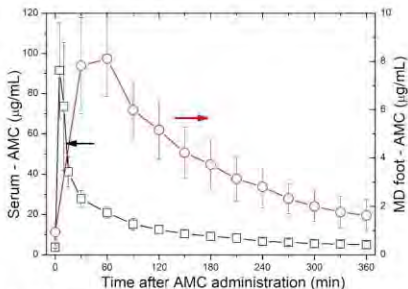
Dosažené LOD a LOQ vypočtené jako trojnásobek, respektive desetinásobek, šumu báseiny děleno směrnici pro výšku piků se pro AMX pohybují kolem hodnoty 40 µg/mL (LOD) a 140 µg/mL (LOQ); pro CTZ kolem hodnoty 100 µg/mL (LOD) a 330 µg/mL (LOQ). Tyto hodnoty jsou dostatečně nízké pro stanovení bazálních hladin obou ATB v séru i MD a současně vyhovující pro monitorování farmakokinetiky obou ATB.



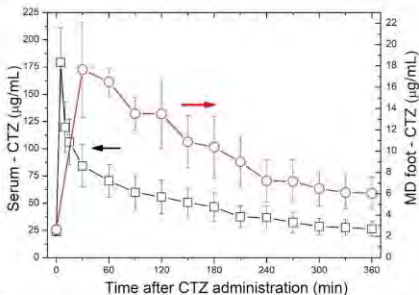
**Obr. 2.** Elektroferogramy CE/C4D stanovení AMX ve farmakologickém preparátu Amoksisklav (A) a v séru (B); elektroferogramy při stanovení CTZ v přípravku Fortuon (C) a v MD podkoží diabetické nohy (D).

Provedená farmakokinetické studie má ověřit, zda dochází k efektivní distribuci AMX and CTZ z krevního oběhu do podkoží u DE. Za tímto účelem je u předlečených pacientů aplikována intravenózně bolusová dávka ATB v množství 1,2 g AMX nebo 2,0 g CTZ a následně jsou kanylou odebírány vzorky venózní krve z vény horní končetiny a vzorky MD z podkoží v oblasti diabetické ulcerace na noze nemocného. Krev je vzorkována na počátku experimentu po 5, 10, 15 min intervalech a následně po 30 min, MD je vzorkován vždy po 30 min (Obr. 3, Obr. 4). Na počátku experimentu těsně před podáním ATB je v krvi monitorována bazální hladina ATB, z důvodu standardního zálečení ATB. Provedená měření potvrdila, že ATB se u všech 8 sledovaných pacientů úspěšně transportovalo z krve do podkoží a ani v jednom případě tak pacienti, jak potvrdila následná cévních vyšetření.





**Obr. 3.** Hladiny AMX v séru a MD z podkoží DM po i.v. aplikaci jednorázové dávky přípravku Amoksilav s obsahem 1,2 g AMX sledované u 5 pacientů. Chybové úsečky značí SEM ( $SD/\sqrt{n}$ ).



**Obr. 4.** Hladiny CTZ v séru a MD z podkoží DM po i.v. aplikaci jednorázové dávky přípravku Forte s obsahem 2,0 g CTZ sledované u 3 pacientů (chybové úsečky značí SEM).

#### Závěr

CE analýza prováděná v kapilárah o malém vnitřním průměru a krátké efektivní dráze je charakteristická vysokou separační účinností a krátkou dobou separace, které jsou důležitými parametry pro klinické stanovení antibiotik AMX a CTZ. Pro detekci v těchto kapilárah je vhodné používat univerzální C4D, která je v kombinaci s 25 µm kapilárami citlivější ve srovnání se standardní UV detekcí<sup>10</sup>. Úprava MD i séra pro CE/C4D stanovení je snadná a spočívá v profepání vzorku s ACN pro podlažení vodivosti klinického materiálu, která je pro

MD dostačující a u séra je doplněna centrifugací. Takto jednoduchá úprava vzorku umožňuje provádět reprodukovatelná stanovení AMX a CTZ i v malých objemech séra a MD v množství 15 – 20 µL a v případě potřeby se může ještě snížit. LOQ srovnatelného se standardním HPLC/UV stanovením AMX a CTZ se dosáhne zavedením on-line stacking spojeného s velkým dávkováním vzorku a doplněného hydrodynamickým vytlačněním zbytkové matrice ven z kapiláry. Vyvinutá technika nachází praktické uplatnění pro kontrolu vstupu AMX a CTZ z krevního oběhu do periferních tkání dolní končetiny u pacientů se syndromem DF a dále byla použita pro monitorování farmakokinetiky AMX a CTZ v krvi a podkoží DF.

#### **Acknowledgment**

Autoři děkují za finanční podporu GAČR, grant 22-22398S.

#### **References**

1. Fejfarová V., Jirkovská A., Petkov V., Bouček P., Skibová J.: *J. Diabetes Complicat.* **18**, 108 (2004).
2. de Marco B. A., Natori J. S. H., Fanelli S., Totoli E. G., Salgado H. R. N.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* **47**, 267 (2017).
3. Duan X. Y., Zhang Y., Yan J. Q., Zhou Y., Li G. H., Feng X. S.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* **51**, 55 (2021).
4. Tůma P., Jaček M., Sommerová B., Dlouhý P., Jarošíková R., Husáková J., Wosková V., Fejfarová V.: *Electrophoresis* **43**, 1 (2022).
5. Nandi P., Lunte S. M.: *Anal. Chim. Acta* **651**, 1 (2009).
6. Tůma P.: *J. Sep. Sci.* **37**, 1026 (2014).
7. Tůma P., Bursová M., Sommerová B., Horsley R., Čabala R., Hložek T.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **160**, 368 (2018).
8. Tůma P.: *Talanta* **224**, 1 (2021).
9. Tůma P., Gojda J.: *Electrophoresis* **36**, 1969 (2015).
10. Tůma P., Jaček M., Fejfarová V., Polák J.: *Anal. Chim. Acta* **942**, 139 (2016).

**Voltammetric Analysis of Mixtures of Selected Plant Protection Products using a  
Boron-doped Diamond Electrode**  
(**Voltametrická analýza směsí vybraných přípravků na ochranu rostlin s využitím  
borem dopované diamantové elektrody**)

Alona Usenko <sup>a</sup>, Jaromíra Chýlková <sup>a</sup>, Martin Kocúrik <sup>b</sup>, and Ondřej Slaviček <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Institute of Environmental and Chemical Engineering, Faculty of Chemical Technology,  
University of Pardubice, Studentská 95, 532 10 Pardubice, Czech Republic,  
E-mail: alona.usenko@student.upce.cz

<sup>b</sup> Institute of Organic Chemistry and Technology, Faculty of Chemical Technology,  
University of Pardubice, Studentská 95, 532 10 Pardubice, Czech Republic

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

### Abstract

This paper describes a method for the voltammetric determination of plant protection product mixtures, in particular fluxapyroxad and mefenflupir, using a boron-doped diamond electrode (BDDE). A total of five model mixtures of these compounds were studied. After evaluation of the results, it was found that for all the proposed ratios, both substances could be reliably determined, for example, RSD (FPX) ranged from 1.06 to 3.59 % and RSD (MFZ) ranged from 1.26 to 3.67 %.

**Keywords:** Fluxapyroxad, Mefenflupir, Boron-doped diamond electrode (BDDE), Differential pulse voltammetry

### Úvod

V současném světě je používání přípravků na ochranu rostlin základem úspěšného zemědělství a zahradnictví. Tyto látky jsou často toxické pro určitou skupinu organismů nebo složku životního prostředí, proto je důležité sledovat jejich obsah v životním prostředí. V naší práci vyvíjíme metody voltametrického stanovení přípravků na ochranu rostlin. V tomto článku bude popsána metoda stanovení fluxapyroxadu a mefenflupiru v modelových směsích těchto látek.

Fluxapyroxad (FPX) je SDHI-fungicid, což znamená, že inhibuje syntézu sukcinátdehydrogenázy v komplexu II mitochondriálního dýchacího řetězce, čímž zpomaluje klíčení spor, zárodečných trubic a růst mycelia hub. Proto se fluxapyroxad používá především ke kontrole a potlačování houbových chorob širokého spektra plodin, zejména rajčat a okurek, bavlny, arašídů, luskovin, obilovin atd. <sup>1-3</sup>. Mefenflupir (MFZ) je velmi účinný isopropanol-triazolový fungicid, který je rovněž široce používán při potlačování houbových chorob brambor, rajčat, jablek, papriky, sóji, peckového a jádrového ovoce. MFZ patří mezi fungicidy inhibující demetylaci sterolů (DMI). DMI fungicidy inhibují cytochrom P450 sterol 14 $\alpha$ -demetylázu a tím zabraňují biosyntéze ergosterolu a ničí strukturu buněčné membrány patogenů. Také díky své isopropanolové struktuře vykazuje absence rezistence vůči jiným triazolovým fungicidům <sup>4-7</sup>. Tyto dva fungicidy jsou spolu představeny ve směsních přípravcích na ochranu rostlin zejména v REVYTREXu a REVYSTARu XL, analýzou kterých se zabýváme v současné době.

Pro stanovení většiny fungicidů, pesticidů a regulátorů růstu rostlin se používá především kapalinová chromatografie (LC) s různými typy detektorů, nejčastěji však v tandemu s hmotnostním spektrometrem (LC-MS). Stanovení fluxapyroxadu a mefenflupiru

pomocí voltametrie nebylo dosud popsáno, přestože je tato metoda méně náročná a rychlejší než klasické instrumentální metody, proto se v naší práci zaměřujeme na její vývoj.

### Experimentální část

0,004 molární standardní roztoky fluxapyroxadu a mefentriflukonazolu byly připraveny navázáním příslušného množství vyzolovaných produktu z přípravků Sercadis (AgroBio Opava, s.r.o.) a Revystar (BASFI AG) resp., a jejich rozpuštěním v acetonitrilu čistoty p.a. (Penta). Isolace FPX a MFZ probíhala následovně: 10 g komerčního přípravku (Sercadis a Revystar resp.) byly rozpuštěny v 200 ml  $\text{CHCl}_3$ , organická fáze byla následně vysušena pomocí  $\text{MgSO}_4$ , přefiltrována a odpařena na vakuové rotační odparce. Surová směs byla přečištěna pomocí preparativní flash chromatografie na přístroji Buchi Reveleris® X2 Flash Chromatography vybaveném ELSD a UV/Vis detektorem za použití mobilní fáze Hexan:Ethylacetát. Identita a čistota vyzolovaných sloučenin byla potvrzena pomocí  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  NMR spektroskopie (Bruker AVANCE II 500 MHz), které jsou ve shodě s literaturou<sup>8,9</sup>.

Jako složka základního elektrolytu byl používán Britton-Robinsonův pufr, připravený smícháním kyselé (0,004 mol  $\text{L}^{-1}$  roztoky  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) a alkalické (0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  NaOH) složky do dosažení potřebného pH pod pH metrem MV 870 Pracitronic.

