XXXV.

MODERNÍ ELEKTROCHEMICKÉ METODY

SBORNÍK PŘEDNÁŠEK

Květen 2015

Best servis Ústí nad Labem

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., Praha

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

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

Sborník přednášek
mezinárodní odborné konference

XXXV.
Moderní Elektrochemické Metody

Jetřichovice 18. – 22. května 2015

Uspořádali:

Tomáš Navrátil, Miroslav Fojta a Karolina Schwarzová

ISBN 978-80-905221-3-8

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

Název: XXXV. Moderní Elektrochemické Metody
Vydal: Srsenová Lenka - Best servis Ústí nad Labem
Autor: kolektiv autorů
Počet stran: 290
Náklad: 85
Vydání 1.
Formát: A5
ISBN: 978-80-905221-3-8

Best servis Ústí nad Labem
J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the AS CR, v.v.i., Prague
Institute of Biophysics of the AS CR, v.v.i., Brno
UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry,
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science,
Charles University in Prague, Prague

Collection of Conference Proceedings

International Conference

Modern Electrochemical Methods XXXV

Jetřichovice, Czech Republic

May 18th - May 22nd, 2015

Editors:

Tomáš Navrátil, Miroslav Fojta, and Karolina Schwarzová

ISBN 978-80-905221-3-8

Obsah **Str.**

Obsah | **Str.**

Obsah **Str.**

Obsah	Str.

Obsah **Str.**

Determination of Biologically Active Organic Compounds by Differential Pulse Voltammetry and Spectrophotometric Methods
(Stanovení biologicky aktivních organických látek pomocí diferenční pulsní voltametrie a spektrofotometrie)

Dmytro Bavol, Hana Dejmkova, Jiri Zima, and Jiri Barek
Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analyti. Chem., University Research Centre Supramolecular Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic,
E-mail: bavold@natur.cuni.cz

Abstract
The utilization of a combination of fast-scan electrochemical detection on a glassy carbon working electrode and flow injection analysis allows a rapid evaluation of biologically active organic compounds based on their oxidation. This approach combines the high sample throughput of flow methods with information gain of voltammetry. Limits of quantification in micromolar quantities of analytes were reached with newly developed methods.

Key words: Flow injection analysis; Differential pulse voltammetry; Glassy carbon electrode.

Úvod
Již několik let si vědci uvědomují rostoucí potřebu automatizování a urychlování elektrochemických metod, které jsou vhodné pro kontinuální měření biologicky aktivních organických látek. Průtoková injekční analýza s elektrochemickou detekcí je široce používanou technikou pro stanovení těchto látek. Amperometrie je nejčastější způsob detekce, protože nabízí vysokou citlivost, vyžaduje relativně jednoduché přístrojové vybavení a poskytuje značnou selektivitu prostřednictvím předem vybraného detekčního potenciálu [1]. Nevýhodou tohoto postupu je fakt, že zde není zachována informace o elektrochemickém chování sledovaných látek, která přitom významně pomáhá při jejich charakterizaci. Tento problém může být řešen použitím sady elektrod, kde je každá nastavená na jiný detekční potenciál, ovšem cenou za to je velká instrumentální náročnost (technická i finanční) v podobě multikanálového přístroje a složitého prostorového uspořádání elektrod [2]. V úvahu připadá i technika pulsní amperometrie, v které jsou na elektrodu vkládány vhodně zvolené hodnoty potenciálu v krátkých pulsech, během kterých je snímán proud [1,3]. I přes značné výhody všech těchto zmíněných technik, žádná z nich neposkytuje kompletní voltametrické informace. Veškeré informace lze získat za pomoci moderních přístrojů pro práci s voltametrickými potenciálovými programy, pulsními i s proměnnými potenciály, které jsou dnes již schopné dostatečně rychlých operací, aby bylo možné uvažovat o aplikaci proměnlivých potenciálů na jedinou elektrodu a o využití takto získaných dat, jako například u cyklické voltametrie, kdy je potenciál měněn plynule mezi dvěma hraničními hodnotami. V tomto případě je zapotřebí najít vhodný kompromis mezi rychlostí tohoto potenciálového skenu a nárůstem proudu pozadí elektrody [4,5]. Jiným přístupem je použití pulsní voltametrie [6-9] nebo voltametrie čtvercových vln, kdy je na elektrodu vkládána celá potenciálová škála [10]. Měřící pulsy je možné doplnit také pulsy zaměřenými na čištění elektrody a úpravu jejích vlastností nebo na prekoncentraci analytu na elektrodě [11]. Tyto techniky mohou poskytnout úplnější údaje o každém zaznamenaném píku: retenční čas a charakteristický voltamogram pro každý naměřený pík. Z elektrochemického hlediska tyto techniky poskytují možnost získání voltamogramů ze vzorků o malých objemech (μL) [12]. Kromě toho lze rychloskenovací technikou generovat voltamogramy vzorků s různou matricí i bez předchozího náročnějšího separačního postupu.

Praktickou aplikaci rychloskenovacích technik lze využít zejména při analýzách komplikovaných vzorků biologického původu, například pro stanovení antioxidantů, které výrazně přispívají k ochraně organismu a pomáhají chránit lidské buňky před oxidačním poškozením. Oxidační stres je příčinou mnoha chorob, předčasného stárnutí i poškození buněk a z tohoto důvodu jsou přírodní antioxidanty v posledních letech velmi intenzivně studovány *in vitro* i *in vivo*. Cyklická voltametrie [13–15], voltametrie čtvercových vln [16,17] a diferenční pulsní voltametrie [18] jsou elektrochemické metody, které přispívají k objasnění mechanismu jejich působení na elektronové úrovni.

Experimentální část

Aparatura potřebná pro měření zahrnuje kombinaci obvyklého vybavení pro průtoková měření (vhodná pumpa, dávkovací ventil, pro chromatografická měření separační kolona) a vybavení pro voltametrická měření. Na parametrech použitého přístroje výrazně závisí kvalita získaných výsledků, dobré zkušenosti jsme získali při použití přístroje Autolab (Metrohm, Švýcarsko). Měření je prováděno v běžném tříelektrodovém systému s pracovní elektrodou, referentní elektrodou a pomocnou elektrodou. S výhodou je možné měřit v nevodném prostředí, což vede ke snížení proudu pozadí.

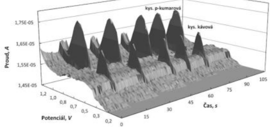
Výsledky a diskuze

První krok, který je nutno vyřešit při aplikaci proměnného elektrického potenciálu, je charakteristika zvoleného elektrochemického detektoru pomocí standardního redoxního systému, používaného ke sledování základních operačních parametrů detektoru a popsat vliv a vhodné podmínky dalších parametrů stanovení, jako je skenovací rychlost DPV, průtoková rychlost nosného roztoku a objem dávkovací smyčky. U skenovací rychlosti je zapotřebí najít vhodný kompromis mezi rychlostí potenciálového skenu a nárůstem proudu pozadí elektrody. Rychlost průtoku nosného roztoku ovlivňuje odezvu detektoru, přičemž tato hodnota by neměla být příliš vysoká, aby nedocházelo ke zvýšené spotřebě nosného roztoku. U objemu dávkovací smyčky obecně platí, že při malých objemech dávkování proud píku roste téměř úměrně s injektovaným objemem, ale při vyšších objemech dávkování se linearita ztrácí. Zvětšení dávkovacího objemu vyvolává rozšíření píku, a také prodlužuje délku záznamu.

Pro analytické použití jakékoliv nové metody pro stanovení je důležité vědět, s jakou opakovatelností a v jakém koncentračním rozsahu analytu se pozoruje změna odezvy detektoru. Nejvhodnější je, když tato závislost je lineární. V tomto případě to byl druhý krok, který bylo třeba prozkoumat, a to nejlépe na modelových vzorcích s vybranými antioxidanty. Opakovatelnosti měření pro vybrané antioxidanty se pohybují řádově do 5 % a získané kalibrační závislosti jsou lineární v širokém sledovaném rozsahu. Získané meze detekce vybraných antioxidantů, měřené rychloskenovací pulsní technikou, dosahují mikromolárního měřítka. Opakovaná měření vybraných antioxidantů měřená rychloskenovací pulsní technikou jsou uvedena na Obr. 1.

Závěr

Rychloskenovací DPV s využitím GCE elektrody v uspořádání wall-jet se ukázala jako vhodná metoda pro elektrochemické kontinuální měření biologicky aktivních organických látek, konkrétně antioxidantů. Zpracované výsledky měření modelových vzorků s vybranými antioxidanty ukazují vysokou přesnost a citlivost měření. Meze detekce této metody dosahují mikromolárního měřítka a rychloskenovací DPV se tak jeví jako dostačující metoda pro stanovení.



Obr. 1. Opakovaná měření vybraných antioxidantů ($1 \cdot 10^{-4}$ mol·dm^{-3} *p*-kumarová kyselina a $1 \cdot 10^{-5}$ mol·dm^{-3} kávová kyselina) měřené rychloskenovací pulsní technikou v průtoku na GCE v prostředí acetonitril – ethanol, (1:1, *V/V*) s přídavkem 0,1 mmol·dm^{-3} chloristanu lithného.

Poděkování
Autoři děkují za finanční podporu Grantové Agentuře Univerzity Karlovy v Praze (projekt č. 456214).

Literatura

1. Kotnik D., Novič M., LaCourse W. R.: J.: Electroanal. Chem. *663*, 30 (2011).
2. Lunte C. E., Ridgway T.H., Heineman W. R.: Anal. Chem. *59*, 761 (1987).
3. Barnes A. C., Nieman T. A.: Anal. Chem. *55*, 2309 (1983).
4. Norouzi P., Ganjali M. R., Matloobi P.: Electrochem. Commun. *7*, 333 (2005).
5. Daneshgar P., Norouzi P., Ganjali M. R.: Mater. Sci. Eng. C *29*, 1281 (2009).
6. MacCrehan W. A.: Anal. Chem *53*, 74 (1981).
7. Ewing A. G., Dayton M. A., Wightman R. M.: Anal.. Chem. *53*, 1842 (1981).
8. Caudill W. L., Ewing A. G., Jones S., Wightman R. M.: Anal. Chem. *55*, 1877 (1983).
9. White J. G., Claire R. L., Jorgenson J. W.: Anal. Chem. *58*, 293 (1986).
10. Josypčuk O., Barek J., Josypčuk B.: XXXIII. Moderní Elektrochemické Metody, sborník přednášek, květen (2013).
11. Gerhardt G. C., Cassidy R. M., Baranski A. S.: Anal. Chem. *70*, 2167 (1998).
12. Trubey R. K., Nieman T. A.: Anal. Chem. *58*, 2549 (1986).
13. Apetrei C., Gutierez F., Rodrıguez-Mendez M. L., Saja J. A.: Sensor. Actuat. B-Chem. *121*, 567 (2007).
14. De Beer D., Harbertson J. F., Kilmartin P. A., Roginsky V., Barsukova T., Adams D. O.: Am. J. Enol. Vit. *55*, 389 (2004).
15. Blasco A. J., Gonzalez Crevillen A., Gonzalez M. C., Escarpa A.: Electroanalysis *29*, 2275 (2007).
16. Blasko A. J., Gonzalez M. C., Escarpa A.: Anal. Chim. Acta *511*, 71 (2004).
17. Robledo S. N., Tesio A. Y., Zon M. A., Fernandez H.: Sensor. Actuat. B-Chem., *192*, 467 (2014).
18. Blasko A. J., Rogerio M. C., Gonzalez M. C.: Anal. Chim. Acta *539*, 237 (2005).

Development of a New Kit for Determination of Free Plasma Metanephrines
(Vývoj nového kitu pro stanovení volných plazmatických metanefrinů)

Alice Brabcová Vránková [a], Lenka Portychová [b], Zora Nývltová [c], Jiří Widimský jr. [a], Tomáš Zelinka [a], Jan Škrha sr. [a], and Aleš Horna [b]

[a] Charles University, First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, 3rd Internal Department, U Nemocnice 1, 128 08 Praha 2, Czech Republic,
E-mail: alice.vrankova@lf1.cuni.cz

[b] Institute of Nutrition and Diagnostics, RADANAL Ltd., Okružní 613, 530 03 Pardubice, Czech Republic

[c] Research Institute for Organic Synthesis Inc., Rybitví, Czech Republic

Abstract

Determination of metanephrines from blood plasma plays an important role in the diagnosis of chromaffin cell tumors pheochromocytoma (PHEO) and paraganglioma (PGL). It is highly preferable to use this method for the diagnosis as it is more sensitive than the other methods. This study aims to develop a new kit for the determination of metanephrine (MN), normetanephrine (NMN) and 3-methoxytyramine (3-MT).

In order to simplify the pre-treatment of the samples and the chromatographic analysis, the solid face extraction (SPE) and all measurement conditions have been thoroughly optimized. As the next step, the method has been validated.

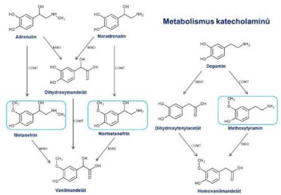
Key words: Metanephrines, Catecholamines, Plasma, Pheochromocytoma, Solid Phase Extraction, Liquid Chromatography.

Úvod

Metanefriny jsou O-methylmetabolity hormonů dřeně nadledvin katecholaminů. Mezi metanefriny můžeme zařadit metanefrin (MN), normetanefrin (NMN) a 3-methoxytyramin (3-MT).(Obr. 1). Důvodem studia této skupiny látek byla zjištěná souvislost mezi zvýšeným obsahem katecholaminů a metanefrinů v tělesných tekutinách a výskytem nádorů pocházejících z chromafinní tkáně sympatického nebo parasympatického nervového systému[1]. Především se jedná o feochromocytom (FEO), případně paragangliom (PRG). Tyto nádory vznikají z chromafinních buněk, tj. z buněk nadledvin a vyskytují se u méně než 1 % pacientů s hypertenzí. Většinou se jedná o nádory benigní, ale až 40 % z nich může být maligních. Téměř ve čtvrtině případů se jedná o nádory dědičné [2,3]. FEO a PRG syntetizují, ukládají a metabolizují katecholaminy a ve většině případů je také vylučují. Z toho důvodu je možné zvýšené koncentrace katecholaminů a jejich metabolických produktů v moči a v plazmě využít jako diagnostické markery tohoto typu nádorů [4].

V mnoha publikacích studovaných v rámci literární rešerše, které se zabývají touto problematikou, je vyzdvihováno zejména stanovení volných metanefrinů v plazmě a je považováno za nejcitlivější stanovení vzhledem k diagnostice FEO [5,6].

Cílem předložené práce bylo vyvinout kit pro stanovení volných plazmatických metanefrinů pro český, případně evropský trh. Během vývoje kitu byla metoda postupně optimalizována, počínaje předúpravou vzorků plazmy a izolací metanefrinů až po složení mobilní fáze a analytické podmínky měření. Poté byla za optimalizovaných podmínek změřena validace metody, která je prezentována v této publikaci.



Obr. 1. Metabolismus katecholaminů.

Experimentální část

Chemické látky, přístroje a experimenty používané ve zde uvedené práci lze rozdělit na tři části:

Příprava standardů

Extrakce na pevné fázi (SPE)

Příprava mobilní fáze a chromatografické stanovení

Standardy

NMN ((±) normetanefrin hydrochlorid), MN ((±) metanefrin hydrochlorid), 3-MT (3-methoxy-4-hydroxyfenylethylamin-hydrochlorid) a HMBA (4-hydroxy-3-methoxybenzylamin-hydrochlorid) používaný jako vnitřní standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Demineralizovaná voda - systém Select Neptune Ultimate (Purite, Oxon, UK).

Extrakce na pevné fázi

Extrakce byla provedena na zařízení Visiprep SPE Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, USA) pomocí vakuové pumpy. Extrakční kolonky na bázi iontové výměny byly nejdříve aktivovány a promyty a to 2 x 2,5 ml roztoku hydroxidu amonného v methanolu, 2 ml fosfátového pufru, pH 7 a 2 ml vody.

Poté byl aplikován 1 ml vzorku plazmy s vnitřním standardem HMBA. Dalším krokem je promytí extrakčních kolonek 2 ml fosfátového pufru o pH 7, poté 2 ml vody a nakonec 2 ml methanolu. Sorbent byl poté sušen za vakua -20 mm Hg po dobu přibližně 2 minuty.

Analyty obsažené v sorbentu kolonek byly nakonec eluovány 2 ml roztoku hydroxidu amonného v methanolu. Eluát byl odpařen při teplotě 60 °C v proudu dusíku, pro urychlení odpařování byly vzorky umístěny do termobloku Multi-Blok Heater (Lab-Line Instruments, Inc., Bombaj, Indie). Odparek byl poté rekonstituován v 220 µl mobilní fáze. 150 µl roztoku bylo následně dávkováno na chromatografickou kolonu.

Příprava mobilní fáze a chromatografické stanovení
Mobilní fáze pro HPLC stanovení s elektrochemickou detekcí byla připravena smísením dvou roztoků A a B (v poměru 1:1). Ke směsi byl přidán acetonitril a pH bylo upraveno na 2,94 pomocí pH metru WTW 526/538 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Německo) s chloridovou elektrodou SCHOTT (SCHOTT AG, Mainz, Německo). Výsledný roztok byl přefiltrován přes nylonový filtr s velikostí pór 0,22 µm (Membrane Solutions, North Bend, OH, USA).

Pro separaci metanefrinů byl používán kapalinový chromatograf UltiMate 3000 Series s autosamplerem UltiMate 3000 Series ACC-3000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA). Uvedený HPLC systém byl spojený s elektrochemickým detektorem Coulochem III s třielektrodovým systémem – 1. elektroda v kondicionační cele nastavená na oxidační potenciál +400 mV (Model 5021A Conditioning Cell), 2. a 3. elektroda v analytické cele nastavené na +100 mV a -350 mV (5011A High S Analytical Cell) (ESA, Chelmsford, USA).

Analytická kolona Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm (5 µm) (Phenomenex, Torrance, USA) s předkolonou UHPLC C18 4,6 mm ID Column (Phenomenex). Kolona byla vyhřívána na 28 °C.

Teplota autosampleru byla nastavena na 8,5 °C a průtok mobilní fáze 0,7 ml/min.

Výsledky a diskuse
Výsledky validace stanovení NMN, MN a 3-MT v krevní plazmě jsou shrnuty v Tabulce I. Validovanými parametry byly opakovatelnost, reprodukovatelnost, linearita, správnost, mez detekce, mez stanovitelnosti a robustnost.

Závěr
V rámci validace metody splňuje změřená opakovatelnost a reprodukovatelnost kritérium přijatelnosti pro RSD, které je méně než 10% pro opakovatelnost a méně než 20% pro reprodukovatelnost.

Metoda je lineární v koncentračním rozsahu 0,05 – 40 ng/ml a kritérium přijatelnosti ($R^2 \geq 0{,}990$) je splněno pro všechny tři metabolity.

Výtěžnost metody rovněž splňuje kritérium přijatelnosti, které se pohybuje mezi 80 a 120 %. Hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti splňují kritérium přijatelnosti (pro standardy bez matrice: LOD ≤ 6 pg/ml, LOQ ≤ 10 pg/ml; pro standardy v plazmě: LOD ≤ 15 pg/ml, LOQ ≤ 20 pg/ml).

Metoda je robustní vůči všem testovaným parametrům, které jsou uvedeny v Tabulce I.

Tabulka I.
Výsledky validace stanovení metanefrinů.

Parametr	Závěr
Opakovatelnost	Obohacená lidská krevní plazma: NMN: RSD = 5,1 %; MN: RSD = 4,8 %; 3-MT: RSD = 6,4 %
Reprodukovatelnost	Obohacená lidská krevní plazma: NMN: RSD = 9,4 %; MN: RSD = 11,5 %; 3-MT: RSD = 16,2 %
Linearita	Obohacená lidská krevní plazma: Metoda je lineární v daném koncentračním rozsahu (0,05 – 40 ng/ml)
Správnost	Průměrná výtěžnost lyofilizované plazmy - s nízkou hladinou metanefrinů: NMN 114 % (RSD = 6,2 %) MN: 107 % (RSD = 6,1 %) - s vysokou hladinou metanefrinů: NMN 112 % (RSD = 7,0 %) MN: 111 % (RSD = 7,5 %) 3-MT: 105 % (RSD = 8,9 %) Výtěžnost splňuje kritérium přijatelnosti (80–120 %).
Mez detekce (LOD) **Mez stanovitelnosti** (LOQ)	Kalibrační roztoky standardů v mobilní fázi (bez matrice): LOD: NMN = 0,027 nmol/l (6pg/ml); MN = 0,013 nmol/l (3 pg/ml); 3-MT = 0,005 nmol/l (1 pg/ml) LOQ: NMN = 0,041 nmol/l (9 pg/ml); MN = 0,021 nmol/l (5 pg/ml); 3-MT = 0.010 nmol/l (2 pg/ml) Obohacená lidská krevní plazma: LOD: NMN = 0,050 nmol/l (11 pg/ml); MN = 0,043 nmol/l (10 pg/ml); 3-MT = 0,064 nmol/l (13 pg/ml) LOQ: NMN = 0,077nmol/l (17 pg/ml); MN = 0,060nmol/l (14 pg/ml); 3-MT = 0.098 nmol/l (20 pg/ml)
Robustnost	Obohacená lidská krevní plazma: Metoda je robustní vůči všem testovaným faktorům (změna injektážního objemu, změna rychlosti průtoku mobilní fáze, změna teploty na koloně a změna potenciálu analytické cely).

Poděkování
Tato práce vznikla s podporou projektu MSM č. 00216208007 a 205025-12 PVK.

Literatura

1. Eisenhofer G., Walther M. M., Huynh T. T., Li S. T., Bornstein S. R., Vortmeyer A., Mannelli M., Goldstein D. S., Linehan W. M., Lenders J. W. M., Pacák K.: J. Clin. Endocrinol. Metab. *86*, 1999 (2001).
2. Kršek M.: Endokrinologie. Galén, Praha 2011.
3. Pacák K.: Feochromocytom. Galén, Praha 2008.
4. Pacák K.: *Habilitační práce*. Univerzita Karlova, Praha 2002.
5. Lenders J. W. M., Pacák K., Walther M. M., Linehan W. M., Mannelli M., Friberg P., Keiser H. R., Goldstein D. S., Eisehofer G.: J. Am. Med. Asoc. *28*, 1427 (2002).
6. Goldstein D., Eisenhofer G., Flynn J. A., Wand G., Pacák K.: Hypertension *43*, 907 (2004).

Sensitive Voltammetric Quantification of Amlodipine in Pharmaceutical Tablets and Human Urine Using a Boron-Doped Diamond Electrode

Kristína Cinková and Ľubomír Švorc
Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic,
E-mail: kristina.cinkova@stuba.sk

Abstract
A boron-doped diamond electrode was used as a perspective electrochemical sensor for the sensitive determination of amlodipine. Electrochemical oxidation of amlodipine is an irreversible process providing single oxidation peak at a potential of +0.75 V vs. Ag/AgCl electrode in Britton-Robinson buffer solution at pH 5. Using differential pulse voltammetry, the limit of detection was found to be 0.07 μM. The method was successfully applied to the determination of amlodipine in pharmaceuticals with result similar to that declared by the producer. Additionally, a biological relevance of the developed procedure was demonstrated by analysis of model human urine samples with adequate recoveries.

Key words: Amlodipine, Boron-doped diamond electrode, Differential pulse voltammetry, Pharmaceutical tablet, Human urine.

Introduction
Amlodipine (AML) represents a third generation and long-acting 1,4-dihydropyridine derivative, which is currently the most frequently used drug for hypertensive patients. Concerning its adverse effects after ingestion, some risk factors increase the likelihood of peripheral edema, palpitations and nausea [1]. Therefore, pharmaceuticals containing AML have to undergo a strict quality control, which requires the development of simple analytical methods for its reliable determination in both pharmaceuticals and biological samples.

Recent literature research reveals numerous studies describing chromatographic methods (usually coupled with spectral detection technique) such as high-performance liquid chromatography [2], gas chromatography [3], electrophoresis [4] as well as spectrophotometry [5] for the determination of AML in different matrices. However, the direct determination of AML is desirable to overcome the complexity involving high implementation costs, complicated sample pretreatment and long analysis time, thus justifying the need for reliable, low cost and simpler methods. Modern electrochemical techniques offer the practical advantages such as operation simplicity, low expense of instrument and lower sensitivity to matrix effects in comparison with chromatographic methods. As for the AML, the glassy carbon electrode is still the most common carbon-based electrode material for its electrochemical determination [6]. Moreover, single-walled and multi-walled carbon nanotubes have been recently applied as significant modifiers in order to increase the electron transfer of AML from solution to the electrode surface and thus enhance its current response [7]. The use of boron-doped diamond (BDD) electrodes is currently very attractive due to low background current, good electrochemical stability in both alkaline and acidic media as well as high resistance to fouling [8-15].

In this work, we report on the evaluation of the electrochemical behavior of AML and on the development of a novel electroanalytical method for the quantification of AML on a BDD electrode[16]. The practical applicability of the method was verified by analysis of pharmaceutical tablets and model human urine samples.

Experimental

Amlodipine besylate was purchased from Sigma-Aldrich (Slovak Republic) and used without any further purification. Britton-Robinson buffer solution (BRBS) was prepared in an usual way by mixing of 40 mM of all necessary components (phosphoric acid, acetic acid and boric acid) and adjusting with sodium hydroxide (0.2 M) to the required pH value. A stock standard solution of AML (1 mM) was prepared by dissolution of 56.7 mg of its solid besylate standard in 100 mL of mixture solution of methanol and deionized water in the volume ratio of 1:10. When not using, it was stored in refrigerator at 4-6 °C.

All voltammetric measurements were carried out using an AUTOLAB PGSTAT 302N (Metrohm Autolab B.V., The Netherlands) potentiostat/galvanostat controlled by NOVA 1.9 electrochemical software. The three-electrode cell system was used with a BDD electrode (B/C = 10000 ppm, produced by Institute of Electronics and Photonics, Faculty of Electrical Engineering and Information Technology, Slovak University of Technology in Bratislava) as working electrode, a platinum wire was applied as a counter electrode and an Ag/AgCl/3 M KCl electrode as reference, to which all electrode potentials hereinafter are referred.

Cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) were applied for investigating the electrochemical behavior and quantification of AML. The modulation amplitude of 50 mV, the modulation time of 100 ms with the step potential of 5 mV and the scan rate of 10 mV s^{-1} represented the optimum DPV parameter values. The limit of detection (LOD) was calculated as three times the standard deviation of the current response for the blank solution divided by the slope of the calibration curve. The standard addition method was used to analyze the pharmaceutical tablets and model human urine samples.

Results and discussion

Fig. 1 shows the CV voltammograms in the absence and presence of 0.1 mM AML in BRBS at pH 5 on the BDD electrode. It is evident that during the anodic scan, the single and distinct oxidation peak was observed at potential of +0.75 V *vs.* Ag/AgCl electrode. On the reverse scan, no corresponding reduction peak was indicated suggesting that the electrode reaction of AML on the BDD electrode is totally irreversible.

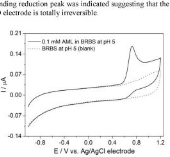


Fig. 1. CV voltammograms of (a) blank (BRBS at pH 5), (b) 0.1 mM AML in BRBS at pH 5 on the BDD electrode with scan rate of 100 mV s^{-1}.

The usefulness of the DPV for the quantification of AML was examined by calibration curve constructed by plotting oxidation peak current against concentration of AML at optimized experimental conditions. Fig. 2 depicts DP voltammograms recorded for additions of aliquots of standard solution containing increasing concentrations of AML (from 0.2 to 38 μM). It is obvious that the calibration graph consists of two linear segments, from 0.2 to 6 μM and from 6 to 38 μM with good linearity. The mean data of both segments of calibration curve, statistical evaluation of the regression lines and the analytical parameters for the developed method are given in Table I. The LOD was calculated to be 0.07 μM and achieved as a consequence of high S/N ratio without any chemical modification of BDD electrode surface.

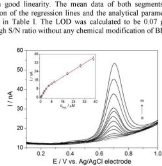


Fig. 2. DP voltammograms of various concentrations of AML (c_{AML}): (a) 0, (b) 0.2, (c) 0.4, (d) 0.8, (e) 2, (f) 2.8, (g) 4, (h) 6, (i) 8, (j) 9.9, (k) 19, (l) 29 and (m) 38 μM in BRBS at pH 5 on the BDD electrode. The optimized DPV parameters: modulation amplitude of 50 mV, modulation time of 100 ms and step potential of 5 mV. Inset: the respective calibration curve $I = f(c_{AML})$.

Table I.
Analytical parameters for the determination of AML in BRBS at pH 5 on the BDD electrode using proposed DPV method ($n = 3$).

Analytical parameter	Value	
	1[st] linear segment	2[nd] linear segment
Intercept, nA	0.11	6.42
Slope, nA/μM	1.91	0.77
SD of intercept, nA	0.05	0.27
SD of slope, nA/μM	0.08	0.01
Linear range, μM	0.2-6	6-38
R^2	0.996	0.998
LOD, μM	0.07	-
LOQ, μM	0.25	-
RSD[*], %	3.6	-

[*]RSD calculated for twenty successive DPV measurements at 9.9 μM AML

The effect of some possible interfering compounds usually present in human urine was examined for 9.9 μM AML in BRBS at pH 5 at the concentration ratios of 1:1, 1:10 and 1:50.

Concerning the common urinary interfering compounds, it was found that a 50-fold excess of barbituric acid may be considered as minor without any substantial influence on the oxidation signal of AML (signal change of AML less than 5%). Nevertheless, the significant interferences were recorded in a 50-fold excess of glucose (signal change of AML about 25% accompanied by meaningful increase of background current) and 10-fold excess of dopamine (30%) and ascorbic acid (40%). The signal change of AML caused by 10-fold excess of uric acid appeared to be 11%, this effect could be evaluated as moderate. Consequently, the interference study revealed that the use of proposed method in analysis of human urine samples containing AML could be limited depending on the presence of particular excess of some common urinary compounds.

The analysis of pharmaceutical tablets of Cardilopin® was performed using standard addition method in order to investigate the accuracy and validity of the proposed method. Fig. 3 displays the typical DP voltammograms of analysis of pharmaceutical tablets using standard addition method with proportional increase of oxidation peak of AML. As can be seen in Table II, the satisfactory recovery values indicate that there were no significant matrix interferences in tablet samples.

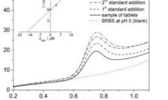


Fig. 3. DP voltammograms of analysis of pharmaceutical tablets Cardilopin® with declared content of 5 mg AML using standard addition method in BRBS at pH 5 on the BDD electrode. The respective standard additions: 10, 20 and 30 μL (c_{AML} = 1 mM). The optimized DPV parameters: modulation amplitude of 50 mV, modulation time of 100 ms and step potential of 5 mV. Inset: the analysis of AML by standard addition method.

Table II.
Analysis of pharmaceutical tablets of Cardilopin® (with declared AML content of 5 mg) spiked with standard solution of AML using proposed method (n = 6).

Added (μL)	Expected (mg)	Standard deviation (mg)	Found* (mg)	Recovery (%)
0	5.000	0.026	(5.202 ± 0.022)	104.1
10	5.056	0.014	(5.123 ± 0.012)	101.3
20	5.113	0.017	(5.256 ± 0.014)	102.8
30	5.170	0.014	(5.272 ± 0.011)	102.0

* Confidence interval for 95% probability calculated as [$\bar{x} \pm t_{n-1,\alpha}\, SD/n^{1/2}$]; $t_{5,\,0.05}$ = 2.0150

Subsequently, in order to examine the biological relevance of the proposed method, the analysis of model human urine samples was undertaken using standard additions method under the optimum experimental conditions. In this case, sufficient recovery values of 105.7 % and 94.1% were reached.

Conclusions

This contribution highlights the development and the application of a novel electroanalytical approach for the direct determination of AML using a BDD electrode as a perspective electrochemical sensor. Validated voltammetric procedure was applied for the determination of AML in commercial pharmaceutical tablets and model human urine samples. The principal advantages of the proposed methodology over chromatographic techniques are that they may be applied directly for the analysis of pharmaceuticals containing AML without the need of separation or complex sample preparation, since there is no interference from the excipients. Furthermore, adequate recovery values were obtained for the determination of AML in model human urine samples, indicating that the method could also be applied to this kind of biological samples, however, depending on the presence of particular excess of common urinary compounds. Conclusively, taking into consideration the results accomplished in this work, the BDD electrode may find future applications as an appropriate and effective electrochemical sensor in drug analysis.

Acknowledgments

This work was supported by the Grant Agency of the Slovak Republic (grant Nos. 1/0051/13 and 1/0361/14) and the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-0797-11.

References

1. Packer M., Carson P., Elkayam U., Konstam M. A., Moe G., O'Connor C., Rouleau J. L., Schocken D., Anderson S. A., DeMets D. L.: Heart Failure *1*, 308 (2013).
2. Zhou Y., Li J., He X., Jia M., Liu M., Li H., Xiong Z., Fan Y., Li W.: J. Pharm. Biomed Anal. *83*, 101 (2013).
3. Kumar A.V., Aravind G., Srikanth I., Srinivasarao A., Raju D. C.: Der Pharma Chemica *4*, 2228 (2012).
4. Li J., Li Y., Zhang W., Chen Z., Fan G.: J. Sep. Sci. *36*, 1817 (2013).
5. Darwish H. W., Hassan S. A., Salem M. Y., El-Zeany B. A.: Spectrochim. Acta, Part A *104*, 70 (2013).
6. Dogan-Topal B., Bozal B., Demircigil B. T., Uslu B., Ozkan S. A.: Electroanalysis *21*, 2427 (2009).
7. Goyal R. N., Bishnoi S.: Bioelectrochemistry *79*, 234 (2010).
8. Yardim Y., Keskin E., Şentürk Z.: Cent. Eur. J. Chem. *11*, 1674 (2013).
9. Švorc Ľ., Kalcher K.: Sens. Actuators B *194*, 332 (2014).
10. Sochr J., Švorc Ľ., Rievaj M., Bustin D.: Diamond Relat. Mater. *43*, 5 (2014).
11. Švorc Ľ., Vojs M., Michniak P., Marton M., Rievaj M., Bustin D.: J. Electroanal. Chem. *717*, 34 (2014).
12. Švorc Ľ., Stanković D. M., Kalcher K.: Diamond Relat. Mater. *42*, 1 (2014).
13. Švorc Ľ., Stanković D. M., Mehmeti E., Kalcher K.: Anal. Methods *6*, 4853 (2014).
14. Švorc Ľ., Cinková K., Samphao A., Stanković D. M., Mehmeti E., Kalcher K.: J. Electroanal. Chem. *744*, 37 (2015).
15. Švorc Ľ., Kalcher K.: Sens. Actuators B *205*, 215 (2014).
16. Švorc Ľ., Cinková K., Sochr J., Vojs M., Michniak P., Marton M.: J. Electroanal. Chem. *728*, 86 (2014).

Electrodeposited Coatings at ITO/FTO Enhancing their Applicability in Electroanalysis

Ales Danhel [a] and Miroslav Fojta [a,b]
[a] Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic
[b] Central European Institute of Technology, Masaryk University, Kamenice 753/5, CZ-62500 Brno, Czech Republic
E-mail: danhel@ibp.cz

Abstract
Recent possibilities of modification of transparent electrodes based on indium-tin oxide and/or fluorine doped tin oxide by electrodeposited coatings enhancing their electrochemical applicability in electroanalysis are discussed in this work. Ordered mesoporous silica and/or chemically functionalized mesoporous silica thin films may serve, among the common utilization in solid phase extraction, as protective layer of the electrode surface against its fouling and/or as molecular sieve permeable for small molecules and blocking large ones (DNA, proteins, *etc.*). Furthermore an electrodeposition of organic modifiers and/or metal (nano)particles inside of the ordered silica nanochanels together with direct electrodeposition of selected metal (nano)particles onto selected conductive transparent supports are presented here as well.

Key words: Amperometry, Electrodeposition, FTO, ITO, Metals, Molecular Sieve, Ordered Mesoporous Silica, Voltammetry.

Introduction

An indium-tin oxide (ITO) and/or fluorine doped tin oxide (FTO) pertain to group of transparent electrodes based on thin films of conductors: In_2O_3, SnO_2, and fluorine doped In_2O_3, respectively, deposited at glass, ceramic and/or flexible plastic supports [1]. Thanks to their transparency, high conductivity, wide potential window (from -0.5 up to 1.5 V) and physical/electrochemical/biological stability, they found practical applicability in electronics, displays, multi-functional windows, solar cells, transistors and (bio)sensors. Even tough their expanding electroanalytical usage presents only small percentage of their overall consumption, miscellaneous applications have already been developed [2,3]. Qualities of the most utilized ITO electrodes have been used in development of voltammetric and amperometric methods for *e.g.* direct catalytic detection of DNA subunits [4,5], sensitive determination of DNAv [6,7] and in DNA hybridization assay [8].

Furthermore ITO and FTO became commonly used electrode materials for electrodeposition of ordered mesoporous silica (OMS) thin films, which generally offer miscellaneous opportunities in the fields of catalysis, membranes, nanocasting matrices, electroanalytical chemistry, biocatalysis and biosensing, photochemistry, biomedicine, molecular machines, environmental technology and green chemistry, as well as in energetic [9]. The OMS films composed of negatively charged silanole groups may serve as: i) solid phase in extraction of heavy metals and other positively charged molecules [10], ii) molecular sieves and iii) protection against fouling of working electrode surface in electroanalysis of small analytes next to large components [11,12]. Moreover silica layers may be chemically modified (grafted) and/or prepared from functionalized silanoles bearing specific functional groups (-CH_3, -COOH, -NH_2, -SH,-N_3) through attached linkers (*e.g.* propyl, phenyl) [13-15]. Presented functional groups increase extraction specificity, efficiency and may be further chemically modified using *e.g.* Click-chemistry in case of azides [16].

Presence of nano-objects (particles, wires) or films of specific compounds (*e.g.* Prussian Blue, enzymes, oligonucleotide, protein) is another possibility to enhance electrochemical properties of ITO and FTO. Nano-objects such as gold [17,18] and silver nanoparticles or wires[1] and carbon nanotubes are commonly used to enhance charge transfer between electrodes and analytes, profiting from their catalytic properties, or to improve chemical binding of chemical modifiers (DNA, proteins, antibodies, enzymes *etc.*) at selected surfaces. One of the most convenient procedures of electrode surface modification is electrodeposition. [19].

With a respect of all the above mentioned benefits, preliminary results concerning electrodeposition of: i) OMS as molecular sieve at FTO, ii) OMS functionalized by mercaptopropyl (OMS-SH) for development of sensor composed of OMS with metal (Ag/Hg) nano-layer deposited at the bottom of the OMS pores at ITO, and iii) silver amalgam (Ag-Hg) particles at ITO are previewed in this work.

Experimental

Chemicals and Material

A 100mM Tetraethoxysilane (TEOS, 98%, Alfa Aesar) and/or 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (TMOS-SH) and 32mM cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, 99+%, Acros) dissolved in 1:1 mixture of ethanol (p.a. 95–96%, Merck) and $NaNO_3$ (≥99.5%, Merck) with pH 3.0 adjusted by 0.1M HCl (p.a., 1M solution, Fluka) were used after 2.5h of stirring for deposition of OMS/OMS-SH films at ITO (CG-51IN, 8-12 Ω cm^{-1}, Delta-Technologies, USA, Fig. 1) and/or FTO (TCO 10-10, 10 Ω cm^{-1}, Solaronix, Switzerland, Fig. 1). 0.5mM solutions of: Ruthenium hexamine chloride ($[(Ru(NH_3)_6]^{3+}$, 98%, Aldrich), Potassium ferricyanide ($[Fe(CN)_6]^{3-}$, >99%, Prolabo) and α-Methylferrocenemethanol (FcMeOH, 97%, Aldrich) in 0.1M KCl (p.a. 98%, Prolabo) were used for OMS/OMS-SH film permeability studies and their analytical characterisation. A 5-(ferrocenoylpropargylamide)-2'-deoxycytidine (dC^{Fc}) synthesized by Balintova from Hocek collaborative research group [20] was used as model DNA redox label in studies of OMS films utilized as molecular sieving layer. Silver amalgam particles were electrodeposited at ITO from 0.1M KNO_3 (p.a., Acros) solution containing 10mM of $AgNO_3$ (p.a. 98%, Safina, Czech Republic) and $Hg(NO_3)_2$ (p.a. Merck) in total, but with varying ratio of the metals (between 15 – 65% Ag^+ (n/n)). N-methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan (NBF, for HPLC derivatiozation ≥97%, Fluka) was electrochemically studied at ITO and at silver amalgam particles deposited at ITO. All solutions were prepared with high purity water (18.2 MΩ cm^{-1}) obtained from a Purelab Option-Q from ELGA.

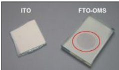


Fig. 1. Photo of the indium-tin oxide (ITO) plate and fluorine doped tin oxide (FTO) plate modified by ordered mesoporous silica (FTO-OMS) thin film (inside of the red oval).

Instruments. Potentiostat Autolab PGSTAT128N (Metrohm, Switzerland) was used in all electrochemical measurements. The OMS/OMS-SH thin layers were prepared by potentiostatic chronoamperometry using applied potential -1.3 V or -1.5 V during 20 s at ITO or FTO, respectively, utilized three electrode system consisted of ITO/FTO working electrode, stainless steel sheet counter electrode and 1 mm silver wire as pseudo-reference electrode. Voltammetric and amperometric studies were performed using three electrode system consisted of OMS/OMS-SH/Ag-Hg particles modified ITO/FTO working electrodes, platinum wire counter electrode and silver chloride reference electrode (Ag|AgCl|3 mol l^{-1} KCl, Metrohm, Switzerland). Scanning electron microscopy (SEM) with energy disperse X-ray spectroscopic detector (EDX) (JCM-6000, JEOL, Japan) and ImageJ freewere progam (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) were used as well.

Results and discussion

OMS as molecular sieve at FTO

Application of OMS electrodeposited at FTO with the aim to develop working electrode allowing voltammetric and amperometric detection of small molecules next to the large ones using permeability of perpendicularly oriented nano-channels of ordered silica with i.d. 2 – 3nm was proposed and results compared with bare FTO. Model sample of novel DNA redox labele dC^{Fc}, which may be potentially enzymatically incorporated into the DNA structure using biochemical methods (*e.g.* primer extension (PEX), polymerase chain reaction (PCR)), was used in the experiments. And exactly the processes of these enzymatic reactions or studies of interaction of small molecules (colorants, drugs, pollutants *etc.*) with biopolymers could be potentially observed/studied real-time. In these systems, large molecules (DNA/oligonucleotides, enzymes, proteins) are in the mixture with building blocks (labeled and natural nucleoside triphosphates) and buffer components or generally studied compounds, respectively. Voltammetric methods for determination of dC^{Fc} using cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV) and square wave voltammetry (SWV) were developed at bare FTO and FTO-OMS under diffusion controlled process and further using potentiostatic chronoamperometry in dynamic/stirring batch arrangement with submicromolar limits of detections. Final utilization of FTO-OMS for direct detection of dC^{Fc} in the PEX mixture is still in progress.

OMS-SH with Ag/Hg at the bottom of the pores

An attempt to deposit a nano-layer of silver, mercury or Ag-Hg at the bottom of OMS nano-channels to connect their excellent electrochemical properties and limited porosity of OMS-SH, was done using sequential procedure. The procedure was consisted of: i) accumulation of the metal(s) by ITO-OMS-SH (thiol-functionalized silica layer deposited at ITO) thanks to strong interaction of the mercapto-group with the metals, followed by ii) washing and chronopotentiometric deposition of accumulated metal at the bottom ITO-OMS-SH (in proper solution and certain applied deposition potential/time), step I) and II) could be repeated to multiply a thickness of the metal(s). Amount of deposited metal could be further estimated by anodic stripping analysis of deposited metal(s). In this case, Ag and Hg were studied separately, but it was unfortunately found, that both selected metals are not deposited in sufficient number of the pores, to significantly enhance any analytical property of ITO-OMS-SH. Moreover deposition of the metal(s) was tried from high concentrated metal solution at ITO-OMS/OMS-SH, but the smallest sufficiently stable unit of metal nano-particles in utilized solution is apparently much bigger than inside diameter of the pores, which were thus destroyed by deposited particles. However at the beginning, electrochemical behavior of individual metals was studied by CV and anodic stripping linear scan voltammetry (ASLSV) at ITO, FTO, ITO-OMS, FTO-OMS, ITO-OMS-SH and FTO-OMS-SH. It is obvious from the Fig. 2, that electrode significantly influences electrodeposition and anodic dissolution of the metal(s) and that ITO previously washed by 30min bath in absolute EtOH and dried on the air in the lab offers significantly better developed reduction and oxidative CV signals of the mercury in first cycle, while no reduction signal was observed at unwashed ITO (due to need of obviously higher nucleation energy). Obtained results were than utilized in electrodeposition of Ag-Hg particles at ITO presented in following paragraph.

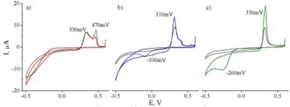


Fig. 2. First two CV cycles (1st in color, 2nd black) of 100 µM Hg^{2+} at: a) ITO-OMS-SH 20%, b) ITO, c) ITO-EtOH in 0.01M HNO_3, scan rate 50 mV/s.

Electrodeposition of Ag-Hg. Silver amalgam (Ag-Hg) is the most convenient alternative electrode material to metal mercury in electroanalysis. Until now only bulk, powder or crystallic Ag-Hg electrodes were used. Modifications by mercury meniscus, electrodeposited mercury film or chemically bounded organic layers were applied [21]. Herein a first attempt to developed simple and easily automated electrochemical procedure of Ag-Hg preparation was studied. Such a procedure could be advantageously used for preparation of Ag-Hg macro-electrodes with high electrode active surface, microelectrodes, working electrodes inside of microfluidic systems and of Ag-Hg electroplated supports with the aim to enhance their electrochemical and also optical properties. Therefore first experiments with electrodeposition of Ag-Hg objects at ITO surface were done form 0.1M KNO_3 electrolyte containing variable concentration of Ag^+ and Hg^{2+} nitrates, which are well soluble in water at high concentrations and do not lead to precipitation of individual metals. Double pulsed potentiostatic chronoamperometry with one nucleation and second growing potential was applied to generate Ag-Hg. Deposited amalgam at ITO was then chemically and physically studied by scanning electron microscopy (SEM) allowing energy disperse X-ray spectroscopic analysis (EDX) with the aim to analyze overall and point elementary composition of the particles, elementary mapping of the surface and further pictorial analysis answering physical properties such as, shape, uniformity, size, density and distribution of the Ag-Hg. All these parameters had to be registered during optimization of the procedure, where parameters such, overall concentration of the metals, their mutual ratio, selection of the electrolyte, electrodeposition parameters (nucleation and growing potential E_1/E_2 and time t_1/t_2, respectively) have crucial influence on final appearance of Ag-Hg particles and their further electrochemical and optical properties. Total concentration of the metals and electrodeposition potentials and times were found to be the most significant parameters influencing final density, size and distribution of the Ag-Hg. Whereas wide mutual ratio of Ag^+ and Hg^{2+} ions in the range of 25 – 55% (n/n) contained in the solution allowed to form particles composed of 60±5% Ag (n/n) deposited at ITO. This signifies preferential and obviously the most stable form of Ag-Hg with optionally regulated size and density of non-spherical particles with diameter larger than 400nm using selected parameters (0.01M Ag^++Hg^{2+}, 55% Ag^+ (n/n), 0.1M KNO_3, E_1 -1.0V, t_1 50ms, E_2 -0.1V, t_2 30s). Thus prepared Ag-Hg at ITO (using t_2 30min), was tested in voltammetric detection of NBF using cyclic voltammetry and compared with bare ITO. CVs at Ag-Hg showed better charge transfer (narrower peak) and easier reduction of NBF (potential about 350mV more positive than at bare ITO), what apparently enhanced electrochemical properties of ITO and open new possibilities in utilization of Ag-Hg in electroanalysis. Moreover metal character of the Ag-Hg and activity of surface plasmons may be further used in optical methods base on elipsometry (Surface Plasmon Resonance, SPR).

Conclusion
There are plenty of possible varieties in electrode modification and it is only question of specific application to select and optimized the most convenient one. Development of such analytical systems has a crucial impact and requirements on development of novel practically applicable sensors and detection systems as well as for further discovering until now non-clarified processes taking place at specific interfaces. Connection of these electrochemical systems with optical methods (*e.g.* elipsometry, fluorimetry) seems to be very promising and exciting approach in the field of analytical chemistry.

Acknowledgment
This research was supported by the ASCR (RVO 68081707*).*

References
1. Langley D., Giusti G., Mayousse C., Celle C., Bellet D., Simonato J. P.: Nanotechnology *24* (2013).
2. Ginley D. S., Hosono H., Paine D. C.: *Handbook of Transparent Conductors*. Springer, 2011.
3. Khan Z. H.: *PhDThesis*. Waseda University, Tokyo 2011.
4. Xie H., Yang D., Heller A., Gao Z.: Biophys. J. *92*, L70 (2007).
5. Gao Z.: Sens. Actuators, B *123*, 293 (2007).
6. Armistead P. M., Thorp H. H.: Anal. Chem. *72*, 3764 (2000).
7. Gao Z. Q., Ting B. P.: Analyst *134*, 952 (2009).
8. Moses S., Brewer S. H., Kraemer S., Fuierer R. R., Lowe L. B., Agbasi C., Sauthier M., Franzen S.: Sens. Actuators, B *125*, 574 (2007).
9. Walcarius A.: Chem. Soc. Rev. *42*, 4098 (2013).
10. Walcarius A.: Electroanalysis *20*, 711 (2008).
11. Wu B., Guo Y., Cao H., Zhang Y., Yu L., Jia N.: Sens. Actuators, B *186*, 219 (2013).
12. Serrano M. B., Despas C., Herzog G., Walcarius A.: Electrochem. Commun. *52*, 34 (2015).
13. Walcarius A.: Anal. Bioanal. Chem. *396*, 261 (2010).
14. Walcarius A., Collinson M. M., v knize: *Annual Review of Analytical Chemistry* (sv. 2. Annual Reviews, Palo Alto 2009.
15. Herzog G., Sibottier E., Etienne M., Walcarius A.: Faraday Discuss. *164*, 259 (2013).
16. Villa N., Ghanbaja J., Aubert E., Walcarius A.: Angew. Chem., Int. Ed. *53*, 2945 (2014).
17. Rashid J. I. A., Yusof N. A., Abdullah J., Hashim U., Hajian R.: Mater. Sci. Eng., C *45*, 270 (2014).
18. Xu J. H., Zhu J. J., Zhu Y. L., Gu K., Chen H. Y.: Anal. Lett. *34*, 503 (2001).
19. Mohanty U. S.: J. Appl. Electrochem. *41*, 257 (2011).
20. Fojta M., Havran L., Pivoňková H., Horáková P., Hocek M.: Curr. Org. Chem. *15*, 2936 (2011).
21. Danhel A., Barek J.: Curr. Org. Chem. *15*, 2957 (2011).

HPLC with Dual Amperometric Detection
(HPLC s duální amperometrickou detekcí)

Hana Dejmkova, Hana Axmannova, Jiri Barek, and Jiri Zima
Charles University in Prague, Faculty of Science, Research Centre UNCE "Supramolecular Electrochemistry", Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, CZ-128 43 Prague 2, Czech Republic,
E-mail: dejmkova@natur.cuni.cz

Abstract
Dual amperometric detection presents an interesting enhancement of electrochemical detection in flow methods – combination of two electrodes in serial or parallel arrangement under different potentials enables to gain additional information that can help to answer the analytical questions. In this contribution, variations in the settings are discussed together with the examples from the determination of food components or ecotoxicological compounds.

Key words: HPLC, Amperometry, Dual electrode.

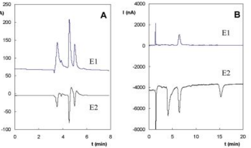
Úvod
Amperometrická detekce v různém uspořádání si udržuje své jisté místo mezi detekčními technikami v průtokových metodách, zejména v HPLC, nicméně i v této ověřené oblasti existují méně běžné varianty či kombinace, které umožní pro konkrétní aplikace zlepšit parametry měření. Jednou z těchto variant je měření s duálním zapojením elektrod, kdy je analytická informace výsledkem kombinace signálů získaných na dvou elektrodách, uspořádaných paralelně či sériově vzhledem k toku mobilní fáze. Popsané uspořádání umožňuje zvětšit citlivost či selektivitu stanovení, pro které je používáno [1-4].

Přístrojové vybavení
Typické přístrojové vybavení pro tento typ detekce je tenkovrstvá průtoková cela, kde je jediná detekční elektroda nahrazena dvojicí elektrod. Jejich tvar je obvykle diskový [5] nebo pásový [6,7], nicméně jsou popsané i jiné varianty, jako například kombinace podkovové a diskové elektrody [8]. Pro výrobu lze použít jakýkoliv z běžných pevných elektrodových materiálů. Komerčně dostupná je sada tvořená párem či čtveřicí elektrod ze skelného uhlíku, vyráběná například společností BASi.

Výsledky
Jak již bylo řečeno, lze z hlediska uspořádání elektrod rozlišovat dvě základní uspořádání, sériové a paralelní. V případě sériového uspořádání je potenciál první, proti proudu umístěné elektrody E1 typicky nastaven na vyšší hodnotu a slouží k primární elektrochemické konverzi (anodické či katodické) sledovaných látek; potenciál druhé, po proudu umístěné elektrody E2 je typicky nižší a sleduje zpětnou reakci produktů vzniklých na první elektrodě. Vzniká tím jakási obdoba voltametrického měření na diskové elektrodě s prstencem. V závislosti na reverzibilitě elektrodové reakce jednotlivých látek se relativní odezva druhé z elektrod mění; tím může být dosaženo vyšší selektivity, jak ukazuje příklad na obr. 1A, kdy je na elektrodě E2 potlačen pík nečistot ve prospěch druhého píku kapsaicinu a třetího píku dihydrokapsaicinu. Absolutní velikost píku je obvykle na elektrodě E2 menší, protože i při plně reverzibilní reakci brání dosažení plné výtěžnosti geometrické uspořádání detektoru, nicméně tato nevýhoda je kompenzována nižším proudem pozadí, spojeným s nízkým detekčním potenciálem na E2. Druhé zapojení, tedy vložení nižšího potenciálu na elektrodu E1, je také možné – zde potom dochází k částečnému odstranění látky s nižším reakčním

potenciálem ze sledovaného roztoku reakcí na E1, což zmenšuje interference na detekční elektrodě E2.

V druhém možném, paralelním uspořádání pracují obě elektrody nezávisle, stejným způsobem, jako ve standardním jednoelektrodovém uspořádání, ale jejich současná přítomnost umožňuje měřit současně odezvu při dvou nezávislých potenciálech a vhodným zpracováním získaných dat zjistit komplexnější informaci o sledovaných látkách. Nejjednodušší variantu představuje prostá detekce při vyšším a nižším potenciálu, případně při anodickém a katodickém potenciálu, jak je ukázáno na Obr. 1B, kde můžeme sledovat hydraziny v anodické i katodické oblasti potenciálů, ale odpovídající hydrazony jen v oblasti katodické. Další zpracování získaných dat ovšem umožňuje i eliminaci některých interferujících píků a podobné operace.



Obr. 1. (A) Chromatogramy extraktu chilli papriky získané sériovou duální amperometrickou detekcí ($E1_{DET}$ = 1,2 V, $E2_{DET}$ = 0,0 V, kolona LiChroCart 125-4 Purospher STAR 125-4, RP 18E (5 µm), mobilní fáze acetátový pufr pH 4: acetonitril (30:70, V/V)); (B) Chromatogramy reakční směsi nitrofenylhydrazinů a jejich hydrazonů ($E1_{DET}$ = 1,0 V, $E2_{DET}$ = – 1,0 V, kolona Kromasil 100 C18 7 µm, 150×4.6 mm, mobilní fáze fosfáto-acetátový pufr pH 3: methanol (60:40, V/V).

Závěr

Amperometrická detekce na dvojici elektrod představuje zajímavou nadstavbu k běžným technikám elektrochemické detekce – za cenu mírně větších nároků na instumentaci umožňuje získat o studovaném vzorku větší množství informací a tím zmenšit nároky na chromatografickou část stanovení nebo komplexněji zodpovědět kladené chemickoanalytické otázky.

Poděkování

Tato práce byla finančně podporovaná Grantovou agenturou České Republiky (projekt č. P206/12/G151).

Literatura

1. Hou W., Wang E.: Analyst *115*, 139 (1990).
2. Lin Y., Zhan R.: Electroanalysis *6*, 1126 (1994).
3. Schieffer G. W.: Anal. Chem. *52*, 1994 (1980).
4. Williams C. K., Koppang M. D.: Electroanalysis *18*, 2121 (2006).
5. Roston D. A., Kissinger P. T.: Anal. Chem. *54*, 429 (1982).
6. Cesar Paixao T. R. L., Richter E. M., Alves Brito-Neto J. G., Bertotti M.: J. Electroanal. Chem. *596*,101 (2006).
7. René A., Cugnet C., Haucharda D. Authier L.: Sens. Act. B-Chem. *174*, 225 (2012).
8. MacCrehan W. A., Durst R. A.: Anal. Chem. *53*, 1700 (1981).

Possibilities and Limitations of Antimony-Modified Carbon Paste Electrodes for the Determination of Trinitrotoluene, TNT
(Možnosti uhlíkových pastových elektrod modifikovaných filmem z antimonu ke stanovení trinitrotoluenu (TNT))

Barbora Dellingerová, Hanna Ingrid Sopha, Ivan Švancara, and Kurt Kalcher
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, CZ-532 10, Pardubice, Czech Republic, E-mail: Ivan.Svancara@upce.cz

Abstract: Antimony films plated *ex-situ* onto carbon paste substrates consisting of either traditional carbon paste from graphite powder (SbF-CPE) or a special mixture from glassy carbon microspheres (SbF-GCPE) are introduced and used to determine trinitrotoluene (TNT) in combination with adsorptive cathodic stripping voltammetry (AdSV). It was confirmed that both SbF-plated electrodes exhibited three well-developed peaks, P1,P2, and P3; each one being more or less proportional to concentration of TNT. After optimization of key working conditions, the measurements were carried out in Britton-Robinson buffer (pH 9) using an accumulation at -0.3 V vs. Ag/AgCl and for a period depending on the content of TNT. Linear calibration curves were obtained in the concentration range of 0,2-1.2 ppm TNT, when accumulating for 180 s; the detectability being dependent upon the choice of peak for evaluation. The respective LODs (3σ) then were estimated as follows: for P1: 85 μg L^{-1}, for P2: 43 μg L^{-1}, and for P3: 121 μg L^{-1}.

Key Words: Antimony film, Carbon paste, Glassy carbon paste, Electrode substrate, Stripping voltammetry, Trinitrotoluene (TNT), Calibration and LODs.

Úvod

2,4,6-trinitrotoluen (TNT) je jednou z nejrozšířenějších vojenských výbušin a neméně významné je i jeho průmyslové využití pro relativně bezpečnou manipulaci a své výhodné fyzikálně-chemické vlastnosti[1]. TNT je stabilní a nehygroskopický, s jen minimální citlivostí na náraz, tření či elektrostatický výboj. Jde o látku téměř nerozpustnou ve vodě, ale i alkoholu, dobře se však rozpouští v nepolárních rozpouštědlech, jako např. benzen, toluen, popř. aceton. TNT má symetrickou molekulu, avšak jako surový produkt je obvykle směsí nesymetrických izomerů, které vznikají v průběhu nitrace toluenu; izomerů je celkem šest, v praxi je však využíván především výše uvedený 2,4,6- trinitrotoluen [1,2].

Analýze výbušin a příbuzných materiálů je věnována značná pozornost, především na poli národní bezpečnosti a monitorování životního prostředí [1,2]. Eskalující hrozby teroristických skupin, ale i rostoucí obavy o okolní životní prostředí, postupně vyústily ve vývoj nových a efektivnějších detekčních systémů pro sledování stop výbušnin [3]. Jejich detekce je často nutná doslova v polních podmínkách, a proto vyžaduje vysokou analytickou výkonnost spojenou s nezbytnou miniaturizací používaného vybavení, což u řady instrumentálních technik vyvolává i značný nárůst pořizovacích a provozních nákladů [3].

Právě elektrochemické a jmenovitě voltametrické techniky jsou výhodnou alternativou [4]. Jak ukazují některé přehledy z poslední doby [3,5-7], jsou si analytici této skutečnosti dobře vědomi a využívání elektroanalytických měření pro detekci a stanovení malých množství látek typu TNT rychle vzrůstá. Prim hrají metody tzv. elektrochemické stripping analýzy (ESA), kdy i velmi nízké koncentrace lze zachytit v nahromaďovacím kroku a tím i detekovat [4,7].

Základem úspěchu v ESA je volba vhodné pracovní elektrody; Pro tyto účely byly studovány nejrůznější typy, varianty či modifikace, přesto na dlouhá desetiletí opanovaly pomyslnou první příčku elektrody a čidla ze rtuti [8,9]. Situace se však výrazně změnila s nástupem nového tisíciletí, pod stále rostoucím vlivem ekologické analýzy – tzv. zelené chemie [10], kdy se pro přípravu a posléze i výrobu elektrod začaly prosazovat materiály s podobnými vlastnostmi jako rtuť, avšak šetrnější k životnímu prostředí. Jednoznačně nejvýraznějším počinem tohoto druhu jsou elektrody na bázi bismutu a antimonu, zejména v konfiguraci tzv. filmových elektrod, BiFE a SbFE, které za pouhých patnáct [11], resp. osm [12] let existence představují respektovaný a již zavedený typ pracovních elektrod pro ESA se širokým spektrem praktických aplikací [13-15]. Zatímco v oblasti anorganické analýzy jsou možnosti jejich využití takřka srovnatelné se rtuťovými předchůdci, o analýze organických látek a biologicky důležitých sloučenin se to zatím konstatovat nedá. Zvláště to platí pro antimonové elektrody, které byly prozatím použity jen v několika málo případech [16-19], přestože nabízejí podobné či dokonce lepší vlastnosti ve srovnání s protějšky z bismutu (např. téměř stejný rozsah polarizace a obecně příznivější charakteristiky u měření při nižších pH).

Stanovení TNT s elektrodami typu SbF-CPE a SbF-GCPE se v tomto příspěvku opírá o nedávno vypracovanou studii z našich laboratoří [20,21], kdy byla použita pasta z práškového skelného uhlíku v roli nosiče externě vylučovaného bismutu. Elektrochemická detekce TNT vycházela z již popsané elektroaktivity tří redukovatelných nitroskupin v molekule, probíhající ve vodných roztocích o vyšším pH [22,23], a to tak, že jako první je redukována nitroskupina v *ortho*-poloze vůči methyl-substituentu, jako poslední pak nitroskupina v poloze *para*-[22,23]. Také naše studie prokázaly, že symetricky uspořádané nitroskupiny se redukují postupně a jednotlivé redukční signály zřejmě odpovídají redukci jedné nitroskupiny.

Co se týče zde prezentovaného příspěvku, je v něm poprvé popsáno využití elektrod typu SbF-(G)CPE a proto dosažené výsledky — ač ve stadiu úvodní studie — mohou dopomoci k dalšímu rozšíření antimonem-modifikovaných elektrod v organické (elektro)analýze, které je dosud spíše sporadické, jak již bylo konstatováno výše.

Experimentální část

Chemikálie a použité roztoky

Všechny látky pro přípravu a roztoků a použité během měření byly analytické čistoty. Zásobní roztok 2,4,6-trinitrotoluenu (TNT) o koncentraci 1000 mg.L^{-1} byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství látky v acetonitrilu. Pro přípravu antimonového filmu *ex-situ* byl použit zásobní roztok Sb^{III} soli (čistota pro AAS, koncentrace 1000 ± 0,1 mg.L^{-1}, Sigma-Aldrich), který byl ředěn dle potřeby. Britton-Robinsonův pufr byl získán smícháním roztoků 0,2 M NaOH a směsi 0,04 M HNO_3 + CH_3COOH + H_3BO_3 na požadovanou hodnotu pH.

Měřicí aparatura a další instrumentace

Voltametrická měření byla prováděna s elektrochemickou automatickou stanicí AUTOLAB (model "PGSTAT 30", Ecochemie, Utrecht, HOL) řízeným software Nova 1.10 (Metrohm Autolab B.V.). Ve 3-elektrodovém uspořádání byla pracovní elektrodou čistá nebo antimonem modifikovaná uhlíková pastová elektroda (CPE a SbF-CPE; viz níže), popř. elektroda z práškového skelného uhlíku (GCPE a SbF-GCPE). Ag/AgCl/3M KCl byla použita jako elektroda srovnávací a platinový plíšek (A_{Pt} = 3×5 mm) jako elektroda pomocná.

Pracovní elektrody

Byly zhotoveny dva typy uhlíkových past, první z nich standardní směs, označená jako CP a druhá pasta byla ze speciálního práškovitého skelného uhlíku s kulovými částicemi (GCP;

podrobná specifikace [24]. Ve třecí misce bylo ručně smícháno a tloučkem zhomoge-nizováno příslušné množství uhlíkového prášku (typ "CR-5"; Maziva Týn, ČR), resp. práškovitého skelného uhlíku ("Sigradur-G", HTW Maitingen, DEU) s běžným parafínovým olejem (Merck). V případě standardní uhlíkové pasty bylo použito 30 % (w/w) oleje, v případě skelného uhlíku 20 % parafínového oleje. Oběma pastami byly naplněny dvě identické elektrodová pouzdra vlastní konstrukce [25] o průměru náplňového otvoru, d = 3 mm. Před každou sérií nových měření byl povrch elektrod obnovován šetrným otřením povrchové vrstvy vlhkým filtračním papírem.

Pozn.: Ze studijních důvodů byl zhotoven i třetí typ uhlíkové pasty na bázi tzv. grafenu ('Gr"; tzv. 2D-formy uhlíku), smíšením mimořádně jemného prášku s nadbytkem parafínového oleje v poměru cca 1:5 (v/v). Tento substrát byl také testován pro vylučování filmu antimonu a funkčnost konfigurace SbF-GrPE zkoušena na detekci TNT. Šlo však o několik málo úvodních experimentů, které nejsou zmíněny v celkovém souhrnu.

Před vylučování antimonového filmu byl povrch CPE popř. GCPE aktivován při potenciálu +0,5 V vs. Ag/AgCl po dobu 30 s. Antimonový film byl generován *ex-situ* v roztoku o složení 0,01 M HCl + 5 mg.L^{-1} Sb^{III} při potenciálu -1,0 V po dobu 60 s pro CPE a 120 s pro GCPE.

Pracovní postupy

TNT bylo detekováno technikou adsorptivní stripping voltametrie (AdSV) s potenciálovou rampou v režimu square-wave (f = 25 Hz, ΔE = 50 mV, potenciálový přírůstek = 4 mV). Měření probíhala v Britton-Robinsonově pufru (pH 9,0) jako nosného elektrolytu. Při prvním kroku, nahromaďování, jenž probíhal za míchání a při potenciálu -0,3 V vs. Ag/AgCl (ref.) po dobu 60 s, popř. 180 s; následovala vřazená doba klidu, t_R = 10 s, již bez míchání. V detekční, rozpouštěcí (stripping) fázi, byla zaznamenávána křivka v intervalu -0,3 V až -1,0 V vs. ref., tj. jako katodická redukce. Případný rušivý vliv rozpuštěného kyslíku byl zamezen probubláváním roztoku inertním plynem po dobu 5 min., a to těsně před měřením(i).

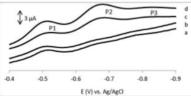
Mezi jednotlivými záznamy obvykle nebylo prováděno elektrochemické čištění povrchu elektrody s vyloučeným Sb-filmem, avšak v případě nižších koncentrací (c < 0,5 mg.L^{-1}), nebo při opakování měření u zjišťování reprodukovatelnosti, byla taková regenerace prováděna při potenciálu -1,0 V po dobu 30 s. Naměřené signály byly zaznamenávány jako intenzity proudu, I_P, v µA. Výšky píků byly vyhodnocovány pomocí výše specifikovaného software a zpracovávány v programu Microsoft Excel.

Výsledky a diskuse

Při hledání výchozích experimentálních podmínek a přístrojových parametrů bylo využito výsledků a pozorování z předchozí studie s BiF-GCPE [20,21]. Úvodní experimenty zaměřené na výběr nejvhodnější elektrody pro detekci TNT v Britton-Robinsonově pufru (pH 9,0), jmenovitě (a) na CPE, (b) SbF-GCPE, (c) GCPE a (d) SbF-GCPE.

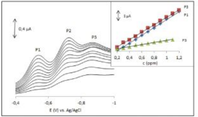
Ve všech čtyřech případech bylo možné sledovat trojici redukčních píků, P1, P2, a P3, nacházející se při potenciálu E_{P1} = -0,5; E_{P2} = -0,7 V a E_{P3} = -0,85 V vs. ref. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s konfigurací typu GCPE a SbF-GCPE, kde všechny tři signály byly dobře patrné (Obr. 1). Po testu na reprodukovatelnost měření byla nakonec zvolena varianta SbF-GCPE. (V předchozí poznámce uvedené konfigurace typu GrPE a SbF-GrPE se vůbec neosvědčily; problém byl už s konzistencí a soudržností samotné pasty a po několika neúspěšných zkouškách byly elektrody z grafenu ze studie definitivně vyřazeny.)

K dosažení co nejlepší výkonnosti zvolené elektrody byly opět ověřovány některé klíčové podmínky a parametry, zejména optimální pH elektrolytu a doba akumulace. Nejlépe vyvinuté stripping piky byly zjištěny pro pH 9, optimální doba akumulace byla 60 s pro obsahy kolem 1 ppm, nižší vyžadovaly nahromadění při 180 s, což odpovídalo předchozím zkušenostem [20,21].



Obr. 1: SWV křivky pro 2 ppm TNT na čtyřech různých elektrodách: a) CPE, b) SbF-GCPE, c) GCPE, d) SbF-GCPE. Exp. podmínky: Britton-Robinsonovův pufr (pH 9); potenciál akumulace, E_{acc} = -0,3 V vs. ref.; doba akumulace, t_{acc} = 60 s, doba klidu, t_r = 10 s; Parametry SWV rampy: f_{SW} = 25 Hz; E_{SW} = 4 mV; ΔE_{SW} = 50 mV.

Kalibrace v rozmezí 0,2-1,2 ppm znázorněná na Obr. 2 a odpovídající alikvotním přídavkům po 0,1 ppm TNT a provedená při t_{acc} = 180 s na SbF-GCPE nabídla poměrně dobře vyvinuté rozpouštěcí signály pro všechny tři redukce. Příslušné korelační koeficienty byly vyhodnoceny takto: pro P1: R^2 = 0,999, P2: R^2 = 9971 a P3: R^2 = 9902.



Obr. 2: SWAdSV a kalibrační křivka pro detekci TNT v inter-valu 0,2-1,2 ppm TNT na SbF-GCPE *ex-situ*, testované v Britton-Robinsonově pufru (pH 9,0).

Pro analýzu lze doporučit především píky "P1" a "P2". Limit detekce (LOD, 3σ) byl pro signál P1 odhadnut na 85 μg L^{-1}, pro signál P2 na 43 μg L^{-1}, a při opakování měření s 200 μg L^{-1} TNT při delší době akumulace (180 s). pro P3 121 μg L^{-1}. Reprodukovatelnost měření, $R_{\pm}$ (n = 10) pro modelovou koncentraci 200 μg L^{-1} TNT a t_{acc} = 180 s byla charakterizována hodnotou RSD; pro P1: $R_{\pm}$ = 14,2 %, pro P2: $R_{\pm}$ = 7,2 % a pro P3: $R_{\pm}$ = 20,1 %.

Závěr

V této studii byla testována možná aplikace antimonem modifikovaných uhlíkových pastových elektrod k detekci a eventuálního stanovení trinitrotoluenu, TNT, s využitím stripping voltametrie v režimu SWV. Pomocí SbF-GCPE připravené *ex-situ* byly příslušné signály postupné redukce kalibrovány v koncentračním rozmezí 0,2-1,2 ppm při akumulaci po dobu 180 s, přičemž detekční schopnosti byly odhadnuty na úrovni 0,05-0,1 ppm.

Poděkování

Tato práce vznikla s podporou projektu Studentské grantové soutěže FChT Univerzity Pardubice, č. SGFCHT06-2013. B.D. a K.K. by také rádi poděkovali za financování studijního pobytu na KFU Graz z mezinárodní výměnné sítě CEEPUS, č. CIII-CZ-0212-08-1415 a projektu "Education of Modern Analytical and Bioanalyticall Methods"

Literatura

1. Akhavan J., *The Chemistry of Explosives*, 2nd Ed. RSC Paperbacks, Cambridge 2001.
2. Yinon J., *Forensic and Environmental Detection of Explosives*. J. Wiley, New York 1999.
3. Wang J., Counterterrorist Detect. Tech. Explos. *1*, *91* (2007)
4. Wang J., *Analytical Electrochemistry*, 3rd Ed., Wiley-VCH, Hoboken, New York 2006.
5. Wang J., Electroanalysis *19*, 415 (2007).
6. Barek J., Fischer J., Wang J.; in: *Sensing in Electroanalysis*, Vol. 6 (Kalcher K., Metelka R., Švancara I., Vytřas K.; Eds.), pp. 139–147. Univ. Pardubice Press, Pardubice 2011.
7. Barek J., Fischer J., Wang J.; in: *Environmental Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors*, Volume 2: Applications (Moretto L.M. and Kalcher K., Eds.); Chapter 12, pp. 965–979. Springer, New York 2015.
8. Economou A., Fielden P.R., Analyst (U.K.) *128*, 205 (2003).
9. Vyskočil V., Barek J., CRAC – Crit. Rev. Anal. Chem. *39*, 173 (2009).
10. De la Guardia M., Garrigues S.; Eds., *Handbook of Green Analytical Chemistry*. J. Wiley, New York 2012.
11. Wang J., Lu J.-M., Hočevar S.B., Farias P.A.M., Ogorevc B., Anal. Chem. *72*, 3218 (2000).
12. Hočevar S.B., Švancara I., Ogorevc B., Vytřas K, Anal. Chem. *79*, 8639 (2007).
13. Švancara I., Vytřas K., Chem. Listy *100*, 90 (2006).
14. Kokkinos C., Economou A., Curr. Anal. Chem. *4*, *183* (2008).
15. Švancara I., Prior C., Hočevar S.B., Wang J., Electroanalysis *22*, 1405 (2010).
16. Nigović B., Hočevar S.B., Electrochim. Acta *58* 523 (2011).
17. Vajdle O., Guzsvány V., Papp Zs., Sopha H., Šebez B., Hočevar S.B., Ogorevc B.; in: YISAC '11: 18th Young Investigators' Seminar on Analytical Chemistry, Book of Abstracts, p. 16. Univ. Press, Novi Sad (Serbia) 2011.
18. Nigović B., Hočevar S.B., Electrochim. Acta *109*, 818 (2013).
19. Cesarino I., Cesarino V., Lanza M.R.V., Sensors Actuators, B *188*, 1293 (2013).
20. Sopha H., Švancara I.; in: *XXXIV. Moderní elektrochemické metody*, Book of Abstracts (Navrátil T., Fojta M., Pecková K.; Eds.), pp. 166 –170; Best Servis, Ústí n. L. 2014.
21. Sopha H., Švancara I., Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A *20*, 7 (2014).
22. Galík M., O'Mahony A.M., Wang J., Electroanalysis *23*, 1193(2011).
23. Chua C.K., Pumera M., Rulíšek L.: J. Phys. Chem. *116*, 4243 (2012).
24. Švancara I., Hvizdalová M., Vytřas K., Kalcher K., Novotný R., Electroanalysis *80*, 61 (1996).
25. Švancara I., Metelka R., Vytřas K.; in: *Sensing in Electroanalysis* (Vytřas K., Kalcher K., Eds.), pp. 7–18. Univ. Pardubice Press, Pardubice 2005.

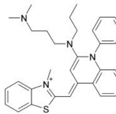
Electrochemical Analysis of Sybr Green I and its Interaction with DNA (Elektrochemická analýza Sybr Green I a jeho interakce s DNA)

Zdenka Dudová, Hana Pivoňková, Luděk Havran, and Miroslav Fojta
Institute of Biophysics of the AS CR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic,
E-mail: dudova@ibp.cz

Abstract
There are used many methods such real-time PCR and electrophoresis in molecular biology and biochemistry which are based on utilization of a fluorescent dye Sybr Green I (SG) for selective detection of double stranded (ds) DNA and its quantification. SG is a planar molecule (see Fig. 1) that intercalates into the DNA double helix and simultaneously can bind into minor groove of dsDNA. In our work we focused on electrochemical behavior of SG on a pyrolytic graphite electrode (PGE) using square-wave voltammetry (SWV). The voltammetric method was used in measurements of SG interactions with DNA at the PGE.

Key words: Sybr Green I, Pyrolytic graphite electrode, Square wave voltammetry, PCR.

Úvod
V molekulární biologii je používáno vícero metod, které využívají k detekci nukleových kyselin fluorescenční značení a barvení. Jako konkrétní příklady lze uvést barvení gelů [1] a kvantifikaci DNA během real-time PCR [2] pomocí barviva Sybr Green I (Obr. 1). SG je planární molekula, která nekovalentně interaguje se dvouřetězcovou (ds) molekulou nukleové kyseliny (NK) interkalací nebo vazbou do malého žlábku, pokud je SG v nadbytku [3,4]. Komplex SG s dsDNA vykazuje silnou fluorescenci. SG je mírný mutagen, ale v porovnání s etidium bromidem (EtBr) méně zdraví škodlivý [5]; navíc lze SG aplikovat v menších koncentracích díky vyšší intenzitě flurescence a tudíž vyšší citlivosti stanovení DNA. Elektrochemické vlastnosti SG, především v interakci s nativní nebo modifikovanou DNA, nebyly dosud podrobně popsány. V tomto příspěvku se zabýváme elektrochemickou analýzou SG za použití square-wave voltametrie (SWV) na pyrolytické grafitové elektrodě (PGE) a následnou analýzou interakce SG s DNA na povrchu PGE.



Obr. 1. Chemická struktura Sybr Green I.

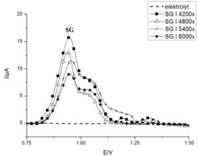
Experimentální část
Zásobní roztok Sybr Green I od firmy Sigma-Aldrich byl naředěn v 0,2M acetátovém pufru pH 5,5 v poměru 1:3000 a 1:6000 µl. Do uvedeného roztoku byla na 60 s ponořena PGE

a poté v tomtéž roztoku změřena SWV za následujících podmínek: počáteční potenciál -1,0 V; koncový potenciál 1,6 V; frekvence 200 Hz; amplituda 50 mV; potenciálový krok 5 mV, referentní elektroda Ag|AgCl|3M KCl.

Použitá DNA byla amplifikována PCR z bakteriálního linearizovaného plazmidu pBSK. Produkt PCR byl dlouhý 987 bp. Reakční směs pro PCR obsahovala ve 100 µl 8 ng templátové DNA; 2 µM primery 987R a 987L; 200 µM dNTPs; 1 U Taq polymerázy. Reakce probíhala ve 30 cyklech: 95 °C/15 s, 55 °C/30 s, 72 °C/60 s. PCR produkty byly přečištěny za použití PCR purifikační sady od firmy Macherey-Nagel (Nucleospin Gel and PCR Clean-up) a jejich koncentrace byla změřena spektrofotometricky na NanoDrop ND-1000 spektrofotometru (NanoDrop Technologies, USA). Takto připravená DNA byla adsorbována na PGE pro studium interakce se SG.

Výsledky a diskuse

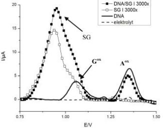
Pomocí SWV jsme nejprve studovali oxidaci SG na PGE. Na voltamogramu (Obr. 2) je patrný nárust dvojpíku v potenciálu 0,95 V. Výška píku roste s nárustem koncentrace SG v elektrolytu, resp. pozorovali jsme tendenci poklesu výšky píku SG se zvyšujícím se ředěním SG (v obrázku nejsou ukázány všechny měřené koncentrace, resp. ředění SG). Současně jsme pozorovali mírný posun píku SG směrem k positivnějším potenciálům s poklesem koncentrace SG v roztoku.



Obr. 2. SWV voltamogram různě ředěného Sybr Green I. PGE byla ponořena do roztoku ředěného SG v acetátovém pufru (4200x - 6000x zředěný zásobní roztok SG), po 60 s byla měřena SWV.

Sybr Green I se interkaluje do dsDNA, pokud je v reakční směsi poměr nukleobází a molekul SG (dye/base-pair ratio, dbpr) pod 0,2 [6]. Pokud poměr bází a SG molekul přesáhne 0,2 dbpr, váže se SG i do malého žlábku dsDNA. Stacking interakce s bázemi malého žlábku (především G-C bohaté oblasti) mohou vést k polarizaci interkalátoru. Elektrostatické interakce mezi fosfátovými skupinami DNA a kladně nabitým SG vedou ke stabilizaci dvoušroubovice DNA.

V této práci jsme se zaměřili na možnost využití oxidačního signálu SG k detekci interakce mezi dsDNA adsorbované na povrchu PGE a SG přímo v základním elektrolytu. Na Obr. 3 je patrný rozdíl mezi voltamogramem samotné dsDNA (pík G^{ox} odpovídající oxidaci guaninu při 1,05 V) a dsDNA adsorbované na PGE a vložené na 60 s do roztoku SG (pík „SG" kolem 0,95 V). Pozorujeme posun píku směrem k více pozitivním potenciálům a nárůst proudové odezvy, tedy výšky píku. Tyto efekty mohou být vyvolány akumulací SG na povrchu elektrody na základě interakce s adsorbovanou DNA. Pozitivní posun potenciálu píku SG pak může souviset s interkalací molekuly SG. Pík A^{ox} odpovídající oxidaci adeninových bází, kolem potenciálu 1,35 V, se mírně snižuje s rostoucí koncentrací SG v roztoku (Obr. 3).



Obr. 3. SWV voltamogram interakce Sybr Green I a s DNA modifikovanou elektrodou. Na PGE byla naadsorbována nativní DNA (samovolná adsorpce 60 s; koncentrace DNA 30 ng/μl), poté byla elektroda omyta a ponořena na 60 s do roztoku 3000x zředěného SG acetátovým pufrem, po omytí přenesena do měřícího elektrolytu (0,2 M acetátový pufr, pH 5,5).

Závěr

Předběžné výsledky prezentované v tomto sdělení ukazují, že (a) barvivo SG poskytuje během elektrochemické oxidace dobře vyvinutý anodický pík na PGE, a (b) tento signál může být využit pro studium interakce DNA se SG na povrchu elektrody. Další experimenty budou věnovány detailnímu studiu chování DNA a SG na PGE při různých koncentračních poměrech.

Poděkování

Tato práce vznikla s podporou grantu GBP206/12/G151 a institucionální podpory RVO 68081707.

Literatura

1. Iida R., Yasuda T., Tsubota E., Nakashima Y., Sawazaki K., Aoyama M., Matsuki T., Kishi K.: Electrophoresis *19*, 2416 (1998).
2. Wege H., Chui M. S., Le H. T., Tran J. M., Zern M. A.: Nucleic Acids Res. *2*, 31 (2003).
3. Jin X., Dong F., Singer V. L.: Faseb J. *10*, 751 (1996).
4. Kiltie A. E., Ryan A. J.: Nucleic Acids Research. *25*, 2945 (1997).
5. Singer V. L., Lawlor T. E., Yue S.: Mut. Res.-Gen. Tox. En. *439*, 37 (1999).
6. Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F.: Nucleic Acids Res. *32* (2004).

Electrochemical Verification of Enzyme/QDs Labelled Antibodies Functionality: An Essential Step in ELISA Methods

Veronika Dvořáková [a,b], Michaela Čadková [a,b], Radovan Metelka [b], Zuzana Bílková [a], and Lucie Korecká [a]

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

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

Abstract

In development of immunoassays for biomarkers of such diseases, the availability of secondary antibodies conjugated with suitable label which could be utilized for highly sensitive electrochemical detection is limited. We established efficient in-house labelling procedure for conjugation of antibodies with CdSe/ZnS quantum dots (QDs) based on antigen modified magnetic microparticles serving as a solid anchor. QLISA based immunosensors achieve higher sensitivity comparing to ELISA based biosensors. Also in case of labelling of antibodies with alkaline phosphatase (ALP) we present a simple verification of labelling protocol efficiency based on electrochemical detection.

Key words: antibody labelling, quantum dots, electrochemical immunosenzor, magnetic particles, ELISA.

Introduction

Immunoassays such as ELISA methods are widely used for quantitative determination of various bioactive proteins especially due to specificity and affinity to target analytes (allergens, toxins, tumor markers etc.) [1,2]. Basically, these methods are based on specific recognition between antibody/antigen and formation of tight immunocomplex which could be visualised by appropriately labelled secondary antibody. The most common enzyme for antibody labelling is horse radish peroxidase (HRP) [2]. Sensitivity of systems using HRP is limited. Especially for analysis of tumor markers the use of other suitable labels is at the forefront of scientists.

Alkaline phosphatase is suitable alternative in ELISA based biosensors reaching high sensitivity [3]. Additionally, in biosensing research, surface functionalized quantum dots, semiconductor nanocrystals with a core-shell structure and a diameter that typically ranges from 2 to 10 nm, are increasingly used as labels in antigen-antibody interaction [4-6]. The use of QDs instead of widely used enzymatic labels may save the time of analysis and cost of test. Moreover QDs made of various heavy metals enable the simultaneous analysis of more biomarkers in one step with minimal peak overlap [7].

In this contribution we present an efficient in-house labelling protocol for direct covalent conjugation of antibody with QDs with use of antigen modified magnetic microparticles (Fig. 1) as well as simple electrochemical verification of labelling efficiency.

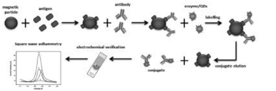


Fig. 1. Scheme of antibody labelling procedure with use of antigen modified magnetic particles and verification of conjugate functionality by electrochemical detection.

Experimental

In-house labelling of anti-ApoE antibodies by CdSe/ZnS quantum dots

Firstly, magnetic particles were modified by specific antigen ApoE by two-step immobilization procedure in presence of N-(3-Dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt (sulfo-NHS) in ratio 6 : 1. Preventive blocking by ethanolamine followed to avoid non-specific sorption. After creation of immunocomplex between antigen and antibody (anti-Apo E IgG) for 1 hour incubation at room temperature supplemented by gentle rotation. Following conjugation with QDs was proceeded also by two-step carbodiimide method with EDC:sulfo-NHS ratio of 6:1. After overnight incubation at 4°C efficient elution of target conjugates (anti-ApoE^{QDs} IgG) by use of 0.1% trifluoroacetic acid cont. 0.5% SDS was performed.

Electrochemical detection of CdSe/ZnS by square wave anodic stripping voltammetry

Labelling efficiency was verified by square wave anodic stripping voltammetry as detection technique. Fractions before, after and washing fractions from immobilization were analysed as well as the small proportion of the proper conjugate. For analysis, each fraction was mixed with 0.1M HCl in ratio sample:HCl 10:40 µl. After 3 minute incubation the sample was applied to screen printed three electrode sensor with the mercury film (ItalSens, IT). Detection conditions were cond. potential 0 V, cond. time 0 sec, dep. potential -1 V, dep. time 120 sec, potential range from -0.95 to -0.15 V, frequency 20 Hz and amplitude 0.0285 V. Peak heights of single fractions were compared. The functionality of in-house labelled conjugate (the preserved antigen binding ability) was verified using antigen modified magnetic microparticles.

Labelling of anti-HE4 antibodies by alkaline phosphatase and electrochemical detection of alkaline phosphatase (ALP) by square wave voltammetry

Specific anti-HE4 IgG antibodies were labelled by enzyme alkaline phosphatase according standard protocol recommended by supplier of commercially available Lightning-Link® Alkaline Phosphatase kit (Innova Bioscience Ltd, Cambridge, UK) [8]. Functionality of conjugate labelled by ALP (anti-HE4^{ALP} IgG) was then verified using magnetic microparticles modified by anti-HE4 IgG antibody – HE4 antigen (0.5 µg) immunocomplex which was visualized by addition of anti-HE4^{ALP} IgG in 0.1 M carbonate buffer pH 9.4 containing 0.1 % BSA and 0.05 % Tween-20. Square wave voltammetry was employed as measuring technique for the detection of electroactive product formed after enzymatic hydrolysis of substrate *p*-aminophenyl phosphate (PAPP, 3 mM in 0.1 M Tris-HCl pH 8.9). The electrochemical detection was performed with electrochemical analyzer PalmSens (PalmSens BV, The

Netherlands) and screen-printed three-electrode sensors DRP-150 comprised of carbon working (4 mm diameter), platinum auxiliary and silver pseudo-reference electrode (DropSens, Spain). Parameters of voltammetric technique were as following: potential range from -0.3 V to 0.3 V, step potential 0.005 V, amplitude 0.02805 V, and frequency 20 Hz. Enzyme activity was monitored by the recording the peak height evaluated at tenth minute and potential 0.045 V.

Results and discussion

The main aim of this work was development of an efficient protocol for labelling antibodies by QDs and ALP used as an essential part in immunoassays for analysis of biomarker of ovarian cancer (protein HE4). The reason of this work is simple - commercial unavailability of chosen specific secondary antibody labelled by QDs (conjugate) and/or alkaline phosphatase. For ALP labelling, the commercially available kit for conjugation with antibodies was used. In case of QDs conjugation the model system comprised of anti-ApoE/ApoE was used for protocol development due to high price of anti-HE4 antibodies.

Problematic step of labelling approach which consists in mixture full of free fraction of antibodies, quantum dots and conjugates has been elegantly solved by using of magnetic carrier representing solid phase. This smart anchor allows better manipulation with the target product during whole protocol. Moreover binding site of antibody is protected because of immunocomplex formation which brings another benefit. As a result we obtained labelled secondary antibody of desired specificity with maintained affinity properties and prepared for further bioapplications. The complete arrangement is shown on Fig. 1.

QDs labelling efficiency was verified by square wave anodic stripping voltammetry as detection technique. Fractions before, after and washing fractions from immobilization were analysed as well as the small proportion of the proper conjugate. This method enables not only functional verification, but also the designation of optimal conjugate dilution, which is as essential step in the development of the whole immunosensor comprised of antibody-antigen-antibody^{QDs} for protein quantification. 0.5 µg of ApoE antigen covalently bound on the magnetic microparticles was taken into reaction with volume of prepared anti-ApoE^{QDs} ranging from 20 to 150 µl. Conditions of electrochemical detection are specified in experimental part. The optimal conjugate dilution was determined (Fig. 2). Electrochemical verification is the only option how to set the optimal conjugate amount for following analyses.

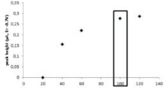


Fig. 2. Optimization of dilution of antibodies labelled by CdSe/ZnS quantum dots. In-house labelling protocol, verification by square wave anodic stripping voltammetry (SWASV), screen printed three-electrode sensors, recording of peak height at potential -0.7 V.

Efficiency of antibodies labelling with ALP using commercial conjugation kit as well as optimal conjugate dilution was verified by square wave voltammetry by detection of electroactive product formed after enzymatic hydrolysis of substrate *p*-aminophenyl phosphate. Due to fact, that labelling protocol was carried out according the optimized protocol recommended by supplier, anti-HE4 IgG antibodies were used directly. For optimization of conjugate dilution, whole immunocomplex comprised of anti-HE4/HE4/anti-$HE4^{ALP}$ was formed. Magnetic microparticles as a solid carrier for anti-HE4 immobilization were used for better manipulation. Conjugate dilutions ranging from 1/500 to 1/300 were tested. Fig. 3 shows that dilution 1/1000 was set to be optimal with regard to the economic advantage when dilutions 1/500 and 1/1000 are compared.

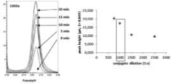


Fig. 3. Optimization of dilution of antibodies labelled by alkaline phosphatase. Labelling protocol by use of commercial kit, verification by square wave voltammetry, screen printed three-electrode sensors, recording of peak height at potential 0.04 V. Illustration of square wave voltammogram for conjugate dilution 1/1000 (left).

Conclusion

Novel in-house labelling approach for preparation of QDs conjugates for QLISA based biosensor for biomarker quantification is presented. Electrochemical detection serves as efficient detection tool for functional verification of prepared conjugate. In addition, alkaline phosphatase was used for antibody labelling as enzyme representative. Firstly, commercially labelling kit was used. Novel in-house labelling procedure as for QDs is now in progress with utilization of ALP.

Acknowledgement

This work was supported by Grant agency of the Czech Republic, project No. 15-16549S.

References

1. Jiang D., Zhang. Q., Shen X., Wang L., Jiang W.: Talanta, *82,* 1003 (*2010).*
2. Abuknesha R.A., Luk C.Y., Griffith H.H.M., Maragkou A., Iakovaki D.: J. Immunol. Methods *306*, 211 (2005).
3. Yin Z., Liu Y., Jiang L., Zhu J.: Biosens. Bioelectron. *26,* 1890 (2011).
4. Martin-Yerga, D., Gonzalez-Garcia M.B., Costa-Garcia A. Sensor. Actuat B-Chem. *182,* 184 (2013).
5. Sun H., Wang M., Wang J., Tian M., Wang H., Sun Z., Huang P.: Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, *30,* 37 (2015).
6. Mahmoud W., Rousserie G., Reveil B., Tabary T.: Anal. Biochem. 416, 180 (2011).
7. Wang J., Liu G., Merkoci A.: J. Am. Chem. Soc. *125*, 3214 (2003).
8. http://www.innovabiosciences.com/antibody-labeling-kits/enzymes/lightning-link-alkaline-phosphatase-ap.html, downloaded: 7. 4. 2015.

