

Charles University, Faculty of Science
Department of Analytical Chemistry
Ph.D. study program: Analytical Chemistry

Summary of the Ph.D. Thesis



**Testing of new electrode arrangements for monitoring of
electrochemically oxidisable biologically active organic
compounds**

Mgr. Milan Libánský

Supervisor: Prof. RNDr. Jiří Zima, CSc.

Supervisor-consultant: Prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.

Supervisor-consultant: RNDr. Hana Dejmková, Ph.D.

Prague, 2017

This Ph.D. Thesis was experimentally carried out in the period from 2013 till 2017 at the Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry. Some experiments were carried out in cooperation with **Ing. Alena Řezníčková, Ph.D.** and **Mgr. Oleksiy Lyutakov, Ph.D.**, from the University of Chemistry and Technology in Prague, Faculty of Chemical Technology, Department of Solid State Engineering.

Financial support of my research was provided by: the Specific University Research (SVV), the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Project MSM0021620857), and the Grant Agency of the Czech Republic (P206/12/G151, Centre of new approaches to bioanalysis and molecular diagnosis).

Abstract

Submitted Ph.D. Thesis is focused on the electrochemical characterization and testing of recently developed working electrodes made from pure gold or graphitic carbon particles and electrochemical arrangements. These electrodes are suitable for large screening measurements of various organic compounds. The development of new sensitive voltammetric methods for determination of oxidisable biologically active organic compounds is another aim of this work.

To verify its applicability, the array of carbon composite film electrodes integrated in measuring cell system was selected for the development of voltammetric methods for determination of homovanillic acid, vanillylmandelic acid and indoxyl sulphate. These analytes, which belong to the group of biomarkers of human diseases, were selected for increasing interest in their determination in medical laboratories. Moreover, determination of indoxyl sulphate was coupled to its solid phase extraction from human urine prior to voltammetric determination. Obtained results were compared with measurements of standards with well-established carbon paste electrode.

Sputtered (physical vapor deposition method) gold nanostructured film electrodes on treated polytetrafluoroethylene substrates and gold nanostructured film electrodes modified with various functional groups on the surface were selected for testing and electrochemical characterization as an interesting analytical tool with promising use as disposable sensors for *in-situ* measurements with microvolumes of the sample. Electrochemical characterization was carried out by examination of the electrode reaction (reversibility, repeatability) of standard redox probes (ferrocyanide/ferricyanide, hydroquinone/benzoquinone) in different types of supporting electrolytes, by evaluation of the parameter of calibration curves of probes, by calculations of their real surface areas from Randles-Sevcik equation, and by observation of blocking of modified electrode surfaces by grafted functional groups. The whole study was complemented by critical evaluation and suggestion of possibilities for improvements of tested electrodes and arrangements. Obtained results were again compared to measurements with conventional bulk gold electrode or pristine gold nanostructured electrode sputtered on glass substrate.

Contents

1. Introduction	5
2. Aims of the study	7
3. Materials and methods	8
3.1. Chemicals and reagents	8
3.2. Fabrication of working electrodes	8
3.2.1. <i>Carbon composite film electrode</i>	8
3.2.2. <i>Carbon paste electrode</i>	8
3.2.3. <i>Gold nanostructured electrodes</i>	8
3.3. General procedures and apparatus	9
4. Results and discussion.....	10
4.1. Carbon composite electrode	10
4.1.1. <i>Homovanillic acid and vanillylmandelic acid</i>	10
4.1.2. <i>Indoxyl sulphate</i>	12
4.2. Gold nanostructured film electrodes.....	13
4.2.1. <i>Gold nanostructured film electrodes on polytetrafluorethylen substrate</i>	13
4.2.2. <i>Gold nanostructured film electrodes with surface modified with pNIPAAm</i>	16
4.2.3. <i>Gold nanostructured film electrodes with surface modified with alkyl and organic functional groups</i>	16
5. Conclusion.....	19
6. References	22
7. Curriculum Vitae	24
8. List of publications, oral and poster presentations.....	26

1. Introduction

Every developed working electrode for electroanalytical purposes has to be tested in various possible ways. It is important to explore electrochemical behaviour during measurement with different supporting electrolytes and analytes to assess whether the electrode is suitable for given purpose. Ideal working electrode should be easily producible from the environmental and biological friendly materials; the use should be user-friendly; electrode should be possible to electrochemically and/or chemically modified to increase the selectivity or the sensitivity of the determination and finally, developed voltammetric methods for the electrode should be sensitive and selective [1].

Carbon composite working electrodes [2] and working **gold film** electrodes [3], frequently satisfy these requirements. In addition, these types of electrodes have merits of simplicity of construction, good compatibility with biological samples, and they are inexpensive from the point of view of both investment and running costs in the comparison to modern spectrometric instruments [1], therefore they are suitable as an instrument for large scale monitoring of electrochemically active organic compounds, especially beneficial in the case of determination of markers of various diseases, where large numbers of samples are assumed. These electrodes can serve as an instrument for fast and independent preliminary and screening determination of analytes [4] prior to determination by more powerful, but more expensive techniques.

However, it is necessary to mention that determination of biomarkers of various diseases require possibility of the measurement in human urine, which is most frequently used body fluid for voltammetric measurements. Obviously, the most of biomarkers of exposure, illness, or treatment are excreted via urine [5]. Therefore, the determination of concentration of the biomarkers in urine is fundamental for determining the stage of disease, monitoring of response of human organism to treatment and for an early diagnosis of tumours and other diseases; thus it is necessary to develop fast and sensitive voltammetric methods linked with solid phase extraction for determination of biomarkers [6, 7].

In this **Ph.D. Thesis**, several frequently monitored biomarkers were selected as model biologically active organic compounds for testing of applicability of selected recently developed electrochemical arrangements based on **carbon composite film electrodes (CFE)**. Selected biomarkers were **homovanillic acid (HVA)**, **vanillylmandelic acid (VMA)** [8] (metabolites of catecholamines) and **indoxyl sulphate (ISu)** (urinary indican, specific indole metabolite) [9] (**Fig. 1**). They are important indicators of neurological (Parkinson's disease [9, 10], chronic schizophrenia [11], bulimia [10]) and metabolic disorders (tumours [12], kidney and heart failure [13, 14]).

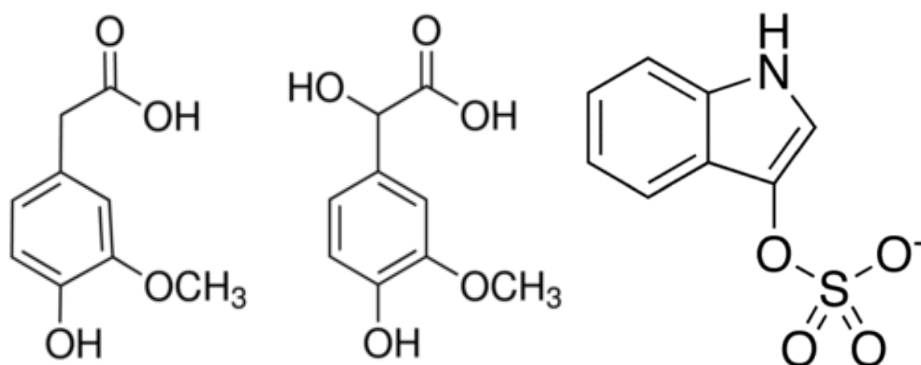


Fig. 1 Structural formulae of HVA, VMA and ISu (from left to the right).

2. Aims of the study

Submitted Ph.D. Thesis is focused **testing** and **characterization** of new electrode material and arrangements made from **gold** or **graphitic carbon** intended for electroanalytical applications. Concretely, the system of **carbon composite film electrodes** integrated in plastic measuring cells [15] and pristine or modified **sputtered gold nanostructured film electrodes** [16] were tested and characterized in many possible ways.

The Ph.D. Thesis presents results based on this six scientific publications mentioned in references [17-22]. In the papers [20-22], Milan Libansky has co-author participation focused on electrochemical testing.

The aims of this **Ph.D. Thesis** can be summarized as follows:

- ❖ To verify the practical applicability of disposable measuring cell system with integrated carbon composite film electrodes (**CFE**) by the development of sensitive electrochemical method for the determination of important disease biomarkers, namely **HVA**, **VMA** and **indoxyl sulphate**.
- ❖ To combine the solid phase extraction of ISu from human urine with the newly developed voltammetric method.
- ❖ To characterize gold nanostructured film electrodes (**GNFE**) sputtered on three types of differently treated polytetrafluorethylen (**PTFE**) substrate from the electrochemical point of view.
- ❖ To characterize sputtered gold nanostructured film electrodes modified by grafted intelligent polymer pNIPAAm or $-C_1H_3$, $-C_4H_9$, $-C_{10}H_{21}$, and $-C_{16}H_{33}$ substrates or $-NO_2$, $-C_8F_{17}$ functional groups on the surface.

3. Materials and methods

3.1. Chemicals and reagents

The stock solutions (1 mmol L^{-1}) of standards of three biomarkers and hydroquinone serving as organic probes/analytes were prepared by dissolving of exact amount of the substances in deionised water. For the electrochemical characterization of gold nanostructured film electrodes, the stock solution of 1 mmol L^{-1} ferrocyanide dissolved in 0.1 mol L^{-1} potassium nitrate or potassium chloride was used as well as these standalone electrolytes: sulfuric acid, potassium nitrate and potassium chloride (all 0.1 mmol L^{-1}) and Britton-Robinson (BR) buffers of various pH. Methanol was used as an elution reagent for solid phase extraction of ISu from urine. All chemicals were analytical grade.

3.2. Fabrication of working electrodes

3.2.1. Carbon composite film electrode

Carbon composite film electrodes were prepared by thorough mixing of graphite microparticles and EPS polystyrene in 9:1 ratio; subsequently 0.5 mL of toluene for each 0.1 g of total weight of solid particles was added; afterwards, 80 μL of the resulting carbon ink was applied into each plastic cell of the 96-wells microtitration plate with implemented metal contact at the round bottom. Parameters of the resulted electrodes were: diameter 8.05 mm, and geometric area 100 mm^2 . Entire detailed fabrication process is described in **[17, 18]**.

3.2.2. Carbon paste electrode

Carbon paste was prepared by thorough mixing of 0.25 g graphite particles with 100 μL of mineral oil Nujol. Prepared carbon paste was packed in the Teflon piston-driven holder with 2 mm inner diameter (geometric area 3.1 mm^2).

3.2.3. Gold nanostructured electrodes

Gold nanolayers (80 nm thin, diameter 3 mm) without surface modification were deposited through contact mask by vacuum sputtering onto surface of patterned polytetrafluorethylen (50 μm foil) with 3 different degrees of treatment: pristine PTFE

(**GNFE-Pristine**), plasma treated (**GNFE-Plasma**) and plasma treated and subsequently grafted (spontaneous grafting) with biphenyl-4,4'-dithiol (**GNFE-BPD**). Deposition contact mask parameters were: round shape head with 3 mm in diameter with connected tail 15 mm long and 1 mm thick; the tail was used for connection to potentiostat. The round shape head was isolated from the tail by non-conductive lacquer to ensure uniform electrode area.

Gold nanolayers (10 nm thin) with surface modification were deposited by vacuum sputtering onto surface of photo-resistive epoxy resin (Su-8) patterned by laser. Subsequently, gold surfaces were functionalized by spontaneous grafting or electrografting from the solutions of compounds with various functional groups/substrates (pNIPAAm, -NO₂, -C₈F₁₇, -C₁H₃, -C₄H₉, -C₁₀H₂₁, and -C₁₆H₃₃). The uniform electrode area with 3 mm diameter was isolated by non-conductive lacquer. Complete procedures are described in **[19-22]**.

3.3. General procedures and apparatus

In this Ph.D. Thesis, DPV (0.1 s pulse width, 50 mV pulse height, 20 mV s⁻¹ scan rate, sampling time 20 ms) and CV techniques (50 mV s⁻¹ scan rate) were used. Voltammetric measurements were performed with portable potentiostat PalmSens, controlled by PSTrace v. 4.8 software. Voltammetric measurements were carried out with an array of carbon composite electrodes integrated in microtitration plate, gold nanostructured film electrodes sputtered on treated PTFE substrates, and gold nanostructured film electrodes with modified surface by various substrates/functional groups. A gel leakless Ag/AgCl reference electrode, to which all potentials values are referred, was used. Platinum wire was used as an auxiliary electrode. For comparison of the results, some measurements were carried out with graphitic carbon paste electrode and commercial gold bulk electrode. Volumes of used sample for the voltammetric measurements were 10 μL for gold nanostructured film electrodes, 370 μL for an array of carbon composite film electrodes and 5 mL for carbon paste and gold bulk electrode.

Urine samples spiked with standard of ISu were prepared from human urine of the healthy person. SPE was performed using poly(styren-divinylbenzene) based solid-phase extraction columns LiChrolut EN 200 mg/3 mL.

The compactness, thickness, elemental composition, and roughness of gold nanostructured electrodes was investigated using scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM) and X-Ray spectroscopy.

All voltammetric measurements were performed five times and each measurement was performed with a new disposable electrode or in a new measuring cell, unless stated otherwise. All values for the construction of functional dependences were calculated as arithmetic averages. The limits of quantification (*LOQ*) were calculated as the concentration of the analyte which gave a signal ten times higher than the standard deviation of the lowest evaluable concentration [23]. All statistical quantities were calculated with significance level $\alpha = 0.05$. Details can be found in papers [\[17-22\]](#).

4. Results and discussion

4.1. Carbon composite electrode

4.1.1. *Homovanillic acid and vanillylmandelic acid*

In the framework of my Master Thesis, an array of solid **carbon composite film electrodes** (CFE) integrated in the wells of 96-well microtitration plastic plates was developed and patented. In the continuation of this research, in this **Ph.D. Thesis**, this array was tested for its practical applicability as a disposable sensor for large scale monitoring of various tumour biomarkers.

The array of integrated CFEs was applied to DPV determination of standards of **HVA** and **VMA** [\[17\]](#), oxidisable tumour biomarkers. Phenolic structure of these acids (**Fig. 1**) and their different oxidation mechanisms (described by Blanco-Lopez [24]) were promising for easy simultaneous electrochemical determination of both analytes in one sample.

DP voltammetric behaviour of both biomarkers ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) was investigated in separate solutions in BR buffer of pH range from 2 to 12. In the case of HVA, one well-shaped anodic voltammetric peak was observed. In the case of HVA, one well-shaped

anodic voltammetric peak was observed. VMA provided two independently evaluable anodic voltammetric peaks with E_p of the first peak similar to the the E_p of HVA. For HVA and VMA the potential difference between the peaks decreased with increasing pH, thus the BR buffer pH 2 was chosen as optimum.