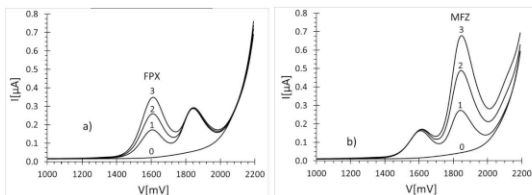
Voltametrická měření byla prováděna s využitím potenciostátu PGSTAT 128N ((AUTOLAB, Metrohm Autolab B.V., Utrecht, Nizozemsko) ovládaného softwarem NOVA 1.11) a tří-elektrodového měřicího článku. Jako pracovní elektroda byla používána borem dopovaná diamantová elektroda BDDE (Windsor Scientific LTD., aktivní povrch 7,07  $\text{mm}^2$ , vnitřní průměr 3 mm, odpor 0,075  $\Omega$  cm s poměrem B/C při depozici 1000 ppm), jako referentní elektroda byla používána nasycená argentochloridová elektroda ( $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$  (sat)), pomocnou elektrodou sloužila platinová elektroda od firmy Monokrystaly, Česká republika. Zkoumaní voltametrické povahy studovaných složek se provádělo s využitím cyklické voltametrie (CV) ( $E_{\text{poč}} = +600\text{mV}$ ,  $E_{\text{konc}} = +2200\text{mV}$ ) a jejich kvantitativní stanovení s využitím techniky diferenční pulzní voltametrie DPV (rozsah potenciálů od +500 do +2200 mV, rychlost polarizace ( $v$ ) 40 mV/s, šířka pulsu 80 ms, moduláční amplituda 50 mV).

### Výsledky a diskuse

Opirá se na výsledky našich dřívějších studií voltametrického chování fluxapyroxadu a mefentriflukonazolu, jako základní elektrolyt pro stanovení obou látek byl použit Britton-Robinsonův pufr s  $\text{pH}=9$  v přítomnosti 33% acetonitrilu. Také s využitím cyklické voltametrie bylo zjištěno, že jak v případě fluxapyroxadu tak i v případě mefentriflukonazolu se jedná o kineticky řízený ireverzibilní oxidační proces.

Voltametrické piky fluxapyroxadu se nacházejí v rozmezí od +1300 do +1680 mV s maximem v rozmezí od +1500 do +1530 mV. Na štěstí piky anodické oxidace mefentriflukonazolu jsou umístěny při více pozitivních potenciálech než piky fluxapyroxadu, zejména od +1560 do +1900 mV s maximem při +1780 mV, což znamená, že při analýze jejich směsi by neměl vznikat problém. Také byly prováděny kvantitativní a reprodukovatelná stanovení obou látek o různých koncentracích, bylo zjištěno, že jak pro FPX tak i pro MFZ se jedná o lineární závislosti výšky piku na zvyšující se koncentraci. Po vyhodnocení výsledků těchto analýz byly vypočteny hodnoty mezi stanovitelnosti, tak například pro FPX o koncentraci 0,038  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $1 \times 10^{-7}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ) byla dosažena mez stanovitelnosti  $\text{LOQ} = 0,011 \mu\text{g}/\text{ml}$  ( $2,88 \times 10^{-8}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ), a pro MFZ o koncentraci 0,02028  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $5,1 \times 10^{-8}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{LOQ}$  se rovnala 0,009  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $2,26 \cdot 10^{-8}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ).

Celkem bylo studováno voltametrické chování pěti různých modelových směsí fluxapyroxadu a mefentriflukonazolu, a to 1:1, 2:1, 1:2, 3:1 a 1:3 (poměr koncentrací  $c_{(FPX)} : c_{(MFZ)}$ ). Obr. 1 znázorňuje směs  $c_{(FPX)} : c_{(MFZ)} = 2:1$ , část a) – stanovení fluxapyroxadu o koncentraci 4,78  $\mu\text{g/ml}$  ( $1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), část b) – stanovení mefentriflukonazolu o koncentraci 2,55  $\mu\text{g/ml}$  ( $6,41 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) metodou standardního přidavku. I když píky studovaných látek jsou ve vyhovující vzdálenosti pro voltametrické stanovení, při vyšším nadbytku jedné látky, například při poměru  $c_{(FPX)} : c_{(MFZ)} = 3:1$  nebo  $c_{(FPX)} : c_{(MFZ)} = 1:3$ , při klasickém způsobu vyhodnocování byl pozorován vliv na stanovení druhé látky a naopak. Tento problém byl vyřešen s použitím počítačové separace píku.



**Obr. 1.** Píky anodické oxidace modelové směsi  $c_{(FPX)} : c_{(MFZ)} = 2:1$

0 – odezva základního elektrolytu, 1 – přidavek modelového vzorku směsi, 2, 3 – přidavky fluxapyroxadu, resp. mefentriflukonazolu.

Výsledky provedených analýz a jejich statistické zpracování jsou uvedené v Tabulce I. Z těchto dat můžeme usoudit, že u všech navrhovaných poměrů se dá spolehlivě stanovit obě látky, tak například  $RSD_{(FPX)}$  se pohybuje v rozmezí 1,06 – 3,59 %, a  $RSD_{(MFZ)}$  – 1,26 – 3,67 %. V současné době pracujeme nad stanovením těchto látek v reálných směsných přípravcích, zejména REVYTREXU, kde hmotnostní poměr  $m_{(FPX)} : m_{(MFZ)}$  se rovná 1:1, a REVYSTARU XL, kde hmotnostní poměr  $m_{(FPX)} : m_{(MFZ)}$  se rovná 1:2.

**Tabulka I.** Výsledky analýz modelových směsí FPX a MFZ

Ratio $c_{(FPX)}:c_{(MFZ)}$		Added [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Found [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Cl [ $\mu\text{g/ml}$ ]		Recovery [%]	RSD[%]
				LLCI	ULCI		
1:1	FPX	2.39	2.47±0.08	2.42	2.52	100-106.7	3.25
	MFZ	2.55	2.60±0.07	2.56	2.64	99.6-104.7	2.52
2:1	FPX	4.78	4.85±0.17	4.73	4.97	97.28-104.18	3.59
	MFZ	2.55	2.55±0.03	2.53	2.57	98.4-100.8	1.26
1:2	FPX	1.91	1.96±0.02	1.95	1.97	101.57-103.66	1.06
	MFZ	3.79	3.84±0.14	3.75	3.93	97.9-105.28	3.67
3:1	FPX	2.86	2.83±0.09	2.77	2.89	95.5-101.40	3.14
	MFZ	0.94	0.89±0.03	0.87	0.91	91.49-96.8	3.23
1:3	FPX	0.95	0.97±0.01	0.96	0.98	101.1-103.2	1.19
	MFZ	2.84	2.94±0.05	2.91	2.97	102.1-105.28	1.53

## Závěr

Byla vyvinuta metoda voltametrické analýzy modelových směsí fluxapyroxadu a mefentriflukonazolu s využitím BDDE. Z vyhodnocených výsledků můžeme usoudit, že u všech navrhovaných poměrů se dá spolehlivě stanovit obě látky. Vyvinuta metoda je vhodná pro využití v praxi, má dobrou citlivost a přesnost.

## Acknowledgments

This work was supported by the grant project of The Czech Science Foundation (project No. 20-01589S), and by The University of Pardubice (projects No. SGSFChT\_2022\_001).

## References

1. Wu X., Xu J., Liu Y., Dong F., Liu X., Zhang W., Zheng Y.: *J. Integr. Agric.* *14*, 114 (2015).
2. US EPA, Office of Chem. Safety and Env. Protection Agency Pollution Prevention (7505P), May 2012.
3. Lin H., Lin F., Yuan J., Cui F., Chen J.: *Sci. Total Environ.* *769*, 144519 (2021).
4. Li T., Li H., Liu T., Zhu J., Zhang L., Mu W., Liu F.: *Pestic. Biochem. Physiol.* *173* (2021).
5. An X., Pan X., Li R., Jiang D., Dong F., Zhu W., Xu J., Liu X., Wu X., Zheng Z.: *Food Chem.* *376* (2022).
6. Ishii H., Bryson P. K., Kayamori M., Miyamoto T., Yamaoka Y., Schnabel G.: *Pestic. Biochem. Physiol.* *171* (2021).
7. Li L., Sun X., Zhao X., Xiong Y., Gao B., Zhang J., Shi H., Wang M.: *J. Agric. Food Chem.* *69*, 4960 (2021).
8. BASF AGRO B.V.: WO2014108286
9. Zhang Y., Chen Z., Nie Jing., Zhang F-G., Ma J-A.: *J. Org. Chem.* *84*, 7148 (2019)

**Effect of 4-pyridyl and *p*-phenylenethioacetate Anchoring Groups on Electric Conductance of Anthraquinone-based Molecular Switch**  
**(Efekt 4-pyridylových a *p*-fenylenoacetátových kotviacích skupín na elektrickú vodivosť molekulových prepínačov na báze antrachinónu)**

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 23 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 effect of selected anchoring groups on the electric conductance of an anthraquinone-based molecular switch. We performed the conductance measurements applying the technique of breaking the metal–molecule–metal junctions with a scanning-tunnelling microscope setup. Presented data summarize the single-molecule conductance values of anthraquinone-based molecular switches with two different anchoring groups and provide important information about molecular junction formation and chemical stability issues. A brief discussion about the next course of investigation of these molecular compounds is also included.

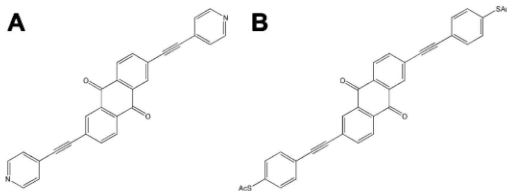
**Keywords:** Molecular electronics, Molecular switches, Anthraquinone, Single-molecule conductance, Scanning tunneling microscope-based break junction technique (STM-BJ).

### Úvod

Molekulárne prepínače predstavujú jednu z potenciálnych aplikácií organických molekúl v oblasti molekulárnej elektroniky. Z tohto hľadiska sa jedná o molekuly, ktoré je možné pomocou vonkajších stimulov reverzibilne prepínať medzi dvoma alebo viacerými (meta)stabilnými stavmi, ktoré sa vyznačujú rôznymi hodnotami molekulovej elektrickej vodivosti  $G$ . Vo všeobecnosti môžeme molekulárne prepínače rozdeliť do dvoch skupín: *konformačné*, u ktorých zmena molekulovej vodivosti  $G$  nastáva prostredníctvom izoménej zmeny 3D molekulovej štruktúry, a *redoxne aktívne*, kde zmena  $G$  súvisí s elektrochemickými redukčno-oxidačnými reakciami, ktoré prebiehajú v rámci molekuly a permanentne menia počet elektrónov v molekule. Ako vonkajšie stimuly na prepínanie medzi jednotlivými stavmi sa uplatňujú svetlo<sup>1,2</sup>, teplota<sup>3,4</sup>, elektrochemické deje<sup>5-8</sup> i chemické vplyvy okolitého prostredia (rozpušťaďa) ako napr. iónové zloženie<sup>9-12</sup>, acidobázické interakcie<sup>13</sup> a podobne. Vďaka týmto početným možnostiam kontroly prepínania molekulovej vodivosti  $G$  nie je potenciál molekulárných prepínačov obmedzený iba na funkciu vyplývajúcu z ich názvu, ale pri vhodne zvolených podmienkach môžu vybrané systémy fungovať ako molekulárny tranzistor<sup>14,15</sup>.

