

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

304 417

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

G01N 27/31 (2006.01)
C07C 49/747 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2012-222**
(22) Přihlášeno: **30.03.2012**
(40) Zveřejněno: **09.10.2013**
(Věstník č. 41/2013)
(47) Uděleno: **12.03.2014**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **23.04.2014**
(Věstník č. 17/2014)

(56) Relevantní dokumenty:
Analytica Chimica Acta, 289, 1994, str. 15-20; XP026592924; Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 13, 1984, str. 55-69; XP026726615.
WO 01/88524 A; 66646; 66647; 66648; 66649; 66650.

(73) Majitel patentu:
Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha 4 -
Krč, CZ
Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v
Olomouci, Olomouc, CZ
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v
Olomouci, Olomouc, CZ

(72) Původce:
Ing. Jan Vacek, Ph.D., Brno - Nový Lískovec, CZ
doc. Jan Hrbáč, Ph.D., Horka nad Moravou, CZ
Mgr. Vladimír Halouzka, Olomouc, CZ
Mgr. Petr Jakubec, Budišov nad Budišovkou, CZ
Ing. Jiří Kopecký, CSc., Třeboň, CZ

(54) Název vynálezu:
**Film elektrooxidovaného nostotrebinu 6 s
permsektivními vlastnostmi pro
nízkomolekulární biologicky aktivní látky,
elektrochemický senzor a způsob stanovení
těchto látek**

(57) Anotace:
Film elektrooxidovaného nostotrebinu 6 připravitelný
elektrosyntézou kompaktního filmu z nostotrebinu 6,
2,2'-bis[4,5-bis(4-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyfenyl)-
cyklopent-4-en-1,3-dionu], na elektrodách z uhlíku
(skelný uhlík, uhlíkové vlákno), zlata, platiny a
obdobných pevných elektrod. Elektrosyntéza je založena
na polarizaci elektrody konstantním nebo cyklicky se
měnícím potenciálem 600 až 1000 mV (vs. Ag/AgCl) v
podpurném elektrolytu (pH 7 až 14), který obsahuje
nostotrebin 6. Získané permsektivní filmy mohou být
využity při výrobě elektrochemických senzorů a mohou
tak zajišťovat jejich selektivitu.

CZ 304417 B6

Film elektrooxidovaného nostotrebinu 6 s permselektivními vlastnostmi pro nízko-molekulární biologicky aktivní látky, elektrochemický senzor a způsob stanovení těchto látek

5

Oblast techniky

Vynález se týká elektrooxidace nostotrebinu 6: 2,2'-bis[4,5-bis(4-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyfenyl)cyklopent-4-en-1,3-dionu], za účelem vytvoření kompaktního filmu na pevných povrchích – elektrodách, které je možné využít jako elektrochemické senzory pro analýzu biologicky aktivních látek.

Dosavadní stav techniky

15

Elektrochemická detekce analytu v přítomnosti interferujících látek je na obvyklých elektrodových povrchích možná pouze tehdy, liší-li se dostatečně elektrodové potenciály redox přeměn analytu a interferentu. V opačném případě je nutné pokrýt elektrodový povrch filmem zajišťující selektivitu stanovení. Pro omezení interferencí při elektrochemických analýzách se nejčastěji využívá kompaktních permselektivních filmů vytvořených na povrchu elektrody. Tyto filmy zajišťují selektivitu stanovení na základě 1/ rozdílné velikosti molekul (size exclusion), 2/ rozdílného náboje (charge exclusion) a 3/ rozdílné hydrofobicity či hydrofilicity (hydrophobic/hydrophilic exclusion) analytu a interferentu, který filmem prochází, resp. neprochází. K přípravě filmů se využívají dva základní přístupy [1]:

25

1. „Solvent casting“, tj. nanesení roztoku látky tvořící film na povrch elektrody a následné odpaření rozpouštědla. Typickým příkladem jsou filmy z Nafionu, acetátu celulózy, polyvinylchloridu, chloroprenu a polysiloxanu.
2. Elektrosyntéza, tj. elektrochemicky iniciovaná tvorba filmu na povrchu elektrody. Tento postup je vhodný, jelikož je možné ovlivnit vlastnosti vytvářeného filmu jako je jeho mocnost a velikost pórů změnou koncentrace deponované látky, volbou vhodných aditiv a rozpouštědel.

Na elektrodě vyloučené permselektivní filmy jsou využívány pro elektrochemickou analýzu širokého spektra biologicky aktivních látek a jejich metabolitů [2]. Jako příklad permselektivních filmů, vytvořených elektrosyntézou, je oxidovaný (overoxidized) polypyrrol [3], polyethylenimin [4], polyfenylendiamin [5] a deriváty fenolu. Mezi nejvýznamnější aplikace permselektivních filmů patří odstranění interferencí při stanovení glukosy pomocí glukosového biosenzoru [6], popřípadě při elektrochemickém stanovení oxidu dusnatého (NO) v buněčných systémech. Jeden z prvních NO senzorů byl navržen Malinským a Tahou [7]. Senzor je tvořen uhlíkovým mikrovláknem opatřeným filmem připraveným z Ni^{II} tetrakis(3-methoxy-4-hydroxyfenyl)porfyrinu. Dále jsou používány senzory s imobilizovaným permselektivním filmem z resorcinolu [8] a senzory na bázi eugenolu a 3-hydroxyfenyloctové kyseliny [9]. Permselektivitu těchto filmů lze ovlivňovat aditivy jako je sulfid sodný [10]. Díky unikátním aplikacím těchto kompaktních filmů v elektroanalytické chemii jsou hledány nové sloučeniny, ze kterých by bylo možné elektrochemickou cestou kompaktní filmy připravit.