Afterwards, adsorptive accumulation [4] of both analytes on the electrode surface was tested in non-stirred separate solutions of HVA and VMA at two concentration levels: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Unfortunately, the attempt to increase the sensitivity of the voltammetric determination of VMA and HVA via their adsorptive accumulation was not successful, probably because of high polarity of these analytes.

Under the optimum conditions for the particular compound and electrode, concentration dependences were measured in the concentration range from 100 to $0.8 \mu\text{mol L}^{-1}$ for HVA and from 100 to $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ for VMA. Achieved limits of quantification were $0.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ for HVA and $1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ for VMA, respectively. In comparison with DPV determinations of HVA and VMA on boron doped diamond electrode and carbon paste electrode [25, 26], developed method on CFE offers slightly lower *LOQ*, which is sufficient for the determination in human urine (width excepted concentrations in interval from 7 to $40 \mu\text{mol L}^{-1}$) [27, 28].

Both analytes are usually determined side by side in one solution, because of their presence in human urine. As mentioned above, E_p of HVA was similar with E_p of the first peak of VMA. Second peak of VMA is well separated, thus it is possible to determine the concentration of VMA and then calculate the concentration of HVA from the first peak current corresponding to the sum of both compounds.

This theory was confirmed by measuring four calibration sets of mixed solutions of HVA and VMA and by subsequent evaluation of average recoveries of the spiked concentrations of both analytes. Obtained average recovery of both analytes was almost 90 %. The entire process of calculation is given in [\[17\]](#).

These results had proven that used electrode arrangement with integrated CFEs can be successfully used for determination of HVA and VMA and their individual determination in the mixture is possible.

4.1.2. *Indoxyl sulphate*

The practical applicability of a previously mentioned array of integrated CFEs was further verified by determination of **indoxyl sulphate (urinary indican)**, oxidisable biomarker of kidney diseases; combined with a preliminary SPE from human urine. Moreover, all obtained results from measurement with CFE were compared to results obtained with well-established carbon paste electrode (CPE) made from the same type of carbon material as CFE [18].

Firstly, the pH dependences were measured. Electrochemical oxidation of ISu provided two well-shaped and well-separated DP voltammetric peaks corresponding to two step electron exchange mechanism, described by Enache et al. in [29]. Optimal pH was selected according to the maximum overall peak height and the separation of the peaks. Therefore pH 2 and pH 3 were selected as optimum media for CFE and for CPE, respectively.

Subsequently, adsorptive accumulation of ISu was tested in the solution of $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ standard in BR buffer of optimal pH. Resulting increase of the current response was negligible after 5 minutes of prolonged time. Therefore, the adsorptive step was not further utilized.

Under optimum conditions, the calibration curves were measured in the concentration range from 50 to $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ for both electrodes. Achieved limits of quantification were $0.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ for CFE and $1.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ for CPE, respectively. The small differences in the electrochemical behaviour attributed to the difference in shape or in the role of the insulator component in the electrode were observed [18]. Achieved *LOQ* are sufficient for the determination of ISu in human urine [5]. Nevertheless, the determination of ISu in the spiked human urine sample was not successful due to the interference of matrix components in spite of the preliminary separation by solid phase extraction.

It can be concluded, that used array of carbon composite electrodes can be successfully used for determination of ISu; however, it is priority to develop a suitable technique for its preliminary separation and preconcentration from urine samples. Otherwise, an array of integrated CFEs achieved slightly better results during determination of the ISu with developed voltammetric method in comparison to well-known CPE [18].

4.2. Gold nanostructured film electrodes

4.2.1. *Gold nanostructured film electrodes on polytetrafluorethylen substrate*

In this **Ph.D. Thesis**, 80 nm thin gold nanolayers/electrodes sputtered on **PTFE** with 3 different degrees of treatment (see 3.2.3.) were electrochemically and physically characterized and their applicability as a disposable electrochemical sensor was verified.

These gold nanolayers were provided by Department of Solid State Engineering at the University of Chemistry and Technology in Prague, where sputtering of gold atoms (group of physical vapour deposition methods) is predominantly used for many biophysical and material applications, but its use for fabrication of working electrodes intended for electroanalytical applications was first tested in this Ph.D. Thesis in spite of the fact that sputtering is considered as pollution free (“green”) method [30].

Chemical composition and morphology of the surface of GNFEs was examined prior to electrochemical characterization. All types of GNFEs exhibited homogeneous gold layer with small differences in coverage of the PTFE. GNFE-BPD exhibited a maximum surface roughness (26.5 nm) caused by the plasma treatment and by grafting of BPD on the surface of PTFE. Surprisingly, GNFE-Plasma exhibited the strongest adhesion of gold layer on the surface of PTFE and the highest levels of surface concentration of Au from all GNFEs. This effect is associated with stronger bonding of gold with roughened PTFE rather than with spontaneously grafted biphenyl-4,4'-dithiol molecules [19].

Electrochemical characterization included examination of the electrode reaction of standard redox probes: ferrocyanide/ferricyanide and hydroquinone/benzoquinone), examination of electrochemical behaviour in BR buffer, KCl, KNO₃, H₂SO₄ and attempt to calculate active surface areas of tested electrodes from Randles-Sevcik equation.

During DPV measurements in different types of supporting electrolytes, maximum accessible potentials for oxidation (0.9 V) were reached in supporting electrolytes of neutral pH. Limiting factor of the anodic width of potential windows was the formation of the gold oxides on the gold surfaces [31, 32]. It was also observable that strong acidic medium coupled with high inserted oxidation potential results in the decrease of the

adhesion of thin nanolayer and in fissures leading to the exposure of the surface of PTFE and distortion of the electrode.

Next study of electrochemical behaviour of GNFEs was performed by CV at scan rates from 10 to 500 mV s^{-1} in solutions of ferrocyanide in potassium nitrate and hydroquinone in BR buffer pH 7. It was necessary to evaluate repeatability of voltammetric peaks, reversibility of the electrode reaction, and the linearity of the relation between the anodic peak current and the square root of scan rate during measurement with inorganic and organic probe. The linear relation between the anodic peak current values and the square root of scan rate was obtained ($R^2 > 0.99$) (**Fig. 2**) for all used electrodes and probes. For all types of GNFEs, slopes of these dependences were higher than for gold bulk electrode which can be explained by higher active roughened areas of GNFEs. This statement was confirmed by calculation of active areas of electrodes by the Randles–Sevcik equation.

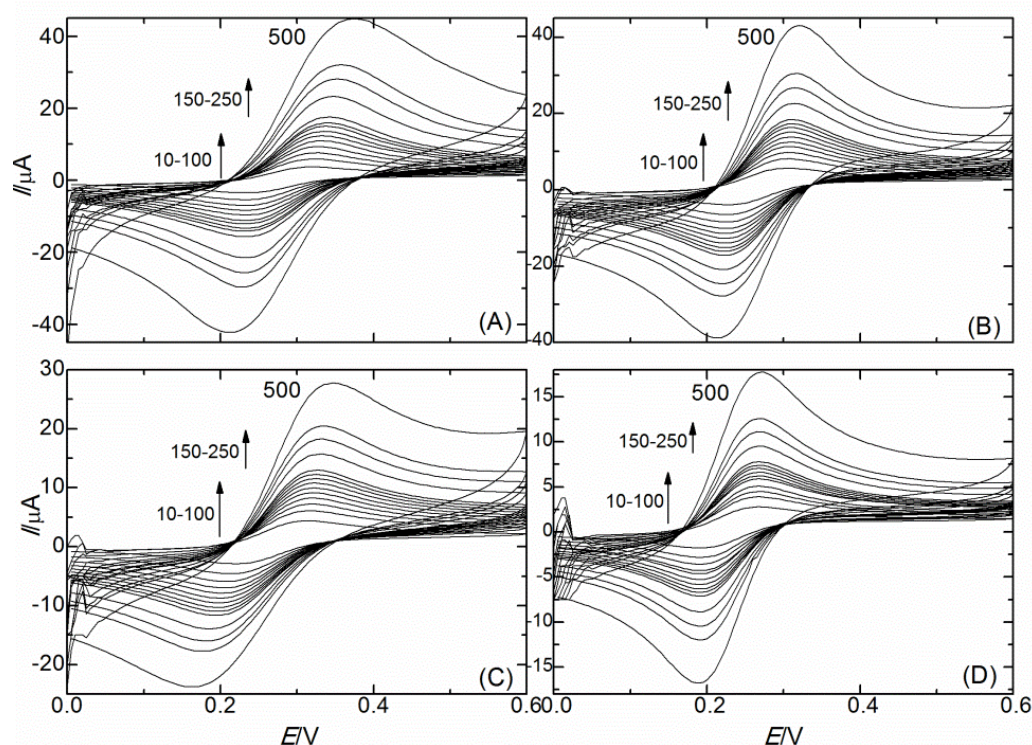


Fig. 2 Cyclic voltammograms of 1 mmol L^{-1} potassium hexacyanoferrate in potassium nitrate measured on (A) GNFE-Pristine, (B) GNFE-Plasma, (C) GNFE-BPD, and (D) gold bulk electrode at different scan rates (from 10 to 500 mV s^{-1}).

The diameter of all used electrodes was 3 mm; therefore, their geometric area was 7.1 mm². Active areas 7.5 ± 0.5 mm², 8.4 ± 0.2 mm², and 7.3 ± 0.5 mm² (active area ± confidence intervals) were calculated for GNFE-Pristine, GNFE-Plasma, and GNFE-BPD, respectively. Statistically, the increase of active area by plasma treatment was observed in the case of GNFE-Plasma. Calculated active areas of other two GNFEs were statistically comparable, but with higher values of confidence intervals caused by deviations from the ideal behaviour on the analyte/electrode interface (mentioned in [33]).

The repeatability of the heights of anodic and cathodic peaks was from 1 % to 8 % for all used electrodes and probes. For the measurement with ferrocyanide, calculated average values of I_A/I_C ratio were nearly 1.0 with $\Delta E_p = 70 - 100$ mV, which pointed to reversible kinetics of the electrode reaction. In the case of hydroquinone, backward reduction peak was minimally 10 % lower than oxidation peak ($I_A/I_C = 1.1 - 1.2$), but the effect of passivation by reaction products during repeated measurements was not observed. The achieved peak-to-peak separation values for hydroquinone with GNFEs (ΔE_p) were higher than predicted for Nernstian reversible simultaneous two electron reaction (30 mV); moreover, it was necessary to impose relatively large overpotential of the GNFE to provide sufficient energy for the redox reaction. However, this interesting electrochemical behaviour of hydroquinone is relatively standard and well-known [34].

The applicability of the electrodes was verified by DPV determination of hydroquinone (HQ) as a common organic environmental pollutant. Achieved limits of quantification of hydroquinone in BR buffer were 4.3 µmol L⁻¹ for GNFE-Pristine, 4.2 µmol L⁻¹ for GNFE-Plasma, and 9.0 µmol L⁻¹ for GNFE-BPD, respectively. Obtained *LOQ* cannot yet compete with low *LOQ* of other nanostructured gold electrodes [35, 36]; on the other hand, all GNFEs showed acceptable electrochemical parameters, which are comparable to parameters of gold bulk electrode. Moreover, gold film electrodes made by sputtering offer certain advantages such as small volume of used sample and easy miniaturization, which is promising for the future use of these electrodes for determination of oxidisable electroactive organic compounds.

4.2.2. *Gold nanostructured film electrodes with surface modified with pNIPAAAM*

Gold nanostructured film electrode (GNFE) with deposited **pNIPAAAM** substrate on the surface was applied as disposable electrochemical sensor. Phase transition influenced by temperature of pNIPAAAM from swollen hydrated state ($T < 32^{\circ}\text{C}$) to collapsed dehydrated state ($T > 32^{\circ}\text{C}$) can be used for entrapping of analyte molecules and subsequent spectrometric determination [37], thus the main task was to find out, whether would be possible to entrap ferrocyanide molecules (dissolved in potassium nitrate) on the surface of the electrode by the change of the temperature [20]. It would be attractive from the point of view of the ability to measure in microliter volumes of the sample, and possibility of determination of submicromolar concentrations of electrochemically active compounds.

All measurements were carried out at two temperatures (25°C and 45°C), which represent two physical states of pNIPAAAM. Electrochemical reaction at 25°C demonstrates sufficient repeatability of the height of forward anodic and backward cathodic peak (under 5 %) and reversibility ($\Delta E_p = 95 \text{ mV}$, $I_{anod}/I_{cathod} = 1.1$) of one electron reaction comparable to measurement with pristine electrode. On the other hand, a significant change of the electrochemical behaviour was observed during the measurement of repeated scans at 45°C on one single electrode. Each subsequent scan resulted in significant increase of the height of the anodic oxidation peak as well as cathodic reduction peak (limiting scan was not found). This phenomenon can be explained by pNIPAAAM collapsing at the electrode surface, resulted in the deviation of the electrode process from a diffusion-controlled mechanism; thus, molecules of ferrocyanide were entrapped and accumulated in the pNIPAAAM layer on the electrode surface and increase of the signal was observed [20].

4.2.3. *Gold nanostructured film electrodes with surface modified with alkyl and organic functional groups*

In this chapter, two mechanisms of grafting of substrate/functional group were used; pNIPAAAM substrate was replaced by “non-intelligent” substrate/functional groups: $-\text{NO}_2$, $-\text{C}_8\text{F}_{17}$ (spontaneously grafted and electrografted) [21], $-\text{C}_1\text{H}_3$, $-\text{C}_4\text{H}_9$, $-\text{C}_{10}\text{H}_{21}$, and $-\text{C}_{16}\text{H}_{33}$

(electrografted) [22]. The task was to find out, whether modified gold surface of the electrode would not be blocked by the substrate/functional group and how the electrochemical reaction of ferrocyanide/ferricyanide redox system would be affected by different grafting mechanism.

The electrochemical characterization was carried out by CV of ferrocyanide dissolved in aqueous medium of potassium nitrate or in potassium nitrate solution with 50 % content of methanol (v/v) as a mixed water-methanol medium.

