

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

Ampérometrie polyiontu heparinu
Diplomová práce



Praha 2006


Jiří Olšák

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Františka Opekara, CSc a školitele specialisty Prof. RNDr. Zdeňka Samce, DrSc., a že jsem všechny použité prameny řádně ocitoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, v této práci získaných, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu ze strany univerzity.

V Praze dne...04.05.2006.....

.....

podpis

Poděkování :

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Prof. RNDr. Františkovi Opekarovi, CSc. a školiteli specialistovi Prof. RNDr. Zdeňkovi Samcovi, DrSc. za odborné vedení a připomínky k mé diplomové práci a za poskytnutou pomoc během celého mého působení na katedře analytické chemie a na ÚFCHJH-AVČR.

Dále bych chtěl poděkovat své rodině za podporu a pochopení během celého mého studia. Dík patří i mým kolegům na pracovišti AVČR, jmenovitě RNDr. Antonínovi Trojánkovi, CSc. a RNDr. Janovi Langmaierovi, CSc., mým přátelům, a v neposlední řadě GA ČR 203/04/0424 za finanční podporu tohoto projektu.

Klíčová slova :

Heparin

Ampérometrie

PVC membránové elektrody

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Úvod | 8 |
| 1.1 Heparin | 8 |
| 1.1.1 Struktura | 8 |
| 1.1.2 Antikoagulační aktivita | 9 |
| 1.2 Metody stanovení heparinu | 10 |
| 1.3 Ampérometrie | 11 |
| 1.4 Cíl diplomové práce | 12 |
| 2. Experimentální část | 13 |
| 2.1 Chemikálie a přístroje | 13 |
| 2.1.1 Chemikálie | 13 |
| 2.1.2 Přístroje | 14 |
| 2.1.3 Roztok pro přípravu PVC membrány | 15 |
| 2.2 Konstrukce elektrody | 16 |
| 2.3 Experimentální a vyhodnocovací postupy | 17 |
| 3. Výsledky a diskuze | 18 |
| 3.1 Tloušťka a odpor membrány | 18 |
| 3.2 Elektrochemie heparinu ve vodných roztocích | 20 |
| 3.2.1 Voltametrie | 20 |
| 3.2.2 Ampérometrie a coulometrie | 26 |
| 3.3 Návrh mechanismu proudové odezvy | 28 |
| 3.4 Stanovení heparinu v krevní plazmě | 31 |
| 4. Závěr | 34 |
| 5. Literatura | 35 |
| 6. Příloha | 37 |

Seznam použitých zkratek a symbolů

| | |
|-------------------|--|
| 1 U | 1 jednotka (1 unit) |
| A | plocha (cm^2) |
| a^0 | aktivita heparinu (U / ml, resp. U / mg) |
| ATIII | antitrombin III |
| c | koncentrace (mol dm^{-3}) |
| C | kapacita |
| $CPEI$ | element s konstantním fázovým posunem (constant phase element) |
| d | tloušťka (μm) |
| D | difúzní koeficient ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) |
| DMFc | dimethylferocén |
| DOS | bis(2-ethylhexyl) sebakát |
| E, ϕ | potenciál (mV) |
| f | rychlost rotace (rpm – rotate per minute, Hz) |
| F | Faradayova konstanta (96485 C mol^{-1}) |
| Fc | ferocén |
| FET | tranzistor řízený elektrickým polem (Field Effect Transistor) |
| GC | skelný uhlík (Glassy Carbon) |
| GlcA | D-glukuronová kyselina |
| GlcN | D-glukosamin |
| HTMA ⁺ | hexadecyltrimethylamonný kation |
| HTMACl | Hexadecyltrimethylamonium chlorid |
| HTMATPBCl | hexadecyltrimethylamonium tetrakis(4-chlorfenyl) borát |
| i | proud (μA) |
| ISE | iontově selektivní elektrody (Ion Selective Electrode) |
| KTPBCl | Tetrakis(4-chlorfenyl) borát draselný |
| M_h | molekulová hmotnost heparinu (kDa - kilo Dalton) |
| n | index lomu, stechiometrický koeficient |
| n_{eff} | efektivní index lomu |
| o-NPOE | o-nitrofenyloktylether |
| PSE | polyiontově selektivní elektrody (Polyion Sensitive Electrode) |
| PVC | polyvinylchlorid |

| | |
|-------------------|--|
| Q | náboj (C) |
| QCM | křemenné mikrováčky (Quartz Crystal Microbalance) |
| R | univerzální plynová konstanta ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) |
| R | odpor (Ω) |
| T | teplota (K) |
| TDMA ⁺ | tridodecylmethylamonný kation |
| TDMACl | trisdodecylmethylammonium chlorid |
| TDMATPBCl | tridodecylmethylammonium tetrakis(4-chlorfenyl) borát |
| THF | Tetrahydrofuran |
| UV/Vis | ultrafialová / viditelná oblast spektra |
| USP | lékařský předpis Spojených států amerických (United States Pharmacopoeia) |
| ν | rychlost polarizace (mV s^{-1}), kinematická viskozita ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) |
| V | objem (ml) |
| z | nábojové číslo |
| Z' | reálná složka impedance |
| Z'' | imaginární složka impedance |
| λ | vlnová délka (nm) |
| ω | úhlová frekvence (rad s^{-1}) |

1 Úvod

1.1 Heparin

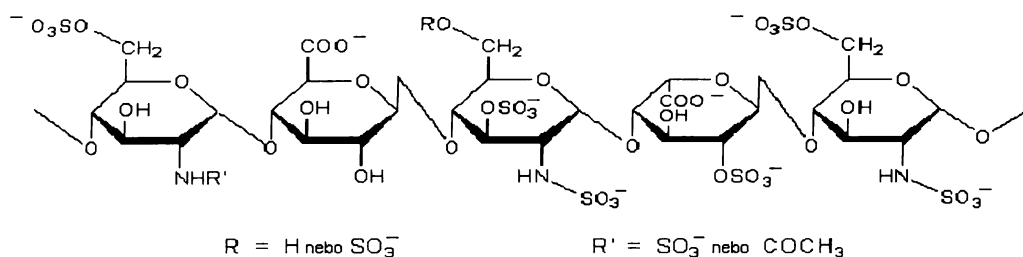
Heparin je významným klinickým antikoagulantem, který zabraňuje nežádoucímu srážení krve při některých chirurgických zákrocích, jako jsou např. mimotělní terapie, okysličování krevního systému nebo dialýza ledvin, a je využíván též terapeuticky.¹

Koncentrace heparinu ve farmaceutických přípravcích nebo v krvi se vyjadřuje v jednotkách U / mg resp. U / ml. 1 U, jak bylo definováno výrobcem (Fluka), je takové množství heparinu, které za standardních podmínek zhydrolyzuje stejné množství auraminu O za minutu, jako jedna jednotka referenčního standardu USP (United States Pharmacopoeia).²

Typická koncentrace heparinu, podávaného při chirurgických zákrocích se pohybuje v rozmezí 1-10 U / ml a při terapeutických aplikacích \approx 0,5 U / ml.

1.1.1 Struktura

Na obr. 1.1 je znázorněná chemická struktura heparinu. Heparin je vysoce sulfonovaný lineární polysacharid, složený z opakujících se jednotek, představovaných molekulami pyranosyluronových kyselin (uronová kyselina) a 2-amino-2-deoxyglukopyranosových jednotek (D-glukosamin, GlcN) navázaných v polohách 1 \rightarrow 4.³ Uronové kyseliny obsahují obvykle 90% L-idopyranosyluronové kyseliny (L-iduronová kyselina) a 10% D-glukopyranosyluronové kyseliny (D-glukuronová kyselina, GlcA). Heparin, s jeho vysokým obsahem sulfonových a karboxylových skupin, je polyelektrolytem, který má vyšší negativní hustotu náboje než jakákoliv jiná známá biologická makromolekula. Molekula s průměrným nábojovým číslem -75 obsahuje řetězce s různou molekulovou hmotností, jež se pohybuje v rozmezí 5-40 kDa.^{4,5}



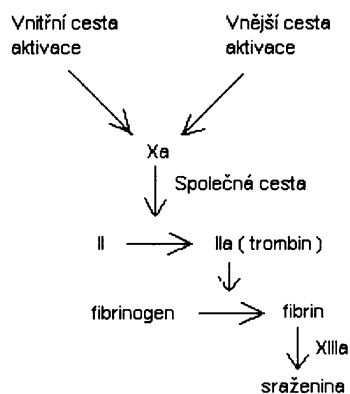
Obr. 1.1 Struktura heparinu

1.1.2 Antikoagulační aktivita

Heparin se převážně vyskytuje v mastocytech orgánů, jako jsou např. játra, střevo, plíce.⁶ Farmaceuticky připravovaný heparin je čištěná polydisperzní směs sulfonovaných polysacharidů⁷ s průměrnou molekulovou hmotností $M_h = 12$ kDa. Zcela sulfonovaný heparin obsahuje v průměru tři sulfonové skupiny na jednu disacharidovou jednotku. Pouze asi 1/3 polysacharidových řetězců obsahuje aktivní místa, na která lze navázat řídicí protein, vyskytující se v koagulační kaskádě - antitrombin III (ATIII). ATIII se váže na specifickou pentasacharidovou sekvenci heparinu za vytvoření binárního komplexu, což vede ke konformační změně ATIII.⁸ Následuje reakce trombinu s heparinem a ATIII za vytvoření ternárního komplexu, který nevratně inaktivuje trombin. Trombin pevně vázaný na ATIII disociuje z heparinu, což umožňuje vazbu a inaktivaci další molekuly trombinu.⁸

Nejdůležitější je prostudována antikoagulační aktivita farmaceutických produktů heparinu, připravených převážně z vepřových střev nebo hovězích plic v koncentracích 120 – 180 U / mg.^{7,9,10} Heparin, získaný z různých zdrojových tkání, se liší strukturou a afinitou k ATIII.^{6,9}

Koagulační kaskáda je znázorněna na obr. 1.2.



Obr. 1.2 Koagulační kaskáda

1.2 Metody stanovení heparinu

V lékařské praxi je důležité udržet krevní hladinu heparinu na takové úrovni, jež je dostatečná k prevenci trombózy a současně nevyvolává riziko nekontrolovaného krvácení.

Pro sledování koncentrace heparinu v organismu byla vypracována metoda, založená na barevných změnách, vyvolaných vytěsněním pyrokatecholové violeti přítomným heparinem.^{11,12}

Další metody jsou vesměs založeny na elektrostatické interakci polyaniontu heparinu s kladně nabitými částicemi (kationty, polykationty) a povrchy různých senzorů. V literatuře je popsáno kontinuální sledování hladiny heparinu v krvi automatickou titrací protaminem v průběhu invazivních chirurgických zákrocích.¹³ Uváděná metoda však není příliš vhodná pro běžnou laboratorní praxi, vzhledem k náročnosti na potřebné vybavení a reagenty. S ohledem na skutečnost, že se ročně podá více než půl miliardy dávek heparinu, je žádoucí vyvinout jednoduchý senzor, jež by byl schopný detekovat heparin přímo v krvi nebo v krevní plazmě.¹⁴

Další metoda využívá techniky křemenných mikrovah (QCM). QCM senzor byl připraven zakotvením protilátky, kterou je např. polykation protamin, nebo proteinu, vázajícího sacharid, na povrch senzoru. Selektivní vazba molekuly detekované látky, vyvolá změny v oscilační frekvenci, která může být elektronicky detekována.¹⁵ QCM technika byla použita pro detekci heparinu, vázajícího se na povrchu s naadsorbovaným protaminem.¹⁶ V rámci studie byly zkoumány účinky množství polykationtu

(protaminu), naadsorbovaného na povrchu zlaté elektrody, na citlivost senzoru vůči heparinu a adsorpční profily heparinu v různých koncentracích.

Dalším příkladem detekce heparinu je metoda využívající senzorů na bázi iontových kanálů.¹⁷ Princip metody spočívá v elektrostatické interakci specifického receptoru (protaminu) s povrchem elektrody. Protamin zabraňuje redoxní reakci kovového komplexu (např. oxidaci $[\text{Mo}(\text{CN})_8]^{4-}$) na povrchu elektrody. Po přidání analytu (heparinu), do tohoto roztoku, se díky vazbě protamin-heparin uvolní povrch elektrody a redoxní reakce komplexu může probíhat. Tyto senzory jsou schopny stanovit heparin v roztocích o různém složení v koncentracích $0,6 - 3,0 \mu\text{g ml}^{-1}$.¹⁸

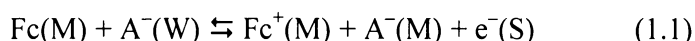
Vysoká hustota negativního náboje heparinu byla základem pro další detekční techniky, jako je např. detekce rozložení nábojových hustot na porézních membránách, zakotvených na iontově selektivních FETech (ISFET).¹⁹ ISFET měří skokovou změnu způsobenou vazbou heparinu na afinitní receptor, kterým je obvykle protamin. Silná elektrostatická přitažlivost mezi protaminem a heparinem, působí změny v povrchových nábojových hustotách na membráně ISFETu.

Pro potenciometrickou detekci heparinu byl vyvinut senzor, tvořený inertní (zpravidla uhlíkovou) elektrodou, pokrytou tenkou vrstvou plastifikovaného polymeru (polyiontově selektivní elektroda, PSE). Potenciálová odezva u tohoto typu senzoru je důsledkem iontové výměny heparinu mezi vzorkem a lipofilní částí organické membrány, za tvorby iontového páru na rozhraní membrána | vzorek.^{20,21,22} V uvedených pracích byla využita schopnost přítomných sulfoskupin heparinu reagovat s kationtem přítomného elektrolytu TDMACl (trisdodecylmethylammonium chlorid). PSE pak funguje jako klasická ISE citlivá na chlorid uvolněný z TDMACl.²³ Výhodou těchto biosenzorů je možnost jejich využití pro stanovení heparinu přímo v krevních vzorcích. Nevýhodou je nevratnost reakce, na níž je detekce založená, což ji předurčuje k použití jako čidla na jedno použití.²⁴

1.3 Ampérometrie

Stabilní tenká vrstva organického rozpouštědla, nanosená na grafitovou elektrodu je vhodným systémem pro kinetickou studii elektronové výměny na rozhraní mezi organickým rozpouštědlem a vodným elektrolytem.²⁵ Obdobný systém s vodnou fází a kapkou organického rozpouštědla, naneseného na povrch kovové²⁶ nebo grafitové²⁷

elektrody, byl použit k měření Gibbsovy energie přenosu iontů z vodného roztoku do polární nebo nepolární organické fáze, pro sérii anorganických aniontů^{27,28}, aniontů organických kyselin²⁹, peptidických aniontů³⁰ a léčiv na bázi aniontů³¹. Ve všech těchto systémech je reakce přenosu iontu přes mezifázi voda | organická fáze spojena s elektrochemickou reakcí na povrchu pevné elektrody, např. elektrooxidací ferocénu.^{25,27} Elektrochemický proces, zahrnující např. přenos anionu A^- z vodné fáze (W) do organické fáze (membrány M), spřažený s oxidací ferocénu (Fc) na pevné elektrodě (S), může být popsán rovnicí (1.1)



Tento proces je v podstatě kombinací dvou reakcí přenosu náboje, z nichž jedna probíhá na rozhraní membrána | elektroda, rov. (1.2)



a druhá na rozhraní membrána | vodná fáze, rov. (1.3)



1.4 Cíl diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout metodu citlivého ampérometrického stanovení heparinu ve vodných roztocích a v krevní plazmě s použitím elektrody pokryté plastifikovaným polymerem. Součástí práce jsou:

a) Návrh a ověření metody definovaného pokrytí povrchu elektrody ze skelného uhlíku (GC) membránou, složenou z plastifikátoru o-nitrofenyl oktyleteru (o-NPOE) nebo bis(2-ethylhexyl) sebakátu (DOS), polyvinylchloridu (PVC), 1,1'-dimetylferocénu (DMFc) a hexadecyltrimethylamonného membránového kationtu ($HTMA^+$) nebo tridodecylmethylamonného ($TDMA^+$) kationtu.

b) Studium mechanismu přenosu heparinu přes rozhraní vodného roztoku elektrolytu a membrány, v závislosti na použitém plastifikátoru (o-NPOE, DOS) a druhu membránového kationtu ($HTMA^+$, $TDMA^+$).

c) Optimalizace ampérometrické metody pro stanovení heparinu v krevní plazmě.

2 Experimentální část

2.1 Chemikálie a přístroje

2.1.1 Chemikálie

Chlorid lithný (LiCl p.a., Fluka)

Zásobní 0,1 M roztok byl připraven rozpuštěním 2,12 g chloridu lithného ve vodě a doplnění objemu na 500 ml.

Sodná sůl heparinu (Hep, Aldrich, 151 U mg⁻¹)

Zásobní roztok byl připraven navážením 20 mg heparinu a rozpuštěním ve 2 ml deionizované vody. Aktivita takto připraveného roztoku heparinu odpovídá 1510 U ml⁻¹

Tetrakis(4-chlorfenyl) borát draselný (KTPBCl, Selectophore, Fluka)

Sloučenina, používaná pro přípravu solí HTMATPBCl a TDMATPBCl.

Aceton (C₃H₆O, p.a., Lach – Ner, s.r.o.)

Byl užíván jako rozpouštědlo při přípravě solí, rozpustných v materiálu membrány.

Hexadecyltrimethylamonium chlorid (HTMACl, čistý, Fluka)

Hexadecyltrimethylamonium chlorid byl použit pro přípravu soli hexadecyltrimethylamonium tetrakis(4-chlorfenyl) borát (HTMATPBCl) reakcí s KTPBCl v acetonu.

Tridodecylmethylamonium chlorid (TDMACl, čistý, Fluka)

Tridodecylmethylamonium chlorid byl použit pro přípravu soli tridodecylmethylamonium tetrakis(4-chlorfenyl) borát (TDMATPBCl) reakcí s KTPBCl v acetonu.

Polyvinylchlorid (PVC, vysokomolekulární, Fluka)

Používán pro výrobu PVC membrány. Připravený zásobní roztok obsahoval 0,15 g PVC ve 2 ml THF.

1,1'-dimethylferocén (DMFc, 97%, Aldrich)

Používán pro výrobu PVC membrány v koncentracích 0,043 g na 2 ml o-NPOE.

Bis(2-ethylhexyl) sebakát (DOS, Selectophore, Fluka)

Používán jako plastifikátor pro výrobu PVC membrány.

O-nitrofenyl oktyl eter (o-NPOE, Selectophore, Fluka)

Používán jako plastifikátor pro výrobu PVC membrány.

Tetrahydrofuran (THF, Riedel-de-Haën, Germany)

Používán jako rozpouštědlo PVC při výrobě membrány.

Albumin (Alb, Standard, Carl Roth, Germany)

Součást krevní plazmy, fyziologická koncentrace 45 g l^{-1} . Zásobní roztok připraven rozpuštěním 45 g albuminu v 1 litru 0,1M LiCl.

Vodné roztoky byly připravovány z deionizované vody (Millipore).

Vzorky krevní plazmy byly získány z krevní banky fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze, Česká Republika.

2.1.2 Přístroje

AUTOLAB (PGSTAT 30, Eco-Chemie, Holandsko)

Programovatelný potenciostat, jehož pomocí byla prováděna voltametrická a chronoampérometrická měření v tří-elektrodové cele za použití rotující diskové elektrody AUTOLAB. Ampérometrický sensor pro heparin se skládal z GC elektrody s nanosenou PVC membránou, sloužící jako pracovní elektroda. Elektroda byla ponořena ve vodném roztoku 0,1 M LiCl nebo přímo v krevní plazmě. Jako referentní elektroda sloužila argentschloridová nasycená elektroda a velkoplošná Pt elektroda byla použita jako pomocná elektroda.

Impedanční měření byla prováděna ve stejné cele pomocí **frekvenčního analyzátoru** (1255 FRA Solatron, Solatron Instruments, Anglie) a **potenciostatu** (1287 Electrochemical interface Solatron, Solatron Instruments, Anglie). Tato měření byla použita k vyhodnocení sumy odporu R membrány a vodného roztoku, určované jako vysokofrekvenční limit reálné složky komplexní impedance.

Tloušťka membrány d byla vyhodnocována na základě UV/Vis reflexního spektra, které bylo měřeno v úhlu 180° **spektrometrem** (Ocean Optics 2000), ovládaným počítačem. Spektrum bylo použito k vyhodnocení tloušťky filmu na základě zjištěného počtu interferenčních maxim/minim, pomocí vzorce 2.1

$$d = \frac{k\lambda_1\lambda_k}{2n_{eff}(\lambda_1 - \lambda_k)} \quad (2.1)$$

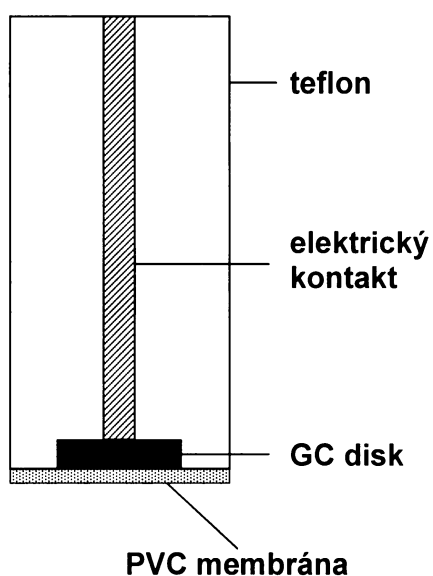
kde k je počet maxim/minim v intervalu mezi vlnovými délkami λ_1 a λ_k , a n_{eff} je efektivní index lomu, vypočítaný z hodnot indexů lomu pro DOS (1,458), o-NPOE (1,511) a PVC (1,539).