Predmetom skúmania v tejto práci boli organické molekuly s centrálnou funkčnou jednotkou tvorenou antrachinónom (Obr. 1). Antrachinón je cross-konjugovaný kyslíkatý derivát antracénu, o ktorom je z literatúry známe, že hodnota jeho vodivosti  $G$  je približne o dva rády menšia než u lineárne konjugovanej východzej látky – antracénu<sup>16,17</sup>. Patrí medzi redoxne aktívne molekuly, prijatím dvojice elektrónov a dvoch protónov sa redukuje na antracén-9,10-diol. Keďže táto redukovaná forma má rovnako ako antracén lineárne konjugovanú štruktúru,

predpokladaná hodnota jej molekulovej vodivosti  $G$  by mala byť v porovnaní s oxidovanou formou (antrachinónom) tiež rádoovo vyššia. Z toho dôvodu je redoxný pár antrachinón/antracén-9,10-diol považovaný za jeden z najperspektívnejších systémov na poli molekulárnych prepínačov<sup>18,19</sup>. Na pochopenie mechanizmov prepínania vodivosti u konkrétnej molekuly či skupiny molekúl je potrebná analýza viacerých faktorov ktoré majú vplyv na samotné procesy prepínania, ako sú mechanizmy transportu náboja, sila väzby medzi molekulou a elektrodou, energia hraničných molekulových orbitálov a tiež spinový stav nosičov náboja<sup>20</sup>. V dôsledku toho predstavuje štúdium prepínania vodivosti u organických molekúl komplexný proces, ktorý zahŕňa postupné skúmanie jednotlivých faktorov. Z literatúry je známe, že koncové (kotviace) skupiny organických molekúl majú výrazný vplyv na ich vlastnosti transportu náboja<sup>6,21-23</sup> vrátane molekulovej vodivosti  $G$ . Preto sme sa v tejto práci zamerali na vplyv vybraných kotviacich skupín, konkrétne 4-pyridylu (**A**, Obr. 1A) a *p*-fenylientoacetátu (**B**, Obr. 1B), na hodnotu molekulovej vodivosti  $G$  systému tvoreného oxidovanou formou redoxného páru antrachinón/antracén-9,10-diol, s kotviacimi skupinami naviazanými v polohách 2 a 6 cez etylénovú konjugovanú spojku.



**Obr. 1.** Chemická štruktúra skúmaných molekúl s centrálnou funkčnou antrachinónovou jednotkou a v polohách 2 a 6 cez etylénové spojky naviazanými 4-pyridylovými (**A**) a *p*-fenylientoacetátovými (**B**) kotviacimi skupinami.

### Experimentálna časť

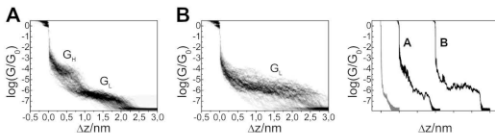
Merania boli vykonané na modifikovanom prístroji Agilent 5500SPM (Agilent Technologies) prostredníctvom kontinuálnej STM-BJ metódy<sup>24</sup>, pri ktorej je zlatý STM hrot opakovane približovaný k a odťahovaný od zlatého substrátu s aplikovanou vzorkou. Medzi hrotom a substrátom je naložené jednosmerné napätie  $U_{bias}$  a počas pohybu hrotu je kontinuálne zaznamenávaná hodnota elektrického prúdu  $I$  prechádzajúca obvodom. V prípade premenenia hrotu a substrátu skúmanou molekulou je na záznamovej krivke prúdu zaznamenané plató, ktorého stredná hodnota po prepočte použitím Ohmovho zákona  $G = IU_{bias}$  zodpovedá hodnote vodivosti  $G$  molekuly. 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  $10 \times 10 \times 1$  mm (99,95 %, Goodfellow). Laboratórne sklo na prípravu vzoriek, zlatý substrát, PTFE cely vlastnej výroby a tesniace Kalrez O-krúžky (DuPont) použité v experimente boli vyčistené vyvarením v 25 % roztoku kyseliny dusičnej (65 % p.a., Lach-Ner) pripravenom zriedením kyseliny ultračistou vodou (merný el. odpor min. 18,2 M $\Omega$  cm, obsah zvyškového uhlíka max. 3 ppb, Milli-Q Integral 5, Merck Millipore). Laboratórne sklo, cely a O-krúžky boli následne opakovane vyvarené v ultračistej vode a cez noc vysušené pri teplote 120 °C. Zlatý substrát bol po vyvarení v kyseline dôkladne opláchnutý ultračistou vodou a uskladnený v ultračistej vode až do okamihu vykonania experimentálnych meraní. Vzorky skúmaných látok **A** a **B** boli pripravené rozpustením látok s koncentráciou 0,5 mM v 1,3,5-



trimetylbenzéne (98 %, Sigma Aldrich). Pri príprave vzorky látky **B** bola pozorovaná nízka rozpustnosť látky, čo bolo kompenzované pridaním 10 % v/v tetrahydrofuránu (bezvodý, 99,9 %, Sigma Aldrich). Pred samotným meraním bola na meracej platforme STM prístroja zostavená kvapalinová meracia cela zložená z PTFE cely a zlatého substrátu, vzájomne oddelených tesniacim O-krúžkom. Substrát bol bezprostredne pred montážou do cely vyžihávaný propán butánovým plameňom a ochladený v atmosfére plynného dusíka (99,996 %, Messer). Následne bolo 100  $\mu\text{l}$  roztoku látky **A** alebo **B** napipetovaných do objemu meracej cely a meracia platforma bola vložená do prístroja.

### Výsledky a diskusia

Obrázky 2A a 2B znázorňujú 2D histograme kriviek vodivosti  $G$  vynesenej v závislosti od vzdialenosti STM hrotu od substrátu, označenej ako  $\Delta z$ . Experimentálne dáta boli získané kontinuálnou STM-BJ metódou pri rýchlosti odťahovania STM hrotu od vzorky  $0,92 \text{ nm s}^{-1}$ . Vodivosť  $G$  je v histogramoch škálovaná ako hodnota  $\log(G/G_0)$ , kde  $G_0 = 2e^2/h = 77,5 \mu\text{S}$  je vodivosť kvantum a ktorého hodnota je stotožnená s hodnotou vodivosti jednoatómového kontaktu zlato-zlato medzi STM hrotom a substrátom. Z vyobrazených histogramov je zrejme, že molekuly látok **A** i **B** ochotne tvoria molekulové spojenia premostením elektród STM-BJ prístroja. U molekúl látky **A** boli v experimente pozorované dve dominantné platá. Na Obr. 2A sú spomínané platá rozlíšené označením ako  $G_H$  resp.  $G_L$  odkazujúc na vyššiu (*high*) resp. nižšiu (*low*) približnú strednú hodnotu ich vodivosti. Prítomnosť dvoch vodivostných plat si vysvetľujeme existenciou dvoch rôznych konfigurácií molekulového spojenia elektróda-molekula **A**-elektróda, typických pre molekuly terminované pyridylovými kotviacimi skupinami<sup>25</sup>. Platá  $G_L$  sme stotožnili s krivkami molekulovej vodivosti spojenia, pri ktorom molekula látky **A** premostí elektródy skrz celú svoju dĺžku, kontaktovaná cez atómy dusíka na 4-pyridylových kotviacich skupinách. V prípade molekúl látky **B** bolo identifikované iba jedno platá so značne väčším rozptylom hodnôt vodivostných kriviek. V histograme na Obr. 2B je toto platá označené ako  $G_L$ . Aj toto platá sme analogicky stotožnili s krivkami molekulovej vodivosti spojenia elektróda-molekula **B**-elektróda skrz celú dĺžku molekuly, pričom v tomto prípade sme uvažovali kontakt molekuly **B** na elektródy cez karbonylové uhliky na acetylových termináloch kotviacich *p*-fenyléntioacetátových skupín. Platá opísané u molekúl látok **A** a **B** sú jasne viditeľné aj v prípade zobrazenia exemplárov individuálnych vodivostných kriviek, znázornených na Obr. 2 vpravo.



**Obr. 2.** 2D histograme vodivostných kriviek jednotlivých molekúl látky **A** (vľavo) a látky **B** (uprostred) v závislosti od vzdialenosti  $\Delta z$  STM hrotu od substrátu, s charakteristickými platami vodivosti, označenými ako  $G_H$  a  $G_L$ . Vpravo: individuálne vodivostné krivky, škálované na hodnotu  $\log(G/G_0)$  v prípade neprítomnosti molekuly (šedá) a v prípade premostenia elektród STM-BJ prístroja molekulou **A** a molekulou **B**.

Výsledky analýzy experimentálnych dát sú zhrnuté v Tabuľke I. Uvedené experimentálne hodnoty molekulovej vodivosti  $G_L$  prepočítané na  $\log(G_L/G_0)$  a dĺžky  $z_{exp}$  molekulového

spojenia pre obe látky sú získané analýzou príslušných plat individuálnych vodivostných kriviek z Obr. 2 vpravo. Vzhľadom na to, že kľúčové sú pre nás hodnoty vodivosti molekulových spojení, pri ktorých molekuly premostia elektródy skrz celú svoju dĺžku, hodnotu vodivosti  $G_H$  u molekuly **A** sme do výslednej analýzy nezahrnuli. Hodnoty  $z_{exp}$  boli vypočítané ako  $z_{exp} = \Delta z + z_{corr}$ , kde  $\Delta z$  je dĺžka plata s hodnotou vodivosti  $G_L$  u príslušnej vodivostnej krivky a  $z_{corr} = 0,4$  nm je korekcia vzhľadom na tzv. „snap-back“ efekt, kedy nastáva skoková zmena dĺžky pri prerušení kontaktu zlato-zlato počas odťahovania STM hrotu od substrátu<sup>11</sup>. Pre porovnanie sú v tabuľke uvedené teoretické aproximácie dĺžky molekulového spojenia  $z_{th}$ , získané zo simulácie energeticky minimalizovaných chemických štruktúr molekúl **A** a **B** v programe Spartan'08 a odmeraním vzdialenosti medzi kontaktnými atómami na kotviacich skupinách (pozri text v predošlom odstavci).

