

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

306 262

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

G01N 27/31 (2006.01)
C07C 49/747 (2006.01)
C08G 2/02 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSL OVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2015-249**
(22) Přihlášeno: **14.04.2015**
(40) Zveřejněno: **02.11.2016**
(Věstník č. 44/2016)
(47) Uděleno: **21.09.2016**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **02.11.2016**
(Věstník č. 44/2016)

(56) Relevantní dokumenty:

J. Hrbec a kol. The permselective layer prepared onto carbon and gold surfaces by electropolymerization of phenolic cyclopentenedione-nostotrebin 6. *Electrochemistry Communications*, 2014, 38, 53-56.; M.B.Gholivand a M. Amiri. Simultaneous detection of dopamine and acetaminophen by modified gold electrode with polypyrrole/azophloxine film. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 676 (2012) 53-59; Jia-Min Lin a kol. Strong adsorption characteristics of a novel overoxidized poly(3,4-ethylenedioxythiophene) film and application for dopamine sensing. *Electrochimica Acta* 149, 2014, 65-75; V. Halouzka a kol. Electrochemical Pretreatment of Carbon Fiber Microelectrodes Based on Sinusoidal-wave Potential Cycling and its Application to Amperometric Sensing of Bioactive Compounds. *Current Analytical Chemistry* 9, 2013, 305-311; Miao Yuqing, Chen Jianrong, Wu Xiaohua. Using electropolymerized non-conducting polymers to develop enzyme amperometric biosensors. *TRENDS in Biotechnology* 22, 2004, 227-231.
CZ.2012-222 A3.

(73) Majitel patentu:

Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
Ústav chemických procesů Akademie věd České republiky, Praha 6 Lysolaje, CZ
TRYSTOM, spol. s r.o., Olomouc, Klášterní Hradisko, CZ

(72) Původce:

doc. Ing. Jan Vacek, Ph.D., Olomouc, CZ
doc. RNDr. Jan Hrbáč, Ph.D., Horka nad Moravou, CZ
Mgr. Vladimír Halouzka, Ph.D., Olomouc, CZ
Ing. Marek Švarc, MBA, Výkleky, CZ
Ing. Martin Bernard, Praha 9, CZ
Ing. Jan Storch, Ph.D., Praha 10, CZ

(54) Název vynálezu:

Aplikace cyklopentendionů pro přípravu permselektivních vrstev pro nízkomolekulární biologicky aktivní látky

(57) Anotace:

Předmětem řešení je elektrosyntéza kompaktního polymerního filmu ze sloučenin obsahujících cyklopentendionový skelet, na elektrodách z uhlíku (skelný uhlík, uhlíkové vlákno), zlata, platiny a obdobných pevných elektrodách. Získané permselektivní vrstvy mohou být využity při výrobě elektrochemických senzorů a mohou tak zajišťovat jejich selektivitu. Elektrosyntéza je založena na polarizaci elektrody konstantním nebo cyklicky se měnícím potenciálem ≥ 200 mV (vs. Ag/AgCl/3 M KCl) ve vodném roztoku monomeru příslušného cyklopentendionu.

CZ 306262 B6

Aplikace cyklopentendionů pro přípravu permselektivních vrstev pro nízkomolekulární biologicky aktivní látky

5 Oblast techniky

Vynález se týká elektrochemické oxidace sloučenin obsahujících cyklopentendionový skelet za účelem vytvoření kompaktních permselektivních vrstev na pevných površích, např. elektrodách. Elektrody pokryté kompaktní permselektivní vrstvou cyklopentendionů je možné využít jako elektrochemické senzory pro analýzu biologicky aktivních látek.