2.1.3 Roztok pro přípravu PVC membrány

1 ml roztoku PVC v THF (75 mg PVC / 1 ml THF) byl smíchán s roztokem obsahujícím HTMATPBCl a 0,1 M DMFc v o-NPOE nebo DOS, nebo s roztokem obsahujícím TDMATPBCl a 0,1 M DMFc v o-NPOE nebo DOS. Poměr složek směsi byl zvolen tak, aby koncentrace HTMATPBCl (resp. TDMATPBCl) v takto připravené membráně byla $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ a koncentrace DMFc $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$.

2.2 Konstrukce elektrody

Na obr. 2.1 je znázorněno schéma elektrody s nanesenou PVC membránou. Ke každému elektrochemickému pokusu byla použita vždy čerstvá membrána, připravená technikou odstředivého nanášení vrstvy (spin-coating). Na povrch rotující (2000 rpm) elektrody ze skelného uhlíku (GC, průměr 3 mm, Eco-Chemie, Holandsko), orientované povrchem směrem nahoru, byla nanesena kapka (75 μl) výše uvedeného roztoku (viz sekce 2.1.3). Následné volné vypařování THF vedlo k vytvoření filmu obsahujícího 25% (hmot.) PVC po celém povrchu elektrody. Nanesení membránového roztoku bylo následně několikrát opakováno, až se vytvořil film s tloušťkou okolo 40 μm .



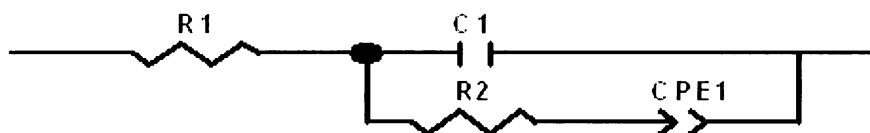
Obr. 2.1 Schéma elektrody

2.3 Experimentální a vyhodnocovací postupy

V následující kapitole jsou uvedeny počítačové programy, které byly použity v rámci této diplomové práce.

1. Programy Z-Plot a Z-Wiew

Tyto programy byly použity pro ovládání frekvenčního analyzátoru a k analýze naměřených impedančních spekter. Zatímco podmínky měření byly nastaveny v programu Z-Plot, program Z-Wiew sloužil k zobrazení a vyhodnocení výsledků impedančních měření. Měření se vyhodnocovala za použití náhradního obvodu elektrody, na jehož základě byla určena reálná složka odporu $R1$, viz schéma na obr. 2.2



Obr. 2.2 Schéma použitého náhradního obvodu. R1 – reálná složka impedance, R2 – kinetický odpor, C – kapacita mezifází, CPE1 - element s konstantním fázovým posunem.

2. Program Ocean Optics

Tento program sloužil k zobrazení výsledků spektrometrického měření při určování tloušťky vytvořené membrány (viz výše).

3. Program GPES

Tento program slouží k ovládání programovatelného potenciostatu AUTOLAB a záznamu voltametrických, ampérometrických a chronoampérometrických měření. Měření byla vyhodnocována buďto přímo v tomto programu nebo po převedení získaných výsledků do programu **OriginPro 7.0**.

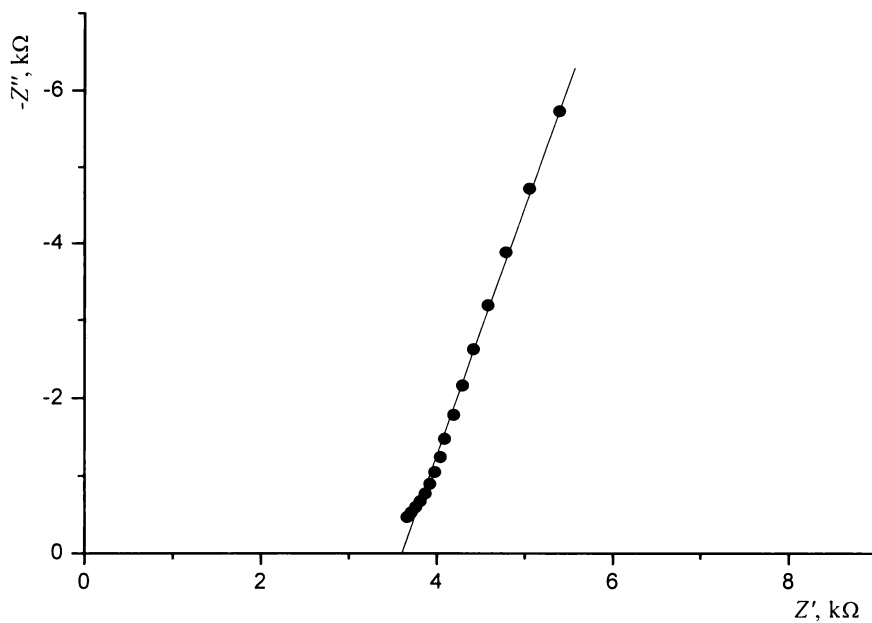
3 Výsledky a diskuze

3.1 Tloušťka a odpor membrány

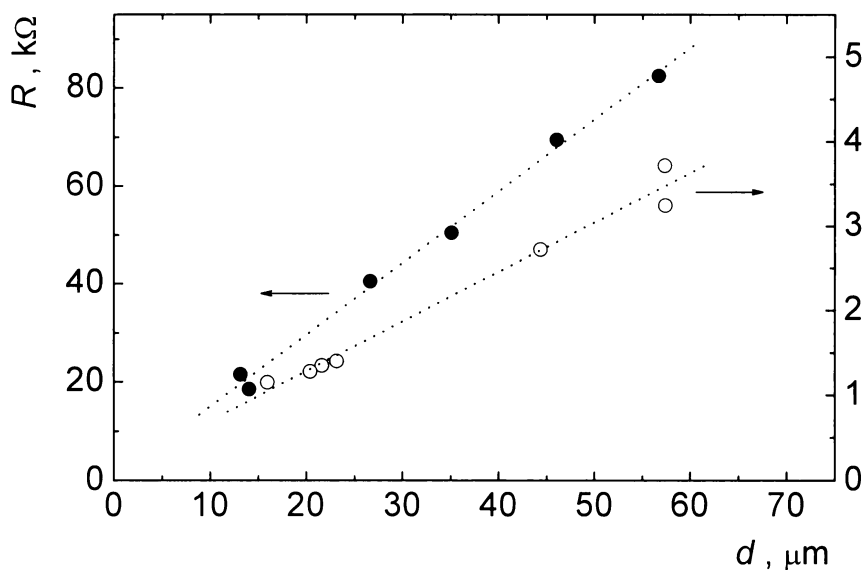
Na obr. 3.1 je zobrazena typická impedanční křivka pro GC elektrodu s nanesenou vrstvou PVC membrány, ponořenou ve vodném roztoku LiCl. Impedanční křivka zde představuje závislost záporné imaginární složky Z'' na reálné složce Z' komplexní impedance. Jak je uvedeno výše, analýzou impedančních dat za použitím náhradního obvodu, byla vyhodnocena reálná složka odporu R . Takto získaná hodnota ohmického odporu se používá při voltametrickém a chronoampérometrickém měření pro účely zavádění IR kompenzace.

Na obr. 3.2 je zobrazena závislost odporu R na tloušťce membrány d pro GC elektrodu s membránou obsahující HTMA⁺/o-NPOE nebo HTMA⁺/DOS. V obou případech je závislost R na d lineární, což je v souladu s představou membrány jako vodiče válcového tvaru, se specifickou vodivostí, určenou pohyblivostmi (difúzními koeficienty) iontů přítomných v membráně a pravděpodobně též stupněm disociace přítomného elektrolytu.

Odpor HTMA⁺/DOS membrány je přibližně dvacetkrát vyšší než v případě membrány HTMA⁺/o-NPOE, což je pravděpodobně způsobeno vyšší viskozitou DOS a nižším disociačním stupněm HTMATPBCl v tomto plastifikátoru. Závislosti z obr. 3.2 byly použity pro rychlou kontrolu membránové tloušťky na základě impedančních měření. Pro voltametrická měření byly použity membrány s tloušťkou 20-50 μm .



Obr. 3.1 Impedanční křivka (●) a její proložení (analýza dat), odpovídající náhradnímu obvodu na obr. 2.2 (–) v rozsahu frekvencí 10-300 Hz.



Obr. 3.2 Závislost odporu membrány R na tloušťce membrány d pro GC elektrodu s nanesenou vrstvou PVC membrány obsahující 0,1 M DMFc a 0,05 M HTMATPBCl v *o*-NPOE (○), nebo 0,05 M HTMATPBCl v DOSu (●) a ponořenou do vodného roztoku 0,1 M LiCl.

3.2 Elektrochemie heparinu ve vodných roztocích

3.2.1 Voltametrie

Proměnnými veličinami v rámci prováděných experimentů byly rychlost polarizace ν (5-50 mV s⁻¹), rychlost rotace elektrody f (200-3000 rpm) a aktivita heparinu a^0 (1-30 U ml⁻¹) ve vodné fázi. Druh použitého základního elektrolytu ovlivňuje polohu a šířku potenciálového okna, které mělo v případě použití HTMATPBCl rozsah 0-0,4 V a v případě TDMATPBCl rozsah 0-0,65 V.

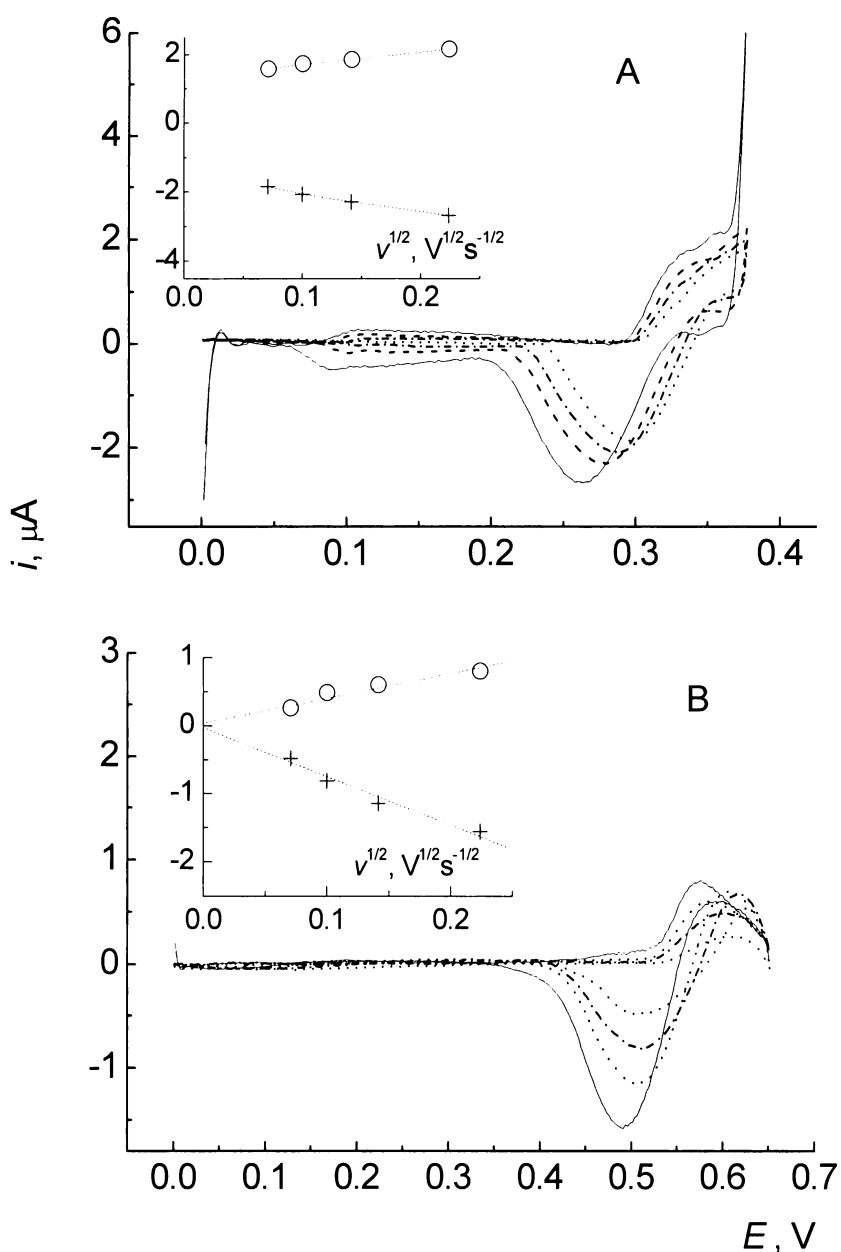
Na obr. 3.3 a 3.4 jsou znázorněny voltametrické křivky heparinu při různých rychlostech polarizace a rotace. Korekci na proud základního elektrolytu bylo zjištěno, že při anodické polarizaci má voltamogram pro elektrodu pokrytou HTMA⁺/o-NPOE (nebo DOS) membránou tvar vlny s limitním proudem (i_{lim}^+) a půlvlnovým potenciálem ($E_{1/2}^+$), zatímco pro elektrodu pokrytou s TDMA⁺/o-NPOE (nebo DOS) membránou, má tvar peaku s proudem (i_p^+) a potenciálem (E_p^+). Při katodické polarizaci má voltamogram vždy tvar peaku, který může být charakterizován proudem (i_p^-) a jeho potenciálem (E_p^-). Výsledky lze shrnout následovně:

1) Potenciálový rozdíl $\Delta E' = E_{1/2}^+ - E_p^- \approx 40$ mV a $\Delta E = E_p^+ - E_p^- \approx 90$ mV pro elektrodu pokrytou HTMA⁺/o-NPOE (nebo DOS) a TDMA⁺/DOS (nebo o-NPOE) membránou je prakticky nezávislý na ν (obr. 3.3) a f (obr. 3.4).

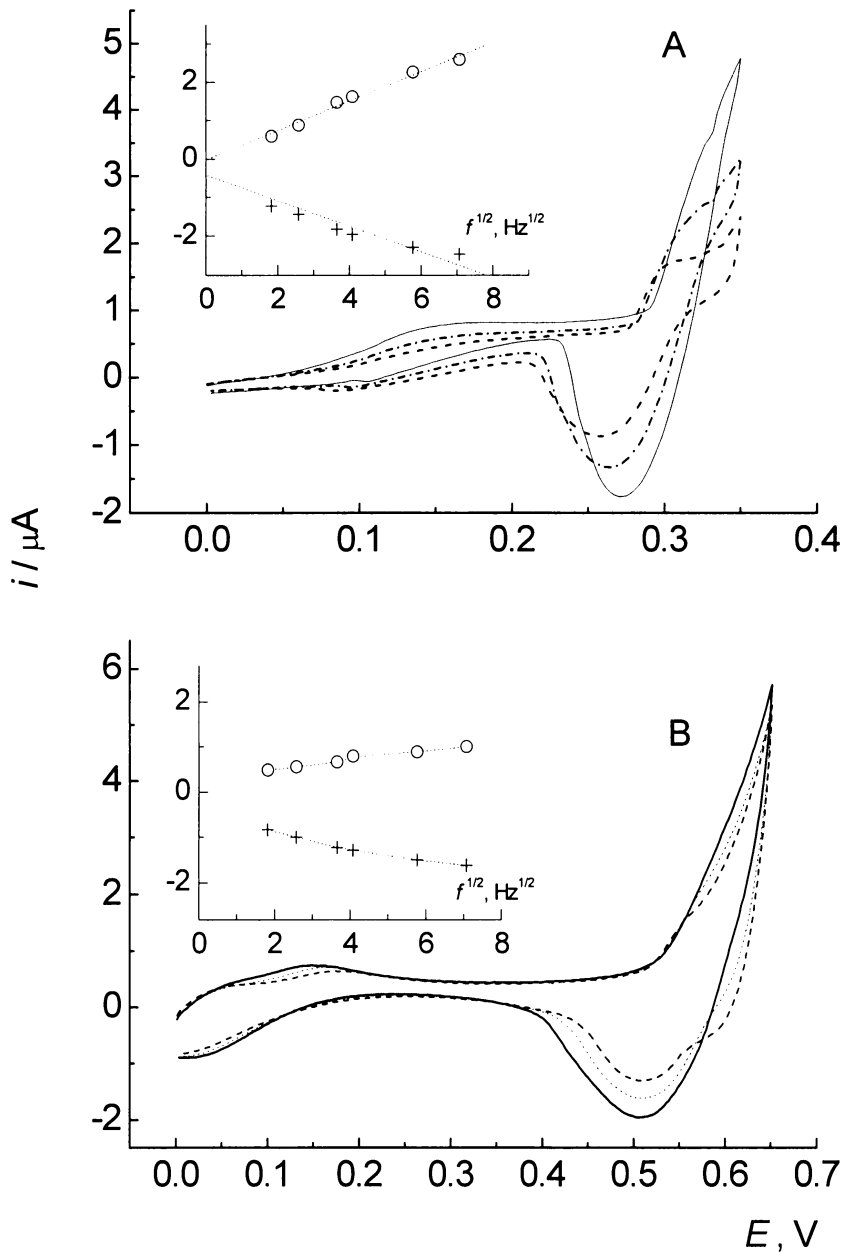
2) Posun půlvlny nebo potenciálového peaku s rostoucí rychlostí polarizace je v obou případech charakterizován směrnici cca -40 mV/dekádu (obr. 3.3).

3) Rychlost polarizace má minimální vliv na limitní proud i_{lim}^+ a na proud peaku i_p^- pro elektrodu pokrytou HTMA⁺/o-NPOE (nebo DOS) (obr. 3.3A), zatímco proudy i_p^+ a i_p^- pro elektrodu pokrytou TDMA⁺/DOS (nebo o-NPOE) vykazují lineární závislost na druhé odmocnině z rychlosti polarizace ν (obr. 3.3B).

4) Limitní proud i_{lim}^+ a proud peaku i_p^- pro elektrodu pokrytou HTMA⁺/o-NPOE (nebo DOS) vykazují lineární závislost na druhé odmocnině z rychlosti rotace f (obr. 3.4A), zatímco pro elektrodu pokrytou TDMA⁺/DOS (nebo o-NPOE) (obr. 3.4B) je tento efekt zanedbatelný.



Obr. 3.3 Cyklické voltamogramy zaznamenané při rychlostech polarizace $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ (tečkovaná), 10 mV s^{-1} (čerchovaná), 20 mV s^{-1} (čárková), 50 mV s^{-1} (plná) na rotující GC elektrodě (1000 rpm) s nanesenou PVC membránou, obsahující 0.1 M DMFc , a (A) $0,05 \text{ M HTMATPBCl}$ v $o\text{-NPOE}$, nebo (B) $0,05 \text{ M TDMATPBCl}$ v DOSu , za přítomnosti heparinu (8 U ml^{-1} v panelu A, 5 U ml^{-1} v panelu B) v roztoku 0.1 M LiCl . Výřez zobrazuje limitní proud (i_{lim}^+) nebo proud peaku (i_p^+) kladné vlny (\circ), a proud peaku (i_p^-) zpětné vlny (+) jako funkci druhé odmocniny z rychlosti polarizace v . Od měřených proudů byl ve všech případech odečten proud základního elektrolytu.