Voltammetric Determination of Imidacloprid on Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode

Jan Fischer [a], Victoria Tserpeli [b], Anastasios Economou [b], and Jiří Barek [a]

[a] Charles University in Prague, Faculty of Science, University Research Centre UNCE "Supramolecular Chemistry", Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 43 Praha 2, Czech Republic, E-mail: jan.fischer@natur.cuni.cz

[b] Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Athens 15771, Greece

Abstract

Voltammetric determination of Imidacloprid was studied using DC voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV) at a meniscus modified silver solid amalgam electrode (m-AgSAE). Optimal conditions were found for its determination in Britton-Robinson (BR) buffer pH 12 and pH 9 within the concentration range from 1.10^{-4} to 2.10^{-6} $mol.l^{-1}$ and $1 \cdot 10^{-4} - 4 \cdot 10^{-7}$ $mol \cdot l^{-1}$ for DCV and DPV, respectively.

Key words: DC voltammetry, Differential pulse voltammetry, Imidacloprid, Meniscus modified silver solid amalgam electrode.

Introduction

Neonicotinoid insecticides are synthetic derivatives of nicotine, an alkaloid compound found in the leaves of many plants. [1] These are insecticides which act on the central nervous system of insects with lower toxicity to mammals. Imidacloprid is the most frequently used insecticide from the chloronicotinyl group. [2] It is used to control sucking insects, some chewing insects including termites, soil insects, and fleas on pets. [1] The European Food Safety Authority stated that neonicotinoids present a high risk to bees. [3] For its voltammetric detection based on reduction of nitro group, several electroanalytical methods were developed on traditional electrodes. [4] Modern amalgam based electrodes presents new alternative of sensitive voltammetric determination of reducible compounds. [5, 6]

Experimental

All reagents were of analytical grade. A stock solutions of 1.10^{-3} $mol.l^{-1}$ Imidacloprid (1-((6-chloro-3-pyridinyl)methyl)-N-nitro-imidazolidinimine) was prepared by dissolving the substance (C.A.S. Registry Number: 138261-41-3; PESTANAL®, analytical standard, Sigma-Aldrich, Germany) in deionized water. Britton-Robinson buffer was used as a supporting electrolyte. Deionized water was produced by a Milli-Q plus system. Other chemicals were obtained from Lachema Brno (Czech Republic) in p.a. purity. All the chemicals were used without any further purification.

Voltammetric experiments were performed using computer controlled Eco-Tribo Polarograph. The working electrode was m-AgSAE with diameter 0.5 mm, reference electrode was Ag/AgCl/3 $mol \cdot l^{-1}$ KCl and auxiliary electrode was platinum wire. The polished silver solid amalgam electrode was immersed into a small volume of liquid mercury and agitated for 15 seconds to form m-AgSAE. This process, denoted as amalgamation, was repeated every week. [6] Before starting the experiment for each new surface of m-AgSAE, the electrochemical activation was carried out in 0.2 $mol.l^{-1}$ KCl at –2200 mV under stirring of the solution for 300 s followed by rinsing with distilled water. Work with m-AgSAE was carried out at a scan rate of 20 mV.s^{-1}, pulse amplitude of –50 mV, pulse duration of 100 ms, sampling time of 20 ms beginning 80 ms after the onset of the pulse and interval between pulses of 100 ms.

Results and discussion

Behaviors of Imidacloprid on m-AgSAE were explored by DCV and DPV in the range of pH 2 – 12 of Britton-Robinson buffer. At optimal pH 12.0 and pH 9.0 for DCV and DPV, respectively, signal stability was checked for series of thirty measurements in the presence of high concentration of Imidacloprid. No significant effect of passivation of m-AgSAE was found and this working electrode could be used without any preliminary regeneration of electrode surface. Found optimal conditions were used for measuring calibration dependences in the concentration range from 1.10^{-4} to 2.10^{-6} mol.l^{-1} with DCV and from 1·10^{-4} to 3·10^{-7} mol·l^{-1} with DPV, see Fig. 1. According to the obtained results, both methods DCV and DPV are suitable for further application in environmental samples.

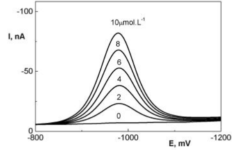


Fig. 1. DP voltammograms of Imidacloprid (from 2.0 μmol.L^{-1} to 10 μmol.L^{-1}) in Britton-Robinson buffer pH 9.0 at m-AgSAE without regeneration of the electrode. The numbers next to curves correspond to concentration of Imidacloprid in μmol·L^{-1}.

Conclusions

The m-AgSAE showed good and sensitive response towards Imidacloprid with reproducible results without any surface passivation. This indicates that m-AgSAE is a suitable sensor for the determination of micromolar concentrations of this substance, as the limit of determination was on micromolar level for both used voltammetric techniques and sensitivity of these methods could be further increased by a preconcentration step. Presented methods are be suitable for the determination of Imidacloprid in simple environmental matrices such as drinking, surface and river water.

Acknowledgements

Financial support from the Grant Agency of the Czech Republic (project P206/12/G151) is gratefully acknowledged.

References

1. Gervais J. A., Luukinen B.; Buhl K.; Stone, D., Imidacloprid Technical Fact Sheet National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services, 2010.
2. Guzsvany V., Kadar M., Papp Z., Bjelica L., Gaal F., Toth K.: Electroanalysis *20*, 291 (2008)
3. European Food Safety Authority: EFSA J. 11, 3066 (2013).
4. Fischer J., Dejmkova H., Barek J.: Curr. Org. Chem. *15*, 2923 (2011).
5. Niaz A., Fischer J., Barek J., Yosypchuk B., Sirajuddin, Bhanger M. I.: Electroanalysis *21*, 1719 (2009).
6. Chorti P., Fischer J., Vyskocil V., Economou A., Barek J.: Electrochim. Acta *140*, 5 (2014).

Electrochemical Reduction and Oxidation of Nucleic Acids Bases and their Analogues: a Brief Overview

Miroslav Fojta, Jan Špaček, Zdenka Dudová, Hana Pivoňková, Aleš Daňhel, Lukáš Fojt, and Luděk Havran
Institute of Biophysics of the AS CR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65, Brno, Czech Republic. E-mail: fojta@ibp.cz

Abstract
Nucleic acids are known as electroactive biomacromolecules containing electrochemically reducible or oxidizable constituents. Nucleobases cytosine, 5-methylcytosine, adenine and guanine can be reduced in aqueous media on mercury or silver amalgam electrodes. Oxidation of all natural nucleic acids bases (in addition to the above mentioned ones, also uracil and thymine) was demonstrated using various types of carbon electrodes. Some of synthetic nucleobases or nucleotide analogues (e.g., 7-deazapurines, cytidine analogues used as epigenetic modulators, etc.) exhibit specific electrochemical properties that differ from those of the parent bases and can be utilized to determine the given substance in the presence of natural nucleic acids or their components.

Key words: nucleobases, nucleic acids, electrochemistry, reduction, oxidation, synthetic analogues, structure

Introduction
It has been known for decades that nucleic acids (NAs) are electrochemically active and can be studied by a variety of electroanalytical methods (reviewed in [1]). Apart from catalytic oxidation of sugar residues in DNA or RNA at copper electrodes, which is actually not specific for the NAs, it is the presence of electrochemically reducible (at mercury-based electrodes) or oxidizable (usually at carbon electrodes) nucleobases which renders the NAs specific intrinsic electroactivity useful in a number of analytical applications. Recently, redox labelling of NAs with various extrinsic redox active moieties (covalently attached to sugar residues or to the nucleobases) has been developed as a versatile tool for highly specific analysis of nucleotide sequences and related purposes [1, 2]. Nevertheless, label-free techniques utilizing electroactivity of natural nucleobases, or utilization of their synthetic analogues resulting from substitutions of small groups of atoms in the nucleobase residues (such as 7-deazapurines [3]) represent potent alternatives for detecting DNA damage or in applications involving polymerase chain reactions (in which bulky external groups may affect the amplification efficiency). In this contribution, reduction and oxidation of natural nucleobases and several examples of their electroactive synthetic analogues are briefly reviewed.

Reduction of natural nucleobases at mercury-based electrodes
Adenine (A) and cytosine (C) are irreversibly reduced at mercury and silver amalgam electrodes in the region of relatively highly negative potentials (depending on conditions, but usually more negative than -1.3 V vs. Ag|AgCl|3M KCl; all potential values in this paper are given against this reference electrode) in acidic or neutral media (proton donors such as ammonium ions facilitate the reduction processes in neutral pH) [1]. The primary reduction site in C has been identified as the C3=N4 double bond (Fig. 1); in A it is the C1=N6 double bond (Fig. 2). Free nucleobases or nucleobases in homopolynucleotides produce separated reduction signals (less negative for C and more negative for A). In oligonucleotides (ONs) the corresponding reduction signals more or less overlap, depending on nucleotide sequence (for ONs composed of homoC and homoA blocks the C and A reduction peaks overlap to lower

extent than for mixed-sequence ONs; in these instances, the overlapping signals can be resolved by elimination voltammetry with linear scan [4, 5]). In natural NAs reduction of both nucleobases contributes to a single, common cathodic peak CA [1]. Recently it has been reported [6] that 5-methylcytosine (5mC; a product of physiological methylation of cytosine, sometimes called „the fifth base of DNA“; an epigenetic modification involved in gene expression control and differentiation) in DNA is reduced at HMDE at practically the same potential as C. Guanine (G) gives at the mercury-based electrodes an anodic signal (usually called peak G; here we prefer using denomination „peak G^{Hg}“ to avoid confusion with guanine oxidation signal at carbon electrodes), which is obtained in e.g., cyclic voltammetry (CV) when sufficiently negative vertex potential is used to allow G reduction at the N7=C8 double bond (Fig. 1). The resulting product, 7,8-dihydroguanine, is subsequently oxidized back to G, yielding the peak G^{Hg}.

It has been established that signals due to nucleobase reduction at the negatively charged surface of the mercury-based electrodes are strongly dependent on DNA structure via changes in the accessibility of nucleobase residues for the corresponding electrode reactions. In double-stranded (ds) DNA, the primary reduction sites of C (N3=C4, Fig. 1) or A (N1=C6) are burried in the double helix interior (shown for C.G pair in Fig. 1), making the Watson-Crick base-paired C or A electrochemically silent. On the other hand the N7=C8 of guanine is relatively well-accessible to undergo the redox process at the HMDE and yield peak G^{Hg} even in the dsDNA (in B-form DNA this site is located in the major groove) [1]. On the other hand, when the guanine forms a Hoogsteen pair (such as in guanine tetrads typical for G-quadruplexes, Fig. 1), the N7 atom is involved in hydrogen bonding and accessibility of the respective group for reduction at the electrodes is limited [7].

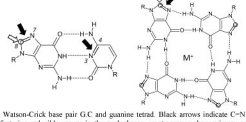


Fig. 1. Watson-Crick base pair G.C and guanine tetrad. Black arrows indicate C=N double bonds featuring reducible groups in the nucleobases, empty arrows show primary oxidation sites in G.

Oxidation of natural nucleobases at carbon electrodes

At carbon electrodes, all DNA bases can be oxidized and among them, particularly G and A produce analytically useful, independently measurable oxidation signals, peaks G^{ox} and A^{ox}, respectively [1]. Oxidation of purine bases, particularly of G (exhibiting the lowest potential of oxidation among natural NA constituents), can be observed under relatively wide range of conditions (such as pH, ionic conditions). In general, free purines are oxidized at less positive potentials (+0.7 for G and +1.0 for A) than the same bases in ONs and natural DNAs (where both purines are oxidized a potentials by about 250 mV more positive). Primary oxidation sites of guanine and adenine, according to literature (reviewed in [1, 8]), are located at C8 or C2 of the purine moieties, respectively (Fig. 2); some recent observations nevertheless suggest that C8 in A could be also involved in the oxidation process (these observations include electrochemical behavior of 7-deazapurines [3], see below, and the approximately 2/1 ratio of apparent electron yields per A/G residue; for more details about oxidation of purines at carbon electrodes, see contribution by J. Špaček et al. in these proceedings). Since the primary oxidation sites of G and A are located in major (C8, Fig. 1) or minor (C2) grooves of the DNA double helix, respectively, and thus relatively well accessible in dsDNA, the duplex DNA structure influences intensity of corresponding oxidation signals only to limited extent. Nevertheless, formation of a G-quadruplex structure has been demonstrated to shift the potential of G oxidation remarkably to more positive values [9].

All natural pyrimidine nucleobases i.e., C, 5mC, thymine (T) and uracil (U) have been reported to produce oxidation signals at the carbon electrodes. All pyrimidines are oxidized at more positive potentials than purines (>+1.2 V for free pyrimidines [our unpublished data] and +1.4 V for bases in DNA [10]). Among the pyrimidines, the oxidation potentials follow a trend 5mC ~T < C ~ U, suggesting that it is the presence of methyl group at C5 rather than the type of substituent X (X stands for amino in C and 5mC or keto for T and U) at C4 which influences the oxidation reaction. Although differences between C and 5mC could in principle be useful for monitoring of cytosine methylation [10], coincidence of oxidation potentials of 5mC and T makes this approach problematic (due to excess of T residues in natural DNA sequences).

Oxidation and reduction of synthetic analogues of nucleobases

7-deazapurines (Pu*; 7-dezaG, G*; and 7-deazaA, A*) are synthetic analogues of purine nucleobases in which the N7 atom is replaced by a CH group. Due to this modification, the Pu* nucleobases are incapable of Hoogsteen base pairing and thus of formation of triplex and quadruplex structures [3]. This property is utilized in some biochemical applications such as those involving PCR, where formation of G-quadruplexes in G-rich regions could affect the amplification reaction. We have shown that both Pu* bases are oxidized at carbon electrodes at potentials by 150-200 mV less positive, corresponding to their „parent" natural purines [3].

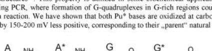


Fig. 2. From left to right: adenine, 7-deazaadenine, guanine and 7-deazaguanine. Empty arrows indicate reducible C=N double bonds, black arrows sites of oxidation according to existing literature, grey arrows other possible oxidation sites (see the text).

This makes the oxidation peak of A* coinciding with peak G^{ox} due to natural G. On the other hand, the G* is oxidized at a potential less positive than any natural NA component and thus can be used as an independent electroactive marker, compatible with PCR applications [3]. Primary oxidation sites of Pu* bases have not been identified yet but similar effects of the substitution of the N7 on the oxidation potentials of both purines lead us to speculations that in natural purine bases, the same rather than different groups of atoms may be involved in the electrooxidation process. Reduction of A* at mercury electrodes gives an irreversible signal practically identical with that of natural A, while G* has been found not to undergo a process analogous to that giving rise to the peak G^{Hg} [11]. These findings accord with the fact that Pu* residues differ from natural purines by the absence of N7=C8 double bond in the imidazole ring but possess identical groups of atoms in the pyrimidine ring. Another purine derivative, 8-oxoG (most common product of oxidative DNA damage used as a biomarker of oxidative stress), exhibits electrochemical oxidation by about 300 mV less positive compared to G, making it possible to detect 8-oxoG in the presence of DNA components [12].

As another example, reduction of cytosine analogues (or corresponding nucleosides) at the mercury electrodes can be mentioned. Electrochemical reduction of 5-azacytidine (azaC, Fig. 3; an inhibitor of DNA methyltransferases used as an epigenetic modulator to induce DNA hypomethylation [13]) was studied [14] and a mechanism involving reduction of the N5=C6 was proposed. At conditions close to physiological, the potentials of the cytidine reduction peak and that of azaC differed by 0.36 V (for azaC being less negative), which was sufficient to determine both compounds in their mixtures. In addition, our recent preliminary data showed zebularine (1-(β-D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidinone, Fig. 3; another hypomethylation agent used in epigenetic studies [15]) to undergo reduction at mercury electrodes at considerably (by more than 500 mV) less negative potential.

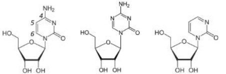


Fig. 3. From left to right: cytidine, 5-azacytidine and zebularine.

Conclusion

Reduction and oxidation of nucleic acids bases and their synthetic analogues provides a palette of useful analytical signals for various electroanalytical applications in the area of DNA structure studies, PCR-related applications and analysis of drugs based on nucleobase derivatives.

Acknowledgements

This work was supported by the Czech Science Foundation (P206/11/1638) and by the Academy of Sciences of the Czech Republic (RVO 68081707).

References

1. Palecek E., Bartosik M.: Chem Rev *112*, 3427 (2012).
2. Hocek M., Fojta M.: Chem Soc Rev *40*, 5802 (2011).
3. Pivonkova H., Horakova P., Fojtova M., Fojta M.: Anal Chem *82*, 6807 (2010).
4. Mikelova R., Trnkova L., Jelen F., Adam V., Kizek R.: Electroanalysis *19*, 348 (2007).
5. Trnkova L., Jelen F., Postbieglova I.: Electroanalysis *18*, 662 (2006).
6. Bartosik M., Fojta M., Palecek E.: Electrochim Acta *78*, 75 (2012).
7. Vidlakova P., Pivonkova H., Kejnovska I., Trnkova L., Vorlickova M., Fojta M., Havran L.: Anal Bioanal Chem *under revision* (2015).
8. Fojta M., Jelen F., Havran L., Palecek E.: Curr Anal Chem *4*, 250 (2008).
9. Chiorcea-Paquim A.-M., Oliveira-Brett A. M.: Electrochimica Acta *126*, 162 (2014).

10. Kato D., Sekioka N., Ueda A., Kurita R., Hirono S., Suzuki K., Niwa O.: J Am Chem Soc *130*, 3716 (2008).
11. Z. D., J. Š., P. H., M. F., Pivoňková H.: in preparation (2015).
12. Brett A. M. O., Piedade J. A. P., Serrano S. H. P.: Electroanalysis *12*, 969 (2000).
13. Gnyszka A., Jastrzebski Z., Flis S.: Anticanc Res *33*, 2989 (2013).
14. Marin D., Teijeiro C., Pina J. J.: J Electroanal Chem *407*, 189 (1996).
15. Bradbury J.: Drug Discov Today *9*, 906 (2004).

Electrochemical Study of Anti-microbial Peptide Interaction with Supported Lipid Membranes

Miroslav Gál [a], Ján Krahulec [b], Lívia Šišová [a], Kornélia Tomčíková [a], and Ján Hiveš [a]
[a] Institute of Inorganic Chemistry, Technology and Materials, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: miroslav.gal@stuba.sk
[b] Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Molecular biology, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava 4, Slovakia

Abstract
LL-37, 37 residue cathelicidin peptide, is an α-helical cationic antimicrobial peptide of human origin with antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative microorganisms. This contribution describes the utilization of the electrochemical impedance spectroscopy to investigate the interaction of LL-37 with various phospholipid layers. Experiments were carried out in 0.1 M KCl. The frequency dependence of the complex impedance of the membrane in the presence and absence of LL-37 was estimated at −0.1 V versus Ag/AgCl 1 mol dm^{-3} KCl. LL-37 shows no significant interaction with DOPC. However, LL-37 shows a small interaction with asolectine. LL-37 shows a significant interaction with a lipid A layer. Our results bring the additional information about the known membrane active properties of LL-37.

Key words: Anti-microbial peptide, Electrochemistry, Impedance spectroscopy, LL-37, Cathelicidin.

Introduction

The innate immune system is an essential defense mechanism that allows higher organisms among other things to fight off infections caused by pathogens. Recent studies have revealed the importance of small cationic peptides, which serve as endogenous antibiotics. Aptly named antimicrobial peptides, they act as effector molecules of the innate immune system and are mainly secreted by phagocytes and epithelial cells [1-5]. Beta-defensins and cathelicidins are the major antimicrobial peptides in mammalian skin, and their expression can be induced by a skin injury or inflammation [6]. The human cathelicidin family consists of a single member, LL-37. LL-37 (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES) is composed of 37 amino acid residues.

In vitro conditions, LL 37 inhibits the growth of a variety of Gram-negative (e.g. *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*) and Gram-positive (e.g. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Listeria monocytogenes*) species in the (sub)micromolar range of peptide concentration. LL-37 is active against clinically important strains of Gram-negative uropathogens (e.g. *P. aeruginosa AK1*, *Klebsiella pneumonia 3a*), periodontal (e.g. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga*), and common wound pathogens (group *A Streptococcus*). The high amounts of LL-37 detected in airway epithelial cells during infection and especially in psoriatic skin lesions suggest that the concentration of LL-37 effective *in vitro* corresponds with the concentration found *in vivo*. In addition, LL-37 is also implicated in angiogenesis, wound closure, chemotaxis etc. [1-3, 7].

Eukaryotic and bacterial membranes are composed of different lipid components. The first one is consisted of mainly phosphatidylcholine (PC), sphingomyelin and cholesterol, whereas a bacterium contains mainly of negatively charged phospholipids, such as phosphatidylglycerol (PG), cardiolipin etc. Dioleoyl phophatidylcholine (DOPC) is used to imitate the eukaryotic and negatively charged dioleoyl phosphatidylglycerol (DOPG) and lipid A are used to imitate the bacterial membrane. Asolectin from soybeans is a mixture of phospholipids extracted from soybeans with an approximate composition of 25% phosphatidylcholine, 25% cephalin, 25% phosphatidylinositol, and small amounts of other phospholipids from soybeans. Approximately 24% of the fatty acid chains in asolectin are saturated, 14% are mono-unsaturated, and 62% are poly-unsaturated [8]. In this contribution, membrane interactions of LL-37, the only human α-helical antimicrobial peptide from the cathelicidin family, are studied [9].

Interaction between LL 37 with three different PLs model membranes determined by electrochemical methods [10-22], especially by electrochemical impedance spectroscopy will be described [23-38]. These findings will be useful for further electrochemical study of the interaction of LL 37 with real membranes and/or cells.

Experimental

Home-made cell was developed to realize the experiments with the interaction of LL-37 with the phospholipid membranes. The cell was composed of two identical glass columns. These columns represent the intracellular and extracellular compartments. The compartments were separated by two Teflon parts with holes, between which the polycarbonate membrane was inserted (pore size of 0.2 μm). The electrodes were placed into the holes in the top of glass compartments (two silver wires coated with silver chloride as reference electrodes and two platinum wires as auxiliary/working electrodes). The same supporting electrolyte (0.1 mol dm^{-3} KCl) was inserted in both compartments. The final concentration of LL-37 in the "extracellular" part of the apparatus was 9 nmol dm^{-3}.

Impedance measurements were performed using Solartron SI 1287 electrochemical interface together with Solartron 1260 impedance/gain-phase analyzer (Solartron, UK). Impedance data were collected in the range 0.1 Hz to 1 MHz. Each impedance curve consisted of 120 measured points. An electrochemical data from EIS measurements were analyzed using Zsim 3.21 software. The voltage -0.1 V was applied in all EIS measurements, because we wanted to study the interactions under the conditions very similar to the real biological systems [39-43].

Results and discussion

DOPC, Asolectine, and lipid A were used to study the ability of LL-37 to differentiate between eukaryotic and bacteria cells, respectively. Impedance data were evaluated using electric equivalent circuit (EC). EC depicted in Fig. 1 was proved to be suitable for characterization of supported phospholipid membranes formed in the pores of polycarbonate substrate [14]. The resistor R_1 represents the electrolyte resistance, the parallel capacitor C_1 corresponds to the capacitance of the supporting polycarbonate membrane and the parallel resistor R_2 to its respective resistance. The parallel combination of the capacitor C_2 and the resistor R_3 in the second pair of the circuit describes the electrical properties of the investigated supported phospholipid membranes which were formed in the pores of the supporting polycarbonate membranes.

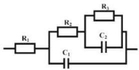


Fig. 1. Equivalent circuit used for the characterization of the phospholipid membranes formed on the polycarbonate support.

No interaction of LL-37 with DOPC (used to imitate the eukaryotic cell membrane) was detected. However, LL-37 shows a small interaction with the Asolectine and a significant interaction with a lipid A layer. In the case of the Asolectin a choline head group and glycerophosphoric acid, with a variety of fatty acids, one being a saturated fatty acid and one being an unsaturated fatty acid are presented [8]. While phosphatidylcholines are found in eukaryotic cells, they are almost absent in the membranes of most bacteria. Therefore, only negligible changes in EIS spectra are observed. On the other side, the significant interaction of LL-37 with lipid A (an essential membrane component of Gram-negative bacteria i.e. used to imitate the bacterial membrane) proves previous study with Gram-negative bacteria.

Acknowledgment
This research was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV–0119–12.

References

1. Tjabringa G. S., Rabe K. F., Hiemstra P. S.: Pulmonary Pharmacology & Therapeutics *18*, 321 (2005).
2. Zanetti M.: Journal of Leukocyte Biology *75*, 39 (2004).
3. Bals R., Wilson J. M.: Cellular and Molecular Life Sciences *60*, 711 (2003).
4. Risso A.: Journal of Leukocyte Biology *68*, 785 (2000).
5. Gudmundsson G. H., Agerberth B.: Journal of Immunological Methods *232*, 45 (1999).
6. Agerberth B., Charo J., Werr J., Olsson B., Idali F., Lindbom L., Kiessling R., Jornvall H., Wigzell H., Gudmundsson G. H.: Blood *96*, 3086 (2000).
7. Krahulec J., Hyrsova M., Pepeliaev S., Jilkova J., Cerny Z., Machalkova J.: Applied Microbiology and Biotechnology *88*, 167 (2010).
8. Johns A., Morris S., Edwards K., Quirino R. L.: J. Appl. Polym. Sci. *132* (2015).
9. Neville F., Gidalevitz D., Kale G., Nelson A.: Bioelectrochemistry *70*, 205 (2007).
10. Selesovska-Fadrna R., Navratil T., Vlcek M.: Chem. Anal. (Warsaw, Pol.) *52*, 911 (2007).
11. Cabalkova D., Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B.: Chem. Listy *103*, 236 (2009).
12. Bandzuchova L., Selesovska R., Navratil T., Chylkova J.: Electrochim. Acta *56*, 2411 (2011).
13. Cizkova P., Navratil T., Sestakova I., Yosypchuk B.: Electroanalysis *19*, 161 (2007).
14. Jaklova Dytrtova J., Sestakova I., Jakl M., Navratil T.: Electroanalysis *21*, 573 (2009).
15. Vyskocil V., Navratil T., Danhel A., Dedik J., Krejcova Z., Skvorova L., Tvrdikova J., Barek J.: Electroanalysis *23*, 129 (2011).
16. Sebkova S., Navratil T., Kopanica M.: Anal. Lett. *37*, 603 (2004).
17. Sebkova S., Navratil T., Kopanica M.: Anal. Lett. *36*, 2767 (2003).

18. Barek J., Cabalkova D., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B.: Environ. Chem. Lett. *9*, 83 (2011).
19. Selesovska R., Bandzuchova L., Navratil T.: Electroanalysis *23*, 177 (2011).
20. Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J.: Electroanalysis *19*, 2003 (2007).
21. Fadrna R., Yosypchuk B., Fojta M., Navratil T., Novotny L.: Anal. Lett. *37*, 399 (2004).
22. Fischer J., Vanourkova L., Danhel A., Vyskocil V., Cizek K., Barek J., Peckova K., Yosypchuk B., Navratil T.: Int. J. Electrochem. Sci. *2*, 226 (2007).
23. Ramesova S., Sokolova R., Degano I., Bulickova J., Zabka J., Gal M.: Anal. Bioanal. Chem. *402*, 975 (2012).
24. Gal M., Hromadova M., Pospisil L., Hives J., Sokolova R., Kolivoska V., Bulickova J.: Bioelectrochemistry *78*, 118 (2010).
25. Pospisil L., Hromadova M., Gal M., Bulickova J., Sokolova R., Filippone S., Yang J., Guan Z., Rassat A., Zhang Y. M.: Carbon *48*, 153 (2010).
26. Gal M., Hives J., Sokolova R., Hromadova M., Kolivoska V., Pospisil L.: Collect. Czech. Chem. Commun. *74*, 1571 (2009).
27. Pospisil L., Hromadova M., Gal M., Valasek M., Fanelli N., Kolivoska V.: Collect. Czech. Chem. Commun. *74*, 1559 (2009).
28. Sokolova R., Ramesova S., Degano I., Hromadova M., Gal M., Zabka J.: Chem. Commun. *48*, 3433 (2012).
29. Pospisil L., Hromadova M., Gal M., Bulickova J., Sokolova R., Fanelli N.: Electrochim. Acta *53*, 7445 (2008).
30. Sokolova R., Degano I., Ramesova S., Bulickova J., Hromadova M., Gal M., Fiedler J., Valasek M.: Electrochim. Acta *56*, 7421 (2011).
31. Pospisil L., Fiedler J., Hromadova M., Gal M., Valasek M., Pecka J., Michl J.: J. Electrochem. Soc. *153*, E179 (2006).
32. Pospisil L., Gal M., Hromadova M., Bulickova J., Kolivoska V., Cvacka J., Novakova K., Kavan L., Zukalova M., Dunsch L.: Phys. Chem. Chem. Phys. *12*, 14095 (2010).
33. Kolivoska V., Gal M., Pospisil L., Valasek M., Hromadova M.: Phys. Chem. Chem. Phys. *13*, 11422 (2011).
34. Petelska A. D., NaumowiCz M., Figaszewski Z. A.: Bioelectrochemistry *70*, 28 (2007).
35. Naumowicz M., Figaszewski Z. A.: Biophys. J. *89*, 3174 (2005).
36. Naumowicz M., Petelska A. D., Figaszewski Z. A.: Cell. Mol. Biol. Lett. *8*, 383 (2003).
37. Naumowicz M., Petelska A. D., Figaszewski Z. A.: Electrochim. Acta *54*, 1089 (2009).
38. Naumowicz M., Kotynska J., Petelska A., Figaszewski Z.: European Biophysics Journal with Biophysics Letters *35*, 239 (2006).
39. Navratil T., Sestakova I., Stulik K., Marecek V.: Electroanalysis *22*, 2043 (2010).
40. Navratil T., Sestakova I., Marecek V.: Int. J. Electrochem. Sci. *6*, 6032 (2011).
41. Parisova M., Navratil T., Sestakova I., Jaklova Dytrtova J., Marecek V.: Int. J. Electrochem. Sci. *8*, 27 (2013).
42. Jaklova Dytrtova J., Navratil T., Marecek V.: Collect. Czech. Chem. Commun. *76*, 1917 (2011).
43. Novakova K., Navratil T., Sestakova I., Marecek V., Chylkova J.: Chem. Listy *108*, 219 (2014).

Natural and Synthetic Components of Nucleic Acids as Reactive Sites for DNA Modification by Osmium Tetroxide Complexes
(Přirozené a syntetické složky nukleových kyselin jako reaktivní místa pro modifikaci komplexy oxidu osmičelého)

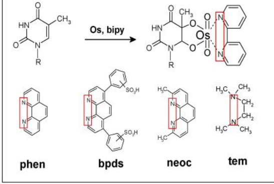
Luděk Havran, Jan Špaček, Jana Rozkošná, and Miroslav Fojta
Institute of Biophysics of the AS CR v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic,
E-mail: raven@ibp.cz

Abstract
Natural DNA electroactivity find wide use in electrochemical analysis of its interactions and damage. For some applications is useful applied redox active tag to improve specificity of the analysis. One from utilized labels in this field are complexes of osmium tetroxide with nitrogen ligands (Os,L), which produce with DNA electroactive covalent adducts. Prime reaction site for Os,L is C=C double bond in pyrimidine nucleobases. If is 2,2'-bipyridine used as ligand, reaction is specific for single strand DNA. In this contribution will be presented results of electrochemical analysis of Os,bipy adducts with different ODN containing chemically modified purine bases.

Key words: DNA, Osmium tetroxide complexes, Electrochemical methods.

Úvod
Ač je DNA přirozeně elektroaktivní molekula, které poskytuje na různých typech pracovních elektrod analyticky využitelné signály [1], pro některé typy aplikací (např. senzory pro analýzu nukleotidových sekvencí) nemají tyto signály dostatečnou specifitu. V těchto případech se jako výhodné ukázalo využití redox aktivitního značení DNA [2]. Jednou z nejstarších metod přípravy značené DNA je její reakce s komplexy oxidu osmičelého s dusíkatými ligandy (Os,L) [3]. Os,L nalezly uplatnění jako elektroaktivní značky například při vývoji elektrochemických senzorů hybridizace DNA [4]. V přirozené DNA, pokud je jako ligand použit 2,2'-bipyridin (bpy), reagují Os,L především s thyminovými zbytky v jednořetězových úsecích (reaguje s nenasycenými C=C vazbami). Vznikají kovalentní adukty, které jsou elektroaktivní. Podstatně méně reaktivní jsou cytosinové zbytky a purinové báze jsou prakticky nereaktivní.

Tyto adukty poskytují na uhlíkových elektrodách, zvláště pak na elektrodě z pyrolytického grafitu (PGE), několik reverzibilních voltametrických signálů v důsledku redukce/oxidace atomu osmia v molekule aduktu. Navíc lze PGE použít pro přímou analýzu reakčních směsí, kdy je nezreagovaný Os,L extrahován z povrchu elektrody pomocí organického rozpouštědla [5]. Na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) studované adukty poskytují podobné faradayické signály jako na PGE a dále pak signál, který je způsobený katalytickým vylučováním vodíku na povrchu HMDE. Tento signál lze použít pro velmi citlivé stanovení aduktů [6]. Kromě nejhojněji využívaného bpy, lze jako L použít řadu dalších bidentátních ligandů, jako jsou: 1,10-fenantrolin, bathofenanthrolin disulfonová kyselina, neocuproin nebo N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (Obr. 1). Volbou ligandu lze měnit potenciály voltametrických signálů vzniklých aduktů. Toho lze využít při konstrukci elektrochemického senzoru hybridizace DNA pro detekci více sekvencí v jedné molekule cílové DNA [7]. V tomto příspěvku budou prezentovány výsledky elektrochemické analýzy aduktů Os,L se syntetickými oligonukleotidy, které obsahují chemicky modifikované nukleobáze.



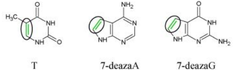
Obr. 1. Rovnice modifikační reakce. Strukturní vzorce ligandů: 1,10-fenantrolin (phen), bathofenanthrolin disulfonová kyselina (bpds), neocuproin (neoc), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (tem).

Experimentální část

Všechny použité oligo deoxynukleotidy (ODN) pocházely od firmy Genery Biotech (Česká republika). Modifikační reakce pomocí komplexu oxidu osmičelého s 2,2'-bipyridinem (Os, bpy) probíhala ve vodných pufrovaných roztocích. Produkty modifikační reakce byly analyzovány za použití elektrody z pyrolytického grafitu (PGE). Nezreagovaný Os,L extrahován z povrchu pracovní elektrody organickým rozpouštědlem [5]. Všechna voltametrická měření byla prováděna za použití potenciostatu/galvanostatu Autolab (Ecochemie, Holandsko) v kombinaci s elektrodovým systémem VA-stand 663 (Metrohm, Herisau, Švýcarsko) v tříelektrodovém zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita PGE, referenční elektroda byla Ag/AgCl/3M KCl a jako pomocná elektroda platinový drát. Analýza byla prováděna adsorptivní přenosovou rozpouštěcí voltametrií s vnuceným pravoúhlým napětím (AdTS SWV).

Výsledky a diskuse

Jedním z příkladů chemické modifikace nukleobází mohou být 7-deaza analogy purinových bází (7-deazaadenin – A* a 7-deazaguanin – G*). Ty našly uplatnění například při PCR amplifikaci G – bohatých úseků DNA, kdy nepřítomnost atomu dusíku v poloze 7 zabraňuje tvorbě guaninových tetraplexů. 7-deaza analogy purinových bází obsahují podobně jako pyrimidinové báze strukturní motiv (C=C vazbu) reakivní k Os,L (Obr. 2). Lze tedy předpokládat, že tyto 7-deaza analogy budou reaktivní k Os,L. Reaktivita A* a G* k Os,bpy byla nejprve testována na sérii modelových ODN o obecné sekvenci A_4X (X = A*, G*, T, A). Reakční směsi byly analyzována pomocí AdTS SWV na PGE. Nezreagovaný Os,bpy byl z povrchu pracovní elektrody extrahován pomocí isopropanolu. Jak vyplývá z výsledků těchto experimentů oba G* a A*, podobně jako kontrolní ODN obsahující T, poskytují voltametrický pík α, který je specifický pro tvorbu aduktu DNA s Os,bpy [5]. Tyto výsledky byly potvrzeny experimenty s produkty inkorporační reakce katalyzované terminální deoxynukleotidyl transferázou (enzym – DNA polymeráza, který prodlužuje ss DNA obsahující 3'-OH konce) a dále také pomocí kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie.



Obr. 2. Strukturní vzorce thyminu, 7-deazaadeninu a 7-deazaguaninu.

Závěr
Pomocí AdTS SWV na PGE bylo prokázáno, že 7-deaza analogy purinových bází mohou podléhat modifikační reakci s komplexy oxidu osmičelého. Touto reakcí, podobně jako v případě pyrimidinových nukleobází, vznikají elektroaktivní adukty.

Poděkování
Tato práce vznikla s podporou projektů GAČR (P206/11/1638 a 15-08434S) a institucionální podporou RVO 68081707.

Literatura
1. Paleček E., Bartošík M.: Chem. Rev. *112*, 3427 (2012).
2. Hocek M., Fojta M.: Chem. Soc. Rev. *40*, 5802 (2011).
3. Paleček E., Hung M. A., Anal. Biochem. *132*, 236 (1983).
4. Fojta M., Kostečka P., Pivoňková H., Horáková P., Havran L.: Curr. Anal. Chem. *7*, 35 (2011).
5. Fojta M., Havran L., Kizek R., Billova S.: Talanta *56*, 867 (2002).
6. Havran L., Fojta M., Palecek E.: Bioelectrochemistry *63*, 239 (2004).
7. Fojta M., Kostecka P., Trefulka M., Havran L., Palecek E.: Anal. Chem. *79*, 1022 (2007).

Studies of Protein-DNA Interactions using Immunoprecipitation with DNA Probes Labelled with Electroactive Groups

Monika Hermanová, Jan Špaček, Hana Pivoňková, and Miroslav Fojta
Institute of Biophysics of the AS CR, v.v.i., Královopolská 135, 61265 Brno, Czech Republic
E-mail: hermanova@ibp.cz

Abstract

Different electrochemically active species were tested for labelling of DNA probes and detection of DNA-protein binding. As the DNA probes, oligonucleotides bearing or lacking specific binding site of the p53 protein were chosen. They were tail-labelled either via chemical modification of single-stranded (ss) oligo(dT) DNA tails with an oxoosmium complex, or via enzymatic synthesis of the ss tail by terminal deoxynucleotidyl transferase and deoxynucleoside triphosphates modified with electrochemically reducible moieties. Electrochemical detection enabled to discriminate between sequence-specific and non-specific p53-DNA binding.

Key words: Protein-DNA binding, p53, Terminal deoxynucleotidyl transferase, Redox labels, Oxoosmium complexes, Benzofurazan, nitrophenyl.

Introduction

Previously developed methodology enables to conduct immunoprecipitation binding experiments with tumor suppressor protein p53 using various DNA substrates or probes and using different detection methods. DNA probes labelled with various redox moieties have been successfully applied in DNA hybridization experiments. Our recent work has revealed applicability of analogous principles in protein-DNA interaction studies as well. Recently we have reported on using DNA probes labelled via chemical modification of oligo(dT) tails with an oxoosmium complex [1]. In further studies, different approach was used for labeling of DNA probes. Two redox DNA labels, nitrophenyl [2] and benzofurazan [3], were chosen for this approach. These two labels are electrochemically active and when using cyclic voltammetry at a mercury electrode, they yield reduction peaks. DNA probes were labelled by nitrophenyl and benzofurazan modified dNTPs using terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). Terminal deoxynucleotidyl transferase attaches nucleotides at the 3´OH terminus of DNA using dNTPs as substrates [4] and it can use modified dNTPs as substrates as well. Previous data show that DNA tail-labelled by TdT is convenient for binding experiments with tumor suppressor protein p53 [5]. As the DNA probes for the p53-DNA binding, two oligonucleotides, one bearing and one lacking specific binding site of the p53 protein were chosen. For the DNA-protein binding, a previously introduced magnetic beads immunoprecipitation assay [6] was used and the recovered tail-labelled oligonucleotides were analyzed using cyclic voltammetry at a hanging mercury drop electrode (HMDE).

Experimental

Tail-labeling of oligonucleotides

Modification of ss oligo(dT) DNA tails with osmium tetroxide, 2,2'-bipyridine (Os,bipy) was conducted as described [1]. In the other approach, dATPs modified with either nitrophenyl or benzofurazan ($dA^{NO2}TP$ and $dA^{BF}TP$, synthesized and kindly provided by Prof. M. Hocek group, IOCB ASCR Prague) were used for tail-labeling of two types of single-stranded oligonucleotides (containing or lacking p53 binding site; PGM1 or noCON) by TdT. The reaction mixture contained 3.6 μM ss oligonucleotide and 1.8 mM modified dATP; the reaction was conducted at 37 °C overnight and the labelled oligonucleotides were purified using Nucleotide Removal Kit (Qiagen).

p53-DNA binding

Magnetic beads immunoprecipitation assay was used for the protein-DNA binding. The p53 protein was mixed with Bp53-10.1 antibody and incubated for 20 minutes on ice. Then the tail-labelled DNA probes at p53 tetramer/duplexes ratio 3:1 were added and incubated 30 minutes on ice. Reaction mixture was added to washed magnetic beads covered with protein G and incubated for 30 min at 10 °C. Oligonucleotides were released from the magnetic beads-antibody-protein-DNA complex through a 5-min incubation at 65 °C in 10 µl of 0.5 M NaCl.

Electrochemical analysis

Cyclic voltammetry at a hanging mercury drop electrode (HMDE) was used for analysis of the released tail-labelled probes. DNA was accumulated at the electrode surface from 4 µl aliquots for 60 s. CV settings were: initial potential 0.0 V, switching potential -1.85 V, final potential 0.0 V, scan rate 1 $V.s^{-1}$, step potential 5 mV. The Os,bipy-modified probes were detected by differential pulse voltammetry to obtain a catalytic osmium peak as described in [1].

Results and discussion

In addition to two peaks typical for DNA (an anodic G peak at potential -0.25 V and a cathodic CA peak at -1.5 V), a cathodic peak typical for NO_2 at -0.5 V [2] for probes tail-labelled with $dA^{NO2}TP$ or a cathodic peak typical for benzofurazan at -0.9 V [3] for probes tail-labelled with $dA^{BF}TP$ could be observed in a cyclic voltammogram of DNA probes released from the magnetic beads. In Fig. 1 depicting p53 binding to benzofurazan labelled probes we can see that the peak gained for the sequence-specific DNA probe (PGM1) was higher than the peak gained for the nonspecific probe (noCON). This difference was even more significant in the case of nitrophenyl labelled probes, when the nitrophenyl peak corresponding to sequence-specific binding to PGM1 is about twofold higher than the peak gained for the nonspecific probe (noCON) (Fig. 2).

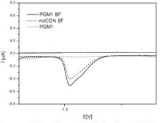


Fig. 1. Binding experiments with benzofurazan labelled probes noCON and PGM1.

Benzofurazan peak is higher than the nitrophenyl peak for both sequence-specific and nonspecific DNA binding which is caused by the fact that benzofurazan undergoes six-electron reduction at the mercury electrode [3] while nitro-group, under the given conditions, only a four-electron reduction [2]. This feature makes it a more convenient label for DNA labeling as it is better detectable at lower concentrations of DNA probes released from the magnetic beads. Nitrophenyl labelled probes display more apparent difference between the sequence-specific and nonspecific DNA binding therefore it might be more useful for the evaluation of the mode of protein-DNA binding. Nevertheless, in both probes the p53 binding is stronger to probes containing p53 specific binding site which corresponds to the known binding specificity of the p53 protein.

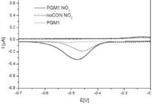


Fig. 2. Binding experiments with nitrophenyl labelled probes noCON and PGM1.

Conclusions

This paper presents use of electroactive DNA labels, osmium tetroxide, 2,2'-bipyridine and newly benzofurazan and nitrophenyl, for the detection of protein-DNA binding. When using $dA^{NO_2}TP$ and $dA^{BF}TP$ tail-labelled oligonucleotides as DNA probes, it is possible to discriminate between sequence-specific and non-specific p53-DNA binding. Both labels, after magnetic beads-based immunoprecipitation binding experiments with protein p53, display increased binding to DNA probes bearing p53 sequence-specific binding site compared to DNA probes lacking this site although in the case of nitrophenyl labelled probes, the difference in binding to both probes was more significant. Benzofurazan labelled probes yielded higher peaks therefore this label might offer lower detection limits.

Acknowledgement

This work was supported by the Czech Science Foundation (grant No. P206/12/G151) and the Academy of Sciences of the Czech Republic (RVO 68081707).

References

1. Němcová, K., Šebest, P., Havran, L., Orság, P., Fojta, M., Pivoňková, H.: Anal. Bioanal. Chem. *406*, 5843 (2014).
2. Cahová H., Havran L., Brázdilová P., Pivoňková H., Pohl R., Fojta M., Hocek M.: Angew. Chem. Int. Ed. *47*, 2059 (2008).
3. Balintová, J., Plucnara, M., Vidláková, P., Pohl, R., Havran, L., Fojta, M., Hocek, M.: Chem. Eur. J. *19*, 12720 (2013).
4. Michelson, A. M., Orkin S.H.: J. Biol. Chem. *257*, 14773 (1982).
5. Horáková, P., Macíčková-Cahová, H., Pivoňková, H., Špaček, J., Havran, L., Hocek, M., Fojta, M.: Org. Biomol. Chem. *9*, 1366 (2011).
6. Pivoňková, H., Šebest, P., Pečinka, P., Tichá, O., Němcová, K., Brázdová, M., Brázdová-Jagelská, E., Brázda, V., Fojta, M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *393*, 894 (2010).

Voltammetric Study of the Interaction of Methyl Violet 2B with DNA and Its Use for the Determination of DNA in Aqueous Solutions

Eva Horáková, Vlastimil Vyskočil, and Jiří Barek
Charles University in Prague, Faculty of Science, University Research Centre UNCE "Supramolecular Chemistry", Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, CZ-128 43 Prague 2, Czech Republic,
E-mail: eva.horakova@natur.cuni.cz

Abstract
Differential pulse voltammetry and cyclic voltammetry at a hanging mercury drop electrode (HMDE) were used to study the interaction of methyl violet 2B (MV) with double-stranded DNA in 0.1 mol L^{-1} acetate buffer pH 4.0 (AB). The mechanism of electrochemical reduction of MV was studied as well, using cyclic voltammetry at HMDE. Moreover, the calibration dependence of the peak current of MV on the concentration of DNA in AB was constructed to be used for the determination of DNA, based on the fact that the peak current of MV is decreasing with increasing concentration of DNA in solution.

Key words: Cyclic voltammetry, Differential pulse voltammetry, DNA interaction, Hanging mercury drop electrode, Methyl violet 2B.

Introduction
Methyl violet 2B (MV) belongs to the group of triphenylmethane dyes. They are used in paper dyeing, as inks and pH indicators [1]. For their bactericidal and fungicidal effects, they are also used for medical purposes [2]. Triphenylmethane dyes are potentially harmful for humans, and they and their metabolites may also accumulate in fish [3,4]. Because of many other negative effects [5-7], the use of some of them is limited by laws. Therefore, investigation of their biological effects [8,9] and monitoring of their occurrence in biological matrices [3,10] and environment [11] is important. Triphenylmethane dyes are electrochemically reducible [7,12], so it is possible to study and determine [13] them using electrochemical methods (for the scheme of reduction of MV, see Fig. 1).

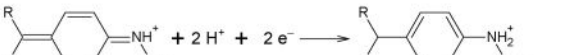


Fig. 1. Scheme of electrochemical reduction of MV. R represents a phenyl moiety.

There are several methods for detection of DNA damage and for investigation of its interactions with organic compounds [14-16]. Modern electrochemical methods represent a very useful tool for this purpose [17,18], and mercury [19], amalgam [20], and carbon [21,22] electrodes are often used in such studies.

Using cyclic voltammetry (CV), it is possible to predict the mechanism of electrochemical reduction of MV and to check whether the interaction of DNA with the studied substance affects this mechanism [19]. Differential pulse voltammetry (DPV) is a useful tool for the basic study of the interaction of MV with DNA, utilizing the change of the peak current and the shift of the peak potential. From the decrease of the DPV peak current of MV, the concentration of DNA (γ_{DNA}) can be determined.

Experimental

The stock solution of MV (1 mmol L^{-1}) was prepared by dissolving 0.3940 g of MV (Merck, Germany) in 500 mL of deionized water. The stability of the stock solution was monitored by UV-Vis spectrophotometry (spectrophotometer Agilent 8453, Agilent Technologies, USA). In our recent study [13], the optimum medium for the voltammetric determination of MV was found to be Britton-Robinson buffer pH 4.0, whereas 0.1 mol L^{-1} acetate buffer pH 4.0 (AB) was used in this present study for a simplification. AB was prepared of 2.08 g sodium acetate trihydrate (p.a., Lach-Ner, Czech Republic) and 4.89 mL acetic acid (p.a., 99%, Penta, Czech Republic) filled up to 1 L in a volumetric flask with deionized water. The stock solution of DNA (γ_{DNA} = 10 mg mL^{-1}) was prepared by dissolving 100 mg of low molecular weight salmon sperm double-stranded DNA (Sigma-Aldrich, USA, stored in a fridge at 4 °C) in 10 mL of deionized water and stored at 4 °C. A new stock solution of DNA was prepared every week. Deionized water produced by a Milli-Q Plus system (Millipore, USA) was used. All lower concentrations needed were prepared by dilution of the stock solutions with deionized water. If not stated otherwise, all solutions were stored in glass bottles in the dark at laboratory temperature.

All voltammetric measurements were carried out with an Autolab PGSTAT10 potentiostat/ galvanostat connected to a Metrohm 663 VA Stand (both Metrohm Autolab, Switzerland) in a tree-electrode system with Ag|AgCl (3 mol L^{-1} KCl) reference electrode (Elektrochemické Detektory, Czech Republic), a platinum wire auxiliary electrode (Monokrystaly, Turnov, Czech Republic), and a multi-mode mercury drop electrode used as a hanging mercury drop electrode (HMDE). The mercury drop surface was 0.52 mm^2. If not stated otherwise, the scan rate (v) was 20 mV s^{-1}, the modulation amplitude –50 mV and the modulation time 80 ms were used. The potentiostat was computer-controlled by the NOVA 1.11 software (Metrohm Autolab, Switzerland). All potentials were referred to the above-mentioned reference Ag|AgCl electrode.

The general measurement procedure was as follows: appropriate volumes of the MV and DNA stock solutions were measured into a volumetric flask and filled up with AB to 10.0 mL, mixed and transferred into a voltammetric cell. Before each measurement, oxygen was removed by bubbling with nitrogen (purity class 4.0, Linde, Czech Republic) for 5 min; this time served also for equilibration within the interaction of DNA with MV. A nitrogen atmosphere was then maintained above the solution in the cell. All measurements were carried out at laboratory temperature.

All voltammograms were measured three times, and peak current (I_p) and peak potential (E_p) values for the construction of the dependences were calculated as arithmetic averages. All figures were drawn up and mathematical operations were carried out using the Origin Pro 8.0 software (OriginLab Corporation, USA). The limit of quantification (L_Q) was calculated using the equation: $L_Q = 10s/a$, where s is the standard deviation of the lowest measurable concentration of 10 repetitive measurements and a is the slope of the calibration curve [23].

Results and Discussion

Study of the Interaction of Methyl Violet 2B with DNA Using Differential Pulse Voltammetry

Electrochemical behavior of MV (0.5, 1.0, 5.0, and 10.0 μmol L^{-1}) in the presence of DNA (1 – 476 μg mL^{-1}) was investigated in AB. The concentration of MV did not affect the trend in the studied parameters changes, E_p and I_p (see Fig. 2). The addition of DNA to the solution of MV (i) caused a decrease of I_p, (ii) shifted the E_p to more positive values, reaching the most positive potential at $\gamma_{DNA} = 50\ \mu g\ mL^{-1}$, and (iii) gave rise to a new peak, corresponding to the reduction of cytidine-adenosine moieties at the potential from −0.95 to −1.20 V.

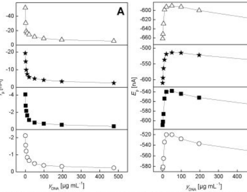


Fig. 2. Dependences of I_p (A) and E_p (B) of MV (0.5 (○), 1.0 (■) 5.0 (★), and 10.0 (△) μmol L^{-1}) on γ_{DNA} in the measured solution. Measured using DPV at HMDE in AB.

Cyclic Voltammetry of Methyl Violet 2B in the Absence and Presence of DNA

The dependences of the log $(-I_p)$ of MV on the log v were investigated in the absence and presence of DNA for MV concentrations 0.5, 1.0, 5.0, and 10.0 μmol L^{-1} and DNA concentrations 5 μg mL^{-1} and 100 μg mL^{-1}. The scan rate was: 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, and 1000 mV s^{-1}. Parameters of these dependences are summarized in Table I.

Table I.
Slopes (with ranges of scan rate used [mV s^{-1}] given in round brackets) of the dependences of the log $(-I_p)$ of MV (0.5, 1.0, 5.0, and 10.0 μmol L^{-1}) on the log v in the absence and presence of DNA in the measured solution. Measured using CV at HMDE in AB.

Concentration of MV [μmol L^{-1}]	Concentration of DNA [μg mL^{-1}]		
	0	5	100
10.0	0.63 (20 – 1000)	0.55 (10 – 1000)	0.53 (5 – 1000)
5.0	0.65 (20 – 1000)	0.50 (5 – 1000)	0.49 (5 – 1000)
1.0	0.75 (20 – 1000)	0.47 (5 – 1000)	0.47 (5 – 1000)
0.5	0.64 (20 – 1000)	0.49 (5 – 100)	0.48 (5 – 200)

From the slopes of the dependence of log $(-I_p)$ of MV on the log v in the absence of DNA, it can be concluded that the electrochemical reduction is both adsorption and diffusion controlled. In comparison to the slopes obtained in the presence of DNA, it can be concluded that the electrochemical reduction is effected by the presence of DNA in the measured solution and is diffusion controlled, suggesting that the diffusion coefficient of the free form of MV is larger than the one of the complex of MV with DNA.

Determination of DNA in Aqueous Solutions Using the Decrease of the Peak Current of Methyl Violet 2B

The decrease of the peak current of MV (1.0, 5.0, 10.0, and 50.0 μmol mL^{-1}) caused by the addition of DNA into the solution was used for the construction of calibration curves of DNA (1 – 1000 μg mL^{-1}) in aqueous solution. The dependence of ΔI_p (the difference of the peak current of MV in the absence of DNA and of the peak current in the presence of DNA) on γ_{DNA} is described by the equation (1), where a is a slope and b is an intercept. The results obtained at individual concentrations of MV were compared to find the one with the highest sensitivity, the widest concentration range, and the lowest L_Q.

$$\Delta I_p = a \times \log \gamma_{DNA} + b \tag{1}$$

For the concentration of MV 10.0 μmol L^{-1}, the relative standard deviation of 10 repetitive measurements (*RSD*) for γ_{DNA} = 1 μg mL^{-1} was 1.22%, and L_Q was 0.77 μg mL^{-1}. For the concentration of MV 5.0 μmol L^{-1}, the *RSD* for γ_{DNA} = 1 μg mL^{-1} was 1.33%, and L_Q was 0.74 μg mL^{-1}. For both previous concentrations of MV, the linear calibration curves were obtained within the DNA concentration range 1 – 1000 μg mL^{-1}. However, for concentrations of MV 1.0 and 50 μmol L^{-1}, the concentration dependences are not linear. Therefore, they are not suitable for the determination of DNA in aqueous solutions. The optimum concentration of MV for the determination of DNA is 10.0 μmol L^{-1} (see Fig. 3). Parameters of the calibration curves are summarized in Table II.

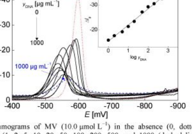


Fig. 3. DP voltammograms of MV (10.0 μmol L^{-1}) in the absence (0, dotted line) and presence of DNA (1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, and 1000 (dashed line) μg mL^{-1}). Measured using DPV at HMDE in AB. Inset: the dependence of the ΔI_p on the log γ_{DNA}.

Table II.
Parameters of the calibration dependences of ΔI_p of MV (5.0 and 10.0 μmol L^{-1}) on the log γ_{DNA} (1 – 1000 μg mL^{-1}). Measured using DPV at HMDE in AB.

Concentration of MV [μmol L^{-1}]	Slope [nA]	Intercept [nA]	R^2	L_Q [μg mL^{-1}]
5.0	−3.78	−15.43	0.9897	0.77
10.0	−6.50	−2.82	0.9931	0.74

Conclusions

The effect of the presence of DNA on the voltammetric behavior of methyl violet 2B (MV) was investigated using differential pulse voltammetry (DPV) and cyclic voltammetry (CV). Using DPV, it was found that the presence of DNA in the measured solution causes the decrease of the peak current of MV (0.5, 1.0, 5.0, and 10.0 μmol L^{-1}), and the peak potential shifts to more positive values. The concentration of MV does not affect the trend of the potential shift. CV was used for the investigation of the electrochemical reduction of MV (0.5, 1.0, 5.0, and 10.0 μmol L^{-1}) in the range of scan rates 5 – 1000 mV s^{-1}. In the absence of DNA, the reduction is both diffusion and adsorption controlled, and in the presence of DNA (5.0 and 100.0 μg mL^{-1}), the reduction is controlled by diffusion. The optimum concentration of MV for the indirect determination of DNA was found to be 10.0 μmol L^{-1}, with the limit of quantification L_Q = 0.74 μg mL^{-1}.

Acknowledgements

This research was carried out within the framework of the Specific University Research (SVV260205). Financial support from the Grant Agency of the Czech Republic (Project P206/12/G151) is gratefully acknowledged.

References

1. Sabnis R. W.: *Handbook of Acid-Base Indicators*. CRC Press, Boca Raton 2007.
2. Balabanova M., Popova L., Tchipeva R.: Clin. Dermatol. *21*, 2 (2003).
3. Andersen W. C., Turnipseed S. B., Karbiwnyk C. M., Lee R. H., Clark S. B., Rowe W. D., Madson M. R., Miller K. E.: Anal. Chim. Acta *637*, 279 (2009).
4. Shen Y. D., Deng X. F., Xu Z. L., Wang Y., Lei H. T., Wang H., Yang J. Y., Xiao Z. L., Sun Y. M.: Anal. Chim. Acta *707*, 148 (2011).
5. Littlefield N. A., Blackwell B. N., Hewitt C. C., Gaylor D. W.: Fund. Appl. Toxicol. *5*, 902 (1985).
6. Sklenar Z.: Pediatrie pro praxi *11*, 232 (2010).
7. Vachalkova A., Novotny L., Blesova M.: Neoplasma *43*, 113 (1996).
8. Oplatowska M., Donnelly R. F., Majithiya R. J., Glenn Kennedy D., Elliott C. T.: Food Chem. Toxicol. *49*, 1870 (2011).
9. Srivastava S., Sinha R., Roy D.: Aquat. Toxicol. *66*, 319 (2004).
10. Sagar K. A., Smyth M. R., Rodriguez M., Blanco P. T.: Talanta *42*, 235 (1995).
11. Sanroman M. A., Pazos M., Ricart M. T., Cameselle C.: Chemosphere *57*, 233 (2004).
12. Kaye R. C., Stonehill H. I.: J. Chem. Soc. 3231 (1952).
13. Horakova E., Barek J., Vyskocil V.: Anal. Lett. *48*, in press (2015).
14. Fojta M.: Electroanal. *14*, 1449 (2002).
15. Xu Y. M., Zhang Z. Y., Zhang H. Y.: Sci. China, Ser. C: Life Sci. *41*, 360 (1998).
16. Zhang S. F., Ling B. P., Qu F. L., Sun X. J.: Spectrochim. Acta A *97*, 521 (2012).
17. Vyskocil V., Labuda J., Barek J.: Anal. Bioanal. Chem. *397*, 233 (2010).
18. Vacek J., Havran L., Fojta M.: Chem. Listy *105*, 15 (2011).
19. Ibrahim M. S., Kamal M. M., Temerk Y. M.: Anal. Bioanal. Chem. *375*, 1024 (2003).
20. Kucharíková K., Novotny L., Yosypchuk B., Fojta M.: Electroanal. *16*, 410 (2004).
21. Hlavata L., Benikova K., Vyskocil V., Labuda J.: Electrochim. Acta *71*, 134 (2012).
22. Hajkova A., Barek J., Vyskocil V.: Electroanal. *27*, 101 (2015).
23. Inczedy J., Lengyel T., Ure A. M.: *Compendium of Analytical Nomenclature: Definitve Rules 1997* (Third Edition). Blackwell Science, Malden 1998.

Nanostructured Metal-Modified Carbon Fiber Microelectrodes for Electrochemical Detection in HPLC

Jan Hrbac [a], David Jirovsky [b], Vladimir Halouzka [c], Daniel Riman [b] and Zdenka Bartosova [b]
[a] Department of Chemistry, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic. E-mail: jhrbac@atlas.cz
[b] Department of Analytical Chemistry, Palacky University, Faculty of Science, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic
[c] Department of Physics and Materials Engineering, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nam. T.G. Masaryka 275, 76001 Zlin, Czech Republic

Abstract
A facile technique enabling CFMEs to be modified with nanostructured metal layers was developed. In this contribution, the approach is demonstrated for copper and bismuth. Copper modified CFMEs were employed in HPLC electrochemical detection of carbohydrates while bismuth coated CFME was used to detect nonsteroidal antiandrogens nilutamide and flutamide.

Key words: Metal nanostructure, Carbon fiber microelectrode, HPLC, Saccharides, Nonsteroidal antiandrogens.

Introduction
Electrochemically pretreated carbon fiber microelectrodes (CFMEs) can be utilized as highly sensitive electrochemical detectors, especially in HPLC, as shown in our previous works. Certain analytes, however, require metal electrode surfaces, rather than carbon ones. Thereby, we developed a facile technique enabling CFMEs to be modified with nanostructured metal layers. The technique is based on the progressive dissolution of metal anodes in unsupported media e.g. ultrapure water and reductive deposition of the anode-derived material on a CFME cathode. The technique appears to be a universal route to metal nanostructures on conducting substrates in general and on CFME in particular. The dimensions of a carbon fiber part of CFME (3-4 mm in length, 7 µm in diameter) enable the direct insertion of the active electrode tip into a narrow-bore capillary even after the modification with metal nanostructures. The advanced mechanical properties of carbon fibers grant the resulting sensing element excellent mechanical stability, superior to other electrode materials of similar size and shape, e.g. extremely fragile metal microwires. We demonstrate the approach on the example of copper modified CFME for the detection of carbohydrates and bismuth modified electrode for antiandrogenic drugs nilutamide and flutamide after HPLC separation.

Experimental
The standards of the tested carbohydrates (xylose, fructose, galactose, glucose, sucrose, maltose, lactose, raffinose, dextran) were obtained from Sigma-Aldrich. De-ionized water, sodium hydroxide obtained from Fluka (Fluka AG, Buchs, Switzerland), and gradient-grade acetonitrile (LabScan, Dublin, Ireland) were used to prepare the mobile phase. Copper wire 99.99%, 0.5 mm diameter and Bi needle (99.99%) were purchased from Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany.

The procedure for microelectrode fabrication is as follows: the carbon fiber is glued using conductive silver epoxy (EC101, Polytec, Germany) onto a copper wire and the junction is then cured at 150 °C for 10 min. The fiber with copper contact attached is fitted into the glass capillary, about 10 mm of the fiber is left protruding from its contracted end. Both ends of the capillary are sealed using epoxy resin (CHS Epoxy 1200, Sindat Pilsen, Czech Republic). Prior to use, the protruding fiber is cut to a length of about 5 mm by lancet, and the fiber end of the electrode is briefly sonicated in dichloromethane. For modification of assembled CFMEs with copper nanostructures, a copper wire was immersed (approx. 3 cm) into ultrapure water (Millipore) contained in 25 ml quartz beaker. CFME was placed 1 cm apart from copper wire. Copper wire was attached to the positive pole of a regulated power supply while CFME was connected to the negative pole. The voltage of the power supply was set to the desired level for the desired period of time. Analogical procedure was used for bismuth.

The HPLC system consisted of an ESA isocratic pump (Model 582), (ESA Inc., Chelmsford, MA, USA) with a pulse damper, a Rheodyne manual injector (Rheodyne, Cotati, CA, USA) equipped with a 10 µL loop. Electrochemical detection was performed using an Coulochem III ESA coulometric detector (ESA Inc., Chelmsford, MA, USA), equipped with a CFME cell. A Clarity chromatographic station (DataApex, Prague, Czech Republic) was used for chromatogram recording. The samples were introduced into the system using a glass 25 µL syringe (Hamilton, Reno, NV, USA). HPLC separations of saccharides were performed using a Hypercarb porous graphitic column, 100 × 2.1 mm i.d. (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For nonsteroidal antiandrogens a C18, 5u, (150 x 3 mm) Phenomenex, Torrance, CA, USA column was used. All fittings, injection loop, connecting ferules and tubings were PEEK™. The mobile phase was vacuum-filtered through a 0.2 µm porous filter (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and degassed by helium sparkling before use. The flow rate was 0.25 ml min^{-1}.The temperature of the HPLC column including connecting tubing and solvent reservoir was maintained at 45 °C using a Techlab K2 thermostat (Techlab GmbH, Braunschweig, Germany). The analytical potential for chromatographic detection was maintained at +500 mV or -900 mV for Cu-coated and Bi-coated CFMEs (both vs. Ag/AgCl), respectively.

Results and discussion

The deposition of metals was carried out in a simple two-electrode cell, with metal (i.e., copper or bismuth) anode, CFME cathode and Millipore water as ‚electrolyte'. It is to be expected that the applied potential (10-30 V) is sufficient to induce oxidation of copper and bismuth to corresponding Cu^{2+} and Bi^{3+} cations, readily reacting with OH^- ions available from the autoprotolysis of water to give corresponding hydroxides, eventually transformed by further hydrolytic reactions, as occurs in the case of Bi^{3+}, where bismuthyl hydroxide (BiOOH) is formed as a final product. The solubility products of $Cu(OH)_2$, Ks = $2.2 \cdot 10^{20}$ and BiOOH, Ks = $4.1 \cdot 10^{10}$ restricts the maximum concentration of free metal ions available for electroreduction to the low value of ~1.7×10^{-7} mol dm^{-3} for copper and ~2×10^{-5} mol dm^{-3} for BiO^+ which, together with the absence of the supporting electrolyte during the deposition, represent key factors in the formation of a high number of nuclei leading to metal-nanostructures rather than to the production of smooth or larger particles containing deposits. In addition to metal reduction, the proton is reduced on the cathode, forming hydrogen gas where hydrogen bubbles released from the cathode are observable with the naked eye during the experiment. Hydrogen may take part in the reduction process as well as may contribute towards keeping the formed layers in the reduced state. As shown in Figs. 1 and 2, the procedure leads to decorating carbon fibers with nanostructures of copper and bismuth.

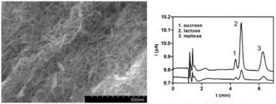


Fig. 1. SEM image of copper nanostructure on carbon fiber (left) and chromatogram of disaccharide mixture (right, lower chromatogram: 4μg/ml, upper: 20 μg/ml, 5 μl, ACN/25 mM NaOH (3/97), E=500 mV vs. Ag/AgCl).

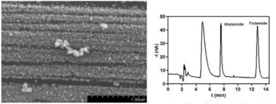


Fig. 2. SEM image of bismuth nanostructure on carbon fiber (left) and chromatogram of nilutamide/flutamide mixture (1mg/ml, upper: 20 μg/ml, 5 μl, ACN/25 mM phosphate buffer, pH=10 (50/50)).

The performances of modified CFME in an HPLC setup were investigated using a model mixture of three disaccharides (sucrose, lactose and maltose) for copper coated carbon fiber while two nonsteroid antiandrogens (nilutamide and flutamide) was analysed on bismuth coated CFME. The modified CFMEs were directly inserted into a piece of PEEK capillary connected to the outlet of HPLC column. For the separation of saccharides we used graphite based HPLC column, which is, unlike the majority of silica-based sorbents, alkali-resistant, and thus no extra post-column addition of concentrated hydroxide solution is needed. This way, the detection of carbohydrates can be accomplished directly in the mobile phase and the necessity of other additional instrumentation (such as a pulseless pump for post-column alkalinisation of the mobile phase) is eliminated. The HPLC separation of nilutamide and flutamide was performed on ordinary C18 column. Fig. 1 shows the chromatogram of three disaccharides (sucrose, maltose and lactose) detected using copper coated CFME at +500 mV vs. Ag/AgCl, C shows the chromatogram of nilutamide and flutamide on bismuth coated CFME recorded at -900 mV vs. Ag/AgCl. The concentration detection limits were ca. $5x10^{-7}$ $mol.dm^{-3}$ for disaccharides while less satisfactory detection limits ($2x10^{-5}$ $mol.dm^{-3}$) were achieved for nilutamide and flutamide on Bi-coated CFME in the cathodic region of potentials (Fig. 2). In both cases, however, the CFMEs exhibited a rapid response, very short reacquisition times and highly stable, low-noise backgrounds, ensuring good baseline stability within runs.

Conclusions
Rapid response times, high surface area, radial diffusion and the guaranteed electrical contact with the carbon fiber substrate ensured by the electrochemical nature of the nanostructures' formation lead to increased analytical usability of fabricated nanostructured metal-coated CFMEs.

Acknowledgment
The research was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, project 15-05198S.

References
1. Bartosova Z., Jirovsky D., Riman D., Halouzka V., Svidrnoch M., Hrbac J., Talanta, *122*, 115 (2014).
2. Bartosova Z., Riman D., Jakubec P., Halouzka V., Hrbac J., Jirovsky D., Sci. World J., *2012*, 295802.
3. Halouzka V., Jakubec P., Kvitek L., Likodimos V., Kontos A. G., Papadopoulos K., Falaras P., Hrbac J., J. Electrochem. Soc., *160*, B54 (2013).
4. Riman D., Bartosova Z., Halouzka V., Vacek J., Jirovsky D., Hrbac J., RSC Adv., *5*, 31245 (2015).

The Use of Self-Assembled Monolayer of Thiolated Calix[4]arene on Polycrystaline Gold Electrode Surface
(Využití samouspořádané monovrstvy thiolovaného kalix[4]arenu na povrchu polykrystalické zlaté elektrody)

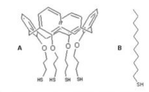
Vojtěch Hrdlička [a,b], Tomáš Navrátil [a], Ivana Šestáková [a], Jiří Barek [b], and Jiří Ludvík [a]
[a] J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the AS CR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: hrdlicv@natur.cuni.cz
[b] Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

Abstract
This study deals with the use of thiolated calixarene (C[4]A) as gold electrode modifier, alone or in combination with insulating undecanthiol ($C_{11}SH$), which is used to fill the gaps between calixes. Desorption potential of thiolated C[4]A and $C_{11}SH$ are both pH dependent, cathodic desorption peaks can be recorded in basic solutions only. The properties of the modified electrode were investigated using hydroquinone – electrochemically active molecule which fits inside the C[4]A cavity. Obtained data suggest that the electrochemical oxidation/reduction of hydroquinone does not use C[4]A cavities as size-selective channels.

Key words: Calixarene, Thiols, Gold electrode, Voltammetry.

Úvod
Kalixareny jsou po cyklodextrinech a crownetherech zřejmě nejčastěji využívaným typem molekulárních kališků se schopností tvořit inkluzní komplexy a rozličným uplatněním [1]. V elektrochemii jsou různé deriváty kalixarenů nejčastěji využívány jako ionofor pro iontově selektivní elektrody [2]. Kostra kalixarenu je elektrochemicky neaktivní, pokud jsou jednotlivé aromatické kruhy substituovány elektrochemicky aktivními substituenty, pak tyto substituenty mezi sebou pomocí kostry nekomunikují [3,4].

Cílem této práce bylo prozkoumat možnost využití samouspořádané vrstvy thiolovaného C[4]A a/nebo undekanthiolu ($C_{11}SH$) (Obr. 1) ke zvýšení citlivosti nebo selektivity voltametrických měření [5]. Thioly se na povrch zlaté elektrody velmi ochotně chemisorbují i bez vloženého potenciálu. V řádech desítek vteřin dochází k pokrytí většiny povrchu, ke kompletnímu pokrytí pak dochází v řádech hodin [6]. Pro thiolovaný C[4]A a $C_{11}SH$ vyplňující mezery mezi kališky byl již navržen postup pro přípravu samouspořádané vrstvy [7].



Obr. 1. (A) Thiolovaný kalix[4]aren (C[4]A), (B) undekanthiol ($C_{11}SH$) [7].

Experimentální část

Pro voltametrická měření byl použit přístroj Eco-Tribo Polarograf (Eco Trend Plus, ČR) se softwarem MultiElChem verze 3.1 (Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., ČR) v operačním systému Windows 7 (Microsoft, USA). Přístroj pracoval v tříelektrodovém zapojení s nasycenou argentochloridovou referentní elektrodou (Elektrochemické detektory s.r.o., ČR) a pomocnou platinovou elektrodou (Monokrystaly, Turnov). Jako pracovní elektroda byla použita polykrystalická zlatá disková elektroda, typ SESV 21 (Elektrochemické detektory s.r.o., ČR) o průměru 1,0 mm.

Pracovní elektroda byla před měřením dvě minuty leštěna na polyuretanové podložce se suspenzí aluminy o velikosti částic 100 µm a sonikována na ultrazvukové lázni po dobu dvou minut. Poté byla elektroda ponořena na 10 minut do peroxosírové směsi (98% H_2SO_4 a 30% H_2O_2, 3:1) a 2 minuty sonikována. Nakonec byla elektroda podrobena cyklické voltametrii v prostředí 0,1M H_2SO_4 při rychlosti polarizace 100 mV·s^{-1}, nejprve 25 scanů v rozsahu potenciálů –200 mV až +1500 mV a poté 10 scanů v rozsahu +750 mV až +200 mV. Modifikace elektrody probíhala ponořením elektrody do 100 µl 10^{-4}M roztoku thiolovaného propoxy C[4]A nebo $C_{11}SH$ v dimethylformamidu po dobu 60 minut, před použitím byla elektroda opláchnuta methanolem a vodou.

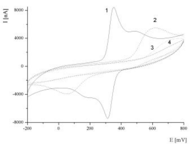
Výsledky a diskuse

Pokrytí elektrody thiolovanými látkami

Vrstva thiolovaného kalixarenu a/nebo $C_{11}SH$ je díky silné vazbě Au-S velmi stabilní a umožňuje voltametrická měření v širokém rozsahu potenciálů. Anodické desorpční píky je možno naměřit v oblasti pokrývání povrchu zlata vrstvou oxidů, v kyselém prostředí tedy přibližně při +1100 mV proti argentochloridové referentní elektrodě. V katodické oblasti je možno sledovat desorpční pík $C_{11}SH$ pouze při pH 12 a vyšším, v kyselejším prostředí jsou překryty vývojem vodíku. Katodické desorpční píky kalixarenu jsou patrné v bazickém a neutrálním prostředí. Předchází jim táhlá vlna, v prostředí kyselém naopak není patrný žádný signál. Dá se tedy předpokládat, že vzniklá monovrstva je v kyselém prostředí stabilní minimálně do potenciálů, při kterých dochází ke katalytickému vývoji vodíku. Ke stabilitě thiolové vrstvy přispívá i nízká rozpustnost $C_{11}SH$ a thiolovaného C[4]A ve vodě. I pokud dojde k redukci vazby Au-S-R, tyto látky se jen velmi neochotně desorbují z povrchu elektrody. Pokud je po katodické desorpci elektroda odpojena, dochází velmi rychle k opětovnému vzniku Au-S-R vazeb. To se projeví na cyklických voltamogramech katodické desorpce zkoumaných thiolátek v bazickém prostředí. Pík odpovídající redukci Au-S-R na SH-R je patrný i po několika desítkách cyklů. Vzhledem k tomu, že desorpční píky jsou poměrně široké a vyskytují se v oblastech se zvýšeným pozadím (oxidace zlatého povrchu nebo vývoj vodíku), měření pokrytí elektrody pomocí cyklické voltametrie nebo voltametrie s lineárním nárůstem potenciálu je zřejmě nedostačující pro rozhodnutí, zda je elektroda zcela pokryta danou thiolátkou. V současnosti jsou proto zkoumány možnosti využití normalizace signálu na skutečný povrch elektrody, využití elektrochemické impedanční spektroskopie nebo katodické rozpouštěcí chronopotenciometrie.

Studium pokrytí elektrody thiolovanými látkami za použití hydrochinonu

Modelová látka hydrochinon se na nemodifikované zlaté elektrodě reverzibilně oxiduje na chinon. Při modifikaci elektrody pouze thiolovaným C[4]A je zřejmý posun zpětného píku do oblasti negativnějších potenciálů a pokles reverzibility. Pokud je elektroda modifikována pouze pomocí $C_{11}SH$, dochází k výraznému poklesu proudu vlny a zpětnou vlnu téměř nelze odlišit od nabíjecího proudu. Pokud jsou mezery mezi chemisorbovanými molekulami kalixarenu vyplněny pomocí $C_{11}SH$, vzniklá vlna je ještě méně vyvinutá, než při použití samotného $C_{11}SH$ jako modifikátoru, což naznačuje, že hydrochinon zřejmě s elektrodou nekomunikuje prostřednictvím kavity kalixarenu. Obdobné výsledky byly získány i v katodické oblasti pro vybrané nitrovaných aromatický látek 1-nitrobenzen, 1-nitronaftalen a 2-nitrofluoren (Obr. 2).



Obr. 2. Cyklické voltamogramy 1mM hydrochinonu v prostředí 0,1M H_2SO_4, rychlost polarizace 100 $mV \cdot s^{-1}$. (1) zlatá elektroda bez modifikace, (2) modifikováno thiolovaným C[4]A, (3) modifikováno $C_{11}SH$, (4) dvoustupňová modifikace thiolovaným C[4]A a $C_{11}SH$.

Závěr

Samouspořádaná vrstva thiolovaného C[4]A na povrchu zlaté elektrody je stabilní v širokém rozsahu potenciálů a v kyselém prostředí ji lze použít i v katodické oblasti. Cyklické voltamogramy hydrochinonu naznačují, že vnitřní spodní průřez kavity C[4]A je zřejmě příliš malý, než aby bylo možno C[4]A využít k tvorbě selektivního „síta" na povrchu zlaté elektrody pro voltametrická stanovení molekul o velikosti jednoduchého aromatického kruhu, pro tento účel by mohla sloužit vrstva vytvořená z kalixarenu složeného z více jednotek.

Poděkování

V. Hrdlička a J. Ludvík děkují za podporu Grantové agentury ČR (projekt č. 13-21704S), T. Navratil za podporu Grantové agentury ČR (projekt č. P208/12/1645) a J. Barek za podporu Grantové agentury ČR (projekt č. P206/12/G151).

Literatura

1. Mokhtari B., Pourabdollah K., Dalali N.: J. Incl. Phenom. Macro. *69*, 1 (2011).
2. Chung T. D., Kim H.: J. Inclus. Phenom. Mol. *32*, 179 (1998).
3. Liska A., Vojtisek P., Fry A. J., Ludvik J.: J. Org. Chem. *78*, 10651 (2013).
4. Liska A., Rosenkranz M., Klima J., Dunsch L., Lhotak P., Ludvik J.: Electrochim. Acta *140*, 572 (2014).
5. Prchal V., Vyskocil V., Danhel A., Barek J., Wang J.: Chem. Listy. *105*, 217 (2011).
6. Vericat C., Vela M. E., Benitez G., Carro P., Salvarezza R. C.: Chem. Soc. Rev. *39*, 1805 (2010).
7. Sustrova B., Stulik K., Marecek V.: Int. J. Electrochem. Sc. *8*, 4367 (2013).

Spectroelectrochemical Study of Electron Transfer in the Extended 1,1'-Bipyridinium Cation

Magdaléna Hromadová [a], Viliam Kolivoška [a], Lubomír Pospíšil [a,c], Michal Valášek [b], and Ján Tarábek [c]

[a] J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of ASCR v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: hromadom@jh-inst.cas.cz

[b] Karlsruhe Institute of Technology, Institute of Nanotechnology, Hermann-von-Helmholtz Platz 1, D-763 44 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

[c] Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of ASCR v.v.i., Flemingovo nám. 2, CZ-166 10 Prague 6, Czech Republic

Abstract

Electron transfer (ET) in the extended 1,1'-bipyridinium has been investigated by UV/Vis/NIR and EPR in-situ spectroelectrochemical techniques. During the in-situ cyclic voltammetric scan no EPR signal was observed at the potential corresponding to the first electron transfer at room temperature, whereas the EPR signal for the subsequent ET steadily increased and was observed even at the potentials corresponding to the fourth electron transfer. The EPR signal was detected for the first electron transfer step only at elevated temperature. The evidence for the presence of comproportionation processes and for the formation of π-dimer is discussed.

Key words: extended bipyridiniums, electron transfer, UV/Vis/NIR and EPR spectroelectrochemistry.

Introduction

Recently a series of the extended oligopyridinium compounds, starting from the extended 1,1'-bipyridinium moiety, has been studied and their electron transfer properties have been investigated [1,2]. In this communication we will discuss the electron transfer mechanism of the first species $\mathbf{A}^{2+}$ in that series using combined UV/Vis/NIR and EPR in-situ spectroelectrochemical measurements. Term extended means that a linker is added between two pyridinium units. In our case a *p*-phenylene linker connects two head-to-head oriented pyridinium moieties (Chart 1). Redox activity of such bipyridinium units depends on the type of linker as well as on the manner in which such units are connected. A tail-to-tail combination represents the building block of the most promising compounds for molecular electronics, i.e. extended viologens [2,3]. It has been shown that the 4,4'-bipyridinium moiety in the extended viologens is reduced in two reversible one-electron steps and the electron may be considered as fully delocalized over two pyridinium centers [3,4].

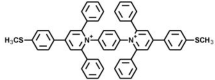


Chart 1. Chemical structure of 1,1'-bipyridinium cation $\mathbf{A}^{2+}$

In the extended 1,1'-bipyridinium $\mathbf{A}^{2+}$ the reduction proceeds in four reversible one-electron steps, which may be viewed as the reduction of each pyridinium moiety by two electrons. In our previous work it has been postulated that pyridinium rings in $\mathbf{A}^{2+}$ can be viewed as two independent, identical and communicating redox centers [1]. Therefore, the aim of the present contribution is to use in-situ spectroelectrochemistry (UV/Vis/NIR and EPR) to gain insight into the redox equilibria during the cyclic voltammetry and/or chronoamperometry measurements.

Experimental

Synthesis of the compound $\mathbf{A}^{2+}$ α-[4-(methylsulfanyl)phenyl]-ω-tert-methylsulfanyl-mono[(2,6-diphenylpyridinium-4,1-diyl)-1,4-phenylene-(2,6-diphenylpyridinium-1,4-diyl)-1,4-phenylene] bis(trifluoromethansulfonate) was described previously [5]. Tetrabutyl-ammonium hexafluorophosphate ($TBAPF_6$), dimethylsulfoxide (DMSO) and acetonitrile (AN) were obtained from Fluka and dried before use. UV/Vis/NIR and EPR spectroelectrochemistry measurements were obtained in the optically-transparent thin-layer electrode (OTTLE) electrochemical cell (University of Reading, UK) and flat quartz cell ER165FCVT-Q (Bruker, Germany) both containing three-electrode system consisting of Pt-mesh working electrode, Pt wire counter electrode and Ag wire quasi-reference electrode. EPR spectra were recorded on EMX^{plus}-10/12 continuous wave EPR spectrometer (Bruker, Germany) and UV/Vis/NIR spectra on a diode-array UV/Vis/NIR spectrometer Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA). Potentiostat Autolab 101 (Metrohm Autolab, the Netherlands) was used for cyclic voltammetry (scan rates between 2 and 5 mV/s) and chronoamperometry experiments. Oxygen was removed from all solutions and the entire electrochemical system by nitrogen gas before each experiment. Spectroelectrochemical OTTLE cell was calibrated for the number of transferred electrons [6].

Results and discussion

Compound $\mathbf{A}^{2+}$ is reduced in four one-electron reversible waves [1] and its redox forms can be traced by in-situ spectroscopic techniques. Fig. 1 shows representative UV/Vis/NIR spectra either after the chronoamperometric step experiment (for AN solvent) or during the voltammetric scan (for DMSO solvent) at potentials corresponding to the acceptance of one, two, three and four electrons. The absorption band of $\mathbf{A}^{2+}$ at 391 nm steadily decreases and the appearance of two new absorption bands centered on 500 and 590 nm is observed. Both peaks shift to the higher wavelength with increasingly negative potential. In-situ EPR spectroelectrochemical measurements give direct information on the presence of radical intermediates. EPR spectroelectrochemistry was measured at two temperatures 293 K and 393 K. Fig. 2 shows that at room temperature the system is EPR silent at potential corresponding to the first reduction wave, whereas the EPR spectrum develops at the potential of the second ET reduction wave. It remains qualitatively the same, but increases in intensity as reduction proceeds through the second up to the fourth electron transfer. At elevated temperature the EPR signal is also observed for the first reduction step (data not shown), which strongly suggests the presence of additional equilibria, in this case the π-dimer formation [7]. Based on the known formal redox potentials of the four electron transfers, one can obtain the equilibrium constants for the comproportionation reactions that are significant for this system. For example, at potential corresponding to the acceptance of the second electron the reaction $A^{2+} + A^{0} \rightleftharpoons 2\,A^{1+}$ produces two cation radicals in accord with the observed EPR signal. The value of the comproportionation constant is $K_{comp} = 35$. An increase of the EPR signal presents a strong evidence for the existence of the comproportionation equilibria. However, other types of homogeneous reactions, which are thermodynamically possible, must be taken into account. For example, at the potential of the first reduction process the formation of the association dimers can explain the experimental data. At the potentials corresponding to the third ET one can envisage the following comproportionation reaction $A^{1+} + A^{1-} \rightleftarrows 2\,A^{0}$ with $K_{comp} = 72$ as well as another homogeneous reaction $A^{1-} + A^{2+} \rightleftarrows A^{1+} + A^{0}$ with $K = 2520$. The observation of qualitatively similar EPR signal at the potential of the third ET can be then explained by the increased concentration of A^{1+} even though one can not exclude the possibility that the EPR spectrum of A^{1-} is practically indistinguishable from that of A^{1+} species. Finally, at the potentials corresponding to the fourth ET two comproportionation reactions are thermodynamically possible: $A^{0} + A^{2-} \rightleftarrows 2\,A^{1-}$ with $K_{comp} = 232$ and $A^{2+} + A^{2-} \rightleftarrows 2\,A^{0}$ with $K_{comp} = 4\times10^{7}$.

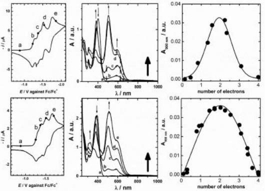


Fig. 1. Representative cyclic voltammograms and in-situ UV/Vis/NIR spectra of $\mathbf{A}^{2+}$ at potentials of the first, second, third and fourth ET. The development of the wide absorption band around 900 nm as a function of the number of transferred electrons during in-situ spectrochronoamperometry. Supporting electrolyte was 0.3M $TBAPF_6$ in AN (upper panel) and DMSO (lower panel).

Conclusions

Extended 1,1'-bipyridinium compound $\mathbf{A}^{2+}$ is reduced in four one-electron reversible steps. Combined UV/Vis/NIR and EPR spectroelectrochemical measurements proved that the cation radical formed after the acceptance of the first electron forms a π-dimer. Several types of the comproportionation equilibria can explain the formation of the cation radical $\mathbf{A}^{1+}$ in accord with the observation of the increasing EPR signal during the cyclic voltammetric scan.

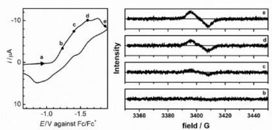


Fig. 2. Representative cyclic voltammogram of A^{2+} in 0.2M $TBAPF_6$/DMSO and in-situ EPR spectra corresponding to potentials indicated by lower-case letters. Temperature 293K.

Acknowledgements

This research has been supported by the Grant Agency of the Czech Republic (14-05180S), by the Grant Agency of the Academy of Sciences (M200401202 and HU/2013/05) and by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (7AMB15FR027).

References

1. Kolivoška V., Gál M., Pospíšil L., Valášek M., Hromadová M.: Phys. Chem. Chem. Phys. *13*, 11422 (2011).
2. Kolivoška V., Valášek M., Gál M., Sokolová R., Bulíčková J., Pospíšil L., Mészáros G., Hromadová M.: J. Phys. Chem. Lett. *4*, 589 (2013).
3. Funston A., Kirby J. P., Miller J. R., Pospíšil L., Fiedler J., Hromadová M., Gál M., Pecka J., Valášek M., Zawada Z., Rempala P., Michl J.: J. Phys. Chem. A *109*, 10862 (2005).
4. Pospíšil L., Fiedler J., Hromadová M., Gál M., Valášek M., Pecka J., Michl J.: J. Electrochem. Soc. *153*, E179 (2006).
5. Hromadová M., Kolivoška V., Gál M., Pospíšil L., Sokolová R., Valášek M. Inclusion complex of α–cyclodextrin and the extended viologen dication: J. Incl. Phenom. *70*, 461 (2011).
6. Kolivoška V., Gál M., Lachmanová Š., Valášek M., Hromadová M., Pospíšil L.: Anal. Chim. Acta *697*, 23 (2011).
7. Tarábek J., Kolivoška V., Gál M., Pospíšil L., Valášek M., Kaminský J., Rulíšek L., Hromadová M.: J. Phys. Chem. C, *submitted*.

Detection of Dasatinib using Pre-reaction with Copper and Mass Spectrometry (Detekce dasatinibu pomocí předřazené reakce s mědí a hmotnostní detekcí)

Jana Jaklová Dytrtová[a,b], Michal Jakl[c], and Tomáš Navrátil[d]

[a] Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the AS CR, v.v.i., Flemingovo náměstí 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic, E-mail:dytrtova@uochb.cas.cz

[b] Charles University in Prague, Faculty of Physical Education and Sport, José Martího 31, 162 52 Prague 6, Czech Republic

[c] Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 21 Prague – Suchdol, Czech Republic

[d] J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the AS CR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic

Abstract

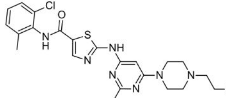
The determination of dasatinib (DAS) was provided using front-end electrochemical separation with mass detection. The electrochemical separation is based on the reaction of DAS with copper solid electrode. The affinity of DAS to copper is supported by redox reaction yealding to DAS fragmentation.

Key Words: Electrochemical separation, Hyphenation, EC-ESI-MS, Copper.

Úvod

Spojení elektrochemických metod s hmotnostní spektrometrií skýtá v současnosti velký potenciál jak pro analytickou chemii, tak i pro studium mechanismů elektrochemických reakcí. V zásadě se však nejedná o jednoduché napojení. Je třeba respektovat některá omezení plynoucí ze spojení dvou rozdílných přístupů [1]. Spojení dvouelektrodové elektrochemické průtokové cely (EC) s hmotnostním spektrometrem s ionizací elektrosprayem (ESI-MS) bylo nedávno vyvinuto a testováno pro detekci pesticidů v biologických matricích [2]. V tomto přístupu je využito velké afinity měďnatých a stříbrných kationtů v nascentním stavu k triazolům. Přičemž jsou kationty generovány na základě vloženého potenciálu na pracovní elektrodu (pevná stříbrná nebo měděná elektroda) do protékajícího roztoku a s pesticidem tvoří komplex, který je následně detekován v hmotnostním spektrometru. Tříelektrodová EC skýtá mnohem robustnější systém pro širší analytické využití. Této cely bylo využito i v případě detekce dasatinibu (DAS).

DAS byl dříve znám pod názvem BMS-354825 jako lék na rakovinu prodávaný pod názvem Sprycel. Jedná se o orálně podávaný tyrosin-kinázový inhibitor. Inhibuje tzv. Philadelphia chromozóm. Poprvé byl použit pro léčbu chronické myelinogenní leukémie a akutní lymfoblastické leukémie. V současné době je testován pro jeho účinky při léčbě rakoviny prostaty i dalších druhů rakoviny.



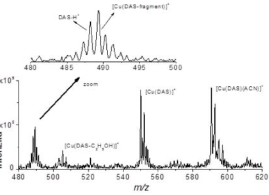
Obr. 1. Dasatinib.

Experimentální část
Konstrukce cely odpovídá tříelektrodovému zapojení potenciostatu. Jako pracovní elektroda (WE) byl použit měděný drát (Lachema, ČR), pomocná elektroda (AUX) byla platinový drát (Safina, ČR) a referentní elektroda byla argentchloridová (RE), vlastní konstrukce. EC cela pracovala v tříelektrodovém zapojení počítačem řízeného polarografického/voltametrického analyzátoru (PC-ETP, Polaro-Sensors, ČR), s programem MultiElchem 2.3 (ÚFCHJH AVČR, v.v.i., ČR) [3] a POLAR.PRO 5.1 (Polaro-Sensors, ČR). Z důvodů kompatibility EC s ESI-MS bylo nutné použít průtok cca 0,45 mL h^{-1}. Při takto nízkém průtoku nabývá tloušťka hydrodynamické hraniční vrstvy milimetrových rozměrů [4]. Problém byl částečně minimalizován použitím elektrod malých průměrů [5]. K míchání bylo dále využito turbulencí v proudícím roztoku, které vznikající na elektrodách vyčnívajících do roztoku [6].

Modelový vzorek byl připraven ze zásobního roztoku DAS v acetonitrilu (10^{-6} mol L^{-1}), 25 mmol L^{-1} vodného acetátového pufru (vše Sigma-Aldrich, ČR) a deionizované vody a EtOH (50%). Vzorek byl dodáván vždy s kontinuálním průtokem z Hamiltonovy stříkačky (Thermo Fisher Scientific, ČR) pomocí pumpy (KD Scientific, USA). Biologický vzorek sestával z plazmy (25%), 25 mmol L-1 acetátového pufru, zbytek byl doplněn EtOH (50 %).

