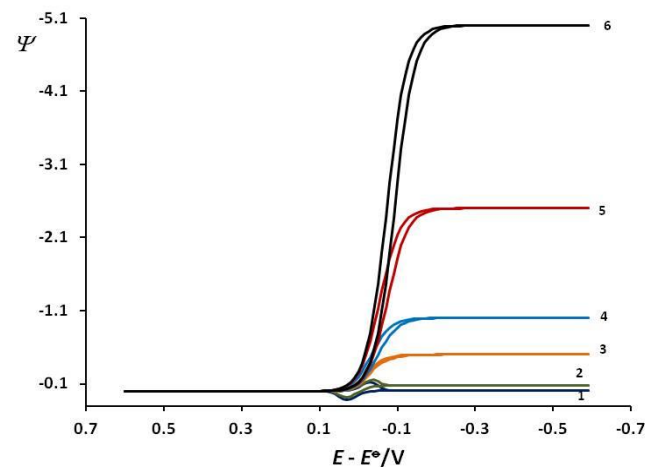
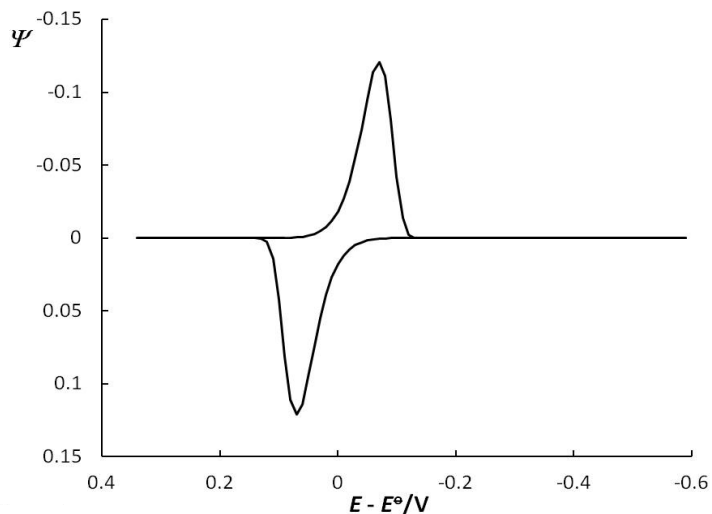
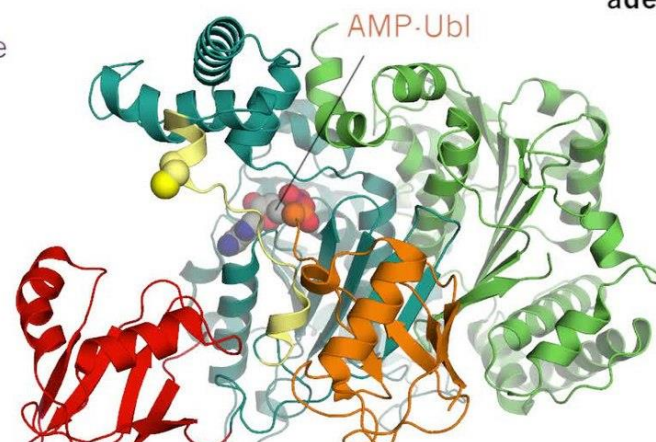