**Tabuľka 1.**

Prehľad experimentálnych hodnôt molekulovej vodivosti  $G_L$ , experimentálnych hodnôt  $z_{exp}$  a teoretických hodnôt  $z_{th}$  dĺžky molekulového spojenia u skúmaných molekúl.

Molekula	$\log(G_L/G_0)$	$z_{exp}$ / nm	$z_{th}$ / nm
<b>A</b>	$-6,23 \pm 0,29$	2,1	2,1
<b>B</b>	$-5,74 \pm 0,22$	2,8	2,6

Z hodnôt uvedených v Tabuľke 1 je vidieť, že hodnoty dĺžok  $z_{exp}$  a  $z_{th}$  sú vo veľmi dobrej zhode, z čoho vyplýva že nami namerané vodivostné krivky skutočne reflektujú namerané hodnoty vodivosti jednotlivých molekúl. Na základe hodnôt  $\log(G_L/G_0)$  s priradiťmi na 2D histogramy na Obr. 2 môžeme konštatovať, že aj keď je rozptyl vodivostných kriviek počas experimentu u molekuly **A** značne menší než u molekuly **B**, hodnota molekulovej vodivosti  $G_L$  je u molekuly **B** približne trojnásobná oproti vodivosti molekuly **A**. To je samo o sebe pozoruhodné vzhľadom na to, že acetyl má vo všeobecnosti nízku afinitu k materiálu elektród (zlato) a zvyčajne sa používa iba ako chrániaca skupina inej terminálnej skupiny. Pôvodným zámerom tejto štúdie, v odlišnosti od už predtým publikovaných prác<sup>16,19</sup> bolo totiž študovať molekulovú vodivosť látky **B** v deprotektovanom stave, teda s kotviacimi *p*-fenyléntiolovými skupinami, ktorý má vysokú afinitu ku zlato. Za týmto účelom bola pripravená vzorka 0,5 mM roztoku látky **B** v 1,3,5-trimetylbenzéne s prídavkom 4,65 % v/v etanolu (absolútny p.a., PENTA) kvôli zvýšeniu rozpustnosti a 10 % v/v trietylamínu (BioUltra  $\geq 99,5$  %, Sigma Aldrich) ako deprotektovacieho činidla. Počas meraní vzorky na STM-BJ prístroji sme však pozorovali tvorbu vodivostných kriviek s dĺžkou niekoľkonásobku teoretickej hodnoty  $z_{th}$  pre molekulu **B** a s rozptylom hodnôt vodivosti v rozsahu niekoľkých rádov až do maxima  $\log(G/G_0) \approx -4$ . Na základe tejto skúsenosti sme dospeli k uzáveru, že u deprotektovaných molekúl látky **B** s najväčšou pravdepodobnosťou dochádza ku samovoľnej oligomerizácii, čo v princípe znemožňuje skúmanie molekulovej vodivosti deprotektovanej formy látky **B**. Napriek tomu nám tento pokus poskytol hodnotné informácie nielen o riziku oligomerizácie pri deprotektovaní látky **B**, ale aj o nízkej miere rozpustnosti základnej látky v 1,3,5-trimetylbenzéne a tiež o nutnosti použiť na zvýšenie rozpustnosti aprotické polárne rozpúšťadlo (tetrahydrofurán).

## Záver

Cieľom tejto práce bolo skúmať vplyv kotviacich skupín 4-pyridylu a *p*-fenyléntioacetátu na hodnotu molekulovej vodivosti u syntetizovaných organických látok na báze antrachinónu s potenciálnou funkčnou aplikáciou vo forme molekulárných prepínačov. Pomocou meraní vykonaných STM-BJ metódou merania vodivosti boli experimentálne stanovené hodnoty molekulových vodivosti  $G_L$  a tiež dĺžky molekulových spojení  $z_{exp}$  u oboch skúmaných látok **A** a **B**. Hodnoty dĺžky  $z_{exp}$  boli v dobrej zhode s teoretickými hodnotami získanými analýzou

štruktúr molekúl A a B v programe Spartan'08. Bola pozorovaná vyššia hodnota  $G_L$  u látky B v porovnaní s látkou A napriek nižšej afinitě *p*-fenyléntioacetátu ku zlatu oproti 4-pyridílu. Pokus o zmeranie molekulej vodivosti deprotektovaných molekúl látky B nebol úspešný, s veľkou pravdepodobnosťou v dôsledku samovoľnej oligomerizácie.

### Acknowledgments

Financial support by the Czech Science Foundation (21-13458S) and by Mobility Plus Projects of the Czech Academy of Sciences (MTA-22-02) is gratefully acknowledged.

### References

1. Sendler T. a 10 spoluautorov: *Adv. Sci.* 2, 1500017 (2015).
2. Ke G., Duan Ch., Huang F., Guo X.: *InfoMat* 2, 92 (2020).
3. Weigelt S., Busse C., Petersen L., Rauls E., Hammer B., Gothelf K. V., Besenbacher F., Linderoth T. R.: *Nat. Mater.* 5, 112 (2006).
4. Darwish N., Aragonés A. C., Darwish T., Ciampi S., Díez-Pérez I.: *Nano Lett.* 14, 7064 (2014).
5. Guo S., Artés J. M., Díez-Pérez I.: *Electrochim. Acta* 110, 741 (2013).
6. Huang C., Rudnev A. V., Hong W., Wandlowski T.: *Chem. Soc. Rev.* 44, 889 (2015).
7. Nichols R. J., Higgins S. J.: *Acc. Chem. Res.* 49, 264 (2016).
8. Hromadová M., Vavrek F.: *Curr. Opin. Electrochem.* 19, 63 (2020).
9. Capozzi B., Xia J., Adak O., Dell E. J., Liu Z.-F., Taylor J. C., Neaton J. B., Campos L. M., Venkataraman L.: *Nat. Nanotech.* 10, 522 (2015).
10. H. M. Osorio a 14 spoluautorov: *J. Am. Chem. Soc.* 137, 14319 (2015).
11. Kolivoška V., Šebera J., Severa L., Mészáros G., Sokolová R., Gasior J., Kocábová J., Hamill J. M., Pospíšil L., Hromadová M.: *ChemElectroChem* 6, 585 (2019).
12. Li J., Pudar S., Yu H., Li S., Moore J. S., Rodríguez-López J., Jackson N. E., Schroeder Ch. M.: *J. Phys. Chem. C* 125, 21862 (2021).
13. Liu X., Li X., Sangtarash S., Sadeghi H., Decurtins S., Häner R., Hong W., Lambert C. J., Liu S.-X.: *Nanoscale* 10, 18131 (2018).
14. Kay N. J., Higgins S. J., Jeppesen J. O., Leary E., Lycoops J., Ulstrup J., Nichols R. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 134, 16817 (2012).
15. Perrin M. L., Burzuri E., van der Zant H. S. J.: *Chem. Soc. Rev.* 44, 902 (2015).
16. Hong W., Valkenier H., Mészáros, G.; Manrique D. Z., Mishchenko A., Putz A., Garcia P. M., Lambert C. J., Hummelen J. C., Wandlowski T.: *Beilstein J. Nanotechnol.* 2, 699 (2011).
17. Valkenier H., Guedon C. M., Markussen T., Thygesen K. S., van der Molen S. J., Hummelen J. C.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16, 653 (2014).
18. Baghernejad M. a 13 spoluautorov: *J. Am. Chem. Soc.* 136, 17922 (2014).
19. Carlotti M., Soni S., Qiu X., Sauter E., Zharnikov M., Chiechi R. C.: *Nanoscale Adv.* 1, 2018 (2019).
20. Liu Z., Ren S., Guo X.: *Top. Curr. Chem.* 375, 56 (2017).
21. Chen F., Li X., Hihath J., Huang Z., Tao N.: *J. Am. Chem. Soc.* 128, 15874 (2006).
22. Widawsky J. R., Darancet P., Neaton J. B., Venkataraman L.: *Nano Lett.* 12, 354 (2012).
23. Li Z., Smeu M., Ratner M. A., Borguet E.: *J. Phys. Chem. C* 117, 14890 (2013).
24. Xu B., Tao N. J.: *Science* 301, 1221 (2003).
25. 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).

## Electrochemical Deposition of Palladium Nanoparticles on a Boron-Doped Diamond Electrode

(Elektrochemická depoziícia paládiových nanočastic na bórom dopovanej diamantovej elektróde)

Marian Vojs<sup>a</sup>, Oleksandr Matvieiev<sup>b</sup>, Michal Hatala<sup>c</sup>, Renáta Šelešová<sup>b</sup>, Martin Vrška<sup>a</sup>, Pavol Michniak<sup>a</sup>, Miroslav Behúl<sup>a</sup>, and Marián Marton<sup>a</sup>

<sup>a</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, E-mail: marian.vojs@stuba.sk

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

<sup>c</sup> Department of Graphic Arts Technology and Applied Photochemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic

### Abstract

The aim of this study is to prepare palladium nanoparticles (PdNPs) by electrochemical techniques (constant and pulse mode) on unique boron-doped diamond electrodes (BDDE) fabricated by a combination of large-area microwave chemical vapor deposition (LA MWCVD) and screen-printing technique. By analyzing the maximum of dopamine as a representative of biomolecules, we evaluated the optimal coverage of BDDE by PdNPs on the surface and determined the amplification of the effective signal. As a result, by utilizing the optimized conditions, the signal of dopamine was amplified up to 7 and 5 times for the positive pulse and constant mode, respectively. The use of PdNPs modified BDDE can allow its application not only for the determination of biomolecules but also for other substances in a harsh environment.

**Keywords:** Boron-doped diamond electrode, Palladium nanoparticles, Electrochemical characterization, Electroanalysis.

### Úvod

Inštrumentálne metódy analýzy sa v posledných rokoch široko používajú v analytickej chémii a ochrane životného prostredia. Voltampérometrické metódy analýzy čoraz viac vytlačujú iné metódy pre svoje výhody: cenu, rýchlosť, jednoduchosť prípravy, ale aj s nevýhodou niekedy menej presná analýza. Najdôležitejším prvkom voltampérometrických a polarografických meraní je materiál pracovnej elektródy. Bórom dopovaná diamantová elektróda (BDDE) sa stala široko používanou a preukázala sa ako dobrá náhrada toxického ortuti. BDDE má množstvo výhod: široké elektrochemické okno, mechanicky stabilná, netoxická, chemicky odolná a odolná voči pasivácii<sup>1-4</sup>. Tieto výhody umožnili vyvinúť nové typy senzorov, ktoré v sebe integrujú techniku prípravy BDD pomocou veľkoplošnej lineárnymi anténami mikrovlnnej podporenej chemickej depoziícií z pár (LA MWCVD) a sieťotlač, ktoré v porovnaní s komerčne dostupnými elektródovými systémami ukázali unikátne vlastnosti<sup>5</sup>. Potreby aplikácií senzorov pre vedecké a/alebo aplikačné uplatnenie si vyžaduje vytvorenie nových elektródových materiálov, a to aj na báze BDDE. Na zvýšenie selektivity a katalytické vlastnosti sa veľmi často využívajú úpravy povrchu elektród nanočasticami kovov, oxidov, uhľikových materiálov, organických zlúčenín, polymérov a biomolekul<sup>6</sup>. Modifikácia bórom dopovanej diamantovej elektródy nanočasticami paládia sa dobre osvedčila ako katalyzátor pre elektrooxidáciu etanolu<sup>7</sup>, elektroredukcii oxidu uhličitého<sup>8</sup>, kyslíkové senzory<sup>9</sup>, stanovenie hydrazinu<sup>10</sup>. Vo väčšine prípadov sa na získanie nanočastic paládia používa elektrolytické nanášanie. V súčasnosti v literatúre nie sú žiadne informácie o vplyve potenciálu a času elektrodepozície

na morfológické charakteristiky a distribúciu nanočastíc paládia na povrchu BDDE. Neexistujú ani informácie o účinkoch elektrolytického nanášania, ako je použitie pulzov.