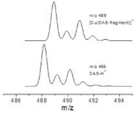
ESI-MS experimenty byly provedeny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí (Thermo Finnigan LCQ Advantage MS System; ThermoFinnigan, USA) se zdrojem elektrospraye s možností polarizace v pozitivním i negativním modu [7]. Optimalizované podmínky pro detekci $[Cu(DAS)]^+$, byly následující: napětí ve sprayi 4,0 kV, napětí na kapiláře 100 V, teplota v kapiláře 230°C, průtok ochranného a pomocného plynu 10–50 arbitrárních jednotek.

Výsledky a diskuse
Vzhledem k vysoké afinitě DAS nebylo nutné na elektrody vkládat žádný pracovní potenciál. K reakci DAS na měděné elektrodě docházelo i za klidového potenciálu. Do roztoku se uvolňoval komplex $[Cu(DAS)]^+$, dále též adukt s acetonitilem $[Cu(DAS)(ACN)]^+$ (Obr. 2). Měď se v komplexu vyskytovala jako Cu^+, přičemž její původ v procesu elektrospraye [8], a také může vznikat reakcí s analytem [9]. Velmi zajímavý, na první pohled ne zcela zřejmý, je komplex komplex Cu s fragmentem DAS, jehož molekulová hmotnost je 489 a náboj 1+, tj. *m/z* 489. Izotopový patern tohoto produktu je v překryvu s izotopovým paternem náležejícím proponovanému DAS (Obr. 3). Jedná se patrně o komplex mědi s fragmentem DAS; přičemž jeho přesné složení bude muset být dále studováno pomocí kolizně indukované fragmentace (disociace) komplexu vybraného *m/z* 489.



Obr. 2. ukazuje získané hmotnostní spektrum modelového vzorku, kde se kromě komplexu DAS s mědí $[Cu(DAS)]^+$ při m/z 550 a jeho aduktu s acetonitrilem (ANC) s m/z 591, vyskytuje též protonovaná forma DAS při m/z 488 a komplex mědi s fragmentem DAS při m/z 489 a také komplex při m/z 505, který náleží (uvedené m/z jsou pro lehké izotopy).

Metoda byla dále využita pro stanovení DAS v plasmě, kde však nebyla díky velké afinitě mědi k matrici plasmy použitelná. Množství elektrochemicky generované mědi nepostačuje na vyvázání DAS z roztoku plasmy. Mnohem lepších výsledků by bylo možné dosáhnout zapojením kapalinové chromatografie před elektrochemickou celu. V tomto případě by však bylo nutné změnit konstrukci EC, aby splňovala nároky na vysoké průtoky a minimální mrtvý objem.



Obr. 3. Simulace (pomocí programu Xcalibur) izotopových paternů proponovaného DAS (m/z 488) a komplexu Cu s fragmentem DAS (m/z 489) ve srovnání s experimentálně získaným smíšeným paternem.

Závěr

Zapojení elektrochemické cely před hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprayem skýtá velký potenciál pro většinu analýz, nicméně v případě stanovení DAS (navzdory jeho velké reaktivitě s mědí) v plasmě díky velké afinitě mědi vůči běžným složkám plasmy je v současné konstrukci použitá elektrochemická cela málo účinná. Jistým řešením je předřazené spojení s kapalinovou chromatografií, kde jsou limitujícími faktory především nutnost použít vysoké průtoky (až 3 mL/min) a nutnost minimalizovat mrtvý objem cely.

Poděkování

Tato práce vznikla s podporou grantů GA ČR (13-21409P, P208/12/1645) a MŠMT (S grant).

Literatura

1. Jaklová Dytrtová J., Jakl M., Schröder D., Navrátil T.: Curr. Org. Chem. *15*, 2970 (2011).
2. Jaklová Dytrtová J., Jakl M., Schröder D., Norková R.: Int. J. Mass Spectrom. *338*, 45 (2013).
3. Navrátil T., Yosypchuk B., Barek J.: Chem. Anal. *54*, 3 (2009).
4. Gunasingham H., Fleet B.: Anal. Chem. *55*, 1409 (1983).
5. Gunasingham H.: Anal. Chim. Acta *159*, 139 (1984).
6. Jaklová Dytrtová J., Jakl M., Norková R., Navrátil T.: *Modern Electrochemical Methods XXXII (XXXII. Moderní elektrochemické Metody): Optimization of a flow rate for a hyphenation of voltammetry with electrospray ionization mass spectrometry, Jetřichovice*, (Navrátil T., Fojta M., Eds.), Best Servis, Ústí nad Labem, Jetřichovice 2012, p. 54.
7. Tintaru A., Roithová J., Schröder D., Charles L., Jušinski I., Glasovac Z., Eckert-Maksić M.: J. Phys. Chem. *112*, 12097 (2008).
8. Tintaru A., Charles L., Milko P., Roithová J., Schröder D.: J. Phys. Org. Chem. *22*, 229 (2009).
9. Jaklová Dytrtová J., Jakl M., Schröder D., Čadková E., Komárek M.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *25*, 1037 (2011).

Sensitive Voltammetric Method for Determination of Herbicide Metribuzin using Silver Solid Amalgam Electrode

Lenka Janíková, Michaela Rogozinská, Renáta Šelešovská, and Jaromíra Chýlková
Institute of Environmental and Chemical Engineering, University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: lenka.janikova@upce.cz

Abstract
Sensitive voltammetric method for a determination of a herbicide metribuzin using two modifications of a silver solid amalgam electrode (mercury meniscus modified (m-AgSAE) and polished (p-AgSAE)) is presented for the first time. It was found, that metribuzin provided two reduction irreversible peaks in wide range of pH using both modifications of AgSAEs and the signal at potential about −650 mV was found to be suitable for analytical purposes. Parameters of differential pulse voltammetry were optimized and it was reached low detection limits. Applicability of the proposed method was verified by analysis of spiked samples of natural waters and herbicide preparation containing metribuzin.

Key words: Metribuzin, Silver solid amalgam electrode, Voltammetry, Herbicide.

Introduction
Metribuzin (MTZ, Fig. 1) is a selective triazinone herbicide widely used all over the world [1,2]. It was developed for pre- and postemergence weed control in the agricultural production of tomatoes, soybeans and potatoes [2]. Its effect is based on the inhibition of the electron transfer in photosynthesis [2]. Its half-life in soils varies from 30 to 120 days depending on a soil type and climatic conditions. MTZ is fairly soluble in water, thus, it has potential to leaching and it was frequently detected in ground and surface waters [2-4]. Thus, the sensitive determination of MTZ is still highly current problem. Various analytical techniques like liquid chromatography [5,6], micellar electro-kinetic chromatography [7] or spectroscopic methods [8,9] were already utilized for sensitive detection of MTZ. Electrochemical methods, which represent a suitable alternative to the above mentioned techniques but with lower demanding on time of analysis and operating costs, were also employed for analysis of MTZ. The electrochemical behavior and particularly the reduction of MTZ on mercury electrodes is described in ref. [1,10,11]. It was found, that the reduction process in acidic media includes two irreversible steps, in which protonated forms of azomethine bonds are reduced [1]. For analytical purposes, the best response was observed in acidic and slightly acidic supporting electrolytes [1,10,11]. Using hanging mercury drop electrode (HMDE) was reached low limit of detection (LOD = 1 nmol L^{-1}) [10]. Only one paper [12] deals with the application of solid or paste working electrode for voltammetric determination of MTZ. Glassy carbon electrode (GCE) and carbon paste electrode (CPE) based on the mixture of carbon paste and Nujol oil and Castor oil, respectively, were utilized as voltammetric sensors for monitoring of electrooxidation of MTZ after its previous electroreduction. As the main electrolytic products of the reduction were identified deaminometribuzin and diketometribuzin [12]. The lowest LOD was obtained for CPE with Castor oil as 1.25 µmol L^{-1} [ref. 12].

The present paper deals with the voltammetric determination of MTZ using two modifications of silver solid amalgam electrode: mercury meniscus modified (m-AgSAE) and polished (p-AgSAE) [13,14]. This type of solid electrodes combines advantages of mercury (high hydrogen overvoltage) and metal (mechanical stability) working electrodes [13,14]. Our research group is over long term interested in the application of this perspective electrode material and we have already applied this electrode material for sensitive voltammetric determination of vitamins [15-18], pharmaceuticals [19-22] or pesticides [23-26].

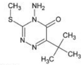


Fig. 1. The chemical structure of MTZ.

Voltammetric behavior and determination of the widely used herbicide MTZ on AgSAEs is for the first time discussed in the presented paper. Various voltammetric Techniques like cyclic voltammetry (CV), linear sweep voltammetry (LSV) and differential pulse voltammetry (DPV) were applied for the examination of the voltammetric behavior and DPV with optimized parameters was successfully used for determination of MTZ in real and spiked samples with complicated matrices.

Experimental

All chemicals used for preparation of standard solutions and supporting electrolytes were of p.a. purity and were prepared in distilled water. The particular amount of the MTZ powder (CAS: 21087-64-9, purity: 99.9 %, Sigma Aldrich) was dissolved in acetonitrile (Lach-ner, Czech Republic) to concentration of 0.01 mol L^{-1} and the stock solution was stored in the glass flask in a refrigerator. Working solutions of MTZ were prepared daily. The Britton-Robinson buffer solutions (BRBS) were prepared from the alkaline component consisting of 0.2 mol L^{-1} NaOH (Lachema, Brno, Czech Republic) and the acidic component which is based on the mixture of H_3PO_4, H_3BO_3 and CH_3COOH (all p.a., Lachema, Brno, Czech Republic) of the same concentration (0.04 mol L^{-1}). Solution of 2 mol L^{-1} KCl, which was used for the activation process of AgSAEs, was prepared from KCl powder (Lachema, Brno, Czech Republic).

The tap water was sampled from the water supply in Pardubice, Czech Republic. The samples of natural waters were obtained from the rivers Elbe (Pardubice, Czech Republic) and Vltava (Prague, Czech Republic). Samples of the natural waters were analyzed directly after previous filtration. The herbicide preparation SENCOR 70WG (Bayer Garden, Czech Republic) containing 700 g kg^{-1} MTZ was grounded in a grinding mortar, transferred in the glass flask with acetone and filtered after 30 minutes of sonication. It was filled up with acetone to the mark and analyzed.

All voltammetric measurements were carried out in 3 electrodes set up, where AgSAE (Eco Trend Plus, Prague, Czech Republic) served as a working, silver|silver chloride|saturated KCl (Ag|AgCl|sat. KCl) as the reference and platinum wire as the auxiliary electrode (both Monokrystaly, Turnov, Czech Republic). All measurements were performed with the computer controlled Eco-Tribo Polarograph PC-ETP (Eco Trend Plus, Prague, Czech Republic) which was equipped by software POLAR.PRO (version 5.1) for Windows XP. The air oxygen was removed from the analyzed solution by bubbling with nitrogen (purity class 4.0; Linde, Prague, Czech Republic) for 5 minutes before every analysis. CV, with following parameters: initial potential (E_{in}) 0 mV, final potential (E_{fin}) −1300 mV, scan rate (v) 100 mV

s^{-1}, regeneration potential (E_{reg}) −1300 mV and regeneration time (t_{reg}) 10 s, was used for the investigation of the basic voltammetric behavior of MTZ. LSV (E_{in} = 0 mV, E_{fin} = −1300 mV, v = 100 and 10-500 mV s^{-1}, respectively, E_{reg} = −1300 mV, t_{reg} = 10 s) was utilized for examination of the effect of pH and scan rate, respectively, on the voltammetric responses of MTZ. DPV with optimized parameters (m-AgSAE: E_{in} = −200 mV, E_{fin} = −1200 mV, v = 50 mV s^{-1}, pulse height −60 mV, pulse width 60 ms; p-AgSAE: E_{in} = 0 mV, E_{fin} = −1100 mV, v = 70 mV s^{-1}, E_{reg} = −1100 mV, t_{reg} = 10 s, pulse height −60 mV, pulse width 20 ms) was used for the rest of analysis. All the measurements were carried out at laboratory temperature.

The limit of detection (LD) was calculated as a three times the standard deviation for the blank solution and divided by the slope of the calibration curve. The parameters of calibration curves (e.g., slope, intercept) were calculated using software Excel 2010 (Microsoft, USA) and OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, USA).

Results and discussion

The effect of pH of supporting electrolyte was studied at first. Very similar results were obtained for both of tested working electrodes. It was found, that 1×10^{-4} mol L^{-1} MTZ provided two irreversible reduction signal in wide range of pH, which is obvious from the Fig. 2., in which the example of cyclic voltammogram recorded in BRBS of pH 3 using m-AgSAE is shown. The highest signals were observed in the acidic and slightly acidic supporting electrolytes (inset of Fig. 2.), which corresponds to the results obtained on mercury electrodes [1,10,11]. Therefore, the BRBS of pH 2 (p-AgSAE) and pH 3 (m-AgSAE) were used for all further measurements. The well-developed and easily evaluable signal 1 was chosen for further examination.

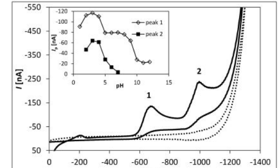


Fig. 2. Cyclic voltammogram in absence (dotted line) and presence (solid line) of 1×10^{-4} mol L^{-1} MTZ recorded on m-AgSAE in BRBS of pH 3. Inset: Dependence between peaks height and pH of the supporting electrolyte.

The effect of scan rate on the peak heights was investigated using LSV. Very similar results were again obtained for both electrodes and the linear dependence of the peak height and the square root of the scan rate ($v^{1/2}$) was obtained, which corresponds to diffusion controlled electrode process. This assumption was confirmed by log(I_p)-log(v) analysis. The slope of these dependences was close to the theoretical value 0.5 (m-AgSAE: 0.5395±0.0076 and p-AgSAE: 0.5422±0.0068). Thus, it could be concluded that diffusion is the controlling process of the followed electrode reactions.

Parameters of DPV, as a sensitive voltammetric technique chose for monitoring of the MTZ reduction, were optimized and are summarized in the part Experimental. Electrochemical regeneration of the working surface of AgSAE very often plays a crucial role in the optimizing process. In case of MTZ, an insertion of the regeneration had no effect on the MTZ response recorded on m-AgSAE during repeated scans and caused slight increase of the peak registered on p-AgSAE. Thus, no regeneration step was used during analysis with m-AgSAE and application of −1100 mV for 10 s was sufficient for regeneration of p-AgSAE. This assumption was confirmed by repeated measurements and calculation of relative standard deviations of 11 repeated measurements of 7.5×10^{-7} mol L^{-1} MTZ (RSD(11)$_{\text{m-AgSAE}}$ = 4.16 %) and 2.5×10^{-6} mol L^{-1} MTZ (RSD(11)$_{\text{p-AgSAE}}$ = 2.13 %), respectively, which confirms high repeatability. Applicability of the proposed method was verified by analysis of model solutions and repeated determinations. Obtained results, which are summarized in Table I, proved good repeatability and accuracy of the MTZ determinations – all of the relative standard deviations of five repeated determinations (RSD(5) are ≤ 6.00 %). The linear dynamic range could be measured in one analysis almost over two concentration ranges from 2.5×10^{-7} to 1×10^{-5} mol L^{-1} for both working electrodes. It is evident, that it was reached good sensitivity, which was confirmed by calculation of limit of detection (LOD$_{\text{m-AgSAE}}$ = 5.99×10^{-8} mol L^{-1} and LOD$_{\text{p-AgSAE}}$ = 7.5×10^{-8} mol L^{-1}). Finally, the proposed method was applied for determination of MTZ in samples with complicated matrices (spiked natural waters and herbicide preparation) with excellent results.

Table I.
Results of the repeated determinations of MTZ in model solutions using m-AgSAE and p-AgSAE.

	m-AgSAE		p-AgSAE	
Added, mol L^{-1}	Found, mol L^{-1}	RSD(5), %	Found, mol L^{-1}	RSD(5), %
2.50×10^{-6}	$(2.48\pm0.04)\times10^{-6}$	1.55%	$(2.47\pm0.03)\times10^{-6}$	1.05%
1.00×10^{-6}	$(1.01\pm0.01)\times10^{-6}$	1.36%	$(1.08\pm0.04)\times10^{-6}$	3.79%
7.50×10^{-7}	$(7.49\pm0.02)\times10^{-7}$	0.22%	$(7.51\pm0.03)\times10^{-7}$	0.33%
5.00×10^{-7}	$(4.85\pm0.29)\times10^{-7}$	6.00%	$(5.05\pm0.05)\times10^{-7}$	1.08%

Conclusion
Two modifications of AgSAE were examined for voltammetric analysis of the widely used herbicide MTZ. It was proved that both of the tested working electrodes are suitable for sensitive detection of MTZ and could serve as a reliable tool for determination MTZ even in samples with complicated matrices.

Acknowledgement
This work was supported by The Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project No. CZ.1.07/2.3.00/30.0021 "Strengthening of R&D Teams at the

University of Pardubice") and by the University of Pardubice (project No. SGSFChT_2015006).

References

1. Ludvík J., Riedl F., Liška F., Zuman P.: Electroanalysis *10*, 869 (1998).
2. http://www.epa.gov/oppfead1/endanger/litstatus/effects/metribuzin/metribuzin_analysis.pdf, Downloaded March 26th, 2015.
3. Pot V., Benoit P., Le Menn M., Eklo O.-M., Sveistrup T., Kværner J.: Pest. Mang. Sci. *67*, 397 (2011).
4. López-Pineiro A., Pena D., Albarrán A., Becerra D., Sánchez-Llrena J.: J. Environ. Manage. *122*, 76 (2013).
5. Parkera C.E., Degena G.H., Abusteitb E.O., Corbinb F.T.: J. Liq. Chromatogr. *6*, 725 (1983).
6. Papadakis E.N., Papadopoulou-Mourkidou E.: J. Chromatogr. A *962*, 9 (2002).
7. Huertas-Pérez J.F., del Olmo Iruela M., Garcia-Campana A.M., González-Casado A., Sánchez-Navarro A.: J. Chromatogr. A *1102*, 280 (2006).
8. Khanmohammadi M., Armenta S., Garrigues S., de la Guardia M.: Vib. Spectrosc. *46*, 82 (2008).
9. Shah J., Jan M.R., Ara B., Mohammad M.: J. Hazard. Mater. *164*, 918 (2009).
10. Skopalová J., Lemr K., Kotouček M., Čáp L., Barták P.: Fresen. J. Anal. Chem. *370*, 963 (2001).
11. Skopalová J., Navrátil T.: Chem. Anal. (Warsaw) *52*, 961 (2007).
12. de Andrade Lima A.C., da Silva E.G., Goulart M.O.F., Tonholo J., da Silva T.T., de Abreu F.C.: J. Braz. Chem. Soc. *20*, 1698 (2009).
13. Novotný L., Yosypchuk B.: Chem. Listy *94*, 1118 (2000).
14. Yosypchuk B., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. *39*, 189 (2009).
15. Bandžuchová L., Šelešovská R., Navrátil T., Chýlková J.: Electroanalysis *25*, 213 (2013).
16. Bandžuchová L., Šelešovská R.: Acta. Chim. Slov. *58*, 776 (2011).
17. Bandžuchová L., Šelešovská R. Navrátil T., Chýlková J.: *Moderní Elektrochemické Metody XXXIII, May 20th – May 24th, 2013*, Collection of Conference Proceedings (Navrátil T., Fojta M., Pecková K. eds.), p. 20.
18. Bandžuchová L., Šelešovská R., Navrátil T., Chýlková J., Novotný L.: Electrochim. Acta *75*, 316 (2012).
19. Šelešovská R., Bandžuchová L., Navrátil T.: Electroanalysis *23*, 177 (2011).
20. Šelešovská R., Bandžuchová L., Navrátil T., Chýlková J.: Electrochim. Acta *60*, 375 (2012).
21. Bandžuchová L., Šelešovská R.: *Modern Electrochemical Methods XXXI, May 23rd -27th, 2011*, Collection of Conference Proceedings (Navrátil T., Barek J. eds.), p. 20.
22. Janíková L., Šelešovská R.: Anal. Lett *accepted* (2015).
23. Bandžuchová L., Šelešovská R., Navrátil T., Chýlková J.: Electrochim. Acta *113*, 1 (2013).
24. Bandžuchová L., Šelešovská R., Chýlková J., Navrátil T.: *XXXIII Moderní Elektrochemicke metody, May 20th – 24th, 2013,* Collection of Conference Proceedings (Navrátil T., Fojta M., Pecková K. eds.), p. 9.
25. Šelešovská R., Janíková L., Chýlková J.: Monatsh. Chem. 146, 795 (2015)
26. Šelešovská R., Janíková L., Kadubcová M., Štěpánková M.: Anal. Lett. *accepted* (2015).

Unique Properties of Amalgam Electrodes
(Unikátní vlastnosti amalgámových elektrod)

Bohdan Josypčuk and Oksana Josypčuk
J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the AS CR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: josypcuk@jh-inst.cas.cz

Abstract
Depending on metal-mercury ratio and on the method of preparation amalgam can be: 1) solid compact; 2) paste; 3) liquid; 4) monocrystalline; 5) porous; 6) powdered. High potential of hydrogen overvoltage is observed on amalgam electrodes and it is comparable with one on Hg-electrodes. Another important benefit is the possibility to prepare amalgam electrode, detector or reactor of required size and shape. From amalgams have been prepared and tested many types of electrodes for batch and flow-through systems. The diversity of amalgam materials provides some unique electrochemical properties of electrodes, the most important of which are described in this paper.

Key words: Electrochemistry, Amalgam electrodes, Biosensors, Flow analysis, Amalgam tubular detector.

Úvod

Obecně amalgámy jsou sloučeniny rtuti a jednoho nebo více kovů. V závislosti na poměru kov-rtuť a způsobu přípravy amalgám může být 1) pevný kompaktní, 2) pastový, 3) kapalný, 4) monokrystalický, 5) porézní, 6) práškovitý. Všechny tyto druhy amalgámů se dají použít pro přípravu pracovních a referentních elektrod. Jestli kov tvořící amalgám je elektrochemický méně aktivní než rtuť (Ag, Au, Ir apod.), pak takový elektrodový materiál se svými vlastnosti velice podobá Hg. Amalgámy obsahující aspoň jeden kov elektrochemicky aktivnější než rtuť (Cu, Bi, Cd apod.) se spíše chovají jako elektrody z tohoto kovu. V obou případech se na amalgámových elektrodách (AE) pozoruje vysoký potenciál vylučování vodíku, který je srovnatelný s Hg-elektrodami [1].

Další důležitou výhodou amalgámů je možnost přípravy elektrody, detektoru nebo reaktoru požadovaného rozměru a tvaru. Doposud z amalgámů byly připravené a vyzkoušené:

1) vyleštěné pevné amalgámové elektrody (p-MeSAE, kde Me je Ag, Au, Ir, Cu, Bi a jiné) [1-5],
2) pevné AE pokryté rtuťovým meniskem m-MeSAE [1, 6-9],
3) pevné AE pokryté rtuťovým filmem MF-MeSAE [10, 11],
4) elektrody z monokrystalické nitě stříbrného amalgámu mc-AgSAE [12],
5) kompozitní AgSAE [13],
6) elektrody ze stříbrného pastového amalgámu AgA-PE [1, 14-16],
7) elektrody naplněné pastou z prášku AgSA a organického pojiva AgSA-PE [17],
8) tubulární detektory pro průtokové systémy [18-21],
9) porézní detektory z AgSA pro průtokové systémy,
10) referentní elektrody (kalomelová, merkursulfátová a merkuroxidová), kde kapalná rtuť byla nahrazená pevným, nebo pastovým amalgámem [22-24],
11) enzymatické minireaktory na bázi porézního amalgámu [20],
12) enzymatické minireaktory na bázi práškového amalgámu [18].

Povrch amalgámů se dá modifikovat anorganickými [25, 26], organickými [10, 27] a biologický aktivními látkami [1, 28-30], což podstatně rozšiřuje možností elektrochemických metod. Vysoká afinita amalgámů k síře dovoluje vytvářet na jejich povrchu monovrstvy thiolů a tvořit tak základ pro přípravu různých typů biosenzorů [10, 18, 20, 27]. Elektrody/detektory z pevných a pastových amalgámů jsou vhodné jak pro vsádkové uspořádání elektrochemické cely, tak i pro práci v průtokových systémech [1, 9, 18-21, 31]. Tak velká rozmanitost amalgámových materiálů poskytuje i některé unikátní elektrochemické vlastnosti elektrod, nejdůležitější z kterých budou popsány v tomto příspěvku.

Experimentální část

Voltametrická a amperometrická měření byla prováděna s využitím počítačového analyzátoru řízeného softwarem MultiElchem v. 3.0 (Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i.) a elektrochemického stojánku (Polaro-Sensors, Praha). Pro přípravu pracovních elektrod, detektorů a naplní minireaktorů byly použity různé druhy amalgámů. Jako referentní sloužila nasycená kalomelová elektroda připravená na základě stříbrného pastového amalgámu [14, 22]. Pomocnou elektrodou tvořil Pt drátek o průměru 1,0 mm a délce 15 mm. Měření byla prováděna při laboratorní teplotě. Pro přípravu roztoků byla použita voda redestilovaná v křemenné aparatuře. Všechny použité chemikálie byly čistoty p. a. nebo lepší.

Výsledky a diskuse

Rtuťové a amalgámové elektrody jsou nejvhodnější pro měření redukčních procesů vzhledem k vysokému přepětí vodíku. Široké potenciálové okno v oblasti negativních potenciálů dovoluje zaznamenávat na zmíněných elektrodách nejen *přímou redukci* analytu, ale i provádět *předběžnou akumulaci* vysoce elektronegativních kovů, nacházejících se v roztoku v podobě iontů. Podle našich zkušeností žádná jiná pevná kovová elektroda není vhodná pro práci s potenciály negativnější než –1200 mV. Na AE se dají redukovat a stanovovat kationty Zn^{2+} (cit. [32]), Mn^{2+} (cit. [33]), Fe^{3+} (cit. [1]), Ni^{2+} (cit. [34]) a taky anionty, např. IO_3^- (cit. [35]). Při všech těchto stanoveních je nutné provádět scan až k potenciálu –1500 mV a negativněji.

S meniskovou CuSAE lze měřit do +950 mV (cit. [33]) v alkalickém prostředí, nebo v roztoku 0,05 M $Na_2B_4O_7$ a tato vlastnost byla využita pro *oxidaci* Mn^{2+}. Stanovení manganu je založeno na oxidaci Mn^{2+} na málo rozpustný hydratovaný oxid manganičitý, který se akumuluje na elektrodě a při elektrochemické redukci poskytuje dobře definovatelný voltametrický pík. Po zjištění optimálního potenciálu akumulace (E_{ac} = +700 mV) byla změřena koncentrační závislost Mn^{2+}. První sada píků s potenciálem kolem +250 mV odpovídá redukci Mn^{4+} na Mn^{2+}. U potenciálu kolem –1500 mV jsou pozorovány píky redukce Mn^{2+} na Mn. Menisková CuSAE je nám jediná známá elektroda dovolující v jednom měřicím cyklu (potenciálové rozmezí od +800 mV do −1800 mV) uskutečnit následující procesy: $Mn^{2+} \rightarrow Mn^{4+} \rightarrow$ akumulace $Mn^{4+} \rightarrow Mn^{2+} \rightarrow$ Mn. V literatuře nebyla nalezena zmínka o možnosti využití amalgámové nebo rtuťové elektrody při potenciálech až do +950 mV.

Je známo, že zlato rozpuštěné ve rtuti tvoří s kadmiem, zinkem, indiem a jinými kovy málo rozpustné intermetalické sloučeniny, což vede ke snížení citlivosti stanovení těchto kovů. Srovnání m-AuSAE a m-AgSAE při *anodické rozpouštěcí voltametrii* (ASV) Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+} a Cu^{2+} ukazuje, že zinek a kadmium na elektrodě se zlatým amalgámem prakticky neposkytují píky jejich rozpouštění a proudová odezva olova a mědi je podstatně menší [4]. Tento experiment jasně naznačuje, že aplikace m-AuSAE pro stanovení nízkých koncentrací zmíněných kovů není vhodná a že přítomnost iontů zlata v analyzovaném roztoku může zásadním způsobem ovlivnit vlastnosti např. m-AgSAE. Na druhou stranu by se m-AuSAE mohla uplatnit v situaci, kde je nutné eliminovat vliv zinku a/nebo kadmia.

Průběh redukce kationtů železa na rtuťových elektrodách záleží na složení základního elektrolytu, pH roztoku a potenciálu akumulace. Při potenciálech kolem −1500 mV a negativnějších se vyloučené železo smáčí rtutí, proniká do hloubky rtuti a tvoří suspenze. Oxidace (rozpouštění) železa z tohoto stavu probíhá u potenciálu rozpouštění samotné rtuti. Je zřejmé, že popsané procesy se mohou uplatnit pro stanovení železa metodou ASV jen obtížně. Pevné elektrody neobsahující kapalnou rtuť vykazují podstatně menší přepětí vodíku než rtuť a většinou nejsou využitelné při vysokých negativních potenciálech. Vyleštěná stříbrná pevná amalgámová elektroda (p-AgSAE) má v zásaditém prostředí přepětí vodíku téměř stejné jako elektrody rtuťové, a proto byla vyzkoušena pro akumulaci železa [36]. Provedená studie ukázala, že p-AgSAE neobsahující kapalnou rtuť je vhodná pro ASV železa. Koncentrační závislost byla lineární v rozsahu 10–500 ppb Fe^{3+} (R = 0,9980); mez detekce 10,1 ppb (RSD = 6,7 %; N = 11).

Kov tvořící pevný amalgám na vyleštěné elektrodě (p-MeSAE) nebo rozpuštěný v menisku (filmu) na m-MeSAE (MF-MeSAE, AgA-PE) může způsobit nebo ovlivnit katalytický proces probíhající na elektrodě. *Katalytické vlastnosti* mědi jako součásti m-CuSAE byly testovány na oxidaci peroxidu vodíku v 0,1 M $NaClO_4$. Při polarizaci elektrody směrem k pozitivním potenciálům je na začátku oxidace mědi na Cu^+ patrný velký katalytický proud oxidace peroxidu vodíku vyvolaný působením Cu^+. Postupné vybublání kyslíku dusíkem vede ke snížení píku až do jeho vymizení. Pro srovnání byl proveden obdobný pokus na HMDE, kde se zmíněné katalytické efekty neprojevují.

V zásaditém prostředí (roztok tetraboritanu nebo hydroxidu sodného) lze pracovat na m-CuSAE i v kladné oblasti potenciálů vzhledem k vytvoření vrstvy oxidů na jejím povrchu, které zabraňují další oxidaci WE. V závislosti na potenciálu se měď elektrody může oxidovat do jedno-, dvou- nebo trojmocného stavu. Trojmocná měď se tvoří kolem +600 mV a katalyticky oxiduje alkoholy, cukry a další látky, které by se na jiných elektrodách oxidovaly buď při mnohem kladnějším potenciálu, nebo by se neoxidovaly vůbec. V našich experimentech při oxidaci ethanolu na m-CuSAE byly získány dobře vyvinuté píky (i když při značném proudu pozadí) a koncentrační závislost byla lineární v rozmezí 0,5–11 obj.% ethanolu (R = 0,9992).

Zavedení tubulárního detektoru (TD) z AgSA pro průtokové systémy podstatně zvýšilo reprodukovatelnost a spolehlivost měření, navíc se zjednodušila konstrukce elektrochemické cely [21]. Použití stříbrného amalgámu dovolilo pracovat při vysokých negativních potenciálech amperometrické detekce, při čemž se zpravidla zvyšuje i proudová odezva detektoru. Tak redukce (detekce) Zn^{2+} se prováděla při E_{det} = –1500 mV, Cd^{2+} při E_{det} = –1700 mV a 4-nitrofenolu při E_{det} = –1200 mV (cit. [21]). Voltametrické stanovení léku Lomustin se provádělo v průtokovém systému při scanu přesahujícím –1200 mV (cit. [19]).

Amalgámy se začaly uplatňovat i v přípravě biosenzorů, kde kovová rtuť je nevhodná kvůli mechanické nestabilitě rtuťové kapky. Zvlášť výhodnou kombinací se jevila konstrukce s tubulárním detektorem ze stříbrného pevného amalgámu a enzymatickým minireaktorem z porézního [20] nebo práškového AgSA [18]. Pro přípravu biosenzorů byly použitý enzymy: glukóza oxidáza, askorbát oxidáza, kataláza, lakáza a tyrozináza. Citlivost prvních dvou biosenzorů byla zvýšená dvakrát kvůli tomu, že se na amalgámovém TD nastavil detekční potenciál přesahující –1100 mV a tímto se dala provést 4-elektronová redukce kyslíku jako indikátoru enzymatické reakce.

Závěr

Při postupech, kde je nezbytná manipulace s pracovní elektrodou (např. práce v průtokových a chromatografických systémech, v mobilních laboratořích, v metodách AdTSV založených na akumulaci (adsorpci) analytu z jednoho roztoku a měření v jiném roztoku) jsou spolehlivější a pohodlnější pevné nebo pastové elektrody. V závislosti na poměru rtuť-kov(y) lze připravit kapalné, pastové nebo pevné amalgámové elektrody, jejichž povrch se může vhodným způsobem modifikovat. Pokud se zavede do amalgámu kov, který interaguje s analytem jinak než rtuť, podstatně se rozšíří možnosti elektrochemických měření. Na základě uvedených příkladů lze říci, že amalgámové elektrody dovolují v mnoha případech nejen nahradit HMDE, ale i vnáší nové a na jiných elektrodách dokonce neproveditelné možnosti.

Poděkování
Autoři děkují za finanční podporu GA ČR (projekty čís. P206/11/1638 a P208/12/1645).

Literatura

1. Yosypchuk B., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. *39*, 189 (2009).
2. Čížková P., Navrátil T., Šestáková I., Yosypchuk B.: Electroanalysis *19*, 161 (2007).
3. Fadrná R.: Anal. Let. *37*, 3251 (2005).
4. Yosypchuk B., Novotný L.: Crit. Rev. Anal. Chem. *32*, 141 (2002).
5. Novotný L., Yosypchuk B.: Chem. Listy *94*, 1118 (2000).
6. Cabalkova D., Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B.: Chem. Listy *103*, 236 (2009).
7. Barek J., Cabalkova D., Fischer J., Navrátil T., Peckova K., Yosypchuk B.: Environmental Chemistry Letters *9*, 83 (2011).
8. Peckova K., Navratil T., Yosypchuk B., Moreira J. C., Leandro K. C., Barek J.: Electroanalysis *21*, 1750 (2009).
9. Yosypchuk O., Karasek J., Vyskocil V., Barek J., Peckova K.: The Scientific World Journal *2012*, 1 (2012).
10. Yosypchuk B., Marecek V.: J. Electroanal. Chem. *653*, 7 (2011).
11. Yosypchuk B., Fojta M., Barek J.: Electroanalysis *22*, 1967 (2010).
12. Danhel A., Mansfeldova V., Janda P., Vyskocil V., Barek J.: Analyst *136*, 3656 (2011).
13. Yosypchuk B., Navrátil T., Lukina A. N., Pecková K., Barek J.: Chem. Anal. (Warsaw) *52*, 897 (2007).
14. Yosypchuk B., Sestakova I.: Electroanalysis *20*, 426 (2008).
15. Niaz A., Fischer J., Barek J., Yosypchuk B., Sirajuddin, Bhanger M. I.: Electroanalysis *21*, 1786 (2009).
16. Niaz A., Fischer J., Barek J., Yosypchuk B., Sirajuddin, Bhanger M. I.: Electroanalysis *21*, 1719 (2009).
17. Danhel A., Yosypchuk B., Vyskocil V., Zima J., Barek J.: J. Electroanal. Chem. *656*, 218 (2011).
18. Josypčuk O., Barek J., Josypčuk B.: Electroanalysis *26*, 1729 (2014).
19. Josypčuk O., Barek J., Josypčuk B.: Electroanalysis *26*, 306 (2014).
20. Josypčuk B., Barek J., Josypčuk O.: Anal. Chim. Acta *778*, 24 (2013).
21. Yosypchuk O., Barek J., Yosypchuk B.: Electroanalysis *24*, 2230 (2012).
22. Yosypchuk B., Barek J., Yosypchuk O.: Electroanalysis *23*, 2226 (2011).
23. Yosypchuk B., Novotný L.: Electroanalysis *16*, 238 (2004).
24. Yosypchuk B., Novotný L.: Chem. Listy *97*, 1083 (2003).
25. Jiránek I., Barek J., Yosypchuk B.: Chem. Listy *102*, 101 (2008).
26. Vaňková L., Maixnerová L., Čížek K., Fischer J., Barek J., Navrátil T., Yosypchuk B.: Chem. Listy *100*, 1105 (2006).
27. Josypčuk B., Fojta M., Yosypchuk O.: J. Electroanal. Chem. *694*, 84 (2013).
28. Večerková R., Hernychová L., Dobeš P., Vrba J., Josypčuk B., Bartošík M., Vacek J.: Anal. Chim. Acta *830*, 23 (2014).

29. Yosypchuk B., Fojta M., Havran L., Heyrovsky M., Palecek E.: Electroanalysis *18*, 186 (2006).
30. Kuchaříková K., Novotný L., Yosypchuk B., Fojta M.: Electroanalysis *16*, 410 (2004).
31. Danhel A., Shiu K. K., Yosypchuk B., Barek J., Peckova K., Vyskocil V.: Electroanalysis *21*, 303 (2009).
32. Yosypchuk B., Novotný L.: Chem. Listy *96*, 756 (2002).
33. Yosypchuk B., Novotný L.: Electroanalysis *15*, 121 (2003).
34. Yosypchuk B., Navratil T., Barek J., Peckova K., Fischer J. *Progress on Drinking Water Research,* (Lefebvre M. H., Roux M. M., Eds.). Nova Science Publishers. New York, 2008.
35. Yosypchuk B., Novotný L.: Electroanalysis *14*, 1138 (2002).
36. Yosypchuk B., Barek J.: Chem. Listy *103*, 284 (2009).

Electrochemical Biosensors Based on Silver Solid Amalgam for Analysis in Flow Systems (Elektrochemické biosenzory na bázi pevného stříbrného amalgámu pro analýzu v průtokových systémech)

Oksana Josypčuk [a,b], Jiří Barek [b], and Bohdan Josypčuk [a]

[a] J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of ASCR, v.v.i., Department of Biomimetic Electrochemistry, Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic,
E-mail: oksana.josypcuk@jh-inst.cas.cz

[b] Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, CZ-128 43 Prague 2, Czech Republic

Abstract

In this contribution, the construction and preparation of 3 types of flow amperometric enzymatic biosensors based on silver solid amalgam (AgSA) were presented. Two of them consist of the tubular detector and enzymatic reactor of porous or powdered AgSA. The third biosensor was constructed using polished AgSA electrode. Reactors and polished AgSA electrodes were modified with thiols or chitosan and different enzymes were covalently immobilized by suitable techniques. Prepared biosensors were used for determination of ascorbic acid, glucose, hydrogen peroxide, catechol, pyrogallol, dopamine and sarcosine in model samples and in same cases in the real samples.

Key words: Biosensor, Silver solid amalgam, Electrochemical detection, Flow analysis, Amperometry, Enzyme.

Úvod

V dnešní době si velkou pozornost zaslouží metody modifikace pracovních elektrod. Je to jednak díky snaze vylepšit jejich vlastnosti (selektivitu, citlivost) a jednak kvůli přípravě biosenzorů, které jsou nepostradatelné v klinických, environmentálních a dalších analýzách vyžadujících co nejvyšší selektivitu stanovení sledovaných analytů. Literatura nabízí celou řadu modifikačních technik v závislosti na typu modifikovaného povrchu (rtuť, uhlík, kovy, amalgámy, sklo,…), nebo chemických látek, kterými jsou povrchy modifikovány (mastné kyseliny, organokřemičitany, thioly apod.). Sloučeniny obsahující –SH skupinu (thioly, R–SH), nebo –S–S– skupinu (disulfidy, $R_1S{-}SR_2$) jsou schopny se samovolně adsorbovat na různé povrchy a tak vytvářet stabilní monovrstevní filmy (SAM – self-assembled monolayer) [1]. SAMy se běžně připravují ponořením substrátu do roztoku thiolu o řádově milimolární koncentraci. Využití amalgámových elektrod různých kovů pro formování thiolových monovrstev bylo poprvé studováno námi a popsáno v této publikaci [1].

Modifikace monovrstev umožňují přípravu nejrůznějších typů biosenzorů využívajících selektivních interakcí mezi analytem a sloučeninou představující biorekogniční elementem navázaný na povrch SAM. Takovou sloučeninou může být DNA, nebo RNA [2-4], enzym [5-7], protilátka [8,9], (strept)avidin, biotin [10] a jiné. Mezi elektrochemickými biosenzory jsou velmi rozšířené amprérometrické enzymatické biosenzory. V závislosti na enzymatické specifitě lze detekovat přímo jeden konkrétní analyt, nebo skupinu chemicky příbuzných analytů (=substrátů) s vysokou selektivitou. Tato jedinečná vlastnost dělá z enzymů mocné nástroje, které se dají využít při vývoji analytických detektorů. V práci představné v tomto příspěvku byl kladen důraz na ampérometrické biosenzory, kde jako biorekogniční elementy byly použity enzymy. První druh enzymatického biosenzoru se skládá ze dvou části – průtokového reaktoru, kde probíhá enzymatická reakce a z tubulárního průtokového detektoru [11], kde se měří zmenšení nebo nárůst koncentrace výchozí látky, nebo produktu dané enzymatické reakce. Reaktor i detektor jsou na bázi stříbrného pevného amalgámu, ale různého typu. Zatímco tubulární detektor je vyroben z kompaktního hladkého amalgámu, konzistence stříbrného pevného amalgámu v reaktoru je porézní [12], nebo prášková, což demonstruje široké možnosti amalgámu jako elektrodového materiálu. Porézní, nebo prášková konzistence výplně reaktoru zajišťuje velkou plochu a tím i větší množství imobilizovaného enzymu. Dva výše zmíněné biosenzory na bázi porézního a práškového reaktorů byly použity pro stanovení glukózy, askorbátu sodného, peroxidu vodíku, katecholu, pyrogallolu a dopaminu.

Druhý typ elektrochemického průtokového biosenzoru se skládá z klasické tužkové leštěné stříbrné amalgámové elektrody pokryté vrstvou chitosanu s imobilizovaným enzymem sarkozinoxidázou. Navázání enzymu bylo uskutečněno pomocí síťovacího činidla glutaraldehydu. Tento biosenzor byl rovněž určen pro analýzu v průtokovém systému, v daném případě pro průtokovou injekční analýzu s wall-jet celou.

U jedné ze skupin enzymatických biosenzorů se koncentrace výchozí látky, nebo produktu enzymatické reakce přímo měří na povrchu elektrody ampérometricky. Tak například, v naší práci jsme použili askorbatoxidázu (AscOx), glukozoxidádu (GOx), catalázu (Cat), lakázu (Lac) a tyrozinázu (Tyr). Během enzymatické reakce u AscOx, GOx and SOx se koncentrace substrátu (= analytu) stanovovala z poklesu koncentrace kyslíku, u Cat se vzrůstající koncentrace kyslíku a v případě Lac a Tyr z koncentrace tvořících se chinonů, které se následně redukovaly v detektoru.

Podobný postup byl aplikován pro navázání enzymu glukozoxidázy na povrch porézního stříbrného pevného amalgámu s monovrstvou kyseliny 11-merkaptoundekanové v reaktoru biosenzoru pro stanovení glukózy. Mezi rozličnými dostupnými proteinovými síťovacími činidly je nepochybně nejrozšířenější glutaraldehyd (1,5-pentanedial). Jedná se o symetrickou lineární molekulu se dvěma aldehydovými skupinami. Své uplatnění nachází v různých odvětvích například cytochemii [13], enzymatické a proteinových technologiích [14,15], imunochemii [16-18] a dalších. Reaguje s různými funkčními skupinami proteinů jako aminovými, thiolovými, fenolovými a imidazolovými kruhy [19].

Další technika kovalentního (nebo i nekovalentního) navázání je zachycení enzymu v polymerní gelové matrici. Pro tyto účely se používají přírodní polymery jako alginát, kolagen, celulóza, pektin nebo chitosan [20]. Tak například chitosan je jeden ze široce používaných imobilizačních matric. V negativní části potenciálového okna je chitosanová vrstva elektrochemicky neaktivní, a proto je možné vkládat elektrodový potenciál až –2.0 V, aniž by došlo k jejímu poškození. Navíc elektrolytická propustnost chitosanového hydrogelu umožňuje difúzi výchozím látkám a produktům enzymatické reakce k a od povrchu elektrody.

Experimentální část

Ampérometrická měření byla prováděna s využitím elektrochemického stojánku (Polaro-Sensors, Praha) a potenciostatu-galvanostatu PGSTST302N (ECO CHEMIE – METROHM AUTOLAB, Nizozemsko). Tubulární detektor a leštěná elektroda byly připraveny ze stříbrného pevného amalgámu, reaktory pak z porézního a práškového stříbrného amalgámu. Jako referentní sloužila nasycená kalomelová elektroda na základě stříbrného pevného amalgámu [21] (její potenciál je stejný, jako u klasické kalomelové elektrody), vůči níž jsou uváděny všechny hodnoty potenciálů. Pomocnou elektrodu tvořil Pt drátek o průměru 1,0 mm a délce 15 mm. Vzdušný kyslík NEbyl z roztoků odstraňován. Měření byla prováděna při laboratorní teplotě. Pro přípravu roztoků byla použita voda redestilovaná v křemenné aparatuře. Všechny použité chemikálie byly minimálně čistoty p. a.

Výsledky a diskuse

Nový průtokový ampérometrický enzymatický biosenzor pro stanovení glukózy se skládá ze dvou částí – průtokového reaktoru na bázi *porézního* pevného stříbrného amalgámu a tubulárního detektoru. Nejdříve porézní amalgám v reaktoru byl modifikován thiolem kyselinou 11-merkaptoundekanovou. Pak následovalo kovalentní navázání enzymu na thiolovou monovrstvu pomocí síťovacích činidel EDC a NHS. Pro náš experiment jsme vybrali enzym glukózoxidázu (GOx) jelikož patří mezi nejvíce stálé a prostudované enzymy. Celý proces přípravy biosenzoru zabírá přibližně 1 hodinu a 40 minut. V posledním kroku se porézní reaktor s GOx byl připojen před tubulární detektor. Takto vzniklý biosenzor byl pak spojen s námi navrženou a konstruovanou miniaturní skleněnou průtokovou celou. Relativní směrodatná odchylka 11 po sobě jdoucích nástřiků modelového vzorku glukózy ($c = 4{,}0 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}) byla 1,83 %. Pokud reaktor s navázaným enzymem nebyl používán, uchovával se v mobilní fázi při 4 °C. Výsledky sledování enzymatické stability během 35 dní ukázaly, že za tuto dobu enzym ztratil pouhých 23 % své aktivity. Kalibrační závislost modelového vzorku glukózy byla lineární v rozmezí $2{,}0 \cdot 10^{-5}$–$8{,}0 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} s limitem detekce $1{,}0 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3}. Nakonec byl biosenzor použit pro stanovení glukózy ve vzorku komerčně dostupného medu s deklarovaným obsahem glukózy 32–37 hmot. %. Pomocí naší optimalizované metody bylo zjištěno, že vzorek medu obsahoval 35,5±1,0 hmot. % (n = 7, RSD = 3,2 %), což dobře koresponduje s hodnotami deklarovanými výrobcem.

Zatímco předchozí biosenzor měl reaktor z *porézního* stříbrného pevného amalgámu, tento typ už má reaktor plněný *práškovým* stříbrným pevným amalgámem. Příprava práškového reaktoru zahrnovala v prvé řadě navázání monovrstvy 4-aminothiofenolu. Vybraný enzym byl následně kovalentně imobilizován na thiolové monovrstvě pomocí síťovacího činidla glutaraldehydu. Obecně amalgámový prášek může být regenerován a opakovaně používán pro přípravu nových biosenzorů s různými enzymy. Ve výsledku bylo připraveno 5 reaktorů s navázanými enzymy askorbatoxidázou (AscOx), glukozoxidázou (GOx), katalázou (Cat), tyrozinázou (Tyr) a lakázou (Lac). Koncentrace substrátů (= analytů) v modelových a reálných vzorcích byla pak stanovována ampérometricky v tubulárním detektoru za podmínek průtokové injekční analýzy z určení změny koncentrace kyslíku, nebo produktů enzymatické reakce. Proudová odezva každého biosenzoru byla optimalizována s ohledem na potenciál detekce, průtokovou rychlost mobilní fáze, dávkovací objem a objem reaktoru. Koncentrační závislost Asc–biosenzoru byla lineární v rozmezí 0,02 to $0{,}6 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} s limitem detekce $12 \cdot 10^{-6}$ mol dm^{-3}. Limity detekce glukózy, peroxidu vodíku, katecholu, pyrogallolu a dopaminu změřené na odpovídajících biosenzorech byly v rozmezí 0,51–14.10^{-6} mol dm^{-3}. Asc–biosenzor byl dále použit pro stanovení kyseliny askorbové ve vitamínových tabletách Celaskon®. Stanovená koncentrace kyseliny askorbové v jedné tabletě Celaskonu® byla 104,9 ± 2,2 mg (N = 9; SD = 2,9 mg; RSD = 2,8 %), což přímo koresponduje s deklarovanou hodnotou v příbalovém letáku (95–105 mg v 1 tabletě). Opakovatelnost měření každého biosenzotu byla vyhodnocena z 11 po sobě jdoucích nástřiků modelových roztoků příslušných analytů. Relativní standardní odchylky se pohybovaly v rozmezí 0,8 až 2,1 %, což poukazuje na dobrou opakovatelnost stanovení.

Poslední enzymatický biosenzor je konstrukčně odlišný od předchozích dvou. Skládá se z klasické tužkové elektrody na bázi leštěného pevného amalgámu pokryté vrstvou chitosanu, na které je imobilizován enzym sarkozinoxidáza pomocí síťovacího činidla glutaraldehydu. Celá příprava zabírá přibližně 3 hodiny, což je relativní krátká doba v porovnání s některými jinými biosenzory, kdy příprava může trvat až desítky hodin. Hotový biosenzor pak pracoval v ampérometrickém modu ve wall-jet uspořádání za podmínek průtokové injekční analýzy. Při enzymatické reakci dochází ke spotřebovávání kyslíku přítomného v mobilní fázi i ve vzorku. Tento úbytek kyslíku je přímo úměrný koncentraci sarcosinu ve vzorku a je měřen ampérometricky přímo na povrchu elektrody. Za optimálních podmínek (mobilní fáze [0,1 mol dm^{-3} fosfátový pufr; 0,001 mol dm^{-3} Na_2EDTA; pH 8,0], potenciál detekce –1,400 V, průtoková rychlost 0,10 ml min^{-1} a dávkovaný objem 100 µl) byla změřena koncentrační závislost sarkozinu v modelovém roztoku. Kalibrační křivka byla lineární v koncentračním rozmezí $7{,}5\cdot10^{-6}$–$5{,}0\cdot10^{-4}$ mol dm^{-3} s korelačním koeficientem $R^2 = 0{,}998$ a limitem detekce $2{,}0\cdot10^{-6}$ mol dm^{-3}. Biosenzor rovněž vykazoval dobrou opakovatelnost měření s RSD = 1,6 % 10 po sobě jdoucích nástřiků modelového roztoku sarcosinu o koncentraci $1\cdot10^{-4}$ mol dm^{-3}.

Závěr

Podle výsledků navržený reaktor plněný *práškovým* stříbrným pevným amalgámem je vylepšenou verzí reaktoru z *porézního* stříbrného pevného amalgámu. Na základě provedeného srovnávajícího experimentu, kdy v porézním i práškovém reaktoru byla imobilizována glukozoxidáza, bylo zjištěno, že citlivost práškového reaktoru byla 2–3× lepší než porézního. Výhodou porézních reaktorů je, že mohou být opakovaně a mohou v něm být imobilizovány různé enzymy. Obecně i amalgámový prášek může být regenerován a opakovaně používán pro přípravu nových biosenzorů s taktéž různými enzymy. Při detekci kyslíku a produktů enzymatické reakce hraje důležitou roli i tubulární detektor. Jednou z jeho hlavních předností je možnost provádění katodických měření při potenciálech až kolem –2 V (ve vodných roztocích). Také vykazuje dobrou dlouhodobou stabilitu – v naší laboratoři je aktivně používán již po dobu více jak dvou let a stále poskytuje stabilní odezvu s dobrou opakovatelností. Výhodou posledního typu biosenzoru je zase to, že je vhodný pro navázání enzymů s nižší aktivitou a dovoluje tak podstatně citlivější stanovení, v daném případě sarcosinu, než při použití reaktorů.

Poděkování

Autoři děkují za finanční podporu GA ČR (projekty P206/12/G151 a P206/11/1638).

Literatura

1. Yosypchuk B., Marecek V.: J. Electroanal. Chem., *653*, 7 (2011).
2. Ostatna V., Palecek E.: Langmuir, *22*, 6481 (2006).
3. Park J. Y., Kwon,S. H., Park J. W., Park S. M.: Anal. Chim. Acta, *619*, 37 (2008).
4. Park, J. Y., Lee Y. S., Chang B. Y., Kim, B. H., Jeon S., Park S. M.: Anal. Chem. *82*, 8342 (2010).
5. Saxena U., Chakraborty M., Goswami P.: Biosens. Bioelectron. *26*, 3037 (2011).
6. Villalonga R., Diez P., Yanez-Sedeno P., Pingarron J. M.: Electrochim. Acta *56*, 4672 (2011).
7. Mendes R. K., Carvalhal R. F., Kubota L. T.: J. Electroanal. Chem. *612*, 164 (2008).
8. Jarocka U., Wasowicz M., Radecka H., Malinowski T., Michalczuk L., Radecki J.: Electroanalysis *23*, 2197 (2011).
9. Rosales-Rivera L. C., Acero-Sanchez J. L., Lozano-Sanchez P., Katakis I., O'Sullivan C. K.: Biosens. Bioelectron. *33*, 134 (2012).
10. Ding S. J., Chang B. W., Wu C. C., Lai M. F., Chang H. C.: Electrochim. Acta *50*, 3660 (2005).
11. Yosypchuk O., Barek J., Yosypchuk B.: Electroanalysis *24*, 2230 (2012).

12. Josypčuk B., Barek J., Josypčuk O.: Anal. Chim. Acta *778*, 24 (2013).
13. Hopwood D.: Histochem. J. *4*, 267 (1972).
14. Walt D. R., Agayn V. I., Trac-Trends in Anal. Chem. *13*, 425 (1994).
15. Barbosa O., Ortiz C., Berenguer-Murcia A., Torres R., Rodrigues R. C., Fernandez-Lafuente R.: Rsc. Advances *4*, 1583 (2014).
16. Tanabe T., Shin M., Fujiwara K.: J. Biochem. *135*, 501 (2004).
17. Ikegaki N., Kennett R. H.: J. Immunol. Methods *124*, 205 (1989).
18. Charshamay D. E., Sewell D. L.: Am. J. Clin. Pathol. *85*, 357 (1986).
19. Habeeb A. F. S. A., Hiramoto R.: Arch. Biochem. Biophys. *126*, 16 (1968).
20. Datta S., Christena L. R., Rajaram Y.: 3 Biotech. *3*, 1 (2013).
21. Yosypchuk B., Novotný L.: Electroanalysis *16*, 238 (2004).

Noise Analysis of Ion Transfer Kinetics at the Micro Liquid/Liquid Interface

Oksana Josypčuk, Karel Holub, and Vladimir Mareček
J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the CAS, v.v.i., Dolejškova 2155/3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: Marecek@jh-inst.cas.cz

Abstract
Fluctuation analysis was utilized to determine the TEA ion transfer kinetics across the water/1,2-dichloroethane interface. The average value $k_s = 0.34$ cm s^{-1} is comparable with the previously reported value k_s = 0.2 cm s^{-1}, derived from electrochemical impedance spectroscopy experiments. The experimental approach utilizing a thick wall glass micro-capillary to fix the interface exhibits a very small stray capacitance value, proving this system to be suitable for determining the kinetics of the fast ion transfer across a liquid/liquid interface. Application of a method employing a small perturbation signal prevents polarization of the inner capillary surface by current flowing through the cell. The induced polarization of the capillary can affect ion concentration at the interface due to electroosmosis and thus make the kinetics data evaluation difficult or erroneous.

Key words: Noise analysis, Liquid/liquid interface, Ion transfer kinetics, Capillary, AC impedance.

Introduction

Random voltage fluctuations were used to characterize electrochemical processes at the micro-interface between two immiscible electrolyte solutions [1-3]. Main interest was paid to the low frequency range of the spectra exhibiting very high voltage fluctuations. The steep rise of the signal observed at low frequencies (<50 Hz) was explained by local micro-convections disturbing the concentration of ions at the interface [2, 3]. The calculated real impedance increase was not detected by the ac impedance technique, though the noise measurement could be viewed as a limiting case of the ac impedance measurement when the excitation signal approaches zero. However, in contrast to the noise measurement a dc potential is applied with ac impedance technique which can stabilize equilibrium conditions at the interface and a measured signal is related to the ac perturbation signal only.

In this paper we have used noise analysis to obtain information on the ion transfer kinetics. To improve resolution of the low magnitude - high frequency noise data, the high magnitude - low frequency part of the signal was eliminated using an analogue high-pass filter. This, together with high input impedance and low input capacitance of the pre-amplifier has enabled us to retrieve noise data with a sufficient accuracy in the frequency range from 60 Hz to 100 kHz. These data have been used to resolve the kinetics of TEA^+ transfer across the water/1,2-DCE interface and to compare them with the ac impedance results.

Experimental

Chemicals and cell

LiCl, tetraethylammoniumchloride (TEACl), tetrabutylammonium chloride (TBACl), tetrabutylammonium tetraphenylborate (TBATPB) were supplied by Fluka AG and used as received (reagent grade). Tetraethylammonium dicarbollylcobaltate (TEADCC) was prepared at the Institute of Inorganic Chemistry of the AS CR, v.v.i. Electrolyte solutions were prepared using deionized water (<0.1 µS, GORO system, Czech Republic) and 1,2-dichloroethane
(1,2-DCE, 99%, Penta).

A two electrode cell with the liquid/liquid interface supported at the tip of a silanised microcapillary with an open circuit potential of 0 V was used throughout:
Ag/AgCl/x mM LiCl +0.5 mM TEACl(w)/x mM TBATPB + 0.5 mM TEADCC(o)/x mM LiCl + 0.5 mM TEACl(w)/AgCl/Ag (1)
where x = 10 or 20. The capillary with orifice diameter of approximately 18 μm was prepared similarly as previously reported [4]. Instead of a grinding operation, the capillary was cut in a proper position.

Apparatus

Home-made low noise - high impedance input preamplifier equipped with a high-pass filter was constructed using operational amplifiers INA116 and OPA 2227 (Texas Instruments). The two-electrode cell (1) was connected to the differential inputs of INA116. The battery - operated preamplifier and the cell were placed in a double shielded (iron and copper) Faraday cage and separated from each other by copper shielding to avoid positive feedback. The preamplifier output was connected to the Dynamic Signal Analyzer HP 35665A (Hewlett Packard). FFT data were obtained in three frequency spans 0-1.6; 0-12.8 and 0-102.4 kHz, each with the 800 lines resolution. Each span was 100 times averaged. The square of the noise mean amplitude $V(f)$ is related to the real part of impedance Z_r by the Nyquist formula $V(f)^2 = 4kTZ_r\Delta f$, where Δf equal to 2, 16 and 128 Hz for the span 1.6, 12.8 and 102.4 kHz, respectively.

The noise apparatus was calibrated using the standard resistor R = 2.19 MOhm connected to the preamplifier inputs. The differential input capacitance C_i forms with the calibrating resistor R a parallel RC circuit whose impedance is decreasing with increasing frequency. The calculated real part of impedance Z_r of this circuit for C_i = 5 pF is plotted in Fig. 1, full line. Fitting of Z_r derived from the noise data to the resistor R value at mid frequencies (600 – 1600 Hz) yields the gain of the preamplifier G = 972 (59.75 dB), cf. Fig.1. The effect of the parallel input capacitance is negligible in this frequency range. A small difference between the noise data and the calculated Z_r at low and high frequencies is caused by a decrease of the preamplifier gain and is compensated in the evaluation of experimental data. The noise data used for evaluation of Z_r were corrected for the apparatus noise. The obtained experimental data $Z_r(f)$ were fitted using the program Mathcad +6, procedure genfit, to resolve circuit elements.

All measurements were carried out at ambient temperature of 295±2 K.

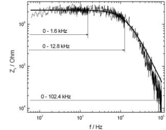


Fig. 1. Calibration of the noise apparatus. The thick line represents the real part Z_r of a parallel RC circuit impedance of the standard resistor R = 2.19 MOhm and capacitance C = 5 pF, calculated for the pre-amplifier gain 59.75 dB.

Results and discussion

The noise analysis data of the cell (1) for x = 10 are shown in Fig. 2. The curve *a* represents a fit to the noise data measured for the cell only filled with the aqueous phase, i.e. without a liquid/liquid interface. The electrical equivalent circuit used in a fitting procedure is composed of a parallel combination of the cell resistance *R* and capacitance *C*. At low frequencies below 3 kHz, the value of Z_r is constant and represents resistance of the cell R = 1.7 MOhm. The Z_r decrease at high frequencies is caused by a parallel capacitance *C* which amounts to 10 pF. It comprises the input capacitance of the preamplifier C_i = 5 pF and a stray capacitance of the cell C_s.

The thick full line in Fig. 2 represents a fit to the noise data *b* measured in the presence of a liquid/liquid interface. The noise data were fitted using a real part of the impedance Z_r of the equivalent circuit shown in the inset of Fig. 2 [3]. In contrast to the line *a*, the real part of the impedance is not constant at low frequencies, but increases with decreasing the frequency below 3 kHz. The impedance decrease at high frequencies, similar to line *a*, is analogously due to the parallel capacitance *C*, amounting in this case to 5.4 pF only. Results of the fitting procedure are shown in Table I.

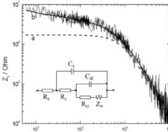


Fig. 2. Noise analysis of a micro-capillary cell: (a) filled only with the aqueous phase 0.01 M LiCl and 0.5 mM TEACl; (b) in the presence of the liquid/liquid interface, cell(1), base electrolyte concentration x = 0.01 M. The equivalent circuit used to fit the ac impedance and noise data is given in the inset.

The apparent standard rate constant k_s was calculated according to ref. [5]

$$k_S = \frac{RT}{AF^2 c_0 R_{ct}} \tag{2}$$

The area of the interface A was calculated from the Warburg coefficient σ using ref. [2]

$$\sigma = \frac{RT}{F^2 A\sqrt{2}}\left(\frac{1}{c_0\sqrt{D_w}} + \frac{1}{c_0\sqrt{D_o}}\right), \tag{3}$$

where D_w is the diffusion coefficient of TEA in water (9.3x10^{-10} m^2 s^{-1}) and D_o is the diffusion coefficient of TEA$^+$ in 1,2-DCE (1.1x10^{-9} m^2 s^{-1}), c_0 is the concentration of TEA$^+$ in both phases (1). The calculated radius r of the interface is shown in Table I

Table I.
Calculated parameters values from noise measurements using the equivalent circuit in the inset of Fig. 2. C_i is the input capacitance of the preamplifier (5 pF). k_s is the apparent standard rate constant, r is radius of the interface. The expected value of C_{dl} is calculated using the value of C_{dl} = 0.09 F m^{-2} and 0.1075 F m^{-2} for the base electrolyte concentration 0.01 and 0.02 M, respectively [7].

	0.01 M base electrolyte	0.02 M base electrolyte
$C_s + C_i$ /pF	6.3	11
C_{dl} /pF	14.3	41
R_c /MOhm	3.30	1.68
R_{ct} /MOhm	0.59	0.70
σ /MOhm s$^{1/2}$	113	77.1
k_s /cm s^{-1}	0.43	0.25
r /μm	8.16	9.89
C_{dl} expected /pF	19	33

The average rate constant value k_s = 0.34 cm s^{-1} corresponds to the value obtained previously [5] with the ac impedance spectroscopy technique. It is therefore evident that the ac impedance technique utilizing a small amplitude perturbation signal is comparable with a noise analysis and the both methods provide reasonable data on the ion transfer kinetics.

4. Conclusions

It has been shown for the first time that fluctuation analysis can serve as a reliable method for determination of kinetic parameters of the ion transfer across a liquid/liquid interface. The source of fluctuations is the real component of the impedance of the cell. In order to resolve all the individual components of the equivalent circuit, some of which act as passive elements, it is necessary to analyze a broad range of frequencies. However, at low frequencies below ca 50 Hz, a very high noise signal related to local micro-convections excludes their use for the ion transfer kinetic data determination. The use of high frequencies is on the other hand limited by a noise signal decrease resulting from a decrease of the overall impedance of the studied cell affected by a parallel stray capacitance.

In contrast to the ac impedance and fluctuation analysis techniques, the steady state voltammetry is not suitable for ion transfer kinetics determination when the size of the capillary is below one micrometer. The current flowing through the system causes polarization of the capillary surface layers which can induce an electroosmotic flow [6]. These results in an ion concentration change near the liquid/liquid interface located at the tip of the capillary and can cause an erroneous determination of the rate constant. With large capillary tip diameters exceeding a few micrometers, the induced electroosmotic flow effect is negligible, but these capillaries are not suitable for a fast ion kinetics determination using a steady state voltammetry technique.

Acknowledgement

We gratefully acknowledge funding from the Czech Science Foundation (project number 13-04630S).

References

1. Mareček V., Grätzl M., Pungor A., J. Janata: J. Electroanal. Chem. *266*, 239 (1989).
2. Mareček V., Lhotský A., Račinský S.: Electrochim. Acta *40*, 2905 (1995).
3. Mareček V., Lhotský A., Račinský S.: Electrochim. Acta *40*, 2909 (1995).
4. Silver B.R., Holub K., Mareček V.: Electrochim. Acta *110*, 801 (2013).
4. Wandlowski T., Mareček V., Holub K., Samec Z.: J. Phys. Chem. *93*, 8204 (1989).
5. Silver B.R., Holub K., Mareček V.: J. Electroanal. Chem. *731*, 107 (2014).
6. Silver B.R., Holub K., Mareček V.: Electrochim. Acta *156*, 316 (2015).
7. Samec Z., Mareček V., Holub K., Račinský S., Hájková P.: J. Electroanal. Chem. *225*, 65 (1987).

Selective Electrochemical Determination of Desipramine Using a Lipid Modified Carbon Paste Electrode

Mahmoud Khodari
Chemistry Department, Faculty of Science, South Valley University, Qena, Egypt,
E-mail: khodari@svu.edu.eg

Abstract
Carbon paste electrodes have been modified with some lipids for the sensitive and selective detection of the antidepressant (desipramine). Voltammetric experimental conditions were optimized taking into account the importance of quantifying desipramine in the complex media and in the pharmaceutical formulations. The sensor (lauric acid modified carbon paste electrode) responds to desipramine giving a cathodic current (at +0.88 V vs. Ag/AgCl electrode and pH 9). The response was characterized with respect to preconcentration potential, accumulation time, paste composition, possible interferences and other variables. A linear relationship between peak response and desipramine concentration over the range from $1x10^{-7}$ to $1x10^{-6}$ M. with standarad deviation of 5.5 %. A detection limit of $3.3x10^{-10}$ M was obtained under the optimum conditions. The method has been applied to the determination of desipramine in serum and urine samples.

Key words: Desipramine, Linear sweep voltammetry, Carbon paste electrode, Fatty acids, modifiers.

Introduction

The tricyclic antidepressants are the most widely used drug for treatment of depression and hence, their measurements in body fluids are of great interest in bioanalysis. Wang et al determined the sensitivity and selectivity of tricyclic antidepressants at carbon paste and lipid –coated glassy carbon paste electrodes [1,2], modified carbon paste electrodes were used for the determination of promethazine and other organic compounds based on the enhancement of the peak response [3-6], the use of carbon paste matrix is dictated by its interesting mechanical and electrochemical properties as well as by its ability to preconcentrate organic molecules [7-10]. To increase the sensitivity and selectivity of preconcentration step, variety of modifiers were incorporated into the carbon paste matrix also carbon printed electrodes were used for the determination of some anions [11,12].

Lipid–modified carbon paste electrodes were electrochemically characterized and their potentials for drug analysis with conventional carbon paste electrodes. The presence of lipids (Fatty Acids, Phospholipids) in the paste matrix enhanced the current Reponses with improved reproducibility. On using 300 s accumulation time, the tricyclic imipramine exhibit a 40-fold enhancement of the response compared to that obtained without accumulation [13], for desipramin some authors reported some sensors for determination of desipramine [14-15].

Instrumentation

Electrodes

Carbon paste was prepared by thoroughly hand mixing 2 g of graphite powder and 0.8 ml of paraffin oil in a mortar and pestle in a minimum amount of chloroform; the solvent was allowed to evaporate overnight at room temperature. Modified electrodes were prepared in a similar fashion except that the graphite powder was first mixed with a definite weight of the fatty acids. The working electrode s were prepared by pressing the paste into a tip of micropipette then polishing using clean paper (Fig. 1). A fresh surface was utilized for each experiment.

Fig. 1. Carbon paste Electrode modified with lauric a.cid

A computer-aided electrochemistry system was used in the voltammetric and amperometric studies. The system consists of a potentiostat Model 263A (EG&G PARC, Princeton Applied Research Corporation, USA) and Electroanalytical software Model 270/250 version 4.0 (PARC).

An Orion research model 601 digital ion analyzer pH-meter was used.

Procedures

25 ml of the selected supporting electrolyte was used and an experiment was carried out to record the base line. Then the analyte is added after suitable dilution. Using a scan rate of 50 mV/s and the other selected conditions

Results and discussions

The electrochemical oxidation of desipramine results in one irreversible anodic peak at lauric acid modified carbon paste electrode (LuMCPE) at potential of + 880 mV. Different analytical parameters such as pH, supporting electrolyte, paste composition, accumulation time and many other factors were investigated as following.

The effect of supporting electrolytes and the solution pH

Phosphate, sodium acetate and sodium borate were tested. A concentration of 0.1 M phosphate was selected which it gives the most favorable results in terms of signal versus backgrounds current From other hand, the results collected using solutions of different pH values ranged from 3.0 to 11.0, showed a little current enhancement in acidic media. A marked increase in response was observed at pH above 7.0 with a maximum value at pH equals 9.0 then a distorted peak with decreasing current was noticed at pH values higher than 9.0 as shown in Fig. 2.

Effect of accumulation time

From the resulting linear sweep voltammogram one can observes a rapid increase in the peak current intensity of desiramine as a function of deposition time with a maximum at 300 s. as shown in Fig. 3. This indicates an electrode process governed first by surface adsorption and subsequently by diffusion into the pasting liquid [16] as a function of

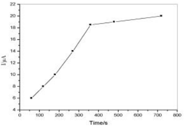


Fig. 2. The peak current response of 1 x 10-5 mol dm^{-3} at different accumulation times, scan rate of 50 mV, Phosphate buffer, pH = 9.0.

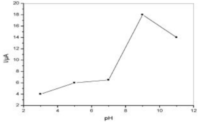


Fig. 3. Linear scan peak currents as a function of pH,[Dsipramine] = 1 x10^{-5} mol dm^{-3}, accumulation time 300s.

The effect of the paste composition

Different ratios of the modifier (lauric acid) were immobilized with the carbon paste ranged from 1 % to 10 %. The best response was obtained with 5 % lauric acid. Higher percentage than this ratio resulted a distortion of the peak shape.

Calibration curve

Quantitative work based on the dependence of peak current on the desipramine concentration. A linear behavior was observed over the range from 1 x 10^{-7} to 1 x10^{-6} M with correlation coefficient of 0.994 and sensitivity of 1.69 mA/mM.

Reproducibility
The reproducibility of the adsorption process has been estimated from five trials for two different concentration of desipramine (5 x 10^{-7} and 5 x 10^{-6} M). A standard deviation of 5.5 % was obtained.

Effect of possible interfering compounds
The potent interfering compound which can be present in biological samples is ascorbic acid. The effect of concentration up 10^{-7} M decreased the peak current of the presence of amino acid glycine, alanine and glutamic acid was investigated and a concentration of 1:1, interfering: desipramine showed no effect of desipramine peak response.

The Detection Limit.
The limit of detection was calculated based on S/N = 3, a value of 3.3 x 10^{-10} M which is better than the reported one [15].

Analytical application
The suggested method was applied to determine desipramine in biological media (urine and serum). The samples of urine were diluted in which 1.0 ml of urine completed to 10 ml using phosphate buffer pH 9.0, then different concentrations of desipramine were added and the voltammograms recorded, a recovery of 97.2 % was obtained.

The same procedures were followed for the determination of desipramine in serum samples and a recovery of 95.2 % was obtained.

Conclusion
A new carbon paste electrode modified with lauric acid or Stearic acid was used for the voltammetric determination of the tricyclic antidepressant drug desipramine, the method was applied for the determination of the drug in biological samples (urine and serum). On plotting desipramine versus the peak response a, a linear behavior was observed over the range from 1 x 10^{-7} to 1 x 10^{-6} M desipramine under the optimum conditions with a correlation coefficient of 0.9980. The collected results showed a good repeatability with standard deviation of 5.5 % and a detection limit of 3.3 x10^{-10} M was calculated.

References

1. Wang J., Banakdar M., Morgan C.: Anal. Chem. *58*, 1024 (1986).
2. Hernandez L., Gonzalez E., Hernandez P.: Analyst *113* (1988).
3. Patriarche G., Kauffmann J.M., Ghandour M., Khodari M.: Electroanalysis *1*, 501, (1989).
4. Hernandez L., Hernandez P., Sosa Z.: Fresenius J. Anal. Chem. 331, 1988 (525).
5. Hernandez L., Hernandez P., Blanco M.H.: Analyst *113*, 1719 (1988).
6. Hernandez L., Hernandez P., Lerenzo E.: Analyst *113*, 621 (1988).
7. Wang J., Frieha B.A.: Anal. Chem. *55*, 1285 (1983).
8. Chancy E., Baldwin R.: Anal. Chem. *54*, 2556 (1982).
9. Wang J., Bonakdar M., Morgan C.: Anal. Chem. *58*, 1024 (1986).
10. Zoulis N., Efstathiou C.: Anal. Chim. Acta 204, 201 (1988).
11. Khodari M.: Int. J. Sci. Res. *3*, 2278 (2014).
12. Khodari M., Bilitewski U., Basry A.: Electroanalysis, *in press*.
13. Khodari M., Mansour H., El-din H.S.: Anal. Lett. *30*, 1909 (1997).
14. Knihnicki P., Wieczorek M., Moos A., Sensor. Actuat. B-Chem., *189*, 37 (2013).
15. Sanghavia B.J., Srivastava A.K.: Analyst, *138*, 1395 (2013).
16. Wang J., Freiha B. A.: Bioelectrochem. Bioenerg. *12*, 255 (1984).

Influence of Electrode Preparation on Electrocatalytic Activityof Tetrapyridinoporphyrazinato Cobalt(II) Complex to Propylene

Monika Klusáčková [a, b], Pavel Janda [a], and Hana Tarábková [a]
[a] J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of ASCR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: monika.klusackova@jh-inst.cas.cz
[b] Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 6, CZ-128 43 Prague 2, Czech Republic

Abstract

The water-soluble complex *N,N',N'',N'''*-Tetramethyl-tetra-3,4-pyridinoporphyrazinocobalt (CoTmt-3,4-ppa) has been deposited by different techniques on two substrate. Electrochemical deposition, spontaneous adsorption, and spin coating have been used to the modification of two electrode material: annealed gold as hydrophilic substrate and highly oriented pyrolytic graphite as hydrophobic substrate. The modified electrodes have been characterized using cyclic voltammetry, backscattering VIS spectroscopy and atomic force microscopy. The influence of substrate material and modification techniques on electrocatalytic activity of CoTmt-3,4-ppa modified electrodes for propylene oxidation has been studied.

Key words: water-soluble phthalocyanine, electrocatalysis, propylene, cyclic voltammetry, atomic force microscopy, backscattering microscopy.

Introduction

Since their discovery in 1934 by Linstead, metallophthalocyanines and their derivatives have been widely used as dyestuffs. Now they are commonly applied as solar cells [1], in photodynamic therapy [2], optical data storage [3], and electrocatalysis [4]. The key factor that allows them to serve as mediators in many electron transfer reactions is their reversible redox chemistry, high thermal and chemical stability, ability to use almost any metallic elements in the central cavity, and easy modification by substitution of the benzene ring [5, 6, 7].

Phthalocyanine complexes adsorbed onto electrodes show better catalytic activity than when are used as homogeneous catalysts [8]. The water-soluble phthalocyanines are able to form films on different types of electrode substrates with significant electrocatalytic properties. This can be achieved in various ways such as electrochemical deposition, by drop casting and spin coating of phthalocyanine solution on the electrode. Another technique for preparation of modified electrode is mixing of the complex with carbon paste, but disadvantage of this method is necessity of large amounts of the complex.

Tetrapyridinoporphyrazines have similar structure as phthalocyanines except the benzene rings are replaced by pyridine rings. The complex CoTmt-3,4-ppa (Fig. 1) is soluble in water due to the positive charge localized on the porphyrazine cycle and shows a lower tendency to form aggregates in solution compared to other water-soluble phthalocyanine. CoTmt-3,4-ppa forms thin electrically conducting films on the electrode surface after reduction of the central metallic ion [5, 6].

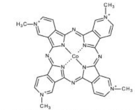


Fig. 1. Structure of *N,N′,N′′,N′′′*-tetramethyl-tetra-3,4-pyridinoporphyrazinocobalt

Propylene is of considerable industrial significance, used as an important source material and intermediate in the chemical industry. However, propylene represents also typical global air pollutants. The oxidation of propylene has been reported mainly on polycrystalline metal electrode such as platinum and gold [9, 10, 11]. These metals are resource-limited, expensive, and irreversibly inactivated by common trace impurities, and require high electrochemical potential for the oxidation of propylene. One way to resolve this problem is by modifying conventional electrodes with catalytic active complexes. Metallophthalocyanines are suitable candidates due to lowering potential of many reactions.

The presented work reports how the method of deposition and substrate affect electrocatalytic activity of modified electrode. This electrocatalytic oxidation of propylene in aqueous solution at laboratory temperature by electrode modified with thin layer of CoTmt-3,4-ppa complex was used.

Experimental

Materials

All materials were analytical grade and used without further purification. The water-soluble powder Co(II)Tmtppa$(CH_3SO_4)^{4-}$ was synthesized and purified by the group of Professor A. B. P. Lever from York University, Toronto, Canada according to [5]. Phosphate buffer was prepared by mixing 0.1 M solutions of NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4 (Merck, Germany) in distilled water and used as supporting electrolyte. Phosphoric acid and sodium hydroxide were used for pH adjustments. For all the measurements was used deionized water (Milli-Q system Gradient, Millipore, resistivity 18.2 MΩ cm).

Physical Measurements (Methods)

Voltammetry

Cyclic voltammetry (CV) experiments were performed using a three-electrode system controlled by the potentiostat/galvanostat Wenking POS 2 (Bank Elektronik, Germany) with CPC-DA software (Bank Elektronik, Germany). Highly oriented pyrolytic graphite (HOPG) 12 × 12 × 2 mm (HOPG ZYB Grade, Structure Probe Inc., USA) and gold Au(111) 12 × 12 × +/– 0,2 mm (Gold arrandee™/Au(111), Germany) were used as working electrode. Before each experiment, the surface of the HOPG electrode was cleaned by removing several layers of the surface using adhesive tape Scotch. Gold layer on glass substrate was flame annealed to obtain Au(111) terraces. Gold electrode was placed into the flame until dark red glowing. After cool down, this procedure was repeated three times. Saturated calomel electrode (SCE) and Pt wire served as reference and auxiliary electrode, respectively. All electrochemical measurements were carried out in 0.1 M phosphate buffer and deoxygenated by argon (6.0, Messer, Germany) at room temperature.

Backscattering VIS spectroscopy
The absorption spectra were measured by spectrometer OOI Base with Fiber Optic SD1000 (Ocean Optics, New Zealand) in the backscattering mode. The halogen lamp Fiber-Lite PL-800 (Dolan-Jenner, USA) was used as the source of irradiation with the range of 400-800 nm. The spectra were measured after backscattering from the electrode/solution interface. The spectra were recorded by the OOI Operating Base 1.52 (Ocean Optics, New Zealand) software package. All experiments were performed in the solution deoxygenated by argon 6.0 at room temperature.

Atomic Force Microscopy
The surface topography of modified electrodes was examined by *ex situ* atomic force microscopy Multimode Nanoscope IIIa (Veeco, USA) in utilizing tapping mode with silicon tip (OTESPA, 42 Nm^{-1}, 300 kHz, Veeco, USA). Atomic force microscopy (AFM) images was analysed by commercial Nanoscope III Software version5.12r5 (Veeco, USA).

Preparation of modified Electrode
Electrochemical deposition
Electrochemical deposition of CoTmt-3,4-ppa on the working electrode was performed by recording successive cyclic voltammetric scans in a potential range from – 0.8 to 0.1 V versus SCE in a pH 4.3 buffer solution containing 1×10^{-5} M CoTmt-3,4-ppa. The number of cycle was adjusted to obtain desired thickness of deposited layers.

Adsorption
The working electrode was modified by 60 min drop casting of 1×10^{-3} M CoTmt-3,4-ppa in a pH 4.3 buffer solution on electrode substrate. Excess solution was removed from the surface.

Spin coating
The film was formed by spin coating (500 rpm) of 1×10^{-3} M CoTmt-3,4-ppa solution in a pH 4.3 buffer. Excess solution is spun off the surface.

After completion of deposition techniques, the modified electrodes (labelled CoTmt-3,4-ppa/HOPG and CoTmt-3,4-ppa /Au) were further scanned in the buffer solution in the absence of CoTmt-3,4-ppa.

Results and Discussion
Firstly, the modified electrodes (labelled CoTmt-3,4-ppa/HOPG and CoTmt-3,4-ppa/Au) prepared by different methods were further characterized by cyclic voltammetry in the buffer solution. It was found that electrochemical behaviour and surface coverage of CoTmt-3,4-ppa electrode modified using same deposition conditions are affected by electrode substrate. Electrochemical results were completed by *ex situ* AFM that allows to better understanding of deposition process mechanism. AFM images and profile analysis show smoother nanomorphology of CoTmt-3,4-ppa/HOPG surface compare to CoTmt-3,4-ppa/Au. However, surface roughness parameters and thickness of deposited layers vary depending on the substrate used and the type of deposition method.

Further, the processes of the spontaneous adsorption and the electrochemical deposition of the complex CoTmt-3,4-ppa on electrode substrates was monitored by the *VIS* absorption spectroscopy in the backscattering mode. The process of deposition resulted in the spectral change consisted of the decrease in the sharp Q-band at 670 nm and the simultaneous formation of a new broad absorption band centred at 472 nm corresponding to reduction of the central metal and the formation of film on the electrode surface. The stability of films was monitored by spectral change in the buffer solution in the absence of CoTmt-3,4-ppa.

Finally, the electrocatalytic activity of CoTmt-3,4-ppa complex for oxidation of propylene was investigated. The cyclic voltammetry of aqueous solution saturated at laboratory temperature by propylene shows irreversible oxidation peak in potential range corresponding to electrooxidation of metal centre. The electrochemical measurement has been completed by in situ backscattering spectroscopy that confirms interaction of CoTmt-3,4-ppa with propylene at the wavelength corresponding to reduced central metal. It was found that the type of substrate and the method of preparing the modified electrode also affected the electrocatalytic activity of complex.

Conclusions

Electrochemical behaviour and electrocatalytic activity of CoTmt-3,4-ppa complex for oxidation of propylene is significantly affected by electrode modification technique and material of electrode substrate.

Acknowledgements

This work was financially supported by grant project SVV260205 of Charles University of Prague and the Grant Agency of the Czech Republic (Czech Science Foundation) (contract 14-14696S).

References

1. Walter M. G., Rudine A. B., Wamser C. C.: J. Porphyrins Phthalocyanines. *14*, 759 (2010).
2. Durmuş M., Ahsen V.: J. Inorg. Biochem. *104*, 297 (2010).
3. Lian K., Li R., Wang H., Zhang J., Gamota D.: Mater. Sci. Eng. B. *167*, 12 (2010).
4. Zagal J. H., Griveau S., Silva J. F., Nyokong T., Bedioui.: Coordin. Chem. Rev. *254*, 2755 (2010).
5. Tse Y. H., Janda P., Lever A. B. P.: Anal. Chem. *66*, 384 (1994).
6. Chen J., Zhang J., Tse Y. H., Janda P., Christendat, D., Lever, A. B. P.: J. Porphyrins Phthalocyanines. *10*, 1238 (2006).
7. Barrera C., Zhukov I., Villagra E., Bedioui F., Páez M. A., Costamagna J., Zagal J. H.: J. Electroanal. Chem. *589*, 212 (2006).
8. Thamae M., Nyokong T.: J. Electroanal. Chem. *470*, 126 (1999).
9. Bełtowska-Brzezinska, M., Łuczak, T., Baltruschat, H., and Müller, U.: J. Phys. Chem. B. 107, 4793 (2003).
10. Schmidt, V. M., and Pastor, E.: J. Electroanal. Chem. 401, 155 (1996).
11. Rodriguez, J. L., Pastor, E., and Schmidt, V. M.: J. Phys. Chem. B. *101*, 4565 (1997).

The Use of Selected Silver Amalgam Electrodes for a Potentiometric Indication of Technological Steps in Production of Demiwater
(Využití stříbrných amalgamových elektrod pro potenciometrickou indikaci technologických kroků ve výrobě demivody)

Ladislav Novotný, Veronika Kočanová, Petr Langášek, and Renáta Petráňková
University Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Environmental and Chemical Engineering, Studentská 573, CZ-532 10 Pardubice, Czech Republic,
E-mail: nvt.l@seznam.cz

Abstract
The article describes the use of selected silver amalgam electrodes for a potentiometric indication of a technological procedure in production of demineralized water for energetics. The obtained diagrams E vs. sequence of individual technological steps had a fairly characteristic course which remained preserved even during repeated measurements. Measurements using a silver electrode instead of silver amalgam electrodes did not provide satisfactory results under the same conditions.

Key words: Potentiometry, Silver amalgam electrodes, Demineralized water, Energetics.

Úvod
V oblasti průmyslového využití speciálně čistých vod zaujímají významné místo výroba demineralizované vody (zkráceně demivody). Příkladem toho je oblast energetiky [1], využívající velká množství demivody jakožto základního pracovního media. Při její výrobě se osvědčilo využití sekvence jednotlivých technologických kroků, počínaje výchozí úpravou surové vody SV (například sedimentací ap.) přes vodu upravenou pomocí čiření a filtrace VČF, pomocí katexu VK, dále anexu VA až po vodu uchovávanou v zásobníku před použitím MIX. Součástí její výroby bývají požadavky na kontrolu (indikaci) správné sekvence zmíněných jednotlivých technologických kroků, jakož i případné zachycení změn v kvalitě uvedených operací například v důsledku zhoršování účinnosti a postupné degradace použitých iontoměničů. Doposud se pro uvedený typ kontroly využívá zpravidla konduktometrie aplikovaná v odebraných vzorcích, po jejich vybublání inertním plynem. Rostoucí požadavky na uplatňování průběžné kontroly si však vyžadují mít pro kontrolní účely alespoň dvě operativní metody využívající nezávislé principy měření. Informace poskytované těmito metodami by se při tom nemusely jen překrývat, ale mohly by se i vzájemně doplňovat.

Předběžné výsledky ukázaly, že mezi nadějné možnosti řešení těchto problémů lze zahrnout využití potenciometrie na amalgamových elektrodách, například v přítomnosti stříbrných iontů [2]. Současně jde o možnosti dalšího uplatnění nové generace amalgamových elektrod, které byly v uplynulých dvou desetiletích poměrně široce využívané pro voltametrická měření [3-6], popřípadě speciálních amalgamových elektrod podobného typu [7,8].

Experimentální část
Sledované vzorky vod z jednotlivých technologických kroků výroby demivody pocházely z JE Dukovany. Jako katex byl při tom použit Lewatit S 100 (firmy Lanxess). Anexová kolona obsahovala slabě bazický Lewatit MonoPlus MP a silně bazický Lewatit MonoPlus M (firmy Lanxess). Pro potenciometrická měření bylo využito uspořádání využívající potenciometrický blok polarografu PA4 (Laboratorní přístroje, Praha) s laboratorně upravenou impedancí. Jako referentní sloužila upravená referentní elektroda Ag/AgCl/3 M KCl (Elektrochemické detektory, Turnov), se solným můstkem obsahujícím 0,1 M KNO_3. Pro

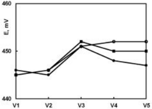
přípravu roztoků byla použita demineralizovaná voda o vodivosti nižší než 0,1 μS/cm. Použité chemikálie ($AgNO_3$, KNO_3 ad.) byly čistoty p.a. Součástí měření bylo i experimentální uspořádání s nádobkou a stojanem Eco-Tribo polarografu (ECO-TREND PLUS, Praha). Pro měření v nepřítomnosti vzdušného kyslíku bylo aplikováno bublání žárovkovým dusíkem čistoty 99,99 % po dobu cca 5 minut.

Výsledky a diskuse

Bylo předpokládáno, že se u sledované technologie charakter složení výchozí surové vody (SV) z dlouhodobého hlediska mění relativně málo a že i další výstupy z její úpravy jak čiřením a filtrací (VČF), tak katexem (VK) a následně anexem (VA) probíhají v režimu ustálených operací s omezenou variabilitou množství i druhu složek obsažených ve vodě po jednotlivých technologických krocích.

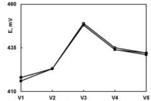
Bylo proto třeba počítat s přítomností souboru kationtů alkalických kovů, alkalických zemin, těžkých, barevných a dalších kovů či prvků s anionty obsahujícími síru, halogenidy, dusík nebo další prvky, a dále s nabitými i nenabitými organickými složkami. V rámci toho byla předpokládána i přítomnost produktů postupné degradace iontoměničů. Vlastní měření byla prováděna v nádobce s roztokem vzorku, do něhož byla zasunuta laboratorně zhotovená měrná pevná stříbrná amalgamová elektroda AgSAE, v provedení plastové špičkové PS („plastic tip“) [7-9] elektrody PS či PT-AgSAE nebo stříbrná disková PS či PT-Ag-elektroda se zasunutým stříbrným drátem a se zbroušeným a vyleštěným ústím. Vedle toho byly do roztoku zavedeny referentní elektroda Ag/AgCl, míchadlo a přívod inertního plynu (N_2) pro odstraňování rozpuštěného vzdušného kyslíku z roztoku bubláním.

V posloupnosti odpovídající technologii úpravy surové vody SV, přes vodu VČF, dále VK, VA až po vodu v zásobníku MIX byly odebrány příslušné vzorky. Do 10 ml každého měřeného vzorku v měrné nádobce byl přidán 0,1 ml 1 M $AgNO_3$. Poté byl každý měřený roztok vybublán po dobu 5 minut dusíkem a nato změřen potenciál jak AgE, tak AgSAE vs. Ag/AgCl. Do diagramů byly vyneseny výsledky opakovaných měření E pro jednotlivé vzorky vody SV (*V1*), VČF (*V2*), VK (*V3*), VA (*V4*) a MIX (*V5*), odděleně pro AgE (viz obr. 1) a AgSAE (viz obr. 2).



Obr. 1. Potenciometrická odezva stříbrné elektrody (AgE) vzorků vod odebraných v jednotlivých etapách výroby demivody, po přídavku 0,01 M $AgNO_3$. V1 – SV; V2 – VČF; V3 – VK; V4 – VA; V5 – MIX. Pořadí 3 následujících měření: ●; ○; ■.

Průběh diagramů na obr. 1 ukazuje, že výsledky měření pomocí AgE byly poměrně málo citlivé a často nejednoznačné. Výrazně též závisely na mechanické úpravě jejího povrchu i na tom, jak často byla prováděna. Odlišný průběh diagramů přinesla měření na AgSAE (obr. 2). Průběh závislostí E vs. Vi vykazoval dobrou reprodukovatelnost a zůstával zachován i v případě dlouhodobé práce a při použití různých AgSAE, kus od kusu. Pozorována byla rovněž relativně malá citlivost charakteru E vs. Vi na mechanické obnovování elektrody.



Obr. 2. Potenciometrická odezva stříbrné amalgamové elektrody (AgSAE) vzorků vod odebraných v jednotlivých etapách výroby demivody, po přídavku 0,01 M $AgNO_3$. V1 – SV; V2 – VČF; V3 – VK; V4 – VA; V5 – MIX. Trojice diagramů po sobě následujících 3 měření. Pořadí změřených diagramů: ●; ○; ■.

Za stejných podmínek byly změřeny obdobné diagramy elektrické vodivosti κ na Vi, které vykazovaly podobný charakter průběhu jako E vs. Vi na AgSAE. Porovnáním odpovídajících hodnot κ a E resp. vyhodnocením korelace mezi těmito veličinami byly získány korelační koeficienty, jejichž hodnota se pohybovala okolo $R = 0,98$.

Závěr

Provedená měření ukázala možnost využití stříbrné amalgámové elektrody pro potenciometrické sledování sekvence příslušných technologických kroků výroby demivody. Získané výsledky korelovaly s dosud využívaným konduktometrickým sledováním zmíněné technologie. Opakovaná měření umožňují další rozšíření aplikovatelnosti, optimalizaci a zjednodušení popsaného způsobu měření.

Poděkování

Tato práce vznikla s podporou projektu č. MSM č. SGSFChT_2015006.

Literatura

1. Langášek P, v knize *Chemie v JE VVER 440* (Machař L., ed.), kap. 1., Sekce jaderných elektráren ČEZ, Praha 1999.
2. Novotný L.: Úřad průmyslového vlastnictví Praha, PV/PUV 2006-600/30527 (2006).
3. Novotný L., Yosypchuk B: Chem. Listy *94*, 1118 (2000).
4. Yosypchuk B., Novotný L.: Crit. Rev. Anal. Chem. *32*, 141 (2002).
5. Barek J., Fischer, Navrátil T., Pecková K., Yosypchuk B., Zima J.: Electroanalysis *19*, 2003 (2007).
6. Yosypchuk B., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. *39*, 189 (2009).
7. Novotný L.: *XXIX. Moderní elektrochemické metody, Jetřichovice, 25. 5. – 29. 5. 2009*, Sborník přednášek (BEST Servis Ústí nad Labem, ed.), str. 82.
8. Novotný L.: Úřad průmyslového vlastnictví Praha, PUV 2007-19501 (2007).
9. Novotný L.: Electroanalysis *12*, 1240 (2000).