In the case of GNFEs with grafted **alkyl groups**, the mixed water-methanol medium was chosen for the purpose of evaluation of hydrophobicity of the surface, which should be dependent on the length of the alkyl chain of the substrate. When $-C_1H_3$ substrate was grafted, partially blocking of ferrocyanide molecules with lower rate of reversibility of the electrochemical reaction was observed ($\Delta E_p = 200$ mV, $I_{anod}/I_{cathod} = 1.4$, $I_{anod} = 8.9$ μ A). Trend in blocking of the electrode surface with growing length of alkyl group continued until the oxidation as well as reduction peak fully disappeared (when $-C_{10}H_{21}$, $-C_{16}H_{33}$ grafted). Slight differences in electrochemical behaviour were observed during the CV in the mixed aqueous-methanol medium (50 % v/v). Pristine electrode and electrodes with grafted $-C_1H_3$ and $-C_4H_9$ groups exhibited well-shaped oxidation peak at the same potential with the statistically same height. Even grafting of $-C_{10}H_{21}$ group has not led to full peak suppression. Despite the fact that grafted $-C_{16}H_{33}$ group should fully block the electrode surface, small oxidation peak was observed, which indicated the influence of the used mixed solvent on measurement. Methanol pushed inorganic probe through the substrate to the surface of gold electrode and the electron transfer controlled by diffusion could be completed; however, the electrochemical reaction is not reversible [22]. It was confirmed that electron reaction can be promoted by the change of the solvent or co-solvent to non-polar medium which leads to revelation of defects where molecular layer of organic groups is not sufficiently bent and unevenly arranged to block electron transfer and the gold surface is electrochemically accessible. Therefore these electrodes can be used in analytical chemistry for the determination oxidisable compounds in mixed aqueous-methanolic medium without problems with disrupting of electrode surface by organic solvent which is the case of some carbon composite electrodes [15].

In the case of GNFEs with $-\text{NO}_2$, $-\text{C}_8\text{F}_{17}$ functional group, the process of grafting was carried out by two mechanisms: spontaneous grafting and electrografting under certain potential. Resulted electrodes were compared to each other to observe differences in surface blocking when different mechanisms of grafting are used [21]. After the spontaneous mechanism of grafting, the peaks become less pronounced, due to partial surface blocking by substrates in comparison to measurement with GNFE-Pristine. When the electrochemically induced modification was applied, the ferrocyanide/ferricyanide probe-related peaks fully disappeared, indicating the full blocking of the gold surface, thus the probe cannot reach the metal surface.

Results obtained from the measurement with GNFEs with modified surfaces pointed to the fact, that not all used functional groups are useful for electroanalytical purposes and resulting electroanalytical performance is strongly influenced also by mechanism of fabrication of electrodes. Nevertheless, the use of modified GNFEs with grafted substrates/functional groups is interesting field of application of new electrode materials in electroanalytical chemistry.

5. Conclusion

The submitted Ph.D. Thesis represents a contribution to the effort to find and test new interesting electrode materials and arrangements for electroanalytical sensors intended for large scale monitoring of electrochemically oxidisable organic compounds. Every new electrode arrangement has to be tested and evaluated from the point of view of user friendliness; easy way of fabrication of the working electrode, good compatibility with biological samples, and environmental friendliness. Furthermore, it is essential to check whether the voltammetric measurement with the new working electrode provides a high level of precision and selectivity of the measurement for given purposes [1].

In this Ph.D. Thesis, a several types of miniaturized electrode film arrangements based on working electrodes made from graphitic carbon or pure gold were tested, characterized in many possible ways and compared with commonly used carbon and gold electrodes. Namely, an array of carbon composite film electrodes integrated in microtitration plate as a disposable measuring cell system, gold nanostructured film electrodes/layers sputtered on treated PTFE substrates and gold nanostructured film electrodes modified by grafted functional group/substrate onto electrode surface were proposed and tested and their applicability for electroanalytical purposes was evaluated.

Moreover, their practical applicability was verified by the development of voltammetric methods for the determination of metabolites of catecholamines: homovanillic acid, vanillylmandelic acid [38]; and indole metabolite, ISu [9]. The determination of these biomarkers is fundamental for determining the stage of disease, monitoring of response of human organism to treatment and for an early diagnosis of tumours and other diseases [6, 7].

The obtained results can be summarized as follows:

- ❖ An array of carbon composite film electrodes (CFE) integrated in microtitration plate (measuring cell system) was found suitable for the determination of mixture of homovanillic acid and vanillylmandelic acid in the concentration range from 100 to 0.8 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The lowest limit of quantification (*LOQ*) was 0.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, which was reached using differential pulse voltammetry. Method for the

determination of homovanillic acid and vanillylmandelic acid in their mixture was developed as well. Limits of quantitation were slightly lower in comparison to *LOQ* obtained with carbon paste electrode and boron doped diamond electrode [25, 26].

- ❖ Array of integrated CFEs was used for the study of electrochemical behavior and for sensitive determination of indoxyl sulphate in the concentration range from 50 to 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Achieved *LOQ* was 0.7 $\mu\text{mol L}^{-1}$. For comparison, *LOQ* achieved with CPE was 1.7 $\mu\text{mol L}^{-1}$. *LOQ* achieved by CFE are comparable to limits achieved with HPLC/ED [39].
 - ❖ For the verification of practical applicability of the array of integrated CFEs with newly developed voltammetric method, an attempt to use solid phase extraction of indoxyl sulphate from human urine was made. However, SPE was not fully successful, because few urine interferences remained in solution with the analyte.
- ❖ This disposable array of integrated CFEs intended for screening measurements offers an inexpensive, independent, and reliable alternative to more frequently used spectrometric detectors. Moreover, this array offers easy portability and possibility of simple *in-situ* measurements in small sample volumes.
- ❖ Gold nanostructured film electrodes (GNFEs, 80 nm thin) sputtered on three types of treated PTFE were electrochemically characterized and their applicability as disposable electrochemical sensors was verified.
- ❖ All GNFEs showed acceptable electrochemical parameters, which are comparable to parameters of gold bulk electrode. The increase of current response due to the increase of active surface area by sputtering of Au atoms onto patterned PTFE (resulting in roughened nanolayer) was observed.
- ❖ GNFEs on PTFE substrate were used for the study of electrochemical behavior and for the determination of hydroquinone in the concentration range from 100 to 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Achieved *LOQs* were 4.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for GNFE-Pristine, 4.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for GNFE-Plasma, and 9.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for GNFE-BPD, respectively. In comparison with other voltammetric determinations of hydroquinone on various gold or

nanostructured gold electrodes, all GNFEs with developed voltammetric method offer inadequate *LOQ* and sensitivity.

- ❖ However, GNFEs on PTFE substrate made by sputtering offer certain advantages e.g. small volume of used sample, easy miniaturization, and also “green” method of fabrication.
- ❖ Basic electrochemical parameters of gold nanostructured film electrode (10 nm thin) modified by grafting of thermosensitive polymer pNIPAAm on the surface (GNFE-pNIPAAm) were evaluated.
- ❖ Positive entrapping and accumulation of the molecules of ferrocyanide on the surface of GNFE-pNIPAAm was observed. It resulted in the increase of the sensitivity of the measurement.
- ❖ During the measurement of basic electrochemical parameters of gold nanostructured film electrode (10 nm thin) modified by grafting of $-\text{NO}_2$, $-\text{C}_8\text{F}_{17}$ functional groups on the surface was found out that forced electrografting under certain potential caused a complete blockage of the electrode surface; afterwards it is not possible to measure with the electrode.
- ❖ In the case of GNFEs- C_xH_n , it was confirmed, that long alkyl substrates can block the entire surface of the gold layer. The extent of this blocking depends on the length of carbon chain. Nevertheless, electron reaction can be promoted by the change of the solvent to mixed aqueous-methanolic medium, which leads to revelation of defects where molecular layer of organic groups is not sufficiently bent and unevenly arranged to block electron transfer and the gold surface is physically available.

6. References

- [1] Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J., Nontraditional Electrode Materials in Environmental Analysis of Biologically Active Organic Compounds, *Electroanalysis*, 19 (2007) 2003-2014.
- [2] Navratil T., Composite Solid Electrodes - Tool for Organic Electrochemistry, *Current Organic Chemistry*, 15 (2011) 2996-3013.
- [3] Siegel J., Lyutakov O., Rybka V., Kolska Z., Svorcik V., Properties of Gold Nanostructures Sputtered on Glass, *Nanoscale Research Letters*, 6 (2011).
- [4] Wang J., Analytical Electrochemistry, 3rd ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2006.
- [5] Durantou F., Cohen G., De Smet R., Rodriguez M., Jankowski J., Vanholder R., Argiles A., European Uremic Toxin Work G., Normal and Pathologic Concentrations of Uremic Toxins, *Journal of the American Society of Nephrology*, 23 (2012) 1258-1270.
- [6] Daniel D., Lalitha R.M., Tumor Markers - a Bird's Eye View, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery Medicine and Pathology*, 28 (2016) 475-480.
- [7] Basuyau J.P., Leroy M., Brunelle P., Determination of Tumor Markers in Serum. Pitfalls and Good Practice, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 39 (2001) 1227-1233.
- [8] Matsuo M., Tasaki R., Kodama H., Hamasaki Y., Screening for Menkes Disease Using the Urine Hva/Vma Ratio, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28 (2005) 89-93.
- [9] Cassani E., Barichella M., Canello R., Cavanna F., Iorio L., Cereda E., Bolliri C., Maria P.Z., Bianchi F., Cestaro B., Pezzoli G., Increased Urinary Indoxyl Sulfate (Indican): New Insights into Gut Dysbiosis in Parkinson's Disease, *Parkinsonism & Related Disorders*, 21 (2015) 389-393.
- [10] LeWitt P., Schultz L., Auinger P., Lu M., Parkinson Study Grp D., Csf Xanthine, Homovanillic Acid, and Their Ratio as Biomarkers of Parkinson's Disease, *Brain Research*, 1408 (2011) 88-97.
- [11] Suzuki E., Kanba S., Nibuya M., Adachi S., Sekiya U., Shintani F., Kinoshita N., Yagi G., Asai M., Longitudinal Changes in Symptoms and Plasma Homovanillic Acid Levels in Chronically Medicated Schizophrenic Patients, *Biological Psychiatry*, 36 (1994) 654-661.
- [12] Flottmann D., Hins J., Rettenmaier C., Schnell N., Kuci Z., Merkel G., Seitz G., Bruchelt G., Two-Dimensional Isotachopheresis for the Analysis of Homovanillic Acid and Vanillylmandelic Acid in Urine for Cancer Therapy Monitoring, *Microchimica Acta*, 154 (2006) 49-53.
- [13] Ellis R.J., Small D.M., Vesey D.A., Johnson D.W., Francis R., Vitetta L., Gobe G.C., Morais C., Indoxyl Sulphate and Kidney Disease: Causes, Consequences and Interventions, *Nephrology*, 21 (2016) 170-177.
- [14] Niwa T., Uremic Toxicity of Indoxyl Sulfate, *Nagoya Journal of Medical Science*, 72 (2010) 1-11.
- [15] Libansky M., Zima J., Barek J., Dejmekova H., Construction of an Electrochemical Cell System Based on Carbon Composite Film Electrodes and Its Application for Voltammetric Determination of Triclosan, *Electroanalysis*, 26 (2014) 1920-1927.
- [16] Reznickova A., Kolska Z., Hnatowicz V., Svorcik V., Nano-Structuring of PTFE Surface by Plasma Treatment, Etching, and Sputtering with Gold, *Journal of Nanoparticle Research*, 13 (2011) 2929-2938.
- [17] Libansky M., Zima J., Barek J., Dejmekova H., Voltammetric Determination of Homovanillic Acid and Vanillylmandelic Acid on a Disposable Electrochemical Measuring Cell System with Integrated Carbon Composite Film Electrodes, *Monatshefte Fur Chemie*, 147 (2016) 89-96.
- [18] Bergerova M., Libansky M., Dejmekova H., Determination of Urinary Indican on Carbon Film Composite Electrode and Carbon Paste Electrode *Current Analytical Chemistry*, Submitted (2017).
- [19] Libansky M., Zima J., Barek J., Reznickova A., Svorcik V., Dejmekova H., Basic Electrochemical Properties of Sputtered Nanostructured Gold Film Electrodes, *Electrochimica acta*, Submitted (2017).
- [20] Guselnikova O., Postnikov P., Kalachyova Y., Libansky M., Zima J., Kolska Z., Svorcik V., Lyutakov O., Large-Scale Ultrasensitive, Highly Reproducible and Regenerative Smart SERS Platform Based on pNIPAAm Grafted Gold Grating, *ChemNanoMat*, 3 (2016) 135-144.
- [21] Guselnikova O., Postnikov P., Elashnikov R., Trusova M., Kalachyova Y., Libansky M., Barek J., Kolska Z., Svorcik V., Lyutakov O., Surface Modification of Au and Ag Plasmonic Thin Films Via

Diazonium Chemistry: Evaluation of Structure and Properties, *Colloids and Surfaces A Physicochemical Engineering Aspects*, In Press (2016).

[22] Guselnikova O., Kalachyova Y., Faragova K., Libansky M., Dejmekova H., Svorcik V., Sajdl P., Lyutakov O., Functional Spp-Based Sers Sensor Platform for Lipoproteins Detection, *Talanta*, Prepared for submission (2017).

[23] Inczedy J., Compendium of Analytical Nomenclature (Definitive Rules 1997), Blackwell Science, Santa Fe, 1998.

[24] Blanco-Lopez M.C., Lobo-Castanon M.J., Ordieres A.J.M., Tunon-Blanco P., Electrochemical Behavior of Catecholamines and Related Compounds at in Situ Surfactant Modified Carbon Paste Electrodes, *Electroanalysis*, 19 (2007) 207-213.

[25] Adamkova H., Determination of Tumor Markers Using Carbon Paste Electrode, Charles University, Prague, 2016.

[26] Baluchova S., Voltammetric Determination of Clinical Markers Vanillylmandelic and Homovanillic Acid at Boron-Doped Diamond Electrode, Charles University, Prague, 2015.

[27] Garcia A., Heinanen M., Jimenez L.M., Barbas C., Direct Measurement of Homovanillic, Vanillylmandelic and 5-Hydroxyindoleacetic Acids in Urine by Capillary Electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 871 (2000) 341-350.

[28] Siren H., Mielonen M., Herlevi M., Capillary Electrophoresis in the Determination of Anionic Catecholamine Metabolites from Patients' Urine, *Journal of Chromatography A*, 1032 (2004) 289-297.

[29] Enache T.A., Oliveira-Brett A.M., Pathways of Electrochemical Oxidation of Indolic Compounds, *Electroanalysis*, 23 (2011) 1337-1344.

[30] Reznickova A., Kolska Z., Siegel J., Svorcik V., Grafting of Gold Nanoparticles and Nanorods on Plasma-Treated Polymers by Thiols, *Journal of Materials Science*, 47 (2012) 6297-6304.

[31] Oesch U., Janata J., Electrochemical Study of Gold Electrodes with Anodic Oxide-Films 1. Formation on Reduction Behavior of Anodic Oxides on Gold, *Electrochimica Acta*, 28 (1983) 1237-1246.

[32] Oesch U., Janata J., Electrochemical Study of Gold Electrodes with Anodic Oxide-Films 2. Inhibitor of Electrochemical Redox Reactions by Monolayers of Surface Oxides, *Electrochimica Acta*, 28 (1983) 1247-1253.

[33] Adams R.N., *Electrochemistry at Solid Electrodes*, Marcel Dekker Inc., New York, 1969.