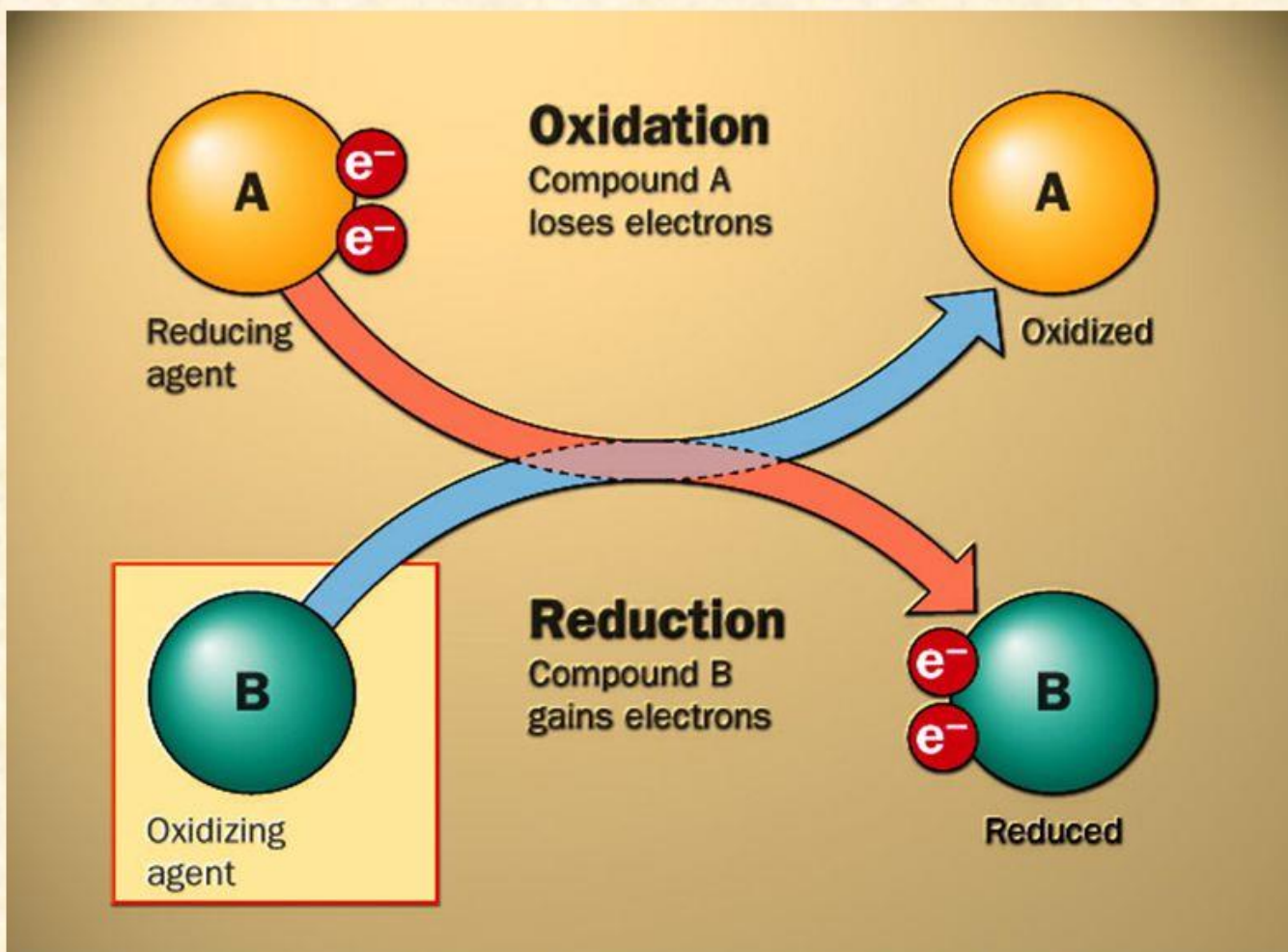


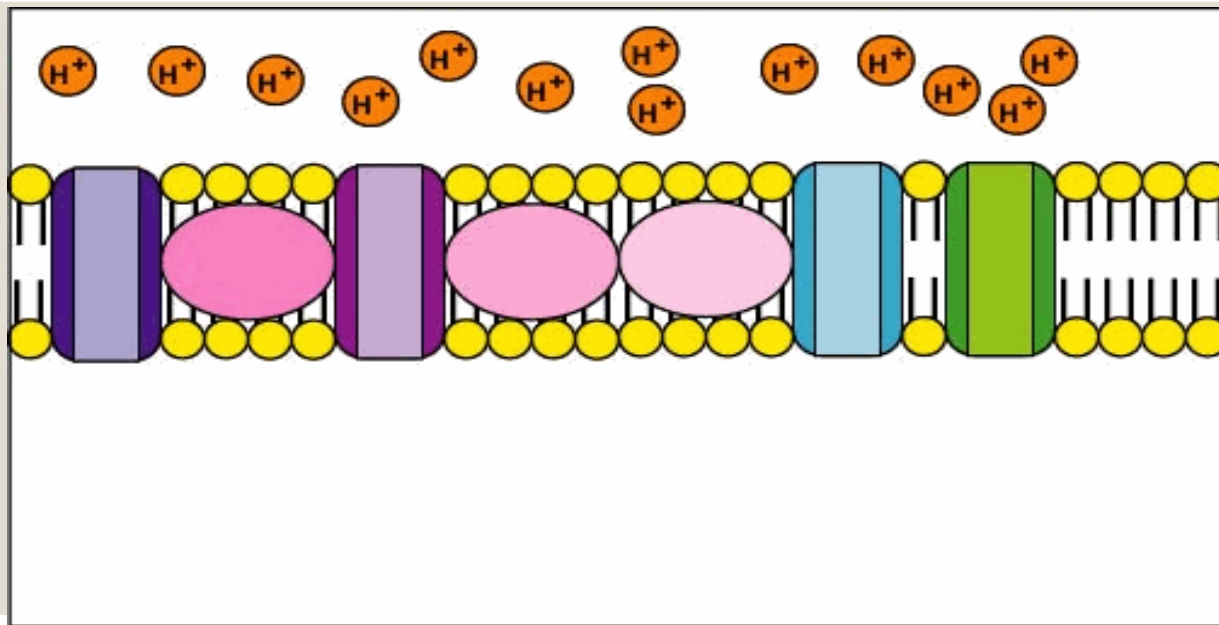
# “VOLTAMMETRY APPLICATION IN MEASURING KINETICS OF DRUG-DRUG AND THE ENZYME-SUBSTRATE