45

Literatura:

1. P. H. Treloar, I. M. Christie, and P. M. Vadgama, Biosensors and Bioelectronics 10, 195–201, 1995.
2. S. Cosnier, Analytical and Bioanalytical Chemistry 377, 507 až 520, 2003
3. S. Pati, M. Quinto, F. Palmisano, and P. G. Zambonin, Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 4638 až 4642, 2004.

50

4. O. Segut, G. Herlem, B. Lakard, V. Blondeau-Patissier, M. Nardin, S. Gree, and J.-Y. Rauch, *Synthetic Metals* 160, 1359 až 1364, 2010.
5. S. A. Rothwell, S. J. Killoran, E. M. Neville, A. M. Crotty, and R. D. O'Neill, *Electrochemistry Communication* 10, 1078 až 1081, 2008.
- 5 6. W.-Z. Jia, K. Wang, and X.-H. Xia, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29, 306 až 318, 2010.
7. T. Malinski, Z. Taha, Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor, *Nature* 358, 676 až 678, 1992.
8. M. Pontié, F. Bedioui, J. Devynck, *Electroanalysis* 11, 845 až 850, 1999.
- 10 9. M. Groppe, S. Thanos, W. Schuhmann, P. Heiduschka, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376, 797 až 807, 2003.
10. R. Lapuente, C. Quijada, F. Huerta, F. Cases, J. L. Vazquez, *Polymer Journal*, 35, 911 až 919, 2003.

15

Podstata vynálezu

Podstata vynálezu spočívá v elektrooxidaci nostotrebinu 6: 2,2'-bis[4,5-bis(4-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyfenyl)cyclopent-4-en-1,3-dionu] (Obr. 1), na povrchu uhlíkových a kovových elektrod. Elektrooxidace nostotrebinu 6 vede k vytvoření kompaktního filmu na povrchu elektrod, které mohou být použity pro selektivní stanovení analytů v nadbytku interferujících látek.

Elektrooxidace nostotrebinu 6 probíhá při potenciálu $E_p \geq 600$ mV vs. Ag/AgCl (Obr. 2A) a vede k vytvoření kompaktního filmu na povrchu elektrody v pufrovaném mediu při $pH \geq 7$. Pro přípravu filmu je možné použít: a/ Elektrosyntézu při konstantním potenciálu, jehož hodnota je 800 mV vs. Ag/AgCl. b/ Elektrosyntézu cyklickými změnami potenciálu, kdy je elektroda periodicky polarizována potenciály 600 až 100 mV vs. Ag/AgCl. K důkazu tvorby filmu elektrooxidovaného nostotrebinu 6 na povrchu elektrod byly použity křemenné krystalové mikrováčky (QCM). Elektrochemický QCM profil je ukázán na Obr. 2B. Pozorovaný pokles frekvence křemenného krystalu (ponořeného do roztoku nostotrebinu 6) při potenciálech ≥ 600 mV vs. Ag/AgCl potvrzuje tvorbu filmu na jeho zlaceném povrchu (viz Obr. 2B). Postup QCM experimentu je uveden v Příkladu 1.

Elektrooxidace nostotrebinu 6 probíhá snadno na zlatých a uhlíkových površích, na platinové elektrodě byl pozorován posun oxidačního píku nostotrebinu 6 ke kladnějším potenciálům. Film elektrooxidovaného nostotrebinu 6 se tvoří na povrchu platiny při potenciálech $E_p \geq 700$ mV (vs. Ag/AgCl) (Obr. 3). Postup vedoucí k vytvoření filmu na povrchu pevných kovových a uhlíkových elektrod je rozveden v Příkladu 2.

Film elektrooxidovaného nostotrebinu 6 lze vytvořit také na povrchu elektrody z uhlíkového mikrovlákna (CF), jejíž výroba je popsána v Příkladu 3. CF elektroda byla nejprve vystavena rychlým změnám potenciálu, což vede ke vzniku kyslík obsahujících funkčních skupin („grafitického oxidu“) na jejím povrchu. Film elektrooxidovaného nostotrebinu 6 vyloučený na povrchu takto předupraveného povrchu je ukázán na mikrografu na Obr. 4. Konkrétní postup vedoucí k pokrytí CF filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6 je demonstrován v Příkladu 4.

Byly prokázány permselektivní vlastnosti filmu elektrooxidovaného nostotrebinu 6 vytvořené na povrchu zlaté a platinové elektrody. Permselektivita byla studována metodou cyklické voltametrie u snadno oxidovatelných biologicky aktivních látek jako je askorbát, dopamin, paracetamol, urát a dusitan. Postup testování je uveden v Příkladu 5. Bylo zjištěno, že film vytvořený na zlaté (nebo platinové) elektrodě je schopen zabránit oxidaci testovaných látek nesoucích záporný náboj, tj. askorbátového a dusitanového aniontu. Naproti tomu dopamin a částečně i paracetamol a urát filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6 proniká. Výše popsané výsledky jsou ukázány na

Obr. 5 v případě zlaté elektrody. Platinová elektroda modifikovaná filmem poskytuje analogické výsledky.

5 Permselectivní vlastnosti filmu elektrooxidovaného nostotrebinu 6 vytvořeného na povrchu uhlíku byly zkoumány pomocí CF elektrod. Permselectivní vlastnosti CF elektrod modifikovaných filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6 (Obr. 6) se nepatrně liší od permselectivity filmu vytvořeného na povrchu pevných kovových elektrod. Filmy elektrooxidovaného nostotrebinu 6 vytvořené na povrchu CF zabraňuje oxidaci askorbátu, dusitanu, urátu a paracetamolu. Naproti 10 tomu proudová odezva kladně nabitého dopaminu je potlačena částečně (Obr. 6C). Dopamin je tedy možné za uvedených podmínek stanovit ve vzorcích, které zpravidla obsahují značné množství interferujících snadno oxidovatelných látek. Elektroda vyrobená ze skelného uhlíku modifikovaná filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6 poskytuje analogické výsledky jako CF elektroda.