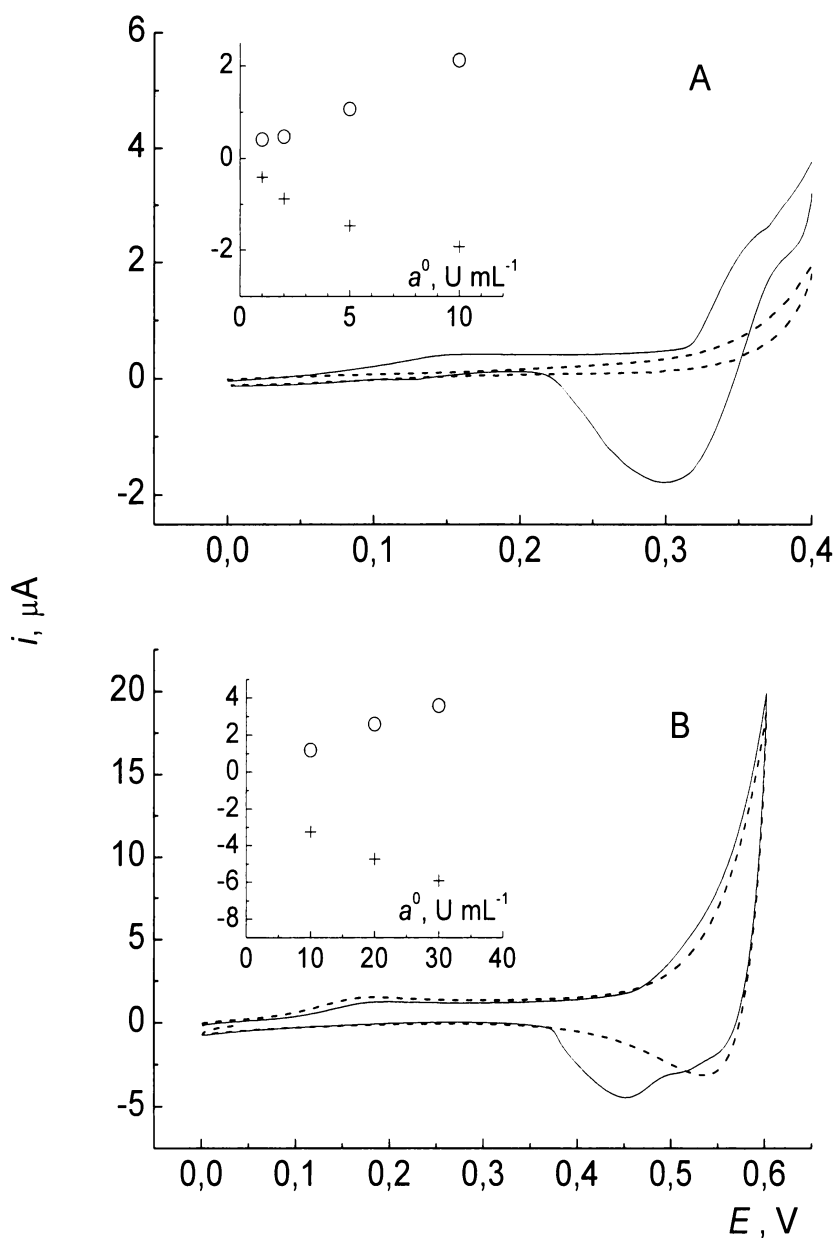


Obr. 3.4 Cyklické voltamogramy naměřené při konstantní rychlosti polarizace $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ a rychlostech rotace elektrody $f = 200 \text{ rpm}$ (čárkovaná), 800 rpm (čerchovaná), a 3000 rpm (plná). Rotující GC elektroda, pokrytá vrstvou PVC membrány obsahující $0,1 \text{ M DMFc}$ a (A) $0,05 \text{ M HTMATPBCl}$ v $o\text{-NPOE}$, nebo (B) $0,05 \text{ M TDMATPBCl}$ v DOSu , za přítomnosti heparinu (8 U ml^{-1} v panelu A, 5 U ml^{-1} v panelu B) ve vodném roztoku $0,1 \text{ M LiCl}$. Výřez zobrazuje limitní proud (i_{lim}^+) nebo proud peaku (i_p^+) kladné vlny (\circ), a proud peaku (i_p^-) zpětné vlny (+) vs. druhá odmocnina z rychlosti rotace f (Hz).

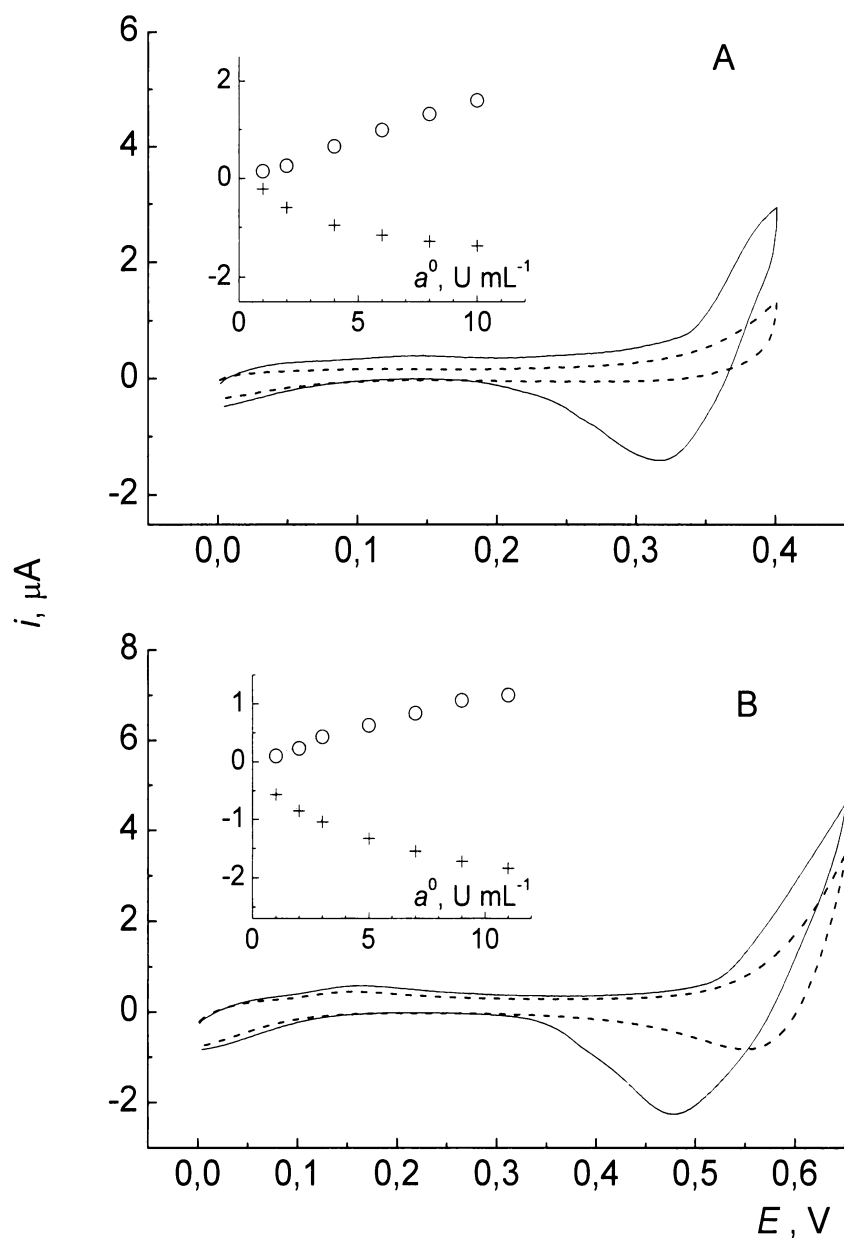
Na obrázcích 3.5 a 3.6 jsou zobrazeny cyklické voltamogramy na rotující GC elektrodě s nanosenou PVC membránou, která byla připravena s použitím dvou různých plastifikátorů (o-NPOE, DOS) a solí se dvěma různými kationty (HTMA^+ , TDMA^+), při různých koncentracích heparinu a^0 ve vodném roztoku 0,1 M LiCl a za podmínek konstantní rychlosti polarizace $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ a rychlosti rotace elektrody $f = 1000 \text{ rpm}$.

Z obrázků 3.5 a 3.6 je zřejmé, že všechny membránové elektrody vykazují proudovou odezvu na heparin, která závisí na jeho koncentraci (výřezy v obr. 3.5 a 3.6). Při anodické polarizaci je však citlivost elektrody pokryté membránou s HTMA^+ /o-NPOE (nebo DOS) ($\partial i_{\text{lim}}^+ / \partial a^0 \approx 0,18 \mu\text{A U}^{-1} \text{ ml}$, Obr. 3.5A a Obr. 3.6A) podstatně vyšší než citlivost elektrody s membránou TDMA^+ /o-NPOE (nebo DOS) ($\partial i_p^+ / \partial a^0 \approx 0,1 \mu\text{A U}^{-1} \text{ ml}$, Obr. 3.5B a 3.6B). Nicméně při katodické polarizaci vykazuje elektroda s TDMA^+ /o-NPOE (nebo DOS) membránou vyšší citlivost, i když závislost na koncentraci heparinu zde není lineární (Obr. 3.5B a 3.6B).

Je pozoruhodné, že citlivost elektrody s HTMA^+ /o-NPOE membránou nezávisí na koncentraci kationtu HTMA^+ . Prakticky bylo dosaženo stejné citlivosti $\partial i_{\text{lim}}^+ / \partial a^0 \approx 0,17 \mu\text{A U}^{-1} \text{ ml}$ v membráně obsahující 0,1 M HTMA^+ , zatímco pro o-NPOE membránu s obsahem 0,01 M HTMA^+ je udávána citlivost $\partial i_{\text{lim}}^+ / \partial a^0 \approx 0,22 \mu\text{A U}^{-1} \text{ ml}$.³⁴



Obr. 3.5 Cyklické voltamogramy zaznamenané na rotující GC elektrodě pokryté PVC membránou s o-NPOE, obsahující 0,1 M DMFc a (A) 0,05 M HTMATPBCl, nebo (B) 0,05 M TDMATPBCl, za přítomnosti (plná) a nepřítomnosti (čárkovaná) heparinu (10 U ml⁻¹) ve vodném roztoku 0,1 M LiCl. Výřez ukazuje efekt koncentrace heparinu a^0 na korigovaný limitní proud (i_{lim}^+) nebo proud peaku (i_p^+) při anodické polarizaci (\circ), a korigovaný proud peaku (i_p^-) při katodické polarizaci (+).

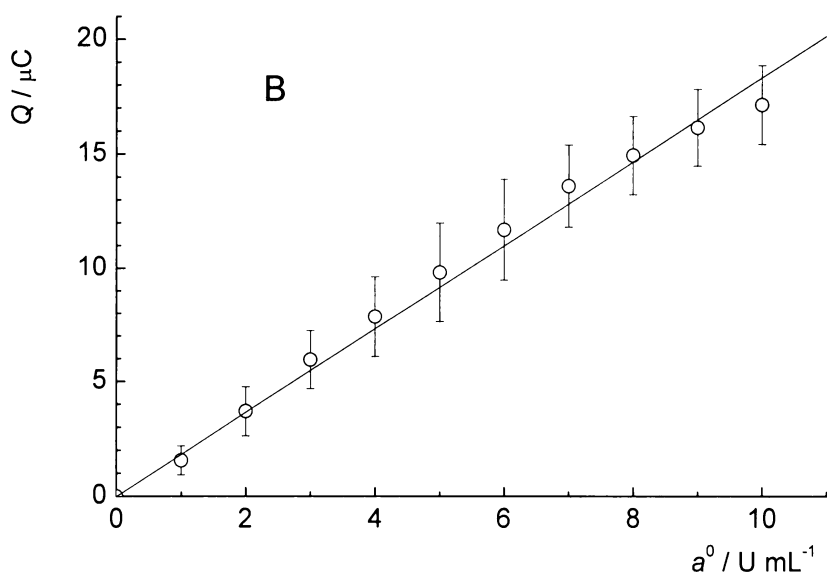
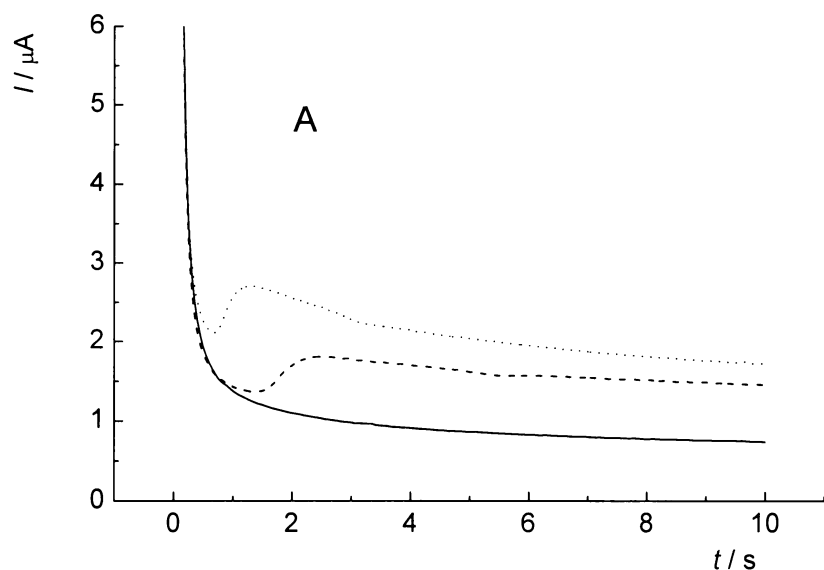


Obr. 3.6 Cyklické voltamogramy změřené na rotující GC elektrodě pokryté DOSEm plastifikovanou PVC membránou, obsahující $0,1 \text{ M DMFc}$ a (A) $0,05 \text{ M HTMATPBCl}$, nebo (B) $0,05 \text{ M TDMATPBCl}$, za přítomnosti (plná) a nepřítomnosti (čárkovaná) heparinu (10 U mL^{-1}) ve vodném roztoku $0,1 \text{ M LiCl}$. Výřez ukazuje efekt koncentrace heparinu a^0 na korigovaný limitní proud (i_{lim}^+) nebo proud peaku (i_p^+) při anodické polarizaci (\circ), a korigovaný proud peaku (i_p^-) při katodické polarizaci ($+$).

3.2.2 Ampérometrie a coulometrie

Chronoampérometrie při konstantním potenciálu E je nejjednodušší technikou membránové rotující elektrody pro sledování změn koncentrace heparinu ve vodných roztocích. Tato technika navíc umožňuje potlačit efekt vyčerpávání ferocénu na rozhraní GC | membrána během dlouhotrvající polarizace při potenciálu v blízkosti limitního pozitivního potenciálu, vedoucí ke zhoršování odezvy. Tento nežádoucí efekt může být z větší části potlačen použitím potenciálových pulsů, při nichž je elektroda na uvedeném potenciálu udržována podstatně kratší dobu.

Na obr. 3.7A je ukázána odezva rotující membránové elektrody na jednotlivý potenciálový puls z 0 V na 0,375 V se setrváním při potenciálu 0,375 V po dobu 10 s, a s následným návratem na potenciál 0 V při různých koncentracích heparinu. Stojí za povšimnutí, že relaxace elektrické dvojvrstvy a difúzního koncentračního profilu trvá přibližně 1s. Po asi 2s přechází anodický proud na prakticky stacionární hodnotu (po provedení korekce na proud základního elektrolytu). Efekt relaxace lze eliminovat integrací chronoampérometrických křivek. Na obr. 3.7B je zobrazena závislost náboje Q , získaného integrací chronoampérometrických křivek, na koncentraci heparinu. Je zřejmé, že v rozmezí medicínálně významných koncentrací heparinu je tato závislost lineární. Vynesené body znázorněné v obr. 3.7B, odpovídající postupnému zvyšování koncentrace heparinu po 1 U ml⁻¹, byly získány zprůměrováním výsledků na třech různých membránových elektrodách. Směrodatné odchylky, vyznačené svislými úsečkami, činily okolo 20% zjištěných hodnot náboje. Aby mohla být vyhodnocena správnost a přesnost (reprodukovatelnost) coulometrické metody, byla lineární křivka z obr. 3.7B použita jako kalibrační graf pro stanovení heparinu ve vodných roztocích, obsahujících tři různé koncentrace heparinu (1, 5, 10 U ml⁻¹). Každé měření bylo zopakováno třikrát a získané hodnoty průměrných koncentrací a směrodatných odchylek jsou uvedeny v Tab. 3.1. Navržená metoda je dostatečně přesná a jak je z uvedených hodnot zřejmé, jsou naměřené hodnoty v oboru vyšších koncentrací správné s odchylkou cca 5%. Vyjma koncentrací heparinu nižších než 1 U ml⁻¹, je tato metoda použitelná pro stanovení heparinu.



Obr. 3.7 Chronoampéroetrická odezva rotující třífázové elektrody (1000 rpm) na jednotlivý potenciálový puls z 0 V na 0,375 V s trváním pulsu 10 s, při koncentracích heparinu 0 U ml^{-1} (—), 5 U ml^{-1} (- -) a 10 U ml^{-1} (...) (A), a odpovídající náboj Q vs. koncentrace heparinu a^0 (B). Referenční body a svislé čáry v okně B představují příslušné průměrné hodnoty a směrodatné odchylky, získané na základě měření se třemi různými elektrodami. Lineární regrese : $Q = -0,015 + 1,833 a^0$.

Tab. 3.1 Coulometrické stanovení heparinu ve vodných roztocích pro tři různé koncentrace.

| koncentrace heparinu (U / ml) | |
|-------------------------------|-----------|
| standard | stanoveno |
| 1,00 | 0,60±0,04 |
| 5,00 | 4,80±0,45 |
| 10,00 | 9,40±0,45 |

3.3 Návrh mechanismu proudové odezvy

Efekty rychlosti polarizace, rychlosti rotace a koncentrace heparinu, umožňují učinit jisté závěry ohledně mechanismu sledované proudové odezvy.

1) Jak je patrné z obr. 3.4, jsou anodický půlvlnový potenciál a potenciál katodického peaku heparinu nezávislé na rychlosti rotace elektrody. Obdobně jsou potenciály anodických a katodických peaků nezávislé na rychlosti polarizace, s potenciálovým rozdílem peaků $\Delta E_p = 30 - 40$ mV. Poslední z uvedených výsledků jasně naznačuje nepřítomnost řídicího kinetického kroku. Rovnicí (1.1) je popsána reakce jednoduchého přenosu aniontu,³³ použité potenciály E se dělí na Galvaniho potenciálový rozdíl mezi GC elektrodou a membránovou fází, $\Delta_M^{GC}\phi = \phi(GC) - \phi(M)$, potenciálový rozdíl mezi vodnou fází a fází membrány, $\Delta_M^W\phi = \phi(W) - \phi(M)$, a konstantu zahrnující příspěvek k potenciálu referentní elektrody. Za nepřítomnosti řídicího kinetického kroku, mohou pak být potenciálové změny dále popsány jako Nernstovy potenciály pro sprážené reakce, rov. (3.1)

$$E = \Delta_M^{GC}\phi - \Delta_M^W\phi + \text{konst.} = \Delta_M^{GC}\phi_{el}^{0'} - \Delta_M^W\phi_{Hep}^{0'} + \left(\frac{RT}{F}\right) \ln \frac{c_{Fc^+}(M)}{c_{Fc}(M)} + \left(\frac{RT}{zF}\right) \ln \frac{c_{Hep}(M)}{c_{R^+}^z(M)c_{Hep}(W)} + \text{konst.} \quad (3.1)$$

kde $\Delta_M^{GC}\phi_{el}^{0'}$ a $\Delta_M^W\phi_{Hep}^{0'}$ představují formální potenciálový rozdíl přenosu elektronu a přenosu aniontu heparinu, a c_i jsou koncentrace reaktantů a produktů reakce přenosů

náboje na jednom a druhém rozhraní membrány, jež mají vztah k elektrickému proudu I , protékajícímu membránou. Rov. (3.1) naznačuje, že potenciálový rozdíl peaků na pevné elektrodě může být určen faktorem $(RT/zF) < 1$ mV / dekáda. Naměřený potenciálový rozdíl peaků $\Delta E_p = 30 - 40$ mV nicméně naznačuje, že zjevná reverzibilita procesu není spojená s jednoduchým přenosem náboje.

2) Ve výřezu na obr. 3.5A je znázorněna závislost limitního anodického nebo katodického proudu i_{lim} na koncentraci heparinu c^0 za konstantní rychlosti rotace elektrody 1000 rpm, a na výřezu obr. 3.4A je znázorněna závislost i_{lim} na druhé odmocnině z rychlosti rotace elektrody f za konstantní koncentrace heparinu 5 U ml⁻¹. V případě kationtu HTMA⁺ je limitní anodický proud heparinu přímo úměrný koncentraci heparinu a druhé odmocnině rychlosti rotace elektrody, je však nezávislý na rychlosti polarizace (obr. 3.3A). Linearita těchto křivek a absence vlivu rychlosti polarizace naznačuje, že anodický proces je řízen konvektivní difúzí heparinu ve vodné fázi. Závislost limitního proudu na rotační rychlosti pak může být popsána Levičovou rovnicí (3.2)

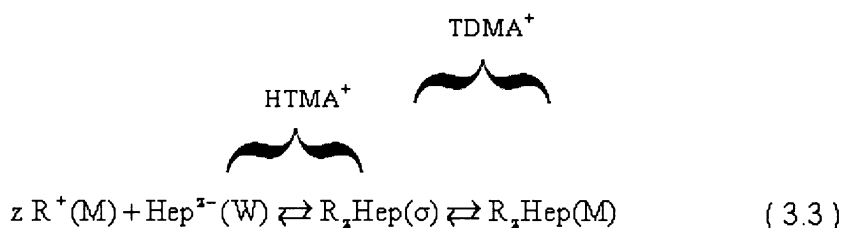
$$i_{lim} = -0,62zFAD^{2/3}\nu^{-1/6}\omega^{1/2}c^0 \quad (3.2)$$

kde A značí plochu rozhraní, D je difúzní koeficient, ν je kinematická viskozita, $\omega = 2\pi f$ je úhlová frekvence rotace a c^0 je molární koncentrace heparinu. Přesné nábojové číslo a molární koncentrace heparinu nejsou bohužel známy, z toho důvodu, že heparin je směsí sulfonovaných polysacharidů. Dalším problémem je, že sprážená reakce, tj. přenos heparinu a redoxní reakce ferocénu, probíhají na opačných stranách membrány a na rozdílných plochách. Geometrická plocha membrány, vystavená vodnému roztoku, je prakticky stejná jako čelní plocha válcové elektrody s průměrem 1 cm ($A = 0,79$ cm²), viz obr. 2.1. Naproti tomu, geometrická plocha dalšího rozhraní je rovna ploše GC disku s průměrem 3 mm ($A = 0,07$ cm²). Lze předpokládat, že elektrochemická aktivita těchto dvou rozhraní závisí na aktuálním rozložení proudu uvnitř membrány a zpracování tohoto problému by vyžadovalo zavedení dalších předpokladů. Dejme tomu, že $z = 75$, $c^0 = a^0 u^{-1} M_h^{-1}$, $M_h = 12$ kDa, $A = 0,07$ cm², $\nu = 10^{-2}$ cm²s⁻¹, $f = 16,66$ Hz (1000 rpm) a $D = 5 \times 10^{-7}$ cm²s⁻¹,³² po dosazení do rov. (3.2) vychází hodnota směrnice $\partial i_{lim} / \partial a^0 = 0,24 \times 10^{-6}$ A U⁻¹ ml, což je blízké

experimentálně získané hodnotě $\partial i_{\text{lim}} / \partial a^0 = 0,22 \times 10^{-6} \text{ A U}^{-1} \text{ ml}$ pro anodický proces (výřez na obr. 3.5A). Podobně, katodický peak v případě HTMA⁺, je úměrný jak odmocnině z rychlosti rotace, tak i koncentraci heparinu, a je nezávislý na rychlosti polarizace. Toto chování, zejména absence vlivu rychlosti polarizace, ukazuje, že katodický proces není spojen s předpokládanou lineární difúzí uvnitř membrány, ale spíše s desorpcí iontového páru z povrchu řízenou konvektivní difúzí.