INTERACTIONS“ WORKSHOP, THIRD CYCLE STUDIES UGD STIP NOV. 2019



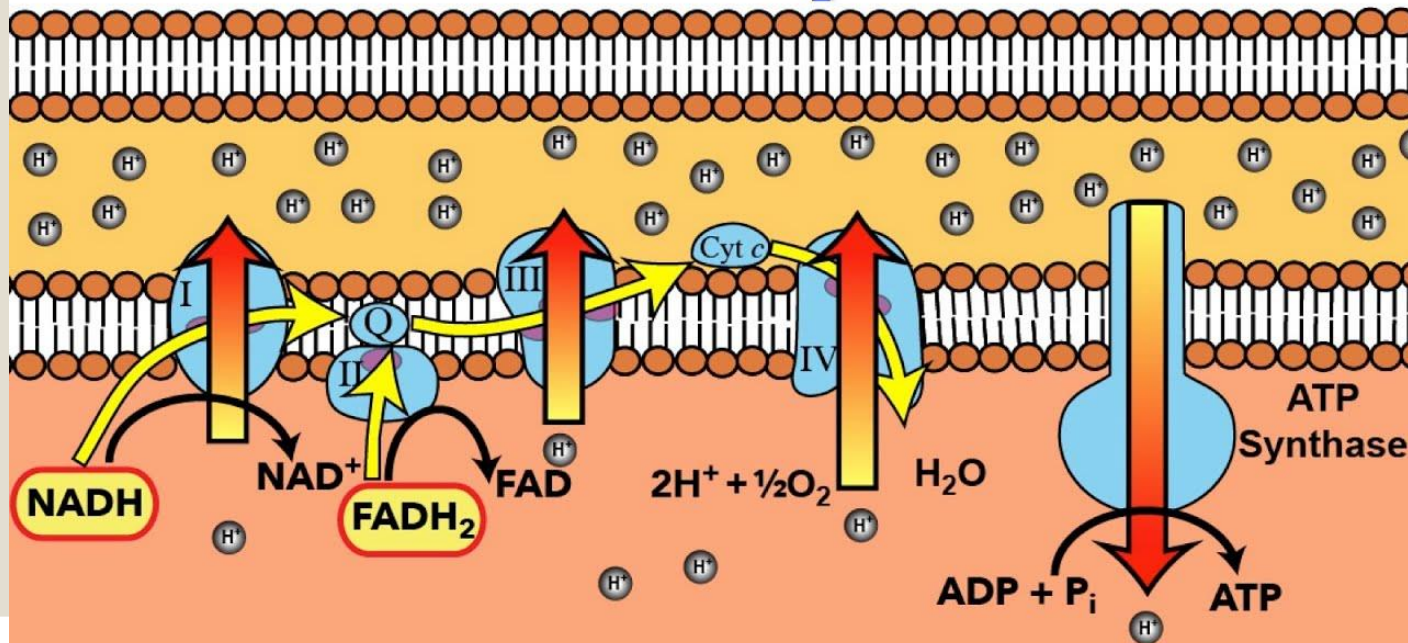
# ШТО Е ЕЛЕКТРОХЕМИЈА И ШТО Е ПРЕДМЕТ НА ИЗУЧУВАЊЕ НА ЕЛЕКТРОХЕМИЈАТА?