15 Stanovení dopaminu bylo provedeno pomocí zlaté a CF elektrody modifikované filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6 pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV) a amperometrie za přítomnosti interferentu. Jako interferující látka byl zvolen askorbát, který běžně komplikuje analýzy dopaminu v nervové tkáni. DP voltamogramy dopaminu na zlaté elektrodě jsou ukázány na Obr. 7. Dopamin v přítomnosti askorbátu na filmem modifikované elektrodě poskytuje oxidační 20 pík kolem potenciálu 0,15 V (vs. Ag/AgCl) a to nezávisle na tom zda je v analyzovaném vzorku askorbát přítomen (Obr. 7A) či nikoliv (obr. 7C). Pokud je pro analýzu dopaminu v přítomnosti askorbátu použita elektroda, která nebyla filmem modifikována je možné pozorovat pík askorbátu kolem potenciálu 0,35 V (vs. Ag/AgCl). Interferující proudy askorbátu zasahují do proudové odezvy dopaminu a zkreslují tak jeho elektrochemické stanovení. Konkrétní provedení experimentu je uvedeno v Příkladu 6. 25

Obdobná situace jako u zlaté elektrody nastává při amperometrické analýze s CF elektrodou (Obr. 8). Pokud není CF elektroda modifikovaná filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6 dochází k nárůstu proudové odezvy jak pro askorbát tak i pro dopamin (Obr. 8A). V případě, že je 30 elektroda filmem modifikována lze pozorovat odezvy dopaminu, přičemž proudové odezvy askorbátu jsou významně potlačeny (Obr. 8B). Detailní provedení amperometrického experimentu je uvedeno v Příkladu 7.

35 Film elektrooxidovaného nostotrebinu 6 má tedy permselectivní vlastnosti pro nízkomolekulární biologicky aktivní látky a je připravitelný z 2,2'-bis[4,5-bis(4-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyfenyl)cyclopent-4-en-1,3-dionu] na pevných kovových nebo uhlíkových površích elektrochemickou syntézou za použití konstantního nebo cyklicky se měnícího potenciálu elektrolýzy $E \geq 600$ mV (vs. Ag/AgCl) v pufovaném mediu při $\text{pH} \geq 7$.

40

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1: Nostotrebin 6: 2,2'-bis[4,5-bis(4-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyfenyl)cyclopent-4-en-1,3-dion].

45

Obr. 2: Voltamogram (A) a odpovídající elektrochemický profil QCM (B) nostotrebinu 6 (1×10^{-4} M v 50 mmol.l⁻¹ PBS, pH 7,4) na zlaceném křemenném krystalu; $\Delta f = f - f(\text{ref})$, tj. změna frekvence vzhledem k frekvenci referenčního krystalu. Pokles Δf indikuje vzrůst hmotnosti materiálu deponovaného na elektrodě. Čísla v obrázcích udávají pořadí příslušného skenovacího cyklu voltamogramu. Detaily provedení experimentu jsou popsány v Příkladu 1. 50

Obr. 3: Cyklické voltamogramy nostotrebinu 6 (1×10^{-4} M v 50 mmol.l⁻¹ PBS pH 7,4) na zlaté (A), skelné uhlíkové (B), platinové elektrodě (C) a elektrodě z uhlíkového mikrovlnáka (D). Provedení experimentu je uvedeno v Příkladu 2 pro pevné kovové (Au, Pt) elektrody a uhlíkovou 55 elektrodu, a v Příkladu 4 pro CF elektrodu, jejíž konstrukce je popsána v Příkladu 3.

Obr. 4: Elektronový snímek filmu elektrooxidovaného nostotrebinu 6 na povrchu elektrody vyrobené z uhlíkového mikrovlákna podle Příkladu 3.

5 Obr. 5: Cyklické voltamogramy askorbátu (A), dusitanu (B), dopaminu (C), paracetamolu (D) a urátu (E) na zlaté elektrodě bez povrchové úpravy (tečkované čáry) a elektrodě pokryté filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6 (plné čáry). Koncentrace testovaných látek: $1 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, základní elektrolyt: 50 mmol.l^{-1} PBS, (pH 7,4). Postup je uveden v Příkladu 5.

10 Obr. 6: Cyklické voltamogramy askorbátu (A), dusitanu (B), dopaminu (C), paracetamolu (D) a urátu (E) na elektrodě z uhlíkového vlákna po elektrochemické předúpravě (tečkované čáry) a stejné elektrodě pokryté filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6 (plné čáry). Koncentrace testovaných látek: $1 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, základní elektrolyt: 50 mmol.l^{-1} PBS, (pH 7,4). Postup je uveden v příkladu 5.

15 Obr. 7: Diferenční pulsní voltamogramy dopaminu (0 až $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) v přítomnosti nadbytku askorbátu (1 mmol.l^{-1}) na zlaté elektrodě pokryté filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6 (A). Pro srovnání je uvedeno identické měření na zlaté elektrodě bez filmu elektrooxidovaného nostotrebinu 6 (B) a měření na zlaté elektrodě pokryté filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6 v nepřítomnosti askorbátu (C). Postup získání DPV záznamů na zlaté elektrodě je uveden v Příkladu 6.

20 Obr. 8: Amperometrické stanovení dopaminu na CF elektrodě v přítomnosti askorbátu (A). Pro srovnání je uvedeno identické měření na elektrodě pokryté filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6 (B). Přípravek dopaminu (finální koncentrace v elektrochemické cele) byl $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a askorbátu 2 mmol.l^{-1} . Postup měření je uveden v Příkladu 7.