Voltammetric Determination of Fenitrothion in Water Samples Using a Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode

Zuzana Krejčová, Jiří Barek, and Vlastimil Vyskočil
Charles University in Prague, Faculty of Science, University Research Centre UNCE „Supramolecular Chemistry", Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, CZ-128 43 Prague 2, Czech Republic,
E-mail: krejco11@natur.cuni.cz

Abstract
A mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode (m-AgSAE) was used for the first time for the determination of submicromolar concentrations of fenitrothion. The medium of ethanol – Britton-Robinson (BR) buffer of pH 7.0 (9:1 *V*/*V*) was chosen as the optimal one. The newly developed direct current (DC) and differential pulse (DP) voltammetric methods are fast, reliable, and robust. Moreover, the applicability of the DP voltammetric method was verified for determination of fenitrothion in spiked samples of drinking and river water, with the limits of quantification in the concentration order of 10^{-7} mol L^{-1}.

Key words: Fenitrothion, Voltammetry, Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode, Drinking Water, River Water.

Introduction
Fenitrothion [*O*,*O*-dimethyl *O*-(3-methyl-4-nitrophenyl)phosphorothioate], which effectively acts against various insects who damage agricultural goods, such as cereals, cotton, rice, or forest crop, belongs to the worldwide used organophosphorus insecticides [1]. Fenitrothion irreversibly inactivates acetylcholinesterase that can cause neuromuscular paralysis [2]. Although fenitrothion degrades rapidly in the environment, its small amounts can be detected in food and drinking water [3]. Thus, humans may be exposed to sublethal concentrations of the insecticide for an extended period of time and, consequently, may be affected by health problems [4].

Therefore, monitoring of fenitrothion is essential. Recently, many analytical methods of fenitrothion detection have been developed, including gas chromatography [5, 6] coupled with mass spectrometry [7] or liquid chromatography [8] hyphenated with mass spectrometry [9]. Voltammetric methods present fast and inexpensive alternative to conventional methods [10, 11]. Moreover, the voltammetric methods enable to estimate and predict the conformational changes of DNA caused by pesticides [4, 12-14].

The main purpose of this work was to develop voltammetric methods for determination of fenitrothion at a mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode (m-AgSAE), which is possible due to easily reducible nitro group in fenitrothion structure (Fig. 1). The second aim was to verify the applicability of these new methods for model environmental samples.

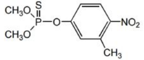


Fig. 1. Structural formula of fenitrothion.

Experimental

The fenitrothion stock solution (1×10^{-3} mol L^{-1}) was prepared by dissolving an accurately weighed amount of fenitrothion (CAS registry number: 122-14-5; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in ethanol and stored in a dark place at 4 °C. Its stability was monitored by UV-Vis spectrophotometer Agilent 8453 driven by UV-Visible Chemstation 9.01 software (both Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Working solutions were prepared freshly before use by exact dilution of the stock solution with ethanol. The Britton-Robinson buffer solutions (pH 2.0-12.0) were prepared in a usual way. Hydrochloric acid of 0.1 mol L^{-1} was used as a supporting electrolyte of pH 1.0, sodium hydroxide of 0.1 mol L^{-1} was used to obtain a solution of pH 13.0. A solution of 0.2 mol L^{-1} potassium chloride was used for the m-AgSAE activation. All reagents were p.a. grade (Lach-Ner, Neratovice, Czech Republic).

All voltammetric measurements were performed using an Eco-Tribo Polarograph (running with Polar Pro 5.1 software, Polaro-Sensors, Prague, Czech Republic) with a m-AgSAE working electrode, a platinum wire counter electrode, and Ag|AgCl (3 mol L^{-1} KCl). The DPV parameters were as follows: a pulse amplitude −50 mV and a pulse width 100 ms, with current sampling for the last 20 ms. Scan rate 20 mV s^{-1} was used for both DCV and DPV. Before starting voltammetric measurements, oxygen was removed from the measured solutions by purging with nitrogen (purity 4.0, Linde, Prague, Czech Republic) for 300 s. At firsr, the working electrode had to be electrochemically activated in stirred 0.2 mol L^{-1} KCl at –2200 mV for 300 s. Before recording each voltammetric curve, an electrochemical regeneration of the m-AgSAE based on 150-times switching the electrode potential between an initial (E_{1reg}) and final (E_{2reg}) regeneration potential for 0.1 s took place. The Origin Pro 8.0 software (OriginLab Corporation, Northampton, USA) was used for an estimation of all parameters of calibration curves and for construction of graphs.

Results and Discussion

At first, the pH influence of BR buffers on voltammetric behavior of fenitrothion was studied by means of DCV and DPV. In acid and neutral media, fenitrothion yielded only one well-shaped wave/peak, corresponding to the four-electron reduction of the nitro group to the hydroxylamino moiety. Peak potential (E_p) was monotonously shifted toward less negative values with increasing pH. In alkaline medium, an additional signal appeared due to the lower concentration of H^+. Thus, the nitro group did not undergo to the reduction so easily as in lower pH and reduction was divided into two steps [15]. With respect to the substance decomposition in alkaline medium, ethanol – BR buffer of pH 7.0 (1:9 *V*/*V*) was chosen as the optimal medium. Passivation of the working electrode surface is a common problem of solid electrodes. Therefore, appropriate regeneration potentials were sought. After application of 0 mV as an initial regeneration potential (E_{1reg}) and –1450 mV as a final regeneration potential (E_{2reg}), a relative standard deviation decreased from 4.0% to 2.5%. The found optimal conditions were used for measuring calibration dependences in the concentration range from 0.6 to 100 µmol L^{-1} using DCV as well as DPV. The parameters of calibration curves are shown in Table I.

The mixture of deionized water and BR buffer (9:1 *V*/*V*) was used to provide a step between determination of fenitrothion in the ethanol – BR buffer medium and in model water samples. In the non-ethanolic supporting electrolyte, it was possible to evaluate the voltammetric signals of fenitrothion at lower concentrations than in the ethanolic – aqueous medium. This became due to the fact that ethanol, whose addition was necessary because of a limited solubility of fenitrothion in water at its higher concentrations, reduced voltammetric signals. The practical applicability of the newly developed method was verified by the direct DPV determination of fenitrothion in model samples of drinking (Fig. 2) and river water. Calibration curves were measured using a mixture of 9.0 mL of a spiked water sample and 1.0 mL of the BR buffer of pH 7.0, and their parameters are summarized in Table I.

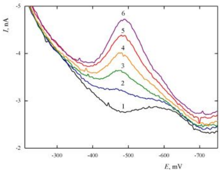


Fig. 2. DP voltammograms of fenitrothion in spiked drinking water – BR buffer of pH 7.0 (9:1) at the m-AgSAE at polarization rate 20 mV s^{-1}; E_{1reg} = 0 mV, E_{2reg} = −900 mV. Concentrations of fenitrothion: 0 (1), 0.2 (2), 0.4 (3), 0.6 (4), 0.8 (5), and 1.0 (6) μmol L^{-1}.

Table I.
Parameters of the calibration straight lines for the determination of fenitrothion using DCV and DPV at the m-AgSAE. Samples of deionized, drinking, and river water were measured in the mixture of model water sample – BR buffer of pH 7.0 (9:1).

Sample	Method	Concentration (mol L^{-1})	Slope (nA L μmol^{-1})	Intercept (nA)	Correlation Coefficient	*LOQ* (mol L^{-1})
Ethanol – BR buffer of pH 7.0 (1:9)	DCV	$(2\text{-}10)\times10^{-5}$	−1.64	−25.26	−0.9933	–
		$(2\text{-}10)\times10^{-6}$	−1.72	−3.73	−0.9920	3.0×10^{-7}
		$(6\text{-}10)\times10^{-7}$	−1.54	−0.55	−0.9986	
	DPV	$(2\text{-}10)\times10^{-5}$	−1.30	−13.93	−0.9900	–
		$(2\text{-}10)\times10^{-6}$	−1.72	−3.20	−0.9920	–
		$(6\text{-}10)\times10^{-7}$	−5.60	2.17	−0.9902	3.7×10^{-8}
Deionized water	DPV	$(2\text{-}10)\times10^{-6}$	−1.48	0.01	−0.9994	–
		$(2\text{-}10)\times10^{-7}$	−1.45	0.17	−0.9994	5.9×10^{-8}
Drinking water	DPV	$(2\text{-}10)\times10^{-6}$	−2.04	0.88	−0.9994	–
		$(2\text{-}10)\times10^{-7}$	−1.20	0.16	−0.9955	1.0×10^{-7}
River water	DPV	$(2\text{-}10)\times10^{-6}$	−1.26	0.64	−0.9999	–
		$(2\text{-}10)\times10^{-7}$	−0.86	0.09	−0.9991	1.5×10^{-7}

Conclusions

Direct current (DC) and differential pulse (DP) voltammetric methods at a mercury meniscus modified silver solid amalgam working electrode (m-AgSAE) were developed for the determination of fenitrothion. A medium of ethanol – Britton-Robinson (BR) buffer of pH 7.0 (9:1 *V/V*) was chosen as the optimal one. The calibration curves were measured in the concentration range from 0.6 to 100 μmol L^{-1}, with the limits of quantification (*LOQs*) of 300 nmol L^{-1} for DC voltammetry and 37 nmol L^{-1} for DP voltammetry. The practical applicability of the newly developed DP voltammetric methodology was verified for the direct determination of fenitrothion in spiked model samples of drinking and river water in the concentration range from 0.2 to 10 μmol L^{-1}, with the *LOQs* of 0.10 μmol L^{-1} and 0.15 μmol L^{-1}, respectively.

Acknowledgements

This research was carried out within the framework of the Specific University Research (SVV 260205). Z. Krejčová thanks the Grant Agency of the Charles University in Prague (Project 140214/2014/B-CH/PrF) and J. Barek and V. Vyskočil thanks the Grant Agency of the Czech Republic (Project P206/12/G151) for the financial support.

References

1. Rougier N. M., Vico R. V., de Rossi R. H., Bujan E. I.: J. Phys. Org. Chem. *27*, 935 (2014).
2. Deng N., Ni Y., Kokot S.: Chin. J. Chem. *28*, 404 (2010).
3. Lijuan Z., Faqiong Z., Baizhao Z.: Biosens. Bioelectron. *62*, 19 (2014).
4. Ahmadi F., Jafari B.: Electroanal. *23*, 675 (2011).
5. Sapbamrer R., Hongsibsong S.: Arch. Environ. Contam. Toxicol. *67*, 60 (2014).
6. Zuin V. G., Yariwake J. H., Bicchi C.: J. Chromatorg. A *985*, 159 (2003).
7. Baroja O., Unceta N., Sampedro M. C., Goicolea M. A., Barrio R. J.: J. Chromatogr. A *1059*, 165 (2004).
8. Sanchez-Ortega A., Sampedro M. C., Unceta N., Goicolea M. A., Barrio R. J.: J. Chromatogr. A *1094*, 70 (2005).
9. Hernandez F., Sancho J. V., Pozo O. J.: J. Chromatogr. B *808*, 229 (2004).
10. Barek J., Peckova K., Vyskocil V.: Curr. Anal. Chem. *4*, 242 (2008).
11. Krejcova Z., Barek J., Vyskocil V.: Electroanal. *27*, 185 (2015).
12. Ibrahim M. S.: Anal. Chim. Acta *1*, 443 (2001).
13. Ni Y., Wang P., Kokot S.: Biosens. Bioelectron. *38*, 245 (2012).
14. Erdem A., Ozsoz M.: Electroanal. *14*, 965 (2002).

Determination of Metallothioneins in the Liver of Small Terrestrial Mammals, Living at Hazardous Element Contaminated Sites
(Stanovení metalothioneinů v játrech drobných zemních savců, volně žijících na lokalitách kontaminovaných rizikovými prvky)

Daniela Křívská [a] and Ivana Šestáková [b]

[a] Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6, Czech Republic, E-mail: krivska@af.czu.cz

[b] J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of ASCR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic

Abstract

Animals living in the contaminated areas are exposed to elevated concentrations of risk elements. Příbramsko is one of most contaminated sites in Czech Republic. This area is loaded with sources of geological and metallurgical industry influence resulting in extremely high Pb, Cd, and Zn contents in soil. We analyzed eighteen subjects trapped on selected locations around Kovohutě Pribram, belonging to the species *Apodemus sylvaticus* and *Microtus arvalis*. By differential pulse voltammetry and modified Brdička reaction were measured concentrations metallothionein (MT) in their livers. Differences of concentrations between measured MT contents were found between species and among places of trapping.

Key words: small terrestrial mammals, trapping, Příbram region, Litavka valley, metallothionein.

Úvod

Příbramsko patří mezi nejvíce znečištěné oblasti České republiky [1]. Kontaminace nánosové půdy v údolí, kterým protéká Litavka, pochází z několika zdrojů. Rizikové prvky jsou zde zastoupeny v půdě a geologickém podloží (As, Zn, Cd, Pb). Ke kontaminaci také dochází vlivem atmosferické depozice rizikových prvků při těžbě a zpracování kovových rud (Kovohutě Příbram, a. s.) [2]. Dalším zdrojem je kontaminovaná voda vytékající z odkalovací nádrže v blízkosti kovohutí. V důsledku jejího poškození několikrát došlo k zaplavení části území u obce Trhové Dušníky [1]. Z půdy jsou rizikové prvky vstřebatelné rostlinami, ve kterých se mohou akumulovat [3,4]. Takto se snadno dostanou do potravního řetězce a v případě, že nejsou z těla vyloučeny, akumulují se i ve tkáních živočichů, což způsobuje řadu zdravotních komplikací již při nízkých koncentracích [5,6]. Na Příbramsku jsou stanoveny vysoké obsahy rizikových prvků, hlavně Cd, Pb, Zn a As, které mohou ovlivnit společenstva volně žijících drobných savců [7].

V orgánech živočichů nejsnadněji akumuluje olovo a kadmium [8,6], a to nejvíce v játrech a ledvinách [9]. Rizikové prvky mají schopnost inhibovat vazebná místa některých životně důležitých enzymů, čímž ovlivní jejich působení a narušují základní biochemické procesy v těle [6].

Metalothioneiny jsou, kromě jiných funkcí, schopny transportovat a detoxikovat kovové ionty ve tkáních a tím chránit organismus před otravou rizikovými prvky [10]. Jejich syntéza je ovlivněna mnoha environmentálními faktory jako koncentrace prvků v prostředí, pohlaví, věk a stáří organismu [11]. Souvislost mezi expozicí kovy a syntézou MT byla na hlodavcích zkoumána převážně v laboratorních podmínkách. MT mohou ale v terénních studiích sloužit také jako biomarkery kontaminace životního prostředí [12,13].

Experimentální část

Na Příbramsku, které se nachází přibližně 60 kilometrů jihozápadně od Prahy (Česká Republika), bylo vybráno několik lokalit s přibližně stejnou charakteristikou porostu. Všechny jsou situovány na břehu řeky Litavky. Dvě kontrolní lokality se nacházejí ve směru proti proudu od Kovohutí Příbram, a. s. a jedna, kontaminovaná, ve směru po proudu v přímé blízkosti kovohutí.

První informace o biodiverzitě drobných zemních savců byly zaznamenány při odchytech v roce 2014, kdy proběhla první sezóna terénního sběru dat. Na zvolených lokalitách s rozdílnou mírou kontaminace byly odchyceny čtyři druhy hlodavců (*Microtus arvalis, Apodemus sylvaticus, Apodemus flavicollis, Myodes glareolus*) a jeden druh hmyzožravce (*Sorex araneus*)[14]. Díky těmto terénním výzkumům můžeme sledovat transport rizikových prvků z kontaminované půdy do potravinového řetězce a zároveň hodnotit odezvu organismu zvířat na stres vyvolaný jejich zvýšeným příjmem.

Na všech lokalitách probíhal odchyt v září 2014 během tří po sobě jdoucích dnů a nocí. Byly použity konvenční sklapovací pasti s návnadou, které byly pokládány v pěti liniích. Vzdálenost mezi liniemi a mezi jednotlivými pastmi byla cca 10 metrů. U odchycených jedinců bylo zjištěno pohlaví, věk a druh pomocí charakteristických znaků. Přímo na lokalitách byla provedena částečná pitva, při které byly odebrány ledviny a játra zvířat. Dále byly orgány uskladněny v – 20 °C a převezeny do laboratoře ČZU.

Extrakty MT byly připravovány ze 100 mg lyofilizovaných jater odchycených zvířat podle metodiky Hisparda et. al., 2008 [15]. Navážený materiál byl zhomogenizován (UltraTurrax T25) v 6 ml pufru (20 mM Tris, 150 mM NaCl – pH 8,6 + 10 mM 2-mercaptoethanol a inhibitory proteáz: 20 μM leupeptin, 2μM aprotinin a 100 μM benzamidin - SIGMA) a následně centrifugován při 4 °C, 16 090 g po dobu 30 minut. 1,5 ml S1 bylo denaturováno 15 min. při 97°C. Po denaturaci a následném zchlazení na 4°C proběhla další centrifugace při 4°C, 10 000 g po dobu 15 minut. Získaný S2 byl zchlazen a uskladněn v -80 °C až do vlastního stanovení.

Voltametrické stanovení koncentrace MT v extraktu S2 bylo prováděno na základě Brdičkovy reakce[16]. Voltametrická stanovení byla prováděna s použitím počítačově řízeného analyzátoru PC-ETP (Polaro- Sensors, Praha, Česká republika) se softwarem POLAR PRO 5.1. Pracovní elektroda byla HMDE (rtuťová tužková elektroda fy Polaro Sensors. Referentní elektroda byla Ag/AgCl/KCl_{nas}, pomocná elektroda Pt drátek (Elektrochemické Detektory, Turnov, Česká republika). Měření byla prováděna při laboratorní teplotě v dusíkové atmosféře, Základní elektrolyt byl 1 M amonný pufr pH 9,5 s 1 mM $Co(NH_3)_6Cl_3$ (SIGMA). Pro měření pH byl používán pH metr Jenway 3505 (Bibby Scientific Ltd. UK).

Pro výpočet výsledků analýzy z analyzátoru PC–ETP byla použita kalibrační křivka vytvořená metodou standardního přídavku standardu MT (Enzo Lifesciences). Výpočty probíhaly v počítačovém programu Polar 5.1.

Reprodukovatelnost metody analýzy koncentrace MT byla ověřena na vzorku jater samce laboratorního potkana kmene Wistar získaného z pokusné stáje CZU, ze kterého bylo možné vytvořit deset navážek lyofilizovaného materiálu. Potkan byl po dobu 40 dní krmen standardní krmnou směsí ST-1 s přídavkem $CdCl_2$, poté byly odebrány orgány a uskladněny v -80 °C. Stanovení MT bylo provedeno výše uvedenými postupy. Základní popisné charakteristiky, které byly vypočteny pomocí programu STATISTICA jsou uvedeny v tabulce č. I. Směrodatná odchylka, která udává kolísání hodnot sledovaného znaku při měření okolo aritmetického průměru, má hodnotu 20,6. Hodnota variačního koeficientu je 14,02, kdy V< 50 je znakem sourodosti měření.

Tabulka I.
Základní popisné charakteristiky pro zjištění reprodukovatelnosti metody analýzy koncentrace MT.

Proměnná	Popisné statistiky					
	N platných	Průměr µg / ml	Minimum µg / ml	Maximum µg / ml	Sm.odch. µg / ml	Var.koef. µg / ml
Hodnota	10	146,9547	119,8620	172,7680	20,59991	14,01787

Výsledky a diskuse
Koncentrace MT byla sledována v játrech drobných zemních savců odchycených na různě kontaminovaných lokalitách na Příbramsku (Tabulka č. II). Naměřené hodnoty zvířat z lokalit (Stadion, Jince) se pohybovaly v rozmezí 99,2 do 144,7 µg/ml extraktu ze 100 mg lyofilizovaného vzorku u druhu *Apodemus sylvaticus* (AS) a od 110,4 do 150,9 µg/ml u druhu *Microtus arvalis* (MA). Na kontaminované lokalitě byly naměřeny hodnoty od 129,6 µg/ml do 173,5 µg/ml u AS a od 131,5 do 161,1 µg/ml u MA.

Tabulka II.
Koncentrace MT v játrech různých druhů z různých lokalit (minimum, maximum a průměr v µg/ml extraktu ze 100mg lyofilizovaného materiálu).

druh	lokalita	*n*	MT min	MT max	MT prům
Apodemus sylvaticus	Stadion	3	99,2	144,7	126,5
	Halda	5	129,6	173,5	158,9
Microtus arvalis	Jince	4	110,4	150,9	134,4
	Halda	6	131,5	161,1	146,3

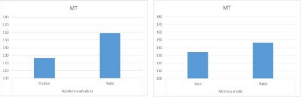
Z těchto výsledků je patrný značný rozdíl mezi kontrolními lokalitami a kontaminovanou lokalitou. Terénní studie se v současnosti nejvíce zabývají druhem AS, u kterého byla prokázána vyšší koncentrace MT v orgánech zvířat žijících na kontaminovaných lokalitách než u zvířat z nekontaminovaných lokalit a byl určen jako vhodný organismus pro biomonitoring kontaminace životního prostředí [12,17,18]. Toto bylo potvrzeno i u jiných druhů jako například *Rattus rattus*, *Rattus tanzeumi* nebo *Mus spretus* [19,20].

Dále byl zaznamenán rozdíl v koncentraci MT v játrech odchycených zvířat ze stejné lokality („Halda") v závislosti na druhu, který je zaznamenán v Grafu č. I. U AS z lokality „Halda" byla průměrně naměřena vyšší koncentrace MT v játrech než u druhu MA. Takovéto druhové rozdíly již byly, spolu s jinými ovlivňujícími faktory popsány ve studii Fritsch et al. [11], kde bylo hodnoceno sedm druhů, včetně AS odchycených na kontaminovaných lokalitách ve Francii. Největší diverzita byla zaznamenána u rejsků *Sorex araneus* a *Sorex minutus*, která je nejspíše způsobena omnivorním stravováním těchto drobných zemních savců na rozdíl od hlodavců stravujících se téměř herbivorní. O koncentraci MT v orgánech MA, který je také herbivorní, se zatím žádné studie nezmiňují.

Závěr
V této studii byla sledována koncentrace MT v játrech dvou druhů drobných zemních savců odchycených na kontaminované lokalitě na Příbramsku v porovnání s kontrolními lokalitami. Byl zjištěn rozdíl jak mezi lokalitami, tak i mezi jednotlivými druhy zvířat. Je tedy potvrzen

vliv znečištění životního prostředí na organizmy, které v něm žijí a jejich obranná reakce pomocí MT. Tato práce je vytvořena pouze z některých druhů odchycených v roce 2014 na Příbramsku. Zbytek vzorků budu předmětem další práce stejně jako sběr dalšího materiálu z této oblasti.

A) B)



Obr. 1. Koncentrace MT v játrech: A) *Apodemus sylvaticus*, B) *Microtus arvalis* (µg/ml extraktu ze 100mg lyofilizovaného materiálu).

Poděkování
Tato studie byla finančně podporována univerzitním grantem CIGA 20142030.

Literatura

1. Šichorová K., Tlustoš P., Száková J., Kořínek K., Balík J.: Plant Soil Environ. *50*, 525 (2004).
2. Vaněk A., Borůvka L., Drábek O., Mihaljevič M., Komárek M.: Plant Soil Environ. *51*, 316 (2005).
3. Lindén A., Olsson I. M., Bensryd I., Lundh T., Skerfving S., Oskarsson A.: Ecotox Environ Safe. *55*, 213 (2003).
4. Hall J. L.: J Exp Bot. *53*. 1 (2002).
5. Wilkinson J. M., Hill J., Phillips C.J.C.: P Nutr Soc. *62*, 267 (2003).
6. Sinicropi M. S., Amantea D., Caruso A.: Arch Toxicol. *84*, 501 (2010).
7. Stankovic S., Kalaba P. & Stankovic A. A.: Environmental Chemic Letter. *12*, 63 – 84 (2014).
8. Chan H. M. and Cherian M.G.: Toxicol Appl Pharm. *120*, 308 (1993).
9. Sures B, Jürges G, Taraschrwski H.: Parasitology. *121*, 27 (2000).
10. Nordberg M., Nordgerg G. F.: Metal ions in life sciences. RSC Publishing. Cambridge 2009.
11. Fritsch C., CossonR.P., Coeurdassier M., Raoul F., Giraudoux P., Crini N., de Vaufleury A., Scheifler R.: Environ Pollut. *158*, 827 (2010)
12. González X. I., Aboal J. R., Fernandéz J. A., Carballeria A.: Sci Total Environ. *366*, 910 (2006).
13. Petrova J., Krizkova S., Zitka O., Hubalek J., Prusa R., Adam V., Wang J., Belkova M., Sures B., Kizek R.: Sensor and actuators B. *127*, 112 (2007).
14. Křivská D., Čadková Z., Horáková B.: 6th Workshop on biodiversity, Jevany, Praha 2014.
15. Hispard F., de Vaufleury A., Martin H., Devaux S., Cosson R. P., Scheifler R., Richet L., Berthelot A. Badot P.–M.: Ecotox Environ Safe. *70*, 490 (2008).
16. Brdička R.: Collect. Czech. Chem. Commun. *5*, 112 (1993).

17. Rogival D., van Campenhout K., Infante H. G., Heran R., Scheirs J., Blust R.: Environ Toxicol Chem. *26*, 506 (2007).
18. Rogival D., Scheris J., Blust R.: Environ Pollut *145*, 516 (2007).
19. Marques C. C., Gabriel S. I., Pinheiro T., Viegas-Crespo A. M., da Luz Mathias M., Bebianno M. J.: Chemosphere *71*, 1340 (2008).
20. Nakayama S. M. M., Ikenaka Y., Hamada K., Muzandu K., Choongo K., Yabe J., Umemura T., Ishizuka M.: Environ Monit Assess. *185*, 4907 (2013).

Electrochemical Preparation of Ferrates
(Elektrochemická príprava železanov)

Emília Kubiňáková, Miroslav Gál, Ján Híveš, and Kamil Kerekeš
Institute of Inorganic Chemistry, Technology and Materials, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: emilia.kubinakova@stuba.sk

Abstract
Interest for eco-friendly oxidative reagents without toxic side effects still grows. Ferrate(VI) is compound with high oxidation potential exceeding potential of other commonly used oxidizing agents. This "green" oxidant can be utilized especially in the waste water treatment technology. Preparation and stabilization of ferrate is quite difficult. This work was aimed on the electrochemical preparation of ferrates from alkaline electrolytes. System contained potassium hydroxide seems to be very perspective. In this system less soluble and easier separated potassium ferrate was formed.

Key words: Ferrate, Ecological oxidant, Electrochemical preparation, Molten electrolyte.

Úvod
Elektrochemické metódy (DC (direct current) a AC (alternating current)) sú vhodné na štúdium širokého spekra redox procesov vo vodných roztokoch a v roztavených soliach [1-16]. Zlúčeniny železa v oxidačnom stupni +VI (železany) sú po elementárnom flóre najsilnejšie oxidačné činidlá. Vysoký redoxný potenciál týchto zlúčenín ich predurčuje na použitie v širokej priemyselnej oblasti, najmä v dočisťovaní a remediácii odpadových vôd. Veľmi dôležitý je tiež fakt, že nepredstavujú záťaž pre životné prostredie. Výrazná oxidačná sila železanov, ale do značnej miery komplikuje ich prípravu a následnú stabilizáciu. Metódy prípravy železanov sa rozdeľujú na chemické a elektrochemické. Chemické sa rozdeľujú na suchú a mokrú oxidáciu, rozdiel je najmä v prítomnosti vody a v použitom oxidačnom činidle. Elektrochemické metódy môžeme deliť podľa použitého prostredia na syntézu vo vodných roztokoch [17-20] a v tavenine [21-25]. Napriek značným výhodám boli elektrochemické metódy, hlavne z tavenín, preštudované v oveľa menšej miere než chemické.

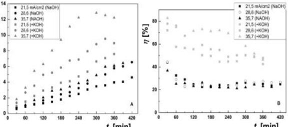
Experimentálna časť
Experimentálna aparatúra pozostávala z olejového termostatu, zdroju jednosmerného elektrického prúdu, termočlánku a počítača. Navážená zmes hydroxid- voda sa roztavila a vytemperovala na požadovanú teplotu v pracovnom PTFE tégliku, ktorého priestor bol oddelený tkaninovou PP diafragmou na anódovú a katódovú časť. Objem anódovej časti predstavoval 2/3 z celkového objemu elektrolytu. Elektródy (mäkká oceľ triedy 11) sa pred umiestnením do taveniny aktivovali v 20 hm. % roztoku kyseliny sírovej, opláchli destilovanou vodou, usušili a predhriali prúdom teplého vzduchu. Po dosiahnutí požadovanej pracovnej teploty boli elektródy pripojené k zdroju jednosmerného elektrického prúdu v dvojelektródovom zapojení. Čas trvania experimentov predstavoval 7 hodín. Vzorky boli z anódového priestoru odoberané každú pol hodinu a po skončení merania v nich bola pomocou UV- Vis spektrofotometra stanovená koncentrácia vzniknutého železanu.

Pracovalo v systémoch hydroxid sodný-voda a hydroxid sodný-hydroxid draselný-voda. Aj v binárnom aj v ternárnom systéme dosahovala koncentrácia hydroxidu sodného 70 hm %, koncentrácia hydroxidu draselného v trojzložkovom systéme sa menila v jednotlivých meraniach od 3 hm. % do 7 hm. %. Ďalej sa optimalizoval vplyv pracovnej teploty, ktorej počiatočná veľkosť bola volená na najnižšej možnej hodnote, 80 °C, na základe fázového diagramu a vplyv zvyšovania prúdovej hustoty. Veľkosť štartovacej prúdovej hustoty 21,5 mA cm^{-2} bola zvolená na základe predchádzajúcich štúdií realizovaných v danej oblasti[18,21].

Výsledky a diskusia

Na základe nameraných údajov sa vyhodnotil vplyv študovaného parametra vzhľadom na množstvo vznikajúceho železanu a na prúdovú účinnosť procesu v závislosti od času. V prvej sérii experimentov sa sledoval vplyv zvyšovania pracovnej teploty na 90 °C. Merania sa vykonávali pri najnižšej prúdovej hustote 21,5 mA cm^{-2} v oboch typoch elektrolytov. Pri teplote 80 °C sa dosiahla v binárnom systéme maximálna hodnota koncentrácie železanu 5,77 hm. % po 7 hodinách priebehu experimentu, pričom pri teplote 90 °C to bolo len 2,78 % po 4 hodinách. V tomto čase došlo tiež pri zvýšenej teplote k výraznému znižovaniu prúdovej účinnosti. V ternárnych systémoch sa dosiahli veľmi podobné výsledky. Je zrejmé, že pri vyššej teplote dochádza po určitom čase trvania experimentu k intenzívnejšiemu termickému rozkladu vzniknutých železanov. Zvyšné experimenty boli realizované už len pri najnižšej možnej pracovnej teplote 80 °C

Druhým sledovaným parametrom bola prúdová hustota. V binárnych aj ternárnych elektrolytoch sa zvyšovala prúdová hustota z hodnoty 21,5 mA cm^{-2} na hodnotu 28,6 mA cm^{-2} a následne až na 35,7 mA cm^{-2}. V obidvoch systémoch sa pozoroval nárast koncentrácie železanov s časom so zvyšujúcou sa prúdovou hustotou (Obr. 1A).

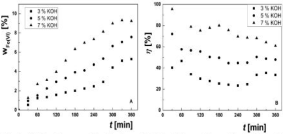


Obr. 1. Závislosť hmotnostného zlomku vznikajúceho železanu (A) a prúdovej účinnosti (B) od času elektrolýzy pri rôznych prúdových hustotách (■ 21,5 mA.cm^{-2},● 28,6 mA.cm^{-2}, ▲ 35,7 mA.cm^{-2}) v tavenine NaOH-H_2O c_{NaOH}= 70 % (čierny symbol) a v tavenine NaOH-KOH-H_2O c_{KOH}= 5 % (sivý symbol); t= 80 °C.

Pre dvojzložkový systém bola najvyššia nameraná koncentrácia pri prúdovej hustote 28,6 mA cm^{-2} 6,56 hm. % po 7 hodinách a pri najvyššej prúdovej hustote to bolo 6,43 hm. % po 6,5 hodinách. Pre trojzložkový systém boli maximálne koncentrácie pre prúdovú hustotu 21,5 mA cm^{-2} 7,71 hm. % po 6,5 hodinách, pre prúdovú hustotu 28,6 mA cm^{-2} sa hodnota zvýšila na 9,54 hm. % po 5,5 hodinách a pri najvyššej prúdovej hustote 35,8 mA cm^{-2} sa dosiahla hodnota 12,84 % už po piatich hodinách. Napriek zvyšujúcej sa koncentrácii železanu s časom pri vyšších prúdových hustotách, predstavoval hlavnú nevýhodu v oboch systémoch intenzívnejší vývoj kyslíka na anóde. Ten spôsoboval výrazné penenie anolytu a do značnej miery komplikoval prevádzkovateľnosť experimentu.

Porovnaním prúdových účinností (Obr. 1B) vidieť pri prvotnom zvýšený prúdovej hustoty mierne zvýšenie účinnosti s časom. Pri druhotnom zvýšení nastal v binárnom systéme pokles prúdovej účinnosti a v ternárnom systéme pozorovať jasné zvýšenie účinnosti, ale aj jej výrazný pokles po určitom čase. Zvyšovanie prúdovej hustoty je teda výhodné len po určitú hodnotu charakteristickú pre podmienky každého experimentu. Z hľadiska porovnania binárneho a ternárneho systému boli jasne lepšie výsledky dosiahnuté v trojzložkovom systéme NaOH-KOH-H_2O.

Posledným sledovaným parametrom bola zmena množstva KOH v ternárnom systéme. Pôvodný pomer NaOH:KOH, ktorý sa pre merania zvolil bol 70:5 hm. %. Sledovala sa zmena množstva vznikajúceho železanu a prúdovej účinnosti pri znížení množstva KOH na 3 hm. % a zvýšení na 7 hm. % (Obr.2). Z hľadiska množstva vznikajúceho železanu sa lepší javil systém s vyšším obsahom KOH, v ktorom sa namerala najvyššia koncentrácia 9,32 hm. % po 5,5 hodinách. Pri 3 hm. % množstve hydroxidu draselného v elektrolyte to bolo len 5,29 hm. % po 6 hodinách. Aj z hľadiska prúdových účinností sa zvýšením množstva KOH dosahovali výrazne vyššie hodnoty. Nevýhodou pri zvýšení hmotnostného zlomku na 7 hm. %, bola ale evidentná heterogenita taveniny v priebehu celého merania.



Obr. 2. Závislosť hmotnostného zlomku vznikajúceho železanu(A) a prúdovej účinnosti(B) od času elektrolýzy pri sledovaní vplyvu zmeny pomeru NaOH:KOH (■ 70:3, ● 70:5, ▲ 70:7) v zmesnom systéme; j= 21,5 mA.cm^{-2} a t= 80 °C.

Záver
Optimalizáciou parametrov elektrochemickej prípravy železanov z tavenín možno zhodnotiť, že pozitívny vplyv na množstvo vznikajúceho železanu má použitie čo najnižších možných pracovných teplôt, čo najvyšších prípustných prúdových hustôt a narastajúca koncentrácia hydroxidu draselného v zmesných elektrolytoch. Celkovo lepšie výsledky boli dosiahnuté v trojzložkovom systéme, čo je spôsobené vylučovaním železanu draselného v tuhej forme, Vďaka tejto pomerne stabilnej forme sa udržuje pomerne nízka koncentrácia železanu v kvapalnej fáze, kde prebieha jeho spätný rozklad.

Poďakovanie
Táto práca vznikla za podpory Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky v rámci projektu VEGA 1/0543/15.

Literatúra

1. Bouzek K., Flower L., Roušar I. and Wragg A. A.: J. Appl. Electrochem. *29*, 569 (1999).
2. Bouzek K. and Roušar I.: J. Appl. Electrochem. *23*, 1317 (1993).
3. Dytrtova J. J., Jakl M., Schroder D. and Navratil T.: Curr. Org. Chem. *15*, 2970 (2011).
4. Hives J., Benova M., Bouzek K., Sitek J. and Sharma V. K.: Electrochim. Acta *54*, 203 (2008).
5. Naumowicz M., Petelska A. D. and Figaszewski Z. A.: Electrochim. Acta *54*, 1089 (2009).
6. Naumowicz M., Petelska A. D. and Figaszewski Z. A.: Cell Biochemistry and Biophysics *61*, 145 (2011).
7. Naumowicz M., Petelska A. D. and Figaszewski Z. A.: Steroids *76*, 967 (2011).
8. Novotny L., Navratil T., Sander S. and Basova P.: Electroanalysis *14*, 1105 (2002).
9. Novotny L., Navratil T., Sander S. and Basova P.: Electroanalysis *15*, 1687 (2003).
10. Petelska A. D., Naumowicz M. and Figaszewski Z. A.: Langmuir *28*, 13331 (2012).
11. Sestakova I. and Navratil T.: Bioinorganic Chemistry and Applications *3*, 43 (2005).
12. Huskova R., Matisova E., Svorc L., Mocak J. and Kirchner M.: J. Chromatogr. A *1216*, 4927 (2009).
13. Mackulak T., Olejnikova P., Prousek J. and Svorc L.: Chemical Papers *65*, 835 (2011).
14. Svorc L., Sochr J., Svitkova J., Rievaj M. and Bustin D.: Electrochim. Acta *87*, 503 (2013).
15. Svorc L., Sochr J., Tomcik P., Rievaj M. and Bustin D.: Electrochim. Acta *68*, 227 (2012).
16. Svorc L., Tomcik P., Svitkova J., Rievaj M. and Bustin D.: Food Chem. *135*, 1198 (2012).
17. Hrnčiariková L., Hiveš J., Kerekeš K., Kamenár J., Gál M.: Acta Chim. Slov. *3*, 74 (2012).
18. Mácová Z., Bouzek K., Sharma V. K.: J. Appl. Electrochem. *40*, 1019 (2010).
19. Mácová Z., Bouzek K.: J. Appl. Electrochem. *41*, 1125 (2011).
20. Kerekes K., Hrnciarikova L., Hives J., Gal M.: J. Electrochem. Soc. *161*, 62 (2014).
21. Hiveš J., Benová M., Bouzek K., Sharma V. K.: Electrochem. Commun. *8*, 1737 (2006).
22. Hiveš J., Benová M., Bouzek K., Sitek J., Sharma V. K.: Electrochim. Acta *54*, 203 (2008).
23. Benová M., Hiveš J., Bouzek K., Sharma V. K.: ACS Symposium series *985* (2008).
24. Hrnčiariková L., Gál M., Kerekeš K., Hiveš J.: Electrochim. Acta *110*, 581 (2013).
25. Hrnčiariková L., Kerekeš K., Hiveš J., Gál M.: Int. J. Electrochem. Sci. *8*, 7768 (2013).

Comparison of Techniques for Single-Molecule Conductance Measurements of Expanded Pyridinium Molecules
(Porovnání technik měření vodivosti expandovaných pyridiniových molekul)

Štěpánka Lachmanová [a,b], Magdaléna Hromadová [a], Romana Sokolová [a], Jana Kocábová [a], Jindřich Gasior [a], Gábor Mészáros [c], and Philippe P. Lainé [d]

[a] J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of ASCR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: stepanka.lachmanova@jh-inst.cas.cz

[b] University of Chemistry and Technology, Technická 1905/5, 166 28, Prague 6, Czech Republic

[c] Research Centre for Natural Sciences, HAS, Magyar tudósok krt. 2, H-1117 Budapest, Hungary

[d] University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, ITODYS, UMR 7086 CNRS, 15 rue Jean-Antoine de Baif, 75205 Paris, France

Abstract

This work is focused on the comparison of two techniques of single-molecule conductance measurements: Scanning Tunneling Microscopy Break Junction technique and Mechanically Controlled Break Junction technique. The structure of studied compound 9-(pyridin-4-yl)benzo[*c*]benzo[1,2]quinolizino[3,4,5,6-*ija*][1,6]naphthyridin-15-ium allows the formation of the molecular bridge between two gold electrodes, which are connected to a source of the constant voltage in both of the used methods. The differences, advantages and disadvantages of both of the techniques will be discussed. Both techniques provided two values of conductance of studied compound depending on the experimantal conditions.

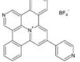
Key words: Single-molecule conductance, Scanning Tunneling Microscopy Break Junction, Mechanically Controled Break Junction, Expanded pyridinium derivatives.

Úvod

Vývoj a miniaturizace elektronických součástek se doposud řídí empirickým pravidlem, které se označuje jako Moorův zákon. Ten odhaduje, že se počet součástek na určitou jednotku plochy zdvojnásobí za 18 měsíců [1]. Nicméně se blíží limit této předpovědi, a to kvůli dosažitelným minimálním rozměrům kovových součástek. Jednou z možností, jak kovové součástky nahradit, je použití specializovaných molekul, které by byly schopné převzít jejich funkci[2]. Mezi nadějné molekuly patří i prodloužené a expandované pyridiniové deriváty [3], které by v budoucnu mohly fungovat jako molekulové dráty.

Techniky použité v této práci pro měření vodivosti jednotlivých molekul, metoda přerušování spojení řízeného rastrovacím tunelovacím mikroskopem (Scanning Tunneling Microscopy Break Junction, STM-BJ) a metoda mechanicky kontrolovaného přerušování spojení (Mechanically Controlled Break Junction, MC-BJ), jsou založeny na obdobném principu [4,5]. Cílem je uchycení studované molekuly mezi dvě vzájemně se oddalující elektrody, které jsou připojeny na zdroj napětí. Při vhodně zvolených podmínkách se zachytí mezi elektrody jediná molekula za vzniku můstku, čímž se uzavře elektrický obvod. Úspěšnost takového zachycení molekuly se projeví vznikem tzv. plata na získaných křivkách zobrazujících závislost měřeného proudu na poloze serva, které řídí vzájemné odtahování elektrod. Přepočtem je následně možné získat hodnoty vodivosti. Vzhledem k tomu, že se metodami STM-BJ a MC-BJ měří hodnoty odpovídající vodivosti jednotlivých molekul, je nutné měřit velké množství vodivostních křivek a následně je statisticky zpracovat. Jako vnitřní standard slouží hodnota měřená při odtrhnutí posledních zlatých atomů jednotlivých elektrod při jejich odtažení.

Látka 9-(pyridin-4-yl)benzo[*c*]benzo[1,2]quinolizino[3,4,5,6-*ija*][1,6]naphthyridin-15-ium, jejíž struktura je uvedena na obrázku Obr. 1, patří mezi expandované pyridiniové deriváty. Molekula byla navržena speciálně za účelem umožnění měření její vodivosti. Na obou koncích molekuly jsou totiž lokalizovány pyridiniové heterocykly, jejichž dusíkové atomy jsou schopné se specificky vázat na zlato, z něhož jsou vyrobené elektrody používané v metodách MC-BJ a STM-BJ.



Obr. 1. Struktura studované látky 9-(pyridin-4-yl)benzo[*c*]benzo[1,2]quinolizino[3,4,5,6-*ija*][1,6]naphthyridin-15-ium tetrafluoroborátu.

Experimentální část

Před zahájením měření technikou STM-BJ byl vzorek vždy nejprve zobrazen metodou rastrovací tunelovací mikroskopie (Scanning Tunneling Microscopy, STM). Měření metodami STM a STM-BJ byla prováděna na přístroji Nanoscope 5500 SPM (Agilent Technologies, USA) s použitím skeneru domácí výroby. Jako rastrovací sonda pro měření STM a jako jedna z elektrod pro STM-BJ byl použit zlatý střihaný hrot z drátu o šíři 0,25 mm (Goodfellow, Velká Británie). Jako substrát a zároveň druhá elektroda pro metodu STM-BJ byla použita zlatá polykrystalická destička s přitaveným zlatým drátem pro propojení kontaktu. Měření metodou MC-BJ byla prováděna v teflonové cele domácí výroby. Elektrody byly vyrobeny naříznutím zlatého drátu o průměru 100 µm (Goodfellow, Velká Británie).

Zlaté destičky používané v měření technikami STM a STM-BJ, teflonové měřicí cely domácí výroby, těsnicí O-kroužky Kalrez (Dupont, USA) a veškeré příslušenství a nádoby použité pro přípravu vzorků i pro manipulaci s měřicí celou, byly před měřením vyčištěny v kyselině peroxosírové, dvakrát vyvařeny v čerstvě deionisované vodě (přístroj Mili-Q, Milipore, USA) a osušeny při teplotě 100 – 120 °C. Zlaté desky byly před měřením vyžíhány butanovým plamenem a chlazeny proudem argonu. Během přípravy vzorků i během sestavování měřicích soustav byla dodržována přísná pravidla uchovávání čistoty práce.

U metod STM-BJ i MC-BJ byla provedena optimalizace podmínek měření vlastností studované látky. Byla provedena i slepá měření pro ověření podmínek před aplikací vzorku měřené látky.

Látka 9-(pyridin-4-yl)benzo[*c*]benzo[1,2]quinolizino[3,4,5,6-*ija*][1,6]naphthyridin-15-ium tetrafluoroborát byla navržena a syntetizována v laboratoři Dr. Philippa P. Lainého v Paříži. Měření metodami STM a STM-BJ probíhala ve směsi ethanolu (molecular biology grade, AppliChem GmbH, Německo) a 1,3,5-trimethylbenzenu (98%, Sigma-Aldrich, USA) v poměru 1:5 při laboratorní teplotě. Pro metodu MC-BJ bylo zvolen poměr 1:9.

Data z měření STM byla zaznamenávána programem PicoView (Agilent Technologies, USA). Měření STM-BJ a MC-BJ byla řízena programem domácí výroby Stretch. Data byla zpracována programy domácí výroby Transienty a BJShow12. Statistická analýza byla provedena v programu Origin 9.1 (OriginLab Corporation, USA).

Výsledky a diskuse

Jedním z hlavních problémů měření vodivosti jednotlivých molekul studované látky byla její nízká rozpustnost v 1,3,5-trimethylbenzenu, který se pro své vhodné vlastnosti pro měření vodivostí používá. Problém byl vyřešen použitím směsi 1,3,5-trimethylbenzenu a ethanolu v poměru 5:1, respektive 9:1, kdy množství ethanolu v systému umožnilo rozpuštění látky v dostatečném množství. Zároveň nebylo množství ethanolu ve směsi tak výrazné, aby způsobovalo výraznější komplikace. To bylo ověřeno měřením slepých vzorků technikami STM-BJ i MC-BJ.

Měření vodivostí technikami STM-BJ a MC-BJ se od sebe co do experimentálního uspořádání poměrně výrazně liší. Každá z uvedených metod má své výhody i nevýhody. Jednou z výhod použití metody STM-BJ je snazší manipulace s elektrodami i aplikace vzorku do měřící cely. Propojení metod STM a STM-BJ navíc nabízí možnost nejprve zobrazit povrch substrátu (velkoplošné elektrody). Následně je možné bez nutnosti jakýchkoliv manipulací se vzorkem měřit vodivost na přesně vybraném místě na povrchu substrátu. Kombinace metod STM a STM-BJ zároveň usnadňuje odstraňování případných nečistot zachycených na vrcholu hrotu (elektrody).

Jednou z nejzásadnějších výhod metody MC-BJ je možnost dosáhnout nižší hranice šumu, než je tomu u STM-BJ, a tím i možnost studovat látky s nižší vodivostí. Za používaných podmínek jsme dosáhli hranice šumu při použití MC-BJ $8 \cdot 10^{-13}$ S, zatímco při použití STM-BJ byla nepřekonatelná hranice již při hodnotě vodivosti $8 \cdot 10^{-11}$ S. Experimentální uspořádání techniky MC-BJ dovoluje pouze malé odtažení elektrod od sebe, což na jednu stranu komplituje odstraňování případných nečistot z povrchu elektrod, nicméně pokud se mezi elektrody úspěšně zachytí studovaná molekula nebo jejich shluk, je možné získat hned několik křivek ukazujících na úspěšné propojení elektrod. Naopak při používání techniky STM-BJ je hrot od velkoplošné elektrody odtahován do větší vzdálenosti a tím se znesnadňuje případné znovuzachycení již změřené molekuly.

Výsledky měření látky 9-(pyridin-4-yl)benzo[*c*]benzo[1,2]quinolizino[3,4,5,6-*ija*][1,6]naphthyridin-15-ium technikami STM-BJ a MC-BJ se příliš neliší. Oběma metodami jsme získali dvě hodnoty vodivosti v závislosti na zvolených podmínkách měření. Metodou STM-BJ jsme měřili hodnoty odpovídající vodivosti $3{,}3 \cdot 10^{-9}$ S a $6{,}7 \cdot 10^{-8}$ S. Metodou MC-BJ jsme zaznamenali hodnoty odpovídající vodivosti $5.1 \cdot 10^{-9}$ S a $4{,}9 \cdot 10^{-8}$ S. Analýzou dat bylo zjištěno, že vyšší hodnota vodivosti odpovídá případům, kdy jsou plata na měřených křivkách delší. To může být vysvětleno zachycením více než jedné molekuly mezi odtahující se elektrody.

Závěr

Technikami STM-BJ a MC-BJ byla měřena vodivost expandovaného pyridinového derivátu 9-(pyridin-4-yl)benzo[*c*]benzo[1,2]quinolizino[3,4,5,6-*ija*][1,6]naphthyridin-15-ium tetrafluoroborátu ve směsi ethanolu a 1,3,5-trimethylbenzenu. Ačkoliv se jednotlivé techniky experimentálním uspořádáním liší, získali jsme oběma metodami dvě hodnoty vodivosti studované látky. Vyšší hodnoty vodivosti odpovídají delším platům na křivkách závislosti proudu na poloze řídícího pieza, což ukazuje na zachycení více než jedné molekuly studované látky mezi elektrody.

Acknowledgement
This research has been supported by the Grant Agency of the Czech Republic (14-05180S), by the Grant Agency of the Academy of Sciences (M200401202 and HU/2013/05) and by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (7AMB15FR027).

Literatura

1. Moore G. M.: Electronics 114 (1965).
2. Tao N. J.: Nat. Nanotechnol. *1*, 173 (2006).
3. Fortage J., Peltier C., Perruchot C., Takemoto Y., Teki Y., Bedioui F., Marvaud V., Dupeyre G., Pospisil L., Adamo C., Hromadova M., Ciofini I., Laine P.: J. Am. Chem. Soc. *134*, 2691 (2012).
4. Kolivoska V., Valasek M., Gal M., Sokolova R., Bulickova J., Pospisil L., Mezsaros G., Hromadova M.: J. Phys. Chem. Lett. *4*, 589 (2013).
5. Garcia-Moreno P., La Rosa A., Kolivoska V., Bermejo D., Hong W., Yoshida K., Baghernejad M., Filippone S., Broekmann P., Wandlowski T., Mart N.: J. Am. Chem. Soc. *137*, 2318 (2015).

Methods for Studying of Plant Membrane Transport

Le Minh Phuong, Hana Vodickova, Brigita Zamecnikova, and Jaromir Lachman
Czech University of Life Science Prague, Department of Chemistry, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6, Czech Republic, E-mail: le_minh@af.czu.cz

Abstract

Plasma membrane or cell membrane is a biological active membrane separating the interior of cell from the outside environment. The transport system enables the entry of necessary nutrients into the cells and exports the macromolecules (such as lipids, proteins, carbohydrates).Studying the transport reactions of plasma membranes has been researched more with the development of techniques for isolating membranes and tonoplasts. The techniques for studying membrane transport in plants can be performed at different levels. At molecular levels, the available techniques are patch- clamp and single channel studies. The fluorescence microscopy and intracellular microelectrode measurements are used at cellular level. For the whole plant, the methods can be radioactive tracers. To study the mechanisms of transport processes and plant membrane properties were investigated using different models of phospholipid membranes. From the phospholipid membranes, the properties and functions of real biological membranes can be easily understood. Important methods for studying of plant membrane transport are summarized in the table.

Key words: Plasma membrane, Separation and identification techniques, Transporters.

Introduction

Plasma membrane (cell membrane) plays an important role, because it separates the cell interior from the environment. Cell membrane consists of the phospholipid bilayer with embedded proteins. The compositions of lipid and protein are varied with the types and developmental stages of cell, as well as the environment.

Lipids and associated proteins are formed the selective barriers that allow specific solutes and molecules transport in and out. There are three main classes of lipids in the plasma membrane. They are glycerollipids (mainly phospholipids), sphingolipids and sterols [1]. Proteins embedded in membrane control all the process of transporting solutes in the cell. It relates to the cell expansion, the transport of assimilated nitrogen and carbon, mineral nutrition and response of plant to the environmental signals. Therefore, this process is important for the growth and development of plant.

Membrane transport is necessary for cell life, through the life cycle, the exchange of cells helps to maintain all the functions. The transport in the membrane is the movement of particles or solutes through the membrane barrier. The necessary nutrients are enabled to come and macromolecules (such as lipids, proteins, carbohydrates) are exported. Toxins and other toxic drugs are prevented inserting into the cells [2].

The transport in membranes depends on a number of factors: the transmembrane solute concentration, the permeability of membrane or the size and charge of solutes. The physical state of lipid bilayer as well as its composition affect to the associations of protein- protein and lipid- protein. They also influence to the transport capacity of membrane and the membrane- bound enzyme activities. So, to analyze the function of membrane, the efficient methods of purification is necessary [1].

With the development of isolating techniques for membranes and tonoplasts, the research in plasma membrane transports has been more studied. Isolating techniques of plasma membranes and tonoplasts enable to research in the reactions of transport *in vitro*[3]. The fraction of plasma membrane was purified by the high speed centrifugation. In some cases, this method is inefficient, such as to fractionate the plasma membrane from the tonoplast. In this case, the free flow electrophoresis has been reported as an appropriate approach [1].

The isolated membrane vesicles are used to study the transport in the purpose to avoid the interference from the metabolism. Through the process, the solute concentrations can be better defined in each side of the membranes [3, 4]. There are two types of preparation: intact vacuoles and isolated plasma membrane (some cases are the tonoplast vesicles). Identification of membrane can be studied when comparing the properties of uptake protoplasts and vacuoles released from protoplast.

Some studies have been conducted on the isolating vacuoles from protoplasts[4]. Protoplasts were isolated by enzymatic digestion and maintained in plasmolyzed state. After that, a gentle osmotic shock was used to lyze the plasma membrane without breaking tonoplast. Intact vacuoles were purified by centrifugation through the sucrose density gradient. The result of the process was the highly purified intact vacuoles.

To isolate the tonoplast membrane from the cell homogenates, after grounding the tissues in mortar and pestle, the density- gradient centrifugation is used. The ratio of protein to lipid is low, so the tonoplast vesicles always have the low density, so can be separated from cellular membranes [5].

Monitoring the transport of solutes into the membrane can be demonstrated by radioisotopes. Incubation the vesicles with the labeled solutes, after that using filtration rapidly and the scintillation counter is used to measure the radioactivity [6].

Fluorescence spectroscopic techniques can also applied to study the membrane proteins, especially membrane transporters. This approach has the advantages including the high sensitivity and available instrumentations. In this method, only relatively small amounts of proteins are required. It can explore the different sides of structural and functional in membrane proteins [7].

Identification of membrane transporter has been studied using the microscopic method in *Arabidopsis thaliana* cultivated in *Saccharomyces cerevisiae* under the enhaced cadmium tolerance and accumulation conditions. During the study, the two mutant transporters atabcc1 and atabcce showed the hypersensitive phenotypes in the presence of cadmium II and mercury II. The two transporters play an important role in vacuolar transporters to prevent the tolerance and accumulation of cadmium and mercury. This is an effective method to characterize transport and useful tool for genetic engineering in the future [8].

Molecule transport in plant has been focused more by the development in studying of electrophysiological approaches, labeled transport substrates and pharmacological research. The in vivo images of intracellular ions and transport inhibitors, as well as the transporters in isolated membranes have been contributed to these researches in plants. There are many techniques for studying plant membrane transport. The methods can be performed at different levels, such as patch- clamp and single channel at molecular levels, or fluorescence microscopy and intracellular microelectrode measurements at cellular level. Radioactive tracers are preferred to perform for the whole plants [9].

In research process, the convenient method to study the plant membrane transport process has been reported was non- invasive microelectrode flux measurement [10]. The advantage of this method is that it allows to study in various levels of structural organization in plants. In this method, the protoplasts or single cells, even tissues or intact organs can be used in high resolution. Other advantage is that it provides the stoichiometry information between time dependence and the membrane transporters.

The effect of plant membrane transport processes to the environmental conditions in plant adaptive responses is important for scientists to increase the tolerance stress for plants. Therefore, the interaction of physiological and metabolic processes with the plant membrane processes have to be further studied. These researches not only involve to the interaction between signaling components and transporters but also on the numbers of transporters.

The association between signal transduction and membranes and the mechanism of transmembrane transport lead to several experimental approaches. The noninvasive microelectrode ion flux method was also used to research on membrane transport in root plants [11]. Transport proteins mediate intracellular ion concentration and ion permeability. The activity of transport proteins are controlled by signaling molecules and cyclic nucleotides. These methods can measure the qualification of fluxes of ions and provide the information of aspects in downstream signal in cells.

The experiments using the electrochemical reactions have been performance at the interfaces of immiscible electrolyte solutions [12]. They compared the three different methods: scanning electrochemical microscopy, electrode cell setup and thin- film voltammetry and found the last method is the most highlighting method. The phenomena of membrane ion transport process can be illustrated using this method.

The phospholipid bilayers are the cell structural components. To study the mechanisms of transport processes and plant membrane properties were investigated using different models of phospholipid membranes. From the phospholipid membranes, the properties and functions of real biological membranes can be easily understood. Building elements of membranes are the two different phospholipids: the mixture of phospholipid from soybeans and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholine. Voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy were used to study [13]. One continuous experiments were performed on cholesterol and phosphatidylcholine (lecithin) using electrochemical impedance spectroscopy [14].

Conclusion

There are many approaches to study the processes of membrane transport in plant. For many years, electrophysiology- the study of transport charged solutes and proteins has reached a lot of development. Some high resolution electrophysiological methods such as patch clamp that havebeen extensively used in many plants. Based on that, the plasma membrane transport activities have been more and more clearly characterized. Especially the ion channel activities can be also used to understand the structure information of proteins. Scientists now can understand the transport mechanisms on the molecular levels.

However, the physiological information of plasma membrane transporters is not so many. The expression and mechanism of regulation of protein level, as well as the regulation of transport activities and how they interact with proteins are still lacking. Biochemical and biophysical methods to reveal the functions are not often analyzed in plants. In the future, the intracellular biosensors to study the activities of transporters in their genuine cellular environments can be performed. This is a novel methodology and opens the new research branch in membrane transport. During the experiments, the conductors should be checked and optimized the methods to obtain the good results of plant membrane transport processes.

Table I.
Used methods for investigation of plant membrane transport.

Methods	Investigation	References
High- speed centrifugation	Isolation of plasma membranes and tonoplasts	1
Enzymatic methods	Isolation of vacuoles and plasma membranes	3, 4
Centrifugation with sucrose gradient	Isolation of vacuoles and tonoplasts	4, 5
Radioisotopic methods	Transport of solutes into the membrane	6
Fluorescence spectroscopic techniques	Membrane transporters	7
Microscopic analysis	Membrane transporters	8
Electrophysical methods	Transport inhibitors and identification of transporters	9
Electrochemical methods	Identification membrane transporters Signal transduction and transmembranes transport	10, 11
Electrochemical microscopy	Membrane ion transport processes	11
Voltammetry	Plant membrane properties	12
Electrochemical impedance spectroscopy	Transport processes	13, 14

Acknowledgment
This research was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Czech Science Foundation) GAČR (Project No.P208/12/1645).

References

1. Furt F., Simon- Plas F., Mongrand S., in book: *The plant plasma membrane* (Schulz B., Murphy A. S., Peer W., eds.), chapter Lipids of plant plasma membrane. Verlag Berlin, Heidelberg 2011
2. Busch W., Milton H., Sairt J.: Mol. Biotechnol. *227*, 53 (2004).
3. Jahn T., Dietrich J., Andersen B., Leidvik B., Otter C., Briving C., Kuhlbrandt W., Palmgren M. G.: J. Mol Biol. *309*, 465 (2001).
4. Pantoja O., Smith J. A. C.: J. Membr. Biol. *186*, 31 (2002).
5. Kawamura Y., Arakawa K., Maeshima M., Yoshida S.: J. Biol. Chem. *275*, 6515 (2000).
6. http://5e.plantphys.net/article.php?ch=t&id=53 downloaded 10.4.2015.
7. Frances J., Sharom- Paula L., Russell Q., Lu P.: Membr. Biol. *227*, 109 (2003).
8. Park J., Song W. Y., Ko D., Eom Y., Hansen T. H., Schiller M., Lee T. G.: Plant J. *69*, 278 (2012).

9. Schulz B., in book: *The plant plasma membrane* (Schulz B., Murphy A. S., Peer W., eds.), chapter Functional classification of plant plasma membrane. Verlag Berlin, Heidelberg 2011.
10. Shabala S., Shabala L., Newman J., in book: *Plant Electrophysiology* (Volkov A., ed.), chapter Methods and cell electrophysiology. Springer-Verlag, Berlin 2012.
11. Ordonez N. M., Shabala L., Gehring C., Shabala S.: Mol. Biol. *1016*, 95 (2013).
12. Tian H., Li Y., Shao H., Yu H. Z.: Anal. Chim. Acta *855*, 1 (2015).
13. Navratil T., Sestakova I., Marecek V.: Modern electrochemical methods XXXI (XXXI Moderni elektrochemicke metody). Jetrichovice, Czech Republic. May 23th- 27th, 2011. Book of Abtracts (Navratil T., Barek J., eds.), 91 (Lecture).
14. Novakova K., Navratil T., Sestakova I., Marecek V., Chylkova J.: Chem. Listy *108*, 219. (2014).

Voltammetric Determination of Homovanillic Acid on a Disposable Electrochemical Measuring Cell System with Integrated Carbon Composite Film Electrodes

Milan Libansky, Jiri Zima, Jiri Barek and Hana Dejmkova
Charles University in Prague, Faculty of Science, University Research Centre "Supramolecular Chemistry", Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, CZ-128 43, Prague, Czech Republic, E-mail: Libanskm@natur.cuni.cz

Abstract
Array of carbon composite film electrodes embedded in 96-well microtitration plate was applied for DPV determination of oxidizable tumour biomarker homovanillic acid (HVA). For the preparation of composite electrodes, graphitic conductive microparticles and nonconductive polystyrene were used. For the measurement, a buffer of pH 2 was selected as the optimum medium. In this medium, concentration dependences were measured; calculated HVA quantification limit was 0.3 μmol L^{-1} and detection limit was 0.1 μmol L^{-1}. Sorption of HVA on employed working electrode was examined in order to verify, if the current is influenced by the time period between cell filling and measurement. The sorption was not observed and current was stable even after 10 minutes.

Key words: Array of embedded carbon film electrodes, 96-well microtitration plate, Differential pulse voltammetry, Homovanillic acid, Tumor biomarkers.

Introduction

Homovanillic acid is important and well known dopamine metabolite of human body. Concentration level of HVA in human fluids is related to Parkinson disease [1], schizophrenia [2], suicide attempts [3], neuroblastic and carcinoid tumors [4]. Hence, the determination of this biomarker is important to secure human health from the critical diseases mentioned above. HVA levels are mostly determined in urine samples [5], usually by GC-MS [6]. Other analytical methods such as HPLC-MS [7], HPLC with fluorescence detection [8], HPLC-ED [9], CZE-ED [10] and voltammetric determination [11-13] can be also used.

Phenolic structure of homovanillic acid (Fig. 1) suggests its oxidizability under potentials accessible for carbon electrodes. The present study is focused on electrochemical determination of homovanillic acid at array of carbon composite film electrodes embedded in 96-well microtitration plate.

Properties of the solid carbon composite electrodes are comparable with properties of common conventional carbon electrodes. Carbon composites electrodes offer certain advantages such as low cost, relatively broad potential window (dependent on pH of the measured solution), high signal-to-noise ratio, and easy miniaturization. They can be easily chemically modified and mechanically or electrochemically pretreated to decrease problems with their passivation [14, 15]. Last but not least, these electrodes are usually made from non-toxic components and thus they are environment-friendly [16]. The working carbon electrodes based on composite materials can be used as voltammetric sensors for the determination of inorganic analytes [17], as well as of organic compounds [18].

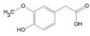


Fig. 1. Structure of homovanillic acid.

Experimental

Chemicals

For the fabrication of composite electrodes, graphite powder (CR-2, Grafit Tyn, Czech Republic) was used as conductive component; polystyrene (packaging EPS polystyrene) served as the nonconductive binder and toluene obtained in p.a. grade from Lachema, Czech as a volatile solvent.

The stock solution of 1 mmol L^{-1} HVA (fluorimetric reagent, Sigma Aldrich, USA) was prepared by dissolving the exact amount of the substance in deionized water and it was kept in the fridge.

Britton-Robinson (BR) buffers serving as supporting electrolyte were prepared by mixing of 0.2 mol L^{-1} of sodium hydroxide (Penta, Czech Republic) with a solution of phosphoric acid, boric acid and acetic acid (all Lachema, Czech Republic), 0.04 mol L^{-1} each. All chemicals used for buffer preparation were of analytical grade purity and used without further purification.

Testing of electrode was performed with 1 mmol L^{-1} potassium hexacyanoferrate(II) in 1 mol L^{-1} potassium chloride, both p.a. grade, Lachema, Czech Republic.

Apparatus

Voltammetric measurements were performed with portable potentiostat PalmSens (Palm Instruments, Netherlands), controlled by PSTrace 3.0.5 software. Differential pulse voltammetry (DPV) and cyclic voltammetry (CV) were carried out with carbon composite film electrode, platinum wire auxiliary electrode and Ag/AgCl (3 mol L^{-1} KCl) reference electrode (Eco-Trend Plus, Czech Republic), to which all potentials values are referred. Electrochemical cell system with integrated carbon composite film electrode is described below. The pH of the solutions was measured with a pH meter Jenway 3510 (Jenway, United Kingdom) with a combined glass electrode.

Procedures

Parameters of the DPV potential program were as follows: 0.1 s pulse width, 50 mV pulse height, 20 mV s^{-1} scan rate. CV measurements were performed at a scan rate of 50 mV s^{-1}. Each measurement was performed in a stand-alone disposable cell with integrated carbon composite electrode. All measurements were repeated five times and each measurement was performed in the new cell, unless stated otherwise. The quantification limits were calculated as the concentration of the analyte which gave a signal ten times higher than the standard deviation of the lowest evaluable concentration [19].

Preparation of the Electrochemical Cell System

The carbon ink for the fabrication of carbon composite film electrodes was prepared by thorough mixing of graphite and polystyrene in 9:1 ratio; subsequently 0.5 mL of toluene for each 0.1 g of total weight of solid particles was added. After complete dissolution of polystyrene, the electrode mixture was homogenized by intensive stirring. As the platform of a cell system, the 96-well microtitration plate (U96 Microwell plates natural, Schoeller Pharma Praha, Czech Republic) with round bottom was used. As a result, set of cells with diameter of approximately 8 mm and volume of approximately 400 µL was obtained. At the bottom of each well, a hole was drilled and metal contact (iron wire) was inserted. Subsequently, 80 µL of the carbon ink was applied into each cell. After the solvent evaporation, the cell set was ready for the measurement. The volume of the carbon ink is sufficient for the complete covering of the iron wire contact surface; mechanical damage leading to the exposal of the contact surface leads to the rapid increase of the cell current even at low potential [20, 21].

Results and Discussion

Testing of the Electrochemical Cell System

The electrochemical behaviour of the applicable electrode mixtures was investigated. Repeatability of measurements and reversibility of one electron reaction was studied by CV of the solution of hexacyanoferrate(II) in potassium chloride.

During the CV testing measurements, the same repeatability and electrochemical parameters were achieved as in our first experiments with this novel electrode system; under the same conditions in the same laboratory [21].

pH Dependences

The behaviour of HVA in media of pH in range from 2 to 12 was investigated. HVA provides one voltammetric peak in positive potential range corresponding to the oxidation of hydroxyl group, with the peak potential decreasing linearly with increasing pH according to the equation E (V) = -0.0496 pH + 0.7821. This trend can be connected with the change of the electrochemical reaction due to the dissociation of hydroxyl group and of carboxyl group in an alkaline medium. The current response is highest in the acidic media. For further measurements, pH 2 was selected as an optimum medium.

Sorption of Homovanillic Acid on the Working Electrode

Sorption of HVA on the employed composite electrodes was examined in order to verify, whether the peak height is influenced by the time period between cell filling and actual measurement or whether we are able to use adsorptive stripping voltammetry. Measurements were carried-out in non-stirred solutions of 100 µmol L^{-1} HVA and 10 µmol L^{-1} HVA in BR buffer of pH 2.

Current responses were measured after time period of 0, 1, 5 and 10 minutes. In both solutions, the electrode response did not show any trend up to 10 minutes. During this time period, value of RSD of the peak current was 1.3 % (0.4 µA) for the higher measured concentration and 3.8 % (0.1 µA) for the lower measured concentration.

It follows from the obtained results that it is not necessary to perform the determination immediately after dispensing the sample.

Concentration Dependence

Concentration dependences were measured under the optimal conditions in the concentration range from 100 to 0.8 µmol L^{-1} (Table I.). The dependences were linear within the whole concentration range. Measured DP voltammograms are shown in Fig. 2. Repeatability of the measurement was 6.6% (n = 15) for the lowest measured concentration in the calibration curve. The standard deviation of the regression line was 0.17 μA (R^2=0.999). Achieved limit of quantification of HVA standard was 0.3 μmol L^{-1}.

Table I.
Parameters of HVA concentration dependences measured by DVP at carbon composite film electrode in buffer of pH 2.

c (μmol L^{-1})	Slope (μA L mol^{-1})	Intercept [a] (μA)	R^2	LOD (μmol L^{-1})	LOQ (μmol L^{-1})
0.8 - 100	0.31	0.05	0.999	0.1	0.3

[a] Intercept is not significantly different from zero (α = 0.05).

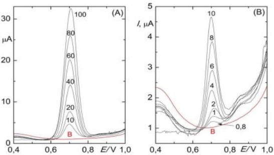


Fig. 2. DP voltammograms of HVA in BR buffer pH 2 at carbon composite film electrode. Corresponding concentration in μmol L^{-1} is displayed near the curves.

Conclusions

Voltammetric method for the determination of homovanillic acid, an oxidizable tumor biomarker, was developed using electrochemical measuring system with carbon composite electrode embedded in 96-well microtitration plate.

From the dependence of peak heights on supporting electrolyte composition, a buffer of pH 2 was selected as the optimum medium. In this medium, concentration dependences were measured; calculated HVA determination limit was 0.3 μmol L^{-1}.

Sorption of HVA on employed composite electrodes was examined. However, the electrode response was stable up to 10 minutes after putting the solution in the cell, which proves that it is not necessary to perform the determination immediately after dispensing the sample. Unfortunately, it means that adsorptive accumulation cannot be used for decreasing HVA determination limit.

Obtained results are fundamental basis for further research, which would include DPV and SWV determination of HVA standard in urine and determination of real samples with a pre-concentration step or with a preliminary separation step.

Acknowledgements
This research was realized in the frame of specific university research SVV. Financial support of the Grant Agency of the Czech Republic (project P206/12/G151) is gratefully acknowledged.

References

1. LeWitt P., Schultz L., Auinger P., Lu M., Parkinson Study Grp D.: Brain Res. *1408*, 88 (2011).
2. Suzuki E., Kanba S., Nibuya M., Adachi S., Sekiya U., Shintani F., Kinoshita N., Yagi G., Asai M.: Biol. Psychiatry *36*, 654 (1994).
3. Sher L., Mann J. J., Traskman-Bendz L., Winchel R., Huang Y. Y., Fertuck E., Stanley B. H.: J. Affect. Disord. *90*, 83 (2006).
4. Lionetto L., Lostia A. M., Stigliano A., Cardelli P., Simmaco M.: Clin. Chim. Acta *398*, 53 (2008).
5. Barco S., Gennai I., Reggiardo G., Galleni B., Barbagallo L., Maffia A., Viscardi E., De Leonardis F., Cecinati V., Sorrentino S., Garaventa A., Conte M., Cangemi G.: Clin. Biochem. *47*, 848 (2014).
6. Kaluzna-Czaplinska J., Socha E., Rynkowski J.: Med. Sci. Monitor *16*, CR445 (2010).
7. Park J. Y., Myung S. W., Kim I. S., Choi D. K., Kwon S. J., Yoon S. H.: Biol. Pharm. Bull. *36*, 252 (2013).
8. Tsunoda M., Mitsuhashi K., Masuda M., Imai K.: Anal. Biochem. *307*, 153 (2002).
9. Zydron M., Baranowski J., Bialkowski J., Baranowska I.: Sep. Sci. Technol. *40*, 3137 (2005).
10. Zhang H. T., Li Z., Zhang J. B., Zhang Y., Ye J. N., Chu Q. C., Zhang M. J.: Chem. Res. Chin. Univ. *29*, 850 (2013).
11. Revin S. B., John S. A.: Anal. Methods *4*, 348 (2012).
12. Selvaraju T., Ramaraj R.: Electrochim. Acta *52*, 2998 (2007).
13. Hatefi-Mehrjardi A., Ghaemi N., Karimi M. A., Ghasemi M., Islami-Ramchahi S.: Electroanalysis *26*, 2491 (2014).
14. Albertus F., Llerena A., Alpizar J., Cerda V., Luque M., Rios A., Valcarcel M.: Anal. Chim. Acta *355*, 23 (1997).
15. Navratil T.: Curr. Org. Chem. *15*, 2996 (2011).
16. Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J.: Electroanalysis *19*, 2003 (2007).
17. Noskova G. N., Zakharova E. A., Kolpakova N. A., Kabakaev A. S.: J. Solid State Electrochem. *16*, 2459 (2012).
18. Prasek J., Huska D., Jasek O., Zajickova L., Trnkova L., Adam V., Kizek R., Hubalek J.: Nanoscale Res. Lett. *6*, 385 (2011).
19. Inczedy J.: *Compendium of Analytical Nomenclature (Definitive Rules 1997)*. Blackwell Science, Santa Fe 1998.
20. Dejmkova H., Libansky M., Zima J., Barek, J. (Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta): CZ 304 176 (2013).
21. Libansky M., Zima J., Barek J., Dejmkova H.: Electroanalysis *26*, 1920 (2014).

Electrochemical Reduction of Quinoxaline Derivatives – *in situ* EPR/UV-VIS-NIR Spectroelectrochemical Study

Karol Lušpai, Peter Rapta, Zuzana Barbieriková, and Vlasta Brezová
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, E-mail: karol.luspai@stuba.sk

Abstract
In present study we focused on the EPR/UV-VIS-NIR spectroelectrochemically investigated cathodic reduction of various quinoxaline derivatives. In case of 10-ethyl-7*H*,10*H*-pyrido[2,3-*f*]quinoxalin-7-one and ethyl 10-ethyl-7-oxo-7*H*,10*H*-pyrido[2,3-*f*]quinoxaline-8-carboxylate derivatives, cathodic reduction represents a reversible one-electron process associated with the generation of corresponding radical anion. However in case of 10-ethyl-7-oxo-7H,10H-pyrido[2,3-f]quinoxaline-8-carboxylic acid derivatives there are two independent cathodic steps. According to results from spectroelectrochemistry, the first irreversible process is associated with the reduction on pyridone ring and the second reversible step is the reduction on π-electron deficient pyrazine moiety besides forming of the corresponding anion radical.

Key words: quinoxalines, 10-ethyl-7-oxo-7*H*,10*H*-pyrido[2,3-*f*]quinoxaline derivatives, cyclic voltammetry, EPR/UV-VIS-NIR spectroelectrochemistry.

Introduction
Quinoxaline derivatives are in the centre of scientific interest due to their interesting properties with mainly biological impact. Antiviral, antimicrobial, anti-tumor and anti-protozoan effects of several quinoxaline derivatives were recently reported [1]. Additionally, several quinoxalines possesses suitable properties for the construction of organic light-emitting diodes [2] and photovoltaic devices with improved stability [3]. However, the carcinogenic activity was found on tricyclic quinoxalines [4]. Moreno et al. reported the effect of molecular structure on the reduction potential as well as on the antimicrobial activity of various quinoxalines. Higher antibacterial activity is observed at derivatives with less negative reduction potential [5]. Group of novel synthesized 10-ethyl-7-oxo-7H,10H-pyrido[2,3-f]quinoxaline derivatives with the substitutions at positions 2,3 and 8 was synthesized recently [6] and their spectral and photochemical properties were investigated [7]. Because the redox behaviour of *N*-heterocyclic compounds can significantly influence their potential biological activity, this study was focused on the electron transfer processes of studied derivatives (Table I) and their investigation by cyclic voltammetry and EPR/UV-VIS-NIR spectroelectrochemistry [8]. Spectroelectrochemistry is combination of conventional voltammetry with different spectral techniques where every spectral method brings one more dimension to the electrochemical experiment. Therefore this method is very useful for studying of complex reactions mechanisms with variety of consecutive reactions.

Experimental
Studied quinoxaline derivatives were obtained from Department of Organic Chemistry of our university [6]. For cyclovoltammetric as well as for spectroelectrochemical experiments, the dry *N,N*-dimethylformamide (DMF) SeccoSolv® was used as a solvent. Tetrabutylammonium hexafluorophosphate ($TBAPF_6$) from Sigma-Aldrich dried in vacuum oven for 16h at 70°C serves as the supporting electrolyte. The ferrocene (Sigma-Aldrich) was used as the internal potential standard and all reported potentials are referred vs. ferrocenium/ferrocene (Fc^+/Fc)

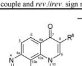
redox couple. All cyclovoltammetric experiments were performed at room temperature under inert argon atmosphere. A standard three electrode arrangement with platinum wire as the working electrode, a platinum (Pt) wire as the counter electrode and silver (Ag) wire as the pseudo-reference electrode was used. The sample concentration in DMF was 1.10^{-4} M for cyclic voltammetry or 1.10^{-3} M for EPR/UV-VIS-NIR spectroelectrochemistry. Concentration of supporting electrolyte ($TBAPF_6$) was 0.2 M and 0.5 M for cyclic voltammetry and for EPR/UV-VIS-NIR spectroelectrochemical experiments, respectively. A Heka PG390USB (Lambrecht, Germany) potentiostat with PotMaster 2.73 software package served for the potential control in cyclovoltammetric studies and Heka PG285 (Lambrecht, Germany) potentiostat with the same software equipment was used for the spectroelectrochemical experiments. The spectroelectrochemical experiments were carried out in a special flat spectroelectrochemical cell suitable for optical transmission EPR resonator ER 4104 OR-C-9609 and the cell was placed directly in the EPR resonator cavity. The working electrode was laminated platinum mesh electrode with small hole in the foil coincident with the light beam, limiting the active surface area of the electrode. A Pt wire counter (auxiliary) electrode and an Ag wire pseudo-reference electrode were used. EPR spectra were recorded using the X-band EPR spectrometer Bruker EMX (Bruker, Germany) with 100 kHz field modulation and corresponding software package Bruker WinEPR Acquisition. The UV-VIS-NIR spectra were recorded using the diode-array spectrometer Avantes AvaSpec (Avantes, Netherlands) with AvaSoft 7.7 software package. This spectrometer was connected to the optical EPR resonator cavity by optical fibers. A deuterium-halogen lamp DH 2000 (Sentronic, Germany) was used as a light source and connected by optical fibers to the EPR resonator. All spectrometers were synchronised together by trigger pulses received from the potentiostat, to simplify the assignment of potentials to the recorded spectra.

Results and discussion

Quinoxalines possessing a hydrogen atom or an ethyl carboxylate group at the C8 position (derivatives 1a-c and 2a-c in Table I) show during cyclovoltammetric reduction one reversible cathodic peak, as illustrated in Fig. 1 for the reduction of derivatives 1a, 2a and 2b.

Table I.

Overview of studied quinoxalines, label of derivatives and reduction potentials corresponding to the first (E_1) or second (E_2) reduction wave. All the potentials are related to Fc^+/Fc redox couple and *rev./irev.* sign means the reversibility/irreversibility of the voltammetric peak.



Label	R^2	R^3	R^8	E_1/ V	E_2/ V
1a	H	H	H	$-1,93^{rev}$	-
1b	CH_3	CH_3	H	$-2,14^{rev}$	-
1c	C_6H_5	C_6H_5	H	$-1,88^{rev}$	-
2a	H	H	$COOC_2H_5$	$-1,83^{rev}$	-
2b	CH_3	CH_3	$COOC_2H_5$	$-2,03^{rev}$	-
2c	C_6H_5	C_6H_5	$COOC_2H_5$	$-1,78^{rev}$	-
3a	H	H	COOH	$-1,64^{irev}$	$-2,02^{rev}$
3b	CH_3	CH_3	COOH	$-1,85^{irev}$	$-2,25^{rev}$
3c	C_6H_5	C_6H_5	COOH	$-1,70^{irev}$	$-2,08^{rev}$

The presence of ethyl carboxylate group at C8 atom of the pyridone moiety (2a-c) results into slight positive potential shift (~100 mV) in comparison to the compounds with hydrogen at C8 carbon (1a-c). The substitution at the C2 and C3 carbons with methyl groups caused a shift of reduction potentials (~200 mV) to more negative values (1b, 2b, 3b), while the presence of phenyl groups at these positions resulted in a slight positive shift of about 50 mV for 1-3c derivatives due to the extended π-system, as shown in Table I.

From spectroelectrochemical measurements on model compound 2b possessing an ethyl carboxylate group at the C8 position several new absorption bands 547, 867 nm and the simultaneous generation of a radical anion evidenced by EPR were observed in the region of the first reversible cathodic voltammetric peak (Fig. 1 right, Fig. 2a).

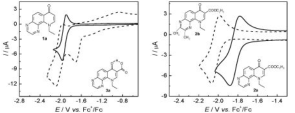


Fig. 1. Cyclic voltammograms of 0.1 mM quinoxalines in DMF containing 0.2 M $TBAPF_6$ (scan rate 0.1 V s^{-1}); left: derivatives 1a (solid line) and 3a (dashed line); right: derivatives 2a (solid line) and 2b (dashed line).

For quinoxalines with carboxylic acid substituent (3a-c in Table I) the cyclic voltammograms show more complex reduction behaviour, exhibiting two cathodic peaks as illustrated in Fig. 1 left for derivative 3a. The first reduction process is irreversible, followed by second one exhibiting a reversible behaviour at the scan rate of 100 mV s^{-1}. The voltammetric response is on face of it similar to the previously studied selenadiazoloquinolones and nitroquinolones with amino hydrogen at the nitrogen of the enaminone system [9,10,11], where the first cathodic peak was irreversible because of the follow-up sigma-dimerization. However, in the case of the investigated quinoxalines, a sigma-dimerization process is suppressed due to the ethyl-substitution at the nitrogen N10 (see structure in Table I) of the pyridone ring similarly as for previously studied selenadiazoloquinolones and nitroquinolones with ethyl-substituted nitrogen [9,10,11]. By measuring at different scan rates as well as by repeated cycling we discovered that in case of quinoxalines 3a-c both electron-transfer processes are diffusion controlled and independent in the mechanism. This is supported by UV-VIS-NIR spectroelectrochemistry (Fig. 2b). More complex behaviour indicates consecutive chemical reactions and such behaviour is on the basis of the previous measurements associated with the presence of a carboxylic group at C8. Considering the data in the literature, the interaction of the oxygen atom at the pyridone C=O group with the acidic hydrogen of COOH substituent at the adjacent carbon results into the formation of a pyridone reduction centre via a six-member ring [12]. Moreover previous cyclovoltammetric investigations of the quinolone antibacterial drug ciprofloxacin showed two cathodic reduction peaks at –0.81 and –1.25 V vs. Ag/AgCl, attributed to the reduction of piperazinyl and pyridone moieties [12,13]. The latter potential correlates well with the irreversible reduction step of the quinoxaline carboxylic acids observed in our study. Consequently, we assume that the first cathodic reduction takes place on the newly-formed pyridone redox site.

To unravel the mechanism of the reduction processes for carboxylic acids 3a-c, *in situ* EPR/UV-VIS-NIR spectroelectrochemistry was used. The reduction at the first irreversible cathodic peak of 3a is accompanied by the emergence of a new optical band around 400 nm, and a decrease of the band at 350 nm found for the initial molecule 3a (Fig. 2b blue lines). No radical formation was observed at the first cathodic peak.

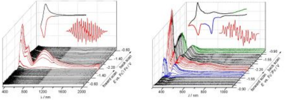


Fig. 2. UV-vis-NIR spectra detected simultaneously during the *in situ* cathodic reduction of a) 2b and b) 3a (scan rate 2.5 mV.s^{-1}, 0.5M $TBAPF_6$ in DMF). Inset: The representative EPR spectra of observed paramagnetic species and corresponding voltammograms.

Interestingly, in the region of the second reversible voltammetric peak, the band at 400 nm remains unchanged, and three new bands at 428, 535 and 655 nm arise independently on the band at 400 nm (Fig. 2b red lines). This is simultaneously coupled with the development of an EPR signal (see inset in Fig. 2b). The hyperfine pattern of the radicals formed at the second reduction peak of the quinoxalines from group 3 possessing a COOH group at C8 is very close to the pattern of the corresponding radical monoanions of the derivatives from groups 1 and 2. This all confirms the presence of two rather independent redox sites within the 3a molecule, namely the newly-formed six-member ring on the pyridone moiety with the COOH substituent at the position C8 and pyrazine sub-unit which remains unchanged during the first irreversible reduction step and associated with the second reversible step.

The reoxidation of the product formed at the first irreversible cathodic peak of 3a was observed at a strongly anodically shifted potential, where, upon oxidation, a decrease in the 400 nm optical band intensity was found (Fig. 2b, green lines).

On the basis of all measurements, we assigned the first irreversible reduction peak to the reduction process on the oxo-group of the pyridone ring, followed by a second reversible reduction step on the π-electron deficient pyrazine moiety, coupled with the generation of corresponding radical monoanions.

Conclusions

The EPR/UV-VIS-NIR spectroelectrochemistry as a unique technique for the simultaneous monitoring of the redox processes was successfully applied to a relatively complex problem, namely the reduction of quinoxaline carboxylic acid derivatives. Whilst the reduction of the quinoxalines with unsubstituted pyridone ring (1a, 1b, 1c) and 8-ethylcarboxylates (2a, 2b, 2c) exhibits a reversible one-electron reduction process associated with formation of radical monoanion, the reduction of 8-carboxylic acid substituted quinoxaline derivatives (3a, 3b, 3c) is more complex. Their spectroelectrochemical investigation revealed two reduction steps, first irreversible reduction peak was assigned to the reduction of newly-formed six-member ring on the pyridone moiety with the COOH substituent at the position C8. The second reversible reduction step is associated with the reduction process on the π-electron deficient pyrazine ring, which is coupled with the generation of the corresponding radical anions. The role of carboxylic substituent in the redox process enables the interaction with the 7-oxo group of the pyridine ring, which can possibly determine the character of their potential biological activities.

Acknowledgement

This work was financially supported by the Scientific Grant Agency of the Slovak Republic project VEGA/1/0307/14. This contribution was financially supported by K. Lušpai and his Anti-EU Projects Initiative "*Time for research in lab not in office*". M. Bella and V. Milata from Department of Organic Chemistry our university are gratefully acknowledged for synthesis of studied quinoxaline derivatives.

References

1. Burguete A., Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D., Ancizu S., Villar R., Solano B., Moreno E., Torres E., Pérez S., Aldana I., Monge A.: Chem. Biol. Drug Design *77*, 255 (2011).
2. Achelle S., Baudequin C., Plé N.: Dyes Pigments *98*, 575 (2013).
3. Li S., Li A., Yu J., Zhong A., Chen S., Tang R., Deng X., Qin J., Li Q., Li Z.: Macromol. Rapid Comm. *34*, 227 (2013).
4. Bella M., Milata V., Larina L.I.: J. Heterocycl. Chem. *49*, 293 (2012).
5. Moreno E., Pérez-Silanes S., Gouravaram S., MacHaram A., Ancizu S., Torres E., Aldana I., Monge A., Crawford P.W.: Electrochim. Acta *56*, 3270 (2011).
6. Saloň J., Milata V., Prónayová N., Leško J.: Coll. Czech. Chem. Comm 66, 1691 (2001)
7. Bella M., Milata V.: Tetrahedron *70*, 4814 (2014).
8. Lušpai K., Staško A., Lukeš V., Dvoranová D., Barbieriková Z., Bella M., Milata V., Rapta P., Brezová V.: J. Solid State Electrochem. *19*, 113 (2015).
9. Staško A., Lušpai K., Barbieriková Z., Rimarčík J., Vagánek A., Lukeš V., Bella M., Milata V., Zalibera M., Rapta P., Brezová V.: J. Phys. Chem. A *116*, 9919 (2012).
10. Lušpai K., Rapta P., Brezová V., Staško A.: *Modern Electrochemical Methods XXXII, Jetřichovice, 21 May – 25 May 2012*, Book of Abstracts (Navrátil T., Fojta M.), p. 63.
11. Lušpai K., Barbieriková Z., Malček M., Bučinský L., Staško A., Bella M., Milata V., Rapta P., Brezová V.: Curr. Org. Chem. *17*, 2427 (2013).
12. Saha D.K., Padhye S., Anson C.E., Powell A.K.: Inorg. Chem. Comm. *5*, 1022 (2002).
13. Tom R.T., Suryanarayanan V., Reddy P.G., Baskaran S., Pradeep T.: Langmuir *20*, 1909 (2004).

Determination of Selected Components of Human Urine by Electrophoresis in Short Capillary with Hydrodynamic Sampling Controlled by Pressure Pulse (Stanovení vybraných složek lidské moči elektroforézou v krátké kapiláře s hydrodynamickým dávkováním řízeným tlakovým pulsem)

Anna Makrlíková [a], František Opekar [a], and Petr Tůma [b]
[a]Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 2030, CZ-128 43 Prague 2, Czech Republic, E-mail: opekar@natur.cuni.cz
[b]Charles University in Prague, Third Faculty of Medicine, Institute of Biochemistry, Cell and Molecular Biology, Ruská 87, CZ-100 00 Prague 10, Czech Republic, E-mail:petr.tuma@lf3.cuni.cz

Abstract
A hydrodynamic sample introduction method controlled by pressure pulse has been proposed for short-capillary electrophoresis. In the method, the separation electrolyte flushes sample from the loop of a six-way sampling valve and is carried to the injection end of the capillary. A short pressure impulse is generated in the electrolyte stream at the time when the sample zone is at the inlet of capillary, leading to injection of the sample into the capillary. Then the electrolyte flow is stopped and the separation voltage is turned on. The amount of sample introduced to the capillary is controlled by the duration of the pressure pulse. The method was used in the determination of ammonia, creatinine, uric acid and hippuric acid in human urine. The determination was performed in a capillary with an overall length of 10.5 cm, in two separation electrolytes with compositions 50 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5.1) and 1 M acetic acid + 1.5 mM crown ether 18-crown-6 (pH 2.4). A dual contactless conductivity/UV spectrometric detector was used for the detection.

Key words: Capillary electrophoresis, Short capillary, Hydrodymanic injection, Human urine, Creatinine, Histidine, Uric acid, Hippuric acid, Ammonia ions.

Úvod

Kapilární elektroforéza (CE) je z důvodu vysoké separační účinnosti, krátké doby separace, a minimálních požadavků na množství vzorků i činidel ideální technikou pro separaci vzorků se složitou matricí. Ve standardních (komerčně dostupných) CE aparaturách jsou používány kapiláry o délce několika desítek cm a doba separace je zpravidla 5 až 30 minut. Při řešení některých analytických problémů, (sledování kinetiky (bio)chemických reakcí, monitorování velkých souborů vzorků, použití multi-dimenzionálních separačních technik) je žádoucí, aby doba separace byla co nejkratší; i malé zvýšení rychlosti separace přispívá ke zkrácení doby analýzy, což ovlivňuje počet analyzovaných vzorků za jednotku času a tím i cenu analýzy.

Účinnou technikou pro zvýšení rychlosti separace je zkrácení separační dráhy. Jednou z možností je provedení elektroforézy na skleněném nebo plastovém mikročipu, kdy je délka separační dráhy řádu jednotek cm a doby analýz v jednotkách až desítkách sekund [1-3]. Praktickou nevýhodou tohoto způsobu separace je nutnost použít speciální separační systém – elektroforetický čip. Výhodnější se z tohoto hlediska jeví použití standardních elektroforetických kapilár, jejichž délku, vnitřní průměr a materiál lze snadno volit podle potřeby; důležitá je i jejich obecně snadná dostupnost a podstatně nižší cena.

Technicky jednoduché řešení umožňující zkrácení separační dráhy je dávkování vzorku do výstupního konce kapiláry (Short-End Injection, SEI), tj. do místa, které je blízko k detektoru; k tomu lze často využít komerční instrumentace [4]. Větší experimentální variabilitu však umožňují specializované aparatury pro provádění separací přímo v krátkých kapilárách [5]. Principiálním experimentálním problémem při separacích v krátkých kapilárách je jejich omezená pohyblivost. Proto musí být aparatura navržena tak, aby všechny potřebné experimentální kroky, především dávkování vzorku a promývání kapiláry, bylo možno provést tak, aby s kapilárou nebylo nutno pohybovat.