Dosavadní stav techniky

15 Detekce analytu v přítomnosti interferujících látek pomocí elektrochemických metod je na obvyklých elektrodových površích možná pouze tehdy, pokud se dostatečně liší elektrodové potenciály redox přeměn analytu a interferujících látek. V opačném případě je nutné elektrodový povrch pokrýt vrstvou zajišťující selektivitu stanovení žádaného analytu. tzv. permselektivní vrstvou. Potlačení signálu interferentů při elektrochemických analýzách je nejčastěji realizováno
20 kompaktní permselektivní vrstvou vytvořenou či nanosenou na povrch elektrody. Permselektivní vrstvy zajišťují selektivitu stanovení na základě 1/ rozdílné velikosti molekul (nazývané též size exclusion), 2/ rozdílného náboje (nazývané též. charge exclusion) a 3/ rozdílné hydrofobicity či hydrofilicity (nazývané též hydrophobic/hydrophilic exclusion) analytu a interferentů, který vrstvou prochází, resp. neprochází. K přípravě permselektivních vrstev se využívají dvě základní
25 metody [1]:

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.

30 2. Elektrosyntéza. tj. elektrochemicky iniciovaná tvorba filmu na povrchu elektrody. Tento postup je výhodný, neboť je touto cestou možné ovlivnit vlastnosti vytvářené vrstvy, např. její mocnost nebo velikost pórů změnou koncentrace deponované látky, volbou vhodných aditiv a rozpouštědel.

35 Permselektivními vrstvami pokryté elektrody jsou využívány pro elektrochemickou analýzu řady biologicky aktivních látek, jejich prekurzoru nebo jejich metabolitů. Příkladem elektrosyntézou vytvořených vrstev může být oxidovaný (overoxidized) polypyrrol [2], polyethylenimin [3], případně polyfenylendiamin [4], poly[3-(7)helicen-9-yl]thiofen [5]. Mezi typické aplikace permselektivních vrstev patří odstranění interferencí při elektrochemickém stanovení glukosy pomocí glukosového biosenzoru [6], případně při elektrochemickém stanovení oxidu dusnatého (NO) [7]. Mezi velmi často elektrochemicky stanovovaný analyt za přispění permselektivních vrstev řadíme dopamin. Dopamin je látka patřící do skupiny katecholaminů, vzniká v mozku
40 obratlovců a funguje jako neurotransmitter umožňující přenos vzruchů. Poškození dopaminových drah je úzce spojeno se vznikem mnoha závažných onemocnění včetně Parkinsonovy choroby či schizofrenie. Rychlé a především selektivní stanovení dopaminu je důležité mimo jiné pro odhalení těchto patologií v raném stádiu. A právě rychlé a selektivní *in situ* stanovení dopaminu umožňují permselektivními vrstvami pokryté elektrochemické senzory.

50 Recentně bylo prokázáno, že efektivním monomerem pro přípravu permselektivních vrstev je fenolový cyklopentendion. konkrétně 2,2'-bis[4,5-bis(4-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyfenyl)-cyklopent-4-en-1,3-dion] [8, 9]. Z tohoto monomeru lze elektrosyntézou připravit permselektivní vrstvy vhodné pro elektroanalytické účely. Vzhledem k tomu, že výše uvedený monomer doposud nebyl připraven syntetickou cestou, je nutné jej získávat složitými a nákladnými biotechnologickými postupy. Z tohoto důvodu jsou pro účely přípravy permselektivních vrstev hle-

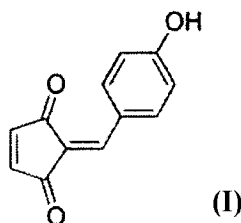
dány nové (strukturně jednodušší) cyklopentendionové monomery, vhodné pro účely elektrosyntézy a připravenelné s výrazně nižšími náklady.

Literatura:

- 5 1. P. H. Treloar, I. M. Christie, and P. M. Vadgama. *Biosensors and Bioelectronics* 10, 195–201, 1995.
2. S. Pati, M. Quinto, F. Palmisano, and P. O. Zambonin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4638–4642. 2004.
3. O. Segut. G. Herletn, B. Lakard. V. Blondeau–Patissier. M. Nardin, S. Gree. and J.–Y. Rauch. *Synthese Metals* 160, 1359–1364, 2010.
- 10 4. S. A. Rothwell. S. J. Killoran. E. M. Neville. A. M. Crotty, and R. D. O'Neill, *Electrochemistry Communication* 10, 1078–1081.2008.
5. J. Hrbac, J. Storch, V. Halouzka, V. Cirkva. P. Matějka, and J. Vacek, *RSC Advances* 4, 46102–46105, 2014.
- 15 6. W. Z. Jia, K. Wang, and X. H. Xia, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29, 306–318, 2010.
7. J. Hrbac, C. Gregor, M. Machova, J. Kralova. T. Bystron, M. Ciz, and A. Lojek. *Bioelectrochemistry* 71, 46–53, 2007.
8. J. Hrbac, P. Jakubec, V. Halouzka, P. Matějka, M. Pour. J. Kopecky, J. Vacek. *Electrochemistry Communications* 38, 53–56, 2014.
- 20 9. Film elektrooxidovaného nostotrebinu 6 s permselektivními vlastnostmi pro nízkomolekulární biologicky aktivní látky, elektrochemický senzor a způsob stanovení těchto látek: patent, č. přihlášky 2012–222, č. dokumentu CZ 304417.

25 Podstata vynálezu

Podstata vynálezu spočívá v elektrochemické oxidaci sloučeniny 2–(4–hydroxybenzyliden)–4–cyklopenten–1,3–dionu strukturního vzorce I.



30

Tuto elektrochemickou oxidaci lze provést na povrchu pevných elektrod, s výhodou uhlíkových a kovových, což vede k vytvoření kompaktního polymerního filmu na povrchu elektrod, které mohou být dále použity pro selektivní stanovení analytu v přítomnosti nadbytku interferujících látek.

35

Elektrochemická oxidace sloučeniny strukturního vzorce I probíhá z vodného roztoku při potenciálu $E \geq 200$ mV vs. Ag/AgCl/3 M KCl (obr. 1) a vede k vytvoření kompaktního filmu na povrchu elektrody. Pro přípravu vrstvy je možné použít: a/ Elektrosyntézu při konstantním potenciálu, jehož hodnota je ≥ 200 mV proti referenční Ag/AgCl/3 M KCl elektrodě, b/ Elektrosyntézu cyklickými změnami potenciálu, kdy je elektroda periodicky polarizována v anodickém směru potenciály ≥ 200 mV proti referenční Ag/AgCl/3 M KCl elektrodě. Tvorba vrstvy dle postupu b/ na povrchu elektrody ze skelného uhlíku je popsána v příkladu 1.

40

Polymerní film vytvořený na elektrodě elektrochemickou oxidací sloučeniny strukturního vzorce I je schopen zabránit oxidaci testovaných látek nesoucích záporný náboj, tj. askorbátového a ditanového aniontu (což jsou reálné interferenty). Naproti tomu nízkomolekulární organické lát-

45

ky, např. dopamin, vytvořenou vrstvou pronikají a lze je touto cestou stanovit i v přítomnosti nadbytku interferentů. Výše popsané výsledky jsou ukázány na obr. 2 v případě cyklopentendionového polymeru vytvořeného na povrchu elektrody ze skelného uhlíku. Postup testování je popsán v příkladu 2.

5

Objasnění výkresů

Obr. 1: Cyklické voltamogramy sloučeniny 2-(4-hydroxybenzyliden)-4-cyklopenten-1,3-dionu ($1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) strukturního vzorce I použité v příkladu 1 a příkladu 2, na skelné uhlíkové elektrodě. Provedení experimentu je uvedeno v příkladu 1.

10

Obr. 2: Cyklické voltamogramy askorbátu (A), dusitanu (B) a dopaminu (C) na elektrodě ze skelného uhlíku bez povrchové úpravy (tečkované čáry) a elektrodě pokryté polymerním cyklopentendionovým filmem (plné čáry). Koncentrace testovaných látek: $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, základní elektrolyt: 50 mmol l^{-1} PBS, (pH 7,4). Postup provedení experimentu je uveden v příkladu 2.

15

Příklady uskutečnění vynálezu

20

Příklad 1

Tvorba polymerního filmu na pevných uhlíkových (skelný uhlík) elektrodách ze sloučeniny 2-(4-hydroxybenzyliden)-4-cyklopenten-1,3-dionu strukturního vzorce I.