Táto práca sa venuje štúdiu prípravy (konštantný potenciál vs. pulzný režim) PdNPs na BDDE elektródovom systéme s cieľom možnosti využitia takto modifikovaného senzora na analýzu biologicky aktívnych látok.

### Experimentálna časť

Pre túto štúdiu sa použili kombinované troj-elektrodové elektrochemické senzory (LM-SP/BDDE) s  $\varnothing = 3 \text{ mm}$  ( $7,07 \text{ mm}^2$ ) pracovnou a pomocnou z BDD pripravenej CVD procesom a kvázi-referenčnou elektródou Ag/AgCl použitím screen-printing technikou a chloridáciou. Rast BDD sa uskutočnil v LA MWCVD reaktore (Cube 300, Scia Ltd., Chemnitz, Nemecko) s použitím 6 kW mikrovlňného výkonu počas 30 h, pri teplote substrátu  $590 \text{ }^\circ\text{C}$  a tlaku 30 Pa. Koncentrácia trimetylborátu (TMBT, Sigma-Aldrich,  $\geq 99,0 \%$ ) bola zavedená do komory po oparení ako 1 % zmes s koncentráciou  $\text{CO}_2$  0,2 % vzhľadom na vodík. Výsledný B/C pomer v plynnej zmesi TMBT/ $\text{CO}_2$ / $\text{H}_2$  bol 312 500 ppm.

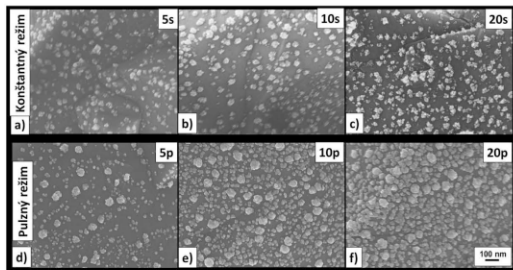
Všetky elektrochemické merania sa uskutočnili pomocou Autolab PGSTAT204. Voltampérometrické merania boli realizované pomocou tradičného trojelektrodového systému, ktorý pozostával z pracovnej elektródy BDDE, pomocnej elektródy – platiny, referenčnej elektródy - nasýtenej chloridostriebornej elektródy.

Elektrochemická modifikáciu BDD elektródy bola vykonávaná pri rýchlosti 100 mV/s, kde počiatočný potenciál bol 1 500 mV, spínací potenciál -500 mV, koncový potenciál bol 1 500 mV v 1 mM  $\text{PdCl}_2$  v elektrolyte 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Elektrodepozícia sa uskutočnila pomocou dvoch rôznych metód. Prvý potenciostaticky s použitím konštantného potenciálu (tzv. konštantný režim)  $E_{\text{dep}} = -200 \text{ mV}$ , čas elektrolyzy bol 5, 10, 20 s. Druhá modifikačná technika (tzv. pulzný režim) sa použili katódové pulzy  $E_{\text{depK}} = -400 \text{ mV}$  po dobu  $t_{\text{depK}} = 1 \text{ s}$  a anódových pulzov  $E_{\text{depA}} = 400 \text{ mV}$  po dobu  $t_{\text{depA}} = 3 \text{ s}$ . Takýchto pulzov bolo 5, 10 a 20. Vyhodnotenie modifikácie sa uskutočnilo meraním diferenciálneho pulzného voltampérogramu (DPV) 100  $\mu\text{M}$  dopamínu v roztoku 0,1 M fosfátového tlmivého roztoku s pH 7,44. Parametre DPV boli počiatočný potenciál -300 mV, koncový potenciál 300 mV, amplitúda modulácie +50 mV, rýchlosť polarizácie 50 mV/s, čas modulácie 50 ms.

Na spracovanie snímok z elektrónového rastrovacieho mikroskopu SEM (JEOL, Japonsko) a následné vyhodnotenie veľkosti častíc a plochy obsadenosti PdNPs bol použitý open source program ImageJ 1.8.0.

### Výsledky a diskusia

Na obrázku 1. je vidieť SEM snímky z povrchu modifikovaných BDDE PdNP pripravených dvoma režimami (konštantným a pulzným). Pri konštantnom potenciostatickom režime (obr. 1a-c) sa so zvyšujúcim časom depozície (z 5 do 20s) zväčšuje len plocha deponovaných PdNP z cca 10 % na 20 %. Priemerná veľkosť nanočastíc (20-30 nm) sa s časom depozície zásadne nemení. V prípade pulzného režimu (obr. 1d-f) dochádza k zmene veľkosti a plochy obsadenia PdNP zásadnejším spôsobom. Pri piatich pulzoch je veľkosť PdNP dvoch typov. Prvý typ  $\sim 10 \text{ nm}$  samostatné nanočastice a 30-50 nm klastre. Zvyšovaním počtu pulzov (10 a 20p) sa zväčšuje zastúpenie klastrov so zväčšujúcou sa obsadenosťou pokrytej plochy BDDE z 15, 25 až 38 % pre 5, 10, 20 pulzov.



**Obr. 1.** SEM snímka elektrodepozície CdNP v dvoch režimoch: konštantný – poteciostatický ( $E_{\text{depK}} = -200$  mV) pri a) 5s, b) 10s, c) 20s a pulzný režim ( $E_{\text{depK}} = -400$  mV,  $t_{\text{depK}} = 1$ s,  $E_{\text{depA}} = 400$  mV,  $t_{\text{depA}} = 3$ s).

Voltampérogam meraný v roztoku 1 mM  $\text{PtCl}_2$  a 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (obr. 2) je konvenčne rozdelený do 6 zón. Predpokladáme možné reakcie, ktoré môžu nastať na elektróde. Zóna 1: V tejto zóne nedochádza k žiadnej reakcii, čo potvrdzuje voltamogram nameraný v podpornom elektrolyte, ktorý je takmer identický. Zóna 2: tu máme vrchol, ktorý môže zodpovedať reakcii redukcie paládiových iónov do kovovej nanočastice na povrchu BDD elektródy reakciou:



Zóna 3: Pokračuje reakcia 1 redukcie paládiových iónov s reakciou vývoja vodíka:



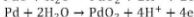
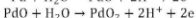
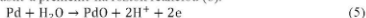
Z literatúry je známe, že paládium (ktoré je už na povrchu BDDE po zóne 2) má Tafelovu konštantu  $a = 0,24$  V, čo sa týka elektrochemickej skupiny kovov s nízkym vodíkovým prepätím<sup>11</sup>. To znamená, že paládium pôsobí ako katalyzátor elektrochemickej redukcie vodíka. V podpornom elektrolyte vývoja vodíka bol pozorovaný pri oveľa zápornejších potenciáloch  $-0,5$  V. Vodík vznikajúci ako výsledok elektrochemickej redukcie (2) môže vstúpiť do chemickej reakcie za vzniku hydridov s paládiom. Potvrzuje to Purbeov diagram, v kyslom prostredí pri záporných potenciáloch má hydrid paládatný väčšiu termodynamickú stabilitu ako čisté paládium, táto reakcia je nasledovná<sup>12</sup>:



Zóna 4: V tejto zóne končí termodynamická stabilita hydridu paládatného, takže reverzná reakcia k (3):



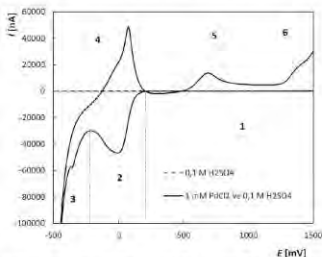
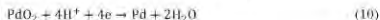
Zóna 5: Nanočastice paládia môžu oxidovať alebo sa rozpúšťať na ióny. V tomto prípade môže tento proces prebiehať v etapách, najskôr sa vytvorí PdO, ktoré sa môže neskôr oxidovať na vyšší stupeň oxidácie  $\text{PdO}_2$ , alebo môže tento proces prebiehať v jednom kroku reakciou (5-7). Paládium sa môže tiež rozpustiť a premeniť na roztok reakciou (8).



Zóna 6: V tejto zóne je už termodynamicky možný proces rozkladu vody na kyslík a zvýšenie stechiometrie oxidov, ktoré by mohli vzniknúť reakciou (9).



Pri premeraní voltamogramov (obr. 2) existuje zóna 7, ktorá zodpovedá procesu redukcie oxidu reakciou:



**Obr. 2.** Cyklický voltampérogram meraný v roztoku 1 mM PdCl<sub>2</sub> a 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pri rýchlosti polarizácie 100 mV/s.

V Tab. 1 je porovnanie maxima dopamínu ako modelovej biologickej molekuly vzhľadom na modifikáciu povrchu BDDE s PdNP k nemodifikovanej BDDE. Pozitívny vplyv pulznej modifikácie je vidieť už pri použití 10 pulzov, kedy dochádza k 5x väčšiemu signálu voči 1,7x pre konštantný režim. Ďalším zvyšovaním času a počtu pulzov, dochádza ku kulminácii výšky maxima (výsledky nie sú uvedené v tejto práci) na 6x (konštantný režim) resp. až 7x (pulzný režim) voči nemodifikovanej elektróde. Porovnaním týchto výsledkov a SEM snímok, dochádzame k záveru, že zásadný vplyv na zisk majú klastre nanočastíc o veľkosti 30-50 nm a ich distribúcia na povrchu.

#### Tabuľka 1.

Výšky maxima pre 100 μM dopamín v 0,1 M fosfátovom tlmivom roztoku s pH 7,44.

	Konštantný režim (s)			Pulzný režim (pulz)			
	BDDE	5	10	20	5	10	20
<i>I<sub>p</sub></i> (nA)	341,14	308,18	594,99	2 115,30	206,69	1 781,00	2 385,40

#### Záver

V tejto práci sme sa venovali modifikácii BDDE pomocou nanočastíc paládia konštantným a pulzným režimom. Predbežné štúdie chemických reakcií nám umožňujú vybrať potenciál pre elektrodepozíciu nanočastíc paládia v oboch režimoch. Použitím celkovo 20 pulzov dosiahneme optimálne zväčšenie signálu dopamínu až 7x pomocou DPV. Výhodou použitia PdNPs je možnosť stanovenia dopamínu v katódickej oblasti, kde by nemuselo dochádzať k interakcii s interferujúcimi látkami z anódickej časti. Proces elektrodepozície PdNPs na povrchu BDD elektródy je zložitý a vyžaduje si ďalšie elektrochemické kinetické štúdie

s cieľom využiť PdNPs modifikované BDD senzory pre analýzu nielen biologických aktívnych látok v environmentálnom prostredí.