Dávkování vzorku do separační kapiláry běžné délky, tím spíše však do krátké kapiláry, je obecně kritickým bodem pro dosažení vysokoúčinné elektroforetické separace. Jednou ze snadno realizovatelných možností je dávkování založené na principu popsaném v práci [6]. Dávkovací konec kapiláry je volně vsunut do trubičky, jíž po dobu dávkování proudí základní elektrolyt (BGE), do kterého je pomocí šesticestného dávkovacího ventilu injektována ze smyčky zóna vzorku. Během průtoku zóny vzorku kolem konce kapiláry dochází k jeho nadávkování do kapiláry. Tohoto principu bylo využito při elektrokinetickém dávkování vzorků energetických nápojů [7,8]. Při elektrokinetickém dávkování je však množství nadávkovaných látek ve vzorku závislé na jejich elektroforetické mobilitě a na celkové vodivosti a složení matrice vzorku. Uvedené problémy řeší tlakem řízené dávkování popsané v této práci. Jeho praktická aplikovatelnost je demonstrována na separaci a stanovení některých složek lidské moče.

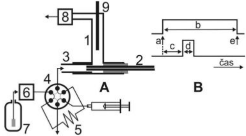
Experimentální část

Dávkovací nádobka elektroforetické aparatury (1), obr. 1A, je sestavena z komerčně dostupných plastových dílů používaných pro spojování hadiček malých průměrů. Separační kapilára (2) je těsně vsunuta do pomocné PTFE trubičky, která zajišťuje její pevnou polohu v dávkovací nádobce. Dávkovací konec kapiláry je vsunut asi 1 mm hluboko do přívodní PTFE trubičky (3), jíž po dobu dávkování protéká roztok BGE se zónou vzorku. Ventil (8) na výstupu z dávkovací nádobky uzavírá výstup z nádobky. Tím je v aparatuře generován tlakový puls, jímž je vzorek nadávkován do kapiláry.

Časová sekvence dávkování je znázorněna na obr. 1B. Dávkování je zahájeno zapnutím lineární pumpy pumpující BGE a současným přepnutím dávkovacího ventilu (4) z polohy „load“ (plnění dávkovací smyčky) do polohy „inject“. Po určité době, nutné k tomu, aby se zóna vzorku dostala proudem BGE k dávkovacímu konci kapiláry, je na definovanou dobu aktivován uzavírací ventil a takto generovaným tlakovým pulsem je vzorek nadávkován do kapiláry. Lineární pumpa je zapnuta tak dlouho, aby se zóna vzorku dostala dostatečně daleko od dávkovacího konce kapiláry. Po vypnutí pumpy je zapnut vysokonapěťový zdroj a zahájena separace. Činnost jednotlivých částí aparatury byla přes jednoduchá interface řízena počítačovým programem.

Separace byly prováděny ve standardní křemenné kapiláře, 50 μm *id*, 363 μm *od*, o délce celková/k detektoru 10,5/8 cm. Elektroforetická aparatura byla sestavena v laboratoři a je detailně popsaná v práci [8]. Separační kapilára je z dávkovací části vedena k duálnímu C^4D/UV (C^4D – bezkontaktní vodivostní detektor) detektoru a ke koncové nádobce s vysokonapěťovou elektrodou vysokonapěťového zdroje. Separace byly prováděny při separačním napětí 5 kV.

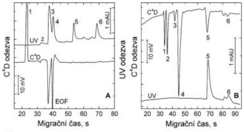
Vzorky moče získané od zdravého dobrovolníka byly analyzovány v den odběru. Moč byla před nadávkováním do kapiláry pouze filtrována pomocí jednorázového stříkačkového PVDF filtru o velikosti pórů 0,45 μm a následně zředěna 50× nebo 100× deionizovanou vodou. Separace moče byly prováděny ve dvou BGE, 50 mM MES + 5 mM NaOH (pH 5,1) a 1 M HAc + 1,5 mM 18-crovn-6 (pH 2,4). Dále uváděné výsledky byly získány při optimalizovaných dávkovacích parametrech, viz obr. 1B: doba zapnutí lineární pumpy, 10 s, čas (a), průtok 1 mL/min; doba zpoždění aktivace uzavíracího ventilu, 5 s, čas (c); doba trvání uzavření uzavíracího ventilu, tj. doba dávkování, 0,5 s, čas (d).



Obr. 1. Schema dávkovací části elektroforetické aparatury (A) a schema časového průběhu dávkovací sekvence (B).
(A): 1 – dávkovací nádobka sestavená z plastových T a L dílů používaných pro spojování hadiček malých průměrů, 2 – separační kapilára těsně zasunutá do 1/16" *od* × 0,01" *id* PTFE trubičky, 3 – přívodní PTFE hadička 1/16" *od* × 0,031" *id*, 4 – šesticestný dávkovací ventil, 5 – dávkovací smyčka o objemu 40 μL, 6 – lineární pumpa pumpující po dobu dávkování základní elektrolyt, 7 – zásobník BGE, 8 – uzavírací ventil, 9 – zemnicí elektroda vysokonapěťového zdroje.
(B): a – iniciace dávkování, b – doba zapnutí lineární pumpy, c – zpoždění uzavíracího ventilu, d – doba uzavření uzavíracího ventilu, tj. doba dávkování vzorku do kapiláry, e – zapnutí vysokonapěťového zdroje a zahájení separace.

Výsledky a diskuse
Elektroferogramy vzorků moče získané v obou BGE a současně detegované oběma detekčními systémy jsou na obr. 2. Na záznamu z C^4D v BGE o složení 50 mM MES + 5 mM NaOH byl registrován pík nerozdělených anorganických iontů, pík histidinu a kreatininu. Na záznamu z UV detektoru jsou za píkem nenabitých látek nesených elektroosmotickým tokem (EOF) dobře oddělené píky kyseliny močové a hippurové. Ze záznamu v tomto BGE bylo možno vyhodnotit a kvantifikovat histidin, kreatinin a kyselinu močovou a hippurovou; výsledky jsou v tabulce I.

V BGE o složení 1 M HAc + crown ether 18-crown-6 jsou na záznamu z C^4D dobře oddělené anorganické ionty a kreatinin. Na záznamu UV detektoru je dobře vyhodnotitelný pouze pík kreatininu. V tomto kyselém BGE pochopitelně nelze stanovit kyseliny a pík histidinu je v obou detektorech špatně oddělen od jiné složky moči, pravděpodobně od svých methyl-derivátů, jejichž detekce v kyselém BGE je citlivější než v BGE neutrálním. Z elektroferogramu v tomto BGE byly kvantifikovány amonné ionty a kreatinin; výsledky jsou v tabulce II.



Obr. 2. Části elektroferogramů vzorku moče registrované C^{4}D a UV detektorem.
(A): moč naředěná vodou 1:50, BGE 50 mM MES + 5 mM NaOH, separační napětí/proud 5 kV/3 μA. Identifikace píků - nerozdělené anorganické ionty (1), histidin (2), kreatinin (3), neutrální látky absorbující UV záření (4), kyselina močová (5), kyselina hippurová (6).
(B): moč naředěná vodou 1:100, BGE 1 M HAc + crown ether 18-crown-6, separační napětí 5 kV/13 μA. Identifikace píků - NH_4^+ (1), K^+ (2), Ca^{2+} (3), Na^+ (4), kreatinin (5), histidin (6).

Tabulka I.
Stanovení kreatininu, histidinu, kyseliny močové a hippurové (v závorce je uvedena detekční metoda). Vzorek – lidská moč/voda 1:50, BGE 50 mM MES + 5 mM NaOH, separační napětí/proud 5 kV/3 μA.

Analyt	Migrační čas, s	Koncentrace, mg/L	RSD, %	Rozsah, mg/L	N^a, m^{-1}
Histidin (C^{4}D)	32 ± 1	67 ± 7	5,1	40 – 330	136200
Histidin (UV)		61 ± 6	4,6		-
Kreatinin (C^{4}D)	36 ± 1	1031 ± 233	10,2	670 – 2150	52300
Kreatinin (UV)		1209 ± 364	13,7		24900
Kys. močová (UV)	54 ± 3	392 ± 20	2,3	40 – 670	118000
Kys.hippurová (UV)	69 ± 5	539 ± 33	2,7	50 –1670	150000

a) Počet teoretických pater byl počítán ze vztahu $N = 5{,}54\,(t_M/w_{1/2})^2$, kde t_M je migrační čas a $w_{1/2}$ je šířka piku v poloviční výšce.

Tabulka II.
Stanovení amonných iontů a kreatininu (v závorce je uvedena detekční metoda). Vzorek – lidská moč/voda 1:100, BGE 1 M HAc + 1,5 mM crown ether 18-crown-6, separační napětí/proud 5 kV/13 μA.

Analyt	Migrační čas, s	Koncentrace, mg/L	RSD, %	N, m^{-1}
NH_4^+	34 ± 0	515 ± 95	8,3	132000
Kreatinin (C^{4}D)	68 ± 0	1666 ± 75	2,0	95600
Kreatinin (UV)		1717 ± 159	4,2	62700

Ke stanovení uvedených látek v obou BGE byla použita metoda standardního přídavku, výsledky jsou mediánem ze tří měření; vyhodnocovány byly plochy píků. Je vidět, že v mezích intervalu spolehlivosti poskytují C^4D a UV detekce stejné výsledky u těch analytů, které lze detegovat oběma metodami. V předposledním sloupci tabulky I je uveden rozsah koncentrací, ve kterých se uvedená složka může v lidské moči vyskytovat za normálních fyziologických podmínek [9]; zjištěné koncentrace všech testovaných složek do uvedených rozsahů spadají.

Závěr

Navrženo je jednoduché zařízení pro tlakem řízené dávkování do krátké separační kapiláry, které je vhodnou alternativou k častěji používanému dávkování elektrokinetickému. Zařízení umožňuje snadnou změnu dávkovacích podmínek změnou jediného parametru, dobou trvání tlakového pulsu. Z vysokých hodnot separačních účinností v tabulkách I a II je zřejmé, že tento způsob dávkování k rozšiřování píků výrazněji nepřispívá. Zařízení bylo použito pro rychlé stanovení některých složek v lidské moči. Doba separace sledovaných složek, amonné ionty, kreatinin, histidin, kyselina močová a hippurová, byla kolem 70 s. Snaha o stanovení všech sledovaných látek v jednom BGE při použití duální detekce však nebyla úspěšná, bylo nutno použít dvou separačních pufrů. Zařízení je využitelné i pro rychlý screening obsahu ostatních anorganických iontů v lidské moči.

Poděkování

Autoři děkují za finanční podporu Univerzitě Karlově, projekt SVV 260205 a PRVOUK 31 a GAČR, grant 15-03139S.

Literatura

1. Shang F. J., Guihen E., Glennon J. D.: Electrophoresis *33*, 105 (2012).
2. Guihen E., O'Connor W. T.: Electrophoresis *31*, 55 (2010).
3. Roman G. T., Kennedy R. T.: J. Chromatogr. A *1168*, 170 (2007).
4. Glatz Z.: Electrophoresis *34*, 631 (2013).
5. Opekar F., Coufal P., Štulík K.: Chem. Rev. *109*, 4487 (2009).
6. Tůma P., Opekar F., Jelínek I.: J. Chromatogr. A *883*, 223 (2000).
7. Vochyánová B., Opekar F. Tůma P., Štulík K.: Anal. Bioanal. Chem. *404*, 1549 (2012).
8. Vochyánová B., Opekar F., Tůma, P.: Electrophoresis *35*, 1660 (2014).
9. Putnam D. F.: Report No. NASA CR-1802, *Composition and concentrative properties of human urine*, McDonnell Douglas Astronautic company, Huntington Beach, Calif., http://ntrs.nasa.gov/archive/nasa/casi.ntrs.nasa.gov/19710023044.pdf. Downloaded Dec.10, 2014.

Electrochemical Oxidation of Brominated Phenols and GC-MS Analysis of their Oxidation Products
(Elektrochemická oxidace bromovaných fenolů a GC-MS analýza jejich oxidačních produktů)

Eva Marková, Pavla Kučerová, Hana Švecová, Jakub Táborský, David Jirovský, Jana Skopalová, and Petr Barták
Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic, E-mail: markova.e@email.cz

Abstract
Electrochemical oxidation of four brominated phenols (2-bromophenol, 3-bromophenol, 4-bromophenol, and pentabromophenol) was studied using voltammetry on glassy carbon electrode and controlled potential electrolysis on platinum gauze electrode in 90% (v/v) short-chain primary alcohols. Oxidation products obtained by controlled potential electrolysis were analysed using gas chromatography with mass spectrometry. Several oxidation products were identified and their structures were proposed.

Key words: Brominated phenols, Cyclic voltammetry, Oxidation, Dimerization, Gas Chromatography, Mass spectrometry.

Úvod

Halogenované fenoly tvoří rozsáhlou skupinu elektroaktivních sloučenin. Elektrochemická oxidace fenolů a jejich derivátů je značně komplikovaný proces a výsledné oxidační produkty jsou závislé na použitých experimentálních podmínkách, jako jsou acidita prostředí, rozpouštědlo, elektrodový potenciál a materiál elektrody. Oxidace chlorovaných fenolů byla studována s využitím nejrůznějších elektrodových materiálů, jako jsou zlato[1], platina [2,3], bórem dopovaný diamant [4] a další vodivé formy uhlíku [5-7]. Mechanismus oxidace závisí na stupni halogenace a pozici příslušného halogenu na aromatickém kruhu [1,8]. Bylo prokázáno, že oxidace fenolů a jejich halogenovaných derivátů je provázena vznikem fenoxy radikálů, které mohou být dále oxidovány na oligomery resp. polymery. Tyto sloučeniny vytváří na povrchu pracovní elektrody povlak, který pasivuje její povrch [1,2,4-7]. Spojením radikálů vazbou C-O-C vznikají polymery etherového typu. Tento mechanismus převládá při oxidaci fenolů v alkalickém prostředí. Pro oxidaci v kyselém prostředí je typické spojení radikálů vazbou C-C a tvorba chinoidních polymerů [9,10].

Proces elektrochemické oxidace byl doposud studován podrobněji pouze u chlorovaných fenolů, zatímco o oxidaci bromovaných fenolů existuje jen velmi málo informací [11-13].

Cílem této práce je studium produktů elektrochemické oxidace různě substituovaných bromovaných fenolů. Oxidace byla prováděna na velkoplošné platinové elektrodě v prostředí obsahujícím 90% primární alkohol (metanol, etanol, propanol, butanol). Byl sledován vliv struktury výchozích látek na výsledné oxidační produkty.

Experimentální část

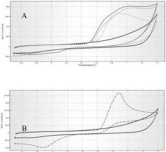
Voltametrická měření

Voltametrická měření byla provedena v nádobce o objemu 50 ml. Základní elektrolyt byl tvořen Britton-Robinsonovým pufrem (pH = 6) a primárním alkoholem (metanol, etanol, propanol, butanol) v objemovém poměru 1:9. Koncentrace bromovaného fenolu v měřeném roztoku byla $2 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}. Měření bylo provedeno metodou cyklické voltametrie na přístroji Autolab PGSTAT 128N v tříelektrodovém zapojení s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku, referentní kalomelovou a pomocnou platinovou elektrodou, s rychlostí polarizace 0,1 V s^{-1}.

Potenciostatická elektrolýza bromovaných fenolů
Elektrolýza bromovaných fenolů ($c = 2 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}, celkový objem 50 ml) byla prováděna při konstantním potenciálu E_a = 1,1 V. Elektrolýza probíhala v míchaném roztoku po dobu 60 min. Základní elektrolyt byl tvořen Britton-Robinsonovým pufrem (pH = 6) s $NaClO_4$ o koncentraci 0,2 mol l^{-1} a alkoholem (metanol, etanol, propanol, butanol) v poměru 1:9. Roztoky po elektrolýze byly odpařeny na vodní lázni a poté extrahovány do ethylacetátu. Po extrakci byl 1 mL organické fáze odebrán do vialky pro GC-MS analýzu na plynovém chromatografu HP 6890 Series s hmotnostním spektrometrickým detektorem Agilent 5973 N. Separace probíhala na křemenné kapilární koloně ZB-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 mm) s heliem jako nosným plynem. Teplotní program byl nastaven na 50 °C - 2 min. – 10 °C/min. – 300 °C - 15 min.

Výsledky a diskuse
Voltametrické chování
Cyklické voltamogramy 2-bromfenolu (2-BF), 3-bromfenolu (3-BF), 4-bromfenolu (4-BF), (Obr. 1A), změřené v 90% metanolu na elektrodě ze skelného uhlíku, ukazují anodický signál při potenciálu kolem 0,8 V. Anodické proudové odezvy 2-BF a 4-BF mají tvar dvojvlny na rozdíl od lépe definovaného píku 3-BF. Odlišnost chování 2-BF a 4-BF od 3-BF je patrná také na katodické větvi voltamogramu. Na rozdíl od 3-BF, který neposkytuje žádnou proudovou odezvu na katodické větvi CV, voltamogramy 2-BF a 4-BF ukazují katodické odezvy při potenciálech kolem 0,1 a -0,2 V (2-BF), resp. -0,5 V (4-BF).

PBF (Obr. 2B) poskytuje dobře definovaný anodický pík s potenciálem 0,88 V a v obráceném směru polarizace katodický pík při potenciálu -0,13 V.

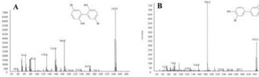


Obr. 1. Cyklické voltamogramy (**A**) 2-BF (----), 3-BF (·····), 4-BF (-·-·-·) a (**B**) PBP (-··-··-) v roztoku metanolu a Brittonova-Robinsonova pufru o pH = 6 (9/1, v/v). Měřeno na elektrodě ze skelného uhlíku. Rychlost polarizace 0,1 V s^{-1}.

Produkty elektrochemické oxidace bromovaných fenolů

GC-MS analýzou elektrolyzovaného roztoku 4-BP v 90% metanolu byl v čase 22,4 min nalezen hlavní oxidační produkt s *m/z* 344. Tento produkt se objevil také v extraktech po elektrolýze 4-BP v prostředí etanolu a propanolu, ne však butanolu. Pík se stejným *m/z* 344 ve stejném retenčním čase 22,4 min byl přiřazen také hlavnímu oxidačnímu produktu 2-BF vznikajícímu jeho oxidací ve všech alkoholech. Analýzou příslušných hmotnostních spekter (Obr. 2) byly tyto produkty identifikovány nejpravděpodobněji jako dimery 5,5'-dibromobiphenyl-2,2'-diol (Obr. 2A) a 3,3'-dibromobiphenyl-4,4'-diol (Obr. 2B).

Při GC-MS analýze extraktů elektrolyzovaných roztoků 3-BF a pentabromfenolu nebyly žádné dimerní produkty nalezeny.



Obr. 2. Hmotnostní spektra dimerních oxidačních produktů (**A**) 4-bromfenolu a (**B**) 2-bromfenolu v 90% metanolu.

Závěr

Výsledky této práce naznačují, že elektrochemické chování monobromfenolů a pentabromfenolu se liší od chování analogických chlorderivátů. Zatímco chlorfenoly tvoří při anodické oxidaci dimerní až polymerní sloučeniny, u bromovaných analogů byla zjištěna tvorba dimerů jen v případě 2-bromfenolu a 4-bromfenolu.

Poděkování

Autoři děkují za finanční podporu projektům Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy České republiky (LO1305), Operačního programu vzdělávání pro konkurenceschopnost – Evropskému sociálnímu fondu (CZ.1.07/2.3.00/30.0041), Univerzity Palackého v Olomouci (IGA_PrF_2015_020) a Grantové agentury České republiky (P206/12/1150).

Literatura

1. Ureta-Zañartu M. S., Bustos P., Diez M. C., Mora M. L., Gutiérrez C.: Electrochimica Acta *46*, 2545 (2001).
2. Ežerskis Z., Jusys Z.: J. Appl. Electrochem. *31*, 1117 (2001).
3. Ežerskis Z., Jusys Z.: Pure Appl. Chem. *73*, 1929 (2001).
4. Codognoto L., Machado S. A. S., Avaca L. A.: J. Appl. Electrochem. *33*, 951 (2003).
5. Berríos C., Arce R., Rezende M. C., Ureta-Zañartu M. S., Gutiérrez C.: Electrochim. Acta *53*, 2768 (2008).
6. Ureta-Zañartu M. S., Bustos P., Berríos C., Diez M. C., Mora M.L., Gutiérrez C.: Electrochimica Acta *47*, 2399 (2002).
7. Berríos C., Marco J. F., Gutiérrez C., Ureta-Zañartu M. S.: Electrochimica Acta *54*, 6417 (2009).
8. Morrow G. W., in *Organic Electrochemistry* (Eds: H. Lund, O. Hammerich), Marcel Dekker, New York 2001, pp. 590-595.

9. Ureta-Zañartu M. S., Mora M. L., Diez M. C., Berrios C., Ojeda J., Gutiérrez C.: J. Appl. Electrochem. *32*, 1211 (2002).
10. Ežerskis Z., Jusys J.: J. Appl. Electrochem. *32*, 543 (2002).
11. Marková E, Kučerová P., Skopalová J., Barták P.: Electroanalysis *27*, 156 (2015).
12. Marková E., Smyslová P., Macíková P., Skopalová J., Barták P.: Chem. Listy *106*, 195 (2012).
13. Taj S., Ahmed M. F., Sankarapapavinasam S.: J. Electroanal. Chem. *356*, 269 (1993).

Electrochemical Study of Oxazaborine Chromophores
(Elektrochemická studie oxazaborinových chromoforů)

Tomáš Mikysek [a], František Josefík [b], Karel Vytřas [a] and Jiří Ludvík [c]
[a] University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 573, 53210 Pardubice, Czech Republic,
E-mail: Tomas.Mikysek@upce.cz
[b] Institute of Organic Chemistry and Technology, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice, Studentská 573, CZ-53210, Czech Republic
[c] J. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry ASCR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic.

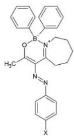
Abstract
This contribution describes a basic electrochemical study of a series of newly synthesized chromophores based on the oxazaborine core. The attention was focused on determination of the first oxidation and the first reduction potentials, their difference and the relationship to the calculated highest occupied molecular orbital (HOMO) and lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) energies. The oxidation is mostly a two-electron irreversible process, the first reduction is also irrevesible, but involving one-electron. For better understanding of the relationship between the structure and redox properties, the approach using sigma (para) constants of Hammett type was applied, the difference between E(ox) and E(red) was correlated with the HOMO-LUMO gap.

Key-words: Oxazaborines, Chromophore, Cyclic voltammetry.

Úvod
S rozvojem moderních technologií především v oblasti optoelektroniky jsou v současné době v popředí zájmu materiálové chemie nově syntetizované organické látky specifických vlastností jako např. fluorescence v pevném stavu, dobrá propustnost světla, rozpustnost, tepelná stabilita, biologická aktivita [1,2].

Počátky heterocyklických sloučenin bóru spadají do druhé poloviny minulého století. Od té doby byl zaznamenán významný nárůst prací zabývajících se touto tématikou. Z několika málo sloučenin na počátku [3,4], které byly mezi ostatními organickými látkami spíše vzácností, se rozvinul nový obor zahrnující celou řadu těchto látek s užitečnými vlastnostmi. Přítomnost atomu bóru ve struktuře značně mění elektronické vlastnosti molekul v porovnání s jejich heterocyklickými analogy. Celá řada bórových heterocyklických sloučenin vykazuje vysokou chemickou i teplotní stabilitu, některé např. odolávají vroucím louhům, kyselině chlorovodíkové, teplotám kolem 300°C [5]. Mnoho těchto sloučenin (např. BODIPY - *boron-dipyrromethene*) našlo své uplatnění v molekulární elektronice, OLED technologiích, nelineární optice, a v neposlední řadě i v medicíně v tzv. záchytné neutronové terapii (angl. Boron Neutron Capture therapy) [6,7].

V posledních několika letech se Oddělení mechanismů organických reakcí Ústavu organické chemie a technologie Univerzity Pardubice zabývá vývojem metodiky pro syntézu různých typů "O-B-N" a "N-B-N" heterocyklů. Tento příspěvek navazuje na předchozí publikované práce [8,9,10] týkající se syntézy a charakterizace nových triazaborinů a oxazaborinů (obr. 1) a rozšiřuje charakterizaci o základní elektrochemické vlastnosti těchto látek.



Obr. 1. Struktura oxazaborinových derivátů. Substituenty: X = -NEt_2, -OCH_3, -CH_3, -H, -Br, -COOEt, -CN, -NO_2.

Experimentální část

Chemikálie. Deriváty oxazaborinů byly syntetizovány na Ústavu organické chemie a technologie Univerzity Pardubice. Pro elektrochemické studium bylo jako základního elektrolytu použito Bu_4NPF_6 o koncentraci 0,1 M rozpuštěného v bezvodém *N,N*–dimethylformamidu (DMF).

Instrumentace. Všechna elektrochemická měření byla prováděna na přístroji AUTOLAB (model "PGSTAT-128"; Metrohm - Autolab B.V., Utrecht, Nizozemí), ke kterému byla připojena měřicí cela s tří-elektrodovým systémem obsahujícím rtuťovou kapkovou, případně platinovou diskovou (průměr 2 mm) pracovní elektrodu, dále pak kalomelovou referentní elektrodu $Hg|Hg_2Cl_2|$sat. KCl oddělenou můstkem obsahujícím roztok základního elektrolytu v DMF a pomocnou elektrodu (platinový plíšek).

Postupy

Cyklická voltametrie (CV)

Tyto experimenty byly prováděny v roztoku výše uvedeného elektrolytu, obsahujícího přibližně 5.10^{-4} M příslušného derivátu oxazaborinu. U většiny experimentů byly použity následující podmínky: na platinové elektrodě probíhaly experimenty v rozsahu potenciálů od 0,0V do +1,5V (oxidace) a od 0,0V do -2,0V (redukce), na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) od 0,0V do -2,8V (směr a rychlost polarizace byly měněny podle potřeby).

Voltametrie s rotující diskovou elektrodou (RDV)

Voltametrie s rotující diskovou elektrodou (RDV) byla prováděna při dvou rychlostech 500 a 1500 ot.min^{-1} opět v rozsahu potenciálů od nuly do +1,5V, resp. do -2,0V.

Polarografie

K polarografickým měřením byla jako pracovní použita kapající rtuťová kapková elektroda (DME) s dobou kapky 2 s a s rychlostí změny polarizačního napětí 5 mV.s^{-1}. Počáteční potenciál byl 0,0 V a koncový potenciál až -2,8 V.

Výsledky

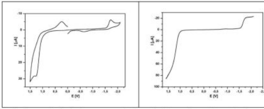
Tato práce se věnuje popisu základního elektrochemického chování nově syntetizovaných oxazaborinů substituovaných různými skupinami a byl přitom sledován vliv substituentů a struktury na oxidační a redukční vlastnosti těchto látek v aprotickém prostředí *N,N*-dimethylformamidu. Hlavní pozornost byla zaměřena na první oxidační a redukční potenciál a na rozdíl mezi nimi.

Oxidace

Potenciál prvního oxidačního procesu se pohyboval v rozmezí +0,67 V až +1,27 V, pro látky obsahující elektron donorní a "neutrální" substituenty (NEt_2, OCH_3, CH_3, H a Br). U látek substituovaných elektron-akceptorními skupinami (COOEt, -CN, $-NO_2$) se oxidační proces pohyboval patrně mimo potenciálové okno. Porovnáním velikosti limitního proudu redukce, která je jednoelektronová s limitním proudem oxidace, je ze záznamu RDV patrná přibližně dvakrát větší hodnota. Z toho se dá usoudit na dvou-elektronovou oxidaci, která je podle experimentů CV ireverzibilní. Z lineární závislosti prvních oxidačních potenciálů na Hamettovských sigma (para) konstantách vyplývá, že látky se substituenty (OCH_3, CH_3 a H) se oxidují stejným mechanismem, přičemž samotné substituenty se neoxidují a ovlivňují oxidační reakci pouze pomocí indukčního efektu. Další látky se substituenty diethylamino a bromo nezapadají do této závislosti a oxidují se tedy jiným mechanismem.

Redukce

Potenciál prvního redukčního kroku všech studovaných látek se pohyboval v rozmezí od -1,01 V do -1,73 V (vs. SCE), jednalo se o difúzí řízený ireverzibilní proces (Obr. 2). U elektron-akceptorních skupin (COOEt, CN, NO_2) byla zjištěna částečná reverzibilita s rozdílem potenciálů katodického a anodického píku odpovídající jednoelektronovému procesu. Z lineární závislosti prvních redukčních potenciálů na Hamettovských konstantách sigma (para), bylo zjištěno, že všechny studované oxazaboriny se redukují stejným způsobem kromě derivátu s nitro skupinou, jehož redukční potenciál leží mimo zmíněnou závislost a redukuje se mnohem snadněji.



Obr. 2. Reprezentativní záznamy oxazaborinu substituovaného methoxy skupinou. Vlevo: cyklická voltametrie, změna polarizačního napětí v = 100 mV/s; vpravo: Pt-RDV, rychlost rotace elektrody 500 $ot.min^{-1}$; koncentrace látky 0,5 mM.

Diskuse

Tato studie se zabývá základní elektrochemickou charakterizací série nově připravených derivátů oxazaborinu, ze kterých je možné připravit triazaboriny jejichž elektrochemickému chování byla věnována pozornost v předchozích pracech [8-10]. Základní elektrochemické vlastnosti v aprotickém prostředí N,N-dimethylformamidu byly zkoumány pomocí cyklické voltametrie, voltametrie s rotující diskovou elektrodou a polarografie. Hlavní pozornost byla soustředěna na první oxidační a první redukční proces a na rozdíl jejich potenciálů, který koreluje s rozdílem energetických hladin HOMO a LUMO.

Z analýzy elektrochemických dat se podařilo lokalizovat centrum oxidace a centrum redukce na molekule oxazaborinu. U látek, jejichž oxidační i redukční potenciály tvoří přímkové závislosti s Hammettovskou konstantou sigma(para) příslušného substituentu, k oxidačnímu i k redukčnímu ději dochází na dvou místech heterocyklického jádra vždy stejným mechanismem, přičemž konkrétní potenciály jsou ovlivněny substitučním efektem. Naopak, v případě diethylamino- (oxidace) nebo nitroderivátů (redukce), příslušný redox děj probíhá na samotných substituentech, tedy jiným mechanismem. Teoretické výpočty jsou pak v souladu s experimentálními daty.

Dalším důležitým parametrem je rozdíl potenciálu první oxidace a první redukce. Tato hodnota koreluje s rozdílem energetických hladin HOMO a LUMO a je zejména důležitá pro materiálový výzkum foto-optických zařízení. U série studovaných látek se tato hodnota pohybuje kolem 2,80 V [11], což je podobná hodnota jako u předchozí studované série triazaborinových sloučenin [10].

Závěr

Tyto informace o základním vztahu mezi strukturou a redox aktivitou u nové série látek umožní cíleně ovlivňovat oxidovatelnost / redukovatelnost látek dalších generací za pomoci vhodné struktury a substituce. Tím bude možné "vyladit" příslušné vlastnosti podle potřeby aplikace. Současně se ukázalo, že elektrochemie je metoda, která může poskytovat experimentální údaje o rozmístění a delokalizaci elektronů v molekule a tím umožnit korelaci s kvantovými výpočty.

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České Republiky projektu CZ.1.07/2.3.00/30.0021 "Posílení excelentních týmů výzkumu a vývoje na Univerzitě Pardubice".

Literatura

1. Hu W.: Organic optoelectronics. Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2013.
2. Jakle F.: Chem. Rev. *110*, 3985 (2010).
3. Dewar M.J.S., Kubba V.P., Pettit R.: J. Chem. Soc. 3073 (1958).
4. Dewar M.J.S., Kubba V.P., Pettit R.: J. Chem. Soc. 3076 (1958).
5. Dewar M.J.S., Kubba V.P., Pettit R.: J. Am. Chem. Soc. 3073 (1958).
6. Chissick S.S., Dewar M.J.S., Maitlis P.M.: J. Am. Chem. Soc. *83*, 2708 (1961).
7. Pozzi E.C.C., Trivillin V.A., Colombo L.L., Hughes A.M., Thorp S.I., Cardoso J.E., Garabalino M.A., Molinari A.J., Heber E.M., Curotto P., Miller M., Itoiz M.E., Aromando R.F., Nigg D.W., Schwint A.E.: Rad. Environ. Biophys. *52*, 481 (2013).
8. Josefík F., Svobodová M., Bertolasi V., Šimůnek P.: Beilstein J. Org. Chem. *9*, 1463 (2013).
9. Josefík F., Svobodová M., Bertolasi V., Šimůnek P., Macháček V., Almonasy N., Černošková E.: J. Organometal. Chem. *699*, 75 (2012).
10. Josefík F., Mikysek T., Svobodová M., Šimůnek P., Kvapilová H., Ludvík J.: Organometallics *33*, 4931(2014).
11. Mikysek T., Kvapilová H., Josefík F., Ludvík J.: Anal Lett. (2015), in print.

Information on Several Interesting Case Reports of Liquid Mercury Intoxication

Tomáš Navrátil [a], Štěpánka Vlčková [b], Karolina Mrázová [b], Kateřina Nováková [a], Sergej Zakharov [b], Šárka Honsová [c], and Daniela Pelclová [b]
[a] J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the AS CR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: Tomas.Navratil@jh-inst.cas.cz
[b] Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, First Faculty of Medicine, Department of Occupational Medicine, Czech Toxicological Information Centre, 120 00 Prague 2, Czech Republic
[c] Charles University in Prague, Faculty of Physical Education and Sport, José Martího 31, 162 52 Prague 6, Czech Republic

Abstract
This contribution reports on several mercury non-professional intoxications. It can be summarized that it is very important to differentiate among forms of mercury which can (acute or chronic) endanger human health. Contrarily to the wide spread fears, liquid mercury represents low danger for men and for environment. Solid amalgams are probably the less toxic forms of mercury compounds. On the other hand, widely spread daily consumer goods can be very dangerous and toxic (saving balls, fluorescent tubes, etc.). Moreover, these goods are not marked as "toxic mercury containing". The article discusses the instruction for removing mercury from our environment. Most of the reported data are based on database of the Czech Toxicological Information Centre (TIC) (from the years 1995 – 2015).

Key Words: Mercury, Poisoning, Toxicity of mercury, Czech Toxicological Information Centre.

Introduction

Many laymen and certain part of experts are convinced that mercury represents huge risk in environment under any circumstances, in any form, and in any dose. On contrary to widely spread popular prejudices, fears and faults [1-3], the toxicity of this element in pure form, in solid or liquid state, is very low [1, 4]. It is very sad that this misinformation is widespread even among experts. This leads to extrusion of reliable mercury thermometers and voltammetric mercury electrodes and to their replacement by others which have less application areas [5-17]. According to data received from Czech Toxicological Information Centre (Czech TIC), several people from the Czech Republic yearly try to realize suicidal attempts by application of liquid mercury orally, intravenously or paravenously (unsuccessfully). Similarly, mild severity and environmentally neglectable are intoxications caused by accidents with devices containing liquid mercury (thermometers, tonometers, barometers, electrochemical devices, mainly polarographic and voltammetric analyzers).

Contact with liquid mercury is very limited [1-3]. On the other hand, higher risk can be caused by mercury vapors released by broken saving balls, fluorescent tubes, etc. Inhalation of Hg vapors by lungs is practically complete. Due to easy solubility in fats, mercury molecules come into brain circulation in some minutes. They cross hematoencephalic barrier and they act neurotoxically. In brain tissue is Hg oxidized to Hg^{2+} (these ions cross hematoencephalic barrier back only less easily) which accumulates in cortex and basal ganglions. Similarly, using catalase mercury is transformed to Hg^{2+} in erythrocytes, these ions are distributed into tissues and they interact with –SH groups of enzymes. The highest depot is present in kidneys, mostly in adrenals. Kidneys react by production of metallothioneins (MT) –cysteine rich proteins [18] - which bind mercury. Kidneys (proximal tubulus, glomerulus) are damaged after their saturation [1, 4].

Experimental

Methods of Mercury Determination

Determination of mercury in various matrices is very complicated. Moreover, it is necessary to differentiate between total content of mercury and content of available forms of mercury in mentioned different forms. Spectroscopic techniques, more precisely, atomic absorption spectroscopy (AAS), are the most common methods of mercury determination. It is applicable for determination of mercury vapors as well as for determination of its total content in solid forms (the solid or liquid material is thermally decomposed, the generated vapors are concentrated in form of gold amalgam from which mercury is released and determined using AAS (e.g., AMA 254, Altec, Czech Republic) [19]. It is possible to reach limit of detection (LOD) of Hg, in waters about 0.01 ng $Hg.L^{-1}$ and in urine 0.1 $ng.L^{-1}$. Voltammetric techniques can be applied for determination of mercury in various matrices too [20]. Mercury electrodes must be replaced by gold electrode (similarly as in case of arsenic [21] determination) or by glassy carbon electrode for these purposes. Application of these methods is more complicated, because the electrode surfaces must be mechanically polished and finally electrochemically cleaned from the oxidation products and other rests of previous analyses. Using voltammetric techniques it is possible to determine mercury in concentration levels from 0.03 to 0.1 $\mu g\ L^{-1}$.

Data Collection

Data concerning mercury intoxications were extracted from the special database (programmed in MS Access) of the calls to the Czech TIC, Prague, between 1995 and 2015; the institution being the only center of choice in the Czech Republic. In each inquiry, several data concerning the exposure were recorded according to the standard protocol, e.g., age and sex of the patient, time of the intoxication, dose and symptoms of intoxication and whether first aid and any treatment have already been administered. In addition, the prognosis of the patient at the time of the call was considered and, if needed, further management and therapy were recommended. In case that the patient needed hospitalization, the discharge report from the hospital was asked for.

Antidotes

At present, mercury intoxication is treated by antidote Dimaval (DMPS, unithiol). It is the chelating antidote of choice. Compared with previously used antidotes (such as dimercaptol (BAL)), it has many advantages, such as lower toxicity and availability of both oral and parenteral applications. More is known about the pharmacokinetics of DMPS (given p.o. or i.v.) in human body than about any other dimercapto chelating agent. In the past, DMSA (dimercaptosuccinic acid, succimer) was used [19, 22]. Dimaval can be applied orally or intravenously in case of both, chronic as well as acute intoxication. It is available on the Czech TIC.

Results and Discussion

Case Reports of Mercury Intoxication

In the framework of the contribution several interesting suicidal attempts realized by intravenous application of a few mL of liquid mercury will be reported. None of them was dangerous for life of the intoxicated persons and finally mercury was removed from their bodies (bloodstream). In one case it remained in the heart and there it was not dangerous for the patient's health.

There will be reported some unintentional intoxications caused bymercury vapors. These are very rare caused by vapors released from liquid mercury.

Removing Small Amounts of Mercury

Effectively cleaned up and properly disposed mercury should not pose a risk to human health. On the web pages of Czech TIC, there can be found several simple instructions for removing small amounts of mercury (e.g., from broken mercury thermometer) [23]. However, some instructions are too "strong", e.g.,

- Secure the contaminated area and contact the appropriate health department.
- Before you start cleaning, wear old clothes, old shoes, and wear rubber gloves. (*on the other hand, recommendation to remove all silver or gold jewelry, rings, etc. is missing*).
- Never use a vacuum cleaner, because you contaminate it and then mercury should be evaporated from it into the air. Vacuum cleaner contaminated with mercury should be discarded after consultation with the relevant health authority.
- Do not clean using a mop or broom.
- Ventilate the room, where there was a spill of mercury, intensively and do not suck there for two weeks.
- If the balls of mercury entered into carpet or upholstery, collect them in a sealable container (see step 4). Never use a vacuum cleaner. If you fail to collect mercury, it is necessary to remove contaminated carpet or upholstery and to dispose of as hazardous waste.
- Elemental mercury that is poured into the sink should have been collected after removing the drain pipe in the U-shank. Mercury left in the U-shank after contact with hot water evaporates and thus prolongs the exposure time.
- Clothing that has come into contact with mercury cannot be washed or dry-cleaned. Save it to double wrap and dispose of as household waste.
- Carefully remove the rubber gloves (pulling and twisting of the wrist inside out), pack them together with the contaminated clothing into a double wrap and dispose of with household waste.
- After disposing of mercury, the room must be thoroughly ventilated at least for 24 hours. Children and pets are not allowed to enter decontaminated space.

These instructions are too hard and are not in fair agreement with the danger represented by small amount of mercury. These instructions can be critically compared with real experiments realized with 1-2 g of mercury (i.e. amount corresponding to mercury in one thermometer). It was proved that such small quantity of mercury can be danger in very vicinity (10-20 cm) [24, 25].

Danger Saving Balls and Fluorescent Tubes

In the comparison with overestimated danger of liquid mercury, the danger of very toxic mercury vapors from saving balls and fluorescent tubes represent much more important problem and higher risk of mercury intoxication [1]. Such ball or tubes can be easily broken and the vapors released into the living spaces. Moreover, recycling and/or safe disposal of these products is not sufficient up to now.

Conclusion

It is possible to conclude that the toxicity of metallic mercury is relatively low and accidents with small doses of this element are not danger for human. Similarly, suicide attempts realized with this liquid element are not life-threatening too. More danger seems to be mercury vapors, which origin may not be in liquid form of this metal (as in the case of saving balls).

In spite of fears about high toxicity of mercury in all forms, it is necessary to differentiate among its different forms and of course, very important role plays the dose of its toxic forms (organic, soluble inorganic salts, and mercury vapors) to which the subject has been exposed.

Acknowledgements
The authors gratefully acknowledge financial support from the Grant Agency of the Czech Republic (Czech Scinece Foundation) project No. P208/12/1645 (K. Novakova) and project No. P206/11/1638 (T. Navratil).

References

1. Navratil T., Svancara I., Mrazova K., Novakova K., Sestakova I., Heyrovsky M., Pelclova D., v knize: *Sensing in Electroanalysis Vol. 6.*; (Kalcher K., Metelka R., Svancara I., Vytras K., Eds.),sv.Vol. 6 University Press Centre, Pardubice, 2011.
2. http://www.europarl.europa.eu/news/expert/infopress_page/064-6115-073-03-11-911-20060309IPR06021-14-03-2006-2006-false/default_en.htm, Downloaded: 15.2.2007.
3. European_Commission, Consolidate Guide to EuRoHS Application Exemtions 2002/95/EC of January 27 2003. http://www.europarl.europa.eu/news/expert/infopress_page/064-6115-073-03-11-911-20060309IPR06021-14-03-2006-2006-false/default_en.htm, 2003.
4. Navratil T., Svancara I., Mrazova K., Novakova K., Chylkova J., Pelclova D.: XXXII Moderni Elektrochemicke Metody (Modern Electrochemical Methods XXXII), 82 (2012).
5. Selesovska-Fadrna R., Navratil T., Vlcek M.: Chem. Anal. (Warsaw, Pol.) *52*, 911 (2007).
6. Cabalkova D., Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B.: Chem. Listy *103*, 236 (2009).
7. Bandzuchova L., Selesovska R., Navratil T., Chylkova J.: Electrochim. Acta *56*, 2411 (2011).
8. Cizkova P., Navratil T., Sestakova I., Yosypchuk B.: Electroanalysis *19*, 161 (2007).
9. Jaklova Dytrtova J., Sestakova I., Jakl M., Navratil T.: Electroanalysis *21*, 573 (2009).
10. Vyskocil V., Navratil T., Danhel A., Dedik J., Krejcova Z., Skvorova L., Tvrdikova J., Barek J.: Electroanalysis *23*, 129 (2011).
11. Sebkova S., Navratil T., Kopanica M.: Anal. Lett. *37*, 603 (2004).
12. Sebkova S., Navratil T., Kopanica M.: Anal. Lett. *36*, 2767 (2003).
13. Barek J., Cabalkova D., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B.: Environ. Chem. Lett. *9*, 83 (2011).
14. Selesovska R., Bandzuchova L., Navratil T.: Electroanalysis *23*, 177 (2011).
15. Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J.: Electroanalysis *19*, 2003 (2007).
16. Fadrna R., Yosypchuk B., Fojta M., Navratil T., Novotny L.: Anal. Lett. *37*, 399 (2004).
17. Fischer J., Vanourkova L., Danhel A., Vyskocil V., Cizek K., Barek J., Peckova K., Yosypchuk B., Navratil T.: Int. J. Electrochem. Sci. *2*, 226 (2007).
18. Sestakova I., Navratil T.: Bioinorg. Chem. Appl. *3*, 43 (2005).
19. Nerudova J., Cabelkova Z., Frantik E., Lukas E., Urban P., Blaha K., Pelclova D., Lebedova J., Cikrt M.: Int. J. Occup. Med. Environ. Health *13*, 131 (2000).
20. Navratil T., Ricarova B., Senholdova Z., v knize: *Metals and neurotoxicity*; (Prakash R., Vojtisek M., Eds.),sv.Vol., Jalgaon (India), 2009.
21. Navratil T., Kopanica M., Krista J.: Chem. Anal.-Warsaw *48*, 265 (2003).
22. Gonzalez-Ramirez D., Zuniga-Charles M., Narro-Juarez A., Molina-Recio Y., Hurlbut K. M., Dart R. C., Aposhian H. V.: J. Pharmacol. Exp. Ther. *287*, 8 (1998).

23. TIC: *Removing of small amounts of mercury*. http://www.tis-cz.cz/index.php/informace-pro-verejnost/rtut-z-teplomeru-likvidace, Downloaded: 15.4.2015.
24. Waldman M., Grohova S., Dolejsi L.: *Aktuality hygieny zivotniho prostredi: Páry rtuti ve venkovním a vnitřním vzduchu a problémy s jejich omezováním, Prague*, Eds.), SZU, Prague 2009, p.
25. Waldman N., Grohova S., Dolejsi L.: *Levels of mrecury in conatminated areas*. http://www.szu.cz/uploads/documents/cpl/Materily_ze_seminaru/Materialy_2009/waldman_17.9.09.pdf, Downloaded: 15.4.2015.

Use of Silver Solid Amalgam Electrode for Determination of Acaricide Amitraz (Využití stříbrné pevné amalgámové elektrody pro stanovení akaracidu amitrazu)

Kateřina Nováková[a,b], Marek Harvila[c], Tomáš Navrátil[b], and Jiří Zima[c]
[a] University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Institute of Environmental and Chemical Engineering, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic
[b] J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of ASCR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: Katerina.Novakova@jh-inst.cas.cz
[c] Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, CZ-128 43 Prague 2, Czech Republic

Abstract
The electrochemical behavior of amitraz was studied at polished (p-AgSAE) and mercury meniscus modified (m-AgSAE) silver solid amalgam electrodes. The reaction mechanism was investigated using direct current voltammetry (DCV) and elimination voltammetry with linear scan (EVLS). The optimum conditions for differential pulse adsorption stripping voltammetry (DPAdSV) determination of amitraz were found in Britton-Robinson (BR) buffer mixed with ethanol in a volume ration of 1:4. DPAdSV with optimized parameters was applied for determination of amitraz in analyzed solutions. The limits of detection were calculated as 8.9 nmol L^{-1} (t_{acc} = 20 s) for m-AgSAE and 0.168 μmol L^{-1} (t_{acc} = 20 s) for p-AgSAE. The proposed method was successfully applied for determination of this compound in real sample solutions.

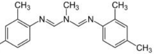
Key words: Pesticide, Amitraz, Amalgam, DPAdSV, EVLS.

Úvod

Jako vzorový pesticid byl vybrán nesystematický akaricid a insekticid amitraz (Obr. 1, N,N'-[(Methylimino)dimethylidyne]di-2,4-xylidine), který je hojně používán v České Republice i v zahraničí. Tento formamidinový pesticid [1] se používá především k likvidaci roztočů, mšic, motolic a červců. Ve velké míře je aplikován ve včelařství proti onemocnění varroázy způsobenou roztoči *varroa jacobsoni* či *acarapis woodi* [2]. Podstatou účinku amitrazu je interakce s oktopaminovými receptory v centrální nervové soustavě ektoparazitů (alfa-adrenergní agonista receptorů v místě nervových synapsí). Vlivem této interakce dochází ke zvýšené aktivitě neuronů, k jejich abnormálnímu chování, následnému odloučení a zániku. Dále inhibuje monoaminooxidázy a syntézu prostaglandinu.

Amitraz má různé farmakodynamické působení. Příznaky nežádoucích účinků této látky na savce a člověka zahrnují ztrátu vědomí, zvracení, respirační selhání, hypotermii, bradykardii, hyperglykémii a útlum centrálního nervového systému [3]. Otrava u člověka může být způsobena buď vdechnutím či průnikem přes kůži a jako antidotum jsou využívány látky atipamezol a yohimbin [4], které působí jako α2-antagonisté.

Pro studium environmentálně významných látek je zapotřebí vyvinout metody, které umožní stanovit tyto látky ve velmi nízkých koncentracích. Elektrochemické metody jsou velmi často využívány ke stanovení biologicky účinných látek, např. pesticidů v různých environmentálních matricích [5-19]. Tyto metody nabízí dostatečně nízké detekční limity pro širokou škálu látek s dobrou selektivitou, zároveň nám mohou objasnit procesy, které se s těmito látkami v přírodě dějí (např. tvorba komplexů) a z toho důvodu byly vybrány pro stanovení této látky, která má nezanedbatelné účinky na zdraví člověka a přitom se tento pesticid a jeho metabolity vyskytují např. ve včelařských produktech. Jako vhodný elektrodový materiál byl vybrán stříbrný pevný amalgám s různou modifikací jeho povrchu [20-24]. Tento typ elektrod kombinuje výhody rtuťových a pevných elektrod jako je vysoké přepětí vodíku, široký rozsah pracovních potenciálů, mechanická stabilita, jednoduchá příprava atd. Další a značnou výhodou tohoto typu pracovní elektrody je nízký obsah rtuti, jejíž použití je v současné době značně snižováno a v několika evropských státech je již používání rtuti pro analytické účely úplně zakázáno.



Obr. 1. Strukturní vzorec amitrazu.

Experimentální část

Zásobní roztok amitrazu (Sigma-Aldrich, CR) o koncentraci 0,0023 mol L^{-1} byl připraven rozpuštěním 3.4 mg v 5 ml etanolu (čistoty p.a., Penta-Švec, CR). Z důvodu nízké stability byl zásobní roztok připravován každodenně. Jako základní elektrolyt byl použit Brittonův-Robinsonův pufr (dále pak BR) v rozsahu pH 2-12, který byl připraven ze zásobních roztoků kyselé (0,04 mol L-1) a zásadité složky (0,2 mol L^{-1}) a ehanol (*v:v*, 4:1) Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a.

Voltametrická měření byla prováděna na Eco-Tribo polarografu (Polaro-Sensors, Praha, ČR) řízeném programem MultiElChem 3.1 pro Windows 7 (Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV CR v.v.i.). Stříbrná pevná amalgámová elektroda (AgSAE), která byla použita jako elektroda pracovní, měla vnitřní průměr 0,5 mm. Pracovní povrch leštěné stříbrné pevné amalgámové elektrody (p-AgSAE) měl velikost 0,224±0.024 mm^2 (α<0.05). Pracovní povrch použité meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrody (m-AgSAE) byl 0.382±0.025 mm^2 (α<0.05). Visící rtuťová kapková elektroda (HMDE), která byla použita jako srovnávací k AgSAE, měla velikost povrchu kapky 0,721±0.022 mm^2 (α<0.05), kapilára měla vnitřní průměr okolo 55 µm (vše od Polaro Sensors, Praha, Česká Republika). V popisovaných experimentech byla jako referentní elektroda použita Ag/AgCl/3M KCl, platinový drátek byl použit jako elektroda pomocná (obě dvě z Elektrochemické detektory, Turnov, CR). Měření byla prováděna při pokojové teplotě (23 ± 2°C). Kyslík byl odstraňován z měřeného roztoku pomocí probublávání dusíkem (o čistotě 4.6, Messer Technogas, Praha, CR) po dobu 10 minut. Hodnoty pH byly měřeny s použitím pH metru Jenway 3505 (Bibby Scientific Limited, UK). Pro všechna měření byla použita deionizovaná voda (Milli-Q-Gradient, Millipore, Praha, CR).

Stříbrná pevná amalgámová elektroda (AgSAE) se skládala z protáhlé skleněné trubičky, jejíž užší konec byl naplněn stříbrným amalgámem a elektrický kontakt byl zajištěn propojením se stříbrným drátkem. AgSAE byla nejprve třena o jemný smirkový papír a poté leštěna za použití polyuretanové podložky a lešticí sady od Elektrochemické detektory, Turnov, Česká Republika, která se skládala ze suspenze Al_2O_3 (velikost částic 1.1 mm) a jemného lešticího prášku Al_2O_3 (velikost částic 0.3 mm). Po dokončení tohoto lešticího procesu byla p-AgSAE připravena k použití. Pokud byla elektroda modifikována rtuťovým meniskem (m-AgSAE), tak došlo k jejímu ponoření do malého množství rtuti a po dobu 15 sekund s ní v rtuti bylo mírně mícháno, čímž došlo k vytvoření rtuťového menisku. Před začátkem práce, stejně jako po pasivaci elektrody či po každé přestávce mezi jednotlivými měřeními, která byla delší než jednu hodinu, byla provedena elektrochemická aktivace AgSAE v prostředí KCl při potenciálu -2200 mV za míchání po dobu 300 s, poté byla elektroda opláchnuta vodou.

Stejnosměrná voltametrie (DCV) byla použita pro první set měření elektrochemického chování amitrazu na amalgámové elektrodě ve dvou modifikacích povrchu. Závislost voltametrického chování této sloučeniny na pH a rychlosti polarizace bylo studováno. Diferenční pulzní adsorpční rozpouštěcí voltametrie (DPAdSV) s šířkou pulzu 80 ms, výškou pulzu -50 mV pro katodický směr a rychlostí polarizace 10 mV s^{-1} byla použita pro stanovení testované biologicky aktivní látky za použití tří pracovních elektrod. Optimální parametry byly nalezeny (Tabulka I). Dusík byl přiváděn do měřicí nádobky přes probublávací nádobu, ve které byla směs etanol/destilovaná voda (4:1, *v/v*), přes vzorek byl dusík veden vždy 5 minut před každým měřením. Každé měření bylo opakováno nejméně 3krát a minimální počet standardních přídavků bylo 7. Získané výsledky byly vyhodnoceny dle [25] a za použití softwaru QC Expert (Trilobyte, Česká Republika) a Excelu (Microsoft Inc., Česká Republika). Kritická mez (LC), mez detekce (LD) a stanovitelnosti (LQ) a další chemometrické parametry byly vypočteny dle [25, 26].

Tabulka I.
Optimalizované parametry pracovních elektrod.

Pracovní elektrody	E_{in} (mV)	E_{fin} (mV)	E_{acc} (mV)	pH
m-AgSAE	-100	-1800	-200	6
p-AgSAE	-100	-1800	-200	5
HMDE	-100	-1800	-300	4

Výsledky a diskuse
Voltametrické chování amitrazu v závislosti na pH bylo studováno pomocí metody DCV na všech třech pracovních elektrodách. Použitá koncentrace pro optimalizaci měřicích parametrů činila $4{,}7 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1}. Nejvíce zřetelný a nejlépe reprodukovatelný ireversibilní katodický pík byl registrován v prostředí BR pufru s etanolem (4:1,*v/v*) ve slabě kyselém pH na všech třech elektrodách. Závislost na rychlosti polarizace byla zjištěna také pomocí DCV a byla lineární pro redukční pík v potenciálové oblasti okolo -1000 mV v rozsahu 10 – 160 mV s^{-1}, jako nejvhodnější byla vybrána hodnota 20 mV s^{-1}.

EVLS byla použita pro charakterizaci procesů probíhajících na povrchu pracovních elektrod (v průběhu katodického skenu). S použitím této techniky byly křivky hodnoceny v rozsahu rychlostí polarizace 10 - 160 mV s^{-1}. V katodickém směru DC voltamogramu na povrchu všech tří pracovních elektrod docházelo k redukci amitrazu v adsorbovaném stavu.

Po prostudování vlivu počátečního potenciálu, potenciálu akumulace, času akumulace a rychlosti polarizace byla použita DPAdSV pro stanovení amitrazu v modelových vzorcích. Čas akumulace (t_{acc}) byl závislý na koncentraci amitrazu v analyzovaném roztoku (pro c = 0.48 µmol L^{-1} byla největší proudová odezva amitrazu při t_{acc} = 30 s na m-AgSAE a t_{acc} = 20s na p-AgSAE). Přímou metodou signálu dle IUPAC [25] byly vyhodnoceny některé chemometrické parametry (Tabulka II). Získané údaje byly vyhodnoceny a poukázaly na to, že tento elektrodový materiál se jeví jako vhodný pro stanovení amitrazu v různých environmentálních matricích.

Tabulka II.
Vybrané chemometrické parametry (vypočítané za použití přímé metody signálu dle IUPAC).

Pracovní elektrody	Kritická mez (CC)	Mez detekce (LOD)	Mez stanovitelnosti (LOQ)
m-AgSAE	0.005 μmol L^{-1}	0.009 μmol L^{-1}	0.013 μmol L^{-1}
p-AgSAE	0.092 μmol L^{-1}	0.168 μmol L^{-1}	0.238 μmol L^{-1}
HMDE	0.003 μmol L^{-1}	0.007 μmol L^{-1}	0.01 μmol L^{-1}

Poté, co bylo prokázáno, že testované pracovní elektrody s optimalizovanými parametry jsou dostatečně citlivé pro voltametrické stanovení amitrazu v modelových vzorcích, tak byl amitraz stanovován v reálných vzorcích vod. Deklarované množství amitrazu v analyzovaném roztoku bylo srovnáno se získanými výsledky. Pro stanovení byla použita metoda standardního přídavku (minimálně 3 přídavky byly přidány v každém měření). Nalezené množství amitrazu bylo ve shodě s deklarovaným.

Závěr

Voltametrické chování amitrazu bylo studováno za použití stříbrné pevné amalgámové elektrody s různě modifikovaným povrchem (p-AgSAE, m-AgSAE). Získané výsledky byly porovnávány s výsledky naměřenými na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE). Bylo nalezeno optimální pH základního elektrolytu a pro všechny tři pracovní elektrody se jeví jako vhodné slabě kyselé prostředí. DPAdSV s optimalizovanými pracovními podmínkami byla využita pro stanovení amitrazu v submikromolárních koncentracích. Některé chemometrické parametry byly spočítány. Aplikovatelnost navrhované metody byla potvrzena stanovením amitrazu v reálných vzorcích pitné vody. Byla vyvinuta spolehlivá a jednoduchá metoda pro stanovení amitrazu v různých environmentálních matricích za použití stříbrné amalgámové elektrody.

Poděkování

Tato práce vznikla s podporou grantu GA ČR (P208/12/1645) a grantu Univerzity Pardubice (SGSFChT_2015006).

References

1. Guo H., Zhang P., Wang J. W., Zheng J.: Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences *951*, 89 (2014).
2. Papaefthimiou C., Papachristoforou A., Theophilidis G.: Pestic. Biochem. Physiol. *107*, 132 (2013).
3. Varma P. V. C., Bhatt S., Bhat R. Y.: Indian J. Pediatr. *80*, 349 (2013).
4. Juneja D., Nasa P., Saraswat V., Tayap J., Aggarwal G., Kumar M., Kumar V.: Crit. Care Med. *42* (2014).
5. Novakova K., Navratil T., Dytrtova J. J., Chylkova J.: J. Solid State Electrochem. *17*, 1517 (2013).
6. Novakova K., Navratil T., Jaklova Dytrtova J., Chylkova J.: Int. J. Electrochem. Sci. *8*, 1 (2013).
7. Hromadova M., Sokolova R., Pospisil L., Fanelli N.: J. Phys. Chem. B *110*, 4869 (2006).
8. Pospisil L., Sokolova R., Colombini M. P., Giannarelli S., Fuoco R.: J. Electroanal. Chem. *472*, 33 (1999).
9. Pospisil L., Sokolova R., Colombini M. P., Giannarelli S., Fuoco R.: Microchem J *67*, 305 (2000).
10. Pospisil L., Sokolova R., Hromadova M., Giannarelli S., Fuoco R., Colombini M. P.: J. Electroanal. Chem. *517*, 28 (2001).

11. Sokolova R., Hromadova M., Ludvik J., Pospisil L., Giannarelli S.: Electrochim. Acta *55*, 8336 (2010).
12. Sokolova R., Degano I., Ramesova S., Bulickova J., Hromadova M., Gal M., Fiedler J., Valasek M.: Electrochim. Acta *56*, 7421 (2011).
13. Sokolova R., Ramesova S., Degano I., Hromadova M., Gal M., Zabka J.: Chem. Commun. *48*, 3433 (2012).
14. Sokolova R., Degano I., Hromadova M., Bulickova J., Gal M., Valasek M.: Collect. Czech. Chem. Commun. *75*, 1097 (2010).
15. Hromadova M., Kolivoska V., Sokolova R., Gal M., Pospisil L., Valasek M.: Langmuir *26*, 17232 (2010).
16. Sokolova R., Gal M., Valasek M.: J. Electroanal. Chem. *685*, 33 (2012).
17. Ramesova S., Sokolova R., Degano I., Bulickova J., Zabka J., Gal M.: Anal. Bioanal. Chem. *402*, 975 (2012).
18. Gal M., Orinakova R., Wiemhofer H. D., Chovan P., Krajnikova A., Hives J.: J. Electrochem. Soc. *156*, D462 (2009).
19. Pospisil L., Hromadova M., Gal M., Valasek M., Fanelli N., Kolivoska V.: Collect. Czech. Chem. Commun. *74*, 1559 (2009).
20. Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J.: Electroanalysis *19*, 2003 (2007).
21. Navratil T., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. *39*, 131 (2009).
22. Cizkova P., Navratil T., Sestakova I., Yosypchuk B.: Electroanalysis *19*, 161 (2007).
23. Navratil T., Kopanica M.: Crit. Rev. Anal. Chem. *32*, 153 (2002).
24. Sokolova R., Kolivoska V., Gal M.: J. Electroanal. Chem. *710*, 36 (2013).
25. Miller J. N., Miller J. C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Pearson Education, Harlow 2005.
26. Nováková K., Navrátil T., Dytrtová J., Chýlková J.: J. Solid State Electrochem., 1 (2013).

Influence of Cadmium on its Metabolism and Changes of Content of Nutritionally Important Compounds in Spring Barley
(Vliv kadmia na metabolismus a změny v obsahu nutričně významných složek v ječmeni jarním)

Luboš Paznocht [a], Hana Vodičková [a], Le Minh Phuong [a], Kateřina Nováková [b], Brigita Zámečníková [a], Zora Kotíková [a], Daniela Miholová [a], and Tomáš Navrátil [b],
[a] Czech University of Life Sciences, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6, Czech Republic, E-mail: le_minh@af.czu.cz
[b] *J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the AS CR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic*

Abstract
Very important agriculture products are cereals, which significantly contributes to securing of human nutrient needs. Cadmium is a toxic heavy metal, which is readily taken up and accumulated by plants in spite of its harmful effects. This metal cause a stress for the plants and results in many morphological, anatomical, physiological and biochemical changes. The effect of cadmium on the plant metabolism and changes in the content of nutritionally important compounds (protein and some metals – Fe, Zn, Cu, Mn content) was investigated. Results shown, that cadmium was effectively retained in the roots and content of studied compounds was influenced by present of cadmium in nutrient medium. In all the parts of cadmium-treated seedlings decrease in the iron content and increase in the zinc content (except of the first leaves) and decrease in the manganese content was found. The copper content in the root tissue increased by 112.1 %, on the other hand a significant decrease (by 44.4 % and 40.9 % respectively) in the first and the second leaves was observed. In the experimental varieties with cadmium in the concentration of 10^{-5} mol L^{-1}, the content of soluble proteins was determined statistically higher in the root and basal parts than in the controlled varieties.

Key words: Barley, Cadmium, Cereals, Nutritionally important substances, HPLC.

Úvod

Stěžejní součástí lidské stravy jsou obiloviny, které patří k nejstarším potravinám. Pro člověka tyto plodiny představují bohatý zdroj energie v podobě sacharidů, proteinů, vitaminu E, vitaminů skupiny B, vlákniny, hořčíku, zinku a dalších minerálních látek.

Pro objasnění vlivu těžkých kovů na vybranou hospodářsky významnou plodinu, jako je ječmen, bylo zvoleno kadmium, které vykazuje škodlivé účinky na životní prostředí. Přirozené koncentrace kadmia v půdě jsou nízké. Naneštěstí se však vlivem lidské činnosti obsah kadmia zvyšuje a představuje tak značné riziko pro všechny složky životního prostředí, se kterými přichází do styku [1, 2].

Rostliny přijímají kadmium převážně ve formě dvojmocného kationtu a pohyb kadmia z kořenů do nadzemních částí rostlin je omezen účinnou bariérou rostliny. Tento pohyb lze snížit i v případě využití fosforečné výživy. V rostlině dochází ke kumulaci kadmia. Obecně platí, že vegetativní části rostlin obsahují větší množství kadmia než semena a plody. Vlivem schopnosti kumulovat se v rostlinných částech a produktech představuje významné riziko v potravním řetězci [3]. Jeho další negativní vlastností je, že vlivem jeho vysoké toxicity nepříznivě ovlivňuje všechny aspekty růstu a vývoje rostlin. Kadmium dokáže narušovat a inaktivovat enzymatickou aktivitu prostřednictvím vazby s thiolovými skupinami proteinů.

Dále může ovlivňovat příjem některých živin změnami permeability plasmatické membrány [4], inhibuje Fe^{3+} reduktázu v kořenech rostlin, snižuje množství enzymatických a neenzymatických antioxidantů [5, 6].

Pokud se v půdě vyskytují vysoké koncentrace kadmia, tak zemědělské plodiny, které jsou pěstované v takovýchto lokalitách, vykazují řadu fyziologických poruch (nižší obsah chlorofylu, proteinů, sacharidů) a rovněž ovlivňují průběh fotosyntézy. To vše vede v konečném důsledku k redukci výnosů. Normální příjem, translokace a využití esenciálních minerálních látek (např. železa, manganu, zinku, mědi, hořčíku) je sníženo příjmem kadmia. Interakce mezi kadmiem a ostatními nutrienty může vést ke změně v jejich obsahu a k různým fyziologickým poruchám. Viditelnými znaky fytotoxicity kadmia jsou chlorózy listů a stonků, listové nekrózy, hnědnutí kořenových a listových špiček, menší vzrůst.

Experimentální část

Chemikálie

Pro stanovení celkového obsahu ve vodě rozpustných proteinů byla použita destilovaná voda (H_2O), 0,5% roztok pentahydrátu síranu měďnatého ($CuSO_4$•$5H_2O$) v 1% vinanu draselnosodném, 2% roztok uhličitanu sodného (Na_2CO_3) v 0,1 mol L^{-1} roztoku hydroxidu sodného (NaOH), fenolové (Follinovo) činidlo a standardní roztok proteinu. Pro stanovení obsahu vybraných prvků byla použita HNO_3 (67% a 1,5%), a dále byl použit peroxid vodíku (36%).

Instrumentace

Celkový obsah ve vodě rozpustných proteinů byl stanoven za pomoci spektrofotometru Marcel Mini od firmy Merazet (Polsko). Při přípravě vzorků byla použita centrifuga Sigma 3-18K (Německo) a třepačka GFL 3006 (Německo).

K měření koncentrace kadmia v mineralizátech rostlin kontrolní skupiny byla použita metoda AAS s elektrotermickou atomizací (ETA-AAS) na přístroji Varian SpectrAA 280 Z (Varian, Austrálie) opatřeném grafitovým atomizátorem GTA 120 a automatickým dávkovačem PSD 120. Koncentrace kadmia v mineralizátech rostlin pokusné varianty, kultivovaných v živném roztoku s obsahem kadmia, byla změřena metodou ICP-OES na přístroji Varian VistaPro (Varian, Austrálie). Stejným způsobem byl měřen obsah železa, zinku, mědi a manganu v mineralizátech rostlin.

Pěstování rostlinek ječmene jarního (odrůda Sebastian) bylo realizováno v kultivační místnosti Výzkumného ústavu rostlinné výroby Ruzyně. Klíčení probíhalo na filtračním papíře v klíčidlech, která byla uložena do termostatu při 20 °C. Naklíčená zrna byla přesazena do kultivačních nádob a jako živný roztok byl použit Knopův roztok. Rostliny byly umístěny v klimatizované kultivační místnosti s umělým osvětlením. Vlhkost vzduchu byla upravena. Byly nastaveny časy osvětlení a tmy 14/10 hodin, teploty 22 °C/16 °C. Rostliny ječmene byly pěstovány ve dvou variantách. Ve variantě kontrolní a ve variantě pokusné, která byla v průběhu růstu rostlin ošetřována roztokem chloridu kademnatého ($c = 10^{-5}$ mol L^{-1}). Po jedenácti dnech kultivace od přidání kadmia do živného roztoku byly rostliny sklizeny. Nadzemní část byla oddělena od kořenů a kořeny byly opláchnuty v destilované vodě. Nadzemní část byla rozdělena na bázi stonku, první (nejstarší), druhý a třetí (nejmladší) list. Takto upravený materiál byl lyofilizován. Po zhruba třídenní lyofilizaci v přístroji LYOVAC-2 (Leybold, GmbH, Německo) byly suché vzorky rozemlety v analytickém mlýnku IKA A11 basic (WERKE GmbH). Namletý materiál byl skladován v chladničce v igelitových sáčcích uložených do exsikátoru.

Celkový obsah proteinů ve vzorcích byl stanoven metodou dle Lowryho, fenolovým (Folinovým) činidlem. Z rostlinného materiálu bylo naváženo 100 mg, byl přidán křemičitý písek a 1 ml demineralizované vody. Následovala homogenizace přibližně 3 minuty na třecí misce. Veškeré množství homogenátu bylo pomocí demineralizované vody kvantitativně převedeno do centrifugačních zkumavek a centrifugováno po dobu 20 minut při 10 000 otáčkách za minutu. Supernatant byl následně převeden do kalibrovaných zkumavek a doplněn demineralizovanou vodou na objem 10 ml. Takto připravený extrakt byl ještě před stanovením proteinů filtrován pomocí filtru Millipore Millex - HV (Hydrophilic PVDF 0,45 μM). Byla připravena sada standardů proteinu o koncentracích 200; 100; 50; 25 a 12,5 μg ml^{-1}. Do první zkumavky byl odměřen přesně 1ml standardního roztoku proteinu. Postupným ředěním tohoto roztoku byly připraveny ostatní koncentrace. K těmto standardům bylo přidáno po 4 ml roztoku (2% Na_2CO_3 v 0,1 mol L^{-1} NaOH s 0,5% $CuSO_4$. $5H_2O$ v 1% vinanu draselnosodném v poměru 50:1). Obsah zkumavek byl protřepán a ponechán 10 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo do všech zkumavek přidáno 0,5 ml fenolového (Folinova) činidla, vše bylo promícháno a ponecháno 30 minut stát při laboratorní teplotě. Současně s těmito standardy byl připraven slepý vzorek. Následně byla proměřena absorbance těchto standardních roztoků při vlnové délce 750 nm, sestrojena kalibrační křivka a rovnice této křivky, s jejíž pomocí byla absorbance konkrétních vzorků přepočítána na skutečný obsah proteinů v sušině. Vzorky připravené z rostlinného materiálu bylo nejprve nutné pro optimalizaci měření 20x naředit.

Stanovení kadmia ve vzorcích rostlin pokusné varianty a všech ostatních prvků (Fe, Zn, Cu, Mn) ve vzorcích kontrolní i pokusné varianty bylo provedeno následujícím postupem. Do teflonových váženek DAP-60S bylo naváženo 0,15 g vzorku. Ke vzorku byly přidány 2 ml HNO_3 (67%) a poté 3 ml H_2O_2 (36%). Nádobky byly protřepány a ponechány půl hodiny stát. Po odstání byly teflonové nádobky uzavřeny a vloženy do mineralizačního zařízení MWS-3+ speed wave (Berghof), kde proběhl tlakový rozklad vzorků. Při tlaku 20 bar, teplotách od 100 °C do 190 °C po dobu 60 minut. Po skončení teplotního rozkladu byly nádobky vyjmuty a nechány vychladnout. Obsah nádobek byl pomocí ultračisté vody kvantitativně převeden do 50 ml kádinek. Kádinky se vzorky byly umístěny na elektrickou topnou desku, kde byly při 120 °C odpařeny téměř do sucha. Po odpaření byly mineralizáty znovu rozpuštěny v 1,5% HNO_3, poté byly převedeny do 10 ml kalibrovaných zkumavek a pomocí střičky s HNO_3 1,5% byly doplněny. Takto připravené vzorky byly analyzovány na obsah kadmia, mědi, zinku, železa a manganu. Zároveň se vzorky byl proveden slepý pokus se všemi činidly. Kvantifikace byla provedena metodou externí kalibrace, při které byly srovnány plochy kalibračních standardů s plochami analytu ve vzorku. Pro kontrolu byl současně analyzován certifikovaný referenční materiál 1567a (pšeničná mouka) a slepé vzorky, jenž byly připraveny stejným způsobem jako ostatní analyzované vzorky, ale bez navážky rostlinného materiálu.

Výsledky a diskuse

Zjevnými příznaky zvýšeného obsahu kadmia v rostlinách bylo zpomalení růstu a poškození kořenů projevující se hnědnutím kořenových vlásků a špiček, chlorózy listů a červenohnědé zbarvení listových okrajů či žilnatiny. Přítomnost kadmia v živném roztoku měla za následek nižší vzrůst rostlin, menší množství a délku kořenů, celkově nižší tvorbu biomasy a obsah chlorofylu.

Nejvyšší obsah kadmia byl nalezen v kořenech rostlin a v dalších částech rostlin pak byla nalezena výrazně nižší množství kadmia. Pro stanovení celkového obsahu ve vodě rozpustných proteinů byla sestavena kalibrační závislost absorbance daného standardního roztoku proteinu na jeho koncentraci ve všech nadzemních částech rostlin ječmene. V důsledku přítomnosti kadmia došlo k nárůstu celkového obsahu ve vodě rozpustných proteinů. V biomase bázi stonků byl zaznamenán nárůst o 34,9 %, v prvních listech o 10,2 %, v druhých listech o 6,5 % a ve třetích listech o 33,4 %. V biomase kořenů byl taktéž zaznamenán nárůst v obsahu ve vodě rozpustných proteinů (o 77,8 %). Ze statistického šetření vyplývá, že čím nižší je obsah kadmia v dané rostlinné části, tím menší je procentuální rozdíl v obsahu ve vodě rozpustných proteinů mezi kontrolní a pokusnou variantou.

Ve všech analyzovaných částech rostlin ječmene byl zjištěn pokles obsahu železa. Nejvýraznější pokles byl zaznamenán v prvním listu (o 47 %) a kořenech (o 41 %). V ostatních částech nebyl tak výrazný. V druhém listu došlo ke snížení obsahu železa o 28 %, ve třetím listu o 23,2 % a v bázi stonku o 12,9 %. Ve všech částech této rostliny, kromě prvních listů (pokles o 21,1 %), byl zaznamenán nárůst obsahu zinku (4 % v kořenech, 70,2 % v bázích stonků, 77,2 % ve třetích listech a 15,8 % druhých listech). V kořenech, bázích stonků a třetích listech pokusných rostlin byl zaznamenáno zvýšené množství mědi. V kořenech bylo toto zvýšení až o 112,1 %, v bázích stonků došlo ke zvýšení obsahu mědi o 42,4 %. Pouze k nepatrné změně (navýšení o 4,3 %) v obsahu mědi došlo ve třetích listech. K výraznému snížení množství mědi došlo v prvních (o 44,4 %) a druhých listech (o 40,9 %). V případě obsahu manganu byl, kromě prvních listů (nárůst o 10,2 %), zaznamenán pokles. V kořenech došlo ke snížení o 10,2 %, v bázích stonků o 21,4 %. Výrazný pokles obsahu manganu byl zjištěn v druhých (o 51,8 %) a třetích listech, kde byl tento pokles ještě výraznější (o 79,0 %).

Závěr

Z výsledků experimentů je patrné, že přítomnost kadmia v živném prostředí ječmene jarního má významný vliv na obsah ve vodě rozpustných proteinů i sledovaných minerálních látek, kterými byly železo, zinek, měď a mangan. Statisticky průkazný nárůst obsahu ve vodě rozpustných proteinů byl zaznamenán v kořenech, bázích stonků a třetích, listech rostlin pokusné varianty, kde do živného roztoku bylo přidáno kadmium. Z analýzy obsahu kovových prvků je patrný klesající obsah kadmia v pořadí kořeny > báze stonků > první (nejstarší) list > druhý list > třetí (nejmladší) list. Kadmium mělo za následek pokles obsahu železa ve všech sledovaných rostlinných částech, mědi v prvním a druhém listu a manganu ve druhém a třetím listu. Naopak významný nárůst byl zaznamenán u zinku ve třetím listu a u mědi v kořenech.

Poděkování

Tato práce vznikla s podporou grantu GA ČR (P208/12/1645).

Literatura

1. Usuda K., Kono K., Ohnishi K., Nakayama S., Sugiura Y., Kitamura Y., Kurita A., Tsuda Y., Kimura M., Yoshida Y.: Toxicol. Ind. Health *27*, 225 (2011).
2. Sestakova I., Jaklova Dytrtova J., Jakl M., Navratil T.: Int. J. Energy Env. *5*, 347 (2011).
3. Hasan S. A., Fariduddin Q., Ali B., Hayat S., Ahmad A.: J. Environ. Biol. *30*, 165 (2009).
4. Novakova K., Navratil T., Sestakova I., Le M. P., Vodickova H., Zamecnikova B., Sokolova R., Bulickova J., Gal M.: Monatsh. Chem. 146, 819 (2015).
5. Upadhyay R. K.: Brazilian Journal of Botany *37*, 377 (2014).
6. Das P., Samantaray S., Rout G. R.: Environ. Pollut. *98*, 29 (1997).

Electrochemical Oxidation of 4-Nitroaniline and 4-Nitrophenol at a Glassy Carbon Electrode

Rene Pfeifer [a,c], Priscila Tamiasso Martinhon [a], Célia Sousa [a], Marco A. C. Nascimento [a], Josino C. Moreira [b] and Jiří Barek [c]

[a] Federal University of Rio de Janeiro, Center of Mathematical and Natural Sciences, Chemistry Institute, Department of Physical Chemistry, GIEESAA Interdisciplinary Group of Education, Electrochemistry, Health, Environmental and Arts, Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Building A, 4th floor, Lab. 411, BR 21941-940, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, E-mail: renepfeifer18@yahoo.com.br

[b] Oswaldo Cruz Foundation, National School of Public Health, Center of Studies of Worker Health and Human Ecology, Street Leopoldo Bulhões, 1480, BR 21041-210, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

[c] Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Albertov 6, CZ-128 43 Prague 2, Czech Republic

Abstract

Differential pulse voltammetry at a glassy carbon electrode (GCE) was used for determination of priority pollutants 4-nitroaniline (4-NA) and 4-nitrophenol (4-NP). For both compounds Britton-Robinson buffer of pH 2.0 was chosen as an optimal base electrolyte. The calibration curve was measured for both substances in the concentration range from 2 to 100 μmol L^{-1}. The calculated limits of detection and quantification are 0.39 and 1.29 μmol L^{-1} (RSD = 5.3 % and R^2 = 0.99283 for n = 5) for 4-NP, and 0.29 and 0.96 μmol L^{-1}(RSD =7.62 %, R^2 = 0.99945 for n = 5) for 4-NA, respectively.

Key words: 4-Nitrophenol, 4-Nitroaniline, Glassy carbon working electrode, Differential pulse voltammetry.

Introduction

Nitroaromatic compounds (NACS) are used as intermediaries in the synthesis of pharmaceuticals, dyes, explosives, and pesticides [1]. They are considered priority pollutants in drinking water because of their mutagenic and/or carcinogenic effects [2-3]. Electrochemical determinations of NACS are mostly based on easy electrochemical reduction of present nitro groups using different electrodes [4-9]. Some studies point out the possibility to use for their quantification anodic oxidation as well [10-11].

It is well known that polishing of the glassy carbon electrode (GCE) surface before each measurement with alumina eliminates passivation of the surface by products of electrochemical oxidation of aromatic hydroxy compounds [12]. Using this procedure, the quantification of these compounds using their anodic oxidation is advantageous since there is no interference of oxygen, a common problem of cathodic quantification. Using 4-NP and 4-NA as model compounds of nitro aromatic compounds that contains electron donating and electrochemically easily oxidisable –OH or $–NH_2$ groups, the present study evaluates the applicability of their quantification by the anodic reaction using the traditional glassy carbon electrode polished with alumina.

Experimental

Aqueous stock solutions of 1 mmol L^{-1} of 4-nitrophenol (99%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were prepared every week by dissolving 0.14099 g of pure substances in 1 L of deionized water (Milliphore, 18.2 Ωmho.cm). UV-Vis spectrophotometric study demonstrated that those stock solutions are stable for at least two months [6]. Aqueous stock solutions of 1 mmol L^{-1} of 4-nitroaniline (99%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were prepared every week by dissolving 0.13960 g of pure substances in 1 L of deionized water. More dilute 4-NA and 4-NP solutions were prepared by exact dilution of stock solutions with buffers solutions. Deionized water produced by a Milli-Q Plus system (Millipore, Billerica, MA, USA) was used. All solutions were stored in glass bottles in the dark at the laboratory temperature.

Boric acid, phosphoric acid, acetic acid, sodium hydroxide (all p.a. purity, Chemapol, Prague, Czech Republic) were used to prepare Britton-Robinson (BR) buffers by titration of a mixture of 0.04 mol L^{-1} boric acid, 0.04 mol L^{-1} phosphoric acid, and 0.04 mol L^{-1} acetic acid with 0.2 mol L^{-1} sodium hydroxide. pH was measured by pH meter Jenway 4330 (Jenway, Chelmsford, UK) with a combined glass electrode of the same producer. The pH meter was calibrated with standard aqueous calibration buffers of pH 4.00, 7.00, and 10.00 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

Voltammetric measurements were performed with a computer controlled FRA2 μAUTOLAB TYPE III, μ3AUT71265 with General Purpose Electrochemical System (GPES) 4.9 software (both Metrohm, Herisau, Switzerland) working under Microsoft Windows XP operating system. Measurements were carried out in the three-electrode arrangement with the glassy carbon electrode (GCE) (Metrohm, Herisau, Switzerland) as working electrode, an Ag|AgCl (3.0 mol L^{-1} KCl) reference electrode (Elektrochemické Detektory, Turnov, Czech Republic) and a platinum wire auxiliary electrode. All potentials in this paper are given with respect to the above mentioned Ag|AgCl (3.0 mol L^{-1} KCl) reference electrode.

At the beginning of the daily measurements, the GCE was polished using alumina slurry (grain size 0.5 μm) for 1 minute, rinsed with deionized water and cleaned in an ultrasonic bath with ultra-pure water. Between individual measurements the same procedure was repeated to eliminate any passivation of the electrode surface. The ultrasonic bath cleaning after alumina polishing was found to be an essential step in the elimination of passivation of the electrode surface after each measurement.

Parameters of differential pulse voltammetry (DPV) were as follows: modulation amplitude - 50 mV, modulation time 50 ms, scan rate 10.05 mV.s^{-1}. At optimal conditions for the determination of 4-NP and 4-NA DP voltammograms were recorded from -800 to -1100 mV and from -800 to -1400 mV, respectively.

All voltammograms were measured three times, and the peak current (I_p) and peak potential (E_p) values for the construction of calibration curves were calculated as arithmetic averages. All calculations were carried out using Origin Pro 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). The limit of quantification (LQ) was calculated using the equation: LQ = 10s/b, where s is the standard deviation of the lowest measurable concentration of 10 repetitive measurements and b is the slope of the calibration curve [13].

Results and discussion

DP voltammetry of 4-nitrophenol at a glassy carbon electrode

The influence of pH on DP voltammograms of 4-NP at GCE is presented in Fig. 1. The highest peak was obtained at pH 2.0 which was used for further measurements.
Calibration curves in the concentration range of 2 – 100 μmol.L^{-1} are depicted in Fig. 2. The limits of detection and quantification are summarized in Table I. and they are quite similar to

those obtained with the cathodic DPV at amalgam electrodes [5,6] based on reduction of nitro group.

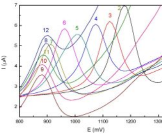


Fig. 1. DP voltammograms of 4-NP (100 μmol.L^{-1}) at GCE in the BR Buffer of pH 2.0 (2), 3.0 (3), 4.0 (4), 5.0 (5), 6.0 (6), 7.0 (7), 8.0 (8), 9.0 (9), 10.0 (10), 11.0 (11), 12.0 (12). Polarization rate 10 mV.s^{-1}.

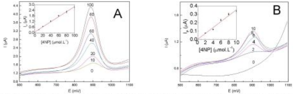


Fig. 2. DP voltammograms of 4-NP at GCE in the BR buffer of pH 2.0 in the concentration range of 10 – 100 μmol.L^{-1} (A) and 2 – 10 μmol.L^{-1} (B); numbers next to curves correspond to actual concentration of 4-NP in μmol.L^{-1}. Insets correspond to concentrations dependence of 4-NP for each range.

Table I.
Parameters of the calibration straight line of 4-NP determination using DPV at GCE in BR buffer pH 2.0 in the concentration range from 2 to 100 μmol.L^{-1}.

Range of concentration, μmol.L^{-1}	10 – 100	2 – 10	2 - 100
Slope, μA μmol^{-1} L	0.03561	0.04258	0.03623
Intercept, μA	0.11845	0.0059	0.07232
Correlation coefficient	0.98945	0.9952	0.99283
L_D, μmol.L^{-1}	2.3	0.39	0.39
L_Q, μmol.L^{-1}	7.7	1.29	1.29
RSD (n=5), %	6.6	5.3	5.3

DP voltammetry of 4-aniline at a glassy carbon electrode

DP voltammograms of 4-NA at a GCE at different pH are shown in Fig. 3. The highest and best developed peak was again obtained at pH 2.0 which was used for further measurements. Voltammograms corresponding to calibration curves in concentration range of 2 – 100 μmol.L^{-1} are shown in Fig. 4. The limits of detection and quantification were calculated, as presented in Table II. and are quite similar values as those obtained with the cathodic peak reaction with amalgam electrodes [5-7].

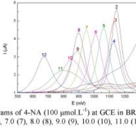


Fig. 3. DP voltammograms of 4-NA (100 μmol.L^{-1}) at GCE in BR buffer pH 2.0 (2), 3.0 (3), 4.0 (4), 5.0 (5), 6.0 (6), 7.0 (7), 8.0 (8), 9.0 (9), 10.0 (10), 11.0 (11), 12.0 (12). Polarization rate 10 mV.s^{-1}.

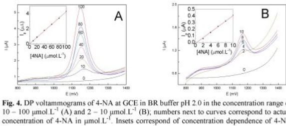


Fig. 4. DP voltammograms of 4-NA at GCE in BR buffer pH 2.0 in the concentration range of 10 – 100 μmol.L^{-1} (A) and 2 – 10 μmol.L^{-1} (B); numbers next to curves correspond to actual concentration of 4-NA in μmol.L^{-1}. Insets correspond of concentration dependence of 4-NA for each range.

Table II.

Parameters of the calibration straight line for DPV determination of 4-NA using DPV at the GCE in BR buffer pH 2.0 in the concentration range 2 - 100 μmol.L^{-1}.

Range of concentration, μmol.L^{-1}	10 – 100	2 – 10	2 - 100
Slope, μA μmol^{-1} L	0.04304	0.04235	0.04336
Intercept, μA	0.01646	-0.01453	-0.0746
Correlation coefficient	0.99933	0.99495	0.99945
L_D, μmol.L^{-1}	1.81	0.29	0.29
L_Q, μmol.L^{-1}	6.03	0.96	0.96
RSD (n=5), %	6.28	7.62	7.62

Conclusions

Anodic DPV method for the determination of 4-NA and 4-NP at a GCE was developed. The limit of detection (LD) in Britton-Robinson buffer pH 2.0 was 0.39 and 0.29 μmol L^{-1}, for-NP and 4-AP, respectively. These values are comparable with cathodic DPV based on electrochemical reduction of nitro group (LD ≈ 0.20 μmol L^{-1}) at meniscus modified silver solid amalgam electrode or polished silver solid amalgam electrode and graphene anchoring magnetite hydroxyapatite composite electrode.[5,6,8] Therefore, it can be concluded that the anodic voltammetry at GCE can be successfully used for the determination of trace amounts of 4-NA and 4-NP.

Acknowledgements

This work was performed in the framework of the Especial Visitant Research (project BR 136/2012) with the financial support of CAPES, which is gratefully acknowledged.

References

1. Podeh, M., Bhattacharya S., Qu M.: Water Res. *29*, 391 (1995).
2. Rawajfih Z., Nsour N.: J. Colloid Interface Sci. *298*, 39 (2006).
3. Tapsoba I., Bourhis S., Feng T., Pontie M.: Electroanalysis *21*, 1167 (2009).
4. Takano S., Shiomoto S., Inoue K., Ino K., Shiku H., Matsue T.: Anal. Chem. *86*, 4723 (2014).
5. Niaz A., Fischer J., Barek J., Yosypchuk B., Sirajuddin, Mhanger M.: Electroanalysis *21*, 1786 (2009).
6. Fischer J., Vaňourková L., Daňhel A., Vyskočil V., Čížek K., Barek J., Pecková K., Yosypchuk B. ; Int. J. Electrochem. Sci. *2*, 226 (2007).
7. Mahmoud K., Ekram R., Omina F.: XXXIII Moderní Elektrochemické Metody, *Jetřichovice, May 20th – May, 24th, 2013*, Book of Abstracts (Navrátil T., Fojta M., and Peckova K., ed.), p. 92.
8. Bharath G., Veeramani V., Chen S., Madhu R., Raja M., Balamurugan A., Mangalaraj D., Viswanathana C., Ponpandian N. ; RSC Advances *5*, 13392 (2015).
9. Veerakumar P., Madhu R., Chen S., Veeramani V., Hung C., Tang P., Wang C. and Liu S. ; J. Mater. Chem. A *2*, 16015 (2014).
10. Garbellini G., Salazar-Banda G., Avaca L. ; J. Braz. Chem. Soc. *14*, 530 (2003).
11. Pedrosa, V., Codognoto L., Avaca L. ; J. Braz. Chem. Soc. *18*, 1095 (2007).
12. Jerky Z., Theodore K. ; J. Am. Chem. Soc. *104*, 5514 (1982).
13. Inczedy J., Lengyel T., Ure A. M.: Compendium of Analytical Nomenclature. International Union of Pure and Applied Chemistry. Zürich 1998.

Examples of Using of Electrochemical Detection at Pencil Graphite Electrode with Enzymatic Labeling for Analysis of Nucleotide Sequence
(Příklady aplikace elektrochemického stanovení na pentilkové electrodě s využitím enzymatického značení pro analýzu nukleotidových sekvencí)

Medard Plucnara [a], Lucia Hároníková [a], Jan Špaček [a], Luděk Havran [a], Petra Horáková [a], Hana Pivoňková [a], Eçe Ecsin [b], Arzum Erdem [b], and Miroslav Fojta [a]

[a] Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic, E-mail: 211107@mail.muni.cz

[b] Ege University, Faculty of Pharmacy, Analytical Chemistry Department, 35100 Bornova, Izmir, Turkey

Abstract

Many examples of utilization of enzymatic labeling for DNA sequence analysis has been described in literature so far. Some of them involve hybridization with complementary biotinylated probe, while others use incorporation of biotinylated nucleotides into DNA strand by DNA polymerases. Common approach is then binding of streptavidine-enzyme conjugates to biotin tags and incubation with substrate, which is converted to detectable product. Here, two recent applications using this principle are described for the detection of PCR amplicons and for SNP typing. Both techniques are combined with detection at pencil graphite electrodes.

Key words: Enzymatic labeling, Alkaline phosphatase, Single nucleotide polymorphism, Pencil graphite electrode.

Úvod

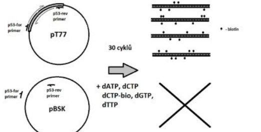
Metoda značení DNA konjugáty streptavidinu s enzymem (např. alkalická fosfatáza-ALP, β-galaktosidáza) připojených k DNA prostřednictvím kovalentně navázaného biotinu už našla v analýze nukleotidových kyselin široké uplatnění. Jako příklady lze uvést stanovení počtu krátkých repetic s využitím biotinylovaných reportérových sond a modifikace komplexy osmia [1] nebo detekce komplementárních sekvencí ve vzorku s využitím magnetoseparace [2]. Alternativou je využití konjugátu enzymu se sekundární protilátkou např. k aduktům osmiových komplexů s DNA [3]. Dále lze uvést typizaci jednonukleotidových polymorfismů s využitím selektivní inkorporace biotinylovaných nukleotidů do řetězce DNA polymerázou [4]. Byly také popsány různé způsoby podstatného zvýšení citlivosti detekce, např. s využitím nanotrubiček pokrytých enzymem [5] nebo také současná detekce dvou cílových sekvencí s využitím dvou různých enzymů produkující elektrochemicky odlišitelné produkty [6].

Experimentální část

V tomto příspěvku jsou popsány dva nové příklady využití enzymatického značení, v obou případech ve spojení s detekcí na „pentilkové" elektrodě. Prvním je detekce specifických produktů PCR reakce, tedy v podstatě detekce přítomnosti cílové sekvence (v tomto případě p53 cDNA) ve vzorku a druhým typizace jednonukleotidového polymorfismu v lidské mitochondriální DNA. V obou případech je metoda založena na selektivní tvorbě biotinylovaných řetězců DNA v prvním kroku a následném rozlišení na základě přítomnosti signálu produktu enzymové reakce.

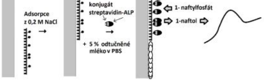
Detekce přítomnosti PCR amplikonů p53 cDNA

Cílem bylo na základě přítomnosti signálu oxidace 1-naftolu detekovat přítomnost amplikonů cDNA po PCR reakci, tzn. přítomnost komplementární sekvence k amplifikačním primerům na plazmidu[7]. Byly použity plazmidy pT77 obsahující 347 nukleotidů dlouhý úsek p53 cDNA a pBluescript (pBSK), který příslušnou sekvenci neobsahuje (obr. 1). Reakční směs pro PCR reakci obsahovala templát (pT77 nebo pBSK) – 10 pg/μl, primery p53-for a p53-rev – 0,25 μM, směs dNTPs – 100 μM (2 % dCTP bioninylovaných) a DNA polymerázu Pfu – 0,3 U. PCR probíhala v 30 cyklech (90 s denaturace při 95 °C, 60 s nasedání primeru při 71 °C a 60 s elongace při 72 °C).