Příklady provedení vynálezu

30

Příklad 1

35 Důkaz tvorby filmu elektrooxidací nostotrebinu 6 pomocí křemenných krystalových mikrováček (QCM)

40 1/ Zlatem pokrytý křemenný krystal byl vložen do elektrochemické QCM cely obsahující roztok $1 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ nostotrebinu 6 v 50 mmol.l^{-1} PBS, pH 7,4) o laboratorní teplotě ($25 \text{ }^\circ\text{C}$). PBS (izotonický roztok pufrovaný fosfáty) byl předem připraven rozpuštěním $0,456 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4$, $2,3 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4$ a $8,68 \text{ g NaCl}$ v 1 l deionizované vody.

2/ Následovalo vložení referentní a pomocné elektrody, připojení elektrodového systému k potenciostatu umožňujícímu simultánní záznam voltamogramu a QCM záznamu.

3/ Byl proveden CV scan.

45

Příklad 2

Tvorba filmu elektrooxidovaného nostotrebinu 6 na pevných kovových (Au, Pt) uhlíkových (skelný uhlík) elektrodách)

50 1/ Povrch elektrody (Au, Pt, skelný uhlík) byl nejprve očištěn vyleštěním na podložce z filtračního papíru nebo kůže, která byla navlhčena suspenzí aluminu o velikosti částic $0,05 \mu\text{m}$.

2/ Elektroda byla zbavena aluminy opláchnutím deionizovanou vodou, poté byla ponořena do deionizované vody a krátce vystavena působení ultrazvuku. Poté byla opět opláchnuta deionizovanou vodou.

3/ V případě kovových (Au, Pt) elektrod bylo navíc použito elektrochemické čištění, kdy byla elektroda vložena do elektrochemické cely obsahující 0,5 M roztok H_2SO_4 . Následovalo vložení referentní a pomocné elektrody, připojení elektrodového systému k potenciostatu a cyklování potenciálu mezi -200 a 1200 mV (vs. Ag/AgCl), 10 cyklů při rychlosti polarizace elektrody 1 V/sec. Skenování bylo ukončeno při -200 mV a elektroda byla opláchnuta deionizovanou vodou.

4/ Elektroda byla vložena do elektrochemické cely obsahující 2 ml roztoku 1×10^{-4} mol.l⁻¹ nostotrebinu 6 v 50 mmol.l⁻¹ PBS (pH 7,4) o laboratorní teplotě (25 °C). PBS (izotonický roztok pufovaný fosfáty) byl předem připraven rozpuštěním 0,456 g NaH_2PO_4 , 2,3 g Na_2HPO_4 a 8,68 g NaCl v 1 l deionizované vody. Následovalo vložení referentní a pomocné elektrody, připojení elektrodového systému k potenciostatu.

5/ K vytváření filmu elektrooxidovaného nostotrebinu 6 na elektrodě byla použita cyklická změna potenciálů v rozmezí 0 až 900 mV vs. Ag/AgCl při rychlosti polarizace 1 V/sec po dobu 60 s.

6/ Elektroda s vytvořeným polymerním filmem byla opláchnuta deionizovanou vodou.

Příklad 3

Postup výroby elektrody z uhlíkového mikrovlákna (CF)

Uhlíkové vlákno (CF) o průměru 7 až 8 μm (Courtaulds XA-S, typ α) bylo přilepeno k měděnému drátku pomocí elektricky vodivého epoxidového lepidla. Vytvrzení spoje bylo prováděno v elektricky vyhřívané sušárně při 130 °C po dobu 25 minut. Tělo elektrody tvořila skleněná kapilára o délce 3 cm a vnitřním průměru 1 mm, jejíž jeden konec byl zúžen vytažením nad plamenem. Uhlíkové vlákno s měděným drátkem bylo prostrčeno otvorem skleněné trubičky tak, aby vyčnívalo ze zúženého konce (5 mm), poté bylo uhlíkové vlákno resp. měděný drátek ve skleněném těle elektrod fixován epoxidovou pryskyřicí. Vytvrzení těchto spojů probíhalo při pokojové teplotě.

Příklad 4

Tvorba filmu elektrooxidovaného nostotrebinu 6 na elektrodách vyrobených z uhlíkového mikrovlákna (CF)

1/ CF elektroda byla odmaštěna a zbavena nečistot na povrchu ponořením do dichlormethanu a vystavena působení ultrazvuku (10 s).

2/ CF elektroda byla vložena do elektrochemické cely obsahující 1% roztok NaCl, nebo jiný elektrolyt, 50 mM PBS (pH 7,4) o laboratorní teplotě (25 °C). PBS (izotonický roztok pufovaný fosfáty) byl předem připraven rozpuštěním 0,456 g NaH_2PO_4 , 2,3 g Na_2HPO_4 a 8,68 g NaCl v 1 l deionizované vody.

3/ Následovalo vložení referentní a pomocné elektrody, připojení elektrodového systému k potenciostatu.

4/ Elektroda byla po zvolenou dobu (30 s) polarizována rychlými (50 Hz, sinus) změnami potenciálu od 0 do 3 V (vs. Ag/AgCl).

5/ Elektroda byla vložena do elektrochemické cely obsahující 2 ml roztoku 1×10^{-4} mol.l⁻¹ nostotrebinu 6 v 50 mmol.l⁻¹ PBS (pH 7,4). PBS (izotonický roztok pufovaný fosfáty) byl předem připraven rozpuštěním 0,456 g NaH_2PO_4 , 2,3 g Na_2HPO_4 a 8,68 g NaCl v 1 l deionizované vody. Následovalo vložení referentní a pomocné elektrody, připojení elektrodového systému k potenciostatu.