## Chapter 4: Oxidation – Reduction Reactions



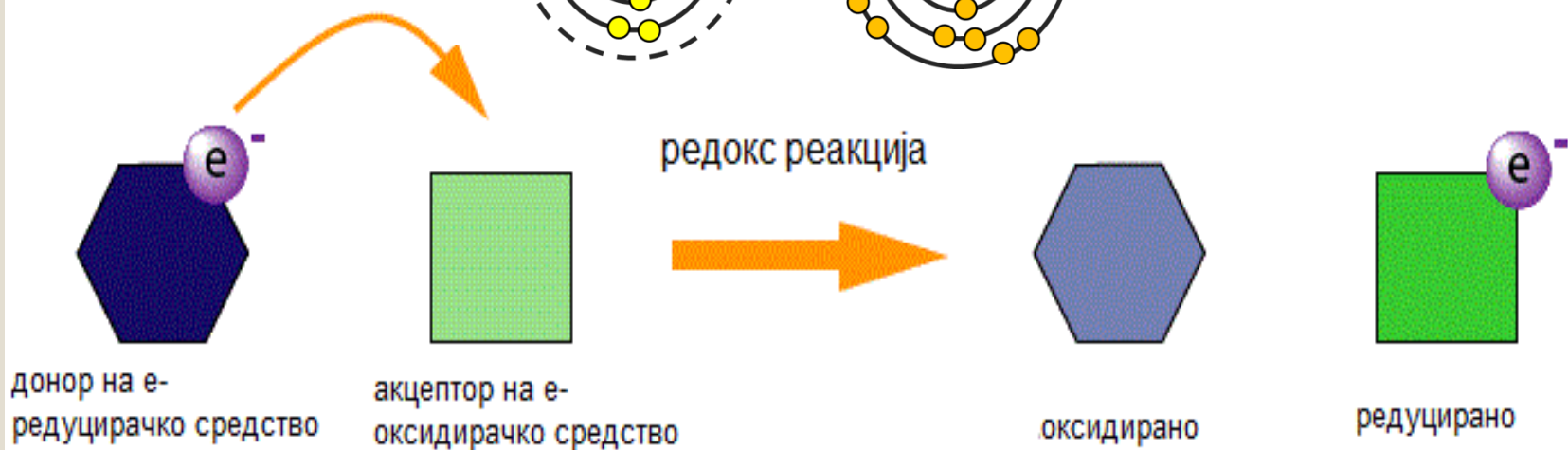
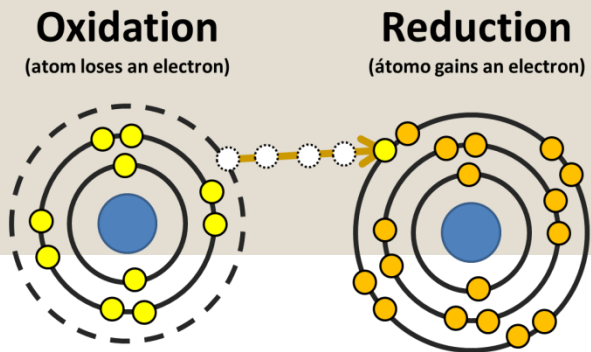