3) Z různých rozsahů potenciálových oken (obr. 3.3, 3.4, 3.5 a 3.6) a z různých efektů rychlostí rotace a polarizace elektrody na proudy peaků (obr. 3.3 a 3.4), lze usuzovat, že se mechanismy reakcí heparinu s HTMA⁺ a TDMA⁺ liší. Výše je popsán mechanismus přenosu heparinu s kationtem HTMA⁺, v jehož přítomnosti proud peaku i_p^- závisí na rychlosti rotace elektrody (obr. 3.4A), z čehož lze vyvodit závěr, že dominantní je zde tvorba adsorbované vrstvy mezi heparinem a kationtem na rozhraní membrána | vodná fáze (σ). V případě kationtu TDMA⁺, který je podstatně hydrofóbnější, proud anodického, ani katodického peaku příliš nezávisí na rychlosti rotace elektrody (obr. 3.4B), zatímco vliv rychlosti polarizace je podobný, jako u procesu řízeného lineární difúzí (obr. 3.3B). To nás vede k závěru, že při anodickém procesu dochází k tvorbě iontového páru mezi heparinem a kationtem a k jeho přenosu do organické fáze. Při katodickém procesu dochází k lineární difúzi iontového páru v opačném směru.

V souhrnu lze mechanismus přenosu popsat schématem (3.3)



kde R⁺ označuje kation HTMA⁺ nebo TDMA⁺ přítomný v membráně.

Všechny uvedené efekty membránových kationtů (HTMA⁺, TDMA⁺) nás vedou k závěru, že důležitým krokem detekčního mechanismu je potenciálová závislost reversibilní adsorpce iontového páru, vytvářeného mezi heparinem a kationtem na rozhraní membrána | vodná fáze.

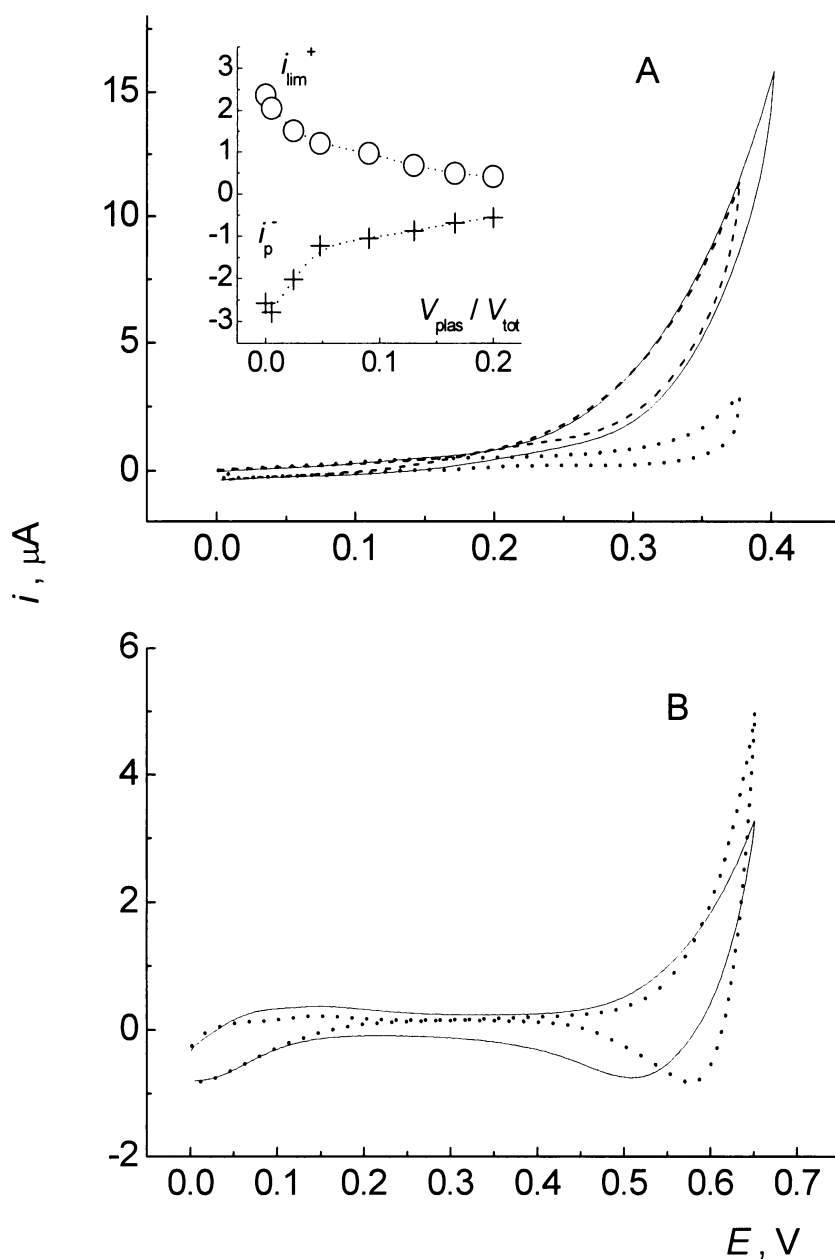
3.4 Stanovení heparinu v krevní plazmě

Elektrody pokryté 1.) HTMA⁺/o-NPOE a 2.) TDMA⁺/DOS membránou byly testovány pro účely ampérometrické analýzy heparinu v krevní plazmě. Na obr. 3.8 je ukázáno voltametrické chování první (obr. 3.8A) a druhé (obr. 3.8B) elektrody v neupravené lidské krevní plazmě a ve vodném roztoku 0,1 M LiCl za nepřítomnosti heparinu. Elektroda pokrytá HTMA⁺/o-NPOE membránou vykazuje nápadné zvětšení proudové odezvy v oblasti kladného limitního potenciálu (obr. 3.8A, plná čára). Pokud byl tento experiment prováděn s vodným roztokem 0,1 M LiCl, obsahujícím albumin v koncentraci porovnatelnou s krevní plazmou (45 g L⁻¹), bylo dosaženo podobného proudového zvýšení (obr. 3.8 A, přerušovaná čára). Nicméně nebyla pozorována žádná voltametrická změna, když byl do roztoku obsahujícího krevní plazmu, nebo do vodného roztoku 0,1 M LiCl obsahujícího albumin, přidán heparin (10 U ml⁻¹). Ve snaze objasnit nepřítomnost odezvy na heparin, byl zkoumán efekt plazmy na voltamogram heparinu ve vodném roztoku 0,1 M LiCl (obr.3.5A). Výřez v obr. 3.8A ukazuje závislost naměřených hodnot i_{lim}^+ a i_p^- na objemové frakci plazmy ve vodném roztoku, V_{plas} / V_{tot} . Je zřejmé, že oba proudy, limitní proud a proud peaku, postupně klesají a dosahují nuly při poměru $V_{plas} / V_{tot} \approx 0,5$.

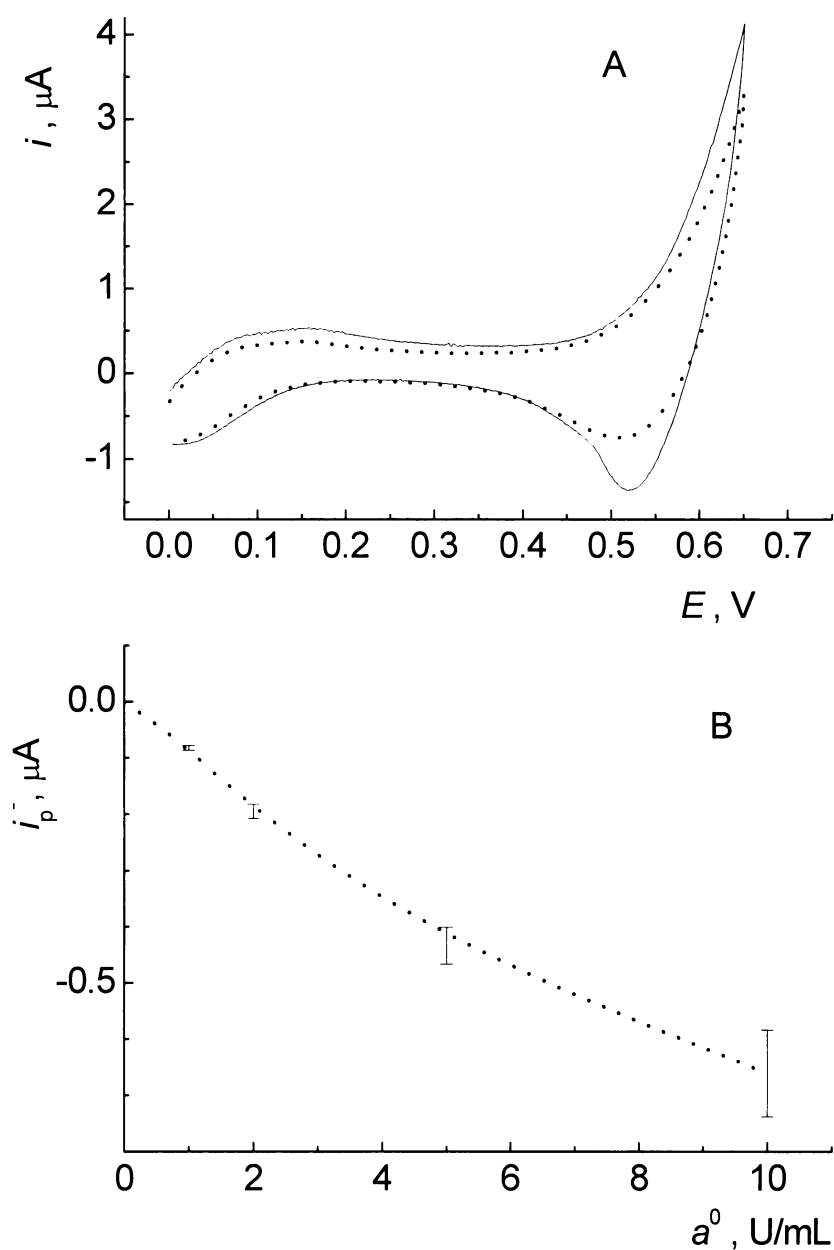
Zvýšení pozitivního proudu v přítomnosti plazmy může být připsáno přenosu složek plazmy do membrány, či spíše usnadnění přenosu HTMA⁺ vazbou na složky plazmy v opačném směru. Přenos HTMA⁺ do vodné fáze určuje kladný limitní potenciál a potlačení odezvy na heparin (obr. 3.8A, výřez) tak může mít původ v konkurenci mezi heparinem a složkami plazmy, pravděpodobně albuminem, tvořícími komplex s HTMA⁺ na vodné straně mezifázi. Takovýto výklad je podporován nepřítomností těchto efektů u elektrody, pokryté TDMA⁺/DOS membránou. Voltamogramy naměřené v plazmě (obr. 3.8B, plná čára) a ve vodném roztoku 0,1 M LiCl (obr. 3.8B, čárkovaná čára) jsou v podstatě identické. Bylo prokázáno, že kation TDMA⁺ se do vodné fáze při pozitivních potenciálech nepřenáší (na rozdíl od HTMA⁺), a nemůže tak reagovat se složkami plasmu, např. albuminem.³⁵

Elektroda pokrytá TDMA⁺/DOS membránou může tedy poskytovat měřitelnou proudovou odezvu na heparin v lidské krevní plazmě (obr. 3.9A). Obr. 3.9B ukazuje kalibrační graf pro heparin v rozsahu koncentrací heparinu 1-10 U ml⁻¹. Počáteční směrnice na kalibračním grafu a směrodatná odchylka SD = 0,0045 μA, vypočítaná ze

tří nezávislých měření 1 U ml^{-1} , byly použity pro odhad limitu detekce ($0,2 \text{ U ml}^{-1}$), jako koncentrace heparinu, odpovídající proudu $3,3 \times \text{SD}$.



Obr. 3.8 Cyklický voltamogram (20 mV s^{-1}) naměřený na rotující GC elektrodě (1000 rpm) pokryté plastifikovanou PVC membránou obsahující $0,1 \text{ M DMFc}$ a (A) $0,05 \text{ M HTMATPBCl}$ v $o\text{-NPOE}$, nebo (B) $0,05 \text{ M TDMATPBCl}$ v DOSu , ve vodném roztoku $0,1 \text{ M LiCl}$ (tečkovaná), v lidské krevní plazmě (plná) nebo ve vodném roztoku $0,1 \text{ M LiCl}$ obsahujícím $0,45 \text{ g ml}^{-1}$ albuminu (čárkovaná). Výřez v okně A ukazuje efekt přidavku lidské krevní plazmy do vodného roztoku $0,1 \text{ M LiCl}$ na limitní proud i_{lim}^+ (\circ) a proud peaku i_p^- ($+$) heparinu (10 U ml^{-1}). Koncentrace plazmy je vyjádřena jako podíl objemu plazmy V_{plas} na celkovém objemu roztoku V_{tot} .



Obr. 3.9 (A) Cyklické voltamogramy (20 mV s^{-1}) naměřené na rotující GC elektrodě (1000 rpm) pokryté plastifikovanou PVC membránou obsahující 0,1 M DMFc a 0,05 M TDMATPBCl v DOSu, v lidské krevní plazmě za nepřítomnosti (tečkovaná) a přítomnosti (plná) heparinu (10 U ml^{-1}). (B) Kalibrační graf ze tří nezávislých měření, na pozadí korigovaný proud peaku i_p^- vs. koncentrace heparinu a^0 v lidské krevní plazmě se směrodatnou odchylkou vyznačenou svislými úsečkami.

4 Závěr

a) V souladu s cílem této diplomové práce byla navržena a ověřena metoda definovaného pokrytí povrchu elektrody PVC membránou, s obsahem dvou různých plastifikátorů.

b) Bylo ukázáno, že GC elektroda pokrytá HTMA⁺/o-NPOE (DOS) nebo TDMA⁺/o-NPOE (DOS) membránou poskytuje srovnatelné ampérometrické odezvy na heparin (1-10 U ml⁻¹) ve vodných roztocích 0,1 M LiCl. Analýza efektů koncentrace heparinu, rychlosti rotace a rychlosti polarizace elektrody umožňuje navrhnout mechanismus odezvy. Předpokládaný mechanismus zahrnuje transport heparinu ve vodné fázi, tvorbu a akumulaci iontového páru mezi polyaniontem heparinu a kationtem HTMA⁺ nebo TDMA⁺ na mezifázi membrána-roztok, desorpci a transport iontového páru ve fázi membrány. Ampérometrická odezva elektrod, pokrytých HTMA⁺/o-NPOE (DOS) membránou je pravděpodobně kontrolována transportem heparinu ve vodné fázi a adsorpcí iontového páru heparinu s HTMA⁺ na mezifázi membrána-roztok. Ampérometrická odezva elektrody s TDMA⁺/o-NPOE (DOS) membránou je naproti tomu řízená spíše transportem iontového páru heparinu s TDMA⁺ uvnitř fáze membrány.

c) Bylo zjištěno, že pouze membrány s TDMATPBCl mohou být použity pro ampérometrické stanovení heparinu v lidské krevní plazmě s detekčním limitem 0,2 U ml⁻¹. Při použití elektrody s HTMA⁺/o-NPOE membránou, brání přenos HTMA⁺ do vodné fáze a jeho konkurenční interakce se složkami plazmy (např. albuminem) ampérometrickému stanovení heparinu.

5 Literatura

1. Linhardt, R. J.: Chem. Ind. 2, 45 (1991).
2. Samec Z.; Trojánek A.; Langmaier J.; Samcová E.: Electrochem. Commun. 5, 867 (2003).
3. Casu, B.: Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 43, 51 (1985).
4. Edens, R. E.; Al-Hakim, A.; Weiler, J. M.; Rethwisch, D. G.; Fareed, J.; Lindhart, R. J.: J. Pharm. Sci. 81, 823 (1992).
5. Ahsan, A.; Jeske, W.; Hoppensteadt, D.; Lormeau, J. C.; Wolf, H. M.; Loganathan, D.:Biochem. J. 254, 781 (1995).
6. Nader, H. B.; Dietrich, C. P.: Natural occurrence and possible biological role of heparin. In Heparin Chemical and Biological Properties, Clinical Applications; Lane, D. A.; Lindhal, U.; Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1989, pp 115 – 133.
7. Linhardt, R. J.; Toida, T. Heparin oligosaccharides: new analogues-development and applications. In *Carbohydrates in Drug Design*; Witzcak, Z. J., Nieforth, K. A., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1997; Chapter 7, pp 277 – 341.
8. Linhardt R. J.: J. Med. Chem. 46, 2551 (2003).
9. Loganathan, D.; Wang, H. M.; Mallis, L. M.; Linhardt, R. J.: Biochemistry 29, 4362 (1990).
10. Jaques, L. B.: Science 206, 528 (1979).
11. Zhong, Z.; Anslyn, E. V.: J. Am. Chem. Soc. 124, 9014 (2002).
12. Wiskur, S. L.; Anslyn, E. V.: J. Am. Chem. Soc. 123, 10109 (2001).
13. Despotis, G. J.; Gravlee, G.; Filos, K.; Levy, J.:Anesthesiology 91, 1122 (1999).
14. van Kerkhof, J. C.; Berveld, P.; Schaasfoort, R. B. M.: Biosens. Bioelectron. 10, 269 (1995).
15. Davis, K. A.; Leary, T. R.: Anal. Chem. 61, 1227 (1989).
16. Cheng, T.-J.; Lin, T.-M.; Chang, H.-C.: Anal. Chim. Acta 462, 261 (2002).
17. Sugawara, M.; Hirano, A.; Buhlmann, P.; Umezawa, Y.: Bull. Chem. Soc. Jpn. 75,187 (2002).
18. Gadzekpo, V. P. Y.; Buhlmann, P.; Xiao, K. P.; Aoki, H.; Umezawa, Y.: Anal. Chim. Acta 411, 163 (2000).
19. van Kerkhof, J. C.; Berveld, P.; Schaasfoort, R. B. M.: Biosens. Bioelectron. 8 (1993).

20. Esson, J.M.; Ramamurthy, N; Meyerhoff, M.: *E. Anal. Chim. Acta* 404, 83 (2000).
21. Fu, B.; Bakker, E.; Yang, V.C.; Meyerhoff, M.: *Macromolecules* 28, 5834 (1995).
22. Ye, Q.; Meyerhoff M.: *Anal. Chem.* 73, 332 (2001).
23. Ma, S. C.; Yang, V. C.; Fu, B.; Meyerhoff, M. E.: *Anal. Chem.* 65, 2078 (1993).
24. Dai, S.; Esson, J. M.; Lutze, O.; Ramamurthy, N.; Yang, V. C.; Meyerhoff, M. E.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19, 1 (1999).
25. Shi, C.; Anson, F. C.: *Anal. Chem.* 70, 3114 (1998).
26. Ulmeanu, S.; Lee, H. J.; Fermin, D. J.; Girault, H. H.; Shao, Y.: *Electrochem. Commun.* 3, 219 (2001).
27. Scholz, F.; Komorsky-Lovrić, Š.; Lovrić, M.: *Electrochem. Commun.* 2, 112 (2000).
28. Komorsky-Lovrić, Š.; Lovrić, M.; Scholz, F.: *J. Electroanal. Chem.* 508, 129 (2001).
29. Komorsky-Lovrić, Š.; Riedl, K.; Gulaboski, R.; Mirčeski, V.; Scholz, F.: *Langmuir* 18,8000 (2002).
30. Gulaboski, R.; Scholz, F.: *J. Phys. Chem. B* 107, 5650 (2003).
31. Gulaboski, R.; Galland, A.; Bouchard, G.; Caban, K.; Kretschmer, A.; Carrupt, P.-A.; Stojek, Z.; Girault, H. H.; Scholz, F.: *J. Phys. Chem. B* 108, 4565 (2004).
32. Barlow, G.H.; Sanderson, N.D.; McNeill, P.D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 518 (1961).
33. Komorsky-Lovrić, Š.; Lovrić, M.; Scholz, F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 66, 434 (2001).
34. Langmaier J.; Olšák J.; Samcová E.; Samec Z.; Trojánek A.: *Electroanalysis* 18, 115 (2006).
35. Langmaier J.; Olšák J.; Samcová E.; Samec Z.; Trojánek A.: *Amperometric Sensor for Heparin, Electroanalysis* accepted 14.3.2006.