Obr. 1. Schéma selektivní amplifikace fragmentu p53 cDNA z plazmidů pT77 obsahujícího sekvenci komplementární k primerům a pBSK neobsahujícího příslušnou sekvenci jako neg. Kontroly.

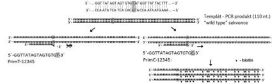
Následovala purifikace produktů s využitím PCR purifikačního kitu (Quiagen). Postup enzymatické detekce je naznačen na obr. 2. Adsorpce vzorku na povrch elektrody byla provedena v prostředí 0,3 M NaCl, po opláchnutí PBS (pH = 7,4) následovala inkubace s konjugátem alkalické fosfatázy se streptavidinem (SALP) v roztoku 5% odtučněného mléka v PBS, opět opláchnutí roztokem PBS (pH = 7,4) a inkubace se 0,5 mM substrátem a měření metodou lineární voltametrie v rozsahu od - 0,3 V do + 1,3 V.



Obr. 2. Schéma adsorpce a následné enzymatické detekce na povrchu pentilkové elektrody.

Detekce vybraného jednonukleotidového polymorfismu v lidské mitochondriální DNA

Pro detekci jednonukleotidového polymorfismu v lidské mitochondriální DNA jsme použili selektivní elongaci diagnostických primerů s (ne)komplementárním 3´-koncovým nukleotidem s místem polymorfismu v templátu (obr. 3), která byla provedena v režimu teplotních cyklů zajišťujících lineární amplifikaci biotinylovaných produktů. Reakci je nutné provést při dostatečně vysoké stringenci (dostatečně vysoká teplota zajišťující vysoce selektivní nasedání primeru). Při dostatečné stringenci probíhá elongace, tj. tvorba biotinylovaných produktů, pouze v případě primeru komplementárního v místě 3´ koncového nukleotidu. Templátem zde byl 110 bp dlouhý PCR produkt lidské mitochondriální DNA (5 ng/µl). Reakční směs dále obsahovala příslušný diagnostický primer – 0,6 µM, směs nukleotidtrifosfátů – každý 50 µM (75 % dCTP biotinylovaných) a Vent polymerázu (mutant bez 3´→ 5´ exonukleázové aktivity) – 0,05 U/µl. Reakce prodlužování primeru byla provedena při různém počtu teplotních cyklů (denaturace - 15 s při 95 °C, nasedání primeru - 20 s při 60 °C, elongace - 45 s při 72 °C) s úvodní denaturací při 95 °C po dobu 3 min. a terminální elongaci při 72 °C po dobu 5 min.



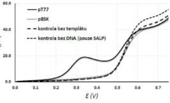
Obr. 3. Schéma selektivní lineární amplifikace s využitím dvou různých diagnostických primerů (primT a primC).

Adsorpce produktů této reakce na elektrodu byla provedena přímo z reakční směsi bez purifikace produktů po přídavku NaCl do 0,2 M koncentrace. Následná enzymatická detekce a měření bylo provedeno způsobem popsaným výše (Obr. 2).

Výsledky a diskuze

Detekce přítomnosti PCR amplikonů p53 cDNA

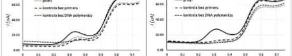
Na obr. 4 můžeme vidět, že signál oxidace 1-naftolu se objevil pouze v případě přítomnosti cílové sekvence v plazmidu. V případě templátu bez příslušné sekvence a negativních kontrol se neobjevil. Přítomnost, resp. intenzita nespecifických signálů však závisela na typu použité polymerázy.



Obr. 4. Rozlišení signálů oxidace 1-naftolu pro amplifikaci Pfu polymerázou z plazmidů pT77 (obsahuje cílovou sekvenci pro primery), pBSK (neobsahuje cílovou sekvenci) a pro

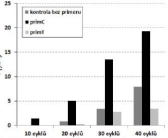
negativní kontroly bez templátu a bez adsorpce vzorku, tj. pouze ponoření do roztoku SALP a inkubace se substrátem (vyloučení nespecifické vazby SALP na povrch elektrody).

Detekce vybraného jednonukleotidového polymorfismu v lidské mitochondriální DNA
Jak je patrné na obr. 5A, v případě kontroly bez diagnostického primeru se objevoval výrazný nespecifický signál oxidace 1-naftolu. To ukazuje na možnou přítomnost nedosyntetizovaných řetězců, případně zbytků původních primerů ve směsi PCR produktu, sloužícího jako templát, které se během cyklické amplifikace rovněž prodlužují směsí nukletidtrifosfátů (včetně biotinylovaných). Tento problém jsme vyřešili terminací volných 3´- konců ve směsi pomocí dideoxy TTP (100 μM) a terminální transferázy před vlastní elongací diagnostických primerů (výrazný pokles signálu u kontroly bez primeru, resp. v případě primT - obr. 5B).



Obr. 5. Vliv terminace volných 3´-konců ve směsi templátu před prodlužováním primeru na intenzitu nespecifických signálů oxidace 1-naftolu; **A** – neterminovaná směs templátu; **B** – terminace templátu terminální transferázou a 100 μM ddTTP.

Dále jsme sledovali rozlišení signálů pro různé diag. primery a kontrolu bez primeru při snižování počtu cyklů (obr. 6).



Obr. 6. Porovnání signálu oxidace 1-naftolu pro různé diagnostické primery a negativní kontrolu bez primeru po různém počtu cyklů s využitím terminace terminální transferázou a dideoxy TTP před prodlužováním primerů.

Závěr

Pomocí enzymatického značení s detekcí na pentilkové elektrodě se podařilo spolehlivě detekovat přítomnost produktů amplifikace a odlišit plazmidy na základě přítomnosti cílové sekvence. Zjišťování přítomnosti sekvence např. v klinických vzorcích může posloužit třeba k detekci přítomnosti mikrobiálních patogenů, delecí v genech, apod. Při typizaci bodových mutací se rovněž podařilo dosáhnout dostačujícího rozlišení, a to už při nízkém počtu cyklů. Při obou metodách je však vždy nutné optimalizovat parametry (zejména stringenci reakce) právě pro danou konkrétní sekvenci. Pentilková elektroda je pro detekci v těchto případech naprosto dostačující, kromě toho představuje velmi levnou a konstrukčně jednoduchou variantu a navíc nevyžaduje před měřením žádnou elektrochemickou ani jinou úpravu.

Poděkování

Tato práce vznikla díky podpoře grantu GA ČR (P206/12/G151) a institucionální podpoře RVO 68081707

Literatura

1. Fojta M., Havran L., Vojtišková M., Paleček E.: J. Am. Chem. Soc. *126*, 6532 (2004)
2. Wang J., Xu D., Erdem A., Polsky R., Salazar M. A.: Talanta *56*, 931 (2002)
3. Paleček E., Kizek R., Havran L., Billová S., Fojta M.: Anal. Chim. Acta *469*, 73 (2002)
4. Horáková P., Šimková E., Vychodilová Z., Brázdová M., Fojta M.: Electroanal. *21*, 1723 (2009)
5. Wang J., Liu G. D., Jan M. R.: J. Am. Chem. Soc. *126*, 3010 (2004)
6. Wang J., Kawde A. N., Musameh M., Rivas G.: Analyst *127*, 1279 (2002)
7. Hároníková L., Špaček J., Plucnara M., Horáková P., Pivoňková H., Havran L., Erdem A., Fojta M.: Monatch. Chem. *146*, (2015).

On-line Analysis of K^+ and NH_4^+ Ions in the Primary Circuit of VVER-440 Nuclear Reactor

Petr Pořický [a] and Zdeněk Zmeškal [b]

[a] ČEZ a.s., NPP Dukovany, 675 50 Dukovany, Czech Republic, E-mail: petr.poricky@cez.cz

[b] Metrohm Czech Republic, Na Harfě 935/5c, 190 00 Prague 9, E-mail: office@metrohm.cz

Abstract

This presentation is focused on practical application of Metrohm-Applikon On-line analyzer ADI 2045Ti in VVER-440 type reactor in Nuclear power plant Dukovany. Chemistry in VVERs is different than that used in PWRs and the knowledge of the concentration of ammonia is crucial for keeping oxygen level as low as possible to prevent corrosion. Potassium hydroxide is added to counter the acidity of hydroboric acid. Analyzer is designed for determination of Potassium and ammonia ions by standard addition method with Metrohm ISE electrodes. Analyzers are now operational for more than 1 year. For presentation purposes one month of data were chosen. Measured data were processed in QC EXPERT statistical software developed by Trilobyte Ltd. The results delivered by analyzer are corresponding with theoretical values as well as results provided by laboratory.

Key words: Potassium ions, Ammonium ions, Determination, Nuclear Reactor.

Introduction

Coolant in the primary circuit is a solution of boric acid in a concentration range from 0,5 to 13,0 g/l. other important ions are K+,NH_4^+, Na^+ and Li^+. The concentration of the K^+ ions is dependent on the concentration of boric acid. K^+ is dosed in to the primary circuit as a solution of potassium hydroxide. The concentration of Na^+ is in a range from 500 to 600 µg/l and the presence is caused by the impurities in dosed chemicals. Ion Li^+ is created by the nuclear reaction of boron; the standard concentration of Li^+ is around 600 µg/l.

In the reactor, the radiolysis of water occurs and the products are hydrogen and oxygen. Oxygen leads to corrosion and it needs to be eliminated. There are two ways to remove the oxygen. First is to dose hydrogen directly in to the coolant, where hydrogen reacts with oxygen. Second is to add a solution of ammonia in to the coolant, radiolysis of ammonia occurs and hydrogen and nitrogen are created. Both ways lead to a low concentration of oxygen.

The reason for online measurement of potassium and ammonia ions is that the concentrations are necessary for high temperature pH_{300} calculation.

The measurement was performed by analyzer ADI 2045Ti from Metrohm Applikon (Fig. 1).

Experimental

Analyzer schematics

Analyzer ADI 2045Ti is composed of separated modules, that enables to adapt the analyzer specifically for customer's needs. The determination of ammonia and potassium ions is performed by standard addition method with polymer ion selective electrodes. Both measurements are performed simultaneously in two reaction vessels. The standard addition is performed by Dosino, a precise automatic burette from Metrohm.

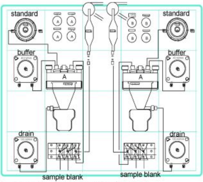


Fig. 1. Analyzer ADI 2045Ti - Metrohm Applikon schematics.

Analytical method

Analytical method is based on the standard addition method, commonly used in the laboratories. The degassed sample is transported to the analyzer via 2/3-way valve. Sampling pipette is first flushed with the sample and re-filled. 10ml of the sample is dosed to the reaction vessel. Buffer is added, stirred and the first addition follows. The result of the first addition decides expected range of the measurement. The volume of the second standard addition is adjusted based on the first addition's potential. When a stable potential is achieved the value is saved. The calibration curve is automatically updated. After the analysis the reaction vessel and the sample lines are automatically cleaned.

Results and discussion

Optimization

The optimization of the application was performed during the first weeks of operation, including adjustments of electrodes positions, stirrer speed, standard addition and calibration parameters, cleaning cycle parameters. After the optimization of the application control, testing was performed.

Calibration

Calibrations (Fig. 2, Fig. 3) were performed by solutions with following concentrations:
K^+ calibration: 1, 5, 10, 15 and 20 mg K^+/l (Table I),
NH_4^+calibration: 1, 5, 10, 15 and 20 mg NH_3/l (Table II).

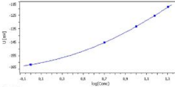


Fig. 2. Calibration plot for K^+.

Table I.
Standards of K^+.

K^+	Concentration[mg/l]
Standard1	1.000
Standard2	5.000
Standard3	10.000
Standard4	15.000
Standard5	20.000

Calculated slope amounted to 59.8 mV/decade.

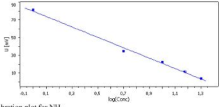


Fig. 3. Calibration plot for NH_3.

Table II.
Standards of NH_3

NH_4^+	Concentration[mg/l]
Standard1	1.000
Standard2	5.000
Standard3	10.000
Standard4	15.000
Standard5	20.000

Calculated slope amounted to -58.6 mV/decade.

Control measurement
10 mg/l K^+ and NH_4^+ standards were dosed and measured 17 times (Table III).

Table III.
Measurement results

	K [mg/l]	NH_3 [mg/l]
Avg.:	9.82	10.26
Min.:	9.74	10.16
Max:	9.89	10.37
variance:	0.0215	0.044
Standard deviation:	0.147	0.21

Calculated error
K^+: -1.8%
NH_3: 2.6%

Lab vs online
Laboratory measurement of K^+ is performed daily, on-line measurement is performed hourly (Fig. 1). There was no significant difference in the results.

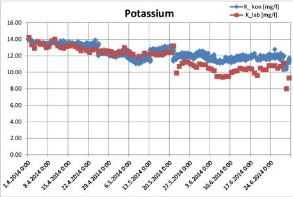


Fig. 4. Recording measuring the concentration of K^+.

Laboratory measurement of $NH_4^+$is performed 2x per week, on-line measurement every 30 minutes (Fig. 5). There is no significant different between lab measurement and online measurement.

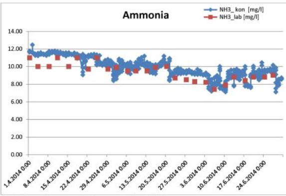


Fig. 5. Recording measuring the concentration of NH_3.

Conclusion

Metrohm – Applikon ADI 2045Ti analyzer shows promising results and is considered a valuable instrument for online determination of K^+ and NH_4^+ ions in a coolant in a primary circuit in NPP Dukovany. Control and process testing was successful and the results stayed below 5% error, declared by the manufacturer.

Voltammetric Determination of Environmental Pollutant 2,4,6-Trinitrophenol Using a Bismuth Bulk Electrode

Vit Prchal, Vlastimil Vyskočil, and Jiří Barek
Charles University in Prague, Faculty of Science, University Research Centre UNCE "Supramolecular Chemistry", Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Hlavova 8, CZ-128 43 Prague 2, Czech Republic
E-mail: vit.prchal@natur.cuni.cz

Abstract
2,4,6-Trinitrophenol (picric acid, PA) is known to have severe genotoxic effects, while adverse reactions are observed in humans as well. World Health Organization (WHO) has designated PA as one of the priority contaminants of the surface waters. In this contribution, a bismuth bulk electrode was used for investigation of the electrochemical behavior of PA, using differential pulse voltammetry, and a new method for its determination was subsequently developed. The optimal medium for the determination was 0.1 mol L^{-1} acetate buffer pH 4.0. The calibration curves were measured in the concentration range from 2 to 100 μmol L^{-1}, with the limits of quantification 0.7 μmol L^{-1} in deionized water, 1.1 μmol L^{-1} in drinking water, and 1.8 μmol L^{-1} in river water. The *RSD* (n = 20) were 3.2, 6.2, and 9.9 %, respectively.

Key words: 2,4,6-Trinitrophenol, Picric acid, Bismuth bulk electrode, Differential pulse voltammetry, Electrochemistry.

Introduction

In the last few decades, nitrated aromatic compounds are in the focus of many environmental agencies because of their toxicity and potential risks concerning the environment. Majority of these compounds are confirmed carcinogens, with strong genotoxic activity when released into the environment.

One of the most important compounds from this group is 2,4,6-trinitrophenol, better known as picric acid (PA), which is well known for its severe genotoxic effects [1] observable even in humans [2]. World Health Organization (WHO) has designated PA as one of the major contaminants in surface waters [3]. As a result of these facts, development of new, highly sensitive methods for determination of PA is highly desirable. Historically, PA was most notably used as explosive [4] and as antiseptic for burn treatment [5]. Nowadays, it is mostly used as precursor for chemical synthesis.

It is well known for long time that nitrated organic substances can be easily determined using electroanalytical methods, because nitro group can be very easily reduced on working electrodes made of various materials. In this contribution, a bismuth bulk electrode (BiBE) was used for differential pulse voltammetric determination of PA.

Experimental

The stock solution of PA (98%, Aldrich, USA) was prepared by its dissolution in Milli-Q deionized water (Millipore, USA), resulting concentration being 1 mmol L^{-1}. All other solutions of lower concentrations were prepared by exact dilution of the stock solution. A 0.1 mol L^{-1} acetate buffer solution prepared from analytical grade reagents was used to adjust the pH..

The electrolyte consisted of 9 mL of a sample (deionized water, drinking tap water, or river water) and 1 mL of the acetate buffer solution to adjust the pH.. Small increments of the PA stock solution were added to water samples to construct calibration curves. Drinking water was obtained from public water supply at the Institute of Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague; a river water sample was taken from the river Vltava, at the Výtoň locality in Prague.

All measurements were performed using an Autolab PGSTAT10 potentiostat/galvanostat connected to a Metrohm 663 VA Stand (both Metrohm Autolab, Switzerland) with the BiBE (prepared in our laboratory) as a working electrode, an Ag|AgCl (3 mol L^{-1} KCl) reference electrode (Elektrochemické Detektory, Czech Republic), and a platinum wire auxiliary electrode. The potentiostat was controlled by the NOVA 1.10 software (Metrohm Autolab, Switzerland). Parameters of differential pulse voltammetry (DPV) were as follows: modulation amplitude -50 mV, modulation time 80 ms, scan rate 25 mV s^{-1}. Before each voltammetric measurement, oxygen was removed from measured solutions by bubbling with nitrogen (purity 4.0, Linde, Czech Republic) for 5 min. For optimization purposes, DPV scans were performed in the whole available potential window of the BiBE. At optimal conditions for the determination of PA, DP voltammograms were recorded from -0.07 to -0.60 V.

On each day of measurements, the BiBE was polished using alumina slurry (grain size 0.5 µm). Afterwards, it was rinsed thoroughly with deionized water and, then, sonicated for 5 min to remove any alumina residue stuck on the electrode surface. Finally, the BiBE was activated by performing 25 cyclic voltammetric scans from 0 to -1.2 V at a polarization rate 100 mV s^{-1}.

Results and Discussion

First of all, the optimal pH of the supporting electrolyte (acetate buffer) had to be found. In acidic media, all three reducible nitro groups on the aromatic ring are reduced simultaneously, and with the increasing pH, the responses differ, starting to form three independent peaks. This was behind the reason to use acetate buffer. At pH 2.0, the peak probably lies out of the potential window of the BiBE, only small underdeveloped peak was visible at the peak potential E_p = -0.28 V. From pH 3.0 to 6.0, the peak of PA was observable. pH 4.0 was selected as the optimal one, because the peak was the best developed and the highest (the peak current I_p = 947 nA at the E_p = -0.18 V; see Fig. 1). The peak potential shift towards negative potentials is linear in the whole range.

One of the major drawbacks of the BiBE can be lower repeatability of measurements, especially when determining organic compounds. Many different techniques to stabilize the electrochemical response were tested, ranging from regeneration at various fixed potentials to different regeneration pulses, which were met with little to no success, even when the regeneration times used were inadequately long (up to 20 min). This problem is caused by susceptibility of metallic bismuth to form oxides, thus changing the active electrode area and resulting in a signal height decrease over time. However, since bismuth oxides can be formed electrochemically, when cycling into positive potentials, an effective remedy was proposed by El Tall et. al [6]. The procedure is quite simple: when the electrode is not in use, it is left with a standby potential of -1.0 V in 0.1 mol L^{-1} acetate buffer pH 4.0, keeping the electrode polarized and preventing bismuth oxides to be formed. When using this method, repeatability of the measurements increased dramatically: the *RSD* (c = 100 µmol L^{-1}, n = 20) was down to 3.0%, when measuring in a deionized water matrix.

Afterwards, calibration dependences were measured at pH 4.0. Since the peak of PA is formed at the beginning of the DPV scan, the peaks cannot be effectively evaluated, especially at lower concentration ranges. An advanced method of the peak processing was used: the peaks were evaluated using a fixed-order polynomial baseline correction method (see Fig. 2), with the polynomial order of three. This technique relies on selecting a given number of points on the original curve (polynomial order +1; so in this case four points), and software algorithm then calculates the baseline as a polynomial curve [7]. The peak currents from the fitted polynomial baseline are then subtracted from the original DP voltammogram, resulting in a curve that is simpler to evaluate compared to the original voltammogram. For reproducibility reasons, those four points were always selected at the same potential values. The reasoning behind this is simple: the BiBE exhibits a big charging current drop at the beginning of the scan, thus making difficult to evaluate the height of the peak at a sharply decreasing baseline. Therefore, the lowest possible concentration for the peak evaluation using linear baseline is around 10 μmol L^{-1}. However, when polynomial baseline was fitted, peaks corresponding to the concentration around 1 μmol L^{-1} can still be evaluated.

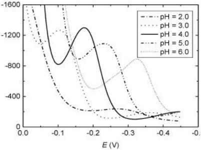


Fig. 1. DP voltammograms of PA (c = 100 μmol L^{-1}) at the BiBE in deionized water – 0.1 mol L^{-1} acetate buffer (pH 2.0 – 6.0) (9:1) mixture.

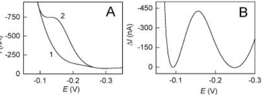


Fig. 2. The different method of the peak evaluation, shown at an example of PA in a deionized water matrix (c = 40 μmol L^{-1}, pH = 4.0). **(A)** The fixed-order polynomial baseline correction outlined: (1) the fitted fixed-order polynomial baseline; (2) the recorded signal of PA. **(B)** The resulting curve, when the fixed-order polynomial baseline correction is applied ($\Delta I = I_{curve,2} - I_{curve,1}$ from Fig. 2A).

The results and parameters of the calibration curve are summarized in Table I, and recorded DP voltammograms for the lowest concentrations are shown in Fig. 3. Only the concentration range of 1 – 10 μmol L^{-1} is depicted, both without and with the polynomial baseline correction used. Afterwards, the newly developed method was applied to real sample matrices of drinking tap water and river water. All the obtained results are summarized in Table I. as well. However, it is important to note that in real sample matrices, PA shows slightly different electrochemical behavior: a smaller peak is occurring immediately after the "main" peak. Nevertheless, only the higher "main" peak was used for constructing the calibration curves.

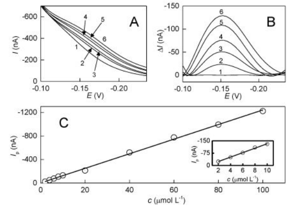


Fig. 3. DP voltammograms of PA measured at the BiBE in deionized water – 0.1 mol L^{-1} acetate buffer pH 4.0 (9:1) solutions in the concentration range of 2 – 10 μmol L^{-1}. **(A)** Without baseline correction and (**B**) with polynomial baseline correction (blank (**1**), 2 μmol L^{-1} (**2**), 4 μmol L^{-1} (**3**), 6 μmol L^{-1} (**4**), 8 μmol L^{-1} (**5**), and 10 μmol L^{-1} (**6**) of PA). **(C)** Corresponding concentration dependence of PA (2 – 100 μmol L^{-1}); the inset shows the lower concentration range (2 – 10 μmol L^{-1}).

Conclusions

A new voltammetric method for the determination of genotoxic pollutant 2,4,6-trinitrophenol (picric acid, PA) at a bismuth bulk working electrode (BiBE) was developed. The limit of quantification (L_Q) reached using differential pulse voltammetry (DPV) in 0.1 mol L^{-1} acetate buffer pH 4.0 is 0.7 μmol L^{-1}, which is slightly lower than that reached using the same technique at another working electrode, proposed as a mercury substitute – a polished silver solid amalgam composite electrode ($L_Q \approx 1$ μmol L^{-1}) [8,9]. Therefore, it can be concluded that the BiBE can be successfully used for the determination of trace amounts of PA as a suitable non-toxic and environmentally friendly alternative to mercury electrodes.

Table I.
Parameters of the calibration curves of DPV determination of PA at the BiBE in water sample – 0.1 mol L^{-1} acetate buffer pH 4.0 (9:1) solutions in the concentration range from 2 to 100 µmol L^{-1}. R – correlation coefficient, L_D – limit of detection, L_Q – limit of quantification.

Matrix	Slope (nA L µmol^{-1})	Intercept (nA)	R	L_D (µmol L^{-1})	L_Q (µmol L^{-1})	RSD (n = 20) (%)
Deionized water	-17.2	-2.4	-0.9880	0.2	0.7	3.0
Drinking water	-13.5	3.3	-0.9960	0.3	1.1	6.2
River water	-11.5	-8.4	-0.9991	0.5	1.8	9.9

Acknowledgements
This work was performed in the framework of the Specific University Research (project SVV260205). Vít Prchal would like to thank the Grant Agency of Charles University in Prague (project GAUK 278015), and Vlastimil Vyskočil and Jiří Barek would like to thank the Grant Agency of the Czech Republic (project P206/12/G151) for financial support of this work.

References
1. Whong W. Z., Edwards G. S.: Mutat. Res. *136*, 209 (1984).
2. O'Neill M. J. (ed.): *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, Vol. 14.* Merck Research Laboratories, Whitehouse Station 2006.
3. Schmoll O., Howard G., Chilton J., Chorus I. (eds.): *Protecting Groundwater for Health: Managing the Quality of Drinking Water Sources.* IWA Publishing (WHO), London 2006.
4. Brown G. I.: *The Big Bang: A History of Explosives.* Sutton Publishing, Stroud 1998.
5. Macpherson W. G.: *Medical Services, Surgery of the War, Vol. 1.* Her Majesty's Stationary Service, London 1922.
6. El Tall O., Beh D., Jaffrezic-Renault N., Vittori O.: Int. J. Environ. Anal. Chem. *90*, 40 (2010).
7. Górski Ł., Ciepela F., Jakubowska M.: Electrochim. Acta *136*, 195 (2014).
8. Vyskočil V., Navrátil T., Daňhel A., Dědík J., Krejčová Z., Škvorová L., Tvrdíková J., Barek J.: Electroanalysis *23*, 129 (2011).
9. Dědík J., Vyskočil V., Daňhel A., Barek J.: Chem. Listy *106*, 217 (2012).

Application of Boron Doped Diamond Electrodes for Square-wave Voltammetric Analysis of Antibiotics in Water Samples

Monika Radičová [a], Miroslav Behúl [b], Marian Vojs [b], Róbert Bodor [a], and Andrea Vojs Staňová [a]

[a] Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská Dolina - Ilkovičova 6, SK-842 15 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: radicova@fns.uniba.sk

[b] Institute of Electronics and Photonics, Faculty of Electrical Engineering and Information Technology, Slovak University of Technology, Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava, Slovak Republic

Abstract

A new, rapid and sensitive voltammetric method using an unmodified boron-doped diamond electrode was developed for the determination of erythromycin and ciprofloxacin in water samples. A three-electrode system was set in an electrochemical cell with Ag/AgCl/3M KCl electrode as the reference electrode and a platinum electrode as the counter electrode. A square-wave voltammetry in ammonium acetate buffer (pH 5) was used for the determination of erythromycin and ciprofloxacin in a linear concentration range from 6.8 to 68.1 μmol/l and from 0.30 to 1.51 μmol/l, respectively. The developed SW method was applied to analysis of selected antibiotics in several water samples.

Key words: Erythromycin, Ciprofloxacin, Voltammetry, BDD Electrode, Water Samples.

Introduction

In recent years, pharmaceuticals and personal care products have attracted a growing attention worldwide as emerging contaminants, which would present a potential threat to aquatic life and even human health. As one group of the most important pharmaceuticals, antibiotics have been excessively used in human and veterinary medicine [1, 2]. Wastewater treatment plants (WWTPs) are not designed to completely remove antibiotics, and consequently they are released into natural waters. Moreover, antibiotics can pass through all natural filtrations and reach ultimately to drinking water due to their high water solubility and often a poor degradability [3]. It is important to note that many of these substances may remain chemically and biologically active even at very low concentration levels in environment [4].

Many studies are focusing on various antibiotics emerging in wastewater and in drinking water, whose presence is continuously increasing [4]. The most common approach for water analysis is based on a combination of liquid chromatography with ultraviolet [5], fluorescence [6] and mass spectrometric detection [7-10]. The liquid chromatography techniques generally use a mobile phase for elution of the analytes, which can pollute environment, and also require time consuming sample preparation [11]. Therefore, several sensitive voltammetric methods are widely used as alternative methods for micro-analysis [12-16].

Erythromycin is a broad-spectrum antibiotic that exhibit a high activity against nearly all Gram-positive and Gram-negative bacteria. It is a macrolide antibiotic having an antimicrobial spectrum similar to or slightly wider than that of penicillin, and is often prescribed for people having an allergy to penicillin. The most part of erythromycin is metabolized by demethylation in the liver. Its main elimination route is in the bile, and a small portion in the urine [17]. Ciprofloxacin is a broad spectrum synthetic antimicrobial agent against both gram-positive and gram-negative aerobic pathogens [18]. It is a 4-quinolone derivative, derived from a nalidixic acid. It provides an effective treatment for a variety of infections particularly those of the urinary, respiratory and gastrointestinal tract, skin and soft tissues. Its spectrum of activity and favourable pharmacological properties make ciprofloxacin useful in the treatment of diabetic foot infections [19]. In this work, the voltammetric behavior of the selected antibiotics (erythromycin and ciprofloxacin) on the unmodified boron doped diamond electrode and its use for the determination of erythromycin and ciprofloxacin in real water samples is described.

Experimental

All measurements were performed by Potentiostat/Galvanostat PGSTAT128N (Metrohm Autolab B.V., Utrecht, Netherland), which was operated by PC using software NOVA ver. 1.10.3 (Metrohm). A three-electrode system was set in an electrochemical cell with Ag/AgCl/3 mol/l KCl electrode as the reference electrode and a platinum electrode as the counter electrode. Unmodified BDD electrodes were used as the working electrode. Cyclic voltammetry (potential range 0 - 1.8 V, step potential 2.5 mV and scan rate 50 mV/s) and square wave voltammetry (potential range 0 - 1.8 V, potential step 0.001 V, amplitude 0.05 V, frequency 70 Hz) were used for electrochemical measurements. Each measurement was repeated three times. All pH values were measured with a pHenomenal pH 1000 L (VWR, Vienna, Austria) pH meter.

Erythromycin and ciprofloxacin were obtained from AppliChem (Darmstadt, Germany). All chemicals for the preparation of a supporting buffer solution were of analytical grade and were obtained from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Water purified by a Labconco WaterPro PS water purification system (Labconco, Kansas City, MI, USA) was used for the preparation of all solutions.

Stock solutions of erythromycin (1.36 mmol/l) and ciprofloxacin (3 mmol/l) were prepared by dissolving of 1 mg of a drug (AppliChem) in 1 ml of the distilled water and filtered through syringe filters of a 0.45 µm pore size (Millipore, Molsheim, France). All experiments were performed in a 0.1 mol/l ammonium acetate buffer (pH=5).

In this study, different real water samples were used (tap water, wastewater from a municipal treatment plant). Before the analysis, all water samples were filtered through 0.45 µm syringe filters (Millipore) and stored in a fridge.

Results and discussion

In the first part of our experimental work we focused on the optimization of electrochemical conditions for the analysis of erythromycin and ciprofloxacin. Cyclic voltammetry (CV) and square wave voltammetry (SW) were selected from electrochemical methods for the analysis of selected antibiotics. The working conditions such as potential range, step potential, amplitude, deposition time and frequency were optimized (optimal conditions are shown in the part Experimental - Apparatus and Experimental conditions). With an increasing value of the optimized parameters also the peak current of erythromycin was increased. However, this phenomenon was linked with the peak broadening and the background current increase. Therefore, the selection of optimal values of the given parameters was a compromise between the peak high and shape. Figure 1 is showing the influence of frequency on peak parameters in SW analysis of erythromycin (25.2 µmol/l) in 0.1 M acetate buffer (pH=5) on the BDD electrode.

We prepared calibration solutions containing erythromycin and ciprofloxacin at concentration levels from 6.8 to 68.1 μmol/l and from 0.3 to 1.5 μmol/l, respectively. We were able to observe an erythromycin oxidation peak at potential + 0.87 V and a ciprofloxacin oxidation peak at potential + 1.16 V. Figure 2 shows a SW voltammogram with increasing concentrations of erythromycin and corresponding calibration curves.

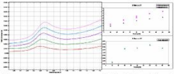


Fig. 1. Influence of frequency on peak parameters in the SW analysis of erythromycin with c=25.2 μmol/l in the 0.1M acetate buffer (pH=5) on the BDD electrode.

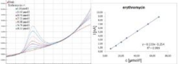


Fig. 2. SW analysis of erythromycin in the 0.1 M acetate buffer (pH=5) on the BDD electrode and the corresponding calibration curve.

In the next step we used a proposed method for determination of erythromycin and ciprofloxacin in real water samples. In the Fig. 3 a simultaneous analysis of ciprofloxacin and erythromycin in 0.1 M ammonium acetate buffer (pH=5) is shown. Fig. 4 illustrates an analysis of erythromycin in a water sample spiked at three concentration levels of erythromycin (6.8, 13.6 and 20.4 μmol/L).

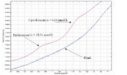


Fig. 3. SW analysis of erythromycin and ciprofloxacin in 0.1 M acetate buffer (pH=5) on the BDD eletrode.

Conclusions

In the presented work, the unmodified boron doped diamond electrode was used for the voltammetric determination of erythromycin and ciprofloxacin. We developed a sensitive square wave voltammetric method for the determination of erythromycin (LOD = 1.1 μmol/l) and ciprofloxacin (LOD = 0.4 μmol/l). The SW method shows a good linearity in concentration range from 6.8 to 68.1 μmol/l and from 0.3 to 1.5 μmol/l for erythromycin and ciprofloxacin, respectively. The proposed method was successfully applied to analysis of both antibiotic agents in real water samples without any preconcentration step and with only filtration of the samples.

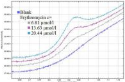


Fig. 4. SW analysis of erythromycin in wastewater on the BDD electrode.

Acknowledgement

This work was financially supported by the grant of the Slovak Research and Development Agency (APVV-0365-12).

References

9. Kong D., Liang B., Yun H., Cheng H., Ma J., Cui M., Wang A., Ren N.: Water Res. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.01.025.
10. Llorca M., Gros M., Rodríguez-Mozaz S., Barceló D.: J. Chromatogr. A *1369*, 43 (2014).
11. Heidari M., Kayemipour M., Bina B., Ebrahimi A., Ansari M., Ghasemian M., Amin M.: J. Environ. Pub. Health (2013), http://dx.doi.org/10.1155/2013/351528.
12. Bussy U., Ferchaud-Roucher V., Tea I., Krempf M., Silvestre V., Boujitita M.: Electrochim. Acta *69*, 351 (2012).
13. Yu Y.-J., Wu H.-L., Fu H.-Y., Zhao J., Li Y.-N., Li S.-F., Kang C., Yu R.-Q.: J. Chromatogr. A *1302*, 72 (2013).
14. He K., Soares A. D., Adejumo H., McDiarmid M., Squibb K., Blaney L.: J. Pharm. Biomed. Anal. *106*, 136 (2015).
15. Bayen S., Yi X., Segovia E., Zhou Z., Kelly B. C.: J. Chromatogr. A *1338*, 38 (2014).
16. Ramsey E. D., Rees A. T., Wei G., Liu J. Y., Wu X. H.: J. Chromatogr. A *1217*, 3348 (2010).
17. Zhou J. L., Maskaoui K., Lufadeju A.: Anal. Chim. Acta *731*, 32 (2012).
18. Gros M., Rodríguez-Mozaz S., Barceló D.: J. Chromatogr. A *1292*, 173 (2013).
19. Zhong Y. S., Ni Y. N., Kokot S.: Chin. Chem. Lett. *23*, 339 (2012).
20. Shan J., Liu Y., Li R., Wu C., Zhu L., Zhang J.: J. Electroanal. Chem. *738*, 123 (2015).
21. Beltagi A.M.: J. Pharm. Biomed. Anal. *31*, 1079 (2003).
22. Song B., Zhou Y., Jin H., Jing T., Zhou T., Hao Q., Zhou Y., Mei S., Lee Y.-I.: Microchem. J. *116*, 183 (2014).
23. Fang H., Zhang J., Zhou S., Dai W., Li C., Du D., Shen X.: Sens. Actuators B *210*, 113 (2015).
24. Laglera L. M., Tovar-Sanchez A.: Talanta *89*, 496 (2012).
25. Ali M., Sherazi S. T. H., Mahesar S. A.: Arabian J. Chem. *7*, 1104 (2014).
26. Vella J., Busuttil F., Bartolo N. S., Sammut C., Ferrito V., Serracino-Inglott A., Azzopardi L. M., La Ferla G.: J. Chromatogr. B *989*, 80 (2015).
27. Zhang X., Wei Y., Ding Y.: Anal. Chim. Acta *835*, 29 (2014).

Electrochemical Study of 5-Nitroquinoline Using Carbon Film Electrode for its Voltammetric Determination in Model Samples of Drinking and River Water

Tereza Rumlova, Ivan Jiranek, Vlastimil Vyskocil, and Jiri Barek
Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, University Research Centre UNCE "Supramolecular Chemistry", Albertov 6, CZ-128 43 Prague 2, Czech Republic,
E-mail: rumlova@natur.cuni.cz

Abstract

This work is focused on searching for optimized working conditions for determination of 5-nitroquinoline (5-NQ) using modern voltammetric methods. The following optimal conditions were found: Britton-Robinson (BR) buffer of pH 11.0 for both methods (DCV and DPV), the regeneration potential cycles (E_{in} = 0 mV, E_{fin} = 0 mV). Under these conditions limits of quantification (LOQ) were found to be 1.0×10^{-6} mol L^{-1} for DCV and 4.0×10^{-7} mol L^{-1} for DPV in deionized water. The LOQ for model samples of water were 2.0×10^{-7} mol L^{-1} for drinking water and 6.0×10^{-7} mol L^{-1} for river water, both using DPV.

Key words: 5-Nitroquinoline, Carbon film electrode, Voltammetry, Drinking water, River water.

Introduction

There is an ever increasing pollution of our environment with various toxic compounds [1]. Therefore, the development of sensitive methods for determinations of these contaminants is necessary. Some heterocyclic polyaromatic compounds (e.g. quinolines and its nitro derivatives) are among compounds suspected of carcinogenity and mutagenity [2-4]. This contribution is focused on voltammetric determination of 5-nitroquinoline (5-NQ) using carbon film electrode (CFE) recently developed in our laboratory. The advantages of CFE are its wide potential window in both cathodic and anodic regions (cca 3 V), high sensitivity and low noise of measurements, quickly and easily renewable electrode surface and also low environmental stress compared to mercury electrodes [5]. The voltammetric methods for determination of 5-NQ and other nitroquinolines were already investigated in our UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry using mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode and glassy carbon paste electrode [6,7] because of easy reduction of present nitro group. 5-NQ is mutagenic [8] and cytotoxic [9,10] and it was tested for cancer treatment [11,12]. The electrochemical reduction of heterocyclic moiety in quinolines is also possible, but more complicated [13-18]. At first, there is a reduction to dihydroquinoline and then to tetrahydroquinoline in two 2-electron waves. Quinolines and their derivatives are usually used as catalysts and as corrosion inhibitors [8]. They are also primers of plenty of alkaloids, dyes and some drugs [19]. It was found out that quinoline is inhibiting the photosynthesis of seaweed and may cause degenerating changes in the retina [20] and changes in the eye lens [21,22].

5-NQ together with the group of some NPAH was determined by HPLC using reverse phase (mixed medium acetonitrile-water). Three types of detection, diode array, fluorescence and chemiluminescence [23] were compared. The retention characteristics of 56 nitrated aromatic compounds, including 5-NQ, by gas chromatography with quartz capillary were published [24]. For preliminary separation and preconcentration of 5-NQ and other polar organic compounds solid phase extraction using columns filled with cyanopropyl group modified silicagel was developed [25]. The electrochemical determination of nitroquinolines and the elucidation of electrochemical behavior of 5-NQ can be found in [4].

Experimental

All voltammetric measurements were carried out using Eco-Tribo Polarograph driven by software PolarPro 5.1 (both Polaro-Sensors, Czech Republic). The software worked under the operating system Microsoft Windows XP (Mircrosoft Corporation, USA). All measurements were carried out in a three-electrode system using platinum wire (PPE, Elektrochemicke detektory, Turnov, Czech Republic) as an auxiliary electrode, silver/silver chloride reference electrode RAE 113 (1 mol L^{-1} KCl, Elektrochemicke detektory, Turnov, Czech Republic) and CFE (prepared on polished-silver solid amalgam electrode substrate, disc diameter 0.36 mm) as a working electrode. The scan rate 20 mV s^{-1}, the pulse amplitude –50 mV and pulse width 100 mV were used. Better reproducibility of voltammetric measurements at CFE was assured by a suitable electrochemical regeneration of CFE surface.

CFE was prepared by covering of p-AgSAE surface with a carbon film. The film is formed after immersing electrode surface in the conductive ink (the active part of the electrode just touches the surface of the ink). One minute after immersing, 1,2-dichloroethane evaporates and the electrode is ready to use. If it is necessary to renew the old film (e.g. because of passivation), it can be easily removed by wiping it off with a filter paper.

The conductive carbon ink was prepared by mixing 0.09 g of carbon powder (microcrystalline graphite 2 µm, CR 2, Maziva Tyn, Czech Republic), 0.01 g of polystyrene and 0.5 mL of 1,2-dichlorethane (MERCK, Germany). The mixture was homogenized by intensive agitation for 3 min at Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA).

Stock solution of 5-NQ ($c = 1\times10^{-3}$ mol L^{-1}) was prepared by dissolving 0.01742 g of 5-NQ (99%, Aldrich, USA) in deionized water with sonication (10 min) and filled up to 100 mL. Lower concentrations were prepared by exact dilution of stock solution. All solutions were kept in dark and at laboratory temperature.

Results

Optimization

For electrochemical determination of 5-NQ, direct current voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV) were used. At first, the electrochemical behavior of 5-NQ ($c = 1\times10^{-4}$ mol L^{-1}) in Britton-Robinson (BR) buffer of different pH was investigated in pH region from 2.0 to 12.0. The best developed and the highest wave/peak was observed in BR buffer pH 11.0 for both methods. In the framework of optimization, the possibility of regeneration of the electrode surface before measuring was investigated. The initial and final regeneration potentials before and after the peak or before and before the peak, in 300 cycles with frequency 10 cycles per second, were tested. The best repeatability and the best developed peak were obtained using hypothetical cycling of initial regeneration potential E_{in} = 0 mV and of final regeneration potential E_{fin} = 0 mV, which is in fact the same as keeping constant potential on the working electrode. This determination is based on cathodic reduction and thus regeneration potentials were chosen in cathodic region of potential window of CFE. Repeatability of measurement on single carbon film (variability on particular films) and repeatability of measurement between several different films (variability of renewing the film) were investigated. Relative standard deviation (RSD) for measurements on one film was about 3% and did not exceed 6%. RSD for measurements on different films was approximately 10 %.

Determination of 5-nitroquinoline in deionized water

The calibration dependences of 5-NQ in BR buffer of pH 11.0, in the concentration ranges of (2-10)×10^{-7} mol L^{-1}, (2-10)×10^{-6} mol L^{-1} and (2-10)×10^{-5} mol L^{-1} for DPV and in concentration ranges of (4-10)×10^{-7} mol L^{-1}, (2-10)×10^{-6} mol L^{-1} and (2-10)×10^{-5} mol L^{-1} for DCV, were measured. The calibration curves were linear within the concentration range from 2×10^{-7} mol L^{-1} to 6×10^{-5} mol L^{-1} for DPV and from 4×10^{-7} mol L^{-1} to 6×10^{-5} mol L^{-1} for DCV. The slopes obtained in individual concentration ranges were tested for their conformity. At higher concentrations (8-10)×10^{-5} mol L^{-1} there was a deviation from a straight line, which was manifested by increasing the signal for both methods. Parameters and limits of quantification are summarized in Table I. and for the illustration corresponding DP voltammograms are depicted in Fig. 1.

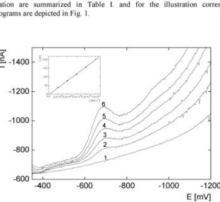


Fig. 1. DP voltammograms of 5-NQ at CFE in the BR buffer of pH 11.0 corresponding to the 5-NQ concentrations: 0 (1); 2 (2); 4 (3); 6 (4); 8 (5); and 10 (6) ×10^{-6}mol L^{-1}. The corresponding calibration curve is given in the inset.

Determination of 5-nitroquinoline in drinking and river water

In order to verify the practical applicability of developed DPV method, the determination of 5-NQ in spiked samples of drinking and river water under optimal conditions was carried out. At first, the possibility of direct determination was tested. 9.0 mL of model samples of water with exact concentration of 5-NQ and 1.0 mL of the BR buffer of pH 11.0 were mixed and measured. The concentration range from 2×10^{-7} mol L^{-1} to 1×10^{-5} mol L^{-1} by both DCV and DPV was investigated. DP voltammograms of 5-NQ in drinking water are depicted in Fig. 2. The parameters of quantification are summarized in Table I.

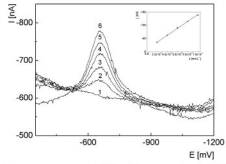


Fig. 2. DP voltammograms of 5-NQ at CFE in drinking water samples. 9 mL of spiked water was filled up to 10 mL with the BR buffer of pH 11.0. The curves correspond to 5-NQ: 0 (1); 2 (2); 4 (3); 6 (4); 8 (5); and 10 (6) $\times 10^{-6}$ mol L^{-1}. The corresponding calibration curve is given in the inset.

Table I.
Parameters of the calibration curves for determination of 5-NQ using DCV and DPV at CFE.

Method	Concentration (mol L^{-1})	Slope (nA L mol^{-1})	Intercept (nA)	R[a]	L_Q[b] (mol L^{-1})
DCV	(2-6)$\times 10^{-5}$	-2.00$\times 10^{-7}$	50.20	-0.9939	--------
	(2-10)$\times 10^{-6}$	-2.32$\times 10^{-7}$	11.82	-0.9846	--------
	(4-10)$\times 10^{-7}$	-2.18$\times 10^{-7}$	3.04	-0.9767	1$\times 10^{-6}$
DPV	(2-6)$\times 10^{-5}$	-2.08$\times 10^{-7}$	19.53	-0.9862	--------
	(2-10)$\times 10^{-6}$	-2.04$\times 10^{-7}$	4.38	-0.9992	--------
	(2-10)$\times 10^{-7}$	-1.86$\times 10^{-7}$	0.99	-0.9952	4$\times 10^{-7}$
DPV drinking	(2-10)$\times 10^{-6}$	-1.58$\times 10^{-7}$	-11.17	-0.9987	2$\times 10^{-7}$
	(4-10)$\times 10^{-7}$	-1.03$\times 10^{-7}$	-11.11	-0.9968	--------
DPV river	(2-10)$\times 10^{-6}$	-1.51$\times 10^{-7}$	-2.19	-0.9992	--------
	(4-10)$\times 10^{-7}$	-1.36$\times 10^{-7}$	-0.31	-0.9975	6$\times 10^{-7}$

[a] Correlation coefficient, [b] Limit of quantification (10σ; α = 0.05)

Conclusions

It has been proved that the modern voltammetric methods (DCV and DPV) can be used for determination of submicromolar concentrations of mutagenic 5-NQ based on cathodic reduction of present nitro group at carbon film electrode (CFE). Because of relatively good solubility of 5-NQ in water, there was a possibility to measure it in a purely aqueous medium. In the whole tested range of pH (2.0-12.0) the substance provided only one wave/peak. BR buffer of pH 11.0 and the regeneration potentials (hypothetical cycling between E_{in} = 0 mV, E_{fin} = 0 mV) were chosen as optimal for further measurements. The calibration dependences of 5-NQ in deionized water were measured. The limits of quantification were 1×10^{-6} mol L^{-1} for DCV and 4×10^{-7} mol L^{-1} for DPV. The applicability of developed DPV method in drinking and river water samples has been verified, with the limits of quantification 2×10^{-7} mol L^{-1} for model samples of drinking water and 6×10^{-7} mol L^{-1} for model samples of river water.

Acknowledgements

This research was carried out in the framework of the Specific University Research (SVV 2015). JB and VV thank the Grant Agency of the Czech Republic (Project P206/12/G151) and TR thanks the Grant Agency of Charles University (Project GAUK 468214) for financial support.

References

1. Barek J., Mejstrik V., Svagrova I., Zima J.: Chemicke Listy *88*, 341 (1994).
2. Kaiya T., Shirai N., Kawazoe Y.: Chem.Pharm. Bull. *34*, 881 (1986).
3. Kawazoe Y., Tachiban M.: Chem. Pharm. Bull. *15*, 1 (1967).
4. Tachiban M., Sawaki S., Kawazoe Y.: Chem. Pharm. Bull. *15*, 1112 (1967).
5. Yosypchuk B., Barek J., Fojta M.: Electroanalysis *18*, 1126 (2006).
6. Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J.: Electroanalysis *19*, 2003 (2007).
7. Jiranek I., Peckova K., Kralova Z., Moreira J. C., Barek J.: Electrochimica Acta *54*,1939 (2009).
8. http://chemicalland21.com/lifescience/phar/5-nitroquinoline.htm, downloaded March 25th 2015.
9. Siim B. G., Atwell G. J., Anderson R. F., Wardman P., Pullen S. M., Wilson W. R., Denny W. A.: J. Med. Chem. *40*, 1381 (1997).
10. Siim B. G., Atwell G. J., Wilson W. R.: Biochem. Pharmacol. *48*, 1593 (1994).
11. Siim B. G., Atwell G. J., Wilson W. R.: Br. J. Cancer *70*, 596 (1994).
12. Siim B. G., Denny W. A., Wilson W. R.: Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. *29*, 311 (1994).
13. Brezina M., Zuman P.: *Polarografie v lekarstvi, biochemii a farmacii*. Zdravotnicke nakladatelstvi, Prague 1952.
14. Cover R. E., Folliard J. T.: J. Electroanal. Chem. *30*, 143 (1971).
15. Folliard J. T., Cover R. E.: J. Electroanal. Chem. *33*, 463 (1971).
16. Adkins H., Cox F. W.: J. Am. Chem. Soc. *60*, 1151 (1938).
17. Meites L., Zuman P., Scott W. J., Campbell B. H., Kardos A. M., Fenner T. L., Rupp E. B., Lampurgani L., Zuman R.: *CRC Handbook Series in Electrochemistry*. CRC Press, Cleveland 1977.
18. Pech J.: Collect. Czech. Chem. Commun. *6*, 126 (1934).
19. Cervinka O.: *Chemie organickych sloucenin*. SNTL, Prague 1987.
20. Giddings J. M.: Bull. Environ. Contam. Toxicol. *23*, 360 (1979).
21. Grant W. M.: *Toxicology of the Eye*. Charles C. Tomas Publisher, Springfield 1962.
22. Patty E. H.: *Industrial Hygiene and Toxicology*. Interscience Publishers Inc., New York 1963.
23. Liu T. Y., Robbat A.: J. Chromatogr. *539*, 1 (1991).
24. White C. M., Robbat A., Hoes R. M.: Chromatographia *17*, 605 (1983).
25. Gundel L. A., Mahanama K. R. R., Daisey J. M.: J. Chromatogr. *629*, 75 (1993).

Voltammetric Studies of Benzodiazepines on Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode
(Voltametrické studium benzodiazepinů na meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě)

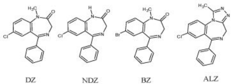
Petr Samiec and Zuzana Navrátilová
Department of Chemistry, Science Faculty, University of Ostrava, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava, Czech Republic, E-mail: p13171@student.osu.cz

Abstract
Differential pulse voltammetry (DPV) and cyclic voltammetry (CV) were used for study of 1,4-benzodiazepines (BDZ) at meniscus modified silver solid amalgam electrode (m-AgSAE). The pH effect of BDZ (Diazepam, Nordiazepam, Alprazolam, and Bromazepam) was studied in the different media (Britton-Robinson, citrate, phosphate buffer and 0,1 mol L^{-1} NaOH). The calibration dependences exhibited good linearity in the range from 10^{-7} to 10^{-4} mol L^{-1} under the pH optimum conditions. The developed method was successfully used for the diazepam determination in the model sample of urine.

Key words: Differential pulse voltammetry, Cyclic voltammetry, Benzodiazepines, Amalgam electrode.

Úvod

BDZ jsou psychoaktivní látky s antikonvulsivním, anxiolytickým a hypnotickým účinkem [1]. Tato léčiva se předepisují pacientům trpícím úzkostí, nespavostí a křečemi [2]. BDZ zvyšují funkci GABA systému, který ovlivňuje centrální nervový systém savců. BDZ se selektivně vážou na GABA receptorový komplex, který je propojen s chloridovým kanálkem. Tyto receptory jsou zodpovědné za neurotransmiterovou inhibici. Navázání BDZ na receptor způsobuje zvýšení afinity vazebného místa pro γ-aminomáselnou kyselinu, což je hlavní inhibitor nervového přenosu [3]. Struktura BDZ je znázorněna na Obr. 1.



Obr. 1. Chemická struktura BDZ: diazepam (DZ), nordiazepam (NDZ), bromazepam (BZ) a alprazolam (ALZ).

Mezi nejpoužívanější metody stanovení BDZ patří separační techniky jako HPLC, GC (UV, MS), micelární elektrokinetická kapilární chromatografie a kapilární elektroforéza [4]. Tyto metody jsou velmi citlivé, avšak v některých případech potřebují finančně náročnou instrumentaci, chemikálie, úpravu vzorků a vhodný detektor [5,6]. Alternativou k těmto technikám může být DPV, která představuje levnou, citlivou a rychlou variantu při stanovení těchto látek. Přítomnost azomethinové funkční skupiny a její snadná elektrochemická redukovatelnost umožňuje použít pracovní elektrodu m-AgSAE [7]. Elektroda m-AgSAE představuje mezistupeň mezi rtuťovými, pevnými elektrodami a kombinují jejich výhody: vysoké vodíkové přepětí, regenerace povrchu a mechanickou stabilitu [8].

Experimentální část

Chemikálie

Standardy DZ a NDZ byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich (Česká republika). Látky BZ a ALZ (KRKA, Slovinsko) byly pořízeny ve formě komerčně dostupných léčiv. Roztoky BDZ (1.10^{-3} mol L^{-1}) byly připraveny rozpuštěním vhodného množství BDZ v methanolu (Mach Chemical, Česká Republika). Takto připravené roztoky byly míchány po dobu 10 minut a následně vloženy do ultrazvukové lázně na stejně dlouho dobu. Tableta obsahující 2 mg DZ (Zentiva, Slovensko) byla zvážena a rozdrcena v hmoždíři. Odpovídající množství DZ (0.007 g) bylo rozpuštěno v odměrné baňce o objemu 25 mL obsahující methanol. 50 µl DZ bylo odpipetováno do 25 mL odměrné baňky obsahující 15 mL modelového vzorku moči a 15 ml 0,1 mol L^{-1} NaOH. Brittonův-Robinsonův pufr (BR), citrátový pufr (CP) a fosfátový pufr (FP), 0,1 mol L^{-1} NaOH byly použity jako základní elektrolyty. BR byl připraven smícháním zásadité složky 0,2 mol L^{-1} NaOH a kyselé složky (0,04 mol L^{-1} H_3PO_4, CH_3COOH, H_3BO_3). CP byl připraven smícháním 0,1 mol L^{-1} kyseliny citronové a 0,1 mol L^{-1} NaOH a FP byl přichystán smícháním 0,05 mol L^{-1} Na_2HPO_4 a 0,1 mol L^{-1} NaOH. K elektrochemické regeneraci elektrody byl použit 0,2 mol L^{-1} KCl. Modelový vzorek moči byl připraven rozpuštěním 3,2 g $CO(NH_2)_2$, 0,153 g $(NH_4)H_2PO_4$, 0,027 g $(NH_4)_2HPO_4$, 0,184 g $CaCl_2$, 0,12 g Na_2SO_4, 1,76 g KCl v 500 mL destilované vody. Všechny vodné roztoky byly připraveny pomocí destilované vody.

Instrumentace

K voltametrickému měření byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem Polar Pro verze 1.0, firma Polaro-Sensors (Praha, Česká republika). K voltametrickému měření byl použit tříelektrodový systém, tvořený referentní argentochloridovou elektrodou (3 mol L^{-1} KCl) typu RAE 113, pomocnou platinovou elektrodou - plíšek typu PPE (Monokrystal, Turnov) a jako pracovní elektroda byla použita m-AgSAE vyrobena firmou Polaro-Sensors. K přípravě roztoků o přesném pH byl použit pH metr Orion Star A211. Destilovaná voda byla připravena pomocí zařízení Demiwa 10 Rosa.

Pracovní postup

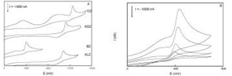
Voltametrická cela obsahující 10 mL směsi BDZ a základního elektrolytu (1:9) byla probublávána 5 minut dusíkem. Takto připravená cela byla použita k nalezení optimálního pH. Kalibrační závislost byla měřena v optimálním prostředí o daném pH. Stanovení DZ (tableta) v modelovém vzorku moči byla prováděna metodou standardního přídavku pomocí tří přídavků ze zásobního roztoku DZ (100 µl 1.10^{-3} mol L^{-1}). Limit detekce (LOD) byl vypočten jako poměr trojnásobku směrodatné odchylky nejnižší měřené koncentrace a směrnice přímky. Limit kvantifikace (LOQ) byl vypočten jako poměr desetinásobku směrodatné odchylky nejnižší měřené koncentrace a směrnice přímky.

Techniky

Cyklické voltamogramy BDZ byly měřeny v optimálním prostředí při různých rychlostech skenu: 50, 100, 250, 500 mV/s. Diferenční pulsní voltamogramy byly získány při těchto parametrech: rychlost skenu v = 10 mV/s; výška pulzu −50 mV a šířka pulzu 80 ms.

Výsledky a diskuze

Z cyklického voltamogramu (Obr. 2A) změřeného na m-AgSAE je zřejmé, že BDZ poskytují v optimálním prostředí jeden redukční pík. Nepřítomnost píku na zpětném skenu nasvědčuje o ireversibilním ději. Posunování potenciálu píku směrem k negativnějším hodnotám potenciálu s rostoucí skenovací rychlostí potvrzuje ireversibilitu děje (Obr. 2B).



Obr. 2. Cyklický voltamogram BDZ (A) v = 50 mV/s, (B) BZ v = 50, 100, 250, 500 mV/s, $c_{(BDZ)} = 1.10^{-4}$ mol L^{-1}.

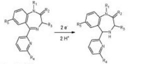
Pro určení řídícího děje byla vynesena závislost logaritmu I na logaritmu rychlosti posunu potenciálu. Hodnoty směrnic získaných z rovnic (1, 4) nasvědčují o difuzně řízeném ději s malým vlivem adsorpce. Vyšší vliv adsorpce je patrný ze směrnice (2) a naopak čistě difuzně řízený děj je zřejmý u BZ (3).

log (I [nA]) = 0,5013 . log (v[mV/s]) + 1,875; R = 0,9943 DZ (1)
log (I [nA]) = 0,5649 . log (v[mV/s]) + 1,448; R = 0,9988 NDZ (2)
log (I [nA]) = 0,4656 . log (v[mV/s]) + 1,368; R = 0,9851 BZ (3)
log (I [nA]) = 0,5187 . log (v[mV/s]) + 1,513; R = 0,9957 ALZ (4)

Počet vyměněných elektronů a protonů může být zjištěn ze závislosti potenciálu E na pH v BR pufru (Tabulka I). Směrnice této závislosti se pak rovná výrazu 2,303 RT∂/nF. Pokud se hodnoty směrnic rovnají teoretické hodnotě 59 mV, pak se redukce účastní stejný počet elektronů jako protonů. Poloviční hodnota směrnice by nasvědčovala redukci pomocí dvou elektronů a jednoho protonu za vzniku radikál aniontu. Přítomnost jednoho piku naznačuje redukci v jednom kroku. Z těchto výsledků lze navrhnout mechanismus redukce (Obr. 3).

Tabulka I.
Závislosti potenciálu E na pH v BR.

BDZ	Rovnice přímky	R
DZ	E (mV) = −50,109 . pH – 585,23	0,9963
NDZ	E (mV) = −47,273 . pH – 640,91	0,9988
BZ	E (mV) = −64,001 . pH – 179,26	0,9986
ALZ	E (mV) = −51,177 . pH – 493,61	0,9987



Obr. 3. Mechanismus redukce BDZ.

Závislost potenciálu piku E na logaritmu rychlosti posunu potenciálu byla vytvořena pro zjištění koeficientu přenosu náboje α. Tento koeficient popisuje symetrii piku a kinetiku děje. Koeficienty α byly vypočteny pomocí rovnice pro cyklické voltametrie [9]. Hodnota směrnice výše zmíněné závislosti je rovna výrazu (RT/αnF) log v. Hodnoty α pro BDZ jsou znázorněny v tabulce II. Se zvětšující se koeficientem α vzrůstá asymetrie píku a klesá rychlost reakce.

Tabulka II.
Výsledky závislosti potenciálu E na logaritmu skenovací rychlosti.

BDZ	směrnice	αn	R
DZ	−0,0641	0,4	0,8476
NDZ	−0,0412	0,62	0,9136
BZ	−0,0321	0,8	0,9147
ALZ	−0,0375	0,67	0,9921

Ke zjištění závislosti intenzity signálu BDZ (c = 1.10^{-4} mol L^{-1}) na velikosti pH směsi BR pufru a methanolu (9:1) v rozmezí pH 2–12 byla použita DPV. Optimální prostředí v BR pufru byly dále porovnány s CP, FP a 0,1 mol L^{-1} NaOH. Výsledky optimálních prostředí v různých pufrech jsou zobrazeny v tabulce III.

Tabulka III.
Optimální prostředí pro stanovení BDZ.

BDZ	Prostředí	Optimální pH	E (mV)	I (nA)
DZ	BR	12	−1174	−153,9
	0,1 mol L^{-1} NaOH	13,2	−1218	−156,1
NDZ	BR	10,2	−1096	−166,9
	FP	10,5	−1105	−152,3
BZ	BR	2	−348	−170
	CP	2	−340	−106,9
ALZ	BR	11	−1059	−177,9
	FP	11	−1061	−240,9

Koncentrační závislost BDZ byla proměřena v optimálním prostředí v rozsahu od 10^{-7} po 10^{-4} mol L^{-1}. Parametry kalibračních přímek BDZ jsou zobrazeny v tabulce IV. Hodnota korelačního koeficientu ukazuje vysokou linearitu v celém měřeném rozsahu. Nízké hodnoty směrodatných odchylek (DZ, NDZ, ALZ) vypovídají přesnosti vyvinuté metody.

Nově vyvinutá voltametrická metoda ke stanovení BDZ byla ověřena na modelovém vzorku moči pomocí metody standardního přídavku. Průměrná hodnota výtěžnosti ze tří měření byla 97,8 % se směrodatnou odchylkou 2,28 % (Tabulka V.). Látky přítomné v tabletě DZ a v modelovém vzorku moči nijak nenarušovaly stanovení.

Tabulka IV.
Kalibrační závislost BDZ.

BDZ	Koncentrační rozsah	Směrodatná odchylka	LOQ	LOD	R
DZ	4.10^{-7} - 1.10^{-4}	3,86	$3{,}12.10^{-7}$	$0{,}9.10^{-7}$	0,9910
NDZ	6.10^{-7} - 1.10^{-4}	3,59	$4{,}27.10^{-7}$	$1{,}28.10^{-7}$	0,9901
BZ	6.10^{-7} - 1.10^{-4}	10,06	$5{,}56.10^{-7}$	$3{,}73.10^{-7}$	0,9917
ALZ	6.10^{-7} - 1.10^{-4}	3,38	$5{,}02.10^{-7}$	$3{,}54.10^{-7}$	0,9975

Tabulka V.
Stanovení DZ v modelovém vzorku moči.

BDZ	Známá koncentrace (10^{-5} mol L^{-1})	Nalezená koncentrace (10^{-5} mol L^{-1})	Výtěžnost (%)	Směrodatná odchylka (%)
DZ	1	0,992	97,8 ± 2,82	2,28
	1	0,991		
	1	0,952		

Závěr

CV a DPV byly použity ke studiu BDZ na m-AgSAE. Pomocí cyklické voltametrie byl objasněn elektrodový děj a kinetika reakce. BDZ obsahují ve své struktuře funkční skupinu, která podléhá dvouelektronové ireversibilní redukci. Bylo zjištěno, že při elektrodovém ději se uplatňuje difuze s různě velkým vlivem adsorpce. Byl navržen mechanismus redukce azomethinové funkční skupiny v BDZ. Byl vypočten koeficient α popisující rychlost přenosu náboje při redukci. Pomocí DPV byla nalezena optimální prostředí z více druhů pufrů (BR, CP a FP). Vyvinutá metoda byla použita ke stanovení DZ v modelovém vzorku moči s výtěžností 97,8 % a směrodatnou odchylkou 2,28 %.

Poděkování

Tato práce byla vypracována v rámci grantu SGS identifikační číslo SGS07/PřF/2015 a projektu MSK DT3 02679/2014/RRC.

Literatura

1. Levine R. R., Walsh C. T., Schwartz-Bloom R. D.: *Pharmacology: Drug actions and reactions*. CRC Press, Boca Raton 2006.
2. Burchum J., Rosenthal L.: *Lehne's pharmacology for nursing care*. Saunders, Philadelphia 2015.
3. Barash P. G., Cullen B. F., Stoelting R. K.: *Klinická anesteziologie*. Grada, Praha 2015.
4. Smyth W. F., McClean S.: Electrophoresis *19*, 2870 (1998).
5. Carvalho L. M., Correia D., Garcia S. C., Bairros A. V., Nascimento P. C., Bohrer D.: Forensic Sci. Int. *202*, 75 (2010).
6. Lozano-Chaves M. E., Palacios-Santander J. M., Cubillana-Aguilera L. M., Naranjo-Rodríguez I., Hidalgo de Cisneros J. L.: Sens. Actuators, B *115*, 575 (2006).
7. Tyszczuk K.: Electroanalysis *22*, 1975 (2010).
8. Šelešovská R., Bandžuchová L., Navrátil T.: Electroanalysis *23*, 177 (2011).
9. Babaei A., Afasiabi M., Mirzakhani S., Taheri A.: J. Braz. Chem. Soc. *22*, 344 (2011).

Reduction and Oxidation of Hydroxyquinolines in Acetonitrile and Dimethylsulfoxide

Romana Sokolová [a], Šárka Ramešová [a], Jan Fiedler [a], Viliam Kolivoška [a], Ilaria Degano [b], Miroslav Gál [c], Marcin Szala [d], and Jacek E. Nycz [d]

[a] J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the AS CR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: sokolova@jh-inst.cas.cz

[b] Department of Chemistry and Industrial Chemistry, University of Pisa, Via Moruzzi 3, 56124 Pisa, Italy

[c] Department of Inorganic Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovakia

[d] Institute of Chemistry, University of Silesia, Szkolna 9, PL-40006 Katowice, Poland

Abstract

This study is focused on investigation of oxidation and reduction pathways of selected hydroxyquinoline compounds in nonaqueous solutions. The experimentally obtained reduction potentials are reported to well correlate with calculated values of LUMO energies as well as the obtained oxidation potentials are in a good agreement with theoretical HOMO energies. The cyclic voltammetry, *in situ* UV/Vis spectroelectrochemistry and *in situ* IR spectroelectrochemistry confirmed that the oxidation mechanism is complicated. Oxidation unexpectedly proceeds together with protonation of the starting compound. This behaviour was found for all studied compounds, hydroxyquinoline carboxylic acids and also for compounds, where a methyl group is present instead of carboxylic group.

Key words: Quinolines, Hydroxyquinolines, Reduction, Oxidation, Spectroelectrochemistry, Protonation

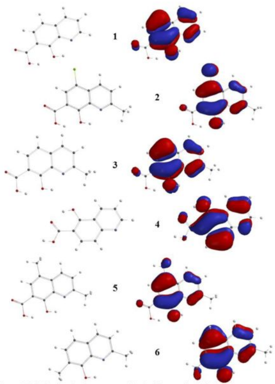
Introduction

The aim of this study is the investigation of the electrochemical oxidation and reduction mechanism of selected hydroxyquinoline derivatives in nonaqueous solution. Hydroxyquinoline carboxylic acids are promising integrase inhibitors, which block the replication of HIV-1 virus in cell cultures [1]. In vitro and ex vivo assays show that their biological activity is closely related to the presence of a carboxyl group at C-7 and a hydroxyl group at C-8 of the quinoline [1]. Oxidation of hydroxycompounds is often connected with proton transfer [2-7].

Experimental

Reagents

8-hydroxyquinoline-7-carboxylic acid (**1**), 5-chloro-2-methyl-8-hydroxyquinoline-7-carboxylic acid (**2**), 2-methyl-8-hydroxyquinoline-7-carboxylic acid (**3**), 2-methyl-5-hydroxyquinoline-6-carboxylic acid (**4**), 2,5-dimethyl-8-hydroxyquinoline-7-carboxylic acid (**5**), 2,7-dimethyl-5-hydroxyquinoline (**6**) were synthesized according to the literature [8-10]. Tetrabutylammonium hexafluorophosphate ($TBAPF_6$), which was used as the supporting electrolyte, was obtained from Sigma Aldrich and dried before use. Acetonitrile, anhydrous, 99.8%, and dimethyl sulfoxide, anhydrous, 99.9%, were purchased from Sigma Aldrich (Germany) and were used as received. All reagents and chemicals were used without any further purification.



Scheme 1. Calculated molecular structure of **1 - 6** with respective HOMO.

Methods

Electrochemical measurements were done in 0.1 M TBAPF$_6$ in acetonitrile and dimethylsulfoxide. 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 microelectrode (diameter 0.7 mm). The auxiliary electrode was platinum net. Oxygen was removed from the solution by passing a stream of argon. The oxidation products of **3** were prepared by exhaustive electrolysis on the carbon paste electrode in the concentration range from 2×10^{-4} M – 2×10^{-3} M solutions. The exhaustive electrolysis and cyclic voltammetry before and after electrolysis were performed using a PGSTAT 12 AUTOLAB potentiostat (Ecochemie, Netherlands).

Spectroelectrochemistry was performed using an optically transparent thin-layer electrode (OTTLE) cell with a three-electrode system (platinum working and auxiliary electrode, Ag|AgCl quasi reference electrode) mounted in a thin layer (thickness 1.7 mm) between optical windows. The experimental setup is described in reference [11,12]. The 1.0 cm quartz cuvettes were used for recording the absorption spectra.

Results and Discussion

Reduction and oxidation potentials of compounds **1** – **6** measured by cyclic voltammetry together with theoretically obtained frontier orbital energy (HOMO and LUMO) as well as molecular volume and dipole moment values are listed in Table I. The potentials of the first reduction wave (Fig. 1) and the first oxidation wave (not shown) are in a perfect agreement with that of the calculated energies for LUMO and HOMO of the six compounds, respectively.

Table I.

Oxidation and reduction potentials measured against Ag/AgCl/1M LiCl reference electrode and calculated values of HOMO, LUMO energies of studied compounds using the density functional theory (DFT) calculations with B3LYP functional and 6-31G* basis set.

Compound	E_{ox}/V	E_{red}/V	E_{HOMO}/eV	E_{LUMO}/eV	μ/D	V/Å^3
1	1.15	-1.03	-6.44	-2.12	7.28	**177.86**
2	1.14	-0.99	-6.41	-2.22	8.00	**209.83**
3	1.06	-1.09	-6.35	-1.98	7.89	**196.21**
4	1.05	-1.32	-6.09	-1.80	0.80	**177.79**
5	0.96	-1.39	-6.16	-1.95	7.92	**214.21**
6	0.90	-1.52	-5.49	-1.23	2.28	**187.63**

A one-electron process was confirmed by comparison of the height of the first oxidation wave of **3** and **6** with the height of oxidation wave of ferrocene under the same conditions. In the literature one can find cases of "father-son" reaction as a chemical reaction taking part in the overall redox mechanism. Thus, the overall electron stoichiometry is 2/3, due to the participation of starting compound as a proton acceptor in the oxidation process. This "father-son" reaction is known in the literature for the reduction of hydroxyimines [13], reductive cleavage of carbon-halide bond [14-19]. In these cases the proton transfer plays an important role and an autoprotonation occurs. In the case of flavonoid luteolin, this "father-son" reaction can be called as an autooxidation, even if it does not require the presence of oxygen [20].

The nature of oxidation products and short-lived intermediates was investigated by *in situ* UV/Vis and IR spectroelectrochemistry in the OTTLE cell and oxidation products were identified by separation techniques.

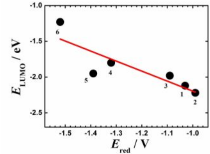


Fig. 1. The correlation of E_{LUMO} of compounds **1** – **6** calculated in vacuum with their experimental reduction potential (Table I).

A protonated hydroxyquinoline derivatives of **3** and **6** were identified as the final oxidation products (2/3) and only 1/3 of hydroxylated oxidation product was found. This finding is in agreement with our previous results dealing with oxidation of hydroxyquinolines [21].

Conclusion

We proved that the nitrogen atom in the heterocycle of hydroxyquinolines is protonated during the apparent 0.7 electron oxidation process. This was rationalized by the auto-deprotonation reaction by another two starting molecules of hydroxyquinoline, so that the overall oxidation mechanism involves 2 electrons and 3 starting molecules. Both, the electrochemical and spectroelectrochemical results showed that the oxidation mechanism is not influenced by the presence of carboxylic group in the chemical structure of hydroxyquinolines, as results from oxidation of 2,7-dimethyl-5-hydroxyquinoline (**6**). Moreover, in the presence of a strong proton acceptor such as pyridine, the oxidation ECEC process involves two electrons and two protons per one molecule of the hydroxyquinoline derivative. The electron transfer efficiency of hydroxyquinolines in biosystems may be related to protonation of biocompounds containing nitrogen bases.

Acknowledgement

This work was supported by The Czech Academy of Sciences (M200401201).

References

1. Zouhiri F., Mouscadet J.-F., Mekouar K., Desmaële D., Savouré D., Leh H., Subra F., Le Bret M., Auclair Ch., d'Angelo J.: J. Med. Chem. *43*, 1533 (2000).
2. Sokolova R., Hromadova M., Ludvik, J., Pospisil L., Giannarelli S.: Electrochim. Acta *55*, 8336 (2010).

3. Tiribilli, C., Giannarelli, S., Sokolova, R., Valasek, M.: " Oxidation mechanisms of Diflunisal on glassy carbon electrode." In: Moderní elektrochemické metody /34./ *[Modern electrochemical methods XXXIV., Sborník přednášek mezinárodní odborné konference XXXIV. Moderní elektrochemické metody].* Srsenová L. – Best servis Ústí n. L., 2014 - (Navrátil, T.; Fojta, M.; Pecková, K.) Jetřichovice (CZ), May 19-23, 2014, p. 202-206. ISBN 978-80-905221-2-1.
4. Pyszkova, M., Zatloukalova, M., Biedermann, D., Kren, V., Ulrichova, J., Ramesova, S., Sokolová, R., Vacek, J.: "Electrochemistry of Flavonolignans and their Interactions with DNA and Proteins." In: Moderní elektrochemické metody /34./ *[Modern electrochemical methods XXXIV., Sborník přednášek mezinárodní odborné konference XXXIV. Moderní elektrochemické metody].* Srsenová L. – Best servis Ústí n. L., 2014 - (Navrátil, T.; Fojta, M.; Pecková, K.) Jetřichovice (CZ), May 19-23, 2014, p. 148-152. ISBN 978-80-905221-2-1.
5. Sokolova, R., Degano, I., Hromadova, M., Bulíčkova, J., Gal, M., Valasek, M.: Collect. Czech. Chem. Commun. *75*, 1097 (2010).
6. Sokolova R., Gal M., Valasek M.: J. Electroanal. Chem. *685*, 33 (2012).
7. Tiribilli, C., Sokolová, R., Giannarelli, S., Valášek, M.: On reduction of the drug diflunisal in non-aqueous media. Monatsh. Chem. Monatsh. Chem. 146, 807 (2015).
8. Nycz J.E., Szala M., Malecki G.J., Nowak M., Kusz J.: Spectrochim. Acta A *117*, 351 (2014).
9. Szala M., Nycz J.E., Malecki G.J.: J. Mol. Struct. *1071*, 34 (2014).
10. Nycz J.E., Malecki G.J.: J. Mol. Struct. *1032*, 159 (2013).
11. Krejcik M., Danek M., Hartl F.: J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem. *317*, 179 (1991).
12. Ramesova S., Degano I., Sokolova R.: Electrochimica Acta *133*, 359 (2014).
13. Isse A. A., Abdurahman A. M., Vianello E.: J. Chem. Soc. Perkin Trans. *2*, 597 (1996).
14. Amatore C., Capobianco G., Farnia G., Sandona G., Savéant J.-M., Severin M.G., Vianello E.: J. Am. Chem. Soc. *107*, 1815 (1985).
15. Sokolova, R., Hromadova, M., Pospisil, L.: „Elektrochemie vybraných halogenových pesticidů a jejich komplexy s cyklodextriny." In: *Moderní elektrochemické metody /27./, [Modern electrochemical methods XXVII., Sborník přednášek z XXVII. mezinárodního odborného semináře].* Srsenová L. – Best servis Ústí n. L., 2007 - (Barek, J.; Navrátil, T.) Jetřichovice (CZ), May 21-24, 2007, pp. 145-148. ISBN 978-80-86238-05-0.
16. Sokolova, R., Pospisil, L., Hromadova, M., Ludvik, J., Gal, M., Giannarelli, S.: „The Electrochemistry of Halogenated Benzonitriles." In: Moderní elektrochemické metody /30./ *[Modern electrochemical methods XXX., Sborník přednášek z mezinárodní odborné konference XXX. Moderní elektrochemické metody].* 2010 - (Barek, J.; Navrátil, T.) Jetřichovice (CZ), May 24-28, 2010, p. 154-157. ISBN 978-80-254-6710-7.
17. Sokolova R., Hromadová M., Ludvik J., Pospisil L., Giannarelli S.: Electrochim. Acta *55*, 8336 (2010).
18. Ramesova, Š., Sokolova, R., Degano, I.: „Electrochemical Study of Rhamnazin." In: Moderní elektrochemické metody /33./, *[Modern electrochemical methods XXXIII., Sborník přednášek z mezinárodní odborné konference XXXIII. Moderní elektrochemické metody].* Jetřichovice (CZ), Srsenová L. – Best servis Ústí n. L., May 20-24, 2013 - (Navrátil, T.; Fojta, M.; Pecková, K.) p. 163-166. ISBN 978-80-905221-1-4.
19. Sokolova R., Gál M., Valasek M.: J. Electroanal. Chem. *685*, 33 (2012).
20. Ramesova, S., Sokolova, R., Tarabek, J., Degano, I.: Electrochim. Acta, 110, 646 (2013).
21. Sokolova R., Nycz J. E., Ramesova S., Fiedler J., Degano I., Szala M., Kolivoska V., Gal M.: J. Phys. Chem. B, under peer review, 2015.

Electrochemical Determination of Selected Heavy Metals in Edible Mushrooms Using Carbon Paste Electrode after Wet Digestion of Sample

Matěj Stočes and Ivan Švancara
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology,
University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic,
E-mail: Matej.Stoces@upce.cz

Abstract
This study deals with determination of copper and lead in edible mushrooms by electrochemical stripping analysis onto carbon paste electrode. Optimal wet digestion (WD) mineralization of sample is proposed as following: boiling (2 hrs) in mixture of HNO_3:$HClO_4$ (1:3). Copper level could be determined right after WD and its concentration level in analysed samples was found in the range: 21.2 – 40.6 μg/g. Determination of lead was possible after removing copper interfering influence by adding ferrocyanide anion and its concentration level in analyzed samples was found in the range: 0.45 – 1.6 μg/g.

Key words: Mushroom, Heavy metals, Electrochemical determination, Carbon paste electrode, Wet digestion, Copper, Lead.

Introduction

Edible mushrooms are widely used for preparation of food or served as a food flavouring ingredients due to their very specific taste and aroma and could be considering as a one of the oldest food of humankind. Leaving behind their taste, they have anticancer, antioxidant, antitumor, antiviral, antibacterial, antifungal or cholesterol-reducing properties [1,2]. Mushrooms serve as good way for intake various minerals such a Fe, K, P, Mn, Mg, Zn or others and therefore there was always interest and demand on their analysis in order to specify mushroom composition. Also determination of phenolic and organic acids in edible mushrooms is nonnegligible research of interest. Phenolic acids such a protocatechuic, p-hydroxybenzoic, p-coumaric, caffeic, ellagic and cinnamic acids and two vanillic acid isomers and some organic acids, namely, citric, ketoglutaric, malic, succinic and fumaric acids are the most analysed compounds due to their protecting role (anti-oxidant activity) against various diseases [3]. Moreover mushrooms contain another essential component, fatty acids, or other various biological active compounds.

Determination of heavy metals and trace element analysis in edible mushrooms could be considered as one of the dominant research area in mushrooms analysis. Level of trace elements and heavy metals above threshold amount, could induce morphological malformation, decrease viability or increase mutagenic effects and so amount of trace elements in edible mushrooms should be monitored. Some species of mushrooms have a capability to accumulate heavy metals (e.g. Pb, Cd, Hg) or some other toxic elements which could be used for decontamination of soils or whole areas. For trace analysis of heavy metals (and/or elements) in mushrooms whole range of analytical methods are employed. Atomic absorption spectrometry (with flame or graphite furnace) is quite often used [4-11], followed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [2,12-15] or ICPOES [16]. Analysis was also done by the aim of separation chromatographic method using gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) [2] or ion chromatography with a pH detection unit [17]. Moreover some non-traditional methods are employed as: tube-excited energy dispersive X-ray fluorescence, gamma ray spectroscopy [18], short-term instrumental neutron activation analysis (INAA) [19] or epithermal neutron activation analysis (ENAA) [15]. Surprisingly electroanalytical methods for mushrooms trace analysis stay almost neglected [20] – probably due to the fact that the most electroanalytical determination of mushrooms is dealing rather with analysis of its antioxidant capacity than with inorganic analysis. Respecting this findings trace electroanalysis of edible mushrooms is challenging and should be able to compare with above mentioned developed methods.

Last but not least, preparation of mushrooms sample before its analysis is important as well. Predominantly microwave digestion for sample mineralization is widely used, however requires appropriate equipment. In principal (and seldom used) classical wet digestion in mineral acids could be used as well. This work is focus on electroanalytical possibilities of determination heavy metals using carbon paste electrode after wet-digestion of sample and thus propose instrumental easy alternation for well-established analytical methods.

Experimental

Chemicals, Reagents, Stock and Standard Solutions

All chemicals used for the preparation of stock solutions were of analytical grade and purchased from Merck, Sigma-Aldrich, and Lachema (Brno, Czech Republic). The stock solutions were made 1M or 0.1M in concentration from the respective chemicals by using doubly distilled water and diluted as required. The AAS-standard solution of Cu(II), Cd(II), Pb(II), Bi(III) were used throughout. Water was obtained by double distillation of deionised water though a laboratory made distillation apparatus.

Instrumentation

An electrochemical analyzer AUTOLAB equipped with PGSTAT12 (Metrohm) controlled by NOVA software (version 1.10,) was used for all measurements. This assembly was connected to an external electrode stand incorporating the standard three-electrode cell with the working electrode and Ag/AgCl reference electrode with double junction, and a Pt-plate auxiliary electrode.

Working Electrodes

Carbon Paste. The proper mixture was prepare by thoroughly hand-mixing of 80% (w/w) graphite powder ("CR-5", Maziva Týn, Czech Republic) with 20% (w/w) highly viscous silicone oil ("LUKOIL MV 800", Lučební závody Kolín, Czech Republic). Each completed CPE assembly was checked with respect to the ohmic resistance; all values falling into an interval of 10-30 Ω. Furthermore, each CPE was renewed by extruding *ca.* 0.5 mm of carbon paste out from the body and then smoothed with a wet filter paper.

Voltammetric Measurements

Square-wave anodic stripping voltammetry (SWASV) was the technique of choice.. Unless stated otherwise, the typical measurement had consisted of three fundamental steps: (i) time-controlled electrochemical deposition under stirring ; (ii) the rest period in quiet solution, and (iii) positively-going voltammetric scan ("stripping step"). Parameters of SWASV were as follows: $E_{initial}$ = -0.9V; E_{end} = 0.2V; E_{step} = 5mV; Amplitude = 20mV and Freq = 25Hz.

Sample Preparation

Several mushrooms of *Boletus badius* were collected at one location at same place. Mushrooms were cut into small pieces a dry at 105 °C, after that were separately grinded in mortar with pestle until homogenous powder was obtained. For digestion procedure 1g of sample was taken into 10 ml of acid mixture. When digestion procedure finished solution was transferred in to 10 ml volumetric flask and fill in with double distillate water (because of evaporation of solution during digestion procedure). From this way prepared sample was taken 250µl in to 20ml of supporting electrolyte (0.2M acetate buffer).

Results and discussion

In the first step wet-digestion procedure were detailed study and later optimized. Mineralization was carried out in mixture of nitric and hydrochloric acid with various mutual ratios. As could be clearly see from table I. The highest level of determined copper is achieved in mixture of HNO_3:$HClO_4$ 1:5 however with rather higher relative standard deviation (≈ 20.3 %) than in the case of acid mixture in ratio 1:3 when satisfying relative standard deviation was obtained (8.3 %). Furthermore it strongly depends on the conditions of digestion procedure itself, such a time and temperature. Considering this fact, 2 hours of continual boiling digestion mixture (HNO_3:$HClO_4$ 1:3) seem to be the most effective. Recovery of digestion procedure was verified by digestion mixture spiked with standard solution of copper (recovery rate of 96-104%).

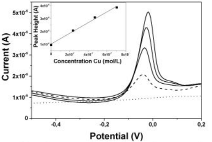


Fig. 1. Representative voltammograms for determination of copper on the carbon paste electrode by the multiple standard addition methods in the sample of mushrooms.

Table I.
Conditions of wet digestion procedure on to found amount of copper.

Acid	Digestion procedure	Cu found (µg per g dry sample)	Relative stand. dev. (%)
HNO_3	boiling 2 hours	25.3 ± 2.1	8.3
HNO_3:$HClO_4$ (1:1)	boiling 2 hours	26.1 ± 3.5	13.4
HNO_3:$HClO_4$ (1:2)	boiling 2 hours	30.2 ± 2.9	9.6
HNO_3:$HClO_4$ (1:3)	**boiling 2 hours**	**32.4 ± 2.7**	**8.3**
HNO_3:$HClO_4$ (1:3)	just stirring 2 hours	23.6 ± 1.9	8.1
HNO_3:$HClO_4$ (1:3)	boiling 4 hours	31.9 ± 3.1	9.7
HNO_3:$HClO_4$ (1:5)	boiling 2 hours	33.5 ± 6.8	20.3
HNO_3:$HClO_4$ (1:10)	boiling 2 hours	23.4 ± 7.3	31.2
$HClO_4$	boiling 2 hours	19.1 ± 11.3	59.2

In next steps comparison of proposed wet digestion procedure and microwave digestion procedure was done, as well as comparison of copper level determined by atomic absorption spectrometry and using mercury electrode with the results obtained on the carbon paste electrode. Wet digestion procedure leads to higher amount of founded copper (32.4 μg/g for CPE; 35.7 μg/g for Hg-electrode; 36.6 μg/g AAS) than microwave digestion procedure (30.6 μg/g for CPE; 29.8 μg/g for Hg-electrode; 30.8 μg/g AAS). When using CPE the founded amount of copper is almost same for both digestion procedure (difference 1.8 μg/g) whereas for AAS or Hg-electrode founded copper amount differs more depending on used digestion procedure (different 5.9 μg/g for AAS and 5.8 μg/g for Hg-electrode).

For analysis of others heavy metals (mainly lead and cadmium) copper act as an unwanted interferent [21] in electrochemical stripping analysis and since level of copper in natural samples is usually several higher than lead or cadmium their determination is challenging. One of the approaches, applied recently by our group in trace analysis of waste sludge [22], lies in using complexing or precipitating agents. The most efficient suppression was achieved by adding the ferrocyanide anion which reacts according to following reaction, $2\,Cu^{2+} + [Fe(CN)_6]^{4-} \rightarrow Cu_2[Fe(CN)_6]$, well-known from classic "probe" qualitative analysis as the formation of *Hatchett's brown*, Ability of restore lead and cadmium signal by the aim of ferrocyanide is depicted on figure 2. Taking advantage this finding determination of lead in mushroom was possible. Concentration level of cadmium in all samples was rather low, under limit of detection, and thereby not possible to determine. Final results of founded amount copper and lead are summarized in table II.

Table II.
Contain of copper and lead in different samples of *Boletus badius*.

Sample No.	Contain of Cu (μg per g dry sample)	Contain of Pb (μg per g dry sample)
1	32.4 ± 2.7	0.45 ± 0.04
2	38.6 ± 3.1	-
3	25.4 ± 1.75	-
4	28.3 ± 1.55	0.800 ± 0.074
5	21.2 ±1.36	0.570 ± 0.048
6	40.6 ± 2.8	1.2 ± 0.11
7	31.7 ± 2.4	1.6 ± 0.13

Conclusion
Wet digestion offers an alternative approach for preparation of natural samples for electrochemical stripping analysis of heavy metals. Optimal digestion procedure for mushroom samples consists of boiling (2 hrs) in mixture of HNO_3:$HClO_4$ (1:3) and could replace microwave digestion mineralization. Furthermore level of copper and lead was monitored in samples of edible mushrooms. Whereas copper determination is possible directly after mineralization procedure, for determination of lead is necessary to remove unwanted influence of copper by adding ferrocyanide anion. This work gathers fundamental findings for later following up study dealing with monitoring of heavy metals in mushrooms depending on their location and study of mushroom (hyper)accumulation of heavy metals.

Acknowledgment
A financial support from the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (project CZ.1.07/2.3.00/30.0021) is gratefully acknowledged.

References

1. Moradali M. F., Mostafavi H., Ghods S., Hedjaroude G. A.: Int. Immunophar. *6*, 701 (2007).
2. Cayan F., Tel G., Duru M. E., Ozturk M., Turkoglu A., Harmandar M.: Food Anal. Met. *2*, 449 (2014).
3. Vaz J. A., Barros L., Martins A., Morais J. S., Vasconcelos M. H., Ferreira I.: Food Sci. Technol. *1*, 343 (2011).
4. Tuzen M.: Microchem. J. *3*, 289 (2003).
5. Tuzen M., Turkekul I., Hasdemir E., Mendil D., Sari H.: Anal. Lett. *7*, 1401 (2003).
6. Soylak M., Saracoglu S., Tuzen M., Mendil D.: Food Chem. *4*, 649 (2005).
7. Turhan K.: Fresen. Environ. Bull. *4*, 397 (2007).
8. Bazaz R. D., Pirali-Hamedani M., Abdi K.: Asian. J. Chem. *3*, 1871 (2008).
9. Semreen M. H., Aboul-Enein H. Y.: Anal. Lett. *5*, 932 (2011).
10. Turkekul I., Elmastas M., Tuzen M.: Food. Chem. *3*, 389 (2004).
11. Ouzouni P. K., Veltsistas P. G., Paleologos E. K., Riganakos K. A.: J. Food Comp. Anal. *6*, 480 (2007).
12. Curdova E., Vavruskova L., Suchanek M., Baldrian P., Gabriel J.: Talanta *3*, 483 (2004).
13. Yin L. L., Shi G. Q., Tian Q., Shen T., Ji Y. Q., Zeng G.: J. Food Sci. *8*, T151 (2012).
14. Mattila P., Konko K., Eurola M., Pihlava J. M., Astola J., Vahteristo L., Hietaniemi V., Kumpulainen J., Valtonen M., Piironen V.: J. Agr. Food Chem. *5*, 2343 (2001).
15. Borovička J., Kubrová J., Rohovec J., Randa Z., Dunn C. E.: Biometals *5*, 837 (2011).
16. Kula I., Solak M. H., Ugurlu M., Isiloglu M., Arslan Y.: Bull. Env. Cont. Toxic. *3*, 276 (2011).
17. Isildak O.: J Anal. Chem. *12*, 1242 (2009).
18. Turhan S., Zararsiz A., Karabacak H.: Int. J. Food Prop. *4*, 723 (2010).
19. Randa Z., Kučera J.: J Radioanal. Nuc.l Ch. *1*, 99 (2004).
20. Piech R., Kubiak W. W.: Electrochim. Acta *2*, 584 (2007).
21. Yang D., Wang L., Chen Z. L., Megharaj M., Naidu R.: Electroanalysis *12*, 2637 (2013).
22. Stočes M., Švancara I.: Int. J. Electrochem. Sci. *4*, 5657 (2013).

Electrochemical Behavior of α-Tocopherol in Various Electrolytes after its Previous Extraction into the Heterogeneous Electrode Material from Aqueous-Acetone Mixture

Milan Sýs, Matěj Stočes, Radovan Metelka, and Karel Vytřas
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology,
University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic,
E-mail: milan.sys@student.upce.cz

Abstract
During comparison of heterogeneous electrode materials with solid glassy carbon, an extraction of α-tocopherol into used lipophilic binder was observed, which can be used for isolation of this biologically active chemical compound from sample matrix and its following analysis by pulse electrochemical techniques. Accordingly, electrochemical behavior of α-tocopherol (known as the most active form of vitamin E) in various electrolytes after its previous extraction into the heterogeneous electrode material from an aqueous-acetone mixture was investigated by cyclic voltammetry. Usually, the α-tocopherol was extracted into glassy carbon paste of the electrode from its solution (50 μmol·L^{-1}) containing 60% acetone for 240 s at speed of stirring 400 rpm. Concerning cyclic voltammetry, following parameters were adjusted in this study: potential range, –0.5 to +1.3 V *vs* Ag/AgC/3.0 mol·L^{-1} KCl; scan rate (v), 50 mV s^{-1}; potential step, 5 mV; number of scans, n=5. The results were compared with those obtained in measurements at solid glassy carbon electrode.