[34] Compton R.G., Banks C.E., *Understanding Voltammetry* 2nd Edition, Imperial College Press, London, 2011.

[35] Hu S., Wang Y.H., Wang X.Z., Xu L., Xiang J., Sun W., Electrochemical Detection of Hydroquinone with a Gold Nanoparticle and Graphene Modified Carbon Ionic Liquid Electrode, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 168 (2012) 27-33.

[36] Ma X.M., Liu Z.N., Qiu C.C., Chen T., Ma H.Y., Simultaneous Determination of Hydroquinone and Catechol Based on Glassy Carbon Electrode Modified with Gold-Graphene Nanocomposite, *Microchimica Acta*, 180 (2013) 461-468.

[37] Zheng Y.H., Soeriyadi A.H., Rosa L., Ng S.H., Bach U., Gooding J.J., Reversible Gating of Smart Plasmonic Molecular Traps Using Thermoresponsive Polymers for Single-Molecule Detection, *Nature Communications*, 6 (2015).

[38] Eisenhofer G., Kopin I.J., Goldstein D.S., Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine, *Pharmacological Reviews*, 56 (2004) 331-349.

[39] Filik H., Avan A.A., Aydar S., Voltammetric Sensing of Uremic Toxin Indoxyl Sulfate Using High Performance Disposable Screen-Printed Graphene Electrode, *Current Pharmaceutical Analysis*, 12 (2016) 36-42.

7. Curriculum Vitae

MSc. Milan Libánský

Personal data

- Date of birth: **25.01.1989**
- Nationality: **Czech Republic**
- Permanent address: **Graficka 958/37, Prague 5, 150 00**
- Phone number: **+420 728 409 538**
- E-mail: **libansky.milan@gmail.com**

Education

2013 – to date Charles university (Prague, CZ)

- PhD. Study of Analytical chemistry at faculty of science

2011 – 2013 Charles university (Prague, CZ)

- MSc. Study of Analytical chemistry at faculty of science

2008 – 2011 Charles university (Prague, CZ)

- BSc. Study of Clinical and toxicological analysis at faculty of science

Practice

2011 – 2013 ALS Laboratory group (Prague, CZ)

- Laboratory staff - Ion exchange chromatography

2014 – 2016 Charles University (Prague, CZ)

- Researcher specialized in electroanalytical methods (Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science)

2013 – 2016 Charles University (Prague, CZ)

- Pedagogical practice (Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science)

- Supervisor of:

High school practice, 2013 - 2016 (students: Michal Kroc, Adéla Zárbybnická, Pavlína Šimonová, and Anna Kroiherová)

- *Advanced laboratory course (SS 2014, WS2014)*

Achievements

- 2013** 1st Place in the competition for MERCK PRIZE for the best work of young analytical chemist for conference paper in 16th year of Czechoslovak contest of MERCK Company in Analytical chemistry
- 2011** 2nd Place in the international competition for the best work in the framework of the 13th Student research conference in Analytical chemistry in Bratislava

Completed training courses, training seminars and workshops

- 2015** FCE, First certificate in English, Cambridge Institute
- 2014** TrainMic workshop: Training in metrology in chemistry (EUROPEAN COMMISSION, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements)
- 2013** IPErasmus (Erasmus intensive programme) - Environmental Remediation and Energy Production Technologies (Instituto Politécnico de Portalegre, Portalegre, Portugal)

Additional skills and activities

- Language skills
 - Czech (native speaker)
 - English (intermediate, B2 level)
- Computer skills (MS Word, MS Excel, MS PowerPoint, WoS)
- Member of Czech Chemical Society (2014-2016)

8. List of publications, oral and poster presentations

A) Theses

1. **Libansky M.**, *Bachelor Thesis*, Charles University, Prague 2011: Determination of arbutin using carbon paste electrode
2. **Libansky M.**, *Master Thesis*, Charles University, Prague 2013: *Construction of an electrochemical cell based on the carbon film electrode*

B) List of journal articles and book chapters

1. **Libansky M.**, Zima J., Barek J., Dejmekova H., Voltammetric Determination of Arbutin on Carbon Paste Electrode, chapter in book *Sensing in Electroanalysis 6*, University of Pardubice Press: Pardubice, 2011, 281-287.
2. **Libansky M.**, Zima J., Barek J., Dejmekova H., Voltammetric Determination of Triclosan Using a System of Disposable Electrochemical Cells with Integrated Carbon Electrode (Voltametrické stanovení triclosanu pomocí systému měrných cel s integrovanou uhlíkovou elektrodou), *Chemické Listy*, 107 (2013) 247-252. (Original in Czech)
3. **Libansky M.**, Zima J., Barek J., Dejmekova H., Voltammetric Determination of Triclosan by a System of Specific Duties with Integrated Carbon Electrode (Voltametrické stanovení triclosanu pomocí systému jednorázových měrných cel s integrovanou uhlíkovou elektrodou), *Chemické Listy*, 108 (2014) 243-250. (Original in Czech)
4. **Libansky M.**, Zima J., Barek J., Dejmekova H., Construction of an Electrochemical Cell System Based on Carbon Composite Film Electrodes and Its Application for Voltammetric Determination of Triclosan, *Electroanalysis*, 26 (2014) 1920-1927.
5. **Libansky M.**, Zima J., Barek J., Dejmekova H., Voltammetric Determination of Homovanillic Acid and Vanillylmandelic Acid on a Disposable Electrochemical Measuring Cell System with Integrated Carbon Composite Film Electrodes, *Monatshefte für Chemie*, 147 (2016) 89-96.
6. Guselnikova O., Postnikov P., Elashnikov R., Trusova M., Kalachyova Y., **Libansky M.**, Barek J., Kolska Z., Svorčík V., Lyutakov O., Surface Modification of Au and Ag Plasmonic Thin Films via Diazonium Chemistry: Evaluation of

Structure and Properties, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2017 (*In press*).

7. Guselnikova O., Postnikov P., Kalachyova Y., **Libansky M.**, Zima J., Kolska Z., Svorcik V., Lyutakov O., Large-scale Ultrasensitive, Highly Reproducible and Regenerative Smart SERS Platform Based on pNIPAm Grafted Gold Grating, *ChemNanoMat*, 3 (2016) 135-144.
8. **Libansky M.**, Zima J., Berek J., Alena Řezníčková, Václav Švorčík, Dejmková H., Basic Electrochemical Properties of Sputtered Nanostructured Gold Film Electrodes, *Electrochimica Acta*, 2017 (*Submitted*).
9. Bergerova M., **Libansky M.**, Dejmkova H., Determination of Urinary Indican on Carbon Film Composite Electrode and Carbon Paste Electrode, *Current Analytical Chemistry*, 2017 (*Submitted*).
10. Guselnikova O., Kalachyova Y., Faragova K., **Libansky M.**, Dejmkova H., Svorcik V., Sajdl P., Lyutakov O., Functional SPP-Based SERS Sensor Platform for Lipoproteine Detection, *Talanta*, 2017 (*Prepared for submission*).

C) List of oral presentations

1. **Libánský M.**, Zima J., Berek J. and Dejmková H.: Determination of Hydroquinone- β -D-glycopyranoside on Carbon Paste Electrode (Stanovení hydrochinon- β -D-glykopyranosidu na uhlíkové pastové elektrodě), *13th Student Scientific Conference –STU, Bratislava, Slovak Republic* (09. 11. 2011).
2. **Libánský M.**, Zima J., Berek J. and Dejmková H.: Voltammetric Determination of Triclosan Using a System of Disposable Electrochemical Cells with Integrated Carbon Electrode (Voltametrické stanovení triclosanu pomocí systému měrných cel s integrovanou uhlíkovou elektrodou), *16th National Competition for the Best Student Scientific Work in the Field of Analytical Chemistry (The Merck Prize) – Brno, Czech Republic* (06. - 07. 02. 2013).
3. **Libánský M.**, Zima J., Berek J. and Dejmková H.: Construction of a Multiple Electrochemical Cell Based on Carbon Film Electrodes, *56th Joint Meeting of the Polish and Hungarian Chemical Societies – Siedlce, Poland* (16. – 20. 09. 2013).
4. **Libánský M.**, Zima J., Berek J., Dejmková H.: New Voltammetric Arrangements for Large Scale Monitoring of Biologically Active Compounds Based on Carbon

Composite Film Electrode, *13th The Present State and Perspectives of Analytical Chemistry in Practice* – Bratislava, Slovak Republic (01. – 03. 06. 2014).

5. **Libánský M.**, Zima J., Barek J., Dejmková H.: Voltammetric Determination of Homovanillic Acid on a Disposable Electrochemical Measuring Cell System with Integrated Carbon Composite Film Electrodes, *XXXV. Modern Electrochemical Methods* – Jetřichovice u Děčína, Czech Republic (18. – 22. 05. 2015).
6. **Libánský M.**, Zima J., Barek J., Dejmková H.: Gold Film and Carbon Composite Film Electrodes for Voltammetric Determination of Oxidizable Organic Compounds, *14th The Present State and Perspectives of Analytical Chemistry in Practice* – Bratislava, Slovak Republic (03. – 06. 05. 2016).

D) List of posters

1. **Libánský M.**, Zima J., Barek J., Dejmková H.: New Voltammetric Arrangements for Inexpensive Monitoring of Biomarkers Based on Carbon Composite Film Electrodes, *Euroanalysis 2015* – Bordeaux, France (06. – 10. 09. 2015).
2. **Libánský M.**, Zima J., Barek J., Reznickova A., Dejmková H.: Electroanalytical Applications of Grafted Nanostructured Gold Film Electrodes, *6th EuChemS Chemistry Congress* – Seville, Spain (11. – 15. 2016).

E) List of patents and utility models

1. Czech National Utility Model number 25415. Dejmková H., **Libánský M.**, Zima J., Barek J.: Electrochemical Measuring Cell and Array of Electrochemical Measuring Cells (*Elektrochemická měřicí cela a soustava elektrochemických měřících cel*). 23.05.2013.
2. Czech Patent number 304176. Dejmková H., **Libánský M.**, Zima J., Barek J.: Electrochemical Measuring Cell and Array of Electrochemical Measuring Cells (*Elektrochemická měřicí cela a soustava elektrochemických měřících cel*). 23.11.2013.
3. Czech National Utility Model number 27672. **Libánský M.**, Zima J., Barek J., Dejmková H.: Array of Working Electrodes and Array of Electrochemical measuring sensors (*Soustava pracovních elektrod a soustava elektrochemických měřících senzorů*). 29.12.2014

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Studijní program: Analytická chemie

Autoreferát dizertační práce



Testování nových elektrodových uspořádání pro monitorování elektrochemicky oxidovatelných biologicky aktivních organických látek

Mgr. Milan Libánský

Školitel: Prof. RNDr. Jiří Zima, CSc.

Konzultant: Prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.

Konzultant: RNDr. Hana Dejmková, Ph.D.

Praha, 2017

Tato disertační práce vznikla na základě výsledků získaných v letech 2013 až 2017 během mého doktorského studia absolvovaného v UNESCO laboratoři elektrochemie životního prostředí na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Některé výsledky vznikly v rámci spolupráce s **Ing. Alenou Řezníčkovou, Ph.D.** a **Mgr. Oleksiy Lyutakovem, Ph.D.** z Ústavu inženýrství pevných látek Fakulty chemické technologie Vysoké školy Chemicko-Technologické.

Tato disertační práce vznikla za finanční podpory ze zdrojů Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV), Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt MSM0021620857), Grantové agentury České republiky (projekt P206/12/G151, Centrum nových přístupů k bioanalýze a molekulární diagnostice) .

Abstrakt

Předložená disertační práce je zaměřena na elektrochemickou charakterizaci a testování nově vyvinutých pracovních elektrod a jejich uspořádání. Tyto elektrody byly vyrobené z čistého atomárního zlata nebo z mikročástic grafitického uhlíku a jsou vhodné pro velkoplošné monitorování různých organických látek; dalším, ale neméně důležitým cílem práce je vývoj nových citlivých voltametrických metod pro stanovení oxidovatelných biologicky aktivních organických látek.

Měřicí systém cel s integrovanými uhlíkovými kompozitními elektrodami byl vybrán pro vývoj voltametrické metody vhodné ke stanovení homovanilové kyseliny, vanilylmandlové kyseliny a indoxylsulfátu. Tyto biomarkery různých onemocnění lidského těla byly vybrány z důvodu neustálého nárůstu zájmu lékařských laboratoří o jejich stanovování. Navíc před samotným stanovením indoxylsulfátu byla provedena jeho extrakce na tuhé fázi z matrice lidské moči. Všechny naměřené výsledky byly porovnány s výsledky měření s již standardně používanou uhlíkovou pastovou elektrodou.

Zlaté naprašované (metoda fyzikální depozice par) nanostrukturované filmové elektrody s povrchem modifikovaným různými funkčními skupinami a substráty a zlaté nanostrukturované filmové elektrody naprašované na upraveném polytetrafluorethylenu byly vybrány pro testování a elektrochemickou charakterizaci. Tyto elektrody představují zajímavý analytický nástroj vhodný pro použití jako jednorázový senzor pro měření v terénu v mikrolitrových objemech. Elektrochemická charakterizace zahrnovala: sledování parametrů elektrochemické reakce (opakovatelnost signálu, reverzibilita) různých standardních analytů (ferrokyanid, hydrochinon) v rozdílných základních elektrolytech, vyhodnocení parametrů naměřených kalibračních křivek zmíněných analytů, výpočet reálných aktivních ploch elektrod pomocí Randlesovy-Ševčíkovy rovnice a sledování, zda není povrch modifikovaných elektrod blokován naroubovanými funkčními skupinami. Vše bylo následně kriticky zhodnoceno a byla navržena možná vylepšení. Získané výsledky byly opět porovnány s měřením na klasické zlaté elektrodě (bulk electrode) nebo na zlaté nemodifikované nanostrukturované elektrodě naprašované na skleněném substrátu.