Full Paper

Amperometry of Heparin Polyion Using a Rotating Disk Electrode Coated with a Plasticized PVC Membrane

Jan Langmaier,^a Jiří Olšák,^b Eva Samcová,^c Zdeněk Samec,^{a*} Antonín Trojánek^a

^a The J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic

*e-mail: zdenek.samec@jh-inst.cas.cz

^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030/8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

^c 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Ruská 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic

Received: June 3, 2005

Accepted: June 6, 2005

Abstract

Electrochemical method of detection of heparin polyion was developed based on voltammetry of heparin on a rotating glassy carbon (GC) electrode coated with a plasticized PVC membrane. The membrane was deposited on the GC disk by spin-coating technique using a mixture of solutions of PVC in tetrahydrofuran, and 1,1'-dimethylferrocene (DMFc) and hexadecyltrimethylammonium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (HTMATPBCl) in *o*-nitrophenyl octyl ether. UV/vis reflection spectrometry was used to evaluate the membrane thickness, which exhibits a linear correlation with the membrane resistance measured by impedance spectroscopy. It is shown that this electrode can be used for amperometric or coulometric detection of heparin in aqueous samples of medically relevant concentrations (1–10 U mL⁻¹), with a detection limit of 1.4 U mL⁻¹. Evidence is provided indicating that the current determining step is the reversible adsorption of the ion-pair of heparin polyion with HTMA⁺ cation at the membrane/aqueous electrolyte interface, which is driven by oxidation of DMFc at the GC/membrane interface.

Keywords: Amperometry, Coulometry, Heparin polyion, Rotating glassy carbon electrode, PVC membrane

DOI: 10.1002/elan.200503381

Dedicated to Professor Karel Štulík on the Occasion of His 65th Birthday.

1. Introduction

A stable thin layer of organic solvent adherent to a graphite electrode has been found to be a suitable system for kinetic measurement of electron transfer across the interface between an organic solvent and an aqueous electrolyte solution [1]. More recently, an analogous arrangement with the aqueous or the organic solvent droplet attached to the surface of a metal [2] or graphite [3] electrode, respectively, has been used for an evaluation of the Gibbs energy of ion transfer from water to a polar or nonpolar organic solvent for large series of ions [2–7]. In all these systems, the ion transfer reaction at the water/organic solvent interface is driven by the electrochemical reaction occurring on the surface of the solid electrode, such as oxidation of ferrocene or decamethylferrocene [1, 3]. Overall mechanism comprising the transfer of, e.g., an anion A⁻ from the aqueous (W) to the membrane (M) phase coupled to oxidation of ferrocene (Fc) at a solid electrode S can be described as [3]



If the droplet does not cover the whole exposed area of the solid electrode, the process can eventually be confined to the very edge of the three-phase junction [3]. Although the

evaluation of electron transfer rate constants and ion transfer Gibbs energies have been so far the only matters of interest, easy preparation and handling seems to predetermine such electrode for a direct ion analysis. The purpose of this report is to demonstrate its usability for an amperometric and coulometric detection of polyion heparin in the range of medically relevant concentrations.

Heparin is an anticoagulant drug, which is used in surgical procedures and therapeutically to prevent blood coagulation [8]. Its assays are currently based on measuring the blood coagulation (clotting) time. Chemically, it is a mixture of highly sulfonated polysaccharides with an average molar mass $M_h = 12$ kDa, and an average negative charge number of -75 [9]. An attempt has been made to develop a method for direct and rapid determination of physiological heparin levels, based on potentiometry with a polyion-sensitive membrane electrode [10]. The optimum membrane composition was found to be 66% (by weight) polyvinyl chloride (PVC), 32.5% dioctyl sebacate (DOS) as a plasticizer and 1.5% tridodecylmethylammonium chloride (TDMACl) as an ion exchanger. It was shown that membranes doped instead with tetraalkyl analogues of TDMA⁺ (i.e., tetradodecylammonium and tetraoctylammonium) exhibited negligible heparin response, while the response of those doped with asymmetric analogues (e.g., dioctadecyldimethylam-

monium and hexadecyltrimethylammonium) was rather small [10]. The response of the TDMACl/PVC membrane electrode to medically relevant heparin concentrations ($0.1\text{--}10\text{ U mL}^{-1}$, ca. $0.04\text{--}4\text{ }\mu\text{M}$) was considerably larger than 0.79 mV/decade , which is the expected Nernstian slope corresponding to the charge number of -75 [10, 11]. Response mechanism was attributed to the non-equilibrium change in the phase boundary potential associated with the slow anion exchange reaction [10, 11],



where $z = 75$, Hep and M denote heparin and the membrane phase, respectively. A rotating electrode configuration has led to lowering of the detection limit, but the potential change with the heparin concentration was not linear on both logarithmic and linear concentration scale [12].

Our recent amperometric measurements of heparin at a 1,6-dichlorohexane plasticized PVC membrane containing hexadecyltrimethylammonium (HTMA^{+}) ion as an ion-exchanger [13], as well as previous study of protamine at the polarized water/1,2-dichloroethane interface [14], indicated that amperometry of these polyions can be a viable alternative to potentiometry. A remarkable effect of the membrane cation (HTMA^{+} , hexadecylpyridinium or bis-(triphenylphosphoranylidene)ammonium) has led us to conclude that amperometric sensing mechanism can be described as a facilitated polyion transfer comprising the formation of an ion-pair at the membrane/aqueous electrolyte interface (σ) [13],



where R^{+} denotes the cation exchanger present in the membrane phase.

However, neither the four-electrode membrane cell nor the liquid–liquid interface is very convenient system for a routine amperometric ion analysis. Therefore, we have designed an electrode coated with a thin PVC membrane containing HTMA^{+} and 1,1'-dimethylferrocene, which is attached to the surface of a glassy carbon (GC) disk. We shall show that the rotating electrode configuration allows gaining a deeper insight into the sensing mechanism, and ensures the stationary current response, which is linear in the range of heparin concentrations down to its therapeutic level. We shall also show that, in contrast to the potentiometric response of the polyion sensitive electrode [10], the amperometric response of the electrode with TDMA^{+} to heparin is negligible.

2. Experimental

Voltammetric and chronoamperometric measurements were carried out using the programmable potentiostat AUTOLAB (PGSTAT 30, Eco-Chemie, Netherlands) in a three-electrode cell. Potentiostat was equipped with the AUTOLAB rotating disk assembly. A Pt wire and the

silver–silver chloride electrode in 0.1 M KCl served as a counter and reference electrode, respectively. Impedance was measured in the same cell by using a frequency response analyzer (1255 FRA Solartron, Solartron Instruments, England) and a potentiostat (1287 Electrochemical Interface Solartron, Solartron Instruments, England).

PVC membrane was deposited on the surface of a glassy carbon disk electrode (3 mm diameter), which was fixed in a PTFE holder (Fig. 1). The solution containing 75 mg PVC (high molar mass, Fluka) in 1 mL of tetrahydrofuran (THF) was mixed with the 0.01 M hexadecyltrimethylammonium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (HTMATPBCl) and 0.1 M 1,1'-dimethylferrocene (DMFc , 97%, Aldrich) in *o*-nitrophenyl octyl ether (*o*-NPOE, Selectophore, Fluka). Surface of the rotating GC electrode oriented upward was spin-coated at 2000 rpm by the drop of the mixture ($75\text{ }\mu\text{L}$). THF was then allowed to evaporate slowly to form the film containing 25% PVC by weight over whole base of the electrode, cf. Figure 1. The deposition procedure was repeated several times so as to prepare the membrane

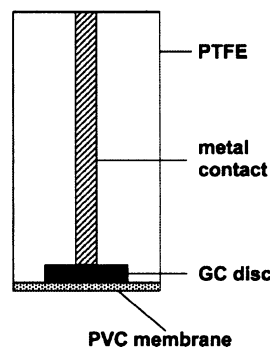


Fig. 1. Scheme of the rotating three-phase electrode with the *o*-NPOE plasticized PVC membrane attached to the surface of glassy carbon disk.

with a thickness of ca. $40\text{ }\mu\text{m}$, which was determined by reflectance spectrometry, vide infra.

The GC electrode covered with the PVC membrane was dipped into the aqueous solution containing 0.1 M LiCl , or the aqueous solution containing 0.1 M LiCl and heparin sodium salt from bovine intestinal mucosa (Aldrich, $u = 151\text{ U mg}^{-1}$). Heparin concentration a° was in the range $0.5\text{--}40\text{ U mL}^{-1}$, which corresponds to the range of the molar concentrations $c^{\circ} = a^{\circ}u^{-1} M_n^{-1} = 0.28\text{--}22\text{ }\mu\text{M}$ assuming $M_n = 12\text{ kDa}$ and the heparin activity u supplied by the manufacturer.

The membrane thickness d was evaluated from the UV/Vis reflection spectrum of the membrane, which was measured in 180° backscattering geometry by fiber-glass waveguide connected to a computer-operated spectrometer (Ocean Optics 2000). The reflectance spectrum exhibited several maxima/minima satisfying the condition

$$d = k\lambda_1\lambda_k/2n_{\text{eff}}(\lambda_1 - \lambda_k) \quad (4)$$

where k is the number of minima/maxima between the wavelengths λ_1 and λ_k , and $n_{\text{eff}} = 1.52$ is the effective refractive index, which was estimated from the values of the refractive index for *o*-NPOE (1.511) and PVC (1.539) [15].

Figure 2 (panel a) shows the typical impedance plot for the GC electrode covered with a PVC membrane and dipped in 0.1 M LiCl in the range of frequencies 10–300 Hz. The sum R of resistances of the membrane and the aqueous electrolyte solution was evaluated by fitting the impedance data to the Randles equivalent circuit with the help of ZPlot/ZWiev software (Scribner Associates, Inc.), cf. Figure 2. The values of $R = 3$ –30 k Ω are considerably higher than the estimated contribution of the aqueous solution and, hence, they practically corresponds to the resistance of the membrane. Figure 2 (panel b) shows a linear correlation between the membrane thickness d and the resistance R that can be expected for a cylindrical conductor. The linear plot in Figure 2b was used for a fast check of the membrane thickness from impedance data, which were routinely measured prior to each experimental run.

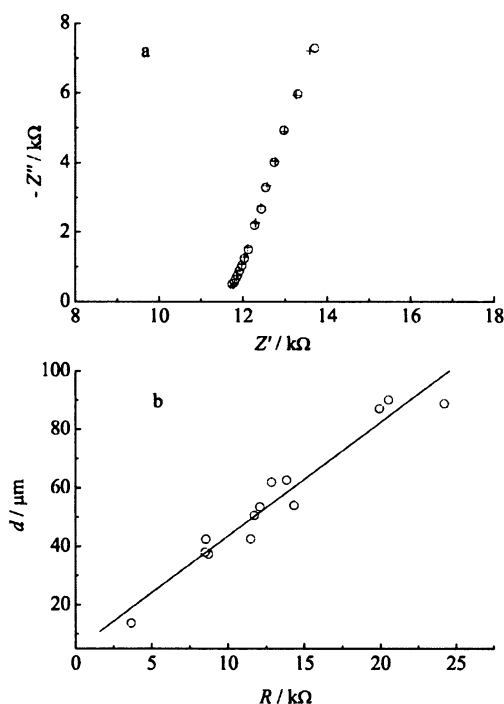


Fig. 2. Impedance plot (○) and the impedance data fit (+) in the range of frequencies 10–300 Hz (a), and the membrane thickness d vs. the membrane resistance R (b) for the three-phase electrode with a PVC membrane containing 0.01 M HTMATPBCl and 0.1 M DMFc in the aqueous solution of 0.1 M LiCl.

3. Results and Discussion

3.1. Rotating Disk Electrode Voltammetry of Heparin

Figure 3 shows the voltammograms recorded on the rotating GC electrode coated with the *o*-NPOE plasticized PVC membrane in the absence (panel a) and presence (panel b) of heparin in the aqueous phase. The anodic wave at ca. 0.33 V and the cathodic peak at ca. 0.3 V on the reverse sweep represent the response of the electrode to heparin present in the aqueous phase. At a stationary GC electrode the anodic wave and cathodic peak appear at approximately the same potentials, cf. the dashed line in Figure 3b. Figure 3c shows the voltammograms of the three-phase electrode with the membrane containing tridodecylmethylammonium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (TDMATPBCl) instead of HTMATPBCl. In this case, practically no heparin response is observed, and the only effect of TDMATPBCl is an extension of the positive potential limit by ca. 0.1 V, which can be ascribed to the higher hydrophobicity of the TDMA⁺ cation. In all these systems a voltammetric peak appears at ca. 0.13 V, which slightly increases on repeating the excursion to the positive potential limit. This peak is likely to be due to the 1,1'-dimethylferricenium cation, which is generated at the GC electrode and transported to the membrane/aqueous electrolyte interface, where it undergoes the transfer to the aqueous phase,



Since the transfer of Fc^+ to the aqueous phase is controlled by the linear diffusion of Fc^+ inside the membrane, the anodic peak at 0.13 V is practically independent of the rotation speed. On the other hand, the cathodic peak corresponding to the transfer of Fc^+ back to the membrane phase can be clearly seen only at a stationary electrode. Owing to the zero bulk concentration of Fc^+ in the aqueous phase, the cathodic current decreases after switching on the rotation cf. the dashed line in Figure 3b.

Figure 4 shows the limiting anodic or cathodic peak current I_{lim} plotted vs. the heparin concentration a° at a constant rotation speed of 1000 rpm (panel a), and vs. the square root of rotation speed f at a constant heparin concentration of 5 U mL⁻¹ (panel b). At a stationary electrode, the heparin peak current is proportional to the heparin concentration and to the square root of the sweep rate. Linearity of these plots indicates that both the anodic and cathodic processes are controlled by the convective ($f \neq 0$) or linear ($f = 0$) diffusion of heparin in the aqueous phase, respectively. The dependence of the limiting current on the rotation speed can be described by the Levich's equation,

$$I_{\text{lim}} = 0.62 zFA D^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2} c^{\circ} \quad (6)$$

where A is the interfacial area, D is the diffusion coefficient, ν is the kinematic viscosity, $\omega = 2\pi f$ is the angular frequency

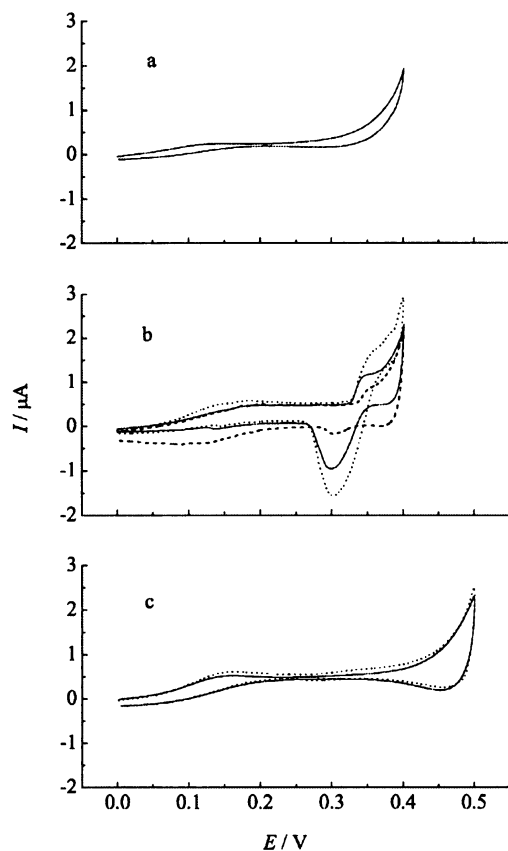


Fig. 3. Cyclic voltammograms of the rotating three-phase electrode with a PVC membrane containing 0.1 M DMFc and 0.01 M HTMATPBCI (a, b) or TDMATPBCI (c) in the absence or presence of heparin in the aqueous solution of 0.1 M LiCl: (a) no heparin, 1000 rpm; (b) 5 U mL⁻¹ heparin at a rotation speed of 0 rpm (---), 200 rpm (—) and 1000 rpm (·····); (c) no heparin (—) and 10 U mL⁻¹ heparin (·····) at a rotation speed of 1000 rpm. Sweep rate 20 mV s⁻¹.

of rotation and c° the bulk molar concentration of heparin. However, the actual charge number and molar concentration of heparin are not exactly known, because heparin is in fact a mixture of sulfonated polysaccharides. Another problem is that the coupled charge transfer reactions, i.e. the transfer of heparin and the redox reaction of ferrocene, proceed on the opposite sides of the membrane with different interfacial areas. The geometric area of the membrane side exposed to the aqueous solution is practically equal to that of the base of the cylindrical electrode holder with a diameter of 1 cm ($A = 0.79 \text{ cm}^2$), cf. Figure 1. On the other hand, the geometric area of the other interface is equal to that of the GC disk with a diameter of 3 mm ($A = 0.07 \text{ cm}^2$). Electrochemical activity of the two interfaces can be then expected to depend on the actual current distribution inside the membrane, which would require an addi-

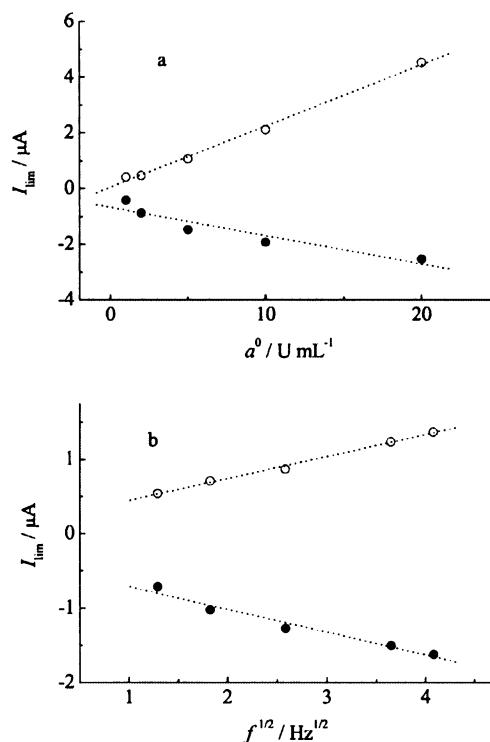


Fig. 4. Plot of the limiting anodic (○) and cathodic peak (●) current I_{lim} of heparin vs. the heparin concentration a° at the rotation speed of 1000 rpm (a), and vs. the square root of the rotation speed at the heparin concentration of 5 U mL⁻¹ (b). Measured limiting currents were corrected for the background current.

tional modelling. Assuming that $z = 75$, $c^\circ = a^\circ u^{-1} M_h^{-1}$, $M_h = 12 \text{ kDa}$, $A = 0.07 \text{ cm}^2$, $\nu = 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $f = 16.66 \text{ Hz}$ (1000 rpm) and $D = 5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [16], Equation 6 predicts the slope $\partial I_{\text{lim}}/\partial a^\circ = 0.24 \times 10^{-6} \text{ A U}^{-1} \text{ mL}$, which is close to that of $0.22 \times 10^{-6} \text{ A U}^{-1} \text{ mL}$ obtained experimentally for anodic process (Fig. 4, panel a).

Two distinct features of the voltammetric behavior of heparin enlighten the mechanism of its electrochemical activity. First, as it can be seen from Figure 3b, the anodic half-wave potential and cathodic peak potential of heparin are independent of the rotation speed. Analogously, at the stationary electrode, the anodic and cathodic peak potentials are independent of the sweep rate, with the peak-potential separation $\Delta E_p \approx 30\text{--}40 \text{ mV}$. This feature clearly points to the absence of any kinetic control. Following the theoretical analysis of the simple anion transfer reaction described by Equation 1 [17], the applied potential E splits into the Galvani potential difference between the GC electrode and the membrane phase, $\Delta_M^{\text{GC}}\phi = \phi(\text{GC}) - \phi(\text{M})$, and the Galvani potential difference between the aqueous and membrane phases, $\Delta_M^{\text{W}}\phi = \phi(\text{W}) - \phi(\text{M})$, and a constant comprising the contributions from the reference

electrodes. In the absence of kinetic control, the two potential differences could be further expressed as the Nernst potentials for the coupled reactions, and the peak separation at the stationary electrode, or the slope of the wave at a rotating electrode, can be supposed to attain the value of $(RT/zF) < 1$ mV/decade. However, the measured peak separation of 30–40 mV indicates that the apparent reversibility of the process is not linked to the charge transfer equilibrium. Second feature noted above is the effect of the rotation speed on the cathodic peak at ca. 0.3 V indicating that the cathodic process is controlled by a reaction step occurring in the aqueous phase, which is probably the heparin desorption and transport from the membrane/aqueous solution interface, cf. Equation 3. Both features, and the effect of the membrane cation (HTMA⁺, TDMA⁺), lead us to conclude that the current determining step is the potential-dependent reversible adsorption of the ion-pair formed by the heparin polyion and HTMA⁺ at the membrane/aqueous solution interface.