6/ K vytváření filmu elektrooxidovaného nostotrebinu 6 na elektrodě docházelo při potenciálu ≥ 600 mV vs. Ag/AgCl.

Pro přípravu filmu byla použita cyklická změna potenciálů v rozmezí 0 až 900 mV vs. Ag/AgCl při rychlosti polarizace 1 V/sec po dobu 60s.

- 5 7/ Elektroda s vytvořeným polymerním filmem byla opláchnuta deionizovanou vodou.

Příklad 5

10 Postup měření cyklických voltamogramů vybraných biologicky aktivních látek na elektrodách bez povrchové úpravy a elektrodách pokrytých filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6

1/ Elektrody (Au, Pt, skelný uhlík) byly nejprve očištěny způsobem uvedeným v bodech 1 až 3 Příkladu 2, v případě CF elektrody je postup uveden v bodech 1 až 4 Příkladu 4. Takto očištěné elektrody byly použity pro měření cyklických voltamogramů aniž by jejich povrch byl modifikován filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6. Pro pokrytí elektrod filmem bylo použito postupu uvedeného v Příkladu 2 (Au, Pt, skelný uhlík), v případě CF elektrody je postup uveden v Příkladu 4.

2/ Testovaná elektroda byla vložena do elektrochemické cely obsahující 50 mM PBS (pH 7,4) o laboratorní teplotě (25 °C), ve kterém byla rozpuštěna testovaná látka (askorbát, dusitan sodný, dopamin, paracetamol, urát), jejíž výsledná koncentrace v roztoku činila 1×10^{-3} mol.l⁻¹. PBSS (izotonický roztok pufrovaný fosfáty) byl předem připraven rozpuštěním 0,456 g NaH₂PO₄, 2,3 g Na₂HPO₄ a 8,68 g NaCl v 1 l deionizované vody.

3/ Následovalo vložení referentní a pomocné elektrody, připojení elektrodového systému k potenciostatu.

25 4/ Cyklický voltamogram byl snímán v rozmezí 0 až 900 až 0 mV vs. Ag/AgCl s polarizační rychlostí 50 mV/sec.

Příklad 6

30 Stanovení dopaminu za přítomnosti askorbátu na zlaté elektrodě pokryté filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6 metodou diferenční pulzní voltametrie (DPV)

1/ Zlatá elektroda byla opatřena filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6 postupem uvedeným v Příkladu 2.

35 2/ Připravená elektroda byla vložena do elektrochemické cely obsahující roztok složený ze základního elektrolytu, 25 ml 50 mmol.l⁻¹ PBS (pH 7,4) o laboratorní teplotě (25 °C), do kterého byl přidán testovaný vzorek obsahující askorbát, dopamin nebo směs obou látek. PBS (izotonický roztok pufrovaný fosfáty) byl předem připraven rozpuštěním 0,456 g NaH₂PO₄, 2,3 g Na₂HPO₄ a 8,68 g NaCl v 1 l deionizované vody.

40 3/ Následovalo vložení referentní a pomocné elektrody, připojení elektrodového systému k potenciostatu.

4/ Byl proveden DPV scan.

45 Příklad 7

Amperometrické stanovení dopaminu v přítomnosti askorbátu na elektrodě z uhlíkového mikrovlákna pokryté filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6

1/ Elektroda byla opatřena filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6 podle Příkladu 4.

50 2/ Připravená elektroda byla vložena do elektrochemické cely obsahující známý objem základního elektrolytu, 25 ml 50 mmol.l⁻¹ PBS (pH 7,4) o laboratorní teplotě (25 °C). PBS (izotonický

roztok pufrovaný fosfáty) byl předem připraven rozpuštěním 0,456 g NaH₂PO₄, 2,3 g Na₂HPO₄ a 8,68 g NaCl v 1 l deionizované vody.

3/ Cella byla umístěna na magnetickou míchačku a vloženo magnetické míchadlo.

5 4/ Následovalo vložení referentní a pomocné elektrody, připojení elektrodového systému k potenciostatu.

5/ Elektroda byla polarizována konstantním potenciálem (600 mV vs. Ag/AgCl), který byl zvolen tak, aby dosahoval nebo převyšoval limitní proud dopaminu (cca 400 mV vs. Ag/AgCl). Bylo zapnuto míchání elektrolytu v cele.

10 6/ Po ustálení základní proudové odezvy (10 minut) byly do elektrochemické cely opakovaně injikovány přídavky dopaminu (10 µl, výsledná koncentrace dopaminu v cele 20 µmol.l⁻¹). Měření bylo provedeno za obdobných přídavků interferující látky – askorbátu (10 µl, výsledná koncentrace askorbátu v cele 2 mmol.l⁻¹).

15 Průmyslová využitelnost

Elektrody pokryté filmem elektrooxidovaného nostotrebinu 6 (2,2'-bis[4,5-bis(4-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyfenyl)cyklopent-4-en-1,3-dion]) mohou být využity jako elektrochemické senzory vhodné k analýze nízkomolekulárních biologicky aktivních látek v přítomnosti inter-

20 ferentů.

25 PATENTOVÉ NÁROKY

1. Film elektrooxidovaného nostotrebinu 6 s permsektivními vlastnostmi pro nízkomolekulární biologicky aktivní látky připravitelný na pevných kovových nebo uhlíkových površích elektrochemickou syntézou při konstantním nebo cyklicky se měnícím potenciálu elektrolýzy $E \geq 600$ mV za použití referentní elektrody Ag/AgCl/3M KCl při pH ≥ 7 , probíhající v roztoku 2,2'-bis[4,5-bis(4-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyfenyl)cyklopent-4-en-1,3-dionu].