# *Electron Transport Chain*



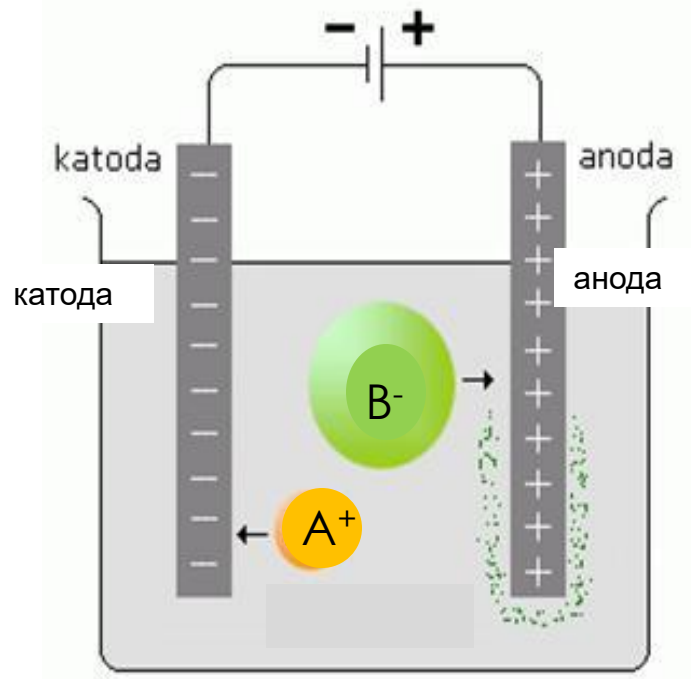
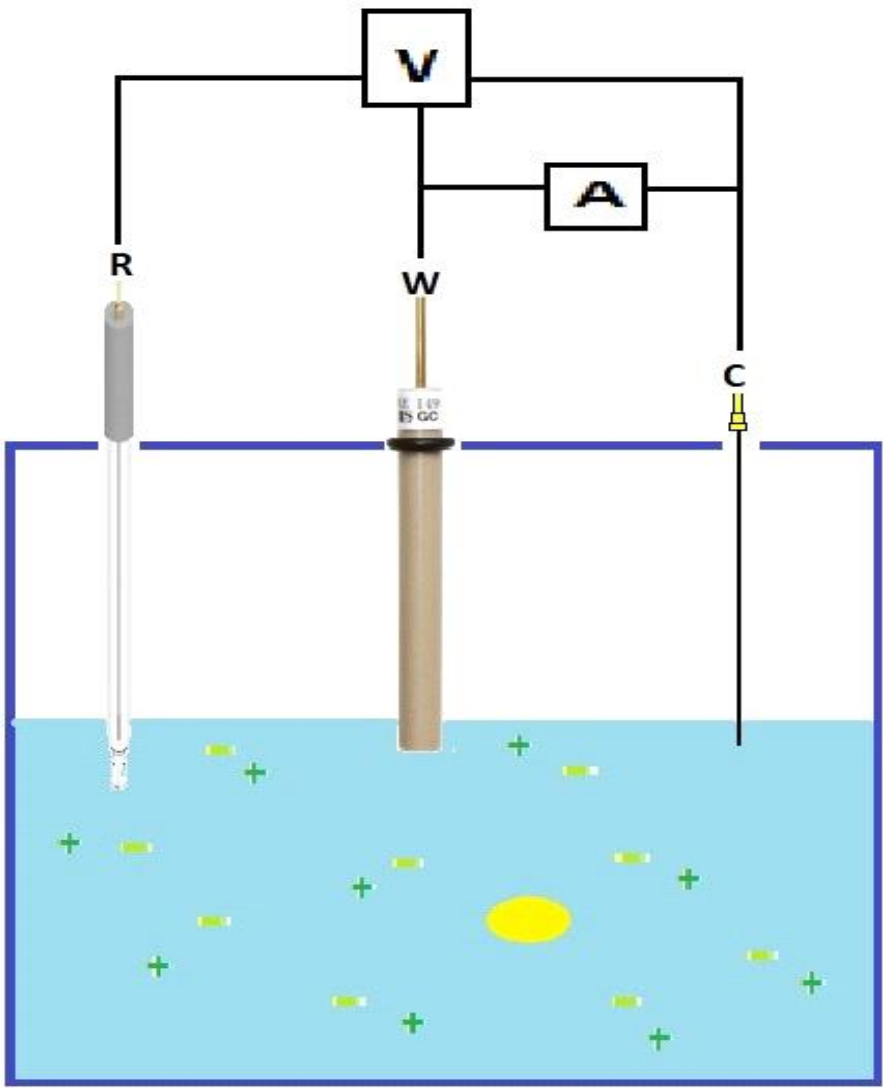