3.2. Potential Pulse Chronoamperometry and Coulometry of Heparin

Chronoamperometry at a constant applied potential E would obviously represent the most straightforward application of the rotating three-phase electrode for a monitoring of the heparin concentration in aqueous solutions. However, the depletion of ferrocene from the GC/membrane interface during the long-term polarization close to the positive potential limit leads to a deterioration of the electrode response. This effect can be largely suppressed by using the potential pulse instead of the constant potential chronoamperometry. Figure 5, panel a, shows the response of the rotating three-phase electrode to single potential pulse from 0 V to 0.375 V with the pulse duration of 10 s at various heparin concentrations. It can be seen that the relaxation of the electric double layer and of the diffusion field takes approximately 1 s. Relaxation time for the stationary convective diffusion can be estimated to be even shorter, i.e. $\tau_d: \delta_d / 3.1 D \approx 0.2$ s, where $\delta_d = 1.61 D^{1/3} \nu^{1/6} \omega^{-1/2}$ is the thickness of the diffusion layer at a rotating disk electrode [18]. After ca. 2 s, the background-subtracted anodic current becomes practically stationary. Integrating the chronoamperometric curves can eliminate effect of time. Figure 5, panel b, shows that the concentration dependence of the charge Q is linear in the range of the medically relevant heparin concentrations. Data points in Figure 5b, which correspond to a stepwise increase in the heparin concentration by 1 U mL⁻¹, were averaged from measurements on three different three-phase electrodes. Standard deviations as shown by vertical bars indicated the relative precision of the charge measurements of ca. 20%. The limit of detection L_D was estimated as $L_D = 3.3 s_0 = 1.4$ U mL⁻¹, where s_0 denotes the standard deviation of response Q for blank aqueous sample, and b is the slope of the linear calibration curve in Figure 5b. In order to assess the accuracy and precision (repeatability) of the coulometric method, the

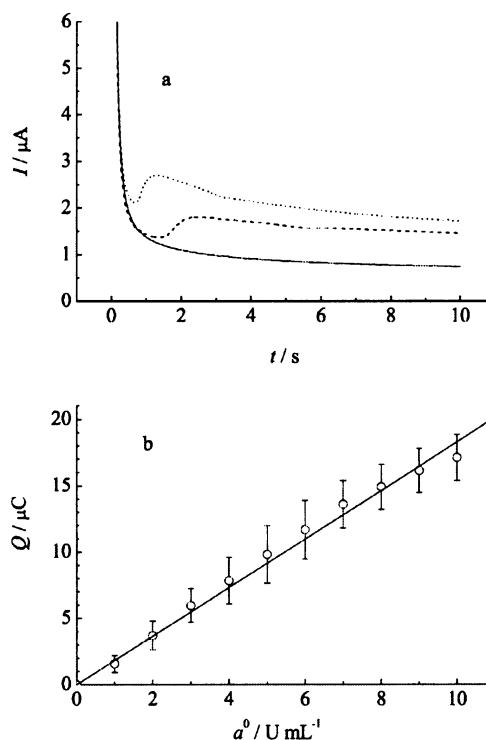


Fig. 5. Chronoamperometric response of the rotating three-phase electrode (1000 rpm) to a single potential pulse from 0 V to 0.375 V with the pulse duration of 10 s at the heparin concentrations 0 U mL⁻¹ (—), 5 U mL⁻¹ (---) and 10 U mL⁻¹ (····) (a), and the corresponding charge Q vs. the heparin concentrations a° (b). Data points and vertical bars in panel b represent the mean and the standard deviations, respectively, obtained from measurements at three different three-phase electrodes, linear regression line: $Q = -0.015 + 1.833 a^\circ$.

linear plot in Figure 5b was used as a calibration curve for the determination of heparin in the aqueous samples with three different heparin concentrations (1, 5 and 10 U mL⁻¹). Each measurement was repeated three times yielding the values of the mean concentration and the standard deviation, which are given in Table 1. Except for heparin concentrations approaching the lower limit of 1 U mL⁻¹, the method is plausibly accurate and precise.

Table 1. Coulometric determination of heparin in aqueous samples of three different heparin concentrations.

| Heparin concentration (U mL ⁻¹) | |
|---|------------|
| Prepared | Determined |
| 1.0 | 0.6 ± 0.04 |
| 5.0 | 4.8 ± 0.80 |
| 10.0 | 9.4 ± 0.45 |

4. Conclusions

The rotating glassy carbon electrode coated with the o-NPOE plasticized PVC membrane can be used for amperometric or coulometric detection of heparin present in aqueous samples of medically relevant concentrations (1–10 U mL⁻¹), with a detection limit of 1.4 U mL⁻¹. Except for heparin concentrations approaching the lower limit of 1 U mL⁻¹, the method is plausibly accurate and precise. The current determining step is the potential-dependent reversible adsorption of the ion-pair of the heparin polyion and HTMA⁺ at the membrane/aqueous solution interface, which is driven by oxidation of DMFc at the GC/membrane interface.

5. Acknowledgements

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant. No. 203/04/0424).

6. References

- [1] C. Shi, F. C. Anson, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3114.
- [2] S. Ulmeanu, H. J. Lee, D. J. Fermin, H. H. Girault, Y. Shao, *Electrochem. Commun.* **2001**, *3*, 219.
- [3] F. Scholz, Š. Komorsky-Lovric, M. Lovric, *Electrochem. Commun.* **2000**, *2*, 112.
- [4] Š. Komorsky-Lovric, M. Lovric, F. Scholz, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *508*, 29.
- [5] Š. Komorsky-Lovric, K. Riedl, R. Gulaboski, V. Miréeski, F. Scholz, *Langmuir* **2002**, *18*, 8000.
- [6] R. Gulaboski, F. Scholz, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 5650.
- [7] R. Gulaboski, A. Galland, G. Bouchard, K. Caban, A. Kretschmer, P.-A. Carrupt, Z. Stojek, H. H. Girault, F. Scholz, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 4565.
- [8] R. A. O'Reilly, in *Basic and Clinical Pharmacology*, 5th ed. (Ed: B. G. Katzung), Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J. **1992**, pp. 466–470.
- [9] J. Linhardt, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2551.
- [10] S. Ma, V. C. Yang, M. E. Meyerhoff, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 694.
- [11] B. Fu, E. Bakker, J. H. Yun, V. C. Yang, M. E. Meyerhoff, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2250.
- [12] Q. Ye, M. E. Meyerhoff, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 332.
- [13] Z. Samec, A. Trojánek, J. Langmaier, E. Samcová, *Electrochem. Commun.* **2003**, *5*, 867.
- [14] S. Amemiya, X. Yang, T. L. Wazenegger, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11832.
- [15] http://www.texloc.com/closet/cl_refractiveindex.html
- [16] G. H. Barlow, N. D. Sanderson, P. D. McNeill, *Arch. Biochem. Biophys.* **1961**, *94*, 518.
- [17] Š. Komorsky-Lovric, M. Lovric, F. Scholz, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2001**, *66*, 434.
- [18] Y. V. Pleskov, V. Y. Filinovskii, *The Rotating Disc Electrode*, Consultants Bureau, New York **1976**.

The definitive work in electrochemistry

Available Volumes:

- 1: Thermodynamics and Electrified Interfaces
 - 2: Interfacial Kinetics and Mass Transport
 - 3: Instrumentation and Electroanalytical Chemistry
 - 4: Corrosion and Oxide Films
 - 6: Semiconductor Electrodes and Photoelectrochemistry
 - 8: Organic Electrochemistry
 - 9: Bioelectrochemistry
- Forthcoming Volumes (completed Fall 2006):
- 5: Electrochemical Engineering
 - 7: Inorganic Electrochemistry
 - 10: Modified Electrodes
 - 11: Index

Editors-in-Chief: Allen J. Bard, Department of Chemistry, University of Texas, Austin, USA/ Martin Stratmann, Max-Planck-Institute for Iron Research, Duesseldorf, Germany

Stay up-to-date in electrochemistry

- a total of 11 volumes makes this the first and only complete reference on electrochemistry
- covering all aspects, from fundamental research to applications in industry
- easy access to electrochemical topics

www.wiley-vch.de/bard/eoe

2006. Approx 6000 pages with approx 3000 figures and about 1000 tables. Hardcover. ISBN 3-527-30250-6
€ 299.00*/£ 200.00 per volume. *The e-price is valid for Germany only!

11 volumes (including index volume)

For ordering information, please contact our customer service:
Wiley-VCH
E-Mail: service@wiley-vch.de
www.wiley-vch.de
John Wiley & Sons, Inc.
E-Mail: custserv@wiley.com
www.wiley.com
John Wiley & Sons, Ltd.
E-Mail: cs-books@wiley.co.uk
www.wiley.com

WILEY-VCH
WILEY
WILEY InterScience®
DISCOVER SOMETHING GREAT

Abstract

Voltammetric measurements of heparin at a rotating glassy carbon (GC) electrode coated with a polyvinylchloride membrane are reported. A spin-coating technique is used to prepare thin membranes (20–40 μm) with a composition of 25%(w/w) PVC, 1,1'-dimethylferrocene as a reference electron donor for the GC|membrane interface, *o*-nitrophenyl octyl ether (o-NPOE) or bis(2-ethylhexyl) sebacate (DOS) as a plasticizer, and hexadecyltrimethylammonium tetrakis(4-chlorophenyl) borate (HTMATPBCl) or tridodecylmethylammonium tetrakis(4-chlorophenyl) borate (TDMATPBCl) as a background electrolyte. It is shown that the electrodes coated with either the HTMA⁺/o-NPOE (DOS) or TDMA⁺/o-NPOE (DOS) membrane provide a comparable amperometric response towards heparin (1–10 U mL⁻¹) in the aqueous solution of 0.1 M LiCl. However, only the membranes formulated with TDMA TPBCl can be used for an amperometric assay of heparin in human blood plasma with a detection limit of 0.2 U mL⁻¹. Effects of membrane composition, heparin concentration, rotation speed and sweep rate on the voltammetric behaviour of heparin provide some insight into the sensing mechanism. Theoretical analysis of the amperometric response is outlined, and the numeric simulation of the voltammetric behaviour is presented.

Keywords: Heparin, Amperometry, PVC membrane electrode, Sensing mechanism, Human blood plasma

Amperometric Sensor for Heparin: Sensing Mechanism and Application in Human Blood Plasma Analysis

Jan Langmaier,^a Jiří Orlák,^b Eva Samcová,^c Zdeněk Samec,^{,a} Antonín Trojánek^a*

^a The J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Dolejškova 3, 182 23 Prague 8, Czech Republic

^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030/8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

^c 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Ruská 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic

* Corresponding author. Tel.: +420-266052017; fax: +420-286582307. E-mail address: zdensek@ih-insti.cas.cz (Z. Samec).

Presented at International Conference on Electrochemical Sensors, Matrafüred, Hungary, November 13–18, 2005.

1. Introduction

Heparin is a mixture of highly sulphated linear polysaccharides with the molar mass ranging from 5 to 40 kDa, which has been used in surgical procedures and therapeutically to prevent blood coagulation [1]. Medically relevant heparin concentrations are in the range 0.1-1 U mL⁻¹ (therapy) [2] or 1-10 U mL⁻¹ (surgery) [3]. The heparin concentration a^0 expressed in U mL⁻¹ can be converted into molar concentration c^0 as $a^0 = c^0 u M_n$, M_n is the heparin molar mass (Da) and u is the heparin activity (U mg⁻¹). The range of concentrations $a^0 = 0.1-10$ U mL⁻¹ then corresponds to the range of the molar concentrations $c^0 = 0.06 - 6$ μ mol L⁻¹, assuming the average molar mass $M_n = 12$ kDa [1], and the typical activity of heparin preparations $u = 150$ U mg⁻¹, e.g. heparin sodium salt from bovine intestinal mucosa (Aldrich).

Heparin assays are currently based on the measurements of plasma or whole blood clotting time [2]. An effort to achieve a sensitive and real-time monitoring of heparin has been a matter of intensive biosensor research [4]. The development of an electrochemical heparin sensor has been pioneered by Mayerhoff and co-workers [5], who have introduced a polymer type membrane electrode that exhibited a significant potentiometric response to heparin (0.1-10 U mL⁻¹) in both aqueous and human blood plasma samples. The optimum membrane composition was found to be 66 % (by weight) polyvinylchloride (PVC), 32.5 % dioctyl sebacate (DOS) as a plasticizer and 1.5 % tridodecylmethylammonium chloride (TDMACl) as an ion exchanger [5,6]. Further, it has been shown that membranes doped instead with the symmetric tetraalkylammonium ions (i.e., tetradodecylammonium and tetraoctylammonium) exhibited negligible heparin response, while the response of those doped with asymmetric analogues of TDMACl (e.g., dioctadecyltrimethylammonium and hexadecyltrimethylammonium) was rather

small [5]. Based on transport and extraction studies, the observed potentiometric response was ascribed to a change in the phase boundary potential associated with either the full displacement of the chloride counter ion from the membrane phase by the anionic heparin for high sample concentrations, or the quasi-steady state non-equilibrium accumulation of heparin at the interface [7]. Rotation of such polyion-sensitive electrode at 5000 rpm resulted in an enhancement in the detection limit towards heparin at least one order of magnitude, i.e. to 0.01 U mL⁻¹ [8].

First amperometric measurements of heparin at a 1,6-dichlorohexane plasticized PVC membrane containing hexadecyltrimethylammonium (HTMA⁺) ion as an ion-exchanger [9] indicated that the direct amperometry could be a viable alternative to the heparin potentiometry. A remarkable dependence of the amperometric response on the nature of the membrane cation (HTMA⁺, hexadecylpyridinium or bis(triphenylphosphoranylidene)ammonium) has led us to conclude that the sensing mechanism can be described as the heparin transfer facilitated by the formation of a complex between anionic heparin and the membrane cation, with an intermediate complex adsorption at the membrane/aqueous electrolyte interface [9]. The role of the interaction between anionic heparin and the membrane cation has been originally assumed to be the origin of the potentiometric response [5,6], though the sensing mechanism has been later formulated as a simple anion exchange process [7]. The strong effect of the membrane cation was confirmed by Amemiya and co-workers [10] in a study of heparin at the polarized water|1,2-dichloroethane interface, which indicated that the heparin transfer is facilitated most efficiently by octadecyltrimethylammonium and hexadecyltrimethylammonium. These authors proposed that the measured current is actually controlled by the adsorption of the heparin complex comprising the effect of the counterion condensation on a polyion [11], and determined its stoichiometry by an analysis of the measured current. Using stripping voltammetry of heparin a significant

enhancement of the limit of detection can be achieved to 0.012 U mL^{-1} in the aqueous solution of 0.12 M NaCl , or to 0.13 U mL^{-1} in sheep blood plasma [10], as compared with cyclic voltammetry giving the detection limit of 1 U mL^{-1} in the aqueous solution of 0.1 M LiCl [9].

Recently, we have shown that the amperometric or coulometric detection of heparin is also possible using a rotating glassy carbon (GC) electrode coated with the *o*-nitrophenyl octyl ether (*o*-NPOE) plasticized poly(vinyl chloride) membrane containing hexadecyltrimethylammonium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (HTMATPBCl) as the background electrolyte and $1,1'$ -dimethylferrocene (DMFc) [12]. The role of DMFc in this system is to provide electron and to form the corresponding cation DMFc^+ at the GC|membrane interface, which then can serve as a pseudo-reference electrode [13]. The aim of this study was to get a deeper insight into the sensing mechanism of such membrane electrode towards heparin and to test this sensor in the human blood plasma analysis. Therefore, we investigated the effects of the membrane composition including that of the plasticizer (*o*-NPOE, DOS) and the membrane cation (HTMA^+ , TDMA^+), as well as the effects of the heparin concentration; the sweep rate, and the rotation speed on the voltammetric behaviour of heparin in the aqueous solution of 0.1 M LiCl . We shall show that the GC electrodes coated with either the $\text{HTMA}^+/\text{o-NPOE}$ (DOS) or $\text{TDMA}^+/\text{o-NPOE}$ (DOS) membrane provide a comparable amperometric response towards heparin in an aqueous solution, but that only the membranes formulated with TDMA^+ can be used for an amperometric assay of heparin in human blood plasma. Theoretical analysis of the amperometric response will be outlined, and the voltammetric behaviour will be simulated by a numeric solution of the transport problem.

2. Experimental

2.1. Reagents

LiCl (Microselect, Fluka), heparin sodium salt from bovine intestinal mucosa (Hep. Aldrich, $\mu = 151 \text{ U mg}^{-1}$), hexadecyltrimethylammonium chloride (HTMACl, purum, Fluka), tridodecylmethylammonium chloride (TDMACl, purum, Fluka), polyvinylchloride (PVC, high molecular weight, Fluka), potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (KTPBCl, Selectophore, Fluka), $1,1'$ -dimethylferrocene (DMFc, 97%, Aldrich), albumin (Alb, Standard, Carl Roth, Germany), bis(2-ethylhexyl) sebacate (DOS, Selectophore, Fluka), *o*-nitrophenyl octyl ether (*o*-NPOE, Selectophore, Fluka), tetrahydrofuran (THF, Riedel-de-Haën, Germany) were used as received. Hexadecyltrimethylammonium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (HTMATPBCl) and tridodecylmethylammonium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (TDMATPBCl) were prepared by metathesis from KTPBCl and HTMACl or TDMACl, respectively, in acetone. Aqueous electrolyte solutions were prepared from highly purified water (Millipore). Samples of the citrate stabilized human blood plasma were obtained from the blood bank of the Faculty Hospital at Královské Vinohrady in Prague, Czech Republic.

2.2. Preparation of the PVC membrane

The membrane was prepared freshly prior to each voltammetric experiment using the procedure that has been described previously [12]. Briefly, the surface of the rotating glassy carbon electrode (GC, 3 mm diam., Eco-Chemie, Netherlands) oriented upward was spin-coated at 2000 rpm by the drop ($75 \mu\text{L}$) of the solution containing 75 mg PVC in 1 mL of THF, which was mixed with the 0.05 M HTMATPBCl and 0.1 M DMFc in *o*-NPOE or DOS, or with 0.05 M TDMATPBCl and 0.1 M DMFc in *o*-NPOE or DOS. THF was allowed to evaporate slowly to

form the film containing 25% PVC by weight over whole base of the electrode. The deposition procedure was repeated several times so as to prepare the membrane with a thickness of ca. 40 μm .

2.3. Apparatus

Voltammetric measurements were carried out in a three-electrode cell using the programmable potentiostat AUTOLAB (PGSTAT 30, Eco-Chemie, Netherlands), which was equipped with the AUTOLAB rotating disc assembly. Amperometric sensor for heparin consisted of a GC electrode coated with the PVC membrane, which served as a working electrode. The electrode was dipped either into the aqueous solution of 0.1 M LiCl, or directly in the human blood plasma, eventually spiked with heparin ($1 - 10 \text{ U mL}^{-1}$). A Pt wire and a silver/silver chloride electrode in 0.1 M KCl were used as a counter and reference electrode, respectively. The potential E of the cell, which is controlled by the potentiostat, can be expressed in terms of the contributions of the Galvani potential differences $\Delta_m^w\phi = \phi(w) - \phi(m)$ and $\Delta_m^{oc}\phi = \phi(GC) - \phi(m)$ between the membrane (m) and the aqueous solution (w), and the GC and the membrane, respectively,

$$E = \Delta_m^{oc}\phi - \Delta_m^w\phi - E_{ref} = -\Delta_m^w\phi - E_{ref} \quad (1)$$

where the constant term E_{ref} includes the potential E_{ref} of the reference electrode, and the pseudo-reference potential difference $\Delta_m^{oc}\phi$, which is controlled by the DMFc^{+/0}/DMFc redox system.

Impedance measurements were carried out in the same cell with the help of a frequency response analyser (1255 FRA Solartron, Solartron Instruments, England) and a potentiostat (1287 Electrochemical Interface Solartron, Solartron Instruments, England). These measurements were used to evaluate the sum R of the resistances of the membrane and the aqueous solution as the high-frequency limit of the real component of the complex impedance [12]. Since the contribution of the aqueous solution is negligible by estimate, the sum R can be practically considered to be the membrane resistance.

UV/V's reflection spectrum of the PVC coated GC electrode exposed to the ambient air was measured in 180° backscattering geometry by fiber-glass waveguide connected to a computer-operated spectrometer (Ocean Optics 2000). The spectrum was used to evaluate the membrane thickness from the number of the interference maxima/minima and the effective refractive index, which was estimated from the values of the refractive index for DOS (1.458), o-NPOE (1.511) and PVC (1.539) [14].

2.4. Membrane resistance and thickness

Figure 1 shows the plot of the resistance R vs. the PVC membrane thickness for the GC electrode coated with the HTMA⁺/o-NPOE or HTMA⁺/DOS membrane. Apparently, the resistance of the latter membrane is approximately 20 times higher, which probably reflects a higher viscosity and lower degree of dissociation of HTMATPBCl in DOS. The plots in Fig. 1 were used for a quick check of the membrane thickness by impedance measurements. For voltammetric measurements the membranes were prepared to have a thickness of 20–40 μm .

3. Results and discussion

3.1. Voltammetry of heparin in the aqueous solution

Figure 2 and Figure 3 show the cyclic voltammograms recorded on the rotating GC electrode coated with the PVC membrane, which was prepared using two different plasticizers (o-NPOE, DOS), and a salt of two different cations (HTMA⁺, TDMA⁺), in the absence and the presence of heparin (1-30 U mL⁻¹) in the aqueous solution of 0.1M LiCl. A correction for the background current revealed that the forward-sweep voltammogram for the electrode coated with the HTMA⁺/o-NPOE (or DOS) membrane has a shape of the wave with a limiting current (i_{lim}^+) and a half-wave potential ($E_{1/2}^+$), while that for the electrode coated with the TDMA⁺/o-NPOE (or DOS) membrane has a shape of the peak with a peak current (i_p^+) and the peak potential (E_p^+). On the reverse sweep, the voltammetric peak has been always obtained, which can be characterised by the peak current (i_p^-) and the peak potential (E_p^-).