### Acknowledgments

Predmetná práca vznikla za finančnej podpory VEGA grantov 1/0554/20, 1/0631/22 a v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: „Strategický výskum v oblasti SMART monitoringu, liečby a preventívnej ochrany pred koronavírusom (SARS-CoV-2), Kód ITMS2014+: 313011ASS8, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja, Grantové agentúry ČR (projekt č. 20-01589S) a Univerzity Pardubice (projekt č. SGSFChT\_2022\_001).

### References

1. Fujishima A., Einaga Y., Rao T.N., Tryk D.A.: *Diamond Electrochemistry*. Elsevier, Amsterdam 2005.
2. Kraft A.: *Int. J. Electrochem. Sci.* ???, 355 (2007).
3. Luong J.H.T., Male K.B., Glennon J.D.: *Analyst* 134, 1965 (2009).
4. Xu J., Granger M.C., Chen Q., Strojek J.W., Lister T.E., Swain G.M.: *Anal. Chem.* 69, 591A (1997).
5. Matvieiev O., Šelešovská R., Vojs M., Marton M., Michniak P., Hrdlička V., Hatala M., Janíková L., Chýlková J., Skopalová J., Cankař P., Navrátil T.: *Biosensors* 12, 241 (2022).
6. Matvieiev O., Šelešovská R., Janíková L.: *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A* 27, 73 (2021).
7. Mavrokefalos, C.K., Hasan, M., Khunsin, W., Schmidt, M., Maier, S. A., Rohan, J. F., Foord, J. S.: *Electrochim. Acta* 243, ??? (2017).
8. Jiwanti P.K., Einaga Y.: *Phys. Chem. Chem.Phys.* 21, 15297 (2019).
9. Szunerits S., Boukherroub R.: *C. R. Chim.* 11, 1004 (2008).
10. Batchelor-McAuley C.E., Banks A.O., Simm T.G.J., Jones R.G. Compton.: *Analyst* 131, 106 (2006).
11. Antropov L.I. *Teoretická elektrochémia*. Intl Law & Taxation Pub (1972).
12. Takeno, N., *Atlas of Eh-pH diagrams*. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Research Center for Deep Geological Environments (2005).



## Development of Voltammetric Methods for Detection of Phytosterols on Carbon-based Electrodes

(Vývoj voltametrických metod pro detekci fytoosterolů na elektrodách na bázi uhlíku)

Michal Zelenský, Kristýna Jelšíková, 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: zelenskm@natur.cuni.cz

### Abstract

The aim of this work was to develop an electrochemical method for the detection of three phytosterols, namely  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, and ergosterol using voltammetric techniques on glassy carbon electrode, and boron-doped diamond electrode. They are oxidized at far positive potentials in acetonitrile containing a strong inorganic acid or perchlorate as a supporting electrolyte. Calibration dependences were measured using differential pulse voltammetry and micromolar detection limits were obtained under optimized conditions. Further, the stability of the anodic signal was tested in dependence on the water content in the measured media and its pH, using phosphate and acetate buffer solutions. Sufficient signal stability is prospective for amperometric detection of phytosterols in liquid flow techniques after their separation.

**Keywords:** Boron-doped diamond electrode, Dehydration, Glassy carbon electrode, Oxidation, Phytosterols, Voltammetry.

### Úvod

Steroly jsou jednou ze základních složek membrán u eukaryotických organismů. Slouží jako regulační dynamiky membrány, signální molekuly a také mění funkci proteinů navázaných na membránu<sup>1</sup>. Steroly jsou ze skupiny terpenoidů. Jedná se o velkou skupinu přírodních látek, které jsou syntetizovány z izoprenových podjednotek<sup>2</sup>. Řadíme je mezi triterpenoidy se steroidním skeletem, který je derivátem skvalenu. Tyto sloučeniny se podílejí na regulaci životně důležitých procesů u vyšších rostlin, řas, většiny hub a obratlovců<sup>3,4</sup>. Za zmínku jistě stojí, že každý typ buněčné membrány má jako hlavní složku specifický sterol. U savců se jedná o cholesterol, ergosterol u hub a sito/stigmasterol u vyšších rostlin<sup>1</sup>.

Uhlíkové elektrody založené na diamantové struktuře s  $sp^3$  hybridizovanými uhlíky jsou perspektivními elektrodovými materiály, a to hlavně díky velmi dobrým vlastnostem diamantu jako je jeho chemická inertnost či tvrdost. Bórem dopované diamantové elektrody (BDD) se od svého zavedení v oblasti elektroanalýzy zasloužily o značnou popularitu a jsou dnes považovány za dobře zavedený elektrodový materiál. Je všeobecně známo, že BDD elektrody mají několik výhod oproti tradičním kovovým (zlatá, platinová) nebo uhlíkovým elektrodám (pyrolyticky uhlík, elektroda ze skelného uhlíku, uhlíková pasta). BDD elektroda poskytuje velmi široké potenciálové okno (ve vodných prostředích 3–3,5 V). Také má nižší a stabilní proud pozadí, což je způsobeno malou diferenciální kapacitou BDD povrchu. Ve výsledku tyto vlastnosti vedou ke zvýšení poměru signál:šum nebo signál:průd pozadí, a tím pádem ke zlepšení parametrů detekce pro mnohé organické látky<sup>5,6,7</sup>. Jedna z možností, jak upravit BDD povrch je jeho leštění. Leštění BDD elektrod se rozšířilo až v posledních deseti letech. Mechanickým leštěním povrchu BDD elektrod se odstraňují  $sp^2$  hybridizované uhlíky, které jsou na povrchu elektrody a nesou kyslíkové funkční skupiny, např. skupiny karboxylové nebo karboxylové. Díky odstranění těchto kyslíkových funkčních skupin BDD elektrody vykazují zrychlenou kinetiku elektronového přenosu<sup>8</sup>.

Elektrody ze skelného uhlíku (GCE) jsou jedny z nepoužívanějších uhlíkových materiálů na bázi  $sp^2$  hybridizovaného uhlíku. Popularita tohoto materiálu vyplývá z jeho výhodných vlastností, jako je chemická a mechanická stabilita nebo poměrně široké potenciálové okno. Další výhodou je, že je prakticky plynotěsný s velmi malou pórovitostí povrchu a obsahuje velmi malá množství nežádoucích nečistot<sup>8</sup>. K obnově povrchu elektrody ze skelného uhlíku se v dnešní době nejvíce využívá leštění pomocí roztoku aluminu ( $Al_2O_3$ ) s částicemi menšími než přibližně 0,05  $\mu m$ . Výkon elektrody je ovlivňován jednak způsobem provedení a jednak materiálem, který se pro leštění použije. Leštění je zavedený postup aktivace elektrody a vede ke zvýšení rychlosti přenosu elektronů na povrchu elektrody<sup>9</sup>.

Elektrochemické metody jsou k detekci steroidů používány omezeně vzhledem k nereaktivitě steroidního skeletu<sup>10</sup>. V této práci byla studována možnost elektrochemické oxidace fytosterolů po chemické aktivaci steroidního skeletu dehydratací pomocí silné kyseliny, která umožňuje oxidaci jiných steroidů, např. primárních žlučových kyselin<sup>11</sup> nebo 7-dehydrocholesterolu<sup>12</sup>.

### Experimentální část

Studovanými látkami byly ergosterol, stigmasterol a  $\beta$ -sitosterol, vše od firmy Sigma – Aldrich, deklarovaná minimální čistota 95 %. Další chemikálie byly, pokud není uvedeno jinak, analytické čistoty: kyselina chloristá 70 % (Lach – Ner, Neratovice, ČR; Sigma – Aldrich), acetonitril pro HPLC (Sigma – Aldrich), alumina (Elektrochemické detektory, Turnov), hydrogenfosforečnan sodný 99% (Riedel – de Haën), dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát 98,0–102,0% (Sigma – Aldrich), ledová kyselina octová (Carlo Erba reagents), octan sodný 99% (Riedel – de Haën), kyselina chlorovodíková 37% (Riedel – de Haën), hydroxid sodný 98% (Baker Analyzed).

Pro měření metodou diferenční pulzní voltametrie (DPV) a cyklické voltametrie (CV) byly použity potenciostaty Eko – Tribo se softwarem Polar-Pro verze 5.1. (EcoTrend Plus, Praha) a Compactstate mobile electrochemistry se softwarem IviumSoft verze 1.9 (Ivium Technologies).

Jako pracovní elektroda byla použita elektroda ze skelného uhlíku o průměru 2 mm ( $A = 3,14 \text{ mm}^2$ , Metrohm, Švýcarsko) a bórem dopovaná diamantová elektroda o průměru 3 mm ( $A = 7,07 \text{ mm}^2$ , Biologic Science Instrument, Francie). Tělo elektrody ze skelného uhlíku je ze skla a elektroda z bórem dopovaného diamantu je z teflonu. Jako referenční elektroda byla použita argenochloridová elektroda ( $3 \text{ mol. l}^{-1} \text{ KCl}$ ) a jako pomocná elektroda byla použita platinová elektroda (obě elektrody Elektrochemické detektory, Turnov).

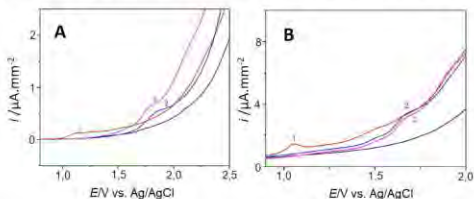
Pro přípravu pufrů o přesné hodnotě pH byl použit kalibrovaný Crison micropH 2001 pH metr s Hamiltonovou elektrodou od firmy Galileo Equipos. Na přípravu 50 ml pufru o daném pH byly vždy všechny složky pufru rozpustěny ve 40 ml deionizované vody. Na pH metru bylo vždy proměřeno pH daného pufru a v případě nutnosti upraveno na požadovanou hodnotu pomocí  $1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$  nebo  $1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HCl}$ . Tímto způsobem byly připraveny roztoky fosfátového pufru o pH 7,0 a acétátového pufru o pH 4,0 a 5,0 (všechny pufrы  $c = 0,1 \text{ mol. l}^{-1}$ ).

Před každým měřením byla pracovní elektroda leštěna na alumině (Elektrochemické detektory, Turnov) po dobu 30 sekund. Velikost částic aluminu byla 0,5  $\mu m$ . Jako základní elektrolyt byla použita kyselina chloristá v prostředí acetonitrilu o koncentraci  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ . Měřený objem byl

10 ml. V tomto objemu je teoreticky obsaženo 0,43 % vody pocházející z koncentrované kyseliny chloristé ( $w = 70\%$ ).