Key words: Aqueous–organic mixtures; Cyclic voltammetry, Extraction, Glassy carbon paste electrode; Tocopherol; Vitamin E.

Introduction
Carbon pastes – as composites of conductive carbon powders and a lipophlic binders – are typical heterogenous electrode materials exibiting specific physico-chemical properties [1]. However, if conventional spectrographic graphite is applied to prepare the pastes, the behavior of the corresponding electrode is dramatically changed when used in organic solvents or in their pertinent aqueous mixtures. The same is valid if tricresyl phosphate and/or 1-butyl-3-methylimidazolium-hexafluorophosphate ionic liquid are used as lipophilic binders.

To operate in pure organic solvents, the carbon pastes can easily be modified by mixing with some surfactant as sodium dodecyl sulfate (SDS) within 50% (w_{SDS} / $w_{carbon\ paste}$) but unfortunately, these kinds of electrode materials are not stable in aqueous solutions [2]. The carbon pastes made from glassy carbon and oils are suitable for application in in aqueous solutions as well as in aqueous-organic mixtures with high content of organic solvent (up to 90%) used as supporting electrolytes.

The α-tocopherol (α-TOH), known as the most biolgical active form of vitamin E, is intracelluar antioxidant essential for proper function of the human body [3]. The α-TOH is soluble only in organic solvents or their aqueous mixtures [4,5]. Several articles describing electrochemical behavior of α-TOH in pure organic solvents and their mixtures with water appeared in the literature [6,7]. According to the authors' knowledge, electrochemical behavior of vitamin E in strictly aqueous solutions has not been thoroughly studied yet. Presumably, the solubility of this biologically significant substance in lipophilic phases (paste binders) can be useful for its isolation from complex sample matrices and for its following analysis using pulse electrochemical techniques. Working electrodes based on glassy carbon pastes (GCPE) should have similar electrochemical properties as solid glassy carbon electrodes (GCE). Therefore, both of them are suitable for anodic oxidation in various aqueous electrolytes such as strong inorganic acids or bases, buffers and solutions of salts [8]. However, passivation of the electrode surface by adsorption of analytes or products of electrochemical reactions may occur which can be seen as disadvantage. Comparison of GCPE (adsorption and extraction) with GCE (only adsorption) can help to distinguish if the electrochemical reactions of α-TOH are located inside the lipophilic binder or at the interface of two immiscible phases.

Experimental

Vitamin E as (+)-α-tocopherol (from vegetable oil; 1000 $UI \cdot g^{-1}$) and tetrabutylammonium hexafluorophosphate (NBu_4PF_6) were purchased from Sigma Aldrich, Vienna, Austria. Acetone (99,9%), acetic acid (99 %), sodium acetate for preparation of 0.1 $mol \cdot L^{-1}$ acetate (pH 4.5) buffer solution, potassium chloride, sulfuric acid (98%), hydrochloric acid (35%), phosphoric acid (85%), sodium hydrate, boric acid, acetonitrile, and ammonia (25%) were from Lach-Ner, Neratovice, Czech Republic. Both KH_2PO_4 and $Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$ for preparation of the 0.1 $mol \cdot L^{-1}$ phosphate (pH 7.0) buffer solution were from Lachema, Brno, Czech Republic. All other chemicals were of the analytical grade purity. Ultrapure water (ρ = 18.3 MΩ cm; Milli-Q system, Millipore) was used for preparing all the solutions.

A three electrode system consisting of GCPE or GCE with the same diameter 3 mm (working), Ag/AgCl/3.0 $mol \cdot L^{-1}$ KCl (reference) and platinum wire (counter electrode) was immersed into the voltammetric cell containing various supporting electrolytes and connected to the potentiostat (EmStat, Ivium Technologies, The Netherlands) employed for electrochemical measurements. All electrochemical measurements were realized at 25 ± 1 °C. Scanning electron microscopy was done at VEGA3 SB, TESCAN, Brno, Czech Republic.

Glassy carbon powder Sigradur-G with particle size 5-20 µm (0.5 g; HTW Hochtemperatur-Werkstoffe, Germany) was mixed with silicone oil MV 8000 (10 or 25 % *w/w*) from Lučební závody, Kolín, Czech Republic in a ceramic mortal for 15 minutes. The homogenous mixture (~10 Ω) was pressed into the electrode Teflon holder with conductive screw. Column of glassy carbon paste in the electrode holder must be lower than 2 cm to allow renovating the electrode surface. SEM pictures of glassy carbon paste structure are presented in Fig. 1.

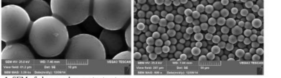


Fig. 1. SEM of glassy carbon paste structures.

Usually the α-TOH was extracted into GCPE from 50 $\mu mol \cdot L^{-1}$ its solution containing 60% acetone at speed of stirring 400 rpm (magnetic stirrer, 1.3 × 0.4 cm) for 240 s (open circle system). To compare the results, the same experiments were done with solid GCE. As an electrochemical technique, cyclic voltammetry was used. All measurements were carried out in potential window from –0.5 to +1.3 V; scan rate (v), 50 mV s^{-1}; potential step, 5 mV; number of scans, n=5. After the procedure described above, the surface of working electrode was washed by pure water and the cyclic voltammetric measurement of the accumulated α-TOH in 0.1 mol·L^{-1} of Britton-Robinson buffer with different pH values was realized.

Results and discussion

Several peaks were detected and as found out, the number of them and their corresponding potentials (E_p) depended on the pH value of used electrolytes. Similar electrochemical behavior of α-TOH was observed at both electrodes under the test, which confirms the adsorption of α-TOH on a GCE surface. Interesting was, that values of peak current responses (I_p) were more than fifteen times higher at GCPE than at solid GCE. For comparison, cyclic voltammograms (first scan; blue line; second repetition; red line) of accumulated α-TOH at both electrodes are shown in Fig. 2. After displacement of GCPE surface less then 3 mm, these peaks were still noticeable with lower peak current responses which confirmed the extraction of α-TOH into the electrode paste.

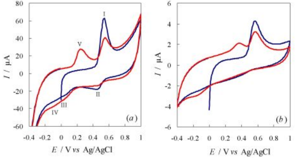


Fig. 2. Cyclic voltammetry (two repetitions) of accumulated α-TOH (50 µmol·L^{-1}) from 60% acetone and then measured in 0.1 mol·L^{-1} HCl at GCPE with 10% silicone oil (*a*) and solid GCE (*b*).

Influence of different supporting electrolytes on electrochemical behavior of α-TOH at GCPE was studied. In strong acids and acidic aqueous buffer solutions, only one oxidation (I) at +0.565 V and three (II, III and IV) reduction peaks were observed at GCPE during the first voltammetric scan. At GCE, peaks III and IV are barely recognizable; they coincide in one wide peak. At the second cycle, a new oxidation peak (V) at +0.255 V was found at the lower potential value. It is evident, that formed peak V is secondary oxidation product of the first oxidation (peak I). Relatively reversible electrochemical behavior of peaks IV and V was observed during following repetations. This could be attributed to the α-tocohydroquinone/ α-tocoquinone (α-TOQ) redox couple[9]. In neutral supporting electrolytes, similar electrochemical behavior of α-TOH was found as described previously but only one reduction reduction peak (IV) was observed during the fisrt cycle. In strong bases and alkaline bufferes, only one oxidation peak (I) at the first repetition was found in potential window from –0.5 to +1.3 V. At more negative potentials, similar phenomenon of α-TOH as in previous situations was also observed at GCPE; the peak IV (–0.60 V) and peak V (–0.38 V) at second repetition.

The highest peak current response of the first oxidation peak (I_p^I) was observed for strong acids. Otherwise, the I_p^I decreases very slowly (nearly constant values of current signals were observed in the pH range 3-8). Generally in electrochemistry of α-TOH, the peak potential values of first oxidation peak decrease with increasing pH values of used electrolytes. The similar linear dependence of peak potential E_p^I or E_p^{IV} on pH with slopes around 0.05 V·pH^{-1} was observed (not shown), which confirms the 1:1 electrons:protons ratio. Experimental data describing behavior of peak potential and peak current response of the first oxidation signal on pH of various used electrolytes are presented in Table I.

Table I.
Parameteres of the first oxidation peak (α-TOH) depending on pH values of used electrolytes.

Electrolytes	c [mol·L^{-1}]	pH	$I_{p,ox}$ [μA]	$E_{p,ox}$ [V]
HNO_3	0.1	0.9	56.66	0.535
HCl	0.1	1.0	49.78	0.525
H_2SO_4	0.05	1.1	40.05	0.520
Acetate buffer	0.1	4.5	24.70	0.420
KCl	0.1	4.8	26.45	0.445
Phosphate buffer	0.1	7.0	22.34	0.315
Amonia buffer	0.1	9.2	36.79	0.180
NaOH	0.1	12.8	32.84	–0.047

Electrochemical behavior of α-TOH can be described by partial chemical reactions. In organic solvents, the H_2O molecules and OH^- ionts are not present. For this reason, cyclic voltammograms of α-TOH in pure organic solvents are somewhat weak in terms of the number of peaks. For comparison, the cyclic voltammogram of α-TOH (2.6 mg in 10 mL acetonitrile containing 0.1 mol·L^{-1} NBu_4PF_6) exhibited only one oxidation peak at +0.86 V (+11.7 μA) and corresponding reduction peak at +0.60 V (10.8 μA) at GCE (not shown). During electrochemical oxidation, a α-TOH$^{+\bullet}$ radical is formed which is reduced back to α-TOH [9]. The difference (26 mV) indicates the reversible electrochemical reaction in which two electron participates.

The proposed model of electrochemical behavior of α-TOH in aqueous acidic or neutral media is shown in Fig. 3, which agrees with data described by Giacomelli [6] for aquous-ethanolic mixtures. In strong acidic solutions, the deprotonation is difficult of dienone cation (product of the first oxidation) with bound water molecule (secondary nucleophilic addition). Therefore in following cycles, the first oxidation peak is still clear. Its response peak current decreases with increasing number of repetitions (slower reaction kinetics). In strong basis like 0.1 mol·L^{-1} NaOH, nucleophilic addition of hydroxyl group is much more faster than addition of water and sequent deprotonation. For this reason, no oxidation peak at the same peak potential (E_p^I) is observed during the second repetition. This suggests that α–TOQ is the resulting product of the α-TOH oxidation in aqueous media[10]. Conversely, it can electrochemicaly be reduced by two electrons (with two participating protons) to tocohydroquinone (second oxidation response).

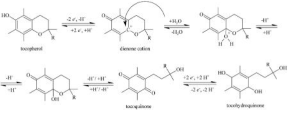


Fig. 3. Proposed electrochemical behavior of α-TOH in acidic and neutral aqueous media.

Conclusion

The selection of suitable lipophilic binder and influence of its content in glassy carbon paste is planned to be target of the next research. It is also necessary to find a suitable organic solvent and its optimum content in corresponding aqueous-organic mixture. As evident, α-TOH is soluble in various organic solvents miscible with water (not only in acetone used in this study). An efficiency of α-TOH extraction into glassy carbon paste is not affected only by selection of the paste binder (and its amount) and the aqueous-organic mixture. Extraction time, temperature and speed of stirring play important role as well. For future analytical applications, it is important to find a linear dependence of the oxidation current response on the α-TOH concentration. Evidently, the extraction step observed in this study gives hope for considerable improvement of the α-TOH determination using stripping anodic pulse techniques.

Acknowledgment

Support of the University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology (project No. SGFChT 06 2015/001) is gratefully acknowledged.

References

1. Švancara I., Hvízdalová M., Vytřas K., Kalcher K., Novotný R.: *Electroanalysis 8*, 61 (1996).
2. Švancara I., Vytřas K., Kalcher K., Walcarius A., Wang J.: *Electroanalysis 21*, 7 (2009).
3. Sies H., Stahl W.: *Am. J. Clin. Nutr. 62*, 1315S (1995).
4. Golumbic C., Mattill A. H.: *J. Biol. Chem. 134*, 535 (1940).
5. Dubbs D. M., Gupta R. B.: *J. Chem. Eng. Data 43*, 590 (1998).
6. Giacomelli C., Giacomelli F. C., Alves L. O., Timbola A. K., Spinelli A.: *J. Braz. Chem. Soc. 15*, 748 (2004).
7. Malyszko J., Karbarz M.: *J. Electroanal. Chem. 595*, 136 (2006).
8. Švancara I., Vytřas K., Barek J., Zima J.: *Crit. Rev. Anal. Chem. 31*, 311 (2001).
9. Yao W. W., Peng H. M., Webster, R. D.: *J. Phys. Chem. C 113*, 21805 (2009).
10. Sýs M., Metelka R., Mikysek T., Vytřas K.: *Chem. Pap. 69*, 150 (2015).

Voltammetric Determination of Herbicide Terbutryn Using Solid Electrodes Based on Silver Amalgam and Boron-Doped Diamond

Renáta Šelešovská, Kristýna Pithardtová, and Lenka Janíková
University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Institute of Environmental and Chemical Engineering, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic,
E-mail: renata.selesovska@upce.cz

Abstract
Possibility of application of the mercury meniscus modified and polished silver solid amalgam electrode and boron-doped diamond electrode has been investigated for voltammetric analysis of herbicide terbutryn. Cyclic voltammetry and direct current voltammetry has been used for study of the voltammetric behavior of the analyzed substance depending on pH of supporting electrolyte and scan rate. Differential pulse voltammetry has been applied for terbutryn determination. Finally, the proposed methods have been successfully used in the analysis of the real samples. The obtained results were compared also with those achieved using hanging mercury drop electrode.

Key words: Voltammetry, Silver solid amalgam electrode, Boron doped diamond electrode, Pesticides, Terbutryn.

Introduction

Terbutryn (TB, N-(1,1-dimethylethyl)-N'-ethyl-6-(methylthio)-1,3,5-triazin-2,4-diamin, CAS: 886-50-0) belongs to the group of triazine herbicides. Its structural formula is shown in Fig. 1. The herbicidal effects of TB were firstly reported in 1965 [1]. It is a selective herbicide, which can be adsorbed by foliage and roots of plants and acts as an inhibitor of photosynthesis. TB is mainly used for weed control in winter cereals, sugar beet, sunflowers, potatoes, and corn. It can serve as an algicide for control of algae and vascular plant in rivers, water reservoirs and ponds. TB can be also a part of paintwork materials with bactericidal and antifungal effects. TB is slightly toxic for humans and other mammals during the acute exposure. It affects primarily the central nervous system which leads to convulsions, impaired coordination and irregular breathing. The high doses of TB cause an edema and water in lungs. The chronic exposure can lead to liver and kidney damage, decrease of white blood cells and slowdown in growth [2].

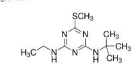


Fig. 1. Structural formula of terbutryn.

Voltammetric determination of TB was described using HMDE [3]. This work is focused on the determination of TB using polished and mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode (p-AgSAE, m-AgSAE) and boron-doped diamond electrode (BDDE). AgSAE represents the step between mercury electrode and solid electrodes, and it combines the advantages of the both above-mentioned types, especially the high hydrogen evolution and good possibility of surface regeneration comparable with HMDE, with the good mechanical stability and nontoxic electrode material of solid electrodes. The m-AgSAE was used up to now for many various analytical applications in determination of inorganic [4,5] and organic compounds [6-10], as well as in the analysis of peptides [11] and DNA [12-14]. The liquid mercury free p-AgSAE has been also successfully used for many analytical applications yet [15-17]. BDDE was the second type of solid electrodes tested in the presented work. The TB determination on BDDE was realized unlike AgSAEs via electrochemical oxidation of the analyte. It is a relatively novel and perspective electrode material firstly described in [18]. BDDE exhibits very good electrochemical properties such as a low and stable background over a wide potential range, high thermal conductivity, and chemical stability [19-22]. Application of this electrode material in electroanalysis of organic compounds has been reviewed e.g. in [23]. Pesticides and their residues are also a large group of substances studied with BDDE, and a number of the papers have been already published on this topic [24-27].

Application of solid working electrodes made of silver amalgam and boron-doped diamond for voltammetric analysis of herbicide TB has been firstly described in the present paper. Applicability of the proposed methods was verified by analysis of real or spiked samples.

Experimental

All chemicals used for the preparing of the standard solutions, electrolytes and other stock solutions were of p.a. purity. Britton–Robinson (B–R) buffer of a pH value from 2 to 12 was prepared from an alkaline component of 0.2 M NaOH (Lachema, Brno, Czech Republic) and an acidic component consisting of 0.04 M H_3PO_4, 0.04 M H_3BO_3 and 0.04 M CH_3COOH (Lachema, Brno, Czech Republic). The electrolytes based on acids were diluted from the concentrated acids (65 % HNO_3 and 57 % $HClO_4$, both from Penta, Praha, Czech Republic) by the distilled water. For the amalgam electrode activation solution of 2 M KCl (Penta, Praha, Czech Republic) was used. TB was supplied by Sigma-Aldrich with the declared purity $\geq$ 99.5 %. The stock solution of 1×10^{-3} M TB was prepared by dissolution of the appropriate amount of standard in acetonitrile under sonication. All stock solutions were stored in the dark in a refrigerator.

Voltammetric measurements were carried out using computer controlled Eco-Tribo Polarograph (Eco-Trend Plus s.r.o., Praha) equipped by POLAR-PRO software, version 5.1. Three-electrode setting was used with HMDE, m-AgSAE, p-AgSAE (Eco-Trend Plus s.r.o., Praha), and BDDE (Windsor Scientific Ltd, United Kingdom) as working electrodes. Ag|AgCl|saturated KCl served as a reference and platinum wire as an auxiliary electrode (both Monokrystaly s.r.o., Turnov). The measurements were performed at laboratory temperature (23±2 °C). Oxygen was removed from the measured solutions by bubbling with nitrogen (purity class 4.0; Linde, Prague, Czech Republic) for 5 minutes. The values of pH were measured using pH-meter Hanna 221 (Hanna Instruments, Inc., USA) and solutions of TB were prepared by applying an ultrasonic bath Bandelin Sonorex (Schalltec GmbH, Germany).

CV and DCV were used for the study of the voltammetric behavior of TB in dependence of pH and scan rate. DPV with optimized parameters was used for pesticide determination with all of the tested working electrodes. The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ), respectively, were calculated as three times (LOD) and ten times (LOQ), respectively, the standard deviation for the blank solution (supporting electrolyte) divided by the slope of the calibration curve. The parameters of calibration curves (e.g., slope, intercept) were calculated using software Excel 2010 (Microsoft, USA) and OriginPro 9 (OriginLab Corporation, USA).

The p-AgSAE was polished using the polishing kit (Electrochemical Detectors, Turnov, Czech Republic) consisting of polishing polyurethane stock, Al_2O_3 suspension (particle size 1.1 mm), and soft polishing Al_2O_3 powder (particle size 0.3 mm). The m-AgSAE was prepared by immersion of the polished electrode into the liquid mercury for 15 s and by shaking the pot with mercury. Before beginning of the work, as well as after every pause longer than 1 hour, for both modifications of AgSAE the electrode surface was activated in the solution of 0.2 M KCl by applying −2200 mV vs. Ag|AgCl|KCl (satur.) electrode for 300 s while the solution was stirring. The regeneration of the electrode surface consisted of the 30 cycles of the potential jumps between −1100 and 0 mV. The regeneration was realized directly in the supporting electrolyte or analyte. BDDE surface was rinsed with deionized water and anodically pretreated by applying +2000 mV during 60 s in 1 M HNO_3 solution in order to clean the electrode surface (get rid of any impurities) followed by the cathodic pretreatment at −2000 mV during 60 s to attain predominance of hydrogen termination of electrode surface, then the electrode surface was rinsed with deionized water and polished with a piece of damp silk cloth until a mirror-like character of surface was obtained. Finally, 20 cyclic voltammograms from −1000 to +2000 mV in the solution of 1 M H_2SO_4 were measured to obtained stable response.

Results and discussion

Fundamental voltammetric behavior of TB on all tested working electrodes was studied using CV. The obtained curves are presented in Fig. 2. It is obvious that this herbicide yields one irreversible reduction signal on both modifications of AgSAE about the potential of −930 mV, which is in accordance with the results published for HMDE [3]. Oxidation peak of TB about +1900 mV was recorded using BDDE. These signals were further studied in dependence of pH and scan rate using DC voltammetry. B-R buffer of pH 2 and 0.01 M HNO_3, respectively, was found as a suitable supporting electrolyte for TB analysis in case of amalgam electrodes, as well as for BDDE. The diffusion as a controlling process of the observed electrode reactions was determined from the linear running of dependences of peak height on square root of scan rate. This result was proved also by the values of slopes of the appropriate logarithmic dependences. This conclusion was expected for BDDE. In case of AgSAEs, it does not correspond to the adsorption controlled process proved on HMDE. It follows that the sensitivity of TB determination using tested solid electrodes cannot be increased by adsorptive stripping voltammetry in contrast with HMDE.

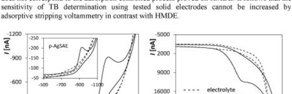


Fig. 2. Cyclic voltammograms of TB obtained on tested electrodes in B-R buffer of pH 2. $c_{TB(m\text{-}AgSAE)} = 5\times10^{-4}$ M, $c_{TB(p\text{-}AgSAE)} = 1\times10^{-4}$ M, $c_{TB(BDDE)} = 1\times10^{-4}$ M.

The method of DPV was used for voltammetric determination of TB using AgSAEs and BDDE, respectively. Parameters of this method were tested and the optimal values are summarized in the chapter Experimental. In case of the amalgam electrodes, conditions of the surface regeneration were proposed too. The repeatability of measurements using various working electrodes was confirmed by measuring and evaluation of 11 repeated curves of TB and calculation of relative standard deviations ($RSD_M(11)$) which are followed in Table I. The obtained values of RSD_M correspond to very good repeatability of measurements. The other statistical parameters obtained for each tested electrode, such as linear dynamic range (LDR), LOD, LOQ and the relative standard deviation of 5 time repeated determinations ($RSD_S(5)$), are also summarized in Table I. Calculated values of $RSD_S(5)$ (< 3.00 %) proved good repeatability of the TB determinations. Finally, the proposed method was successfully applied for the determination of TB in practical samples of spiked drinking and river water.

Table I.
Statistical parameters of proposed methods for TB determination using all tested electrodes

Electrode (surface [mm^2])	Method	LDR [mol L^{-1}]	LOD [mol L^{-1}]	LOQ [mol L^{-1}]	$RSD_M(11)$ [%]	$RSD_S(5)$ [%]
HMDE (0.73)	AdSV	2×10^{-9}-1×10^{-6}	4.1×10^{-10}	1.3×10^{-9}	1.3	2.5
m-AgSAE (0.39)	DPV	1×10^{-7}-1×10^{-5}	2.9×10^{-8}	9.8×10^{-8}	0.1	2.8
p-AgSAE (0.28)	DPV	2×10^{-8}-5×10^{-5}	4.3×10^{-9}	1.4×10^{-8}	0.2	2.2
BDDE (7.07)	DPV	2×10^{-7}-5×10^{-5}	1.2×10^{-7}	3.9×10^{-7}	0.1	1.2

Conclusion

The voltammetric behavior of herbicide terbutryn on m-AgSAE and liquid mercury free p-AgSAE, as well as on BDDE, was studied and the methods of its determination were proposed in the present paper. It was found that all of the tested solid electrodes can serve as a tool for TB determination, but both modifications of the amalgam electrode allow achieving the significantly lower limits of detection in comparison with BDDE. The p-AgSAE seems to be the most sensitive tested electrode which yields the lowest values of LOD and LOQ and concurrently the widest LDR. With regard to the ratio of working surface of p-AgSAE and HMDE, the sensitivity of p-AgSAE for TB determination can be considered almost comparable with those declared for HMDE.

Acknowledgement

This work was supported by The Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project No. CZ.1.07/2.3.00/30.0021 "Strengthening of R&D Teams at the University of Pardubice") and by the University of Pardubice (project No. SGSFChT_2015006).

References

1. Gast A.: Weed Abs. *14*, 150 (1965).
2. http://www.epa.gov/iris/subst/0285.htm#woe, Downloaded March 2nd, 2015.
3. Pedrero M., Calvo V., Manuel de Villena F. J., Pingarrón J. M., Polo L. M.: Analyst *118*, 1405 (1993).
4. Novoný L., Yosypchuk B.: Chem. Listy *94*, 1118 (2000).
5. Yosypchuk B., Novotný L.: Chem. Listy *96*, 756 (2002).
6. Yosypchuk B., Novotný L.: Talanta *56*, 971 (2002).
7. Barek J., Fischer J., Navrátil T., Pecková K., Yosypchuk B.: Sensors *6*, 445 (2006).
8. Šelešovská R., Bandžuchová L., Navratil T., Chylkova J.: Electrochim. Acta *60*, 375 (2012).

9. Bandžuchová L., Šelešovská R., Navrátil T., Chýlková J., Novotný L.: Electrochim. Acta *75*, 316 (2012).
10. Bandžuchová L., Šelešovská R., Navrátil T., Chýlková J.: Electroanalysis *25*, 213 (2013).
11. Šelešovská-Fadrná R., Fojta M., Navrátil T., Chýlková J.: Anal. Chim. Acta *582*, 344 (2007).
12. Fadrná R., Yosypchuk B., Fojta M., Navrátil T., Novotný L.: Anal. Let. *37*, 65 (2004).
13. Fadrná R. Cahová-Kuchaříková K., Havran L., Yosypchuk B., Fojta M.: Electroanalysis *17*, 452 (2005).
14. Yosypchuk B., Fojta M., Havran L., Heyrovský M., Paleček E.: Electroanalysis *18*, 186 (2006).
15. Fadrná R.: Anal. Lett. *37*, 3255 (2004).
16. Bandžuchová L., Šelešovská R., Navrátil T., Chýlková J.: *XXXIII Modern Electrochemical Methods (XXXIII Moderní elektrochemické metody), Jetřichovice, May 20th – 24th, 2013*, Book of Abstracts (Navrátil T., Fojta M., Pecková K, eds.), p. 14 (Lecture).
17. Šelešovská R., Bandžuchová L.: *XXXIV Modern Electrochemical Methods (XXXIII Moderní elektrochemické metody), Jetřichovice, May 19th – 23th, 2014*, Book of Abstracts (Navrátil T., Fojta M., Pecková K, eds.), p. 23 (Lecture).
18. Pleskov Y. V., Sakharova A.Y., Krotova M.D., Bouilov L.L., Spitsyn B.V.: J. Electroanal. Chem. *228*, 19 (1987).
19. Barek J., Fischer J., Navrátil T., Pecková K., Yosypchuk B., Zima J.: Electroanalysis *19*, 2003 (2007).
20. Kraft A.: Int. J. Electrochem. Sci. *2*, 355 (2007).
21. Peckova K., Barek J.: Curr. Org. Chem. *15*, 3014 (2011).
22. Šelešovská R., Janíková-Bandžuchová L., Chýlková J.: Elecroanalysis *27*, 42 (2015).
23. Peckova K., Musilova J., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. *39*, 148 (2009).
24. Svorc L., Rievaj M., Bustin D.: Sens. Actuators B *181*, 294 (2013).
25. Janíková-Bandžuchová L., Šelešovská R., Schwarzová-Pecková K., Chýlková J.: Electrochim. Acta *154*, 421 (2015).
26. Bandzuchova L., Svorc L., Vojs M., Marton M., Michniak P., Chylkova J.: Int. J. Environ. Anal. Chem. *94*, 943 (2014).
27. Šelešovská R., Janíková L., Chýlková J.: Monatsh. Chem. 146, 795 (2015)

Voltammetry of Metallothioneins on Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode
(Voltametrie metalothioneinů na stříbrné pevné amalgámové elektrodě modifikované rtuťovým meniskem)

Ivana Šestáková [a], Daniela Křivská [b], Bohdan Josypčuk [a], Kateřina Nováková [a], and Tomáš Navrátil [a]
[a] J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the AS CR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: sestakov@jh-inst.cas.cz
[b] Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6, Czech Republic

Abstract
Peak of AgMT is formed on m-AgSAE from MT in alkaline media. The height of this peak is proportional to the MT concentration in range 37- to 301 ng /ml and can be increased with accumulation. In ammonia solution with Co(III) salt, apart from usual Brdička response at -1400 mV another, more positive catalytic system is observed, when formation of AgMT is allowed. This phenomenon has been confirmed by elimination voltammetry.

Key words: Metallothionein, Brdička reaction, Silver complex, Elimination Voltammetry m-AgSAE

Úvod
Metalothioneiny (MT) jsou nízkomolekulární proteiny s vysokým obsahem cysteinylových zbytků a schopností vázat ionty kovů, zejména zinku a kadmia. Savčí metalothioneiny (isoformy MT1, MT2) byly doposud studovány s použitím rtuťové elektrody [1-4], která umožnuje rozlišit komplexy s různým typem koordinace a to polarografickými, voltametrickými a chronopotenciometrickými metodami. Výsledky těchto studií, zejména s aplikací metody multivariačního rozlišení křivek (MCR-ALS) jsou v dobré shodě s jinými metodami jako NMR či ESI –MS.

Pro řadu prací věnujících se studiu biologických funkcí metalothioneinů jako homeostáze, prevence oxidačního stresu, detoxifikace či studie vlivu znečištění životního prostředí na různé živočichy je důležitý celkový obsah metalothioneinů v jednotlivých tkáních. Byla již publikována řada metod, nicméně díky jednoduchosti a citlivosti je stále významná aplikace Brdičkovy metody [5-8] založené na katalýze vývoje vodíku v amoniakálním roztoku se solí Co(III).

Stříbrné pevné amalgámové elektrody [9-11] jsou v současnosti aplikovány pro řadu anorganických i organických látek díky vlastnostem podobným rtuťové elektrodě ale podstatně větší stabilitě. Proto je předmětem této studie chování savčího metalothioneinu na meniskové stříbrné pevné amalgámové elektrodě a možnosti jejiho využití pro analýzu biologických extraktů.

Experimentální část
Cd-Zn metalothionein byl získán od fy Sigma-Aldrich a Enzo Lifesciences, pro srovnání byl dále použit MT fragment od fy Sigma-Aldrich, obsahující pouze 3 cysteinové zbytky - (Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala).

Borátový pufr pH 8.4 byl připraven z Suprapure sodium teraborate (Merck), amonný pufr pH 9.5 z p.a. chloridu amonného a p.a. roztoku amoniaku (Lachema, Brno). Základní elektrolyt byl 1 M amonný pufr pH 9,5 s 1 mM $Co(NH_3)_6Cl_3$ (SIGMA).

Biologické extrakty byly připravovány ze 100 mg lyofilizovaných jater laboratorních potkanů podle metodiky Hisparda et. al., 2008 [12]. Navážený materiál byl zhomogenizován (UltraTurrax T25) v 6 ml pufru (20mM Tris, 150 mM NaCl – pH 8,6 + 10 mM 2-mercaptoethanol a inhibitory proteáz: 20uM leupeptin, 2uM aprotinin a 100uM benzamidin – (SIGMA) a následně centrifugován při 4 °C, 16 090 g po dobu 30 minut. 1,5 ml S1 bylo denaturováno 15 min. při 97°C. Po denaturaci a následném zchlazení na 4°C proběhla další centrifugace při 4°C, 10 000 g po dobu 15 minut. Získaný S2 byl zchlazen a uskladněn v -80 °C až do vlastního stanovení.
Voltametrická stanovení byla prováděna s použitím počítačově řízeného analyzátoru PC-ETP (Polaro- Sensors, Praha, Česká republika) se softwarem POLAR PRO 5.1. a Multielchem 2.1. Pracovní elektrody byly HMDE (rtuťová tužková elektroda fy Polaro Sensors) a stříbrná amalgámová elektroda ve formě m-AgSAE, připravená a aktivovaná dle práce [9]. Referentní elektroda byla Ag/AgCl/KCl_{nas}, pomocná elektroda Pt drátek (Elektrochemické Detektory, Turnov, Česká republika). Měření byla prováděna při laboratorní teplotě v dusíkové atmosféře. Pro měření pH byl používán pH metr Jenway 3505 (Bibby Scientific Ltd. UK).

Výsledky a diskuse

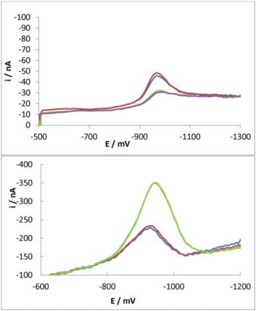
Pík redukce Ag MT

Rozdílně od voltametrie na HMDE, kde jsou patrné redukční píky v molekule MT komplexovaného Cd a Zn, je na m- AgSAE patrný pouze jeden redukční pík v oblasti kolem -0,90 V. Popsaný pík přísluší redukci komplexu Ag-MT, jak bylo ukázáno voltametrií na HMDE s přídavky Ag^+ k roztoku Cd,Zn,MT v polarografické nádobce. Jak ukazuje obr. 1, ve stejné oblasti jako MT poskytuje pík Ag komplexu i fragment obsahující pouze tři cysteinové zbytky.

Pík Ag MT roste s dobou akumulace (Obr.1.) a v rozsahu koncentrací 38 až 300 ng/ml byla získána lineární závislost mezi koncentrací metalothioneinu a výškou píku. (i=-0.4979*C+21.55, R=0.9984.) Přídavek biologického extraktu dle výše uvedeného postupu však ukázal značné snížení odezvy i reprodukovatelnosti výsledného záznamu. Vzhledem k dostatečné citlivosti stanovení v čistém elektrolytu by bylo řešením použití průtokového systému se střídáním vzorku a čistého elektrolytu.

Brdičkova reakce na m- AgSAE

Pro úspěšnost stanovení je pro každý vzorek nutný nový a aktivovaný povrch rtuťového menisku. Při opakovaných záznamech dochází ke tvorbě AgMT a jeho interakci s Co(II) vznikajícím na elektrodě redukcí Co(III) ke vzniku nového katalytického proudu u cca -1,15 V. To je dobře patrné při aplikaci eliminační voltametrie na pokrytou m-AgSAE v borátovém pufru. (Obr. 2.) Katalytický proud Ag-komplexu v amoniakálním roztoku s Co(II) skýtá perspektivu pro citlivou analytickou aplikaci.

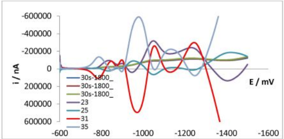


Obr. 1. m-AgSAE, DPV 20mV/s, borátový pufr pH 8.4. Horní: 0.03μM MT-fragment, čištění 30s -1600 pak 30s -250 mV a 30s -1600 pak 60s -250 mV. Dolní: MT 30ng/ml, čištění 60s -1800 mV, pak 100s -600mV nebo 300s -600 mV

Závěr

Na m-AgSAE je pozorován pík komplexu AgMT, který lze zvýšit akumulací při vhodném potenciálu. Výška píku lineárně závisela na koncentraci MT v roztoku v rozsahu 38-301 ng/ml. Přídavek biologického extraktu však stanovení znemožňuje.

Brdičkovu reakci v prostředí 1M amoniakálního pufru s 1 mM Co(III) je třeba provádět vždy na novém a aktivovaném menisku. Při delších záznamech se projevuje nový katalytický systém spojený s tvorbou AgMT, který skýtá perspektivu pro další citlivé analytické stanovení.



Obr. 2. Eliminační voltametrie- DC rychlosti 80, 160, 40 a 20 mV/s, od -600 do -1600 mV. m-AgSAE z amonného pufru s Co(III) a MT přenesena do borátového pufru pH 8.5. Znázorněny křivky pro rychlost 80mV/s a eliminační křivky se zachováním pouze difusního proudu (23, 31) nebo pouze kinetického proudu (25 a 35).

Poděkování

Autoři děkují za podporu grantu GAČR P206/11/1638 a GAČR P208/12/1645.

Literatura

1. Rodriguez A.R., Esteban M.:, Cell. Mol. Biol. *46*, 237(2000).
2. Sestakova,I.,. NavratilT.:Bioinorg. Chem. Appl. *3*, 43 (2005).
3. Serrano N.,Sestakova I., Diaz-Cruz J.M: Electroanalysis *18*,169 (2008).
4. Dabrio M., Rodriguez A.R., Bordin G., Bebiano J., De Ley M., Sestakova I., Vasak M., Nordberg M.: J. Inorg. Biochem. *88*, 123 (2002).
5. Adam V., Fabrik I., Eckschlager T., Stiborova M., Trnková L., Kizek R.: Trends Anal. Chem.*29*, 409 (2010).
6. Olafson R.W., Olsson P.E.: Meth. Enzym. *205*, 205 (1991).
7. Raspor B.: J. Electroanal. Chem. *503*, 159 (2001).
8. Kizek R., Trnkova L., Palecek E.: Anal. Chem. *73*, 4801 (2001).
9. Novotny L., Yosypchuk B.: Chem. Listy *94*, 118 (2000).
10. Yosypchuk B., Heyrovsky M., Palecek E., Novotny L.: Electroanalysis *14*, 1488 (2002).
11. Selesovska-Fadrna R., Fojta M., Navratil T., Chylkova J.: Anal. Chim. Acta *582*, 344 2007).
12. Hispard F., de Vaufleury A., Martin H., Devaux S., Cosson R. P., Scheifler R., Richet L., Berthelot A. Badot P. –M.: Ecotox Environ Safe. *70*, 490 (2008).

Electrochemical Reduction of FOX-7 in Aprotic Solvent Accompanied by Formation of a Radical with Alternating Line-width Effect

Ludmila Šimková [a], Karol Lušpai [b], Jiří Klíma [a], and Jiří Ludvík [a]
[a] J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of ASCR, v.v.i., Dolejškova 3, CZ-182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: ludmila.simkova@jh-inst.cas.cz
[b] 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
Different structures of FOX-7 in various solutions play a crucial role in the mechanism of its electrochemical reduction. In aprotic solvent the irreversible four-electron, four-proton reduction of one nitro group proceeds according to the autoprotonation mechanism. The zwitterionic form of FOX-7 serves as a source of protons. The two-step reduction is accompanied by an adsorption step in dependence on used solvent and material of electrode. The *in situ* spectroelectrochemical measurements revealed formation of a dianion radical intermediate with alternating line-width effect. The intramolecular dynamic processes were described by temperature dependent *in situ* ESR measurement.

Key words: FOX-7, 2,2-dinitroethene-1,1-diamine, zwitterionic form, reduction, autoprotonation mechanism, spectroelectrochemistry, ESR, EPR, temperature dependence, alternating line-width.

Introduction
The molecule of FOX-7, chemically 2,2-dinitroethene-1,1-diamine, was successfully synthesised by Latypov et al. in 1998 [1] as an unexpected product of nitration of 2-methylimidazole [2]. Since that time its synthesis and chemical and physical properties have been widely investigated and recently extensively reviewed [3]. FOX-7 as an energetic material has attracted substantial interest because its performance is similar like 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazacyclohexane (RDX), the most effective currently used explosive [4], but its sensitivity towards external stimuli is much lower. Besides its applicability, FOX-7 is a very specific and attractive molecule even from the point of view of fundamental research because due to its two geminal nitro groups it is one of the most interesting molecules with multiple redox centres. In addition to this, the molecule involves electron-donating and electron-withdrawing part stabilized by push-pull effect which allows tautomeric, mesomeric and acidobasic equilibria.

We have focused on the redox properties of this molecule. Its electrochemical redox behaviour has been described first in aqueous buffered solutions [5] where hydrogen atoms from the solvent can participate in hydrogen bonding and in protonation reactions.

In aprotic media FOX-7 exists in several different structures – it was found and proved in the previous work [6] (Fig. 1). The hydrogen atoms participating anyhow in redox reactions originate thus exclusively from the molecules of the substrate. Due to the push-pull effect the molecule of FOX-7 (**I**) is polarized and its zwitterionic form (**II–III**) is present in the solution. It can undergo easily dissociation (deprotonation) (**IV**) and serves thus as a source of protons.

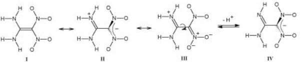


Fig. 1. Structures of FOX-7 in aprotic solvents.

Therefore autoprotonation mechanism during the electrochemical reduction in aprotic solvent can occur. In order to shed more light on this "auto-" or "self-redox" reaction mechanism, the present *in situ* spectroelectrochemical systematic study (UV-vis-NIR and ESR at different temperature) was realized.

Experimental

The sample of FOX-7 was used as obtained from the laboratory of organic synthesis at the University of Pardubice. For analytical experiments 0.01 M stock solution in DMF was freshly prepared every day, and the adequate volume was transferred by a Hamilton microsyringe into the cell. Concentration of FOX-7 was 0.3–0.6 mM. As aprotic solvents, acetonitrile (AN, LC-MS Chromasolv®, ≥99.9 %, Fluka), *N,N*-dimethylformamide (DMF, purified and dried by double distillation [7]), and dimethylsulfoxide (DMSO, <0.025 % H_2O, Merck Seco Solv ®) were used. The 0.1 M solution of terabutylammonium tetrafluoroborate (Bu_4NBF_4) or terabutylammonium hexafluorophosphate (Bu_4NPF_6) serving as electrolytes, was deaerated by argon.

For all electrochemical experiments a standard three-electrode system was applied. A dropping mercury electrode (DME) with a controlled drop time was used in DC-polarography. A platinum, gold or glassy carbon stationary electrode (area ca. 1 mm^2), alternatively a hanging mercury drop electrode (HMDE) were used for cyclic voltammetry. The auxiliary electrode was made of a platinum wire or foil and a saturated calomel electrode separated from aprotic solution by a salt bridge served as the reference electrode. All experiments were carried out in an undivided 10 ml cell and were conducted by the analog potentiostat PA4, both Laboratorní přístroje Praha with an XY recorder.

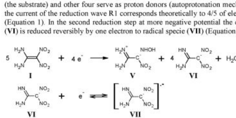
The *in situ* UV-vis-NIR/ESR spectroelectrochemical measurements at room temperature, were performed in the optical ESR cavity (ER 4104OR, Bruker Germany). ESR spectra were recorded by the EMX X-band CW spectrometer (Bruker, Germany). The g-values of the radical species were determined via Mn external standard. UV-vis-NIR spectra were measured by Avantes spectrometers AvaSpec-2048x14-USB2 with the CCD detector and AvaSpec-NIR256-2.2 with the InGaAs detector applying the AvaSoft 7.5 software. Both the ESR and UV-vis-NIR spectrometers were linked to a HEKA potentiostat PG 390. Triggering of all instruments was performed by the software package PotMaster v2x40 (HEKA Electronic, Germany). A spectroelectrochemical flat cell with a three-electrode arrangement consisting of a laminated working electrode with a gold mesh, a platinum wire as a counter electrode, and a silver chloride-coated silver wire as a pseudoreference electrode was used. The scan rate for *in situ* spectroelectrochemical measurements was around 4 mV/s. All solutions were prepared in glove box.

Special arrangement of the electrochemical cell (described by Rapta and Dunsch [8]) was used for temperature dependent measurements. The cell was polarized in an amperostatic

2-electrode mode. A Pt mesh served as working electrode and Pt wire as an auxiliary/reference electrode. A Heka PG285 (Lambrecht, Germany) potentiostat with PotMaster v2x73 software package served for the potential and voltage control. The ESR cavity (Bruker 4102 ST/8342) equipped by Dewar flask and connected to the ER4111VT Bruker (Bruker, Germany) variable temperature unit and connected to the liquid nitrogen setup was used. In this setup the liquid nitrogen is electrically evaporated and nitrogen vapours are heated to the required temperature. All ESR spectra were recorded *in situ* using an X-band ESR spectrometer EMX (Bruker, Germany) with 100 kHz field modulation. The experimental ESR spectra were processed by the Bruker software WinEPR as well as using the special program provided by A. Rockenbauer [9].

Results and discussions

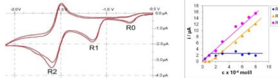
The electrochemical reduction of FOX-7 in aprotic solvents proceeds in two reduction steps with consumption of approximately 2 electrons. In the first step irreversible four-electron, four-proton reduction of one nitro group of FOX-7 occurs, where one molecule is reduced (the substrate) and other four serve as proton donors (autoprotonation mechanism). Therefore the current of the reduction wave R1 corresponds theoretically to 4/5 of electron per molecule (Equation 1). In the second reduction step at more negative potential the deprotonated anion (**VI**) is reduced reversibly by one electron to radical specie (**VII**) (Equation 2).



$E_{1/2}^{1}$ (1)

$E_{1/2}^{2}$ (2)

In AN and DMF the reduction mechanism is accompanied by an adsorption step (R0) (Fig. 2a). Its behaviour (Fig. 2b) is typical for the case when the primary product of the reduction is strongly adsorbed. The appearance of the adsorption phenomenon is connected with the specific properties of the mercury surface and its renewability and with the structural form of FOX-7 which prevails in bulk both in AN and DMF. It is not observed at any other used electrode materials.



a b

Fig. 2. a) Typical cyclovoltammetric curve of FOX-7 in AN on mercury electrode. Concentration of FOX-7 6×10^{-4} mol.l^{-1}. b) Plot of individual polarographic limiting currents of reduction waves in dependence on concentration of FOX-7 in AN. The potentials are compared to SCE.

The interpretation of *in situ* UV-vis-NIR and ESR spectra proved [10] formation of two different stable products during the irreversible reduction step R1, which manifest themselves by peaks at 430 nm (hydroxylamine derivative **V**) and 370 nm (intermediate **VI**). Upon the reduction of R2 reduction step new bands at 306 and 710 nm increase which belong to the reversibly formed radical intermediate (**VII**) with an alternating line-width (AL) effect (Fig. 3) as a result of intramolecular dynamic processes in the timescale of X-band ESR spectroscopy.

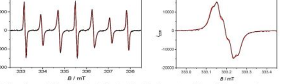


Fig. 3. Experimental (black line) and simulated (red line) spectra of the radical observed upon electrochemical reduction of FOX-7 at 265 K with detail view of the first line.

For better understanding of observed dynamic processes, the temperature dependent ESR measurements (from 225 to 335 K) during continuous *in situ* electrochemical generation of radical anion were performed. Recorded spectra were simulated by using special program [9] capable to distinguish the spin system parameters for different conformers (sites) in dynamic chemical exchange including the correlation time characterizing the rate of the observed dynamics.

Conclusion

In aprotic solvent the electrochemical reduction of FOX-7 proceeds by an autoprotonation mechanism. In dependence on used solvent and material of working electrode the reduction process is accompanied by an adsorption pre-wave. The autoprotonation mechanism was proved by *in situ* spectroelectrochemical experiments which reveal formation of a dianion radical with alternating line-width effect upon the second reduction step. By temperature dependent ESR spectra the observed dynamics was described.

Acknowledgement

Prof. Antal Rockenbauer Ph.D. from Hungarian Academy of Sciences is gratefully acknowledged for providing his simulation program. The authors thank Doc. Zdeněk Jalový Ph.D. from the University Pardubice for granting the sample and project 13-21704 S (GAČR) for financial support.

References

1. Latypov N. V., Bergman J., Langlet A., Wellmar U., Bemm U.: Tetrahedron *54*, 11525 (1998).
2. Latypov N. V., Langlet A., Wellmar U. World patent WO 99/03818, Jan. 28, 1999.
3. Šimková L., Liška F., Ludvík J.: Cur. Org. Chem. *15*, 2983 (2011).
4. Meyer R., Köhler J., Homburg A.: Explosives, sixth, completely revised edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2007.

5. Šimková L., Klíma J., Sazama P., Ludvík J.: J. Solid State Electrochem. *15*, 2133 (2011).
6. Šimková, L., Šoral M., Lušpai K., Ludvík J.: J. Mol. Struct. *1083*, 10 (2015).
7. Liška A., Vojtíšek P., Fry A.J., Ludvík J.; J. Org. Chem *78*, 10651 (2013).
8. Rapta P., Dunsch L.: J. Electroanalyt. Chem. *507*, 287 (2001).
9. Rockenbauer A., Korecz L.: Appl. Magn. Reson.: *10*, 29 (1996).
10. Šimková L., Dmitrieva E., Klíma J., Dunsch L., Ludvík J.: J. Solid State Electrochem. 19, 103 (2015).

Possibility of Using Purine Oxidation Signals for DNA Sequence Analysis (Možnost využití signálů oxidace purinových bází DNA k analýze sekvencí DNA)

Jan Špaček, Kateřina Cahová, Luděk Havran, and Miroslav Fojta
Institute of Biophysics, v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, 612 65, Brno, CzechRepublic, E-mail: j.h.spacek@ibp.cz

Abstract
Signals provided by electrochemical oxidation of single stranding DNA on the surface of pyrolytic graphite electrode, which correspond to the oxidation of adenine and guanine (A and G) are known for over forty years. The mechanism of oxidation of free A and G as well as nucleoside mono-, and triphosphates of these bases is know but the mechanism of oxidation of purines in the DNA still remains unexplained. Ratiometry of A and G signals could be a new tool for DNA sequence analysis, if signals of A and G oxidation obtained from single-stranded DNA adsorbed at the electrode surface are proportional to the number of oxidized As and Gs in studied samples. Our preliminary results suggest that there is a correlation, yet we encountered problems, which yet has to be addressed and explained before this method could be applied for DNA analysis.

Key words: DNA oxidation, DNA sequence analysis, Electrochemistry, Pyrolytic graphite electrode.

Úvod
DNA je na povrchu elektrod z pyrolytického grafitu (PGE) silně adsorbovaná v širokém rozsahu potenciálů, čehož je možné využít pro přenosové techniky, při kterých je vzorek adsorbován z malého objemu a měření je prováděno v čistém elektrolytu. V jednořetězcové formě (ssDNA) je DNA adsorbována přednostně bázemi a díky větší flexibilitě snáze kopíruje relativně drsný povrch PGE. Dvouřetězcová (dsDNA) je na povrch PGE adsorbována cukrfosfátovou pátěří s bázemi ukrytými uvnitř dvoušroubovice a kvůli větší rigiditě kopíruje nerovnosti povrchu PGE hůře. Z výše popsaných sterických důvodů, signály oxidace bází DNA jsou mnohem lépe vyvinuté u ssDNA než u dsDNA, přestože lokalizace příslušných primárních oxidačních míst ve žlábcích dvoušroubovice v principu umožuje oxidaci obou purinových bazí i v dsDNA [1]. Oxidace adeninu (A) a guaninu (G) jsou pomalé ireverzibilní elektrochemické procesy. Pro měření oxidace bází DNA jsou obvykle používány pulzní metody. Při pH 7 potenciál oxidace volného G má pozici kolem +0,7 V (proti Ag|AgCl|3M KCl) a oxidace volného A probíhá okolo +1 V. S měnícím se pH se píky oxidace A a G (A^{ox} a G^{ox}) posouvají o 60 mV negativním směrem na jednotku pH. Oxidace nukleosidů probíhá při potenciálech o 250 mV vyšších, než oxidace odpovídajících bází [2] a výrazně se neliší od signálů poskytovaných oxidací purinů v ssDNA (viz Obr. 1). Signály oxidace DNA můžeme pozorovat v širokém rozmezí pH (od 2,7 do 8,1). Iontová síla acetátového nebo fosfátového pufru, v rozsahu od 50 mM do 5 M nemá významný vliv na proudovou odezvu A^{ox} a G^{ox} [1].
Za specifických podmínek je možné pozorovat signály oxidace všech čtyř bází DNA [3], ale většina senzorů je založená na detekci oxidace purinových bází, případně pouze guaninu, protože k jejich oxidaci dochází při nižších potenciálech a méně stringentních podmínkách [4].
Proudová odezva A^{ox} a G^{ox} by měla odpovídat zastoupení těchto bází ve studovaných sekvencích DNA. Rozhodli jsme se proto zjistit, nakolik je tento předpoklad správný, jaké jsou limitace této metody a jestli a jak přesně je možné určit poměr zastoupení A : G ve studovaných vzorcích ssDNA.

Experimentální část

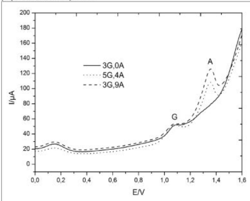
Měření jsme prováděli pomocí potenciostatu Autolab (Metrohm-Autolab, Holandsko) a tříelektrodového zapojení (pracovní elektroda PGE, referenční elektroda: Ag/AgCl/3M KCl, pomocná elektroda: platinový drát). Jako elektrolyt byl použitý acetátový pufr s iontovou sílou od 0,05M do 5M a pH od 4 do 6.

Měření vzorů DNA s různým zastoupením A a G bylo prováděno přenosovou technikou: 2 µl syntetických oligonukleotidů o délce 20nt s koncentrací 20 mg/l bylo adsorbováno po dobu 60 s na povrch PGE z 0,2M roztoku NaCl. Modifikovaná elektroda byla opláchnuta v destilované vodě a následně s ní bylo provedeno elektrochemické měření voltametrií s vnuceným střídavým napětím (SWV): frekvence 200 Hz, amplituda 50 mV, velikost kroků 5 mV, měřený potenciál 0 – 1,6 V.

Po měření byla elektroda opláchnuta v destilované vodě a povrch byl obnoven lepicí páskou.

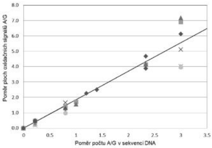
Výsledky a diskuze

Pokud byly provedeny dvě následující měření se stejnou elektrodou, pak píky A^{ox} a G^{ox} byly přítomné pouze v prvním měření, z čehož vyplývá, že v prvním měření došlo k ireverzibilní oxidaci všech purinových bází DNA adsorbované na povrchu elektrody. Proto jsme se rozhodli pro vyhodnocování používat plochu píku, která odpovídá celkovému náboji souvisejícímu s oxidací. Protože velikosti aktivních ploch PGE se různí nejen mezi elektrodami, ale i mezi jednotlivými měřeními, rozhodli jsme se využít ratiometrického přístupu pro standardizaci výsledků.



Obr. 1. SWV v 0,2M acetátovém pufru pH 5, vzorky oligonukleotidů s různým zastoupením G a A.

V první sérii měření devíti různých oligonukleotidů vycházel poměr velikostí ploch oxidačních signálů A/G ku počtu bází A/G 1,8 s 11% směrodatnou odchylkou. Pokud bylo na elektrodě stejné množství adeninu a guaninu, potom náboj vzniklý oxidací adeninu byl 1,8x větší než náboj vzniklý oxidací guaninu. Při zopakování těchto měření po půl roce s jinou elektrodou byl poměr ploch oxidačních signálů 1,89 s 14% směrodatnou odchylkou (shrnuto v grafu 1), což naznačuje, že je možné tuto metodu využít pro stanovení zastoupení A a G v neznámých vzorcích ssDNA. Při poměrech počtu A/G v sekvenci 3 a více začíná narůstat chyba. Tato chyba je dána malou velikostí píku G, který je ovlivňován šumem. Vzhledem k radiometrickému způsobu výpočtu je tento šum umocněn. Zjistili jsme, že při změně pH a iontové síly dochází ke změně směrnice závislosti poměru velikosti ploch na poměru počtu bází, což je v rozporu s předchozími zjištěními [1]. Rovněž některé sekvence mají systematicky nižší nebo vyšší poměry velikosti ploch, než bychom čekali z početního zastoupení bází. Toto může být dáno vlivem sekundárních struktur (vlásenek).



Graf 1. Závislost poměru velikosti ploch A^{ox} a G^{ox} na poměru počtu A ku G v sekvenci oligonukleotidů (měřeno v 0,2M acetátu pH 5). Body označují jednotlivé měření rozlišené podle sérií, přímka vyznačuje směrnici y=1,85x.

Závěr

Předkládáme aplikaci metody, která přestože byla navrhnuta už v roce 1978 [1], nebyla doposud vyzkoušena v praxi. Doposud nemáme dostatek dat, abychom mohli popsat vliv sekundárních struktur ssDNA (vlásenek) na výsledky této metody a jak a zda je možné těmto vlivům předcházet. Rovněž spolehlivost této metody v závislosti na délce DNA zůstává nezodpovězena.

Poděkování

Tato práce vznikla díky podpoře grantu GA ČR (P206/12/G151) a institucionální podpoře RVO 68081707.

Literatura

1. Brabec V., Dryhurst G.: J. Electroanal. Chem. *89*, 161 (1978).
2. Boussicault F., Robert M.: Chem. Rev. *108*, 2622 (2008).
3. Olivera-Brett A.M., Piedade J.A.P., Diculescu V.C.: Anal. Chem. *332*, 321 (2004).
4. Paleček E.; Bartošík M.: Chem. Rev. 3427 (2012).

Lab-made Sensors Based on Boron-doped Diamond for Determination of Herbicide Linuron

Michaela Štěpánková [a], Renáta Šelešovská [a], Lenka Janíková [a], Marian Vojs [b], Marián Marton [b], Miroslav Behúl [b], Kateřina Nováková [a, c] and Jaromíra Chýlková [a]
[a] University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Institute of Environmental and Chemical Engineering, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic,
E-mail: st26846@student.upce.cz
[b] 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.
[c] J. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry of the AS CR, v.v.i, Dolejšova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic.

Abstract
Voltammetric behaviour of substituted urea herbicide linuron (LIN) was investigated using two types of boron-doped diamond electrodes (BDDE): commercial BDDE and lab-made sensors based on boron-doped diamond (LM-BDDE). Various methods like cyclic voltammetry (CV), direct current voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV) were examined. It was found that LIN provides one oxidation peak using all of the tested working electrodes and the highest current response was recorded in the acidic media. Thus, Britton-Robinson (B-R) buffer of pH 2 was used as a supporting electrolyte. Parameters of DPV were optimized and the low limits of detection (LOD) were reached 1.41×10^{-7} M for commercial boron-doped diamond electrode and 8.81×10^{-9} M, respectively, which represents the lowest LOD obtained for lab-made boron-doped diamond electrodes.

Key words: Boron-doped diamond electrode, Sensors, Voltammetry, Linuron.

Introduction
Linuron (LIN, Fig. 1) is a substituted urea herbicide used to control newly emerging and germinating grasses and broad-leafed weeds. It may be applied pre-plant, pre-emergence, post-emergence, or post-transplant using ground equipment. It is labelled for field and storehouse usage in such crops as soybean, cotton, corn, bean, potato, carrot, winter wheat, asparagus, and fruit crops. LIN acts as an herbicide through the inhibitor of photosynthesis. It is a slightly toxic compound and belongs in EPA toxicity class III [1-3]. The electrochemical determination of linuron using various types of working electrodes have been described [4-6].

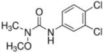


Fig. 1. Structural formula of linuron.

BDDE corresponds with the concept of green analytical chemistry. Boron-doped diamond is known to be a remarkable material due to its particularly attractive properties combining chemical resistance, thermal conductivity, optical transparency, high thermal stability and stable background current [7, 8]. The common BDD films used in electroanalysis usually grow on Si supports from dilute mixtures of a hydrocarbon gas (typically methane) in hydrogen using one of several energy-assisted chemical vapor deposition methods [9]. This electrode material has already been utilized as a sensitive analytical tool in determination of various pesticides, e.g. picloram [10], methidation [11] or carbaryl [12]. Also these electrodes were used for determination of other substances, e.g. caffeine [13], adrenalin [14] or phenol [15].

The electrochemical properties of LM-BDDEs with different parameters and their applicability for the determination of LIN were studied in present paper.

Experimental
All chemicals used for preparation of the supporting electrolytes, standard solutions and other solutions were of p.a. purity. Britton-Robinson (B-R) buffer of a pH value from 2 to 12 was prepared from an alkaline component of 0.2 M NaOH (Lachema, Brno, Czech Republic) and an acidic component consisting of 0.04 M H_3PO_4, 0.04 M H_3BO_3 and 0.04 M CH_3COOH (Lachema, Brno, Czech Republic). The electrolytes based on 1M, 0,5M and 0,1M HNO_3 were diluted from 65 % HNO_3 (Penta, Praha, Czech Republic). All solutions were prepared in distilled water. 1×10^{-3} M stock solution of LIN was made by dissolution of the LIN powder (purity 99.7 %, Sigma Aldrich, Praha, Czech Republic) in 70 % acetonitrile and stored in the glass flask in a refrigerator.

Voltammetric measurements were performed by computer controlled Eco-Tribo Polarograph (Polaro-Sensors, Praha, Czech Republic) equipped by POLAR.PRO software (version 5.1) for Windows. All measurements were provided in a 3-electrodes set up, where BDDE (7.07 mm^2) (Windsor Scientific Ltd, United Kingdom) or LM-BDDEs (0.43 mm^2) (Slovak University of Technology in Bratislava, Slovak Republic) served as the working electrode, saturated silver/silver chloride as a reference and platinum wire as an auxiliary electrode (both Monokrystaly, Turnov, Czech Republic). Each BDDE was anodically (3 V for 20 s) and cathodically (−3 V for 80 s) pretreated in 0.5 M H_2SO_4 (Penta, Praha, Czech Republic) at the beginning of each working day [4]. The measurements were performed at laboratory temperature (23±2°C). The values of pH were measured using pH-meter Hanna 221 (Hanna Instruments, Inc., USA).

For fabrication of BDD sensors was used the n-type Si(100) wafer with 1.4 μm thick SiO_2 layer (CVD, Oxford PlasmaLab 80) as a substrate. Firstly, the Si substrates were cleaned with isopropanol and deionized water and then they were seeded in the ultrasonic bath using a nanodiamond powder <10 nm (CAS No. 7782-40-3, Sigma Aldrich). The BDD films were deposited 2 hours using double bias enhanced hot filaments reactor (HF CVD). A boron-doped monocrystalline diamond was achieved by adding trimethylboron (TMB) to the 0.5 %, 1 % and 2 % CH_4 in H_2 gas mixture. The B/C ratio in the gas phase was from 0 to 20 000 ppm. The deposition was performed in the pressure 3 000 Pa at a temperature 650 ± 20°C. The active area (0.43 mm^2) of working electrode was created in 400 nm SiO_2 (CVD, Oxford PlasmaLab 80) by using standard optical lithography and wet etching in BOE solution (6:1 volume ratio of 40 % NH_4F in water to 49 % HF in water). The electrode chip (10 × 3 mm^2) was electrically connected by Ag polymer paste (CB115, DuPont) to the printed circuit board´s support and completely passivated by non-conducting paste (548X, DuPont) [16].

CV measured between potentials from −500 mV to 2 200 mV with v of 100 mVs^{-1} was used for the study of the voltammetric behavior of LIN. DCV, with followed parameters: initial potential (E_{in}) of −500 mV, final potential (E_{fin}) of 1 900 mV and scan rate (v) of 100 mV, was utilized for studying the effect of a scan rate on the voltammetric response of LIN. DPV was used for the study of the voltammetric behavior of LIN in dependence of pH of supporting electrolyte. DPV with optimized parameters (E_{in} = 400 mV, E_{fin} = 1600 mV, v = 50 mVs^{-1}, pulse height 70 mV and pulse width 20 ms) was applied for LIN determination. The limit of detection (LOD) was calculated as a three times the standard deviation for the blank solution and divided by the slope of the calibration curve. The parameters of calibration curves (e.g., slope, intercept) were calculated using software OriginPro 9 (OriginLab Corporation, USA).

Results and discussion

The voltammetric behavior of LIN and optimization of method has been studied on commercial BDDE. A choice of the suitable supporting electrolyte is a crucial step in the optimizing process of the voltammetric analysis. Using CV it was found that LIN provides one irreversible oxidation peak at about +1 300 mV in wide range of pH. No reduction signal was recorded under the used working conditions, which is obvious from the figure 2B, and the electrode process could be described as chemically irreversible. B-R buffer of pH 2 served as a supporting electrolyte because the highest oxidation response was observed in this medium. The linear dependence of peak height and the square root of scan rate was measured using DCV, which corresponds to the diffusion-controlled electrode process. The parameters of DPV were optimized using BDDE for LIN determination and this method was subsequently applied for analysis of model solutions containing LIN using all tested LM-BDD sensors. The example of the concentration dependence of LIN measured on commercial BDDE using DPV is shown in Fig. 2A.

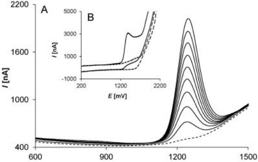


Fig. 2. The concentration dependence of LIN (DPV, $c_{LIN} = 5.0\times10^{-6} - 4.5\times10^{-5}$ M) (A) and the cyclic voltammogram ($c_{LIN} = 1.0\times10^{-4}$ M) (B) obtained on commercial BDDE.

CV and DPV were performed to characterize LM-BDDEs in the presence of $Fe(CN_6)^{3-}/Fe(CN_6)^{4-}$ as a redox probe. After that the voltammetric behavior of LIN was studied using LM-BDDEs which differed in the procedure of preparation, the ratio of CH_4/H_2 (0.5 %, 1 %, 2 %) in the gas mixture, and in the boron-doping level (0 – 20 000 ppm B/C). At third the cycle of cyclic voltammograms were measured the peak heights (I_p) and compared with ratio of B/C in gas phase. The same experiment was performed for DPV and the dependence is shown in Fig. 3. Highlighted points represent electrodes which were chosen, due to the highest signal of LIN recorded on them, for the further measurements. DPV with optimized parameters was used for further measurements on model solutions and various statistical parameters including the linear dynamic ranges (LDR), the relative standard deviations of repeated measurements ($RSD_M(11)$), relative standard deviations of repeated determinations for various concentration levels ($RSD_D(5)$) and limits of detection (LOD), were calculated and they are summarized in Table I.

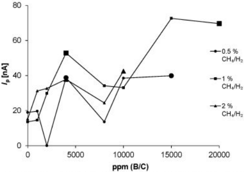


Fig. 3. The dependence between peak heights and boron-doping level for the LM-BDD sensors.

Table I.
Statistical parameters of LIN voltammetric determination obtained on LM-BDDEs and on commercial BDDE.

CH_4/H_2 [%]	B/C [ppm]	LDR [M]	$RSD_M(11)$ [%]	$RSD_D(5)$ [%]	LOD [M]
0.5 %	4000	$5\times10^{-7} - 8\times10^{-5}$	1.21	<1.3	1.50×10^{-7}
	15000	$2.5\times10^{-7} - 2\times10^{-4}$	1.08	<5.4	5.33×10^{-8}
1 %	4000	$5\times10^{-7} - 1.2\times10^{-4}$	2.67	<0.9	1.15×10^{-7}
	20000	$5\times10^{-7} - 1.6\times10^{-4}$	0.15	<0.9	7.91×10^{-8}
2 %	4000	$1\times10^{-7} - 1.6\times10^{-4}$	0.41	<0.4	8.81×10^{-9}
	10000	$2.5\times10^{-7} - 1.6\times10^{-4}$	1.17	<0.6	2.88×10^{-8}
Commercial BDDE	1000	$5\times10^{-7} - 1.2\times10^{-4}$	0.84	<1.5	1.41×10^{-7}

Conclusion

The voltammetric behavior of herbicide LIN on commercial BDDE and on lab-made sensors based on boron-doped diamond was investigated. CV and EIS were performed to characterize LM-BDDEs in the presence of $Fe(CN_6)^{3-}/Fe(CN_6)^{4-}$ as a redox probe. Optimized parameters of DPV were used for determination of LIN on BDDE as well as on LM-BDDEs and it can be concluded, that lab-made sensors can be very sensitive and it is very important to optimize the procedure of their preparing for the obtaining of the best electrochemical properties.

Acknowledgement

This work was supported by the University of Pardubice (project No. SGSFChT_2015006) and by The Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project No. CZ.1.07/2.3.00/30.0021) and by the grants of Slovak National Grant Agency No. 1/0785/14, Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-0365-12.

References

1. http://envirocancer.cornell.edu/turf/pdf/linuron_fs.pdf, Downloaded March 19st, 2015.
2. http://www.epa.gov/oppfead1/endanger/litstatus/effects/linuron-analy.pdf, Downloaded March 19st, 2015.
3. http://extoxnet.orst.edu/pips/linuron.htm, Downloaded March 19st, 2015.
4. Figueiredo-Filho L. C. S., Sartori E. R., Fatibello-Filho O.: Anal. Methods *7*, 643 (2015).
5. Lima F, Gozzi F., Fiorucci A. R., Cardoso C. A. L., Arruda G. J., Ferreira V. S.: Talanta *83*, 1763 (2011).
6. Đorđevic´ J., Papp Z., Guzsvány V., Švancara I., Trtić-Petrović T., Purenović M., Vytřas K.: Sensors *12*, 148 (2012).
7. Musilová J, Barek J., Pecková K.: Chem. Listy *103*, 469 (2009).
8. Ashcheulov P., Šebera J., Kovalenko A., Petrák V., Fendrych F., Nesládek M., Taylor A., Vlčková Živcová Z., Frank O., Kavan L., Dračínský M., Hubík P., Vacík J., Kraus I., Kratochvílová I.: Eur. Phys. J. B *86*, 443 (2013).
9. Pecková K., Musilová J., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. *39*, 148 (2009).
10. Bandžuchová L., Šelešovská R., Švorc Ľ., Chýlková J., *Collection of Conference Proceedings International Conference: Modern Electrochemical Methods XXXIV (Moderní Elektrochemické Metody), Jetřichovice, May 19th-May 23rd, 2014,* Book of Abstracts (Navrátil T., Fojta M. and Pecková K., ed.). p. 9.
11. Hachami F., Errami M., Bazzi Lh., Salghi R., Hilali M., Bazzi L.: J. Mater. Environ. Sci. *5*, 1516 (2014).
12. Codognoto L., Tanimoto S. T., Pedrosa V. A., Suffredini H. B., Machado S. A. S., Avaca L. A.: Electroanalysis *18*, 253 (2006).
13. Švorc Ľ., Svitková J., Tomčík P., Rievaj M., Bustin D.: *Collection of Conference Proceedings International Conference: Modern Electrochemical Methods XXXII (Moderní elektrochemické metody), Jetřichovice, May 21st-May 25th, 2012,* Book of Abstracts (Navrátil T., Fojta M., ed.). p. 138.
14. Sochr J., Švorc Ľ., Rievaj M., Bustin D., Labuda J.: *Collection of Conference Proceedings International Conference: Modern Electrochemical Methods XXXIII (Moderní elektrochemické metody), Jetřichovice, May 20th-May 24th, 2013,* Book of Abstracts (Navrátil T., Fojta M. and Pecková K., ed.). p. 182.
15. Iniesta J., Michaud P. A., Panizza M., Cerisola G., Aldaz A., Comninellis C.: Electrochim. Acta *46*, 3573 (2001).
16. Bandžuchová L., Švorc Ľ., Vojs M., Marton M., Michniak P., Chýlková J.: Intern. J. Environ. Anal. Chem. *94*, 943 (2014).

The Effect of Boron Doping Levels on the Surface Functionalization of Diamond Electrodes. Electrochemical Grafting of Aryldiazonium Salts and DNA Hybridization Efficiency

Ľubomír Švorc [a], Daliborka Jambrec [b], Marian Vojs [c], Stefan Barwe [b], Jan Clausmeyer [b], Pavol Michniak [c], Marián Marton [c], and Wolfgang Schuhmann [b]

[a] Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Chemical and Food Technology, Institute of Analytical Chemistry, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic, E-mail: lubomir.svorc@stuba.sk

[b] Ruhr-Universität Bochum, Analytical Chemistry - Center for Electrochemical Sciences (CES), Universitätsstrasse 150, 44780 Bochum, Germany

[c] 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 impact of different doping levels of boron-doped diamond on the surface functionalization by means of electrochemical reduction of aryldiazonium salts was investigated. The grafting efficiency of 4-nitrophenyl groups increased with the boron levels (B/C ratio from 0 to 20000 ppm). The controlled grafting of nitrophenyldiazonium was used to control the amount of immobilized single-stranded DNA strands at the surface and further on the hybridization yield in dependence on the boron doping level. The grafted nitro functions were electrochemically reduced to the amine moieties. Subsequent functionalization with a succinic acid introduced carboxyl groups for subsequent binding of an amino-terminated DNA probe. DNA hybridization significantly depends on the probe density which is in turn dependent on the boron doping level. The proposed approach opens new insights for the design and control of doped diamond surface functionalization for the construction of DNA hybridization assays.

Key words: diamond electrode, boron doping level, surface functionalization, electrochemical grafting, DNA hybridization.

Introduction

Conductive diamond film has emerged as a possible candidate for an ideal platform material for biosensors and biointerfaces. Its exceptional hardness, high chemical stability, excellent mechanical properties as well as inherent bioinertness and biocompatibility makes it favorable alternative to established materials. In particular, boron-doped diamond (BDD) has received particular interest owing to its superior electrochemical properties such as large working potential window in aqueous solutions, low and stable background current and negligible surface fouling [1-3]. These properties, in combination with its carbon nature, make BDD a material of choice for interfacing biomolecular entities. However, the electronic properties of BDD electrodes are dependent on a range of factors such as dopant concentration, structural defects in the diamond film, surface termination, non-diamond carbon impurity content (e.g. sp^2 inclusions) and crystallographic orientation [4,5]. The chemical inertness of as-grown BDD films prevents the direct biomolecule immobilization to the surfaces. Hence, the BDD surface functionalization is required to provide the suitable reactive groups (e.g. amino, thiol or carboxylic groups) for the further covalent attachment of biomolecule. Electrochemical functionalization using diazonium salts has been proved to be an efficient approach since it provides versatile functionality, high stability and good flexibility in regards to tethered substituents[6]. The degree of surface functionalization can be controlled by varying the measurement conditions, namely, the grafting potential, the modifier concentration, the nature of the modifiers and the intrinsic properties of the substrate itself.

Surface termination and doping level of doped diamond films affect the electronic properties (energy barriers) and depletion layer width at the solid/electrolyte interface, respectively. By tuning these parameters, the efficiency of surface functionalization of diamond electrodes could be effectively controlled. Concerning the BDD, no systematic studies exploring the effect of boron doping levels on electrochemical grafting of aryldiazonium salts and biomolecule sensing efficiency have been made until now. Therefore, we introduce here a strategy for tuning of the surface functionalization of BDD electrodes based on the variation of their boron doping level. We investigated the effect of the boron doping level on the electrochemical grafting of aryldiazonium salts, the related density of immobilized single-stranded DNA capture probes and the influence on the yield of complementary DNA hybridization.

Experimental

Electrochemical measurements were performed in a single compartment glass cell using AUTOLAB PGSTAT 302N (Metrohm Autolab B.V., The Netherlands) potentiostat controlled by NOVA 1.10 software. A standard three-electrode system was set up with Ag/AgCl/3 M KCl as the reference electrode and Pt wire as the auxiliary electrode, respectively. Bare BDD (with a constant geometric area of 0.43 mm^2) and modified BDD electrodes with different boron doping levels (B/C ratio varied from 0 to 20000 ppm) were separately applied as the working electrodes.

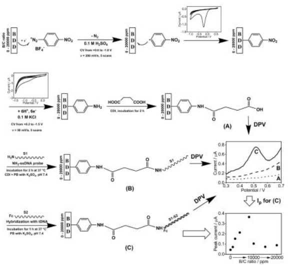
4-nitrophenyldiazonium tetrafluoroborate was prepared according to the known procedure [3]. Sulphuric acid, potassium chloride and phosphate buffer (PB, pH 7.4) were used as supporting electrolytes. Succinic acid and 1,1′-carbonyldiimidazole (CDI, activator) were bought from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). DNA oligonucleotides with an *Escherichia coli* E447 strain sequence complementary to a hypervariable region of S16 RNA were purchased from FRIZ Biochem (Neuried, Germany). The sequences of the immobilized single-stranded DNA (NH_2-ssDNA; S1) capture probe was 5'-GT CAA TGA GCA AAG GTA TTA ACT TTA CTC CCT TCC TCC TTTTTTT NH_2 (C6) and the ferrocene-labelled target DNA strand (S2, fully complementary to S1) was 5'-$(Fc)_4$GGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGAC). The oligonucleotides were dissolved in PB (pH 7.4) and kept frozen.

Prior to use, the respective bare or modified BDD electrodes were sequentially pretreated by thorough rinsing with ultrapure water, 5 min soak in methanol, followed by another thorough rinsing with ultrapure water, and finally blown dry using argon gas. Afterwards electrochemical cleaning of bare BDD electrodes was performed by applying +2.5 V during 180 s in 0.5 M H_2SO_4. Following this step, bare BDD electrodes were cathodically pretreated by applying -2.5 V during 300 s to obtain hydrogen terminated surface. All electrochemical experiments were carried out after deaeration of particular solution in cell by purging with argon gas for 15 min. The electrochemical grafting of aryldiazonium salt and following conversion of attached substituents were investigated using cyclic voltammetry (CV). Differential pulse voltammetry (DPV) with pulse height of 50 mV, pulse time of 50 ms and scan rate of 10 mV/s was employed for the DNA hybridization assay.

For the DNA probe (S1) immobilization, the carboxyl-modified BDD electrodes were immersed in 10 mM PB (pH 7.4) containing 450 mM K_2SO_4 and 1 μM DNA probe and stored in the thermo-mixer (HTC BioTech, Ditabis, Germany) for 2 h at 37 °C. Subsequently, electrodes were rinsed with the same buffer solution (excluding DNA) to remove non-specifically bound DNA. The S1 modified electrodes were thus obtained (S1/COOH-BDD). For the hybridization S1/COOH-BDD electrodes were incubated in the same buffer solution containing 1 μM target ferrocene labelled DNA (S2) for 1 h at 37 °C. Afterwards the electrodes were rinsed with the buffer solution and denoted as S1-S2/COOH-BDD.

Results and Discussion

A general strategy for the preparation of surface functionalized BDD electrodes with different doping levels and their further application is displayed in Scheme 1.



Scheme 1. Schematic diagram of the preparation of different surface functionalized BDD electrodes with various boron doping levels for assessment of DNA hybridization efficiency. **A)** COOH-BDD electrodes; **B)** DNA probe modified BDD electrodes (S1/COOH-BDD); **C)** double stranded DNA (with Fc label) modified BDD electrodes (S1-S2/COOH-BDD).

4-Nitrophenyldiazonium tetrafluoroborate in 0.1 M H_2SO_4 was reduced at BDD electrodes by means of CV. Fig. 1 displays the cathodic peaks in the first scan attributed to the electro-chemical grafting of 4-nitrophenyl groups. In consecutive scans the reduction currents decrease remarkably due to the increasing surface passivation of BDD electrodes by additional 4-nitrophenyl functionalities (not shown). It can be supposed that the generated 4-nitrophenyl radicals react with BDD surfaces under formation of C-C bonds. When considering the reduction peak currents and peak area, a substantial increase is observed with increasing boron doping level. The improvement of charge transfer with increasing boron doping level results in an improved attachment of 4-nitrophenyl moieties at the BDD electrode surface as expected due to the increase in the specific conductivity. To evaluate the electrochemical blocking properties of the grafted 4-nitrophenyl groups, CVs of BDD electrodes before and after grafting of 4-nitrophenyl groups were recorded in 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ in 0.1 M KCl (not shown). BDD electrodes exhibit well defined peaks with a significant improvement of the reversibility degree with the doping level. After electrochemical grafting a rapid decay of the peak currents appears indicating a strong suppression of the electron transfer of the redox couple. This confirms the effective grafting of 4-nitrophenyl functionalities creating an efficient barrier to the redox couple from approaching the BDD electrode surface.

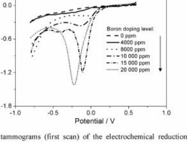


Fig. 1. Cyclic voltammograms (first scan) of the electrochemical reduction of 1 mM 4-nitrophenyldiazonium tetrafluoroborate in 0.1 M H_2SO_4 at a scan rate of 200 mV/s for BDD electrodes with different boron doping levels.

The BDD surface-tethered 4-nitrophenyl functionalities were converted to 4-aminophenyl groups by electrochemical reduction using CV in 0.1 M KCl. Broad cathodic peaks in the first scan with different peak potentials and currents are observed for all BDD electrodes (not shown), representing the electrochemical reduction of 4-nitrophenyl to 4-aminophenyl. The peak currents of highly doped BDD surfaces are higher as compared to those with a low doping level. This is in accordance with the previously mentioned smaller charge consumed during the electrochemical conversion of 4-nitrophenyl to 4-aminophenyl groups and the charge for grafting of the 4-nitrophenyl diazonium cations for lower boron levels. The 4-aminophenyl moieties provide a slightly different blocking efficiency as compared to the 4-nitrophenyl terminated surface. This is supposed to be due to different electrostatic interactions in these two cases. The 4-aminophenyl modified BDD surface remains moderately protonated while the 4-nitrophenyl modified BDD surface possesses a partially negative charge from its resonance structure. This results in an electrostatic attraction or repulsion, respectively, between the charged BDD surfaces and the redox couple. The reaction with succinic acid in the presence of the activator CDI leads to the formation of amide bonds with terminated (mostly activated) carboxyl groups at the surface. The carboxylic moieties exert an electrostatic repulsion for the redox probe which hampers its diffusion to the electrode surface.

After modification with succinic acid we obtained at least partially CDI-activated carboxyl groups at the surface which serve as active sites for the subsequent covalent immobilization of amino-terminated ssDNA probes. DNA target molecules were modified with Fc labels allowing the detection of the hybridization process by DPV. Since the amount of tethered 4-nitrophenyl functionalities at the surface increases with the boron doping level, the amount of free carboxylic groups and therefore ssDNA strands increases as well. At low DNA probe coverage electrostatic repulsion between neighboring DNA strands is minimal and therefore the hybridization efficiency is maximum. However, the Fc oxidation signal is then limited by the low amount of DNA at the surface. With increasing DNA probe coverage the hybridization yield and therefore the Fc signal increases as well. This is observed for boron levels of up to 8000 ppm (Scheme 1). However, for BDD electrodes with a higher doping level, probe DNA coverage and by this the charge density at the surface becomes too high, leading to a significant decrease in the hybridization efficiency and the hybridization yield. This is observed for electrodes with boron levels higher than 8000 ppm.

Conclusions

A novel strategy for the control of surface functionalization of BDD electrodes based on the investigation of the effect of boron doping levels on the electrochemical grafting of aryldiazonium salt was established. It was shown that the grafting efficiency increases with increasing boron doping level, which was assumed due to the increase of the specific conductivity. Amino functionalities introduced by grafting of nitro groups and subsequent electrochemical reduction were used to control the coverage of immobilized DNA probes at the surface. We observed a dependence of the hybridization yield on the boron doping level. Increase of the target DNA signal was observed as the boron doping level increased to 8000 ppm. Using electrodes with a boron doping level higher than 8000 ppm, the hybridization yield decreased presumably due to an enhanced charge density and electrostatic barrier at DNA probe modified BDD surfaces, which led consequently to a decrease of the hybridization yield. Our approach ensures highly stable surface modification typical of covalent grafting on intrinsically inert diamond surfaces but also allows fine tuning of the surface properties. Taken into consideration the results achieved in this study, the proposed protocol paves new ways to diamond-based biosensors.

Acknowledgments

This work was supported by the Grant Agency of the Slovak Republic (grant Nos. 1/0051/13 and 1/0361/14) and the Slovak Research and Development Agency under the Contract Nos. APVV-0797-11 and APVV-0365-12. Financial support for Ľubomír Švorc by the German Academic Exchange Service (DAAD) is also acknowledged.

References

1. Švorc Ľ., Stanković D. M., Kalcher K.: Diamond Relat. Mater. *42*, 1 (2014).
2. Švorc Ľ., Kalcher K.: Sens. Actuators B *194*, 332 (2014).
3. Sochr J., Švorc Ľ., Rievaj M., Bustin D.: Diamond Relat. Mater. *43*, 5 (2014).
4. Švorc Ľ., Stanković D. M., Mehmeti E., Kalcher K.: Anal. Methods *6*, 4853 (2014).
5. Švorc Ľ., Kalcher K.: Sens. Actuators B *205*, 215 (2014).
6. Pinson J., Podvorica F.: Chem. Soc. Rev. *34*, 429 (2005).

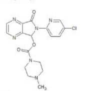
Electrochemical Oxidation of Zopiclone and Identification of its Oxidation Products (Elektrochemická oxidace zopiklonu a identifikace jeho oxidačních produktů)

Jakub Táborský, Ondřej Kurka, Martin Švidrnoch, Pavla Kučerová, Hana Švecová, Eva Marková, Jitka Součková, and Jana Skopalová
Department of Analytical Chemistry, Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic, E-mail: jana.skopalova@upol.cz

Abstract
Zopiclone is a non-benzodiazepine short-acting hypnotic drug. As a cyclopyrrolone derivative, it belongs to a novel chemical class which is structurally unrelated to existing hypnotics. In present work, electrochemical behaviour of zopiclone was investigated using cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, differential pulse adsorption stripping voltammetry and square wave voltammetry. Oxidation products of zopiclone formed during controlled potential electrolysis were analysed using mass spectrometry in off-line as well as on-line coupling. Two main oxidation products were identified as *N*-desmethyl zopiclone and zopiclone *N*-oxide.

Key words: Zopiclone, oxidation, voltammetry, mass spectrometry.

Úvod
Zopiklon (ZOP, Obr. 1) je nebenzodiazepinové hypnotické léčivo z třídy cyklopyrrolonů určené ke krátkodobé léčbě nespavosti. Působí jako sedativum, anxiolytikum, způsobuje uvolnění svalů a má anestetické a antikonvulzivní účinky. ZOP je chirální léčivo podávané jako racemická směs, nicméně farmakologická aktivita je připisována hlavně (+)-(*S*)-ZOP enantiomeru, který se nazývá eszopiklon [1,2]. Bylo zjištěno, že farmakokinetika ZOP je stereoselektivní po orálním užití [3]. ZOP je metabolizován oxidativní biotransformací enzymy cytochromu P450, konkrétně enzymem CYP3A4. Produkty biotransformace jsou *N*-demethylovaný zopiklon a zopiklon *N*-oxid. Při tvorbě *N*-demethylovaného metabolitu je částečně aktivní také enzym CYP2C8 (cit. [4]).



Obr. 1. Strukturní vzorec zopiklonu

Elektrochemickou redukci ZOP studoval J. C. Viré a kol. [5] K analýze použili metody DC polarografie, cyklickou a diferenčně pulzní voltametrii a square wave polarografii. Yilmaz [6] oxidoval zopiklon na elektrodě ze skelného uhlíku pomocí adsorpční stripping voltametrie. Zopiklon poskytoval ireverzibilní anodický pik okolo potenciálu 1 V v Brittonových-Robinsonových pufrech. Potenciál i proud píku se měnil s aciditou elektrolytu. Dále byl prokázán adsorpční charakter proudové odezvy. V žádné z dosud zveřejněných studií však nebyly popsány produkty elektrochemických reakcí zopiklonu. Identifikace produktů anodické oxidace zopiklonu je cílem této práce.

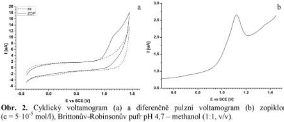
Experimentální část

Cyklická voltametrie (CV), diferenčně pulzní voltametrie (DPV), diferenčně pulzní adsorpční rozpouštěcí voltametrie (DPAdSV) a square wave voltametrie (SWV) byly použity ke studiu elektrochemického chování ZOP. Měření byla prováděna na přístroji Autolab PGSTAT128N v tříelektrodovém zapojení s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku, referentní nasycenou kalomelovou a pomocnou platinovou elektrodou. Elektrolytem byla směs methanolu a Brittonova-Robinsonova pufru o různých hodnotách pH (1:1, v/v).

Analýza oxidačních produktů elektrolýzy ZOP za konstantního potenciálu v offline experimentech i v online spojení průtokové elektrochemické cely s hmotnostním spektrometrem byla provedena na hmotnostním spektrometru Agilent 1100 Series LC/MSD Trap.

Výsledky a diskuse

Cyklický voltamogram zopiklonu (Obr. 2a) poskytuje jediný anodický proudový signál. V opačném směru polarizace ZOP nevykazuje žádnou proudovou odezvu, což svědčí o ireverzibilitě elektrodového děje. Na diferenčně pulzním voltamogramu (Obr. 2b) se objevuje rovněž jeden oxidační pík. Závislost logaritmu proudu CV píku na logaritmu rychlosti polarizace elektrody je lineární v rozsahu 10 – 900 mV/s s hodnotou směrnice regresní přímky 0,66. To ukazuje na difúzí řízený děj částečně ovlivněný adsorpcí ZOP na povrch elektrody.

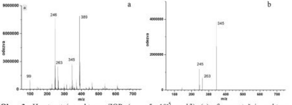


Obr. 2. Cyklický voltamogram (a) a diferenčně pulzní voltamogram (b) zopiklonu ($c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/l), Brittonův-Robinsonův pufr pH 4,7 – methanol (1:1, v/v).

Oxidace ZOP závisí na aciditě základního elektrolytu. S rostoucím pH prostředí se potenciál píku posouval k negativnějším hodnotám v oblasti pH 1,7 – 6,0 se směrnicí -77 mV/pH. Z této směrnice vyplývá, že v uvedeném rozmezí pH je poměr počtu vyměňovaných protonů a elektronů H^+/e^- = 1,3. V neutrální a alkalické oblasti byl posun potenciálu zanedbatelný. Průsečík regresních přímek obou lineárních úseků v hodnotě pH 6,2 odpovídá zdánlivé disociační konstantě ZOP. Hodnota pK_a zopiklonu 6,79 je uváděna v literatuře [7].

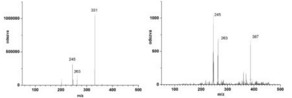
Koncentrační závislost ZOP byla měřena metodou DPAdSV. Mez detekce vypočtená z parametrů regresní kalibrační přímky měla hodnotu $2,2 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

Analýza standardu ZOP hmotnostním spektrometrem (Obr. 3a) ukázala pík protonizované molekuly s hodnotou m/z 389. Izolací a fragmentací tohoto iontu (Obr. 3b) bylo získáno fragmentační spektrum s ionty m/z 345, 263 a 245. Toto spektrum odpovídá spektru uváděnému v literatuře [8].



Obr. 3. Hmotnostní spektrum ZOP (c = 5 · 10^{-5} mol/l) (a), fragmentační spektrum izolovaného iontu m/z 389 (b)

MS analýzou roztoků zopiklonu elektrolyzovaných při různých potenciálech a různém pH byl nalezen oxidační produkt P1 s molekulárním iontem $[M+H]^+$ m/z 375, který byl identifikován jako *N*-demethylovaný zopiklon. Z analýzy hmotnostních voltamogramů pořízených v online spojení elektrochemické průtokové cely a hmotnostního spektrometru byl nalezen a identifikován oxidační produkt P2 s molekulárním iontem $[M+H]^+$ m/z 405, zopiklon *N*-oxid. Fragmentační spektra obou produktů jsou na obrázku 4a, respektive 4b.



Obr. 4. Fragmentační spektrum *N*-demethylovaného zopiklonu (a), *N*-oxidu zopiklonu (b).

Závěr

Voltametrické experimenty ukázaly, že zopiklon podléhá v širokém rozmezí pH ireversibilní anodické oxidaci kontrolované adsorpčně-difúzním mechanismem. Hmotnostně spektrometrickou analýzou produktů elektrochemické oxidace zopiklonu byly nalezeny dva oxidační produkty, *N*-demethylovaný zopiklon a zopiklon *N*-oxid. Výsledky této práce dokumentují podobnost mezi elektrochemickou oxidací a *in vitro* oxidací zopiklonu enzymy cytochromu P450.

Poděkování
Tato práce vznikla s podporou projektů MŠMT ČR (LO1305), Operačního programu Vzdělávání pro konkurenceschopnost – ESF (CZ.1.07/2.3.00/30.0041), Univerzity Palackého v Olomouci (IGA_PrF_2015_020) a GAČR (P206/12/1150).

Literatura
1. Tonon M. A., Jabor V. A. P., Bonato P. S.: Anal. Bioanal. Chem. *400*, 3517 (2011).
2. Tonon M. A., Bonato P. S.: Electrophoresis *33*, 1606 (2012).
3. Jantos R., Vermeeren A., Sabljic D., Remaekers J. G., Skopp G.: Int. J. Legal Med. *127* 69 (2013).
4. Becquemont L., Mouajjah S., Escaffre O., Beaune P., Funck-Brentano C., Jaillon P.: Drug Metab. Dispos., 27, 1068 (1999).
5. Viré J.-C., Zhang H., Quarin G., Patriarche G.J.: Talanta *40* 313 (1993).
6. Yilmaz S.: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces *71*, 79 (2009).
7. https://www.drugbank.com, Downloaded April 16, 2015.
8. Smyth W. F., Joyce C., Ramachandran V. N., O'Kane E., Coulter D.: Anal. Chim. Acta *506*, 203 (2004).

Determination of Hindered Phenolic Antioxidant in Oils Using Linear Sweep Voltammetry with a Gold Disc Electrode
(Stanovení fenolického antioxidantu v olejích pomocí LSV a zlaté diskové elektrody)

Markéta Tomášková [a], Jaromíra Chýlková [a], Tomáš Mikysek [b], and Vladimír Jehlička [c]
[a] University of Pardubice, Faculty Chemical Technology, Institute of Environmental and Chemical Engineering, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic,
E-mail: Marketa.Tomaskova@upce.cz
[b] University of Pardubice, Faculty Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic
[c] University of Pardubice, Jan Perner Transport Faculty, Department of Informatics in Transport, Studentská 95, 532 10 Pardubice, Czech Republic

Abstract
The method of voltammetric determination of hindered phenolic antioxidant using linear sweep voltammetry with gold working electrode was developed. Different supporting electrolytes were studied for the development of this methodology. The developed method was purposed for determination of antioxidant 4,4´-methylenebis(2,6-di-tert-butylphenol) in base oil. The model samples of base oil were extracted using ethanol. The electroanalytical method developed has enabled the determination of antioxidants in model and real samples with satisfactory results and good prospects for practical analysis.

Key words: Antioxidant, Oil, Voltammetry, Gold disc electrode.

Úvod

Oleje významně ovlivňují nejen spolehlivost a životnost mazacího systému, ale i ekonomickou stránku provozu. Ekonomický pohled na používání oleje není jen v jeho pořizovací ceně, ale také ve výměnných intervalech. Časté výměny oleje vedou ke stavu, kdy se nevyužívá jeho celkových mazacích schopností – a naopak při intervalech výměny delších, než je životnost oleje, může dojít až k závažné poruše či destrukci zařízení. Proto je třeba nalézt optimální lhůtu, po jejímž uplynutí je potřeba mazivo vyměnit. Základním procesem stárnutí oleje v motoru je termooxidace. Ta je ještě doprovázena polymerací, kondenzací, termickým štěpením, odpařováním složek oleje atd. Jedním ze znaků oxidace je také tmavnutí oleje. Oxidační zplodiny motorových olejů vedou k tvorbě usazenin na místech, kde je olej v klidu nebo jen v pomalém pohybu, k tvorbě lepkavých kalů a laků na stěnách válce a pístu. Pro zpomalení oxidačních reakcí se do motorových olejů přidávají aditiva, tzv. antioxidanty. Antioxidační účinek vyplývá ze specifické struktury těchto látek [1, 2].