30

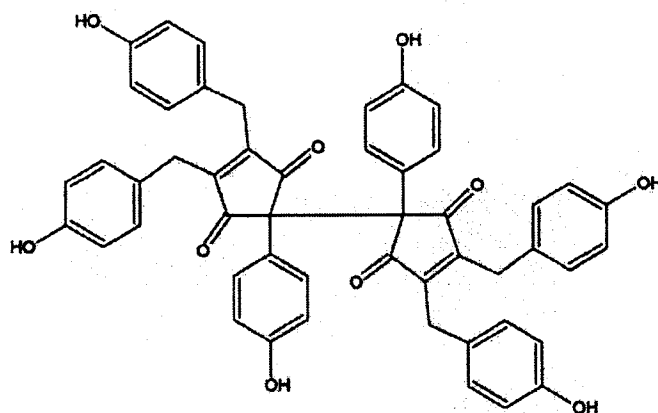
2. Způsob přípravy filmu podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že do roztoku 2,2'-bis[4,5-bis(4-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyfenyl)cyklopent-4-en-1,3-dionu] je ponořena elektroda s pevným kovovým nebo uhlíkovým povrchem, která je vystavena cyklicky se měnícímu potenciálu $E \geq 600$ mV za použití referentní elektrody Ag/AgCl/3M KCl při pH ≥ 7 .