# Волтаметриски техники- потенциодинамички електрохемиски техники

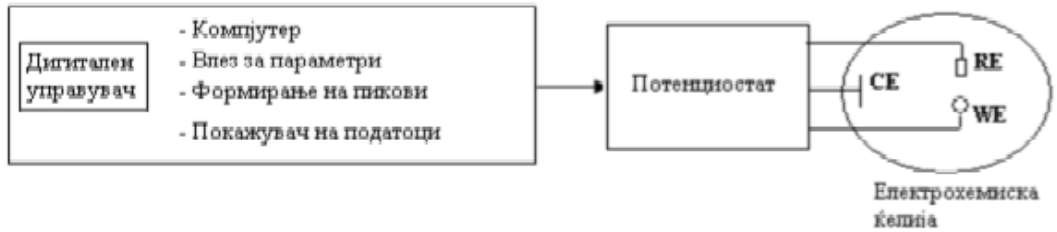


# Принцип на работа на волтаметриските техники:

**Сигнал за ексцитација:**  
 -електричен потенцијал



**Аналитички сигнал:**  
 -струја која протекува низ ќелијата во тек на редокс реакцијата



Дигитален управувач

- Компјутер
- Влез за параметри
- Формирање на пикови
- Показувач на податоци

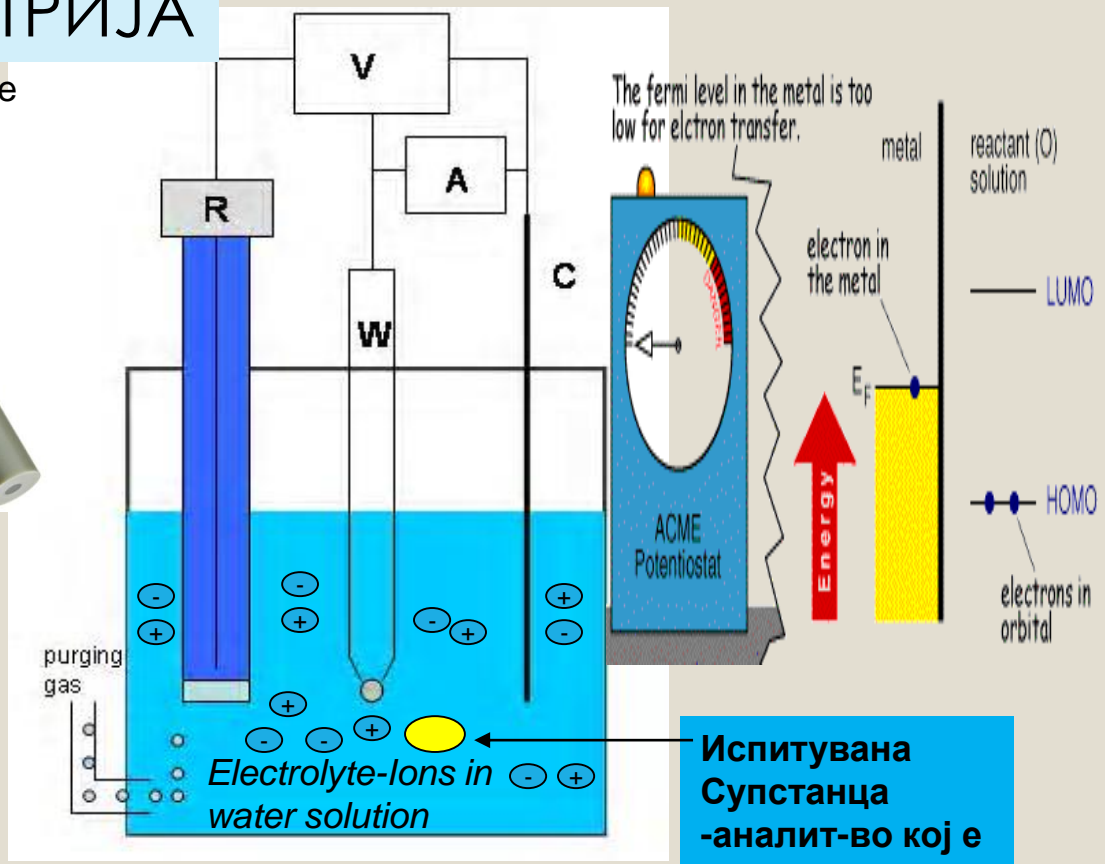
Потенциостат

Електрохемијска ќелија

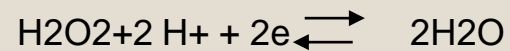
- евтини
- брзи
- разни варијанти и модификации
- осетливи во микро и милимоларна конц.S