All membrane electrodes exhibit an amperometric response to heparin, which depends on the heparin concentration, cf. the insets in Fig. 2 and Fig. 3. On the forward sweep, the sensitivity of the electrode coated with the HTMA⁺/o-NPOE (or DOS) membrane ($\partial i_{lim}^+ / \partial \alpha^0 \approx 0.18 \mu A U^{-1}$ mL, Fig. 2A and Fig. 3A) is considerably higher than that of the electrode coated with the TDMA⁺/o-NPOE (or DOS) membrane ($\partial i_p^+ / \partial \alpha^0 \approx 0.1 \mu A U^{-1}$ mL, Fig. 2B). On the reverse sweep, however, the electrode coated with TDMA⁺/o-NPOE (or DOS) membrane exhibits a higher sensitivity, though the dependence on the heparin concentration is not linear (Fig. 2B and Fig. 3B). This behaviour explains why the electrode coated with TDMA⁺/o-NPOE membrane exhibited a negligible heparin response, when the sweep was reversed at a less positive potential (0.5 V) [12]. It is noteworthy that the sensitivity of the electrode coated with the HTMA⁺/o-

NPOE membrane does not depend on the HTMA⁺ concentration. Practically the same sensitivity $\partial i_{lim}^+ / \partial \alpha^0 \approx 0.17 \mu A U^{-1}$ mL was achieved in the presence of 0.1 M HTMA⁺ in the membrane, while the sensitivity $\partial i_{lim}^+ / \partial \alpha^0 \approx 0.22 \mu A U^{-1}$ mL was reported for the o-NPOE membrane containing 0.01 M HTMA⁺ [12].

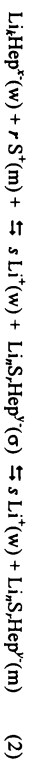
The effects of the sweep rate ν (5-50 mV s⁻¹) and the rotation speed f (200-3000 rpm) on the voltammetric behaviour are demonstrated in Fig. 4 and Fig 5, respectively. Their analysis reveals several remarkable features of the heparin transfer. First, the potential difference $\Delta E^+ = E_{1/2}^+ - E_p^- \approx 40$ mV and $\Delta E^- = E_p^+ - E_p^- \approx 90$ mV for the electrode coated with the HTMA⁺/o-NPOE (or DOS) and the TDMA⁺/DOS (or o-NPOE) membrane, respectively, is practically independent of both ν (Fig. 4) and f (Fig. 5). Second, a minor negative shift of the half-wave or the peak potentials with the increasing sweep rate is observed, with the slope of ca. -40mV/decade in both cases (Fig. 4). Third, the sweep rate has only a minor effect on the limiting current i_{lim}^+ and the peak current i_p^- for the electrode coated with the HTMA⁺/o-NPOE (or DOS) (Fig. 4A), while the peak currents i_p^+ and i_p^- for the electrode coated with the TDMA⁺/DOS (or o-NPOE) exhibit a linear dependence on the square root of the sweep rate ν (Fig. 4B). Fourth, the limiting current i_{lim}^+ and the peak current i_p^- for the electrode coated with the HTMA⁺/o-NPOE (or DOS) exhibit a linear dependence on the square root of the rotation speed (Fig. 5A), cf. also ref. 12, while the effect is minor for the electrode coated with the TDMA⁺/DOS (or o-NPOE) (Fig. 5B).

The half-wave or the peak potential reflects the Gibbs energy of interaction of anionic heparin with the cation present in the membrane or the organic solvent phase [9, 10, 12]. Present

measurements show that the energy of interaction of heparin with HTMA⁺ ($E_{1/2}^* \approx 0.35$ V) is higher by ca. 0.2 eV than with TDMA⁺ ($E_{1/2}^* \approx 0.55$ V). On the other hand, a wider potential range in the presence of TDMA⁺ can be ascribed to a higher hydrophobicity of this cation [12], i.e. HTMA⁺ can be extracted more easily into the aqueous phase. Both effects probably reflect the difference in the ion structure, i.e. in the number of long-chain alkyl groups. Simultaneous extraction of the membrane cation that interacts with heparin could influence the sensing mechanism and/or interfere the amperometric assay. In order to identify the process responsible for the positive potential limit, the voltammetric measurements were performed at different concentrations of LiCl in the aqueous phase (0.01–1 M) in the absence of heparin. Figure 6 shows the plots of the potential E , as read from the voltammogram at a constant positive current, vs. the logarithm of the Cl⁻ concentration. The slope of such a plot is expected to attain the value of –59 or 0 mV, depending on whether the Cl⁻ anion or the membrane cation, respectively, controls the positive potential limit. These data suggest that the transfer of Cl⁻ dominates at the electrode coated with the TDMA⁺/o-NPOE (or DOS) membrane irrespective of the chloride concentration, while the transfer of HTMA⁺ is the limiting process at the electrode coated with the HTMA⁺/o-NPOE (or DOS) membrane at low concentrations of Cl⁻ (≤ 0.1 mol dm⁻³).

3.2. Sensing mechanism

The overall sensing mechanism including the formation of a complex between heparin and the cation of the membrane or the organic solvent phase, adsorption of the complex at the interface, and the counterion condensation effect, can be described as



where (w), (m) and (σ) denote the aqueous phase, the membrane phase and the interphase, respectively, and S⁺ denotes the membrane cation (HTMA⁺, TDMA⁺). The apparent charge number x of heparin and the stoichiometric coefficient k are related to the charge number z of the heparin polyanion (average value of $z = 75$ [11]), $x = (1 - \xi)z$ and $k = \xi z$, respectively, depending on the extent of the counterion condensation $\xi = 0-1$ [10]. The stoichiometric coefficient n and the apparent charge number y of heparin at the interface or in the membrane phase are then given by $n = k - s = \xi z - s$ and $y = x + s - r = (1 - \xi)z + s - r$, respectively. It is shown in Appendix that the electric current i can be generally expressed as a sum of the faradaic (i_F) and charging (i_C) contributions, depending on whether the produced Li_nS_nHep^y is located on the membrane or the aqueous side of the interface. In the former case, we have

$$i = i_F + i_C = FA(x + s)v_1 + \frac{dq^m}{dt} \quad (3)$$

where F is the Faraday constant, A is the interfacial area, v_1 is the rate of the first reaction in the reaction sequence, Eq. (2), from left to right, q^m is the surface charge density on the membrane side of the interface, and t is time. In the latter case, the expression for the current has the form

$$i = i_F + i_C = FA(x + s)v_1 - FAy\frac{d\Gamma_K^m}{dt} + \frac{dq^m}{dt} \quad (4)$$

where $d\Gamma_K^m/dt$ represents the adsorption rate for Li_nS_nHep^y.

On assuming that the adsorption rates $d\Gamma_n^w/dt$, $d\Gamma_{Li}^w/dt$ and $d\Gamma_s^m/dt$ for Li_nHep^+ , Li^+ and S^+ , respectively, are negligible compared to the corresponding material fluxes, the relation of the faradaic current i_f to the material fluxes simplifies to

$$i_f = FA(x+s)J_h^w = -FA \frac{x+s}{s} J_{Li}^w = -FA \frac{x+s}{r} J_s^m = FA(x+s)(J_h^m + \frac{d\Gamma_h^m}{dt}) \quad (5)$$

or

$$\begin{aligned} i_f &= FAxJ_h^w + FAyJ_h^m = -FA \frac{r}{s} J_{Li}^w + FAyJ_h^m = -FAJ_s^m + FAyJ_h^m \\ &= FA(x+s)J_h^m + FA \frac{d\Gamma_h^m}{dt} \end{aligned} \quad (6)$$

respectively.

Effects of the heparin concentration, the sweep rate and the rotation speed allows making conclusions about the role of the steps in the sensing mechanism described by Eq.(2). First, the absence of the effects of the sweep rate and the rotation speed on the potential difference

$$\Delta E = E_{1/2}^+ - E_p^- \approx 40 \text{ mV} \text{ and } \Delta E = E_p^+ - E_p^- \approx 90 \text{ mV} \text{ clearly indicates that the charge transfer}$$

process is reversible. Hence, the concentrations c_i 's of the reacting species at the interface can be related to the interfacial potential difference across the membrane|solution interface, $\Delta_m^w \phi$, or to the cell potential E given by Eq. (1), through the Nernst equation,

$$E = E^0 + \frac{RT}{(x+s)F} \ln \frac{c_h^m}{c_h^w (c_s^m)^Y} \quad (7)$$

where E^0 is the formal potential including the bulk concentration of the Li^+ ion, which is present in excess and transport effect of which can be neglected. Second, the effects of the sweep rate and the rotation speed on the measured current could provide a hint for simplification of the transport problem, which is difficult to solve due to the coupling of the stationary convective diffusion in the aqueous phase with the linear diffusion in the membrane phase and the adsorption at the interface. Thus, the linear dependence of the current at the electrode coated with the HTMA⁺/o-NPOE (or DOS) membrane on the square of the rotation speed (Fig. 5A), and its independence of the sweep rate (Fig. 4A), as well as of the HTMA⁺ concentration, suggests that the role of transport in the membrane phase is negligible, i.e. the material flux J_h^m of $Li_nS_nHep^+$ in the membrane phase approaches zero. By using the familiar relationship between the convective diffusion flux J_h^w and the concentration of heparin at the interface c_h^w , a simple equation for the faradaic current follows from Eq. (5),

$$i_f = i_{lim} \left(1 - \frac{c_h^w}{c_h^{w,0}}\right) = (x+s)FA \frac{d\Gamma_h^m}{dt} \quad (8)$$

where $c_h^{w,0}$ is the bulk concentration of heparin, and $i_{lim} = (x+s)FA(D_h^w/\delta)c_h^{w,0}$ is the limiting convective diffusion current, which is proportional to $c_h^{w,0}$ and to the ratio of the diffusion coefficient of heparin, D_h^w , and the thickness of the stationary diffusion layer in the aqueous phase, δ^w . By replacing the coefficient $x+s$ with r , and the surface concentration Γ_h^m with Γ_h^w ,

we obtain the equation, which follows from Eq. (6) for the case that $\text{Li}_2\text{S}_2\text{HeP}^{\bullet}$ is adsorbed on the aqueous side of the interface:

Eq. (8) can be used to simulate the voltammetric response of the HITMA⁺-o-NPPOE (or

DOS) membrane, provided that the potential dependence of the surface concentration Γ_n^m or Γ_n^m of $\text{Li}_2\text{S}_2\text{HeP}^{\bullet}$ is described. Such description can be based on the thermodynamic analysis leading to the Nernst equation for the first reaction in the reaction sequence, Eq. (2),

$$E = E_{ad}^{o'} + \frac{RT}{z_{df}F} \ln \frac{a_n^o}{c_n^w} \quad (9)$$

where the adsorption potential $E_{ad}^{o'}$ includes the bulk concentration of both Li^+ in the aqueous phase and S^{\bullet} in the membrane phase, a_n^o represents the activity of $\text{Li}_2\text{S}_2\text{HeP}^{\bullet}$ in the interphase, $z_{df} = \alpha r + (1 - \alpha)(x + s)$ is the effective charge number, where α is the fraction of the potential difference $\alpha = \Delta_m^x \phi / \Delta_m^w \phi$ influencing the adsorption of $\text{Li}_2\text{S}_2\text{HeP}^{\bullet}$ in the location x of the interphase (σ). In the first approximation, the surface concentration Γ_n^m could be related to the activity a_n^o through the Henry isotherm, $\Gamma_n^m = \beta_0 a_n^o$ with the adsorption coefficient β_0 . Eq. (9) then can be rearranged to

$$\Gamma_n^m = \beta_0 \exp\left(\frac{z_{df}FE}{RT}\right) c_n^w = \beta(E) c_n^w \quad (10)$$

where $E_{ad}^{o'}$ was included in the adsorption coefficient β_0 . Eq. (8) and Eq.(10) finally give the differential equation for Γ_n^m or Γ_n^m , e.g.

$$\frac{d\Gamma_n^m}{dt} + g(E)\Gamma_n^m = p \quad (11)$$

where p is the ratio $i_{lim} / FA(x + s)$ or i_{lim} / FAr , and $g(E) = p / \beta(E)c_n^w$.

Eq. (11) was solved numerically using the following estimates of the parameters involved. First, the experimental value of the coefficient $\partial i_{lim}^w / \partial a^o \approx 0.2 \mu\text{A U}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ (Fig. 2A and Fig. 3A) yields the charge number of ca. 75 for $x + s$ or r [12]. Based on this estimate and the experimental value of the limiting current $i_{lim}^w \approx 2 \mu\text{A}$ at $a^o = 10 \text{ U mL}^{-1}$ (Fig. 2A and Fig. 3A), the parameter p was set to $4 \times 10^8 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. According to Eq. (10), the adsorption coefficient β_0 determines the surface concentration $\Gamma_n^m(0) = \beta_0 c_n^{w,o}$ at $E = 0$, which can be supposed to approach zero. An estimation of β_0 $\approx 1 \times 10^7$ m was based on the assumption that $\Gamma_n^m(0)$ approaches 1% of the surface concentration $\Gamma_n^m \approx 4 \times 10^{-8} \text{ mol m}^{-2}$ at $c_n^{w,o} = 6 \times 10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$ corresponding to the charge of ca. 2 μC passed on the forward or reverse potential sweep (Fig. 2A and Fig. 3A). An analysis of Eq.(11) suggests that the value of the effective charge number z_{df} determines the shift of the half-wave potential or the peak potential with the sweep rate, $\partial E_p / \partial \log v \approx -2.303RT / z_{df}F$. The experimental value of ca. -40mV/decade reported above corresponds to $z_{df} \approx 1.5$. A numerical solution of Eq.(11) using these parameters revealed that a better fit of the experimental voltammetric data is obtained for $z_{df} \approx 0.5$. Since $x + s$ (or r) $\gg 1$

and $0 < \alpha < 1$, the estimated value of α_{sp} appears to be too small. However, one should realize that the derivation of Eq. (9) assumes that the heparin polyion is a point-charge ion, which is rather a rough approximation and, hence, the effective charge number should be considered as the adjustable parameter of this simple model. Figure 7 shows the dimensionless voltammograms calculated for the sweep rates 5-50 mV s⁻¹. As it can be seen, the simulation reproduces well the experimentally observed features (Fig. 4A, Fig. 5A). In particular, the predicted potential difference $\Delta E_p^- = E_{1/2}^+ - E_p^- \approx 0.04$ V and ca. 50% increase of i_p^- with the increasing sweep rate agrees well with the experimental data (Fig. 4A), while the predicted negative shift of the peak potential $\partial E_p^- / \partial \log v \approx -0.12$ V is somewhat more pronounced than observed one. Not illustrated are the predicted positive shift of the peak potential with the increasing rotation speed and the effects of the rotation speed on i_{lim}^{+} and i_p^- (Fig. 5A).

We conclude that the simulation of the voltammetric behaviour supports the assumptions made above about the sensing mechanism for the electrode coated with the HTMA⁺/o-NPOE (or DOS) membrane. Essentially the same mechanism was assumed by Amemiya et al [10] in their study of the heparin transfer across a polarized water[1,2-dichloroethane interface. A stoichiometric analysis of the process was carried out under the conditions that the current is controlled by the transport of the ion S⁺ in the organic solvent phase ($c_s^{m,0} / c_s^{w,0} \ll 1$), which made it possible to determine the stoichiometric ratio $(x+s)/r = (y+r)/r \approx 1$ indicating that $y/r \ll 1$ [10]. This result suggests that the negative heparin charge is neutralized by the S⁺ cation at the interface [10]. As it is shown in the Appendix, such analysis is justified in case that either Li₁₀S₅Hep⁻ is adsorbed on the membrane side of the interface, or the adsorption of Li₁₀S₅Hep⁻ can

be neglected. Nevertheless, the coefficient at J_s^m [10] is also predicted to equal unity in the case that Li₁₀S₅Hep⁻ is adsorbed on the aqueous side of the interface. On the other hand, the relatively large potential difference $\Delta E_p^+ = E_{1/2}^+ - E_p^+ \approx 0.04$ does not seem to have the origin in the irreversibility of the charge transfer process as it has been proposed [10], but rather in the effect of the potential on the adsorption of the heparin complex Li₁₀S₅Hep⁻, cf. Eq. (10).

The voltammetric behaviour of the electrode coated with the TDMA⁺/o-NPOE (or DOS) membrane indicates that the role of the transport inside the membrane is much more pronounced. Indeed, the peak shape and the linear dependence of the current on the square root of the polarization rate (Fig. 4B) are features that can be associated with the linear diffusion of the cation S⁺ and Li₁₀S₅Hep⁻ inside the membrane phase. However, the effects of the transport in the aqueous phase, which are expressed in a weak dependence of the current on the heparin concentration (Fig. 2B, Fig. 3B) and on the rotation speed (Fig. 5B), cannot be neglected. Analogously, a higher amperometric sensitivity on the reverse sweep (Fig. 2B, Fig. 3B) points to an adsorption effect. Such voltammetric behaviour is difficult to simulate and only qualitative conclusions about the sensing mechanism can be currently made, which are consistent with those made in regards the potentiometric response of a polyion sensitive electrode [5-7]. In the latter case, however, the transfer of heparin into the membrane phase is necessarily coupled with the transfer of chloride in the opposite direction [6,7]. The potentiometric response is then due to a change in the ratio of chloride concentrations on the aqueous and membrane side of the interface [6,7], which is strongly affected by the transport conditions in both the membrane phase (cf. the effect of the PVC content [7]) and the aqueous phase (cf. the effect of the rotation speed [8]). On the other hand, the amperometric response of the TDMA⁺/o-NPOE (or DOS) membrane to heparin is not linked to the chloride transfer, which rather proceeds in parallel in the same

direction as the transfer of heparin. This difference in the sensing mechanism could explain why a change in the transport conditions in the aqueous phase has a relatively small effect on the amperometric response. Our attempt to increase the sensitivity of the TDMA⁺/o-NPOE (or DOS) to heparin by increasing the PVC content [7] was not successful due to an enormous increase of the membrane resistance, which prevented introducing the required ohmic drop compensation.

3.3. Application in human blood plasma analysis

The electrodes coated with the HTMA⁺/o-NPOE and the TDMA⁺/DOS membrane were tested for an amperometric assay of heparin in human plasma. Figure 8 shows the voltammetric behaviour of the former (Fig. 8A) and the latter (Fig. 8B) electrode in untreated human blood plasma and the aqueous solution of 0.1 M LiCl in the absence of heparin. The electrode coated with the HTMA⁺/o-NPOE membrane exhibits a remarkable enhancement of the current at the positive potential limit (Fig. 8A, full line). When this experiment was carried out with the aqueous solution of 0.1 M LiCl containing albumin at a level comparable to plasma (45 g L⁻¹), the same current enhancement was observed (Fig. 8A, dashed line). However, no change in voltammogram was detected when the plasma sample or the aqueous solution containing albumin were spiked with heparin (10 U mL⁻¹). In order to clarify the absence of the heparin response, the effect of plasma on the voltammogram of heparin in the aqueous solution of 0.1 M LiCl (Fig. 2A) was examined. Inset in Fig. 8A shows the dependence of the measured values of i_{lim}^+ and i_p^+ on the volume fraction of plasma in the aqueous solution, $V_{\text{plasma}}/V_{\text{tot}}$. It is seen that both the limiting and peak current continuously decrease and reach zero at $V_{\text{plasma}}/V_{\text{tot}} \approx 0.5$.

The positive current enhancement in the presence of plasma could be ascribed to the transfer of a plasma component to the membrane or, more likely, to the facilitated transfer of HTMA⁺ in the opposite direction. Actually, the potential dependent extraction of HTMA⁺ into the aqueous phase controls the positive potential limit. A suppression of the heparin response (Fig. 8A, inset) could have then the origin in the competition between heparin and a component of plasma, possibly albumin, both forming a complex with HTMA⁺ on the aqueous side of the interface. Such interpretation is supported by the absence of such effect on the electrode coated with the TDMA⁺/DOS membrane. Indeed, the voltammograms recorded in plasma (Fig. 8B, full line) and the aqueous solution of 0.1 M LiCl (Fig. 8B, dotted line) are almost identical. Note that TDMA⁺ is not extracted into the aqueous phase at the positive potential limit unlike HTMA⁺, and cannot interact with the plasma component e.g. albumin.

If this explanation is correct, the electrode coated with the TDMA⁺/DOS membrane should provide a measurable current response to heparin in human blood plasma, which indeed is the case (Fig. 9A). Fig. 9B shows a calibration graph for heparin in the range of heparin concentration 1-10 U mL⁻¹. The initial slope of the calibration graph and the standard deviation SD = 0.0045 μA calculated from three independent measurements at 1 U mL⁻¹, were used to estimate the limit of detection of 0.2 U mL⁻¹, as the heparin concentration corresponding to the current of 3.3 x SD.

4. Conclusions

The GC electrodes coated with either the HTMA⁺/o-NPOE (DOS) or TDMA⁺/o-NPOE (DOS) membrane provide a comparable amperometric response towards heparin (1-10 U mL⁻¹) in the aqueous solution of 0.1 M LiCl. However, only the membranes formulated with

TDMA TPBCl can be used for an amperometric assay of heparin in human blood plasma with a detection limit of 0.2 U mL^{-1} . An analysis of the effects of the heparin concentration, rotation speed and sweep rate gives some insight into the sensing mechanism comprising the transport of heparin in the aqueous phase, the formation and accumulation of the complex between the anionic heparin and HTMA⁺ or TDMA⁺ at the membrane-solution interface, and the desorption and transport of the complex in the membrane phase. Amperometric response of the electrode coated with the HTMA⁺/o-NPOE (DOS) membrane appears to be controlled by the heparin transport in the aqueous phase and the adsorption of the heparin complex with HTMA⁺ at the membrane-solution interface. This explanation is supported by a simulation of the voltammetric behaviour based on a numeric solution of the transport problem. On the other hand, the amperometric response of the electrode coated with the TDMA⁺/o-NPOE (DOS) membrane is governed by the transport of the heparin complex and the TDMA⁺ cation inside the membrane phase. It is proposed that the potential-dependent extraction of HTMA⁺ and its competitive interaction with a plasma component (e.g. albumin) impedes the amperometric assay of heparin in the human blood plasma using the electrode coated with the HTMA⁺/o-NPOE membrane.