35

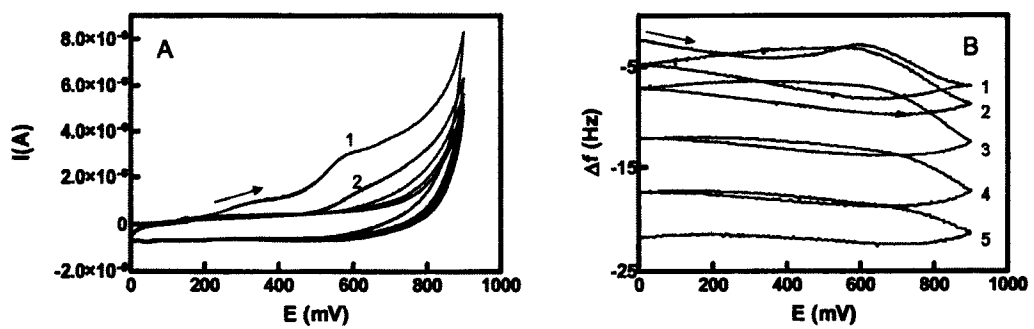
40

5 výkresů

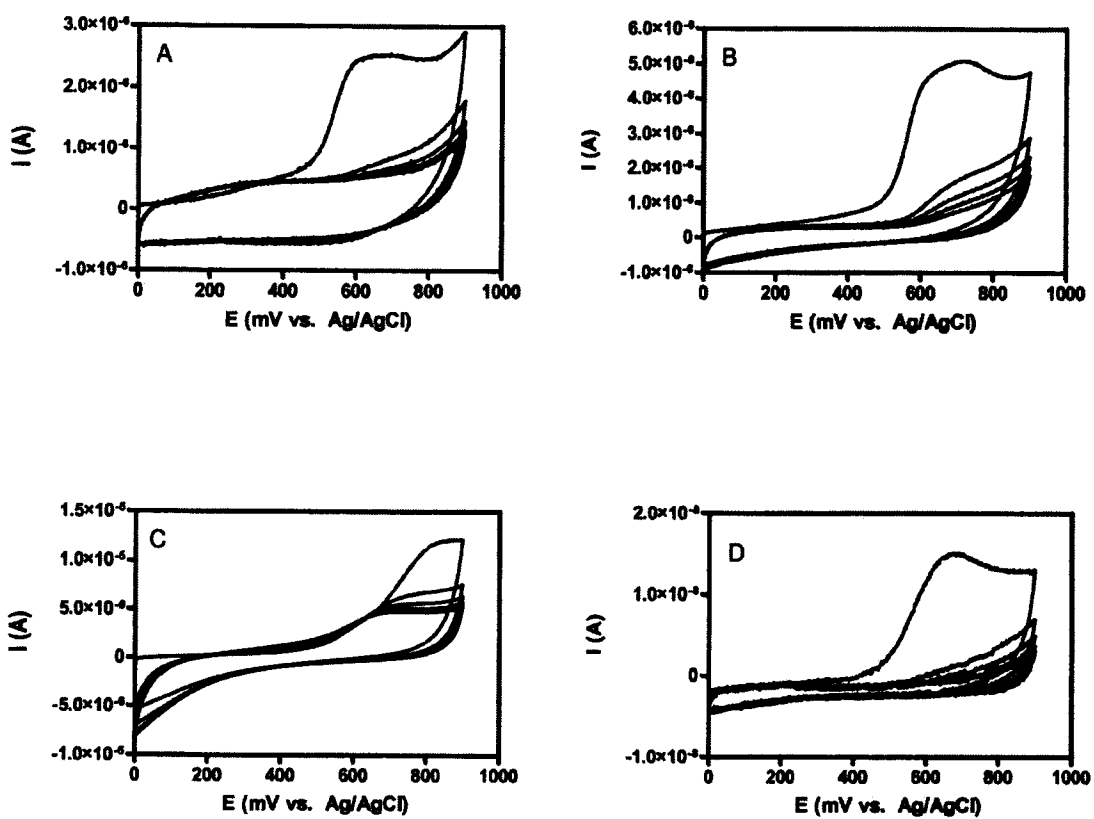
Obr. 1



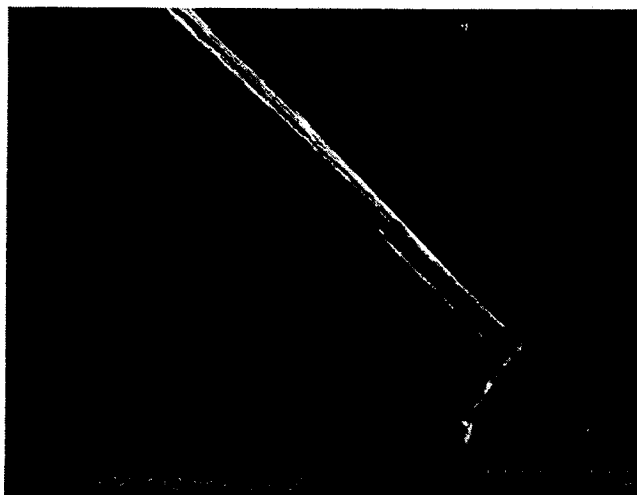
Obr. 2



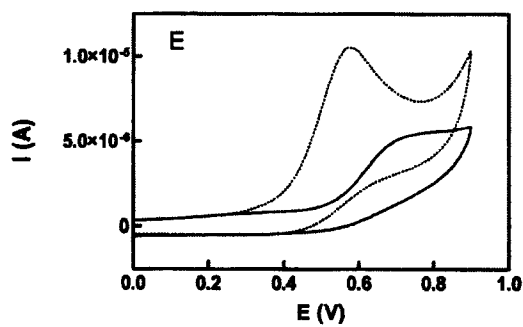
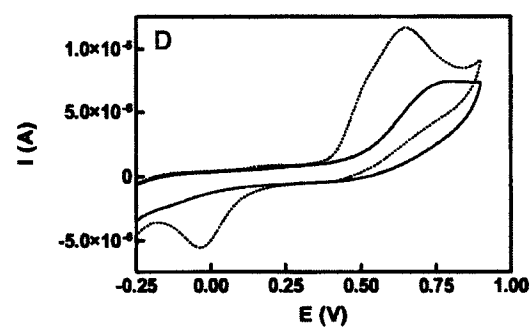
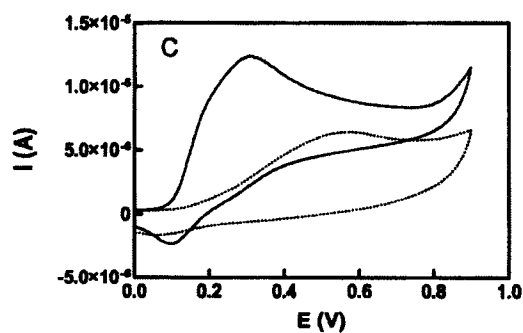
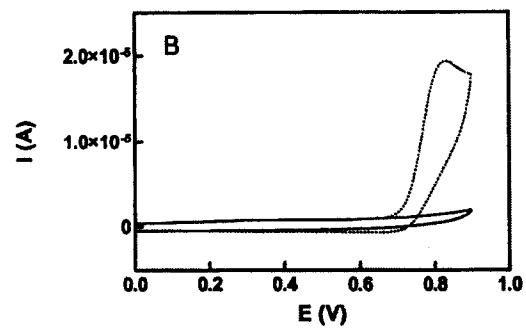
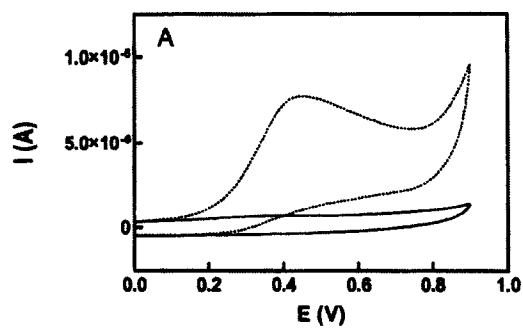
Obr. 3