25

1/ Očištěná elektroda byla vložena do elektrochemické cely obsahující 5 ml roztoku $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ látky strukturního vzorce I o laboratorní teplotě ($25 \text{ }^\circ\text{C}$). Následovalo vložení referentní a pomocné elektrody, připojení elektrodového systému k potenciostatu.

30

2/ K vytváření polymerního filmu na elektrodě byla použita cyklická změna potenciálů v rozmezí 0 až 1200 mV vs. Ag/AgCl/3 M KCl při rychlosti polarizace 100 mV/s po dobu 120 s.

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

Příklad 2

35

Postup měření cyklických voltamogramů vybraných biologicky aktivních látek na elektrodách bez povrchové úpravy a elektrodách pokrytých polymerním filmem látky strukturního vzorce I.

40

1/ Očištěné elektrody byly použity pro měření cyklických voltamogramů aniž by jejich povrch byl modifikován polymerním filmem. Pro pokrytí elektrod polymerním filmem z látky strukturního vzorce I bylo použito postupu uvedeného v příkladu 1.

45

2/ Testovaná elektroda byla vložena do elektrochemické cely obsahující 50 mM PBS (pH 7,4) o laboratorní teplotě ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), ve kterém byla rozpuštěna testovaná látka (askorbát, dusitan sodný, dopamin), jejíž výsledná koncentrace v roztoku činila $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. 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.

50

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

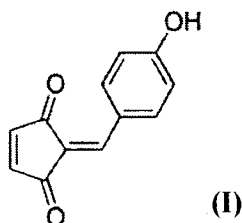
4/ Cyklický voltamogram byl zaznamenán v rozmezí $-100/1000/-100 \text{ mV}$ vs. Ag/AgCl/3 M KCl s rychlostí polarizace 100 mV/s.

Průmyslová využitelnost

Elektrody a obecně vodivé substráty pokryté kompaktním permselektivním polymerním filmem připraveným elektrochemickou oxidací cyklopentendionů mohou být využity jako senzory a čipové platformy vhodné k analýze nízkomolekulárních biologicky aktivních látek v přítomnosti interferentů.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Polymerní film připravitelný z vodného roztoku obsahujícího látku 2-(4-hydroxybenzyliden)-4-cyklopenten-1,3-dion, strukturního vzorce I



- elektrosyntézou při konstantním potenciálu, jehož hodnota je ≥ 200 mV proti referentní Ag/AgCl/3 M KCl elektrodě,
- nebo elektrosyntézou cyklickými změnami potenciálu, kdy je elektroda periodicky polarizována v anodickém směru potenciálem ≥ 200 mV proti referentní Ag/AgCl/3 M KCl elektrodě.

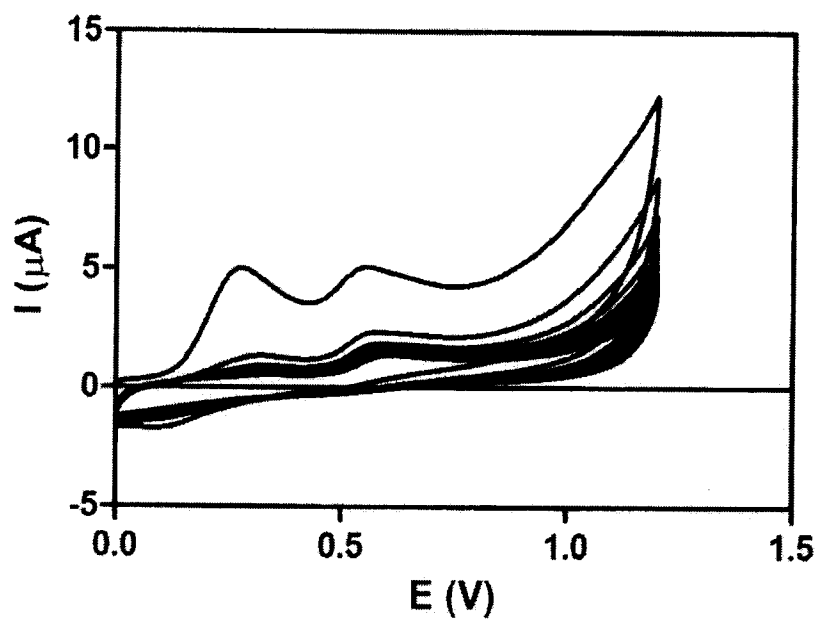
2. Elektroda pro stanovení nízkomolekulárních biologicky aktivních látek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že na svém povrchu obsahuje polymerní film podle nároku 1.