Obsah

1. Úvod	5
2. Cíle dizertační práce	7
3. Materiály a metodika	8
3.1. Chemikálie	8
3.2. Výroba a příprava pracovních elektrod	8
3.2.1. <i>Uhlíková kompozitní filmová elektroda</i>	8
3.2.2. <i>Uhlíková pastová elektroda</i>	8
3.2.3. <i>Zlaté nanostrukturované elektrody</i>	8
3.3. Obecné postupy a aparatura	9
4. Výsledky a diskuze	10
4.1. Uhlíková kompozitní elektroda	10
4.1.1. <i>Kyselina homovanilová a kyselina vanilylmandlová</i>	10
4.1.2. <i>Indoxylsulfát</i>	11
4.2. Zlaté nanostrukturované elektrody	12
4.2.1. <i>Zlaté nanostrukturované filmové elektrody na polytetrafluorethylenovém substrátu</i>	12
4.2.2. <i>Zlaté nanostrukturované filmové elektrody s povrchem modifikovaným pNIPAAAM</i>	15
4.2.3. <i>Zlaté nanostrukturované filmové elektrody s povrchem modifikovaným alkylovými a organickými funkčními skupinami</i>	16
5. Závěr	19
6. Literatura	22
7. Curriculum Vitae	24
8. Seznam publikací, přednášek a plakátových prezentací	26

1. Úvod

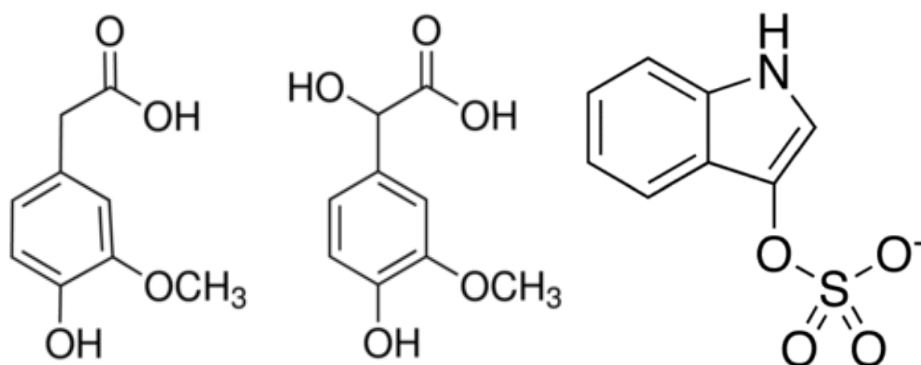
Každá vyvinutá pracovní elektroda určená pro elektroanalytické účely musí být testována různými možnými způsoby. Aby se dalo posoudit, zda je elektroda vhodná pro dané účely, je důležité prozkoumat elektrochemické chování při měření se základními elektrolyty, stejně tak jako s analyty.

Ideální pracovní elektroda by měla být snadno vyrobitelná z materiálů přívětivých pro životní prostředí, měla by být uživatelsky přijatelná, mělo by být možné zvýšit citlivost a selektivitu měření elektrochemickou a/nebo chemickou modifikací elektrody a konečně, samotné voltametrické metody vyvinuté s použitím elektrody by měly být citlivé a selektivní [1]. **Uhlíkové kompozitní filmové pracovní elektrody** [2] a pracovní **zlaté filmové elektrody** [3] většinou splňují všechny tyto požadavky. Navíc tyto elektrody v porovnání s moderními spektrometrickými přístroji mají výhodu ve své konstrukční jednoduchosti, jsou kompatibilní s biologickými vzorky a jsou levné z hlediska pořizovacích i provozních nákladů [1]. Tyto elektrody jsou vhodné pro monitorování elektrochemicky aktivních organických látek, především různých markerů onemocnění, kde se předpokládá velké množství analyzovaných vzorků. Dále mohou tyto elektrody sloužit jakožto analytické zařízení pro nezávislé stanovení analytů [4] a k předběžnému orientačnímu stanovení před stanovením citlivějšími a selektivnějšími technikami, které jsou ale nákladnější.

Nicméně je nutné zmínit, že stanovení biomarkerů různých onemocnění vyžaduje měření v lidské moči, která patří mezi nejčastěji využívanou tělní tekutinu při voltametrických stanoveních. Není to žádné překvapení, jelikož valná většina biomarkerů expozice a nemocí jsou vylučovány právě do moči [5]. Proto je podstatné vyvíjet rychlé a citlivé voltametrické metody spojené s extrakcemi na tuhé fázi, abychom mohli z koncentrace biomarkerů získávat informace o fázi nemoci, abychom mohli monitorovat odpověď lidského organismu na léčbu anebo pro včasnou diagnózu nádorového bujení či jiných nemocí [6, 7].

Pro testování aplikovatelnosti nedávno vyvinutých elektrochemických uspořádání založených na uhlíkových kompozitních filmových elektrodách (**CFE**) bylo v této

disertační práci vybráno několik modelových biologicky aktivních organických sloučenin, které jsou často stanovovány. Konkrétní zvolené biomarkery byly **kyselina homovanilová**, **kyselina vanilylmandlová** (metabolity katecholaminů) [8] a **indoxylsulfát (ISu)** neboli močový indikan (specifický metabolit indolu) [9] (**obr. 1**). Tyto biomarkery jsou důležitými indikátory neurologických poruch (Parkinsonova choroba [9, 10], chronická schizofrenie [11], bulimie [10]) a poruch metabolismu (nádory [12], onemocnění ledvin a srdce [13, 14]).



Obr. 1 Strukturní vzorce HVA, VMA a ISu (jmenovitě zleva doprava).

2. Cíle dizertační práce

Předkládaná dizertační práce je zaměřena na testování a charakterizaci nových elektrodových uspořádání vyrobených ze zlata či grafitového uhlíku určených pro elektroanalytické aplikace. Konkrétně byl systém uhlíkových kompozitních filmových elektrod integrovaných v plastových měrných celách [15] a nemodifikované a modifikované naprašované zlaté nanostrukturované filmové elektrody [16] testovány a charakterizovány mnoha možnými způsoby.

Předkládaná dizertační práce je založena na vědeckých publikacích uvedených v seznamu literatury [17-22]. U publikací [20-22] má Milan Libánský spoluautorský podíl zaměřený na elektrochemické testování.

Cíle této práce byly:

- ❖ Ověřit praktickou aplikovatelnost disposabilního systému měrných cel s integrovanými uhlíkovými kompozitními elektrodami vývojem citlivých elektrochemických metod pro stanovení **HVA**, **VMA** a **indoxylsulfátu**, důležitých biomarkerů onemocnění.
- ❖ Vyvinutou voltametrickou metodu zkombinovat s extrakcí tuhou fází indoxylsulfátu z lidské moči.
- ❖ Z hlediska elektroanalytické chemie charakterizovat zlaté nanostrukturované filmové elektrody naprašované na třech rozdílných typech polytetrafluorethylenu (**PTFE**).
- ❖ Elektrochemicky charakterizovat naprašované zlaté nanostrukturované filmové elektrody s modifikovaným povrchem s naroubovaným pNIPAAm inteligentním polymerem nebo s naroubovanými $-C_1H_3$, $-C_4H_9$, $-C_{10}H_{21}$, $-C_{16}H_{33}$ substráty nebo $-NO_2$, $-C_8F_{17}$ funkčními skupinami.

3. Materiály a metodika

3.1. Chemikálie

Zásobní roztoky (1 mmol l^{-1}) tří zvolených biomarkerů a hydrochinonu byly připraveny rozpuštěním přesného množství látky v deionizované vodě. Pro elektrochemickou charakterizaci zlatých nanostrukturovaných elektrody by použit zásobní roztok hexakynoželesnatanu draselného (1 mmol l^{-1}) rozpuštěného v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ dusičnanu draselném nebo chloridu draselném. Dále byly použity samostatně připravené základní elektrolyty ($0,1 \text{ mmol l}^{-1}$): kyselina sírová, dusičnan draselný a chlorid draselný a Brittonův-Robinsonův pufr o různém pH.

Methanol byl použit jakožto eluční činidlo pro extrakci ISu na tuhé fázi. Všechny použité chemikálie byly analytické čistoty.

3.2. Výroba a příprava pracovních elektrod

3.2.1. Uhlíková kompozitní filmová elektroda

Uhlíková kompozitní filmová elektroda byla připravená homogenizováním grafitových mikročástic s EPS polystyrenem v poměru 9:1 a následně bylo přidáno 0,5 ml toluenu na každých 0,1 gramu pevných částic. Následně bylo 80 μl vzniklého uhlíkového inkoustu aplikováno do každé jamky (96 jamek) mikrotitrační destičky s integrovaným kovovým kontaktem na dně. Elektrody měly průměr 8,05 mm a polokulovou plochu 100 mm^2 . Celý postup přípravy je detailně popsán v pracích **[17, 18]**.

3.2.2. Uhlíková pastová elektroda

Uhlíková pasta pro plnění elektrody byla připravena rozetřením 0,25 g grafitu s 0,1 ml minerálního oleje Nujol. Připravená pasta byla plněna do teflonového pouzdra s vnitřním průměrem 2 mm, tedy s elektrodovou plochou $3,1 \text{ mm}^2$.

3.2.3. Zlaté nanostrukturované elektrody

Zlaté nanovrstvy o tloušťce 80 nanometrů (kruhový průměr 3 mm) byly vakuově naprašovány přes kontaktní masku na povrch tří různých typů polytetrafluorethylenu (tloušťka PTFE 50 μm): PTFE s neupraveným povrchem (**GNFE-Pristine**), PTFE

s povrchem zdrsňným plasmou (**GNFE-Plasma**) a PTFE s povrchem zdrsňným plasmou s následně spontánně naroubovaným bifeny-4,4-dithiolem (**GNFE-BPD**).

Parametry depoziční kontaktní masky byly: kulatá hlava (pro elektrodu) o průměru 3 mm s připojeným „pruhem“ o délce 15 mm a šířce 1 mm; pruh sloužil k připojení potenciostatu. Definovaná plocha elektrody byla zajištěna izolací elektrodové hlavy od připojovacího pruhu pomocí nevodivého laku.

Zlaté nanovrstvy o tloušťce 10 nanometrů s modifikovaným povrchem byly nejdříve vakuově naprašovány na povrch fotorezistivním laserem upravené epoxidové pryskyřice (Su-8). Následně byly zlaté povrchy modifikovány funkčními skupinami/substráty (pNIPAAm, $-\text{NO}_2$, $-\text{C}_8\text{F}_{17}$, $-\text{C}_1\text{H}_3$, $-\text{C}_4\text{H}_9$, $-\text{C}_{10}\text{H}_{21}$, and $-\text{C}_{16}\text{H}_{33}$) spontánním roubováním či elektro-roubováním (v roztocích).

Jednotná plocha elektrody s průměrem 3 mm byla zajištěna izolací pomocí nevodivého laku. Kompletní podmínky a detaily postupu výroby elektrod jsou uvedeny v [\[19-22\]](#).

3.3. Obecné postupy a aparatura

V této dizertační práci byly použity tyto voltametrické techniky: Diferenční pulzní voltametrie s šířkou pulzu 0,1 s, výškou pulzu 50 mV, rychlostí skenu 20 mV s^{-1} , časem vzorkování 20 ms a cyklická voltametrie s rychlostí skenu 50 mV s^{-1} . Pro voltametrické měření byl použit přenosný potenciostat PalmSens ovládaný softwarem PSTrace v. 4.8 a tyto pracovní elektrody: systém uhlíkových kompozitních filmových elektrod integrovaných v mikrotitrační destičce, zlaté nanostrukturované filmové elektrody naprašované na upraveném PTFE a naprašované zlaté nanostrukturované filmové elektrody s povrchy modifikovanými různými funkčními skupinami či substráty. Všechny hodnoty potenciálů byly vztaženy k referenční gelové argentchloridové elektrodě. Jako pomocná elektroda byl použit platinový drátek.

Všechny získané výsledky byly porovnány s výsledky získanými měřeními na uhlíkové pastové elektrodě či komerční zlaté „bulk“ elektrodě. Dávkované objemy vzorků pro měření byly 10 μl pro zlaté nanostrukturované filmové elektrody, 370 μl pro systém uhlíkových kompozitních filmových elektrod a 5 ml pro uhlíkovou pastovou elektrodu a zlatou „bulk“ elektrodu.

Vzorky moči s přídatkem standardu ISu k extrakci na tuhé fázi byly připraveny z moči zdravé osoby. Extrakce byla provedena na extrakčních kolonkách LiChrolut EN 200 mg/3 ml poly(styren-divinylbenzen).

Kompaktnost, tloušťka, prvkové složení a drsnost zlatých elektrod byla zkoumána pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM), mikroskopie atomových sil (AFM) a rentgenové spektroskopie.

Všechna voltametrická měření byla prováděna pětikrát a pro každé měření byla použita vždy nová elektroda či nová elektrodová cela, pokud není uvedeno jinak.

Všechny funkční závislosti byly vypočítány z aritmetických průměrů. Mez stanovitelnosti byla vypočítána jako podíl desetinásobku směrodatné odchylky nejnižší vyhodnotitelné koncentrace ke směrnici kalibrační závislosti [23]. Všechna statistická vyhodnocení byla vypočtena na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Detailní podmínky pracovních postupů a použitých zařízení jsou zmíněny v publikacích **[17-22]**.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Uhlíková kompozitní elektroda

4.1.1. Kyselina homovanilová a kyselina vanilylmandlová

Systém **uhlíkových kompozitních filmových elektrod (CFE)** integrovaných v plastových měrných celách plastové mikrotitrační destičky byl v rámci mé **diplomové práce** vyvinut a patentován. Následně byla v rámci této dizertační práci testována praktická využitelnost tohoto systému, jakožto jednorázového senzoru určeného pro monitorování biomarkerů lidského onemocnění.

Systém integrovaných CFEs byl použit k DPV stanovení standardů HVA a VMA **[17]**, oxidovatelných tumorových biomarkerů. Fenolická struktura těchto kyselin (**obr. 1**) společně s jejich rozdílným oxidačním mechanismem (mechanismus přehledně popsal Blanco-Lopez v [24]) byly příslibem k snadnému simultánnímu stanovení obou analytů v jednom vzorku.

Vliv pH na chování obou látek při DPV byl sledován v oddělených roztocích standardů o koncentraci $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ v prostředí BR pufru o hodnotě pH 2 až 12. HVA poskytovala

jeden dobře vyvinutý anodický voltametrický pík. VMA poskytovala dva nepřekrývající se anodické voltametrické píky s potenciálem prvního píku shodného s potenciálem píku HVA. Potenciálový rozdíl mezi jednotlivými píky obou látek se snižoval se vzrůstajícím pH, takže jako optimální prostředí pro měření bylo zvoleno pH 2.

V dalším kroku bylo testováno, zda je možné oba analyty adsorptivně akumulovat na elektrodovém povrchu [4]. Testování probíhalo v nemíchaných roztocích standardů na koncentračních hladinách: $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ a $10 \mu\text{mol l}^{-1}$. Bohužel, pokus o zvýšení citlivosti voltametrického stanovení HVA a VMA použitím adsorpční voltametrie nebyl úspěšný, příčinou byla pravděpodobně příliš vysoká polarita analytů.

Za optimálních podmínek byly naměřeny kalibrační závislosti v koncentračním rozsahu od 100 do $0,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro HVA a od 100 do $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro VMA. Dosažené meze stanovitelnosti byly $0,3 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro HVA a $1,0 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro VMA. *LOQ* dosažené vyvinutou metodou pro CFE jsou nepatrně nižší než hodnoty dosažené na uhlíkové pastové elektrodě či elektrodě s borem dopovaným diamantem [25, 26]. Dosažené hodnoty *LOQ* jsou dostatečné pro stanovení obou biomarkerů v lidské moči, kde se referenční hodnoty obou analytů pohybují od 7 do $40 \mu\text{mol l}^{-1}$ [27, 28].