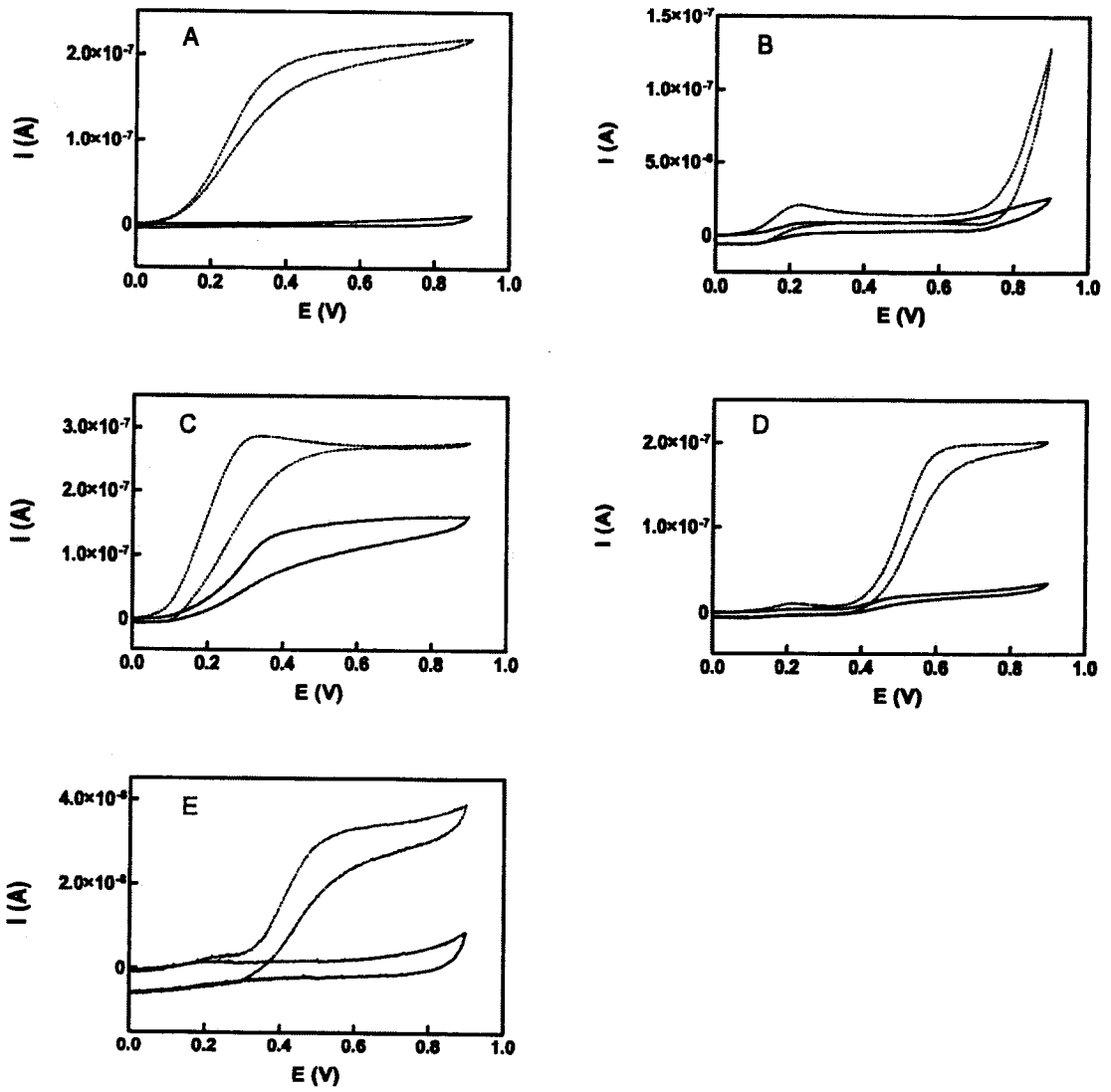
Obr. 4



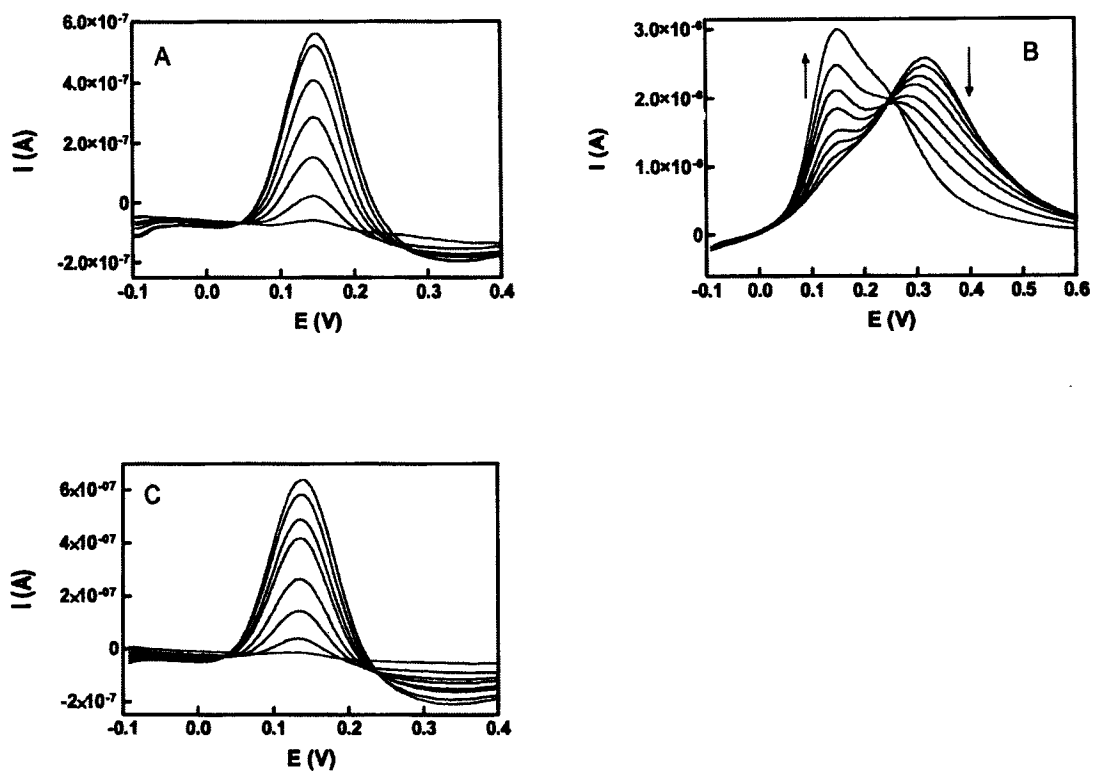
Obr. 5



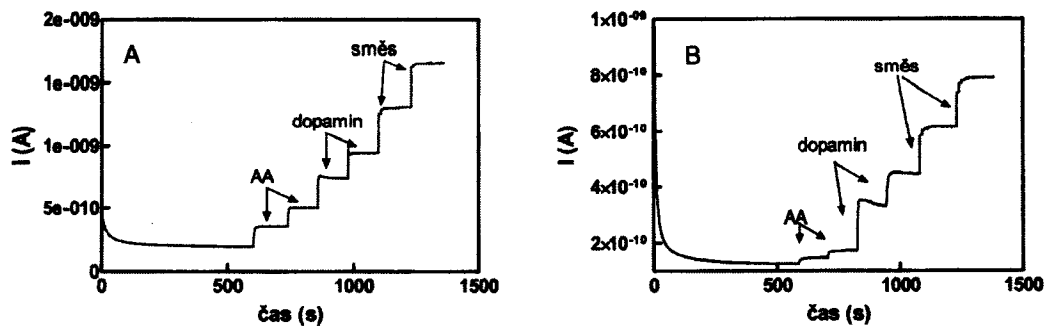
Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8



Konec dokumentu