### Výsledky a diskuze

Z naměřených voltamogramů (Obr. 1) je patrné, že elektrochemická oxidace probíhá na obou elektrodách velmi podobně. Na GCE probíhají elektrochemické oxidace stigmasterolu a  $\beta$ -sitosterolu u méně kladných potenciálů, než je tomu u BDD elektrody. Pro GCE dochází k oxidaci okolo +1,6 V, zatímco u BDD elektrody je tomu až okolo +1,8 V. U ergosterolu se dehydratační produkty elektrochemicky oxidují na obou elektrodách okolo +1,1 V, přičemž ještě dochází k další oxidaci okolo +1,5 V. Signál, který je u potenciálů +1,1 V, je nejpravděpodobněji zapříčiněn druhou dvojnou vazbou ve steroidním skeletu ergosterolu. Zatímco stigmasterol a  $\beta$ -sitosterol mají dvojnou vazbu  $\Delta^5$ , ergosterol obsahuje konjugované dvojnou vazby  $\Delta^5$ . Zpětný katodický scan nevykazoval žádnou elektrochemickou aktivitu, z čehož vyplývá, že děj, který na elektrodách probíhá při anodickém scanu, je ireverzibilní.



**Obr. 1.** Anodická větev prvního cyklu cyklických voltamogramů na (A) GCE a na (B) BDD elektrodě pro (1) ergosterolu ( $c = 5 \cdot 10^{-5}$  mol  $\cdot$  l $^{-1}$ ), (2)  $\beta$ -sitosterol ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\cdot$  l $^{-1}$ ), (3) stigmasterol ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol  $\cdot$  l $^{-1}$ ) v prostředí 0,1 mol  $\cdot$  l $^{-1}$  HClO $_4$  v acetonitrilu, obsah vody 0,43 %. Rychlost scanu byla 200 mV  $\cdot$  s $^{-1}$ , měřeno v rozsahu 0 V–2,5 V. Černá křivka je základní elektrolyt.

Dále bylo testováno, jak zvyšování obsahu vody ve vzorku anodický signál dehydratačních produktů studovaných fytoosterolů včetně jeho stability. Vyšší obsahy vody v měřeném prostředí jsou žádoucí například pro modifikaci složení mobilní fáze, tj. její čísní síly v HPLC. Deionizovaná voda byla přidávána až poté, co proběhla samotná dehydratační reakce, aby nedocházelo k ovlivnění této reakce vodou. Obsahy vody byly v rozsahu 0,43 %–50 %. Potenciály oxidace byly vždy odečteny v maximu píku, a to pro stigmasterol přibližně v rozsahu +1,67–1,76 V,  $\beta$ -sitosterol +1,66–1,72 V a ergosterol +0,96–1,08 V při použití GCE. Potenciály oxidace při použití BDD elektrody jsou pro stigmasterol v rozsahu +1,77–1,83 V,  $\beta$ -sitosterol +1,77–1,76 V a ergosterol +1,08–1,1 V.

Ze závislosti intenzity signálu a jeho potenciálu na obsahu vody v měřeném roztoku, kdy byla jako pracovní elektroda použita GCE, je patrné, že s přibývajícím množstvím vody se posunuje potenciál elektrochemické oxidace všech tří fytoosterolů k méně pozitivním hodnotám. Fytoosteroly se chovají obdobně i na BDD elektrodě s výjimkou ergosterolu, u kterého dochází k posunu potenciálu k pozitivnějším hodnotám.

Koncentrační závislosti byly změřeny pro všechny tři fytoosteroly na obou elektrodách. Kalibrace proběhly metodou DPV v prostředí 0,1 mol. l<sup>-1</sup> kyseliny chloristé obsahující 0,43 % vody, která pochází z koncentrované kyseliny chloristé, a v prostředí s obsahem vody 40 %. Bylo dosaženo mikromolárních detekčních limitů.

Dalším krokem bylo studium stability anodického signálu dehydratačních produktů fytoosterolů po přidavku běžných pufrů. Byly vybrány vodné fosfátové (pH 7,0) a acetátové (pH 4,0 a 5,0) pufrů o koncentraci  $c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ , které jsou nejčastěji používané v průtokových systémech typu HPLC, s cílem zvýšit pH roztoku tak, aby byl měřený roztok kompatibilní například s reverzními kolonami běžně používanými v HPLC. Pufr byl vždy přidáván až po proběhnutí dehydratační reakce v prostředí 0,1 mol. l<sup>-1</sup> kyseliny chloristé v acetonitrilu. Pro další měření byl vybrán fosfátový pufr o pH 7,0, jelikož ani u nejméně rozpustného stigmasterolu nedochází k jeho vysrážení při obsahu do 30 % pufrovací vodné složky v acetonitrilu. V tomto prostředí byly naměřeny kalibrační na BDD elektrodě.

### Závěr

V této práci byl rozvinut originální přístup pro detekci fytoosterolů s využitím voltametričeských technik. Bylo zde prokázáno, že fytoosteroly a jejich dehydratační produkty mohou být detekovány ve směsných prostředích acetonitril:vodná složka (voda, fosfátový pufr). Je tedy předpokládán další rozvoj metody za použití BDD elektrod vyznačujících se dostatečně širokým potenciálovým oknem v anodické oblasti, například pro detekce fytoosterolů pomocí HPLC s ampérometričeskou detekcí.

### Acknowledgment

Financial support was provided by the Czech Science Foundation (project GACR 19-11268S) and the Specific University Research (SVV260560).

### References

1. Dufoure E. J.: *J. Chem. Biol.* **1**, 63 (2008).
2. Fahy E., Subramaniam S., Brown H. A., Glass Ch. K., Merrill A. H., Murphy R. C., Raetz Ch. R. H., Shimizu T., Spener F., Meer G., Wakelam M.J.O., Dennis E.A.: *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* **107**, 337 (2005).
3. Hannich J. T., Umebayashi K., Riezman H.: *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1 (2011).
4. Desmond E., Gribaldo S.: *Genome Biol. Evol.* **1**, 364 (2009).
5. Baluchová S., Daňhel A., Dejmková H., Ostatná V., Fojta M., Schwarzová-Pecková K.: *Anal. Chim. Acta* **1077**, 30 (2019).
6. Muzyka K., Sun J., Fereja T. H., Lan Y., Zhang W., Xu G.: *Anal. Methods* **11**, 397 (2019).
7. Musilová J., Berek J., Peckova K.: **103**, 469 (2009).
8. Dekanski A., Stevanović J., Stevanović R., Nikolić B. Ž., Jovanović V. M.: *Carbon* **39**, 1195 (2001).
9. McCreery R. L.: *Chem. Rev.* **108**, 2646 (2008).
10. J. Klouda, Berek J., Nesmerak K., Schwarzova-Peckova K.: *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **47**, 384 (2017).
11. Klouda J., Berek J., Kocovsky P., Herl T., Matysik F.M., Nesmerak K., Schwarzova-Peckova K.: *Electrochem. Commun.*, **86**, 99 (2018).
12. Klouda J., Benesova L., Kocovsky P., Schwarzova-Peckova K.: *Talanta*, **229**, 122260 (2021).

# ECO-TREND PLUS s.r.o.

E-mail: ecotrendplus@seznam.cz tel. 266 053 877 tel./fax 286 890 502

## DETEKČNÍ SYSTÉM ÚNIKU ROPNÝCH LÁTEK

### AS-DETECTOIL

Detekční zařízení určené ke zjišťování a monitorování přítomnosti ropných látek, olejů, apod. na hladině vody. Zařízení je certifikováno. Zařízení je využitelné zejm. v průmyslu (energetika, čistírny odpadních vod, ap.), v odlučovačích ropných látek, v životním prostředí aj. – jako kontrolní a bezpečnostní systém.



### POPIS ZAŘÍZENÍ

Systém sestává ze sondy o rozměrech 70 x 70 x 30 mm, z vyhodnocovacího přístroje o rozměrech 220 x 50 x 150 mm (napájeného napětím 12 V – akumulátor, trafo) a z výstupu pro instalaci signalizačního zařízení (zvonek, světlo) či pro napojení regulačního, záznamového a jiného systému.

Zařízení umožňuje dlouhodobý, spolehlivý a bezúdržbový provoz, i v prostředí s nebezpečím výbuchu. Díky rozměrům sondy lze detektor instalovat např. i do vrtů nebo na odbočky z potrubí.

### TECHNICKÉ ÚDAJE

připojením na síť 220/50 Hz; 3,5 mA; akumulátor nebo trafo; váha 1,9 kg

## Rejstřík autorů

- Ashcheulov Petr, 35  
Baluchová Simona, 13  
Balzer Nico, 154  
Bartáček Jan, 69  
Barták Petr, 147  
Bártová Michaela, 151  
Behůl Miroslav, 217  
Beinrohr Ernest, 47  
Berisha Laridon, 171  
Bilková Zuzana, 92  
Bilková Zuzana, 105, 171  
Birošová Lucia, 17  
Bláhová Eva, 9  
Brzózka Agnieszka, 125  
Cacciola Francesco, 96  
Cankaf Petr, 147  
Cuhorka Jiří, 69  
Cuřinová Petra, 175  
Čambal Peter, 13  
Červený Václav, 120  
Čierna Martina, 17  
Dakošová Olivia, 17, 20, 140  
Daňhel Aleš, 23  
Degano Iliária, 179  
Dejtnková Hana, 27  
Dian Juraj, 120  
Dušek Libor, 30, 115  
Eva Bláhová, 81  
Fajgar Radek, 175  
Farka Zdeněk, 199  
Fejfarová Vladimíra, 203  
Fiedler Jan, 179  
Fischer Jan, 13, 35  
Foji Lukáš, 38  
Foja Miroslav, 23, 38, 41, 44, 159  
Frühbauerová Michaela, 77  
Gál Miroslav, 17, 20, 140  
Gasiór Jindřich, 212  
Hason Stanislav, 38  
Hatala Michal, 217  
Havran Luděk, 44  
Helán Václav, 47  
Herink Petr, 30  
Hermanová Monika, 41, 159  
Hojová Lucia, 55  
Horská Anna, 96  
Hrdlička Vojtěch, 64  
Hromadová Magdaléna, 154, 212  
Choińska-Młynarczyk Marta, 59, 64, 194  
Chýlková Jaromíra, 69, 135, 184, 208  
Chytrý Ondřej, 23  
Jan Klouda, 81  
Janíková Lenka, 184  
Jashari Granit, 73, 77, 92  
Jelšíková Kristýna, 9, 81, 222  
Jenner Leon, 84  
Jerga Radek, 147  
Josypčuk Bohdan, 88  
Karásková Aneta, 115  
Kastrati Gylkhane, 92  
Kielar Filip, 140  
Klíkarová Jitka, 96  
Klíma Jiří, 189  
Kocábová Jana, 154  
Kouřík Martin, 208  
Koláčná Lucie, 100  
Kolibal Miroslav, 38  
Kolivoška Viliam, 64, 154, 194  
Kolotilov Sergey, 125  
Korecká Lucie, 92, 105  
Kramplová Zuzana, 110, 168  
Kubešová Jana, 9, 81  
Kuchtová Gabriela, 30, 115  
Liška Jiří, 120  
Ludvík Jiří, 100, 189  
Lukášek Jan, 154  
Lušpai Karol, 189  
Lytyvnenko Anton, 125  
Mackulak Tomáš, 143  
Mareček Vladimír, 130  
Marton Marián, 143, 184, 217  
Matějka Pavel, 175  
Matvieiev Oleksandr, 135, 184, 217  
Melníková Eva, 20, 140  
Mészáros Gábor, 212  
Metelka Radovan, 77  
Michniak Pavol, 143, 217  
Mika Luděk, 13, 27  
Mikulová Nikola, 147  
Mikysek Tomáš, 77, 151  
Mishura Andrey, 125  
Mondello Luigi, 96  
Mordačiková Erika, 55, 143  
Mortet Vincent, 13  
Navrátil Tomáš, 59, 64, 194  
Némec Vojtěch, 44  
Novák Miroslav, 151  
Nováková Luchmanová Štěpánka, 154  
Novotný Ladislav, 30, 115  
Nyze Jacek, 179  
Ondráčková Anna, 159  
Páles Jakub Marián, 175