Acknowledgements

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant. No. 203/04/0424).

References

- [1] R. J. Linhardt, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2551.
- [2] R. A. O'Reilly in B.G. Katzung (Ed.), *Basic and Clinical Pharmacology*, 5th Ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1992, pp. 466-470.

- [3] L.B. Jaques, *Pharmacol. Rev.* **1980**, *31*, 99.
- [4] R. Jeinek, S. Kolusheva, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 5987.
- [5] S. Ma, V.C. Yang, M.E. Meyerhoff, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 694.
- [6] S. Ma, V.C. Yang, M.E. Meyerhoff, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2078.
- [7] B. Fu, E. Bakker, J.H. Yun, V.C. Yang, M.E. Meyerhoff, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2250.
- [8] Q. Ye, M.E. Meyerhoff, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 332.
- [9] Z. Samec, A. Trojánek, J. Langmaier, E. Samcová, *Electrochem. Commun.* **2003**, *5*, 867.
- [10] J. Guo, Y. Yuan, S. Asemiya, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5711.
- [11] G.S. Manning, *J. Chem. Phys.* **1969**, *51*, 924.
- [12] J. Langmaier, J. Olišák, E. Samcová, Z. Samec, A. Trojánek, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 115.
- [13] F. Scholz, Š. Komorsky-Lovrić, M. Lovrić, *Electrochem. Commun.* **2000**, *2*, 112.
- [14] http://www.texloc.com/closest/cl_refractiveindex.html

Appendix

The consistent approach to a description of the electric current in terms of the material fluxes requires considering also the balance of the charge in the electric double layer at the membrane/solution interface. We shall assume that the electric double layer consists of the ions of the supporting electrolytes (LiCl and SY= HTMA TPBCl or TDMA TPBCl) and the heparin polyion ($h = \text{Li}_i\text{S}_i\text{Hep}^-$ or $h' = \text{Li}_i\text{S}_i\text{Hep}^{+}$). The description of the current depends on the location of the produced complex $\text{Li}_i\text{S}_i\text{Hep}'$ in the interphase σ . The reason is that when $\text{Li}_i\text{S}_i\text{Hep}'$ is located on the membrane side of the interface, there is only a single charge transfer reaction, i.e. the first step in the sequence, Eq.(2), which results in the transfer of charge $(x+s)F^-$ per 1 mol of heparin. On the other hand, when $\text{Li}_i\text{S}_i\text{Hep}'$ is located on the aqueous side of the interface, there are two

charge transfer reactions in the sequence resulting in the transfer of charge of rF and yF per 1 mol of heparin, respectively. Note that, because $x + s = r + y$, the net charge transferred is the same as in the former case.

When $\text{Li}_n\text{S}_r\text{Hepr}^y$ is located on the membrane side of the interface, the electroneutrality in the double layer can be then described as

$$q^w = FA(\Gamma_{\text{Li}^+}^w - \Gamma_{\text{Cl}^-}^w - x\Gamma_{\text{h}}^w) = -q^m = -FA(\Gamma_{\text{s}}^m - \Gamma_{\text{y}}^m - y\Gamma_{\text{h}}^m) \quad (\text{A1})$$

where Γ_i 's represent the surface concentrations with the superscript denoting the aqueous (w) or the membrane (m) phase, q^w or q^m is the surface charge density on the aqueous or the membrane side of the interface, respectively, F is the Faraday constant and A is the interfacial area. The mass balance at the interface ($x=0$) then gives

$$J_{\text{h}}^w = v_1 + \frac{d\Gamma_{\text{h}}^w}{dt} \quad (\text{A2})$$

$$J_{\text{Li}^+}^w = -sv_1 + \frac{d\Gamma_{\text{Li}^+}^w}{dt} \quad (\text{A3})$$

$$J_{\text{Cl}^-}^w = \frac{d\Gamma_{\text{Cl}^-}^w}{dt} \quad (\text{A4})$$

$$J_{\text{s}}^m = -rv_1 - \frac{d\Gamma_{\text{s}}^m}{dt} \quad (\text{A5})$$

$$J_{\text{y}}^m = -\frac{d\Gamma_{\text{y}}^m}{dt} \quad (\text{A6})$$

$$J_{\text{h}}^m = v_2 \quad (\text{A7})$$

$$\frac{d\Gamma_{\text{h}}^m}{dt} = v_1 - v_2 \quad (\text{A8})$$

where J_i 's represent the ion fluxes, t is time, and v_1 or v_2 are the rates of the first and the second reaction in the sequence (2), respectively, in the direction from left to right. This balance equations allows expressing the electric current i as the sum of the faradaic (i_f) and charging (i_c) currents,

$$i = i_f + i_c = \sum_l F A J_l^w = \sum_l F A J_l^m = FA(x+s)v_1 + \frac{dq^m}{dt} \quad (\text{A9})$$

The faradaic current i_f can be then related to the material fluxes of the reactants and products of reaction (2) through the relationships

$$\begin{aligned} i_f &= FA(x+s) \left(J_{\text{h}}^w \frac{d\Gamma_{\text{h}}^w}{dt} \right) = -FA \frac{x+s}{s} \left(J_{\text{Li}^+}^w \frac{d\Gamma_{\text{Li}^+}^w}{dt} \right) \\ &= -FA \frac{x+s}{y} \left(J_{\text{s}}^m + \frac{d\Gamma_{\text{s}}^m}{dt} \right) = FA(x+s) \left(J_{\text{h}}^m + \frac{d\Gamma_{\text{h}}^m}{dt} \right) \end{aligned} \quad (\text{A10})$$

When $\text{Li}_n\text{S}_r\text{Hepr}^y$ is located on the aqueous side of the interface, the electroneutrality condition reads

$$q^w = FA(\Gamma_{\text{Li}^+}^w - \Gamma_{\text{Cl}^-}^w - x\Gamma_{\text{h}}^w - y\Gamma_{\text{h}}^m) = -q^m = -FA(\Gamma_{\text{s}}^m - \Gamma_{\text{y}}^m) \quad (\text{A11})$$

and the electric current i can be expressed as

$$i = i_f + i_c = \sum_i F A J_i^m = \sum_i F A (x+s) v_i - F A y \frac{d\Gamma_h^m}{dt} + \frac{dq^m}{dt} \quad (\text{A12})$$

In this case, the faradaic current i_f is related to the material fluxes of the reactants and products of reaction (2) through

$$\begin{aligned} i_f &= F A r \left(J_h^m - \frac{d\Gamma_h^m}{dt} \right) + F A y J_h^m = -F A \frac{r}{s} \left(J_{Li}^m - \frac{d\Gamma_{Li}^m}{dt} \right) + F A y J_h^m \\ &= -F A \left(J_s^m + \frac{d\Gamma_s^m}{dt} \right) + F A y J_h^m = F A (x+s) J_h^m + F A r \frac{d\Gamma_h^m}{dt} \end{aligned} \quad (\text{A13})$$

Note that in this case, the coefficient at J_s^m is unity, i.e. the stoichiometric ratio $(x+s)/r$ cannot be inferred from the current measured under the conditions that the current is controlled by the flux of the cation S^+ and the desorption of $Li_nS_rHep^m$ is negligible ($J_h^m = 0$). As expected, the same expression follows from Eq.(A10) and Eq. (A13), if the adsorption of $Li_nS_rHep^m$ can be neglected ($v_1 = v_2$),

$$\begin{aligned} i_f &= F A (x+s) v_1 = F A (x+s) \left(J_h^m - \frac{d\Gamma_h^m}{dt} \right) = -F A \frac{x+s}{s} \left(J_{Li}^m - \frac{d\Gamma_{Li}^m}{dt} \right) \\ &= -F A \frac{x+s}{r} \left(J_s^m + \frac{d\Gamma_s^m}{dt} \right) = F A (x+s) J_h^m \end{aligned} \quad (\text{A14})$$

Captions for Figures

Fig. 1

Membrane resistance R vs. membrane thickness d for the GC electrode coated with a PVC membrane containing 0.1 M DMFc and 0.05 M HTMATPBCl in o-NPOE (○), or 0.05 M HTMATPBCl in DOS (●), and dipped in the aqueous solution of 0.1 M LiCl.

Fig. 2

Cyclic voltammograms recorded on the rotating GC electrode coated with the o-NPOE plasticized PVC membrane containing 0.1 M DMFc and (A) 0.05 M HTMATPBCl, or (B) 0.05 M TDMATPBCl, in the presence (full line) and absence (dotted line) of heparin (10 U mL^{-1}) in the aqueous solution of 0.1 M LiCl. Insets show the effect of the heparin concentration σ^0 on the background-corrected limiting (i_{lim}^+) or the peak (i_p^+) current on the forward sweep (○), and on the background corrected peak current (i_p^-) on the reverse sweep (+).

Fig. 3

Cyclic voltammograms recorded on the rotating GC electrode coated with the DOS plasticized PVC membrane containing 0.1 M DMFc and (A) 0.05 M HTMATPBCl, or (B) 0.05 M TDMATPBCl, in the presence (full line) and absence (dotted line) of heparin (10 U mL^{-1}) in the aqueous solution of 0.1 M LiCl. Insets show the effect of the heparin concentration σ^0 on the background-corrected limiting (i_{lim}^+) or the peak (i_p^+) current on the forward sweep (○), and on the background corrected peak current (i_p^-) on the reverse sweep (+).

Fig. 4

Background-corrected cyclic voltammograms recorded at the sweep rates 5 mV s^{-1} (dotted), 10 mV s^{-1} (dashed-and-dotted), 20 mV s^{-1} (dashed) and 50 mV s^{-1} (full) on the rotating GC electrode (1000 rpm) coated with the plasticized PVC membrane containing 0.1 M DMFc, and (A) 0.05 M HTMATPBCl in o-NPOE, or (B) 0.05 M TDMATPBCl in DOS, in the presence of heparin (8 U mL^{-1} in panel A, 5 U mL^{-1} in panel B) in the aqueous solution of 0.1 M LiCl. Insets show the plots of the limiting (i_{lim}^*) or the peak (i_p^*) current on the forward sweep (\circ), and the peak current (i_p^-) on the reverse sweep (\oplus), vs. the square root of the sweep rate v .

Fig. 5

Cyclic voltammograms (20 mV s^{-1}) recorded at the rotation speed 200 rpm (dashed), 800 rpm (dashed-and-dotted), and 3000 rpm (full) on the rotating GC electrode coated with the plasticized PVC membrane containing 0.1 M DMFc and (A) 0.05 M HTMATPBCl in o-NPOE, or (B) 0.05 M TDMATPBCl in DOS, in the presence of heparin (8 U mL^{-1} in panel A, 5 U mL^{-1} in panel B) in the aqueous solution of 0.1 M LiCl. Insets show the plots of the limiting (i_{lim}^*) or the peak (i_p^*) current on the forward sweep (\circ), and the peak current (i_p^-) on the reverse sweep (\oplus), vs. the square root of the rotation speed f (in Hz).

Fig. 6

Plots of the potential E , as read from the background voltammogram at a constant positive current, vs. the logarithm of the Cl^- concentration for the electrode coated with the HTMA⁺/o-

NPOE (\square), TDMA⁺/o-NPOE (\blacksquare), HTMA⁺/DOS (\bullet) or TDMA⁺/DOS (\circ) membrane in the aqueous solution of LiCl.

Fig. 7

Simulation of the voltammetric behaviour of the rotating GC electrode (1000 rpm) coated with the HTMA⁺/o-NPOE membrane at the sweep rates 5 mV s^{-1} (dotted), 10 mV s^{-1} (dashed-and-dotted), 20 mV s^{-1} (dashed) and 50 mV s^{-1} (full). The dimensionless voltammetric current i/i_{lim} was obtained by a numeric solution of Eq. (10) for the experimental value of $i_{\text{lim}} = 2 \mu\text{A}$, and the values of the parameters $\beta_0' = 3 \times 10^{-10}$ m and $\alpha(x+s) = 0.5$.

Fig. 8

Cyclic voltammograms (20 mV s^{-1}) recorded on the rotating GC electrode (1000 rpm) coated with the plasticized PVC membrane containing 0.1 M DMFc and (A) 0.05 M HTMATPBCl in o-NPOE, or (B) 0.05 M TDMATPBCl in DOS, in the aqueous solution of 0.1 M LiCl (dotted), human blood plasma (full) or the aqueous solution of 0.1 M LiCl containing 0.45 g mL^{-1} of albumin (dashed). Inset in panel A shows the effect of the human blood plasma added to the aqueous solution of 0.1 M LiCl on the limiting current i_{lim}^* (\circ) and the peak current i_p^* (\oplus) of heparin (10 U mL^{-1}). Plasma concentration is expressed as the ratio of the volume of plasma V_{plasma} to that of the solution V_{sol} .

Fig. 9

(A) Cyclic voltammograms (20 mV s^{-1}) recorded on the rotating GC electrode (1000 rpm) coated with the plasticized PVC membrane containing 0.1 M DMFc and 0.05 M TDMATPBCl in DOS, in the human blood plasma in the absence (dotted) and presence (full) of heparin (10 U mL^{-1}). (B) Calibration graph from three independent measurements of the background-corrected peak current i_p^- vs. the heparin concentration σ' in the human blood plasma, with the standard deviation indicated by vertical bars.

Fig. 1

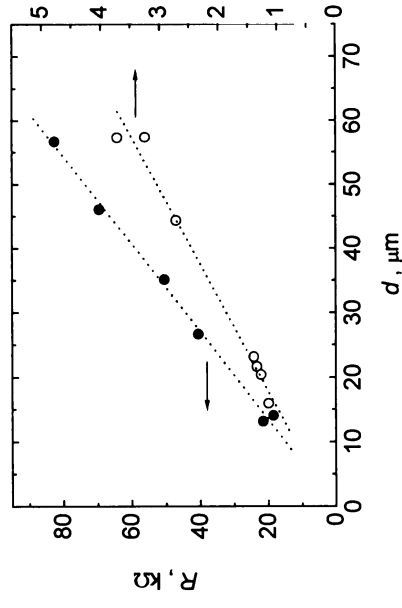


Fig. 2

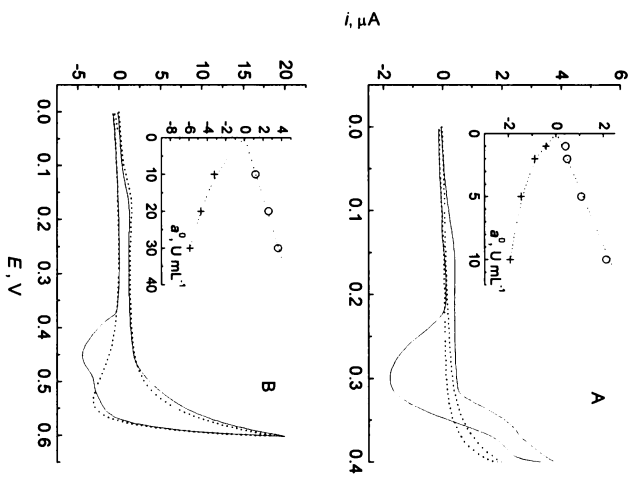


Fig. 3

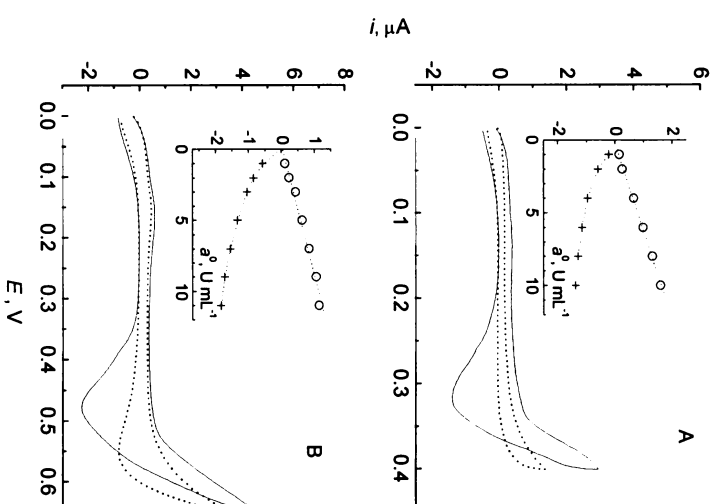


Fig. 4

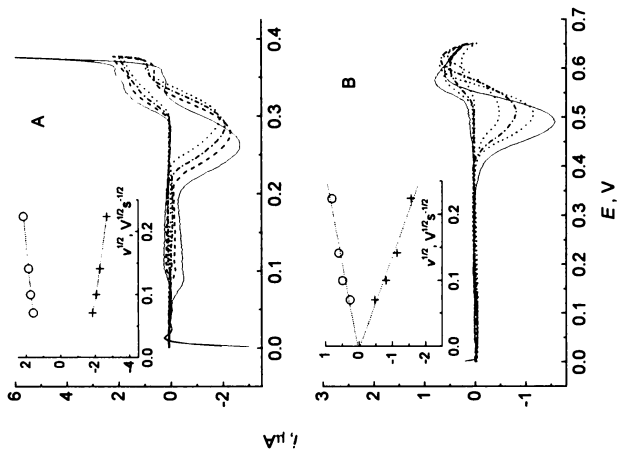


Fig. 5

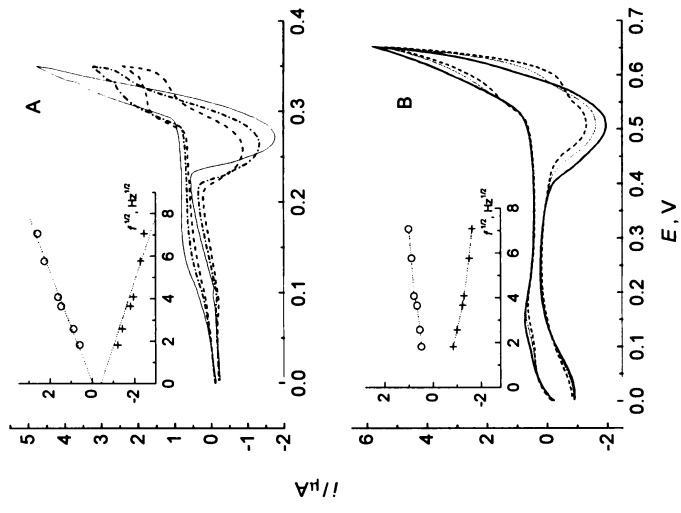


Fig. 6

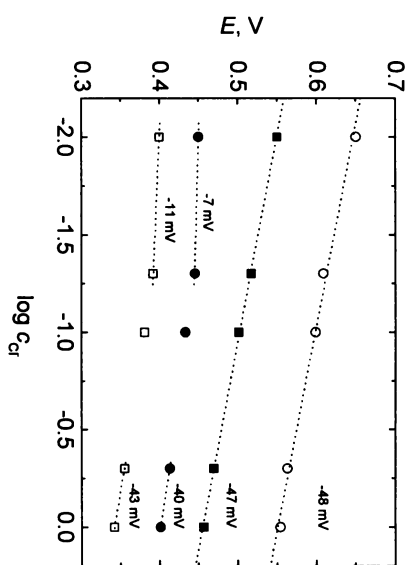


Fig. 7

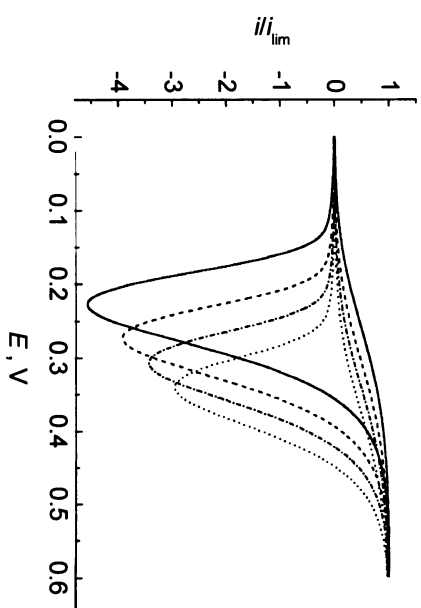


Fig. 8

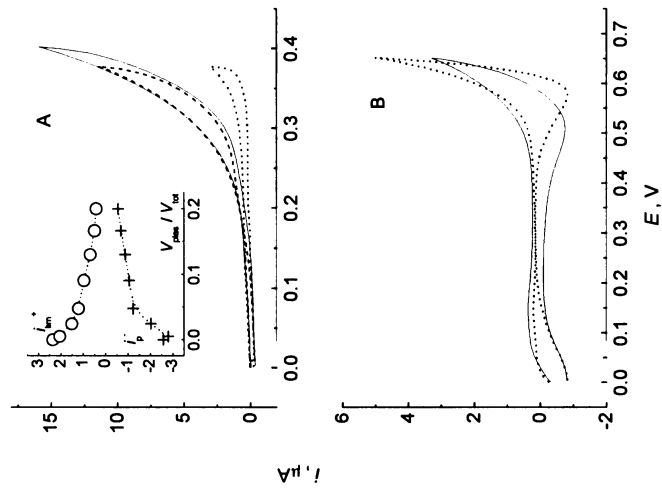


Fig. 9