Většina běžně používaných antioxidantů jsou butylované fenoly nebo polyfenoly [3]. Byla publikována celá řada prací zabývajících se jejich analýzou v různých typech vzorků, pouze pár autorů se věnuje problematice stanovení antioxidantů v ropných produktech, nejčastěji v bionaftě [4-7]. V této práci byla pozornost zaměřena na vývoj metody pro stanovení antioxidantu 4,4´-methylenebis(2,6-di-tert-butylphenol), který je používán v motorových olejích a průmyslových mazivech. Jedná se o vysoce efektivní aditivum využívané k potlačení tvorby kyselých a nerozpustných produktů oxidace oleje.

Experimentální část

Všechny použité chemikálie byly analytické čistoty. Standardní roztok antioxidantu 4,4´-methylenebis(2,6-di-tert-butylphenol) (MBP) (4 $g.l^{-1}$) byl připraven rozpuštěním vhodného množství MBP (Sigma Aldrich) v 96%-ním roztoku etanolu. Pro stanovení antioxidantu byl použit základní elektrolyt složený z rozpuštěné kyseliny sírové (Penta) ve směsi s isopropanolem, acetonitrilem nebo ethanolem (vše z firmy Penta). MBP byl stanovován v matrici základového oleje. Modelové vzorky byly připraveny rozpuštěním daného antioxidantu v základovém oleji, který neobsahoval antioxidační přísady. Tyto vzorky oleje musely být extrahovány 96% ethanolem. Navážka 4-5 g modelového vzorku oleje byla společně s ethanolem vložena na 10 min do ultrazvukového pole. Po usazení suspenze byla horní vrstva oddělena, zbavena zbytků oleje a analyzována. Pro odstranění zbytků oleje z extraktu byl použit bezvodý síran sodný (Sigma Aldrich).

Voltametrické analýzy byly realizovány za použití elektrochemického analyzátoru EP 100VA (HSC Servis: Bratislava, Slovensko) v tříelektrodovém uspořádání, které se skládalo ze zlaté diskové elektrody (AuDE, Ø 2 mm, HSC Servis, Bratislava, Slovensko) jako pracovní elektrody, Ag/AgCl/ 3 $mol.l^{-1}$ KCl elektrody jako referentní a platinového drátku (3x5 mm) jako pomocné elektrody.

Výsledky a diskuse

Pro analýzu antioxidantu MBP se ukázalo jako nejvhodnější kyselé prostředí [8, 9]. Dále bylo nutné zajistit rozpustnost analyzované látky v základním elektrolytu přítomností vhodného organického rozpouštědla. Pro tyto účely byla využita metoda LSV, aby bylo možné sledovat elektrochemické chování MBP v různých základních elektrolytech. Koncentrace MBP se pohybovala v rozmezí od 12,98 $\mu g.ml^{-1}$ do 101,57 $\mu g.ml^{-1}$. Nejprve bylo testováno stanovení MBP v roztoku obsahujícím 0,2 $mol.l^{-1}$ kyselinu sírovou a isopropanol. V prostředí tohoto elektrolytu byly získány píky anodické oxidace při potenciálech od 1,0 V do 1,55 V, které byly ale velmi špatně vykreslené a jejich vyhodnocení nebylo možné (obr. není prezentován). Dalším organickým rozpouštědlem byl acetonitril. V tomto případě křivka pozadí (základního elektrolytu) výrazně ovlivňovala tvar voltametrických křivek antioxidantu. Pro správné vyhodnocení bylo tedy nutné odečíst od záznamu křivku základního elektrolytu. Po tomto odečtu byly získány jasně rozlišitelné píky. Dále bylo zjištěno, že v tomto případě je závislost $I=f(c)$ nelineární. Z toho důvodu byl jako další rozpouštědlo studován ethanol. Byla zde pozorována obdobná situace jako při použití acetonitrilu a po odečtení základní linie byla také zjištěna nelineární závislost výšky píku na koncentraci analyzovaného antioxidantu.

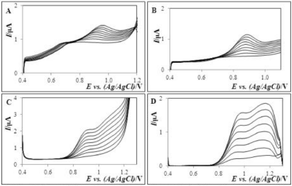
Antioxidant MBP je velmi dobře rozpustný v toluenu a dobře rozpustný v ethanolu a z tohoto důvodu byl studován vliv množství toluenu na píky anodické oxidace MBP v základním elektrolytu obsahujícím ethanol a kyselinu sírovou. Pro další měření bylo zvoleno malé množství kyseliny o koncentraci 0,05 $mol.l^{-1}$, protože je tento antioxidant nerozpustný ve vodě a větší množství vodného roztoku kyseliny (1:1, V/V) snižovalo jeho rozpustnost. Dále bylo zjištěno, že jen nepatrný přídavek toluenu zajistí lineární odezvu výšky píku na koncentraci, ale se zvyšujícím množstvím se posouvá křivka základního elektrolytu směrem k nižším potenciálům, a proto i k vzhledem k výše uvedeným informacím byl pro další studie vybrán jako základní elektrolyt H_2SO_4 o koncentraci 0,05 $mol.l^{-1}$ obsahující ethanol a 1 ml toluenu.

V této práci bylo stanovení antioxidantu MBP testováno pomocí různých voltametrických metod. Koncentrace MBP se pohybovala v rozmezí od 13,24 $\mu g.ml^{-1}$ do 103,54 $\mu g.ml^{-1}$. První metodou použitou pro stanovení MBP byla square wave voltametrie (SWV) (Obr. 1A), obrázek 1B dokumentuje křivky anodické oxidace MBP získané s využitím diferenční pulzní voltametrie (DPV). Další metodou pak byla lineární voltametrie (LSV) prezentovaná obrázkem 1C. Bylo zjištěno, že LSV je citlivější, než DPV nebo SWV, ale poskytuje hůře definované píky. Oproti tomu u metod DPV a SWV se projevila nelineární závislost výšky píku na koncentraci a proto byla vybrána metoda LSV. Problém s hůře definovanými píky byl vyřešen odečtením křivky základního elektrolytu. Obr. 1D dokumentuje příslušné píky po této úpravě. V tabulce I jsou uvedeny příslušná hodnoty LOD a LOQ pro jednotlivé metody.

Tabulka I.
Výsledné hodnoty meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) při stanovení MBP za použití různých voltametrických metod.

Voltametrická metoda	LOD [μg.ml^{-1}]	LOQ [μg.ml^{-1}]
LSV	0,94	3,13
SWV	9,04	30,14
DPV	5,46	18,19

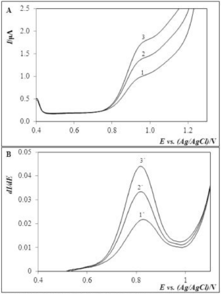
Z tabulky je patrné, že nejnižší hodnoty byly získány právě pro LSV.



Obr. 1. Křivky anodické oxidace MBP získané pomocí různých voltametrických technik. Exp. pod.: základní elektrolyt: 0,05 mol.l^{-1} H_2SO_4, ethanol a 1 ml toluenu; koncentrační rozsah MBP: od 13,24 μg.ml^{-1} do 103,54 μg.ml^{-1}; rychlost nárůstu potenciálu 40 mV.s^{-1}; E_{IN}: +0,4 V, E_{FIN}: +1,3 V; (a) SWV (b) DPV (c) LSV (d) stejné jako (c), ale po odečtení křivky základního elektrolytu.

Z obrázku 1D je vidět, že výška píku je lineárně závislá na koncentraci, což potvrdily i výsledky statistického zpracování. Byla získána závislost ve tvaru $h = (0{,}015)c+0{,}011$ (kde h je v μA a c v μg.ml^{-1}). Standardní odchylka pro směrnici byla 7,13.10^{-5} μg.ml^{-1} a pro úsek 4,69.10^{-3} μg.ml^{-1}. Hodnoty LOD a LOQ jsou již uvedeny v tabulce 1. Přesnost a správnost stanovení byla testována opakovaným stanovením ($n = 10$) modelového vzorku o koncentraci 13,24 μg.ml^{-1}. Získané výsledky ukázaly, že chyba stanovené nepřesáhla ±10%. Průměrná stanovená hodnota (13,31 μg.ml^{-1}) se nacházela v 95%-ním intervalu spolehlivosti a od reálné hodnoty se lišila o +0,5 %. Směrodatná odchylka byla 0,643 μg.ml^{-1}.

Jelikož je antioxidant MBP používán k prevenci oxidační degradace olejů, bylo testováno stanovení této látky v modelových vzorcích oleje. Při analýze MBP v extraktu oleje se odezva prakticky neliší od stanovení antioxidantu v samotném základním elektrolytu. Tudíž, je možné konstatovat, že se zde neobjevují žádné interference z matrice extraktu oleje. Příklad voltametrického stanovení antioxidantu v extraktu modelového vzorku oleje je uveden na obr. 2A. Křivka 1 reprezentuje vzorek, křivky 2 a 3 pak přídavky standardního roztoku MBP. Pro přesné určení vrcholu píku, který je u nižších koncentrací hůře stanovitelný, je možné využít derivovaný záznam, který je dokumentován na obr. 2B. Získané výsledky analýz modelových vzorků základového oleje jsou shrnuty v tabulce II.



Obr. 2. Křivky anodická oxidace MBP v extraktu modelového vzorku oleje. Exp. pod.: LSV, zákl. elektrolyt: 0,05 mol.l^{-1} H_2SO_4 obsahující ethanol a 1 ml toluenu; E_{IN}: +0,7 V, E_{FIN}: +1,6 V; rychlost nárůstu potenciálu 40 mV.s^{-1}; (a) křivka 1 - c_{MBP}: 0,72 g.kg^{-1}; křivky 2, 3 – přídavky standardního roztoku MBP (c= 27,26 μg.ml^{-1}); (b) křivky 1´, 2´ a 3´ - křivky 1, 2 a 3 po matematické úpravě (derivaci).

Tabulka II.
VÝSLEDKY ANALÝZ MODELOVÝCH VZORKŮ OLEJE.

Vzorek	Stanovováno [$g.kg^{-1}$]	Stanoveno [$g.kg^{-1}$]	Chyba stanovení [%]	Relativní směrodatná odchylka [%]
		4,556	-3,1	0,195
0,50%	4,64	4,578	-1,3	0,231
		4,400	-5,2	0,178
		0,717	-6,8	0,006
0,10%	0,77	0,757	-1,7	0,025
		0,733	-4,4	0,015

Z tabulky je vidět, že se nijak výrazně neliší experimentálně získané výsledky od deklarovaných koncentrací v modelových vzorcích.

Závěr

V této práci byla navržena a experimentálně odzkoušena metoda pro stanovení fenolického antioxidantu 4,4´-METHYLENEBIS(2,6-DI-TERT-BUTYLPHENOL). Z výsledků práce vyplynulo, že voltmetrické stanovení antioxidantu MBP lze provádět v prostředí organických rozpouštědel – ethanolu a toluenu za přítomnosti 0,05 $mol.l^{-1}$ H_2SO_4 s využitím zlaté indikační elektrody a metody LSV, která je pro analyzované koncentrace dostatečně citlivá. Metodu lze aplikovat na stanovení antioxidantu ve vzorcích olejů s nutností extrakce analytu ze vzorku za použití ethanolu.

Poděkování

Tato práce vznikla s podporou projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR č. CZ.1.07/2.3.00/30.0021 "Posílení excelentních týmů výzkumu a vývoje na Univerzitě Pardubice".

Literatura

1. Rudnick L. R.: Lubricant additives – chemistry and application. Taylor and Francis Group. Florida (USA) 2009.
2. Straka B.: Motorové oleje a tribotechnická diagnostika naftových motorů. Nakladatelství dopravy a spojů. Praha 1986.
3. Mukhopadhyay A. K.: Antioxidants – Natural and synthetic. Amani International Publishers. Kiel (Germany) 2006.
4. Goulart L. A., Teixeira A. R. L., Ramalho D. A., Terezo A. J., Castilho M.: Fuel *115*, 126 (2014).
5. Caramit R. P., Freitas A. G. A., Souza J. B. G., Araujo T. A., Viana L. H., Trindade M. A. G., Ferreira V. S.: Fuel *105*, 306 (2013).
6. Tormin T. F., Gimenes D. T., Richter E. M., Munos R. A. A.: Talanta *85*, 1274 (2011).
7. Araujo T. A., Barbosa A. M. J., Viana L. H., Ferreira V. S.: Fuel *90*, 707 (2010).
8. Tomášková M., Chýlková J., Navrátil T., Šelešovská R.: Energy and Fuels *28*, 4731 (2014).
9. Tomášková M., Chýlková J., Jehlička V., Navrátil T., Švancara I., Šelešovská R.: Fuel *123*, 107 (2014).

On-line Sample Manipulation in Capillary During Electrophoretic Separation
(On-line manipulace se vzorkem v kapiláře v průběhu elektroforetické separace)

Petr Tůma [a] and Jan Gojda [b]

[a] Charles University in Prague, Third Faculty of Medicine, Institute of Biochemistry, Cell and Molecular Biology, Ruská 87, CZ-100 00 Prague 10, Czech Republic,
E-mail: petr.tuma@lf3.cuni.cz

[b] Centre for research on diabetes, metabolism and nutrition; 2nd Internal Department of Third Faculty of Medicine and Faculty Hospital Královské Vinohrady, Charles University in Prague, Šrobárova 50, 100 34 Prague 10, Czech Republic

Abstract

Hydrodynamic pressure is applied together with high voltage to achieve rapid capillary electrophoretic separation of amino acids. Moreover pressure is used to force the undesirable solvent from the sample zone out of the capillary. Determination of the branched-chain amino acids (BCAAs) valine, isoleucine, and leucine in human blood plasma is completed by capillary electrophoresis (CE) with contactless conductivity detection in optimized background electrolyte 3.2 M acetic acid in 20% *v/v* methanol, pH 2.0. The achieved separation time was 125 s when using a capillary with an effective length of 14.7 cm, electric field intensity of 0.96 kV/cm and simultaneous application of a hydrodynamic pressure of 50 mbar. It followed from the performed tests that the plasmatic levels of BCAAs attain a maximum 60 minutes after intravenous application of an infusion of BCAAs.

Key words: Branched-chain amino acids, Capillary electrophoresis, Contactless conductivity detection, Pressure assisted capillary electrophoresis.

Úvod

Aminokyseliny s větveným postranním řetězcem (branched chain amino acids, BCAAs): valin (Val), isoleucin (Ile) a leucin (Leu), se řadí mezi 9 pro člověka esenciálních proteinogenních aminokyselin. BCAAs jsou zastoupeny zejména v proteinech kosterního svalstva, kde představují až 35% z esenciálních AAs. Vedle strukturální funkce mají volné BCAAs celou řadu dalších efektů na intermediární metabolismus, hormonální regulace, růst a proteinovou bilanci [1]. Pro svoje anabolické efekty je suplementace BCAAs již dlouho užívána ve sportovní medicíně. Empirická data ukazují účinky na oddálení svalové únavy a urychlení rekonvalescence po výkonu. Obdobně je suplementace BCAA v klinické praxi užívána u pacientů trpících úbytkem kosterního svalstva, ať již na podkladě nádorového onemocnění či vysokého věku [2].

Tento rostoucí zájem o studium klinických účinků BCAAs vyžaduje monitorování jejich plasmatických hladin v dlouhých časových intervalech. To klade vysoké požadavky na provádění rychlých analýz rozsáhlých souborů klinických vzorků. Potřeba současného stanovení tří strukturně velmi podobných látek, Val, Ile, Leu, v komplexní matrici jakou je krevní plasma, se obvykle neobejde bez použití vysokoúčinné separační techniky. Vedle hojně užívaných metod GC a HPLC, lze pro rychlé monitorování aminokyselin v tělesných tekutinách použít i kapilární elektroforézu (CE) [3].

Velkou předností při CE stanovení aminokyselin (AAs) [4] a dalších neabsorbujících látek jako jsou sacharidy, biogenní aminy, organické kyseliny, léčiva, atd.; je použití bezkontaktní vodivostní detekce (C^4D) [5]. Elektrochemická detekce založená na principu C^4D je univerzální detekční technikou, pro kterou není potřeba provádět derivatizaci biogenních látek a tyto látky se detegují ve své nativní formě. Dalším krokem pro urychlení CE analýzy je provádění separace na krátké separační dráze [6]. K tomu lze použít mikročipy, laboratorně sestavená zařízení s krátkými kapilárami [7] nebo techniku short-end-injection [8] známou z komerčních přístrojů.

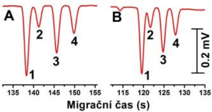
Experimentální část

Veškerá elektroforetická měření byla provedena na elektroforetickém přístroji HP^{3D}CE systém (Agilent Technologies, Waldbronn Germany) vybaveným bezkontaktním vodivostním detektorem (C^{4}D), který je zabudován do elektroforetické kazety a termostatován na 25°C. C^{4}D, se dvěma 2,5 mm dlouhými tubulárními elektrodami od sebe vzdálenými 1,2 mm, pracuje se střídavým sinusovým signálem o frekvenci 1,8 MHz a efektivní hodnotou napětí 50 V. Detektor byl vyvinut na Katedře fyzikální chemie Univerzity Karlovy v Praze [9] a v současnosti je komerčně dostupný (www.hpst.cz).

Separace aminokyselin s větveným postranním řetězcem byly provedeny v křemenné kapiláře o délce 31,5 cm, délka k C^{4}D 14,7 cm, vnitřní průměr 25 µm, vnější průměr 360 µm; vnitřní stěna kapiláry byla před prvním použitím pokryta INST pokrývacím roztokem (Biotaq, U.S.A.) pro potlačení elektroosmotického toku (EOF) [10]. Separace aminokyselin byly provedeny v optimalizovaném základním elektrolytu se složením 3,2 M kyselina octová v 20% v/v methanolu, pH 2,0. Vzorky krevní plasmy získané od zdravých dobrovolníků byly před CE stanovením upraveny přídavkem acetonitrilu; 250 µL vzorku plasmy bylo deproteinizováno přídavkem 750 µL acetonitrilu, po 30 s protřepání byl vzorek v Ependorfce centrifugován silou 4 × *g* po dobu 45 s a supernatant byl následně použit k CE analýze. Vzorek byl dávkován do kapiláry tlakem 50 mbar po dobu 16 s.

Výsledky a diskuse

Pro dosažení minimální doby separace v CE je potřebné zkracovat separační dráhu a zvyšovat intenzitu separačního napětí. Z tohoto důvodu byla použita minimální délka kapiláry a vzorek byl dávkován do jejího krátkého konce, výsledkem je efektivní délka kapiláry 14,7 cm a intenzita pole 0,96 kV/cm při aplikaci maximálního napětí přístroje +30 kV. Za těchto podmínek jsou migrační časy BCAA kolem 140 s, počet separačních pater kolem 500000 m^{-1} a rozlišení kritického páru Val/Ile 1,42. Dalším krokem pro zkrácení migračního času je zrychlení pohybu analytu v kapiláře pomocí současné aplikace hydrodynamického tlaku používaného v mikrofluidice ; maximální použitelný tlak přístroje je 50 mbar. Tím se podařilo zkrátit migrační čas o dalších 16% až na cca 120 s. Počet teoretických pater se mírně snížil na cca 450000 m^{-1} a rozlišení kritického páru Val/Ile je 1,14. Tlak tak v kapilárách s malým *id* výrazně nepřispívá k dodatečnému rozmývání zón vlivem parabolického rychlostního profilu často popisovaného v literatuře. Navíc zjištěná opakovatelnost migračního času pro deset po sobě následujících analýz jednoho modelového vzorku je 0,1 % při aplikaci tlaku i bez tlaku.

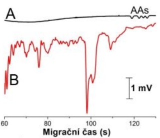


Obr. 1. CE separace aminokyselin s větveným postranním řetězcem v krevní plasmě řízená: A – napětím +30 kV; B – napětím +30 kV a tlakem 50 mbar. Experimentální podmínky v textu.

Tabulka I.
Srovnání migračního času, separační účinnosti, rozlišení, výšky piku pro klasickou CE a tlakem řízenou CE separaci modelového vzorku aminokyselin o koncentraci 10 μM. Současně jsou uvedeny i parametry kalibračních závislostí a LOD.

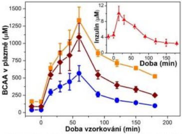
Separace řízená pouze napětím +30 kV			
	Val	**Ile**	**Leu**
Čas, s	137,5 (0.2)	140,3 (0,2)	144,8 (0,1)
$N \times 10^3$, m^{-1}	518 (11)	509 (17)	508 (13)
Rozlišení	1,42 (Val/Ile)	2,14 (Ile/Leu)	1,83 (Leu/Ser)
Výška piku, mV	0,12 (0,00)	0,10 (0,00)	0,09 (0,00)
Separace řízená napětím +30 kV a tlakem 50 mbar			
Čas, s	118,7 (0,2)	120,8 (0,2)	124,0 (0,2)
$N \times 10^3$, m^{-1}	465 (11)	454 (7)	454 (8)
Rozlišení	1,14 (Val/Ile)	1,69 (Ile/Leu)	1,45 (Leu/Ser)
Výška piku, mV	0,10 (0,00)	0,09 (0,00)	0,08 (0,00)
Kalibrace			
Rozmezí, μM	5 - 100	5 - 100	5 - 100
Citlivost, μV.s. μM^{-1}	8,7 (0,1)	9,9 (0,1)	9,5 (0,1)
Úsek, μV.s	11,3 (5,9)	4,8 (3,4)	0,9 (3,9)
R^2	0,9996	0,9999	0,9998
LOD, μM	0,4	0,4	0,4

Vedle zkrácení migračního času byl tlak použit pro vytlačení zóny acetonitrilu z kapiláry [11]. Cca 75% v/v zastoupení ACN ve vzorku má kladný vliv na zaostření AAs vlivem stacking efektu [12] a zároveň se ACN uplatňuje při deproteinizaci krevní plazmy. Nevodivá zóna ACN po elektroforetickém vycestování iontů působí jako nadbytečný odpor. Pokud není vytlačena z kapiláry tlakovým impulsem, způsobuje i) přerušení elektroforetické separace nebo ii) kolísání elektrického proudu v průběhu separace. Toto kolísání se projeví zvlněním baseliny C^{4}D, které zdánlivě připomíná píky migrujících látek a je patrné na některých publikovaných elektroferogramech [13]. Hydrodynamický tlak současně působící s electrodriven separation je velmi důležitým pomocníkem. V tomto případě byl nejprve použit negativní tlak k vytlačení ACN ze zóny vzorku, který byl následně přepnut na kladný sloužící k urychlení pohybu analytů v kapiláře.



Obr. 2. Stabilita baseliny C^4D při vytlačení zóny acetonitrilu z kapiláry (A) a bez vytlačení (B). Vytlačení ACN bylo provedeno tlakem 50 mbar po dobu 16 s.

Plasmatické hladiny BCAA rychle narůstají a dosahují svého maxima v čase 60 min od začátku intravenózní infúze. Maximální plasmatická koncentrace je 14,5 krát vyšší v porovnání s bazální pro Ile a Leu, a 8,5 krát vyšší v případě Val. Po dosažení maxima koncentrace pomalu klesá a bazální hladiny dosahuje po více než 120 min. Vzrůst plasmatické hladiny BCAA vyvolá vyplavování inzulínu. Inzulín reaguje velmi rychle a svého plasmatického maxima dosáhne již v čase 15 min po podání BCAA a následně postupně klesá.



Obr. 3. Dynamika plasmatických hladin BCAA a inzulínu od počátku intravenózní aplikace BCAA; Val (■), Ile (●), Leu (♦), inzulín (▲).

Závěr

Pro rychlé monitorování BCAAs v krevní plasmě ve velkých souborech vzorků lze s úspěchem použít metodiku CE-C^4D. Při CE separaci, prováděné v krátké kapiláře při vysokých intenzitách elektrického pole, se počet teoretických pater pro BCAAs pohybuje kolem 500000 pater/m. Úplné separace BCAAs je možné docílit za cca 2 min při současné aplikaci hydrodynamického tlaku, který nemá výrazný vliv na snížení separační účinnosti.

Navíc v kombinaci s univerzální C^4D není potřeba v UV/Vis neabsorbující BCAAs derivatizovat; naopak je lze detegovat přímo v jejich nativní formě s LODs na submikromolární koncentrační hladině. Z provedené klinické studie vyplynulo, že plasmatické hladiny BCAAs dosahují svého maxima 60 min po intravenózní aplikaci infuze BCAAs.

Poděkování
Práce vznikla za finanční podpory GAČR, Grant č. 15-03139S, a Univerzity Karlovy, projekt PRVOUK P31 a UNCE 204015.

Literatura

1. Adeva M.M., Calvino J., Souto G., Donapetry C.: Amino Acids *43*, 171 (2012).
2. Tazi E.M., Errihani H.: Indian J. Palliat. Care *16*, 129 (2010).
3. Kašička V.: Electrophoresis *35*, 69 (2014).
4. Coufal P., Zuska J., van de Goor T., Smith V., Gaš B.: Electrophoresis *24*, 671 (2003).
5. Kubáň P., Hauser P.C.: Electrophoresis *34*, 55 (2013).
6. Opekar F., Coufal P., Štulík K.: Chem. Rev. *109*, 4487 (2009).
7. Vochyanová B., Opekar F., Tůma P., Štulík K.: Anal. Bioanal. Chem. *404*, 1549 (2012).
8. Glatz Z.: Electrophoresis *34*, 631 (2013).
9. Gaš B., Zuska J., Coufal P., van de Goor T.: Electrophoresis *23*, 3520 (2002).
10. Tůma P.: J. Sep. Sci. *37*, 1026 (2014).
11. Tůma P.: J. Chromatogr. A *1345*, 207 (2014).
12. Tůma P., Soukupová M., Samcová E., Štulík K.: Electrophoresis *30*, 3436 (2009).
13. Tůma P., Málková K., Samcová E., Štulík K.: J. Sep. Sci. *33*, 2394 (2010).

Use of Reversibly Deposited Mediator Metal for Preparation of Metal-Film Electrodes

Katarzyna Tyszczuk-Rotko [a], Radovan Metelka [b], and Karel Vytřas [b]
[a] Maria Curie-Sklodowska University, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry and Instrumental Analysis, 20-031 Lublin, Poland
[b] University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, 53210 Pardubice, Czech Republic, E-mail: radovan.metelka@upce.cz

Abstract
A new approach for preparation of metal-film electrodes utilizing the combination of *ex situ* and/or *in situ* plating methods and the use of reversibly deposited mediator is presented. By plating metal film onto the surface of glassy carbon electrode together with mediator zinc, followed by the subsequent oxidation of zinc and further deposition of particular metal, a higher surface coverage of electrode with metal particles is achieved. Application of newly developed technique for preparation of metal-film electrodes was demonstrated on the detection of Ni(II) at lead-film electrode with the aid of AdSV and Sn(IV) at bismuth-film electrode using SWASV.

Key words: Electrodeposition, Mediator, Zinc, Lead-film electrode, Bismuth-film electrode, Glassy carbon electrode.

Introduction
Proper coating of the substrate with metal particles is a critical step in preparation of metal-film electrodes, having the greatest impact on their analytical performance. Generally, there are three different techniques for electrochemical formation of metal deposit. Firstly, in *ex situ* plating, an electrodeposition is performed in separate plating solution and metal-film electrode is then transferred to the sample solution for analysis. Secondly, during *in situ* plating, metal ions are added directly into the sample solution and the film is deposited on the electrode surface together with analyte during the accumulation step of stripping analysis. The third technique is based on modification of heterogeneous electrodes (carbon paste electrodes or screen printed electrodes) with a metal precursor compound, e.g. Bi_2O_3 [1], which undergoes reduction to metal also in the course of analyte preconcentration.

Recently, a new technique for preparation of metal-film electrodes utilizing the combination of *ex situ* and/or *in situ* plating methods and the use of reversibly deposited mediator was presented [2]. Metal-film electrodes were prepared using an electrochemical, defect-mediated, thin-film growth method [3,4]. Using such approach, the metal of interest (e.g. Pb or Bi) is co-deposited with a reversibly deposited mediator metal, followed by the subsequent oxidation of mediator with simultaneous deposition of lead or bismuth at the appropriate potential. A necessary characteristic of the mediator is that it must be less noble than the metal of interest; therefore zinc was selected as mediator for further experiments. Recent studies confirmed the usefulness of a reversibly deposited mediator metal for enhancing the electrochemical properties of *ex situ* plated lead-film electrodes (PbFEs). However, the applicability of the PbFEs prepared with the use of the mediator metal was demonstrated on the adsorptive stripping voltammetric determination of folic acid only [5].

In this contribution, the application of newly developed electrodeposition technique was extended to determination of Ni(II) ions using adsorptive stripping voltammetry. It was found that replating the lead film, formed *ex situ* with use of zinc mediator, once again *in situ* promotes the growth of tiny lead crystallites and further increases the coverage of electrode surface, which leads to improved analytical performance of the PbFE [2]. Zinc mediator was also employed for *in situ* preparation of bismuth-film electrode, which was then utilized for enhanced electrochemical detection of Sn(IV) ions with the aid of SWASV in the presence of caffeic acid as the complexing agent [6].

Experimental

Reagents and apparatus

Acetate buffer was prepared from CH_3COOH and NaOH (Merck). Stock standard solutions of Zn(II), Sn(IV), Ni(II), and Bi(III) with concentration of 1 g L^{-1} were obtained from Fluka. Working solutions were prepared daily by dilution of the stock solution in 0.01 M HNO_3. 0.1 M nioxime was prepared by dissolution of reagent (Sigma-Aldrich) in 0.2 M NaOH. All the other chemicals were of reagent grade and were obtained from Sigma-Aldrich. Certified reference materials TMRAIN-95 (rain water) and SLEW-3 (estuarine water) were obtained from National Research Council (Canada). All solutions were prepared in deionized water of resistivity higher than 18.2 MΩ cm (Millipore, UK).

Voltammetric measurements were performed using µAutolab analyzer (Eco Chemie, The Netherlands). A three-electrode setup was used, consisting of glassy carbon electrode (GCE) as working electrode, Ag/AgCl (3 M KCl) reference electrode and platinum wire as auxiliary electrode. The glassy carbon surface was polished daily using 0.3 µm and then 0.05 µm alumina slurries on Buehler polishing pad with subsequent washing and sonication for 2 min. Water samples were mineralized using UV-digester (Mineral, Poland) for 3 h. 10 µL of 30 % H_2O_2 was added to each 10 mL of the sample to speed up the process. Atomic force microscopy (AFM) measurements were performed using NanoScope III instrument and NanoScope version 5.12 software (Digital Instruments, USA) together with WSxM 4.0 Develop 8.0 June 2005 software (Nanotec Electronica S.L., Spain) for data acquisition and analysis.

Preparation of lead-film electrode with use of mediator and Ni(II) determination

The *ex situ* electrodeposited lead-film electrode was prepared from a solution containing 0.1 M acetate buffer (pH 5.6), 7.5×10^{-5} mol L^{-1} Pb(II) and 5×10^{-6} mol L^{-1} Zn(II). Potential of the working electrode was set to –1.4 V for 45 s and then to –0.75 V for 30 s under stirring the solution with magnetic bar. Using such potential sequence, lead (metal of film electrode) and zinc (reversibly deposited mediator) were deposited simultaneously on the surface of glassy carbon electrode. In the second step, Zn was stripped off the electrode, whereas Pb continued to deposit. The resulting *ex situ* lead-film electrode was rinsed with water and transferred into a solution containing 0.2 M ammonia buffer (pH 9.0), 0.25 M $NaNO_2$, 2.5×10^{-5} mol L^{-1} Pb(II), 2×10^{-5} mol L^{-1} nioxime, and various concentrations of nickel ions. Solution pH was adjusted to 8.2 with addition of NH_4OH or H_2SO_4 if required. Then, a potential sequence was applied to the working electrode: –1.45 V for 20 s and –0.67 V for 120 s. During the first step, the lead film was further deposited. In the next stage, the Ni(II)-nioxime complex was accumulated on the electrode surface. After 5 s equilibration time, the square wave voltammogram was recorded between –0.67 and –1.0 V with a frequency of 200 Hz and amplitude of 50 mV. All voltammetric measurements were carried out in non-deaerated solutions.

Preparation of bismuth-film electrode with use of mediator and Sn(IV) detection

The bismuth, zinc and tin were simultaneously deposited on the glassy carbon substrate from a solution, containing 0.1 M acetate buffer (pH 4.5), 0.4 mmol L^{-1} Bi(III), 0.04 mmol L^{-1} Zn(II), 1.73 mmol L^{-1} caffeic acid as the complexing agent, and Sn(IV) in the appropriate concentration, at potential of –1.2 V for 90 s. Then, the potential of –0.85 V was applied to the working electrode for 45 s. During this step, Zn atoms were stripped off the surface and Bi and Sn still continued to deposit. After 15 s of equilibration time without stirring, square-wave voltammograms were recorded in the range from –0.85 to –0.35 V. Before each measurement, the electrode was cleaned by applying 0.7 V for 50 s with solution stirring in order to remove all deposited metals. Square-wave voltammetric scans were performed with frequency of 15 Hz, amplitude of 40 mV and step potential of 5 mV. In the case of the bismuth-film electrode prepared without use of the mediator, Zn(II) ions were not added to the supporting electrolyte.

Results and discussion

Comparison between just *in situ* plated lead-film electrode and the lead-film electrode prepared with and without the use of mediator zinc with subsequent *in situ* lead plating has been made for test concentration of 5×10^{-10} mol L^{-1} Ni(II). After baseline correction of corresponding adsorptive stripping voltammograms, all electrodes exhibited similar electrochemical behavior with respect to the position of stripping peak for Ni(II) at –0.84 V. Well-defined and sharp peak was recorded using the PbFE prepared with the use of mediator zinc in contrast to the broader and lower analytical signal obtained at PbFE without use of mediator. The use of mediator in preplating step resulted in about two-fold increase of Ni(II) signal. In the case of *in situ* plated PbFE, no signal was observed for test concentration of Ni(II) ions, which corresponds to the literature data [7,8]. Careful optimization of experimental conditions included pH and concentration of Zn(II) in preplating solution, concentration of Pb(II) ions in sample solution, potential and time of simultaneous deposition of both metals as well as zinc oxidation and further deposition of lead. The resulting lead film exhibited much higher surface coverage of 97±4 % comparing to the value 49±5 % obtained for lead film deposited without the use of mediator zinc (Fig. 1), thus facilitating the adsorption of the Ni(II) complexes with nioxime, and consequently provides a significant enhancement of the voltammetric response.

Analytical performance of the proposed lead-film electrode for Ni(II) determination was ascertained after estimation of optimal conditions in AdSV detection step. Linear response was observed within the concentration range from 1×10^{-10} up to 1×10^{-8} mol L^{-1} Ni(II) using accumulation time of 120 s; the dependence obeyed equation $y = 0.375\,x + 0.125$, where y and x are the peak current (μA) and Ni(II) concentration (nmol L^{-1}), respectively. The detection limit evaluated as three times standard deviations of the blank (3σ) was estimated as 3.9×10^{-11} mol L^{-1} for the accumulation time of 120 s. Repetitive measurements of 5×10^{-9} mol L^{-1} Ni(II) at the developed PbFE provided good repeatability with RSD 3.8 % ($n = 10$). Interference from other ions was also investigated and neither 1000-fold excess of Zn(II), Fe(III), Cu(II), Mn(II), Mo(VI) nor 100-fold excess of V(V) and Co(II) affected the voltammetric signal for 5×10^{-9} mol L^{-1} Ni(II). Addition of 1 mg L^{-1} Triton X-100 surfactant to the same nickel solution decreased the height of Ni(II) stripping peak to 20 % of its original value. PbFE prepared with the use of mediator was applied to determination of Ni(II) in two certified reference materials: SLEW-3 (estuarine water) and TMRAIN-95 (rain water). Obtained results (Table I) are in close agreement with certified values, which confirms the usability of proposed electrodes for determination of Ni(II) in natural water samples.

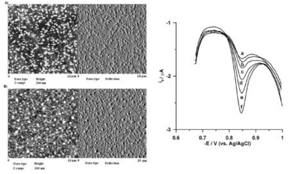


Fig. 1. AFM images of the surface of the lead film electrode prepared *ex situ* without (A) and with (B) the use of a reversibly deposited mediator zinc and after *in situ* plating with lead (*left*). SWAdSV of 0.1–2 nmol L^{-1} Ni(II) at PbFE prepared with the use of mediator and replated *in situ* with Pb (*right*) (Reprinted from [2] by permission of John Wiley & Sons, Inc.).

Surface changes similar to PbFE were also observed in case of bismuth-film electrode (BiFE) prepared *in situ* with or without mediator zinc. Change in surface morphology of bismuth deposit under different conditions of *in situ* electroplating was noted after AFM observations (Fig. 2). Resulting Sn(IV) stripping signals exhibited at least two-fold increase when the mediator was added to the sample solution leading to enhanced electrochemical detection of tin at micromolar concentration levels. The chemical composition of analyzed solution has a large influence on both mediated process of bismuth film formation at glassy carbon surface and the analyte accumulation. As it is clearly seen at Fig. 2, electrodeposition from 0.1 M NaBr provided sharp and intensive voltammetric response of tin in the presence of caffeic acid as a complexing agent, whereas the use of acetate buffer produced lower and broader stripping peaks with a maximum shifted to more negative potentials. Preliminary experiments revealed high interference from lead, which gives intensive oxidation signal at similar peak potentials as tin. Efforts are now being made to ascertain experimental conditions to achieve the highest stripping signals of tin while minimizing interferences from other compounds. Other possible procedures involving the use of various complexants for stripping analysis of tin are also investigated.

Table I.
Results of Ni(II) determination in certified reference materials. Relative standard deviations in brackets are given in percent for $n = 5$.

Certified reference material	Ni(II) concentration, µg L^{-1}	
	Proposed method	Certified value
SLEW-3 (estuarine water)	1.19 (4.1)	1.23±0.07
TMRAIN-95 (rain water)	0.82 (3.8)	0.80±0.17

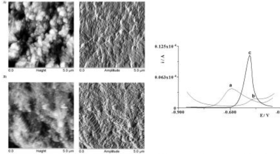


Fig. 2. AFM images of the surface of the bismuth film electrode prepared without (A) and with (B) the use of reversibly deposited mediator zinc (*left*). SWASV of 5×10^{-6} mol L^{-1} Sn(IV) at BiFE prepared with the use of mediator in various supporting electrolytes: a) 0.1 M acetate buffer (pH 4.5), b) 0.1 M HNO_3, c) 0.1 M NaBr (*right*).

Conclusion

Combination of *ex situ* and/or *in situ* electroplating techniques in the presence of reversibly deposited mediator zinc resulted in electrodes with increased coverage of working electrode surface with metal film, which facilitates adsorption of target analytes in stripping analysis. The analytical performance of such prepared lead-film electrodes is even comparable to hanging mercury drop electrodes in the AdSV of nickel ions.

Acknowledgements

The work was financed from resources of the Polish National Science Centre awarded on the basis of decision No. DEC-2013/08/M/ST4/00286.

References

1. Pauliukaite R., Metelka R., Svancara I., Krolicka A., Bobrowski A., Vytras K., Norkus E., Kalcher K.: Anal. Bioanal. Chem. *374*, 1155 (2002).
2. Tyszczuk-Rotko K., Metelka R., Vytřas K., Barczak M.: Electroanal. *26*, 2049 (2014).
3. Sieradzki K., Brankovic S. R., Dimitrov N.: Science *284*, 138 (1999).
4. Brankovic S. R., Dimitrov N., Sieradzki K.: Electrochem. Solid State Lett. *2*, 443 (1999).
5. Tyszczuk K.: Electrochim. Acta *56*, 3975 (2011).
6. Frena M., Campestrini I., de Bragda O. C., Spinelli A.: Electrochim. Acta *56*, 4678 (2011).
7. Korolczuk M., Tyszczuk K., Grabarczyk M.: Electrochem. Commun. *7*, 1185 (2005).
8. Korolczuk M., Tyszczuk K.: Anal. Chim. Acta *580*, 231 (2006).

Electrochemical and Spectral Behavior of MicroRNA (miR-34a-5p)

Aneta Večeřová [a], Kristýna Hudcová [b], Iveta Pilařová [a], Michal Masařík [b], and Libuše Trnková [a,c]

[a] Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, CZ–625 00 Brno, Czech Republic, E-mail: 408219@mail.muni.cz; libuse@chemi.muni.cz

[b] Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Kamenice 5, CZ–625 00 Brno

[c] Central European Institute of Technology – CEITEC, Brno University of Technology, Technická 3058/10, CZ–616 00 Brno, Czech Republic

Abstract

MicroRNAs are a family of small noncoding RNAs, negatively regulating gene expression at the post-transcriptional level and playing a crucial role as potential biomarkers and targets for many types of cancer. Our attention was devoted to electrochemical and spectral studies of miR-34a-5p, related with head and neck and also prostate cancer. Voltammetric experiments on mercury electrode and circular dichroic spectroscopic experiments were performed in the range of pH between 3 and 8. The miRNA and its DNA sequential analogues (miDNA) provided interesting and significant different results. The comparison of miRNA and both DNA (U) and (T) showed the effect of substitution of ribose to deoxyribose, and structural diversity of nucleic acids was confirmed by both electrochemical and spectral methods.

Key words: miR–34a–5p, Human cancer, miDNA, Cyclic voltammetry, Linear sweep voltammetry, Circular dichroic spectroscopy, Mercury electrode.

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) represent a family of small noncoding RNAs (21 – 25 nucleotides), negatively regulating gene expression at the post-transcriptional level [1]. Their functions are critical to normal cellular processes such as differentiation and apoptosis. Recent studies demonstrated that deregulated miRNA expression contributes to the malignant phenotype [2] and for this reason miRNAs play a key role as both diagnostic markers and therapeutic targets for many different tumor types (colorectal cancer, breast cancer, lung cancer, prostate cancer, etc.) [2-3]. Great attention is devoted to the study of miR–34a–5p, related to head and neck cancer and also prostate cancer [4]. This miRNA is a direct transcriptional target of p53 and its overexpression after p53 activation mediates some of the key tumor suppressive effects of p53 via induction of growth arrest, apoptosis or senescence [2]. Our contribution is focused on the comparison of the structure of miRNA, based on ribose, and its miDNA analogues, based on deoxyribose and containing U or T in this sequence, by using voltammetric methods (cyclic voltammetry – CV, or linear sweep voltammetry – LSV). The voltammetric experiment was completed with CD (circular dichroism) spectra.

Experimental

Chemicals

The lyophilized samples of miRNA (miR-34a-5p,UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU) and miDNAs (UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU and TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT) were purchased from Sigma Aldrich Company. The exact concentration of the nucleic acids studied was determined by UV/VIS spectroscopy. Phosphate–acetate buffer as the supporting electrolyte was prepared as a mixture of acetic acid (glacial, Sigma Aldrich; ACS reagent), phosphoric acid (84%; p.a.; Penta Chrudim), and sodium hydroxide (Sigma Aldrich; 97%; p.a.). All solutions were prepared in distilled MILI Q water.

Methods

Cyclic voltammetry (CV) and/or linear sweep voltammetry (LSV)

The voltammetric experiment was realized using the electrochemical analyzer μAUTOLAB TYPE III (Metrohm, Switzerland). The solution of DNAs or RNA sample with a concentration of $1 \cdot 10^{-4}$ mol·L^{-1} was dosed into the voltammetric cell and the three-electrode set was insured: the hanging mercury drop electrode (HMDE) as a working electrode, and Ag/AgCl/3M KCl and Pt wire as a reference and an auxiliary electrode, respectively. As a supporting electrolyte the phosphate-acetate buffer (pH 3.03 – 5.45) was used.

The CV curves were measured in the potential range from 0 to -1.7 V at scan rates from 200 to 800 mV/s and the sample measured was adsorbed on the electrode surface at an accumulation potential of 0 V for 120 s.

Circular dichroic spectroscopy

The CD spectral experiment was carried out using a CD spectrometer Jasco 185 (Tokyo, Japan) in 0.1 cm path–length Hellma cells (λ: 220 – 330 nm; rate: 100 nm/min) placed in a thermostatted holder (23 °C). The concentrations of miDNAs and miRNA were $1 \cdot 10^{-4}$ mol·L^{-1} in phosphate–acetate buffer (pH 3.14 – 8.54).

Results and discussion

Cyclic voltammetry (CV) and/or linear sweep voltammetry (LSV)

It follows from voltammetric results that miDNAs and miRNA provide typical reduction signals of adenine and cytosine (A and C) and an oxidation signal of guanine (G) on the mercury electrode (HMDE) in buffered aqueous solution (phosphate–acetate buffer; pH 3.03 – 5.45). As was shown previously, the oxidation peak of guanine (GI and GII peaks) corresponds to the oxidation of the reduced product of guanine (7,8-dihydrogenguanine). The guanine reduction process proceeds at very negative potentials (more than -1.6 V) and is overlapped by the discharge of hydrogen [5].

The comparison of LSV curves of the DNA (U) and DNA (T) backbone at different pH showed that DNA (U) and DNA (T) yield only one reduction signal of adenine and cytosine (AC signal). This signal is shifted into the more negative potential region with increasing pH and scan rate. The current intensity of these signals is comparable for both miDNA (U) and miDNA (T).

Cyclic voltammetry, which offers the opportunity to investigate oxidation processes on the same electrode surface, provides on HMDE two oxidation signals of guanine (GI and GII) for both miDNA (U) and miDNA (T). This double G-peak is specific to DNA fragments and is not detectable in pHs more acidic than pH 3. With increasing pH the GI oxidation signal is visible and its height gradually increases, while the GII oxidation signal disappears. The current intensity of the GI oxidation signal reaches the maximum at pH 4.75 and with shift of pH to the more alkaline pH region, the current intensity of the GI oxidation signal decreases and the GII oxidation signal is well readable. It is interesting that at pH 5.38 the current intensity (peak height) of both oxidation signals, GI and GII, is comparable.

Similar results related to pH dependence of AC reduction and G oxidation signals were obtained in the study of DNA fragments on HMDE [6].

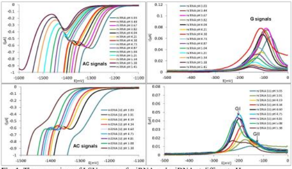


Fig. 1. The comparison of LSV curves of miRNA and miDNA at different pH.

It is obvious from Fig. 1 that miRNA and miDNA provide only one AC reduction signal with different plotting, which is shifted into the more negative potential region with increasing pH. In the case of miRNA, the current intensity of these reduction signals decreases with increasing pH and is comparable with DNA AC reduction signals.

On the contrary, RNA (miR-34a-5p) provides only one G oxidation signal, perhaps due to a different structural arrangement (Z–form) on the mercury electrode. This signal already appears at pH 3.03 and, with increasing pH, the current intensity of the G signal increases. In addition, the G oxidation signal is shifted into the more negative potential region with increasing pH. At pH 4.38 the current intensity of the G oxidation signal reaches the maximum and with the shift into the more alkaline pH region, the intensity of the G oxidation signal gradually decreases (Fig. 1.).

Circular dichroic spectroscopy

The DNAs and RNA structure in solutions was characterized by means of circular dichroic spectroscopy [7]. CD spectroscopy pointed out to a gradual change of the structure dependent on the pH change in both DNA and also RNA backbone (Fig. 2). The miDNA (U) and (T) backbone here forms 2 to 3 types of structures according to the three isoelliptic transition points (229 nm, 247 nm, and 274 nm). The DNA skeleton passes into a more ordered structure around pH 4.5 – 5.8, where the structure is the most stable. The RNA backbone forms one accurate isoelliptic transition point (277 nm) and between 239 – 253 nm a shoulder appears, which indicates a gradual change in the two structures. In the middle of the shoulder (244 nm) peak height slowly varies. The stability of these structures is highest between pH 4 and 5 (Fig. 2).

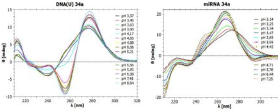


Fig. 2. CD spectra of miRNA and miDNA at different pH.

Conclusion

The comparison of miRNA and both miDNA (U) and (T) showed significant differences in structure – electrochemical and spectral behavior relation. The structural stability of miRNA and its miDNA sequential analogues was studied by CD spectroscopy. It was found that the structural stability of these nucleic acids studied is significantly dependent on pH. DNA structure is most stable between pH 4.5 – 5.8 and RNA structure is most stable between pH 4 and 5. The effect of substitution of ribose to deoxyribose was shown and the structural diversity was confirmed also by electrochemical methods. Electrochemical investigation indicates that on the mercury electrode surface in the aqueous–buffered solutions (phosphate–acetate buffer; pH 3.03 – 5.45), miRNA and its miDNA sequential analogues provide only one reduction AC signal, i.e., the reduction signals of adenine and cytosine merge into one reduction signal. Contrary to miDNAs which yield two oxidation signals of guanine on HMDE, miRNA provides only one reduction signal of guanine, due to the different structural arrangement (Z-form), on the mercury electrode.

Acknowledgment

This research was supported by (a) the CEITEC – Central European Institute of Technology Project CZ.1.05/1.1.00/02.0068, (b) SIX CZ.1.05/2.1.00/03.0072, and (c) KONTAKT II (LH 13053) projects of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

References

1. He L., Hannon G. J.: Nat. Rev. Genet. *5*, 522 (2004).
2. Mirnezami A. H. F., Pickard K., Zhang L.: EJSO. *35***,** 339 (2009).
3. Gaur A., Jewell D. A., Liang, Y.: Cancer Res. *67*, 2456 (2007*)*.
4. Cha Y., Kim N. H., et al.:. Cell Cycle. *11*, 1273 (2012).
5. Studnickova M., Trnkova L., Zetek J., Glatz Z.: Bioelectrochem. Bioenerg. *21*, 83 (1989).
6. Pilarova I., Kejnovska I., Vorlickova M., Trnkova L.: Electroanalysis. *26*, 2118 (2014).
7. Vorlickova M., Kejnovska I., Bednarova K., Renciuk D., Kypr J.: Chirality *24,* 691 (2012).

Primer Extension Reaction at the Gold Electrode Surface
(Metoda prodlužování primeru na povrchu zlaté elektrody)

Pavlína Vidláková, Luděk Havran, and Miroslav Fojta
Institute of Biophysics of the AS CR,v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic,
E-mail: vidlakova@ibp.cz

Abstract
One option of covalent DNA labeling is incorporation of chemically modified nucleotides using corresponding deoxynucleotide triphosphates into DNA molecules using polymerase-catalyzed primer extension. Primer extension is usually performed in solution and then the product is analyzed, often after a suitable separation. In our study we tested the possibility to prepare oligonucleotides with enzymatically incorporated anthraquinone labeled nucleotides using primer extension on templates immobilize at a gold electrode surface.

Key words: DNA, Primer extension, Anthraquinone, Electrochemical analysis, DNA modification.

Úvod
Elektrochemická analýza je využívána ke studiu přirozených i modifikovaných molekul DNA i oligonukleotidů. Elektrochemická stanovení dosahují citlivosti přinejmenším srovnatelné s optickými metodami při nižších pořizovacích a provozních nákladech. Přestože přirozené nukleové kyseliny jsou elektrochemicky aktivní [1] a jejich oxidačně-redukční i tensametrické píky signály je možné využít pro celou řadu analytických aplikací, je často výhodné použít elektrochemické značení. To obvykle dovoluje citlivější detekci, než jaká by byla dosažena měřením vlastních signálů DNA. Je také možné lépe detekovat a rozpoznat značenou DNA i ve velkém nadbytku neznačené DNA. Výhodou může být i využití značky, jejíž redoxní reakce probíhají reverzibilně.

Pro značení DNA je často využívána metoda prodlužování primeru (primer extension, PEX). Při této metodě je pomocí vhodné DNA polymerázy prodlužován řetězec ODN ve směru od 5´ konce ke 3´ konci. Syntéza probíhá komplementárně k sekvenci oligonukleotidového řetězce - templátu. DNA polymerázy dokáží inkorporovat jak přirozené, tak i chemicky modifikované nukleotidy.

Pro zakotvení oligonukleotidů na povrchu zlatých elektrod se využívá zejména interakce thiolových skupin kovalentně navázaných na jednom konci syntetických oligonukleotidů (ODN) s povrchem zlaté elektrody. Za vhodných experimentálních podmínek lze tímto způsobem připravit vysoce organizovanou monovrstvu označovanou jako SAM (self-assembled monolayer) [2-4].

Experimentální část
Antrachinonem modifikované nukleosidtrifosfáty ($dN^{AQ}TP$) byly syntetizovány a poskytnuty skupinou prof. Michala Hocka (UOCHB AVČR, Praha).

Inkorporace značených nukleosidtrifosfátů byla prováděna metodou prodlužování primeru s využitím enzymu vent-(exo)-DNA polymerázy. Jako templáty pro PEX reakci byly používány oligonukleotidy 5´-CTAGCATGAGCTCAGTCCCATGCCGCCCATG-3´modifikované SH skupinou na 5´- nebo 3´- konci. Templáty byly na elektrodu imobilizovány pomocí vazby S-Au. Imobilizace byla prováděna přes noc při laboratorní teplotě. Volný povrch elektrody byl blokován 6-mercapto-1-hexanolem.

Voltametrická měření byla prováděna na analyzátoru Autolab (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands) spojeném s VA-Stand 663 (Metrohm, Herisau, Switzerland) ve tříelektrodovém zapojení (Ag/AgCl/3M KCl jako referenční elektroda, platinový drátek jako pomocná elektroda). Měření bylo prováděno v inertní atmosféře argonu. Jako pracovní elektroda byla používána zlatá disková elektroda. Cyklická voltametrie (CV) - základní elektrolyt 0,2 M acetátový pufr pH 5, počáteční potenciál 0,05 V, potenciál bodu obratu -0,7 V. Square wave voltametrie (SWV) - základní elektrolyt 0,2 M acetátový pufr, pH 5, počáteční potenciál -0,7 V, konečný potenciál 0 V nebo počáteční potenciál 0 V a konečný potenciál -0,7 V.

Výsledky a diskuse

Příprava DNA-SAM modifikovaných elektrod a PEX

Na povrch zlatých elektrod byl pomocí vazby S-Au imobilizován templát modifikovaný SH skupinou na 3´nebo 5´ konci. Elektrody byly následně na 60 minut ponořeny do 1mM roztoku 6-mercapto-1-hexanolu, aby došlo k uspořádání navázaných molekul oligonukleotidů a zablokování volného povrchu elektrody. Následně byly provedena PEX reakce. Reakce byla prováděna buď ve dvou krocích, kdy byly nejprve provedena hybridizace s primerem a teprve poté byla elektroda vložena do reakční směsi obsahující značené i neznačené dNTP a enzym, nebo v jednom kroku, kdy byl primer součástí reakční směsi. Pro značení byly používány $dA^{AQ}TP$ a $dC^{AQ}TP$. Reakce probíhala 90 minut při teplotě 60 °C. Připravené PEX produkty byly elektrochemicky detekovány.

Voltametrická měření

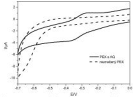
Elektrochemické chování připravených PEX produktů bylo studováno pomocí CV a SWV na zlaté diskové elektrodě. Pro elektrochemické chování antrachinonu je charakteristická dvouelektronová reverzibilní chinon/hydrochinon přeměna. V katodické větvi cyklického voltamogramu poskytuje antrachinon pík AQ^{red} při potenciálu okolo -0,35 V, příslušející redukci antrachinonu na antrahydrochinon. V anodické větvi cyklického voltamogramu je patrný pík AQH_2^{ox} příslušející zpětné oxidaci antrahydrochinonu. V CV ODN značených antrachinonem je patrný pár píků AQ^{red}/AQH_2^{ox} (Obr. 1), ale píky nejsou příliš dobře vyvinuté. Neznačené ODN na zlaté elektrodě v použitém potenciálovém rozsahu (0 - -0,7 V) neposkytují žádný signál.

Jako vhodnější metoda než CV se pro studium antrachinonem modifikovaných ODN ukázala SWV. Ve SWV modifikovaných ODN měřených jak v katodickém (0 až -0,7 V) tak v anodickém směru (-0,7 až 0 V) je dobře patrný pík antrachinonu při potenciálu -0,35 V (Obr. 2). Nemodifikovaný ODN ve sledovaném potenciálovém rozsahu neposkytuje žádné signály. Pro ověření, zda signály antrachinonu skutečně odpovídají PEX produktu a nejedná se pouze o signály $dN^{AQ}TP$ adsorbovaným na elektrodu nebo interkalovaných do oligonukleotidu byly připraveny kontroly, kdy do reakční směsi nebyl přidán buď primer, nebo enzym. Také tyto kontroly neposkytují ve sledované oblasti voltamogramu žádný signál (Obr. 2).

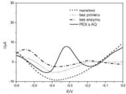
Závěr

V této práci se zabýváme přípravou antrachinonem značených oligonukleotidů pomocí PEX prováděné přímo na povrchu zlaté diskové elektrody a elektrochemickým stanovením takto připravených oligonukleotidů. Naše výsledky ukazují, že reakce na povrchu probíhá, a to jak u ODN navázaných na elektrodu SH skupinou na 3´konci, tak u oligonukleotidů navázaných

SH skupinou na 5´konci. Oba připravené PEX produkty je možné elektrochemicky stanovit měřením redoxních signálů antrachinonu. Antrachinon se pro studování těchto reakcí ukázal jako vhodná značka. Výhodou je zejména reverzibilita jeho redoxních reakcí, která umožňuje provádění více měření s jednou připraveným oligonukleotidem.



Obr. 1. CV neznačeného PEX produktu a PEX produktu značeného antrachinonem připravených na zlaté diskové elektrodě, základní elektrolyt 0,2 M acetátový pufr, počáteční potenciál 0V, potenciál bodu obratu -0,7 V.



Obr. 2. CV neznačeného PEX produktu, PEX produktu značeného antrachinonem a kontrol, kdy do reakční směsi nebyl přidán enzym nebo primer připravených na zlaté diskové elektrodě, základní elektrolyt 0,2 M acetátový pufr, počáteční potenciál -0,7 V, konečný potenciál 0 V.

Poděkování

Tato práce vznikla díky podpoře grantu GA ČR (P206/11/1638) a institucionální podpoře (RVO 68081707).

Literatura

1. Palecek, E., Jelen, F.: In *Electrochemistry of nucleic acids and proteins Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics* (Palecek, E., Scheller, F., Wang, J., ed.), pp 74-174, Elsevier, Amsterdam 2005.
2. Zhao Y. D., Pang D. W., Hu S., Wang Z. L., Cheng J. K., Dai H. P.: Talanta *49*, 751 (1999).
3. Keighley S. D., Li p., Estrela P., Mighorato P.: Biosensor. Bioelectron. *23*, 1291 (2008).
4. Levicky R., Herne T. M., Tarlov M. J., Satija S. K.: J. Am. Chem. Soc. *120*, 9787 (1998).

Study on the Electrophoretic Behaviour of Short Oligodeoxyribonucleotides in Fused Silica Capillaries. A Preliminary Communication

Lada Vítová, Miroslav Fojta, and Radim Vespalec
Institute of Biophysics of the AS CR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic
E-mail: skrabalova@ibp.cz

Abstract
Effects of background electrolyte pH, composition and concentration on the electrophoretic transport of short oligodeoxyribonucleotides (ODNs) in fused silica capillaries have been investigated in the presented study. Mobilities and separation efficiencies of ODNs peaks varied with all three background electrolyte characteristics. Just changes in the background electrolyte characteristics and acid-base properties of ODNs are not sufficient for a systematic explanation of the observed variations. Despite the indicated complexity of ODNs electrophoretic behaviour, we show that very high separation efficiencies of ODNs peaks can be achieved in background electrolytes of physiological pH.

Key words: capillary electrophoresis, DNA, electrophoretic migration, fused silica capillary, oligodeoxyribonucleotides.

Introduction
Because of DNA reactivity and sensitivity to exogenous influences, local changes in DNA structure and chemical composition may occur. Such changes, their causes and consequences can be studied using miscellaneous experimental techniques and tools. Popular tools are short linear oligodeoxyribonucleotides (ODNs) bearing additional functional groups or molecular fragments [1, 2]. Such short oligomers, which consist of maximum ten monomers, are classified as molecules of small and intermediate size. Mixtures of such compounds can be separated using capillary electrophoresis (CE) in buffered aqueous solutions [e.g. 3-5]. However detailed studies of short ODNs and of their derivatives are practically lacking. For the research of ODNs derivatives it is essential to study the mother ODNs first. Available literature [e.g. 3-5] does not provide any consistent notion of the electrophoretic behaviour of ODNs.

An ODN which consists of *n* monomers, and does not bear 3´- or 5´-terminal phosphate group, contains (*n*-1) monovalent phosphate fragments whose dissociation starts approximately at pH 1 [6]. In addition, pK_a values of nitrogen atoms in nucleic base moieties have to be taken into account. Considering number of acid and basic ionisable groups, an ODN has negative electrophoretic charge if it contains at least one adenine, cytosine or a synthetic nucleobase without strongly basic nitrogen atoms. ODNs bear excess negative charge at pH values 8 – 11 (which prevail in CE separations of nucleotides and their oligomers[7]), therefore ODNs migrate anionically. Probably this fact evoked the opinion that electrophoretic properties and behaviour of these species are determined exclusively by their electrophoretic charge. Consequently an expectation was created that nucleotides, ODNs and DNA fragments do not interact with the wall of the fused silica capillary [3]. In analytical studies ODNs are therefore considered as having identical or very close electrophoretic properties regardless of their base composition and/or nucleotide sequence. Articles which take into consideration other properties of ODNs besides the acid-base ones are rather scarce [8, 9].

The aim of the study was the investigation of the influence of background electrolyte (BGE) pH, composition and concentration on the electrophoretic transport of short ODNs in fused silica capillaries. Additional effort of the study was directed towards searching for BGEs which enable reaching satisfactory separation efficiencies (at least $1\cdot10^5$ theoretical plates per 1 meter of separation capillary).

Supporting Information

The separation system in free solution capillary electrophoresis is a fused silica capillary filled with BGE. For maximum possible buffering capacity of BGEs, their pH was adjusted to the pK_a of the buffering BGE constituent. For the elimination of experimental difficulties caused by electroosmotic flow, the inner wall of the separation capillary was coated with chemically bound polyacrylamide [10] in experiments in the pH range 4.7 – 7.6. In experiments carried at pH higher than 7.6, uncoated capillary was used.

The ODNs of interest differed by the number of monomers (5 – 10 units) and by their nucleobase composition. Synthetic ODNs have been supplied by VBC Biotech Services GmbH (Vienna, Austria) and GENERI Biotech (Hradec Králové, Czech Republic).

Findings

The presented study was motivated by the expectation that anionically migrating ODNs do not interact with the negatively charged surface of fused silica capillary [3]. In the first experiments 0.1 mM solution of a randomly selected pentamer A4T was injected into the capillary filled with 20 mM sodium acetate buffer of pH 4.7. Only two peaks have been detected in three consecutive injections of the pentamer. However reproducible migration of A4T has been reached if the acetate buffer pH was adjusted with TRIS or morpholine. Pentamer GAGAT and hexamer ATAATA yielded the very same results qualitatively. Therefore in the next step chloride salts of different organic bases have been added (in 1 mM or 5 mM concentrations) to sodium acetate and morpholine acetate buffers to possibly provide information about the action of organic cations in the ODNs transport in fused silica capillaries. Experiments with monovalent and divalent cations added into sodium acetate buffer resulted in a reproducible migration of GAGAT through the capillary, but the separation efficiency of the GAGAT peak was too low. Trivalent and tetravalent organic cations turned out to be unadvisable as BGE additives because they caused substantial mobility decrease. Only the higher (5 mM) concentration of mono- or divalent organic cations added into morpholine acetate BGE resulted in GAGAT separation efficiency improvement, however its mobility decreased unacceptably.

Zwitterionic Good´s buffers MES (pK_a = 6.4 [11]) and MOPS (pK_a = 7.2 [11]) have been employed in the following experiments performed in polyacrylamide coated capillary. The coating is considered stable up to pH 8. Pentamer A4T was not detected from injections repeated in long periods when 20 mM sodium-MES buffer was the BGE, whereas in the morpholine-MES buffer the ODN has been detected and migrated reproducibly. Satisfactory separation efficiency of $1.5\cdot10^5$ has been achieved. The first NaOH-adjusted buffer in which pentamer A4T has migrated reproducibly was 20 mM sodium-MOPS buffer of pH 7.2. The separation efficiency of A4T peak was below the efficiency limit, however if the MOPS concentration was doubled, the separation efficiency of A4T peak increased five times, up to $3.5\cdot10^5$ theoretical plates. We also show that even higher separation efficiencies can be reached in this separation system.

For experiments carried at pH higher than 7.6, uncoated capillary was used. The electroosmotic flow (EOF), the motion of liquid in the capillary induced by applied electric field, is directed towards cathode. Therefore the EOF must be sufficiently fast to avoid long runs in experiments analyzing anions. Good´s buffer CAPSO (40 mM) adjusted with NaOH to pH 9.7 has been chosen as a suitable one. ODNs A4T and A9T migrated with reproducible mobilities in this BGE, however their separation efficiencies were below the efficiency limit. In contradiction with the theory of capillary electrophoresis is the observation that the efficiency of A4T was higher than that of A9T and that their efficiencies changed in a different way when urea was added to the BGE. From another tested basic BGEs, sodium carbonate buffer of pH 9.5 and ethanolamine-methoxyacetic acid of the same pH appeared as the most promising ones. The influence of the sodium carbonate BGE concentration on the migration of ODNs was also checked. At the lowest concentration of sodium carbonate buffer (its ionic strength equaled that of 40 mM CAPSO adjusted with NaOH) the separation efficiency of A4T peak was close to the defined limit, and was the highest (more than $2 \cdot 10^5$ theoretical plates) in the most concentrated sodium carbonate buffer (70 mM).

Conclusion

Our experimental data indicate that electrophoretic properties and behaviour of ODNs are much more complex than it has been thought and presented in existing literature until now. The continuing study aims at recognizing processes influencing CE separations of short ODNs. The oral contribution will discuss possible hypotheses on processes and ODNs behaviour that are beyond the experimental data.

Acknowledgements

This work was supported by the Czech Science Foundation (grant GBP206/12/G151 to M. F.) and by the ASCR (RVO 68081707).

References

1. Paleček E.: Method. Enzymol. *212*, 139 (1992).
2. Fojta M., Kostečka P., Pivoňková H., Horáková P., Havran L.: Current Anal. Chem. *7*, 35 (2011).
3. Cohen A. S., Terabe S., Smith J. A., Karger B. L.: Anal. Chem. *59*, 1021 (1987).
4. Dolník V., Liu J., Banks F. B., Jr., Novotný M. V., Boček P.: J. Chromatogr. *480*, 321 (1989).
5. Takahashi T., Sakurai T., Hirata K., Hoshino H.: Analyst *134*, 1299 (2009).
6. Blackburn, G. M.; Gait, M. J.; Loakes, D.; Williams, D. M. Nucleic Acids in Chemistry and Biology, 3rd ed., RSC Publishing, Cambridge, 2006.
7. Geldart S. E., Brown P. R.: J. Chromatogr. A *828*, 317 (1998).
8. Iki N., Kim Y., Yeung E. S.: Anal. Chem. *68*, 4321 (1996).
9. Stellwagen E., Stellwagen N. C.: Electrophoresis *28*, 1053 (2007).
10. Vespalcová M., Gregorová D.: J. Sep. Sci. *26*, 729 (2003).
11. Linde D. R., Editor-in-Chief, *Handbook of Chemistry and Physics*, 77th edition, CRC Press, Boca Raton 1996 – 1997.

Boron-Doped Diamond Electrodes in Electroanalysis of Reducible Organic Compounds

Jana Vosáhlová [a], Jaroslava Zavázalová [a], Václav Petrák [b,c], and Karolina Schwarzová-Pecková [a]

[a] Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 6, CZ-128 43, Prague 2, Czech Republic, E-mail: kpeckova@natur.cuni.cz

[b] Institute of Physics of the ASCR, v.v.i., Na Slovance 1999/2, 182 21 Prague 8;

[c] Czech Technical University in Prague, Faculty of Biomedical Engineering, nám. Sitná 3105, 272 01 Kladno, Czech Republic

Abstract

Boron doped diamond (BDD) electrodes became a well-established tool in electroanalysis of oxidizable organic compounds; nevertheless their possibilities in electroanalysis of reducible compounds remain relatively unexploited. Thus, in this study the influence of the presence of oxygen, electrode pretreatment, and activation between individual scans for electroreduction of tartrazine and allura red (azo group), 5-nitroquinoline (nitro group and *N*-heterocycle), vanillin (aromatic aldehyde), and azidothymidine (azide group) using batch voltammetry was tested. Further, the effect of boron concentration in BDD films on the width of potential window in aqueous media was investigated. Sufficient boron-doping level is required (B/C ratio during BDD deposition procedure > 2000 ppm) to obtain well developed voltammetric signals despite the fact that the width of the potential window in the cathodic region increases with decreasing boron content.

Key words: 5-nitroquinoline, Azo-dyes, Boron-doped diamond, Boron concentration, Voltammetry, Reduction.

Introduction

In the last twenty years boron doped diamond (BDD) electrodes have became a well-established tool in electroanalysis of organic compounds. This popularity is given by advantageous mechanical electrochemical properties, *i.e.* low and stable background current, mechanical and corrosion resistance, wide potential window in anodic region and by fouling resistance or easy removal of adsorbed reaction by-products and products by rinsing BDD surface with appropriate solvent or application of high anodic or cathodic potential. These properties are significantly influenced by morphology of the BDD films, boron concentration, and content of non-diamond (sp^2 carbon) impurities, which are significantly affected by the type, conditions and operation procedures during the production of BDD thin film by a chemical vapor deposition procedure [1, 2]. The boron content is usually given by the B/C ratio in the gas phase, typical values range from 500 ppm to 15 000 ppm resulting in boron carrier concentration in the final film $1{\cdot}10^{18}\ cm^{-3} - 1{\cdot}10^{21}\ cm^{-3}$. Depending on the boron-doping level and crystallinity of the BDD, the electrical conductivity of the BDD films ranges from insulating to metallic with the predicted threshold for the semiconductive/metallic transition at ~2.10^{20} boron atoms per cm^{-3} (ref. [3] (theoretical value)), *i.e.* ~1000 – 2000 ppm (experimental values) [1, 4]. Pretreatment of the electrode surface can be applied for conditioning of the electrode surface, enhancement of the voltammetric signals, preventing the passivation of electrode surface, and ensuring of repeatable and reproducible response of particular analytes. For this purpose, most frequently high positive/negative current densities or potentials (~ < ±2.0 V) applied for few seconds to minutes are used. As results of this anodic/cathodic pretreatment, oxygen-terminated (O-BDD) or hydrogen-terminated (H-BDD) surfaces are produced. In the former case, the formation of OH radicals (Eq. 1) at high anodic potentials causes oxidation and stabilization of the electrode surface with the prevalence of the ketonic, alcoholic and carboxylic groups[5].

$$H_2O(BDD) \rightarrow HO^{\bullet}(BDD) + H^+ + e^- \qquad (1)$$

The cathodic pretreatment has to be applied just before the electrochemical experiments to ensure reliable and reproducible results, especially when the electrode has not been used for a long period of time due to its instability in air. It facilitates the interaction and adsorption of the electrochemical species with the electrode surface and thus clearly leads to a larger electrochemical activity for a number of compounds[6].

The high number of studies on voltammetric and amperometric determination of organic compounds was surveyed in comprehensive tables in several reviews[2, 7-10], where prevalence of oxidizable substances is evident. The few determinations based on reduction were suggested *e.g.* for some nitrophenols[11-13], aminonitrophenols[14], and nitro-group containing pesticides and drugs[15, 16] including benzazepines[17] and nitro derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons[18, 19], and further for *N*-heterocyclic compounds cytochrome c[20], paraquat[21], brimonidine[22], and diazepam[17]. This indicates that despite the fact that BDD electrodes are mentioned to be relatively insensitive to oxygen presence in measured solutions and a suitable alternative to mercury-based electrodes for stripping analysis of inorganic species[23], their possibilities in analysis of reducible organics remain relatively unexploited.

Thus, in this study we concerned on BDD electrodes as possible tools in voltammetry of reducible organic compounds. Analytes containing typical reducible groups and previously studied at mercury, amalgam or other carbon-based electrodes were selected[24-26]: tartrazine and allura red (azo group), 5-nitroquinoline (nitro group and *N*-heterocycle), vanillin (aromatic aldehyde), and azidothymidine (azide group). Further, the effect of boron concentration in BDD films on the width of potential window and voltammetric response of selected analytes in aqueous media was investigated.

Experimental

The following aqueous stock solutions were prepared in deionized water ($c = 1.10^{-3}$ mol L^{-1}, all from Sigma-Aldrich): Zidovudine, vanillin, allura red, tartrazine, 5-nitroquinoline. All chemicals for supporting electrolytes were dissolved in deionized water and were of gradient grade purity (Lach-Ner, Neratovice, CZ). Measurements were carried out using a computer driven Eco-Tribo Polarograph with PolarPro software, version 5.1 (both Eco-Trend Plus, Prague). BDD electrodes were prepared using microwave plasma-assisted chemical vapor deposition reactor (Seki ASTeX 5010, Woburn, MA, USA) using pressure of 50 mBar at temperature of 720°C on silicon wafers (resistivity of ca 0.005 Ω·cm, thickness of wafer 300 μm, ON Semiconductor, Rožnov pod Radhoštěm) of mixtures containing 99.0% H_2/1.0% CH_4 and trimethylboron gas with variable B/C ratio in the gas phase 500, 1000, 2000, 4000, and 8000 ppm. The wafers with deposited BDD film of 1 μm thickness were placed in Teflon electrode body with disk diameter of 2.7 mm, *i.e.* geometric electrode area A = 5.7 mm^2 (ref.[27]). Three electrode arrangement with BDD electrodes as indicator electrodes and platinum wire auxiliary electrode and silver / silver chloride (3M KCl) reference electrode was used. In differential pulse voltammetry, a pulse height of +50 mV, pulse width of 100 ms and scan rate of 20 mV s^{-1} were applied.

Results and Discussion

The potential window in aqueous media was firstly investigated for a set of BDD electrodes with boron concentration 500 ppm – 8000 ppm. Several supporting electrolytes commonly used in electroanalysis and representing the wide range of pH values were used: 1 mol L^{-1}

KCl, 0.1mol L^{-1} $HClO_4$, 0.1 mol L^{-1} acetate buffer pH 4.0, 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer pH 7.0, and 0.05 mol L^{-1} borate buffer pH 9.0. Fig. 1A depicts an example of cyclic voltammograms in 0.1 mol L^{-1} acetate for all tested BDD films. The width of the potential window is inversely dependent on the doping level, as is valid for all tested media. The narrowing of potential window with increasing boron content is more extreme at the cathodic side, where the differences of the cathodic potential limits $E_{\text{lim,C}}$ between 500 ppm and 8000 ppm electrode are in the region of 831 mV (phosphate buffer pH 7.0) to 578 mV (1 mol L^{-1} KCl). The decline is continuous with higher differences of $E_{\text{lim,C}}$ for 500 ppm to 4000 ppm electrodes. As the hydrogen evolution reaction at the cathodic requires the presence of catalytic sites on the electrode surface, it can be concluded that their availability decreases with decreasing boron content leading to extended potential window in accordance with theoretical calculations concluding that hydrogen bonding to boron is energetically favorable in diamond [28].

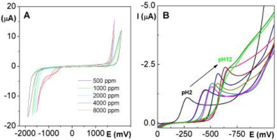


Fig. 1. (A) Cyclic voltammograms of 0.1 mol L^{-1} acetate buffer pH 4.0 measured at BDD electrode deposited using B/C ratio 500 ppm – 8000 ppm; scan rate 100 mV s^{-1}, the third cycle presented; (B) DC voltammograms of 5-nitroquinoline ($c = 1.10^{-4}$ mol L^{-1}) in Britton-Robinson buffer pH 2.0-12.0. Recorded at 4000 ppm BDD film at scan rate of 100 mV s^{-1}.

The electrochemical behavior of tested compounds was processed in aqueous media in BR buffer pH 2.0 – 12.0. For all compounds, the influence of the presence of oxygen, electrode pretreatment and activation between individual scans was tested. A voltammetric signal was present within the potential window of the 4000 ppm BDD electrode, nevertheless for zidovudine and vanillin the signal was placed on the onset of background current caused by supporting electrolyte decomposition reaction and thus was not suitable for analytical purposes. BDD films with lower boron-doping level and more extended potential window did not provide better results for these compounds.

The voltammetric signal of 5-nitroquinoline and azo-dyes depends largely on the pH of the BR buffer, electrode pretreatment and activation between individual scans. For 5-nitroquinoline, anodic pretreatment at +2.4 V for 5 min in 0.5 mol.l^{-1} H_2SO_4 leading to O-terminated surface was applied and 30 s stirring between individual scans assured repeatable signal heights in the whole pH range 2.0 – 12.0 (Fig. 2B). Presence of oxygen in the measured solutions led to slight increase of peak heights and acceptable increase of its relative standard deviation. On the other hand, detection azo-dyes requires acidic media and H-terminated surface, *i.e.* BDD electrode was pretreated at −2.4 V for 5 min in 0.5 $mol.l^{-1}$ H_2SO_4 and this potential in measured media was kept for 30 s between individual scans. In oxygen-saturated media the voltammetric signals are not repeatable, as the negative peak potentials of azo-dyes are relatively close to 0 V, *i.e.* in the region of the oxygen reduction. At optimized conditions, limits of detection lye in the 10^{-7} $mol.l^{-1}$ concentration range for 5-nitroquinoline and allura red and 10^{-6} $mol.l^{-1}$ for tartrazine. The difference of peak potentials of mentioned azo-dyes in DP voltammetry enables their simultaneous determination, which will be demonstrated on their determination in selected soft drinks.

Conclusions

These results demonstrate that BDD electrodes can be an useful tool in voltammetric determination of reducible compounds with detection limits comparable with those obtained at solid amalgam and other carbon-based electrodes. Proper choice of boron-doping level of BDD electrode, its pretreatment and activation between individual scans is necessary to obtain repeatable voltammetric signal.

Acknowledgements

This research was carried out within the framework of Specific University Research (SVV 260205). The research was financially supported by the Grant Agency of the Charles University in Prague (Project GAUK 684213) and CTU grant SGS14/215/OHK4/3T/17.

References

1. Zivcova Z. V., Frank O., Petrak V., Tarabkova H., Vacik J., Nesladek M., Kavan L.: Electrochimica Acta *87*, 518 (2013).
2. Peckova K., Musilova J., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. *39*, 148 (2009).
3. Williams A. W., Lightowl E. C., Collins A. T.: J. Phys. C: Solid State Phys. *3*, 1727 (1970).
4. Hutton L. A., Iacobini J. G., Bitziou E., Channon R. B., Newton M. E., Macpherson J. V.: Anal. Chem. *85*, 7230 (2013).
5. Duo I., Levy-Clement C., Fujishima A., Comninellis C.: J. Appl. Electrochem. *34*, 935 (2004).
6. Salazar-Banda G. R., Andrade L. S., Nascente P. A. P., Pizani P. S., Rocha R. C., Avaca L. A.: Electrochim. Acta *51*, 4612 (2006).
7. Musilova J., Barek J., Peckova K.: Chem. Listy *103*, 469 (2009).
8. Zavazalova J., Barek J., Peckova K.: Boron Doped Diamond Electrodes in Voltammetry: New Designs and Applications (an Overview). In: *Sensing in Electroanalysis* (Kalcher K., Metelka R., Švancara I., Vytřas K., eds.), Vol. 8. University Press Centre, University of Pardubice, Pardubice 2013/2014.
9. Peckova-Schwarzova K., Zima J., Barek J.: Determination of Aromatic Hydrocarbons and Their Derivatives. In: *Electrochemical Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors*; (Moretto L. M., Kalcher K., eds.), Vol. 2: Applications. Springer, New York 2015.
10. Peckova K., Barek J.: Curr. Org. Chem. *15*, 3014 (2011).
11. Musilova J., Barek J., Peckova K.: Electroanalysis *23*, 1236 (2011).
12. Garbellini G. S., Salazar-Banda G. R., Avaca L. A.: J. Braz. Chem. Soc. *18*, 1095 (2007).
13. Pedrosa V. A., Suffredini H. B., Codognoto L., Tanimoto S. T., Machado S. A. S., Avaca L. A.: Anal. Lett. *38*, 1115 (2005).
14. Dejmkova H., Barek J., Zima J.: Int. J. Electrochem. Sci. *6*, 3550 (2011).
15. Chuanuwatanakul S., Chailapakul O., Motomizu S.: Anal. Sci. *24*, 493 (2008).

16. Juliao M. S. D., Ferreira E. I., Ferreira N. G., Serrano S. H. P.: Electrochim. Acta *51*, 5080 (2006).
17. Martins I., Canaes L. D., Doretto K. M., Rath S.: Electroanalysis *22*, 455 (2010).
18. Yosypchuk O., Barek J., Vyskocil V.: Anal. Lett. *45*, 449 (2012).
19. Cizek K., Barek J., Fischer J., Peckova K., Zima J.: Electroanalysis *19*, 1295 (2007).
20. Haymond S., Babcock G. T., Swain G. M.: J. Am. Chem. Soc. *124*, 10634 (2002).
21. Tyszczuk-Rotko K., Beczkowska I., Nosal-Wiercinska A.: Diam. Relat. Mat. *50*, 86 (2014).
22. Radulovic V., Aleksic M. M., Agbaba D., Kapetanovic V.: Electroanalysis *25*, 230 (2013).
23. Jones S. E. W., Compton R. G.: Curr. Anal. Chem. *4*, 170 (2008).
24. Vyskocil V., Barek J.: Crit. Rev. Anal. Chem. *39*, 173 (2009).
25. Peckova K., Navratil T., Yosypchuk B., Moreira J. C., Leandro K. C., Barek J.: Electroanalysis *21*, 1750 (2009).
26. Jiranek I., Peckova K., Kralova Z., Moreira J. C., Barek J.: Electrochim. Acta *54*, 1939 (2009).
27. Maixnerova L., Barek J., Peckova K.: Electroanalysis *24*, 649 (2012).
28. Dai Y., Proshlyakov D. A., Zak J. K., Swain G. M.: Anal. Chem. *79*, 7526 (2007).

Electrochemical Characterization of Poly(methylene Blue) Modified Graphite Electrodes

Magda Zlámalová [a,b], Pavel Janda [a], and Karel Nesměrák [b]
[a] J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of ASCR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic, E-mail: magda.zlamalova@jh-inst.cas.cz
[b] Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

Abstract

This work deals with electrochemical study of methylene blue (MB) polymerization as well as characterization of deposited conductive film on basal plane highly oriented pyrolytic graphite (HOPG) and pencil-graphite electrode (PGE). Poly(methylene blue) modified electrodes (HOPG/pMB and PGE/pMB) have been prepared by potential cycling in aqueous electrolyte solution containing methylene blue monomer. It has been found that electrochemical properties and electrocatalytic activity of deposited film are greatly influenced by the type of electrode substrate. Developed electrodes have been further investigated as potential sensors for sulfhydryl-containing compounds.

Key words: Poly(methylene blue), Electropolymerization, Cyclic voltammetry, Potentiommetry, HOPG, PGE.

Introduction

Electrode surface modification can improve the electrochemical response to analyte by mediating or catalyzing its charge transfer reaction, protecting the surface against passivation and by changing the electrochemical reaction mechanism respectively. Utilizing electrodes with immobilized suitable chemical mediators can solve some problems with bare solid electrodes such as insufficient sensitivity and selectivity, slow electron transfer, current and potential oscillations, or high overpotential.

Electrodes chemically modified by polymeric films have attracted considerable interest over the past two decades due to their potential application in electrochromic devices, electrocatalysis and electroanalysis. Electrosynthesized polymers exhibit some unique behavior that the corresponding monomers do not always display. In the past few years, surface-modified electrodes based on the electropolymerization of various phenoxazine and phenothiazine derivatives have been reported in the literature [1,2].

The electrocatalytic activity of poly(methylene blue) (Fig. 1) in presence of some biologically active compounds has been already reported in several studies [3-7].

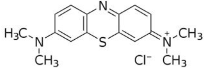


Fig. 1. Chemical structure of methylene blue.

Cyclic voltammetry of methylene blue (MB) in aqueous solution leads to the formation of stable conductive polymer film on the solid electrode surface. It has been already published that basic solutions are optimal media for the polymerization of MB [3] and electrochemical properties of electrodeposited polymer film are affected by solid electrode substrate [8].

The aim of our work is designing new electrode system which combines auspicious electrochemical properties of pMB and advantages of HOPG and PGE. We optimized the conditions of electropolymerization and characterized the properties of HOPG/pMB and PG/pMB electrodes. The modified electrode exhibits electrocatalytical activity towards SH^- group. Our findings will be utilized for development of new potentiometric sensor.

Experimental

Reagents and supporting electrolyte solutions

Methylene blue was purchased from Lachema. The supporting electrolyte solution used for the electropolymerization of MB consisted of 0.1 M phosphate buffer and 0.1 M sodium nitrate or potassium sulfate (pH 8.0). The concentration of monomeric MB dissolved in the solution was 0.1 mM. Solution of 0.1 M phosphate buffer with 0.1 M KCl was used for pMB electrochemical characterization and for other experiments. Solutions of sodium sulfide were prepared immediately before experiments. Millipore Milli-Q pure water (resistivity $\geq$ 18 MΩcm) and analytical grade reagents were used for preparation of all solutions. Stock solutions were kept in glass vessels in dark at ~6°C. All experiments were performed at room temperature.

Instrumentation

All electrochemical experiments were carried out on computer-controlled potentiostat-galvanostat Wenking POS2 (Bank Electronik) with software CPC-DA (Bank Elektronik) in a electrochemical cell with HOPG/pMB or PG/pMB as a working electrode, saturated calomel reference electrode (SCE), and platinum wire counter electrode. The pH measurements were carried out with a pH-meter (Jenway 3510) at room temperature

Preparation of pMB-modified HOPG and PGE

Graphite substrate was prepared by peeling off basal plane of highly oriented pyrolytic graphite (HOPG, ZYB Grade, 12 mm x12 mm x 2 mm; Momentive Performance Materials Quartz). Geometric area accessible for modification was defined by viton flat sealing (20 mm^2). The pencil-graphite rod (KOH-I-NOOR, HB of 0.5 mm in diameter and 6 cm in length) was inserted into a glass capillary and sealed using two-component epoxy adhesive. Electrical contact was obtained by mercury with platinum wire. The electrochemical polymerization of methylene blue was carried out under argon atmosphere in an one-compartment electrochemical cell containing methylene blue monomer solutions in 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) with 0.1 M $NaNO_3$ saturated by argon. The preparation of pMB films was carried out by voltammetric cycles between -0.6 V and +1.1 V at the sweep rate 100 mVs^{-1}. The polymer growth was controlled by the deposition time or the number of deposition cycles. After electropolymerization both the electrode and the cell were thoroughly rinsed with phosphate buffer containing 0.1 M KCl to remove any remaining monomeric MB.

Results and discussion

Fig. 2 shows typical cyclic voltammograms obtained during film growth on HOPG (A) and PG (B). The voltammetric curves are similar to that obtained on glassy carbon electrode [3]. Beyond cca 0.8 V the rapidly rising current (wave III) originates from the oxidation of the MB to a cation-radical $MB^{+\cdot}$ formed by the polymerization of monomer. The growth of the polymer film is accompanied by a decrease of the monomer oxidation peak at -0.26 V (I, I') and by an increase of redox waves corresponding to the polymeric MB (II, II'). We observed that the oxidation peak I is decreases in subsequent cycles. It was suggested that initial increase of peak current is in consequence of MB adsorption on the graphite surface. Adsorbed MB monomer shows an oxidation peak at the same potential as that of the monomer from solution.

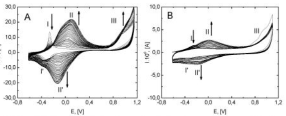


Fig. 2. The pMB film growth during electropolymerization from a solution containing 0.1 mM MB monomer in 0.1 M phosphate buffer and 0.1 M $NaNO_3$ (pH 8.0) on the surface of HOPG (A) and PGE (B). 30 minutes cycling between −0.6 and +1.1 V vs. SCE at scan rate 100 mVs^{-1}.

Cyclic voltammetry was performed to investigate catalytic activity of HOPG/pMB towards sodium sulfide as a model SH^-/S^{2-} analyte. For this measurement sodium sulfide was dissolved in 0.1 M phosphate buffer with 0.1 M KCl (pH 8.0). With the first dissociation constant of hydrogen sulfide in aqueous solutions pK_{a1}~7.02 practically all hydrogen sulfide in the solution is in the form of HS^-. Based on cyclic voltammetry measurements, we can conclude that pMB film deposited on HOPG basal plane and pencil graphite substrate displays sufficient electrocatalytic activity towards sulfhydryl group (Fig. 3) and pMB-modified electrode can thus be utilized for construction of potentiometric sensor.

Conclusion

In this work poly(methylene blue) film was deposited on the HOPG basal plane substrate. We have investigated electrochemical behavior during electropolymerization and electrochemical properties of resulting HOPG/pMB and PG/pMB electrode. Modified electrodes exhibit electrocatalytical activity towards sulfhydryl group. Our findings will be utilized for the development of new potentiometric sensor.

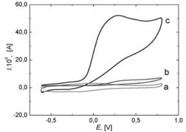


Fig. 3. CV in 0.1 M phosphate buffer, pH=8.0 at PGE/pMB (no Na_2S in solution) (a), CV 10^{-2}M Na_2S in 0.1M phosphate buffer, pH=8.0 at PGE (b), and at PGE/pMB (c).

Acknowledgement
This research was carried out within the framework of the Specific University Research (SVV260205). Financial support from the Grant Agency of the Czech Republic (Czech Science Foundation) (contract No. 14-14696S) is gratefully acknowledged.

References
1. Schelreth D. D., Karyakin A. A.: J. Electroanal. Chem *395*, 221 (1995).
2. Barsan M. M., Pinto E. M., Brett C. M. A.: Electrochim. Acta *53*, 3973 (2008).
3. Karyakin A. A., Strakhova A. K., Karyakina E. E., Varfolomeyev S. D.: Bioelectrochem. Bioenerg. *32*, 35 (1993).
4. Marinho M. J. C, Cabral M. F., Mazo L. H.: J. Electroanal. Chem *685*, 8 (2012)
5. Komura T., Niu G. Y., Yamaguchi T., Asano M., Matsuda A.: Electroanalysis *16*, 1791 (2004).
6. Silber A., Hampp N., Schuhmann W.: Biosens. Bioelectron. *11*, 215 (1996).
7. Rincón R. A., Artyushkova K., Mojica M., Germain M. N., Minteer S. D., Atanassov P.: Electroanalysis 22, 799 (2010).
8. Liu J., Mu S.: Synthetic Metals *107*, 159 (1999).

ISE sponsored Meeting

ECO-TREND PLUS s.r.o.

E-mail: ecotrendplus@seznam.cz tel.: 266 053 877 tel./fax: 286 890 502

DETEKČNÍ SYSTÉM ÚNIKU ROPNÝCH LÁTEK

AS-DETECTOIL

Detekční zařízení určené ke zjišťování a monitorování přítomnosti ropných látek, olejů, apod. na hladině vody. Zařízení je certifikováno. Zařízení je využitelné zejm. v průmyslu (energetika, čističky odpadních vod, ap.), v odlučovačích ropných látek, v životním prostředí aj. – jako kontrolní a bezpečnostní systém.

POPIS ZAŘÍZENÍ

Systém sestává ze sondy o rozměrech 70 x 70 x 30 mm, z vyhodnocovacího přístroje o rozměrech 220 x 50 x 150 mm (napájeného napětím 12 V – akumulátor, trafo) a z výstupu pro instalaci signalizačního zařízení (zvonek, světlo) či pro napojení regulačního, záznamového a jiného systému.

Zařízení umožňuje dlouhodobý, spolehlivý a bezúdržbový provoz, i v prostředí s nebezpečím výbuchu. Díky rozměrům sondy lze detektor instalovat např. i do vrtů nebo na odbočky z potrubí.

TECHNICKÉ ÚDAJE

připojením na síť 220/50 Hz; 3,5 mA; akumulátor nebo trafo; váha 1,9 kg

COMARR PARDUBICE

Jsme ryze česká společnost pracující v oboru výpočetní techniky, programování aplikací, projekcí a realizací slaboproudých systémů.

ComArr

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 pomoct se strukturovanou kabeláží ?

Konzultujte své potřeby s našimi odborníky.:

- Požární a zabezpečovací signalizace.
- kamerové a video systémy,
- inteligentní elektroinstalace, programovatelné systémy

Projektový a heldeskový systém TASKPOOL

TaskPool je moderní helpdeskový webový systém pro výrazné zefektivnění správy požadavků a řízení firemních procesů.

Výhody helpdesk systému TaskPool:

- Šetří firemní náklady
- Přizpůsobeno pro použití z mobilních telefonů
- Plně nastavitelný helpdesk na Vašich webových stránkách
- Správa požadavků přes webové rozhraní, přístup odkudkoli
- Uchovávání kompletní historie komunikace (nelze mazat)
- Mapování a optimalizace firemních procesů

Za 24 let své působnosti na trhu jsme získali cenné zkušenosti a stali se silným partnerem pro tisíce spokojených zákazníků.

Kontakty:

ComArr, spol. s. r. o.

Tolarova 291

533 51 Pardubice

ič: 15050084

dič: CZ15050084

www.comarr.cz

Tel.: +420 466 889 111

E-mail: info@comarr.cz

DropSens

ISBN 978-80-905221-3-8