Petrářová Karolína, 81  
 Petříková Kateřina, 184  
 Pivoňková Hana, 41, 159  
 Polák Peter, 100  
 Pospíšilová Eva, 163  
 Pruchkouski Dzmitry, 84  
 Purdešová Andrea, 110, 168  
 Salvadori Karolína, 175  
 Samec Zdeněk, 130  
 Sedlák Miloš, 69  
 Semkovičová Barbora, 35  
 Shabani Egzontina, 171  
 Shishkanova Tatiana V., 163, 175  
 Schwarzová-Pecková Karolína, 9, 13, 35, 81, 222  
 Skopalová Jana, 64, 147  
 Slaviček Ondřej, 208  
 Slovákova Marcela, 105  
 Sokol Jozef, 110, 168  
 Sokolova Romana, 179  
 Stýskala Jakub, 147  
 Sulka Grzegorz, 125  
 Sýkorová Eva, 84  
 Sýs Milan, 73, 77, 96, 151  
 Šebera Jakub, 154  
 Šelešovská Renáta, 64, 69, 135, 184, 217  
 Šimková Ludmila, 189  
 Šislerová Michaela, 105  
 Štěrba Oskar, 194  
 Švancara Ivan, 73, 77  
 Taylor Andrew, 13  
 Tobrman Tomáš, 100  
 Trnková Libuše, 199  
 Trojánek Antonín, 130  
 Trísková Iveta, 199  
 Tůma Petr, 203  
 Tvorynska Sofiiia, 88  
 Usenko Alona, 69, 208  
 Valášek Michal, 154, 212  
 Vaněčková Eva, 194  
 Vavrek František, 154, 212  
 Veselí Vullnet, 171  
 Vojs Marian, 55, 143, 184, 217  
 Vojs Staňová Andrea, 55, 143  
 Voltman Denis, 55  
 Vrška Martin, 55, 184, 217  
 Wantulok Jakub, 179  
 Zajacová Cechová Monika, 147  
 Zelenský Michal, 9, 222

# Hledá se BWTek

#odměnajísta5000kc

Zaregistrujte váš BWTek přístroj na našem webu nebo pomocí následujícího QR kódu a získáte odměnu!



Metrohm Česká republika s.r.o. je od 01.01.2022 výhradním distributorem a podporou pro produkty Metrohm BWTek.

**Metrohm**  
Česká republika  
**BWTEK**  
A Metrohm Group Company

[www.metrohm.cz](http://www.metrohm.cz)





# COMARR PARDUBICE



*Jsme ryze česká společnost pracující v oboru výpočetní techniky, programování aplikací, projektů a realizací 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, rezervací prostředků a řízení přístupu do objektu.

## Inteligentní slaboproudé instalace

*Chcete zabezpečit své okolí ? Rodinu, zaměstnance, kolegy, firmu, nebo školu ? Nebo pomoci se strukturovanou kabeláží ?*

Konzultujte své potřeby s našimi odborníky.:

- Požární a zabezpečovací signalizace,
- kamerové a video systémy,
- inteligentní elektroinstalace, programovatelné systémy

## Projektový a helpdeskový systém TASKPOOL

TaskPool je moderní helpdeskový webový systém pro výrazné zefektivnění správy požadavků a řízení firemních procesů.

### Výhody helpdesk systému TaskPool:

- Šetří firemní náklady
- Přizpůsobeno pro použití z mobilních telefonů
- Plně nastavitelný helpdesk na Vašich webových stránkách
- Správa požadavků přes webové rozhraní, přístup odkudkoli
- Uchovávání kompletní historie komunikace (nelze mazat)
- Mapování a optimalizace firemních procesů



## ComArr

*Za 30 let své působnosti na trhu jsme získali cenné zkušenosti a stali se silným partnerem pro tisíce spokojených zákazníků.*

## Kontakty:

ComArr, spol. s r. o.

Tolarova 291

533 51 Pardubice

IČ: 15050084

DIČ: CZ15050084

[www.comarr.cz](http://www.comarr.cz)

TEL: +420 466 889 111

E-mail: [info@comarr.cz](mailto:info@comarr.cz)

## Pro svou práci volte kvalitu!

Firma Fisher Scientific, spol. s r. o. je českou pobočkou mezinárodní společnosti Thermo Fisher Scientific, která je největším světovým dodavatelem laboratorní techniky a vybavení laboratoří



- laboratorní přístroje a zařízení
- laboratorní sklo, plasty, spotřební materiál
- laboratorní chemikálie, rozpouštědla, speciální chemikálie
- přístroje a spotřební materiál pro molekulární biologii, biochemii, mikrobiologii
- pomůcky pro ochranu zdraví a bezpečnost práce v laboratoři
- laboratorní nábytek, digestoře



[www.thermofisher.cz](http://www.thermofisher.cz)

# ECO-TREND PLUS s.r.o.

E-mail: ecotrendplus@seznam.cz tel. 266 053 877 tel./fax 286 890 502

Osvědčený analyzátor do každé laboratoře, provozu i terénu, výzkumu i škol  
moderní, citlivý a široce využitelný s vlastními originálními US patenty, certifikovaný přístroj

## PC ECO - TRIBO voltametrický/POLAROGRAFICKÝ analyzátor

---

- vysoká citlivost • snadná automatizace • ideální pro speciaci
- stolní nebo přenosná verze (připojení na stolní PC, laptop či notebook)
  - verze pro DOS, Win 3.x, 9x, Me, 2000, XP

### Metody

- DC a diferenční pulzní voltametrie (DCV a DPV), Cyklická voltametrie, DP a Tast polarografie
- Chronopotenciometrie s konstantním proudem
- Možnost návrhu vlastních metod podle potřeby uživatele

### Elektrody

- Miniaturní tužková rtuťová
- Zlatá, uhlíková (pastová i filmová), stříbrná, měděná
- Pevné amalgamové
- stříbrná, zlatá, měděná (menisková, leštěná, filmová)

### Použití

#### Pro ekoanalýzu (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 prvku Mendělejevovy tabulky
- **stanovení aniontů (dusičnanů, dusitanů, Cl<sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, J<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, S<sup>2-</sup>)**
- **sledování velkého množství org. látek a škodlivin** (saponátů, herbicidů, pesticidů, insekticidů, nitrolátek, barviv, biologicky aktivních látek, surfaktantů atd.).

#### Hodnocení stavu a stupně opotřebení motorů, ropných olejů a maziv

v běžných podmínkách, bez demontáže

#### Oblasti aplikací - dosud nejširší laboratorní, provozní, dílenská i terénní praxe

vodohospodářství, ekologie, hygiena, zemědělství a potravinářství, medicína, farmacie, geologie, hutnictví, chemické a jiné průmyslové závody, výzkum, školství atd.

Analýza všech druhů vod a vodných roztoků; odpadních vod, vod z galvanizoven, průsaků, skládek odpadů, výluhu púd; geologických vzorků; rud; popílků a prachu; zemědělských, chemických a farmaceutických vzorků; pokrytí ČSN a vyhl. na vody z asi 80 % atd.

**Samozřejmostí je bezplatná konzultace a předvedení systému. Poskytujeme komplexní, odborný i pogarantiční servis, odbornou pomoc a vývoj analytických metodik. Celý systém je, pro svou jednoduchou obsluhu, vhodný pro výukové účely.**

# 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.

Vě svých řadách Společnost vítá **studenty i učitele.**



Česká společnost chemická, Novotného lávka 5, Praha1, [www.ocsd.cz](http://www.ocsd.cz)

## Členské výhody:

- Možnost zažádání o evropskou nostrifikaci chemického vzdělání a odborné praxe spojenou s udělením titulu EurChem, platného v celé EU,
- Podstatné slevy u vložného na sjezdech a konferencích, jejichž oficiálním pořadatelem je ČSCH,
- Informace o dění v evropských strukturách, jako např. EuCheMS, ECTN, EC2E2N a podobně,
- Možnost přidruženého členství v IUPAC, a z toho plynoucí sleva u nakladatelství Blackwell a na konferencích sponzorovaných IUPAC
- Možnost získání a doporučení členské přihlášky do významných zahraničních chemických společností (RSC, ACS, GDCh, GÖCh, SFC aj.)
- Přístup k elektronickým informačním médiím Společnosti,
- Možnost zapojení se do práce a komunikace v jedné z místních či odborných poboček ČSCH,
- Volný přístup k tištěným verzím časopisů ChemPubSoc Europe v „knihovně ČSCH“
- Možnost objednání předplatného Chemických listů s významnými slevami,
- Významná sleva (ca 90 %) na předplatné časopisu Chemistry – A European Journal, a dalších evropských časopisů konsorcia ChemPubSoc Europe, jichž je ČSCH spolumajitelem,
- Přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- Možnost získání příležitostných slev obchodních firem spolupracujících s ČSCH,
- Sleva při zapůjčení automobilu (až 35 %) u společnosti AVIS a HERTZ na celém světě, kromě Austrálie, a použití těchto automobilů na akcích v ČR za speciální tarify,
- Sleva 20 % z publikačních poplatků v časopise ChemOpenChem, který společnost spoluvlastní.
- Možnost uplatnit informace z vlastní pracovní činnosti (výsledky, novinky, inzerce, tisková oznámení aj.).






ISE sponsored Meeting



**CHEMAGAZÍN**





© Best servis Ústí nad Labem

ISBN 978-80-905221-9-0