Vzhledem k tomu, že se oba analyty nacházejí v lidské moči, jsou běžně stanovovány vedle sebe v jednom roztoku, a jak bylo zmíněno v předchozích odstavcích, potenciál prvního píku VMA je shodný s potenciálem píku HVA. Druhý pík VMA je dobře oddělený a je tedy z něho možné stanovit koncentraci VMA a následně vypočítat koncentraci HVA z proudu prvního píku odpovídajícího součtu proudu píků obou sloučenin. Tato teorie byla ověřena změřením čtyř různých kalibračních sad směsných roztoků obou standardů a následným zhodnocením průměrné výtěžnosti koncentrace přídavek obou analytů. Získaná průměrná výtěžnost obou analytů byla téměř 90 procent. Celý výpočetní postup je uveden v publikaci [17].

Tyto výsledky potvrdily, že použité elektrodové uspořádání s integrovanými CFEs může být úspěšně použito pro stanovení HVA a VMA samostatně i ve směsi.

4.1.2. *Indoxylsulfát*

Praktická použitelnost zmíněného systému integrovaných CFEs byla dále ověřena stanovením ISu (močový indikan, oxidovatelný biomarker onemocnění ledvin) a jeho

předběžnou extrakcí (SPE) z moči. Získané výsledky byly navíc porovnány s výsledky získanými měřeními na zavedené uhlíkové pastové elektrodě vyrobené ze stejného typu uhlíku jako CFE [18].

Nejdříve byly změřeny pH závislosti. Elektrochemická oxidace ISu poskytla dva dobře vyvinuté a oddělené voltametrické píky odpovídající dvoustupňovému mechanismu výměny elektronů, který popsal Enache [29]. V souladu s maximální výškou píků a jejich rozlišením bylo zvoleno pH 2 pro CFE a pH 3 pro CPE jako optimální pH pro měření.

Následně byla ověřena možnost adsorpční akumulace ISu o koncentraci $5 \mu\text{mol l}^{-1}$ v BR pufru při optimálním pH. Výsledný nárůst proudové odezvy po pěti minutách akumulace byl zanedbatelný, tudíž adsorpční krok nebyl dále používán.

Za optimálních podmínek byly naměřeny kalibrační závislosti v koncentračním rozsahu od 50 do $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ s dosaženými mezemi $0,7 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro CFE a $1,7 \mu\text{mol l}^{-1}$ pro CPE. Malé rozdíly v elektrochemickém chování z důvodu rozdílného tvaru a použitého izolátoru v elektrodách byly popsány v [18]. Dosažené hodnoty *LOQ* jsou dostatečné pro stanovení ISu v lidské moči [5]; nicméně stanovení standardu ISu v lidské moči nebylo úspěšné z důvodu velkého množství interferentů v matrici, a to navzdory předběžné separaci pomocí extrakce na tuhé fázi.

Celkově shrnuto tak použité elektrodové uspořádání s integrovanými CFEs může být úspěšně použito pro stanovení ISu a navíc dosáhlo nepatrně lepších výsledků, než CPE během stanovení standardu ISu s vyvinutou voltametrickou metodou; nicméně prioritou je vyvinout vhodnou techniku pro předběžnou separaci a prekoncentraci ISu ze vzorků moči.

4.2. Zlaté nanostrukturované elektrody

4.2.1. Zlaté nanostrukturované filmové elektrody na polytetrafluorethylenovém substrátu

Zlaté nanovrstvy/elektrody o tloušťce 80 nanometrů vakuově naprášené na povrch tří různých typů PTFE (viz. 3.2.3) byly elektrochemicky a fyzikálně charakterizovány a byla ověřena jejich aplikovatelnost jakožto elektrochemických senzorů.

Tyto zlaté nanovrstvy byly připraveny Ústavem inženýrství pevných látek Vysoké školy Chemicko-Technologické, kde naprašování atomů zlata, jakožto metodu fyzikální parní

depozice kovů, využívají především pro mnoho biofyzikálních a materiálových aplikací, ale využití pro výrobu pracovních elektrod určených pro elektroanalytické aplikace je prvně testováno v této dizertační práci navzdory tomu, že naprašování je považováno za metodu nezatěžující životní prostředí [30].

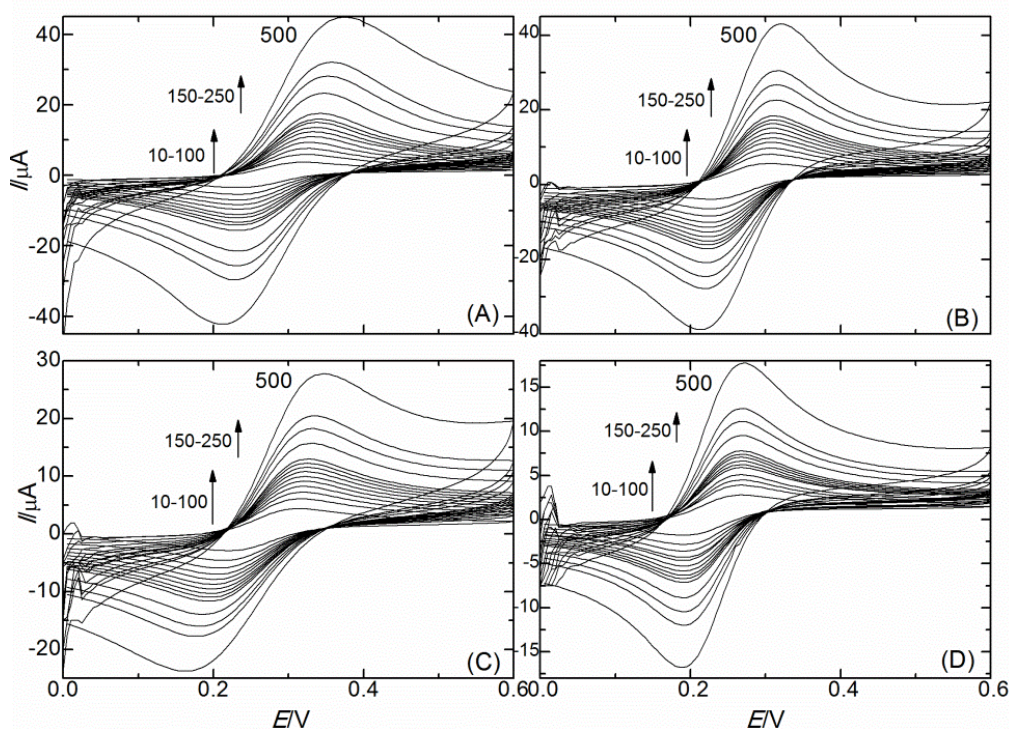
Před samotnou elektrochemickou charakterizací byla zkoumána morfologie a chemické složení povrchu všech typů GNFEs. Všechny typy GNFE prokázaly homogenní zlatou vrstvu s malými rozdíly v pokrytí PTFE [19]. U GNFE-BPD byla pozorována největší povrchová drsnost (26,5 nm) z důvodu úpravy povrchu plazmování PTFE a následným naroubováním BPD na povrch PTFE. Překvapením bylo, když ze všech typů GNFE, právě GNFE-Plasma prokázala nejsilnější přilnavost zlata na povrchu PTFE a prokázala nejvyšší povrchovou koncentraci zlata ve vrstvě. Ten jev je spojován s tím, že zlato raději tvoří silnější vazbu se zdrsňeným povrchem PTFE, než se spontánně naroubovanými molekulami bifenyl-4,4-dithiolu [19].

Elektrochemická charakterizace zahrnovala zkoumání elektrodových reakcí standardních redoxních sond: hexakynoželesnatan/hexakynoželesitan a hydrochinon/benzochinon, zkoumání elektrochemického chování v BR pufru, KCl, KNO₃, H₂SO₄ a pokus o výpočet aktivních povrchů testovaných elektrod z Randlesovy-Ševčíkovy rovnice.

Během DPV měření v různých typech základních elektrolytů bylo dosaženo nejvyššího efektivního oxidačního potenciálu (0,9 V) v základních elektrolytech o neutrálním pH. Tvorba oxidů zlata na povrchu elektrod byla limitujícím faktorem pro šířku anodického okna [31, 32]. Dále bylo pozorováno, že silně kyselé prostředí ve spojení s vloženými vysokými oxidačními potenciály způsobily snížení přilnavosti zlaté vrstvy k povrchu PTFE a došlo k tvorbě prasklin vedoucích až k úplnému odhalení PTFE a k nevratnému poškození elektrody.

Elektrochemické zkoumání chování hexakynoželesnatanu v dusičnanu draselném a hydrochinonu v pufru o pH 7 bylo zkoumáno pomocí cyklické voltametrie při rostoucí rychlosti polarizace od 10 do 500 mV s⁻¹. Bylo nutné vyhodnotit opakovatelnost měření voltametrických píků, reverzibilitu elektrodové reakce a linearitu závislosti proudu anodického píku na odmocnině z rychlosti polarizace pro oba analyty.

Dle získaného koeficientu determinace ($R^2 > 0,99$) byla závislost proudu anodického píku na odmocnině z rychlosti polarizace lineární pro všechny použité elektrody a měřené analyty (**obr. 2**). Směrnice těchto závislostí byly pro všechny typy GNFE dvakrát vyšší, než směrnice získaná měřením na zlaté „bulk“ elektrodě, což se dá vysvětlit vyšším zdrsňeným aktivním povrchem zlatých nanostrukturovaných filmových elektrod. Toto tvrzení bylo potvrzeno výpočtem aktivních ploch elektrod pomocí Randles-Ševčíkovy rovnice. Průměr všech použitých elektrod byl 3 mm; tudíž jejich geometrický povrch byl $7,1 \text{ mm}^2$. Vypočítané velikosti aktivních povrchů s intervaly spolehlivosti byly v uvedeném pořadí $7,5 \pm 0,5 \text{ mm}^2$, $8,4 \pm 0,2 \text{ mm}^2$, a $7,3 \pm 0,5 \text{ mm}^2$ pro GNFE-Pristine, GNFE-Plasma a GNFE-BPD. Ze statistického hlediska byl nárůst aktivního povrchu elektrody potvrzen pouze v případě elektrody naprášené na plasmou zdrsňeném povrchu. U ostatních elektrod byly hodnoty statisticky shodné, ale vyšší hodnoty intervalů spolehlivosti poukazují na odchylky od ideálního chování na rozhraní analyt/elektroda potřebného pro výpočet z Randlesovy-Ševčíkovy rovnice (zmíněno v [33]).



Obr. 2 Cyklické voltamogramy 1 mmol l^{-1} hexakynoželeznanu draselného v dusičnanu draselném měřené na (A) GNFE-Pristine, (B) GNFE-Plasma, (C) GNFE-BPD, and (D) zlaté bulk elektrodě při různých rychlostech polarizace (od 10 do 500 mV s^{-1}).

Opakovatelnost výšky anodického a katodického píku byla v rozmezí 1 % až 8 % pro všechny použité analyty i elektrody. Při měření hexakynoželeznanu, byly vypočítané průměrné hodnoty poměru I_A/I_C okolo 1,0 a $\Delta E_p = 70 - 100$ mV, což poukazuje na reverzibilní kinetiku elektrodové reakce. V případě hydrochinonu byl zpětný redukční pík minimálně o 10 % nižší než oxidační pík, tedy poměr I_A/I_C byl v rozmezí 1,1 – 1,2, nicméně při opakovaném měření nebyla pozorována pasivace elektrodového povrchu produkty elektrodové reakce. Při sledování hydrochinonu bylo dosaženo vyšších hodnot ΔE_p než předpokládaných 30 mV pro Nernstovskou reverzibilní výměnu dvou elektronů a navíc bylo nutné měřit při poměrně velkých hodnotách přepětí na GNFE, aby elektrodová reakce měla dostatek energie. Nicméně toto zajímavé elektrochemické chování hydrochinonu je relativně známé a nevybočuje z popsaných údajů [34].

Aplikovatelnost elektrod byla ověřena DPV stanovením hydrochinonu, jakožto běžného environmentálního polutantu.

Dosažené meze stanovitelnosti hydrochinonu v BR pufru byly v uvedeném pořadí 4,3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro GNFE-Pristine, 4,2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro GNFE-Plasma, a 9,0 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro GNFE-BPD.

Dosažené hodnoty *LOQ* nemohou soutěžit s nízkými *LOQ* při porovnání s ostatními voltametričnými stanoveními hydrochinonu na různých typech nanostrukturovaných zlatých elektrod [35, 36]; na druhé straně všechny zlaté nanostrukturované elektrody prokázaly přijatelné elektrochemické parametry, které jsou srovnatelné s parametry dosaženými zlatou „bulk“ elektrodou. Navíc naprašované zlaté filmové elektrody nabízejí jisté výhody, jako například možnost měření v malém objemu vzorku a jednoduchou miniaturizaci, což je příslibem pro budoucí využití těchto elektrod pro stanovení oxidovatelných elektroaktivních organických sloučenin.

4.2.2. *Zlaté nanostrukturované filmové elektrody s povrchem modifikovaným pNIPAAM*

Zlaté nanostrukturované filmové elektrody s povrchem modifikovaným pNIPAAM byly aplikovány jako disposabilní elektrochemický sensor.

Fázová změna pNIPAAm řízená teplotou z otevřeného hydratovaného stavu ($T < 32^\circ\text{C}$) na uzavřený dehydratovaný stav ($T > 32^\circ\text{C}$), může být použita pro zachycení molekul analytu a jeho následné spektrometrické stanovení [37]. Z tohoto důvodu bylo hlavním cílem zjistit, zda bude možné změnou teploty zachytit molekuly hexakynoželeznanu (rozpuštěného v dusičnanu draselném) na povrchu elektrody [20], což by mohlo být atraktivní z hlediska měření v malých objemech vzorku a stanovení submikromolárních koncentrací elektrochemicky aktivních sloučenin.

Všechna měření byla prováděna při dvou teplotách (25 a 45 °C) reprezentujících dva fyzikální stavy pNIPAAm. Opakovatelnost výšky anodického a katodického píku při měření za teploty 25 °C vyjádřena pomocí RSD byla lepší než 5 % a parametry reverzibility odpovídaly hodnotám $\Delta E_p = 95 \text{ mV}$, $I_{anod}/I_{katod} = 1,1$. Všechny hodnoty byly shodné se získanými hodnotami na nemodifikované elektrodě. Na druhé straně významná změna chování byla zaznamenána při opakovaném měření na jedné elektrodě při teplotě 45 °C, kde každý následný sken způsobil nárůst anodického i katodického píku o desítky procent (limitující sken nebyl nalezen).