# ВОЛТАМЕТРИЈА

W-working electrode

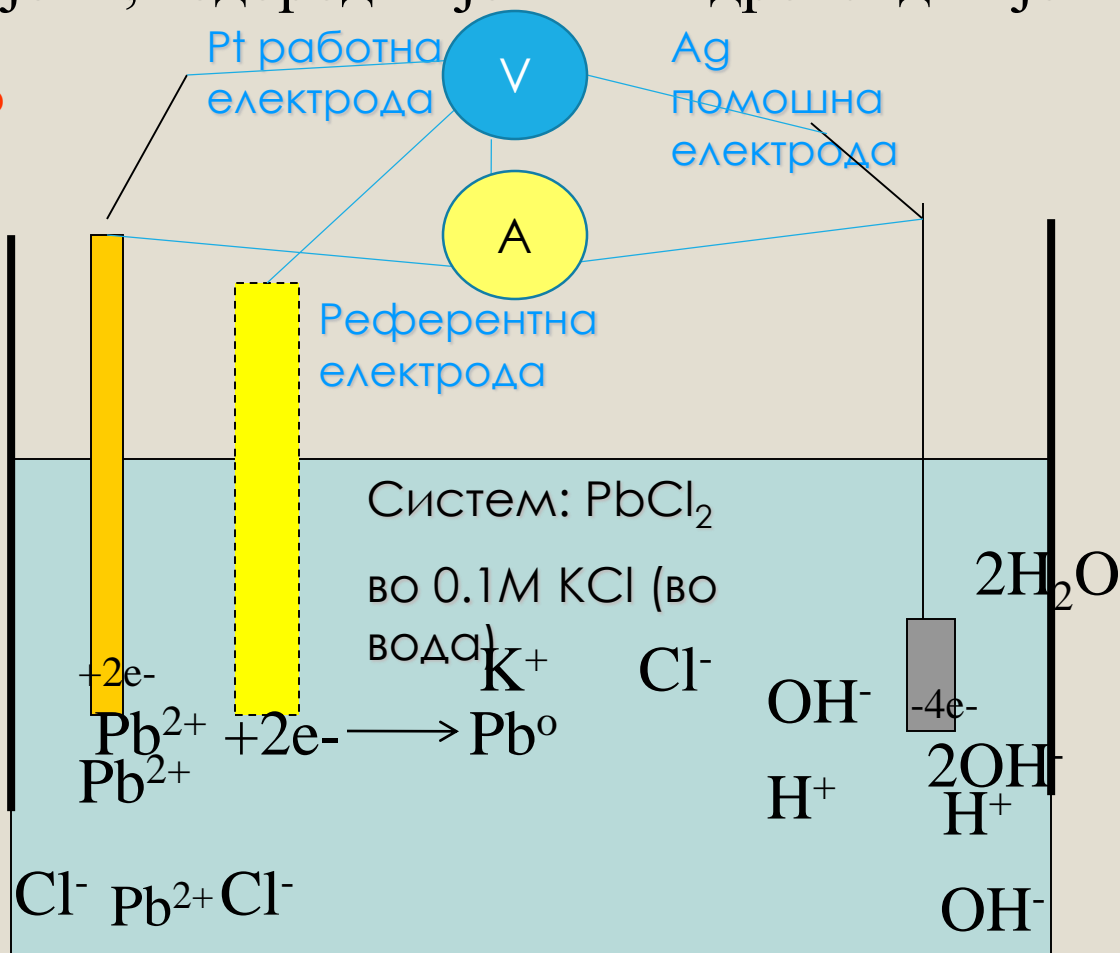


Испитувана  