3. Elektroda pro stanovení nízkomolekulárních biologicky aktivních látek podle nároku 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že její aktivní část je vyrobena z uhlíku nebo kovu.

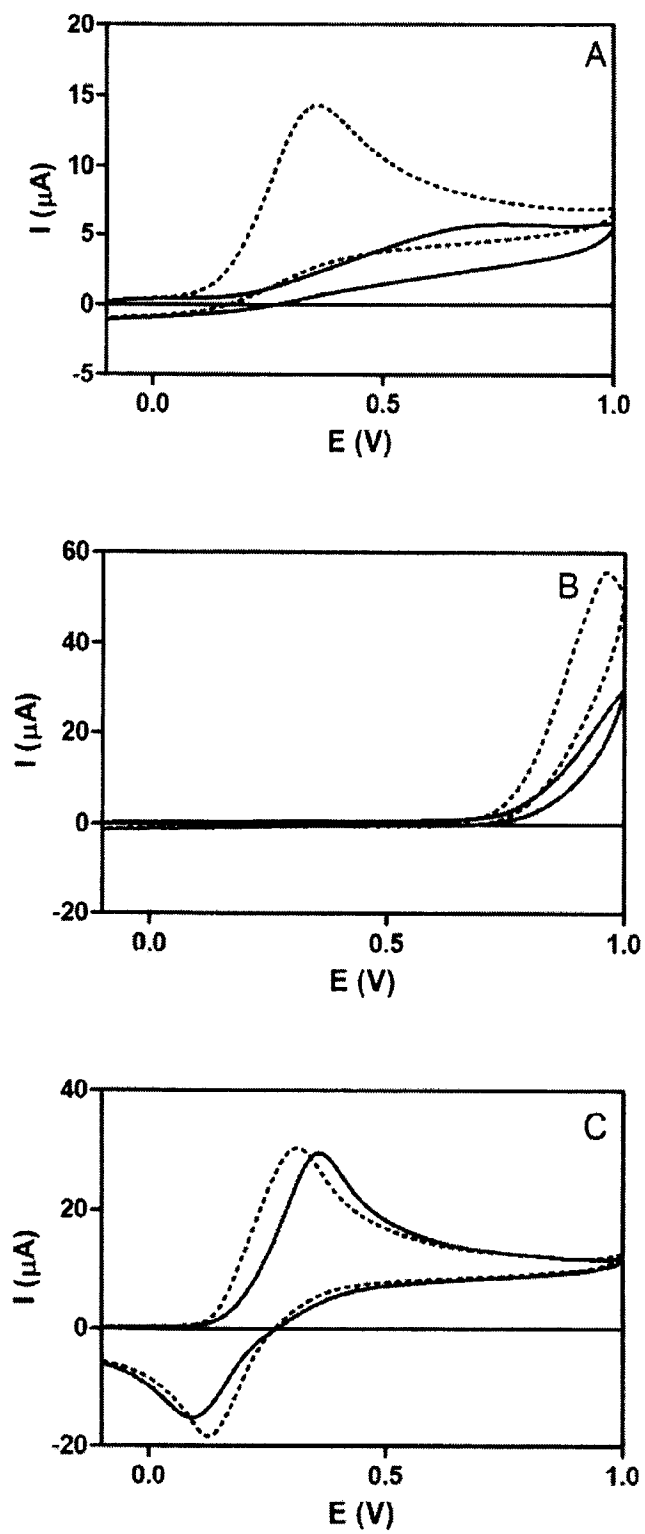
4. Elektrochemický senzor pro stanovení nízkomolekulárních biologicky aktivních látek, s výhodou dopaminu, v přítomnosti interferentů, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že jedna z elektrod použitá v senzoru je elektroda podle nároku 2.

2 výkresy

Obr. 1



Obr. 2



Konec dokumentu