Tento jev může být vysvětlen uzavíráním struktury pNIPAAm směrem k elektrodovému povrchu při vyšší teplotě, což vyústilo k ovlivnění koncentrace analytu zachyceného na povrchu elektrody. Molekuly hexakynoželeznanu byly uzavřeny a akumulovány ve vrstvě pNIPAAm na povrchu elektrody což způsobilo nárůst signálu [20].

4.2.3. Zlaté nanostrukturované filmové elektrody s povrchem modifikovaným alkylovými a organickými funkčními skupinami

V této kapitole dizertační práce byly pro depozici substrátu na povrchu elektrody použity dva různé mechanismy roubování a pNIPAAm byl nahrazen následujícími “non-intelligent“ modifikátory: $-\text{NO}_2$, $-\text{C}_8\text{F}_{17}$ (spontánní roubování a roubování pod napětím) [21],

$-\text{C}_1\text{H}_3$, $-\text{C}_4\text{H}_9$, $-\text{C}_{10}\text{H}_{21}$, and $-\text{C}_{16}\text{H}_{33}$ (roubování pod napětím) [22]. Cílem práce bylo zjistit, zda nebude zlatý povrch elektrod blokován substráty/funkčními skupinami a jak bude

probíhající elektrodová reakce hexakynoželeznatanu ovlivněná použitím jiného mechanismu roubování.

Elektrochemická charakterizace byla prováděna cyklickou voltametrií ve vodném prostředí roztoku hexakynoželeznatanu rozpuštěného v dusičnanu draselném a v roztoku ferrokyanidu rozpuštěného ve směsně-methanolickém prostředí s 50% obsahem methanolu.

Směsné vodně-methanolické prostředí bylo použito pro měření s GNFEs s naroubovanými alkylovými skupinami na zlatém povrchu, aby se ověřila hydrofobicita elektrodového povrchu v závislosti na délce alkylového řetězce. Částečná blokáce povrchu ($\Delta E_p = 200$ mV, $I_{anod}/I_{cathod} = 1,4$, $I_{anod} = 8.9$ μ A) byla pozorována v případě GNFE-C₁H₃. S narůstající délkou uhlíkového řetězce rostl i efekt blokáce povrchu; při naroubování -C₁₀H₂₁, -C₁₆H₃₃ skupin došlo k úplnému vymizení oxidačního i redukčního voltametrického píku.

Decentně rozdílné chování bylo pozorováno při použití směsně-methanolického prostředí (50 % V/V). Dobře vyvinuté oxidační píky o statisticky stejné výšce a potenciálu byly pozorovány při měření s nemodifikovanou elektrodou a elektrodami s naroubovanými -C₁H₃ a -C₄H₉ skupinami. Naroubování -C₁₀H₂₁ skupiny taktéž nevedlo k úplné blokáci elektrodového povrchu. Malý oxidační signál byl pozorován při měření s GNFE-C₁₆H₃₃ elektrodou navzdory faktu, že elektrodový povrch by měl být již plně blokován, což indikovalo vliv použitého rozpouštědla. Methanol protlačil anorganický analyt skrz vrstvu modifikátoru k zlatému povrchu elektrody, kde došlo k ireverzibilní elektrodové reakci [22].

Bylo potvrzeno, že elektrodová reakce může být podpořena změnou základního elektrolytu na více nepolární prostředí, což vede k odhalení míst, kde jsou organické řetězce nerovnoměrně uspořádané a nedostatečně ohnuté k blokáci elektrodového povrchu a elektrodový povrch je dostupný pro elektrochemickou reakci. V analytické chemii bude tudíž možné tyto elektrody využít ke stanovení oxidovatelných sloučenin ve směsně vodně-methanolickém prostředí bez problémů s poškozováním elektrodového povrchu organickými rozpouštědly, jako je tomu v případě některých uhlíkových kompozitních elektrod [15].

Při měření s GNFE- NO_2 a $-\text{C}_8\text{F}_{17}$ modifikovanými povrchy byl proces roubování realizován dvěma různými mechanismy: spontánním roubováním a roubováním pod elektrickým potenciálem. Vzniklé elektrody byly navzájem porovnány, aby byly pozorovány rozdíly v blokaci povrchu podle použitého mechanismu [21].

Při použití spontánního mechanismu depozice funkčních skupin byl elektrodový povrch částečně blokován a píky hexakynoželednatanu byly méně vyvinuty v porovnání s měřením na nemodifikované zlaté nanostrukturované filmové elektrodě. Voltametrické píky hexakynoželednatanu úplně vymizely, když byla použita elektrochemicky vyvolaná modifikace elektrody, což indikovalo nedostupný kovový povrch této elektrody.

Výsledky získané při měření na GNFE s modifikovaným povrchem poukázaly na fakt, že ne každá použitá funkční skupina či substrát je využitelná pro elektroanalytické účely a že celkové elektroanalytické vlastnosti jsou taktéž silně ovlivněny použitým mechanismem modifikace. Nicméně využití těchto modifikovaných elektrod je zajímavé téma rozšiřující možnosti využití nových elektrodových materiálů v elektroanalytické chemii.

5. Závěr

Předkládaná dizertační práce představuje příspěvek ke snaze najít a otestovat nové zajímavé elektrodové materiály a uspořádání jakožto elektroanalytické senzory vhodné pro velkoplošné sledování elektrochemicky oxidovatelných organických sloučenin. Každé nové elektrodové uspořádání musí být testováno z hlediska uživatelské přijatelnosti, jednoduchosti výrobního postupu, dobré kompatibility s biologickými vzorky a s životním prostředím. Navíc je důležité zkontrolovat, zda voltametrická měření s novou elektrodou poskytují vysokou úroveň přesnosti a selektivity pro zamýšlené využití [1].

V této dizertační práci bylo několik typů miniaturizovaných elektrodových filmových uspořádání založených na grafitovém uhlíku či čistém zlatě testováno a charakterizováno mnoha možnými způsoby a získané výsledky byly porovnány s výsledky měření s běžně užívanými uhlíkovými a zlatými elektrodami. Jmenovitě byly testovány jednorázové měrné systémy cel složené z uhlíkových kompozitních filmových elektrod integrovaných v mikrotitrační destičce, zlaté nanostrukturované filmové elektrody naprášené na upraveném PTFE substrátu a naprašované zlaté nanostrukturované filmové elektrody s povrchem modifikovaným naroubovanými různými funkčními skupinami/substráty a byla vyhodnocena jejich praktická využitelnost.

Tato jejich praktická využitelnost byla ověřena vývojem voltametrických metod pro stanovení metabolitů katecholaminů: kyseliny homovanilové a vanilylmandlové [38]; metabolitu indolu indoxylsulfátu [9]. Stanovování těchto biomarkerů je nezbytné pro stanovení fáze onemocnění, kontrolu odpovědi lidského organismu na léčbu či pro včasnou diagnózu nádorových a jiných onemocnění [6, 7].

Získané výsledky je možné shrnout takto:

- ❖ Systém uhlíkových kompozitních elektrod (CFE) integrovaných v mikrotitrační destičce (systém měrných cel) byl shledán vhodným pro stanovení HVA a VMA v rozsahu koncentrací od 100 do 0,8 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Metoda je použitelná i pro stanovení směsi těchto látek. Nejnižší dosažená mez stanovitelnosti metodou DPV byla 0,3 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Tyto dosažené hodnoty *LOQ* byly nepatrně nižší než

hodnoty dosažené uhlíkovou pastovou elektrodou nebo elektrodou s borem dopovaným diamantem [25, 26].

- ❖ Systém integrovaných CFEs byl použit pro studium elektrochemického chování a pro citlivé stanovení indoxylsulfátu v koncentracích od 50 do 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Dosažená mez stanovitelnosti byla 0,7 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Uhlíková pastová elektroda dosáhla meze stanovitelnosti 1,7 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Tyto meze stanovitelnosti jsou srovnatelné s mezemi dosaženými s HPLC/ED [39].
- ❖ Praktická použitelnost systému a nově vyvinuté voltametrické metody byly ověřeny spojením s extrakcí indoxylsulfátu na tuhé fázi (SPE) z matrice lidské moči. Nicméně SPE nebyla úspěšná, jelikož všechny interferenty z moči nebyly od analytu separovány.
- ❖ Tento systém integrovaných CFEs určený pro screeningové měření nabízí levnou, nezávislou a vhodnou alternativu k častěji používaným spektrometrickým detektorům. Díky své snadné přenosnosti tento systém nabízí možnost jednoduchého *in-situ* měření v malých objemech vzorku.
- ❖ Zlaté nanostrukturované filmové elektrody (GNFEs, 80 nm tloušťka) naprášené na třech typech upraveného PTFE byly elektrochemicky charakterizovány a byla ověřena jejich aplikovatelnost coby jednorázových elektrochemických senzorů.
- ❖ Všechny GNFEs poskytly přijatelné elektrochemické parametry srovnatelné s parametry zlaté „bulk“ elektrody. Bylo pozorováno, že díky naprašování atomů zlata na upravený PTFE došlo k nárůstu proudové odezvy z důvodu zvětšeného (zdrsněného) aktivního povrchu elektrody.
- ❖ GNFEs naprášené na PTFE substrátu byly použity pro studium elektrochemického chování a pro stanovení hydrochinonu v koncentracích od 100 do 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Dosažené meze stanovitelnosti hydrochinonu byly 4,3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro GNFE-Pristine, 4,2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro GNFE-Plasma a 9,0 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro GNFE-BPD, respektive. GNFEs s vyvinutou metodou neposkytují dostatečné výsledky a citlivost při porovnání s ostatními voltametrickými stanoveními hydrochinonu na různých typech nanostrukturovaných zlatých elektrod a zlaté „bulk“ elektrodě.

- ❖ Nicméně, GNFEs naprášené na PTFE substrátu nabízí jisté výhody jako například: potřeba pouze malého množství vzorku, snadná miniaturizace a kompatibilita přípravy elektrod s konceptem „zelené analytické chemie“.
- ❖ Byly vyhodnoceny základní elektrochemické parametry naprašovaných modifikovaných zlatých nanostrukturovaných elektrod s naroubovaným termocitlivým polymerem pNIPAAm (GNFE-pNIPAAm, tloušťka 10 nm) na povrchu.
- ❖ Bylo pozorováno, že na povrchu GNFE-pNIPAAm je možné zachytit a akumulovat molekuly hexakynoželeznatanu, což vedlo k nárůstu citlivosti stanovení.
- ❖ Měřením základních elektrochemických parametrů naprašovaných modifikovaných zlatých nanostrukturovaných elektrod (tloušťka 10 nm) s naroubovanými $-\text{NO}_2$, $-\text{C}_8\text{F}_{17}$ funkčními skupinami na povrchu bylo zjištěno, že vynucené roubování pod zvolenými potenciály způsobí úplnou blokaci elektrodového povrchu a vymizení signálu testovaných látek.
- ❖ V případě GNFEs- C_xH_n (tloušťka 10 nm) bylo potvrzeno, že roubování alkylových řetězců může způsobit blokaci povrchu zlaté vrstvy, rozsah blokace je však závislý na jejich délce. Nicméně změnou rozpouštědla na směsné vodně-methanolickém prostředí dojde k odhalení míst, kde jsou organické řetězce nerovnoměrně uspořádané a nedostatečně ohnuté k blokaci elektrodového povrchu a elektrodový povrch je tím zpřístupněn pro elektrodovou reakci.

6. Literatura

- [1] Barek J., Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B., Zima J., Nontraditional Electrode Materials in Environmental Analysis of Biologically Active Organic Compounds, *Electroanalysis*, 19 (2007) 2003-2014.
- [2] Navratil T., Composite Solid Electrodes - Tool for Organic Electrochemistry, *Current Organic Chemistry*, 15 (2011) 2996-3013.
- [3] Siegel J., Lyutakov O., Rybka V., Kolska Z., Svorcik V., Properties of Gold Nanostructures Sputtered on Glass, *Nanoscale Research Letters*, 6 (2011).
- [4] Wang J., Analytical Electrochemistry, 3rd ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2006.
- [5] Durantou F., Cohen G., De Smet R., Rodriguez M., Jankowski J., Vanholder R., Argiles A., European Uremic Toxin Work G., Normal and Pathologic Concentrations of Uremic Toxins, *Journal of the American Society of Nephrology*, 23 (2012) 1258-1270.
- [6] Daniel D., Lalitha R.M., Tumor Markers - a Bird's Eye View, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery Medicine and Pathology*, 28 (2016) 475-480.
- [7] Basuyau J.P., Leroy M., Brunelle P., Determination of Tumor Markers in Serum. Pitfalls and Good Practice, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 39 (2001) 1227-1233.
- [8] Matsuo M., Tasaki R., Kodama H., Hamasaki Y., Screening for Menkes Disease Using the Urine HVA/VMA Ratio, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28 (2005) 89-93.
- [9] Cassani E., Barichella M., Canello R., Cavanna F., Iorio L., Cereda E., Bolliri C., Maria P.Z., Bianchi F., Cestaro B., Pezzoli G., Increased Urinary Indoxyl Sulfate (Indican): New Insights into Gut Dysbiosis in Parkinson's Disease, *Parkinsonism & Related Disorders*, 21 (2015) 389-393.
- [10] LeWitt P., Schultz L., Auinger P., Lu M., Parkinson Study Grp D., Csf Xanthine, Homovanillic Acid, and Their Ratio as Biomarkers of Parkinson's Disease, *Brain Research*, 1408 (2011) 88-97.
- [11] Suzuki E., Kanba S., Nibuya M., Adachi S., Sekiya U., Shintani F., Kinoshita N., Yagi G., Asai M., Longitudinal Changes in Symptoms and Plasma Homovanillic Acid Levels in Chronically Medicated Schizophrenic Patients, *Biological Psychiatry*, 36 (1994) 654-661.
- [12] Flottmann D., Hins J., Rettenmaier C., Schnell N., Kuci Z., Merkel G., Seitz G., Bruchelt G., Two-Dimensional Isotachopheresis for the Analysis of Homovanillic Acid and Vanillylmandelic Acid in Urine for Cancer Therapy Monitoring, *Microchimica Acta*, 154 (2006) 49-53.
- [13] Ellis R.J., Small D.M., Vesey D.A., Johnson D.W., Francis R., Vitetta L., Gobe G.C., Morais C., Indoxyl Sulphate and Kidney Disease: Causes, Consequences and Interventions, *Nephrology*, 21 (2016) 170-177.
- [14] Niwa T., Uremic Toxicity of Indoxyl Sulfate, *Nagoya Journal of Medical Science*, 72 (2010) 1-11.
- [15] Libansky M., Zima J., Barek J., Dejmekova H., Construction of an Electrochemical Cell System Based on Carbon Composite Film Electrodes and Its Application for Voltammetric Determination of Triclosan, *Electroanalysis*, 26 (2014) 1920-1927.
- [16] Reznickova A., Kolska Z., Hnatowicz V., Svorcik V., Nano-Structuring of PTFE Surface by Plasma Treatment, Etching, and Sputtering with Gold, *Journal of Nanoparticle Research*, 13 (2011) 2929-2938.
- [17] Libansky M., Zima J., Barek J., Dejmekova H., Voltammetric Determination of Homovanillic Acid and Vanillylmandelic Acid on a Disposable Electrochemical Measuring Cell System with Integrated Carbon Composite Film Electrodes, *Monatshefte Fur Chemie*, 147 (2016) 89-96.
- [18] Bergerova M., Libansky M., Dejmekova H., Determination of Urinary Indican on Carbon Film Composite Electrode and Carbon Paste Electrode, *Current Analytical Chemistry*, Submitted (2017).
- [19] Libansky M., Zima J., Barek J., Reznickova A., Svorcik V., Dejmekova H., Basic Electrochemical Properties of Sputtered Nanostructured Gold Film Electrodes, *Electrochimica acta*, Submitted (2017).
- [20] Guselnikova O., Postnikov P., Kalachyova Y., Libansky M., Zima J., Kolska Z., Svorcik V., Lyutakov O., Large-Scale Ultrasensitive, Highly Reproducible and Regenerative Smart SERS Platform Based on Pnipam Grafted Gold Grating, *ChemNanoMat*, 3 (2016) 135-144.
- [21] Guselnikova O., Postnikov P., Elashnikov R., Trusova M., Kalachyova Y., Libansky M., Barek J., Kolska Z., Svorcik V., Lyutakov O., Surface Modification of Au and Ag Plasmonic Thin Films Via

- Diazonium Chemistry: Evaluation of Structure and Properties, *Colloids and Surfaces A Physicochemical Engineering Aspects*, In Press (2016).
- [22] Guselnikova O., Kalachyova Y., Faragova K., Libansky M., Dejmekova H., Svorcik V., Sajdl P., Lyutakov O., Functional Spp-Based Sers Sensor Platform for Lipoproteins Detection, *Talanta*, Prepared for submission (2017).
- [23] Inczedy J., Compendium of Analytical Nomenclature (Definitive Rules 1997), Blackwell Science, Santa Fe, 1998.
- [24] Blanco-Lopez M.C., Lobo-Castanon M.J., Ordieres A.J.M., Tunon-Blanco P., Electrochemical Behavior of Catecholamines and Related Compounds at in Situ Surfactant Modified Carbon Paste Electrodes, *Electroanalysis*, 19 (2007) 207-213.
- [25] Adamkova H., Determination of Tumor Markers Using Carbon Paste Electrode, Charles University, Prague, 2016.
- [26] Baluchova S., Voltammetric Determination of Clinical Markers Vanillylmandelic and Homovanillic Acid at Boron-Doped Diamond Electrode, Charles University, Prague, 2015.
- [27] Garcia A., Heinanen M., Jimenez L.M., Barbas C., Direct Measurement of Homovanillic, Vanillylmandelic and 5-Hydroxyindoleacetic Acids in Urine by Capillary Electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 871 (2000) 341-350.
- [28] Siren H., Mielonen M., Herlevi M., Capillary Electrophoresis in the Determination of Anionic Catecholamine Metabolites from Patients' Urine, *Journal of Chromatography A*, 1032 (2004) 289-297.
- [29] Enache T.A., Oliveira-Brett A.M., Pathways of Electrochemical Oxidation of Indolic Compounds, *Electroanalysis*, 23 (2011) 1337-1344.
- [30] Reznickova A., Kolska Z., Siegel J., Svorcik V., Grafting of Gold Nanoparticles and Nanorods on Plasma-Treated Polymers by Thiols, *Journal of Materials Science*, 47 (2012) 6297-6304.
- [31] Oesch U., Janata J., Electrochemical Study of Gold Electrodes with Anodic Oxide-Films 1. Formation on Reduction Behavior of Anodic Oxides on Gold, *Electrochimica Acta*, 28 (1983) 1237-1246.
- [32] Oesch U., Janata J., Electrochemical Study of Gold Electrodes with Anodic Oxide-Films 2. Inhibitor of Electrochemical Redox Reactions by Monolayers of Surface Oxides, *Electrochimica Acta*, 28 (1983) 1247-1253.
- [33] Adams R.N., *Electrochemistry at Solid Electrodes*, Marcel Dekker Inc., New York, 1969.
- [34] Compton R.G., Banks C.E., *Understanding Voltammetry* 2nd Edition, Imperial College Press, London, 2011.
- [35] Hu S., Wang Y.H., Wang X.Z., Xu L., Xiang J., Sun W., Electrochemical Detection of Hydroquinone with a Gold Nanoparticle and Graphene Modified Carbon Ionic Liquid Electrode, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 168 (2012) 27-33.
- [36] Ma X.M., Liu Z.N., Qiu C.C., Chen T., Ma H.Y., Simultaneous Determination of Hydroquinone and Catechol Based on Glassy Carbon Electrode Modified with Gold-Graphene Nanocomposite, *Microchimica Acta*, 180 (2013) 461-468.
- [37] Zheng Y.H., Soeriyadi A.H., Rosa L., Ng S.H., Bach U., Gooding J.J., Reversible Gating of Smart Plasmonic Molecular Traps Using Thermoresponsive Polymers for Single-Molecule Detection, *Nature Communications*, 6 (2015).
- [38] Eisenhofer G., Kopin I.J., Goldstein D.S., Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine, *Pharmacological Reviews*, 56 (2004) 331-349.
- [39] Filik H., Avan A.A., Aydar S., Voltammetric Sensing of Uremic Toxin Indoxyl Sulfate Using High Performance Disposable Screen-Printed Graphene Electrode, *Current Pharmaceutical Analysis*, 12 (2016) 36-42.

7. Curriculum Vitae

Mgr. Milan Libánský

Osobní údaje

- Datum narození: 25. 1. 1989
- Národnost: Česká republika
- Trvalé bydliště: Grafická 958/37, Praha 5-Smíchov, CZ-15000
- Mobilní telefon: 728 409 538
- E-mail: libansky.milan@gmail.com

Vzdělání

2013 – dosud Univerzita Karlova (Praha, ČR)

- Postgraduální studium oboru „Analytická chemie“ na PřF.

2011 – 2013 Univerzita Karlova (Praha, ČR)

- Navazující magisterské studium oboru „Analytická chemie“ na PřF.

2008 – 2011 Univerzita Karlova (Praha, ČR)

- Bakalářské studium oboru „Klinická a toxikologická analýza“ na PřF.

Praxe

2011 – 2013 ALS Laboratory group (Praha, ČR)

- Vědecký pracovník se zaměřením na iontovou chromatografii

2014 – 2016 Univerzita Karlova (Praha, ČR)

- Vědecký pracovník (Katedra analytické chemie, PřF)

2013 – dosud Univerzita Karlova (Praha, ČR)

- Pedagogická praxe (Katedra analytické chemie, PřF)

Odborné vedení:

- *Vedení středoškolské praxe 2013 až 2016 (student Michal Kroc, Adéla Zárybnická, Pavlína Šimonová a Anna Kroiherová)*

- *Pokročilé praktikum z analytické chemie (LS 2014, ZS 2014)*

Ocenění

2013 – 1. Místo za konferenční příspěvek v 16. Ročníku Československé soutěže o cenu firmy MERCK v oboru analytická chemie

2011 – 2. Místo v mezinárodní soutěži o nejlepší konferenční příspěvek v oboru analytická chemie v rámci 13. Študentské vědecké konference v Bratislavě

Absolvované stáže, vzdělávací kurzy a certifikáty

2015 – FCE – First certificate in English, Cambridge Institute

2014 – TrainMic certifikát: Training in metrology in chemistry (EUROPEAN COMMISSION, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements)

2013 – iPerasmus (Erasmus intensive programme) - Environmental Remediation And Energy Production Technologies (Instituto politécnico de Portalegre, Portalegre, Portugal)

Ostatní údaje, kvalifikace a aktivity

- Jazykové znalosti
 - Český jazyk (mateřský jazyk)
 - Anglický jazyk (úroveň B2 - FCE)
- Práce s PC (MS Word, MS Excel, MS Power point, Web of Science, Origin, EndNote, LIMS, Chromeleon, PSTRace)
- Člen České společnosti chemické (2013-2016)

8. Seznam publikací, přednášek a plakátových prezentací

A) Závěrečné práce

1. **Libansky M.**, *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova, Praha 2011: Stanovení arbutinu na uhlíkové pastové elektrodě.
2. **Libansky M.**, *Diplomová práce*, Univerzita Karlova, Praha 2013: Konstrukce měřící cely s elektrodou na bázi uhlíkového filmu.

B) Články a kapitoly v knihách

1. **Libánský M.**, Zima J., Barek J., Dejmková H., Voltammetric Determination of Arbutin on Carbon Paste Electrode, Kapitola v knize *Sensing in Electroanalysis 6*, University of Pardubice Press: Pardubice, 2011, 281-287.
2. **Libánský M.**, Zima J., Barek J., Dejmková H., Voltametrické stanovení triclosanu pomocí systému měrných cel s integrovanou uhlíkovou elektrodou, *Chemické Listy*, 107 (2013) 247-252.
3. **Libánský M.**, Zima J., Barek J., Dejmková H., Voltametrické stanovení triclosanu pomocí systému jednorázových měrných cel s integrovanou uhlíkovou elektrodou, *Chemické Listy*, 108 (2014) 243-250.
4. **Libánský M.**, Zima J., Barek J., Dejmková H., Construction of an Electrochemical Cell System Based on Carbon Composite Film Electrodes and Its Application for Voltammetric Determination of Triclosan, *Electroanalysis*, 26 (2014) 1920-1927.
5. **Libánský M.**, Zima J., Barek J., Dejmková H., Voltammetric Determination of Homovanillic Acid and Vanillylmandelic Acid on a Disposable Electrochemical Measuring Cell System with Integrated Carbon Composite Film Electrodes, *Monatshefte für Chemie*, 147 (2016) 89-96.
6. Guselnikova O., Postnikov P., Elashnikov R., Trusova M., Kalachyova Y., **Libansky M.**, Barek J., Kolska Z., Svorčík V., Lyutakov O., Surface Modification of Au and Ag Plasmonic Thin Films via Diazonium Chemistry: Evaluation of Structure and Properties, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2017 (V tisku).

7. Guselnikova O., Postnikov P., Kalachyova Y., **Libansky M.**, Zima J., Kolska Z., Švorčík V., Lyutakov O., Large-scale Ultrasensitive, Highly Reproducible and Regenerative Smart SERS Platform Based on pNIPAm Grafted Gold Grating, *ChemNanoMat*, 3 (2016) 135-144.
8. **Libánský M.**, Zima J., Berek J., Alena Řezníčková, Václav Švorčík, Dejmková H., Basic Electrochemical Properties of Sputtered Nanostructured Gold Film Electrodes, *Electrochimica Acta*, 2017 (*Podáno*).
9. Bergerová M., **Libánský M.**, Dejmková H., Determination of Urinary Indican on Carbon Film Composite Electrode and Carbon Paste Electrode, *Current Analytical Chemistry*, 2017 (*Podáno*).
10. Guselnikova O., Kalachyova Y., Faragova K., **Libansky M.**, Dejmkova H., Svorcik V., Sajdl P., Lyutakov O., Functional SPP-Based SERS Sensor Platform for Lipoproteine Detection, *Talanta*, 2017 (*Připraveno k podání*).

C) Přednášky

1. **Libánský M.**, Zima J., Berek J. and Dejmková H.: Stanovení hydrochinon- β -D-glykopyranosidu na uhlíkové pastové elektrodě, *13. Studentská vědecká konference – STU, Bratislava, Slovensko (09. 11. 2011)*.
2. **Libánský M.**, Zima J., Berek J. and Dejmková H.: Voltametrické stanovení triclosanu pomocí systému měrných cel s integrovanou uhlíkovou elektrodou, *16. Celostátní soutěž o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru Analytická chemie (Cena společnosti Merck) – Brno, Česká republika (06. - 07. 02. 2013)*.
3. **Libánský M.**, Zima J., Berek J. and Dejmková H.: Construction of a Multiple Electrochemical Cell Based on Carbon Film Electrodes, *56th Joint Meeting of the Polish and Hungarian Chemical Societies – Siedlce, Polsko (16. – 20. 09. 2013)*.
4. **Libánský M.**, Zima J., Berek J., Dejmková H.: New Voltammetric Arrangements for Large Scale Monitoring of Biologically Active Compounds Based on Carbon Composite Film Electrode, *13th The Present State and Perspectives of Analytical Chemistry in Practice – Bratislava, Slovensko (01. – 03. 06. 2014)*.
5. **Libánský M.**, Zima J., Berek J., Dejmková H.: Voltammetric Determination of Homovanillic Acid on a Disposable Electrochemical Measuring Cell System with

Integrated Carbon Composite Film Electrodes, XXXV. *Moderní elektrochemické metody* – Jetřichovice u Děčína, Česká republika (18. – 22. 05. 2015).

6. **Libánský M.**, Zima J., Barek J., Dejmková H.: Gold Film and Carbon Composite Film Electrodes for Voltammetric Determination of Oxidizable Organic Compounds, 14th *The Present State and Perspectives of Analytical Chemistry in Practice* – Bratislava, Slovensko (03. – 06. 05. 2016).

D) Plakátové prezentace

1. **Libánský M.**, Zima J., Barek J., Dejmková H.: New Voltammetric Arrangements for Inexpensive Monitoring of Biomarkers Based on Carbon Composite Film Electrodes, *Euroanalysis 2015* – Bordeaux, Francie (06. – 10. 09. 2015).
2. **Libánský M.**, Zima J., Barek J., Reznickova A., Dejmková H.: Electroanalytical Applications of Grafted Nanostructured Gold Film Electrodes, 6th *EuCheMs Chemistry Congress* – Seville, Španělsko (11. – 15. 2016).

E) Patenty a užité vzory

1. Český užité vzor číslo 25415. Dejmková H., **Libánský M.**, Zima J., Barek J.: *Elektrochemická měřicí cela a soustava elektrochemických měřících cel.* 23.5.2013.
2. Český patent číslo 304176. Dejmková H., **Libánský M.**, Zima J., Barek J.: *Elektrochemická měřicí cela a soustava elektrochemických měřících cel.* 23.11.2013.
3. Český užité vzor číslo 27672. **Libánský M.**, Zima J., Barek J., Dejmková H.: *Soustava pracovních elektrod a soustava elektrochemických měřících senzorů.* 29.12.2014