Супстанца  
-аналит-во кој е  
присутен  
H2O2



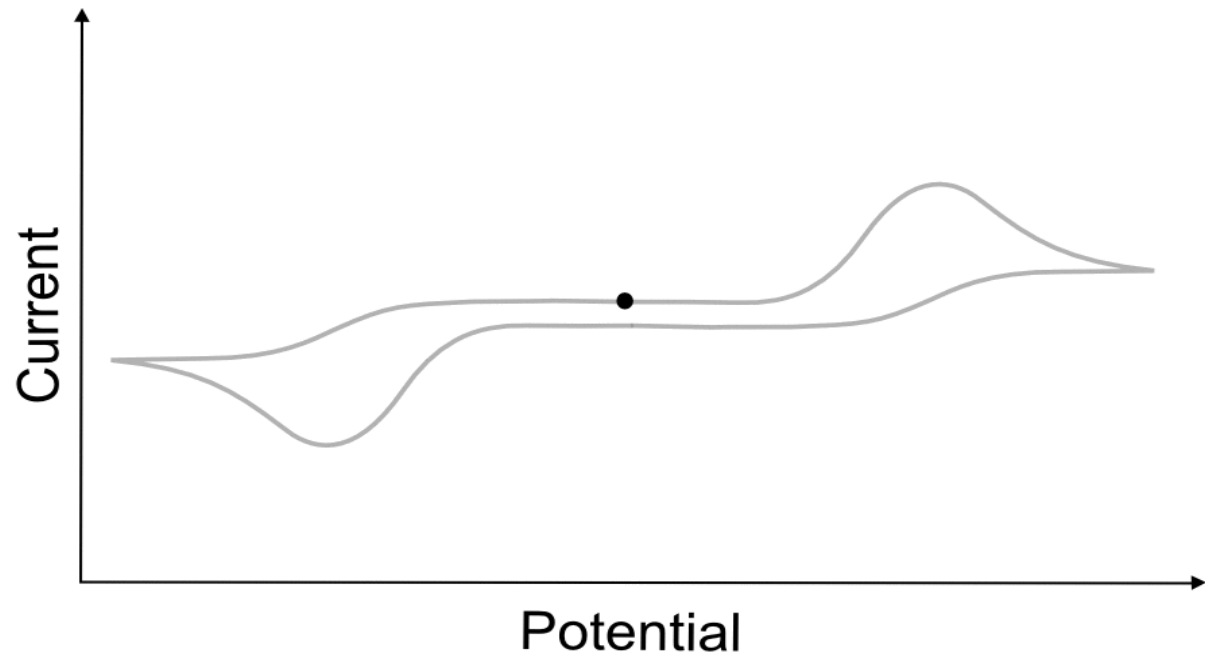
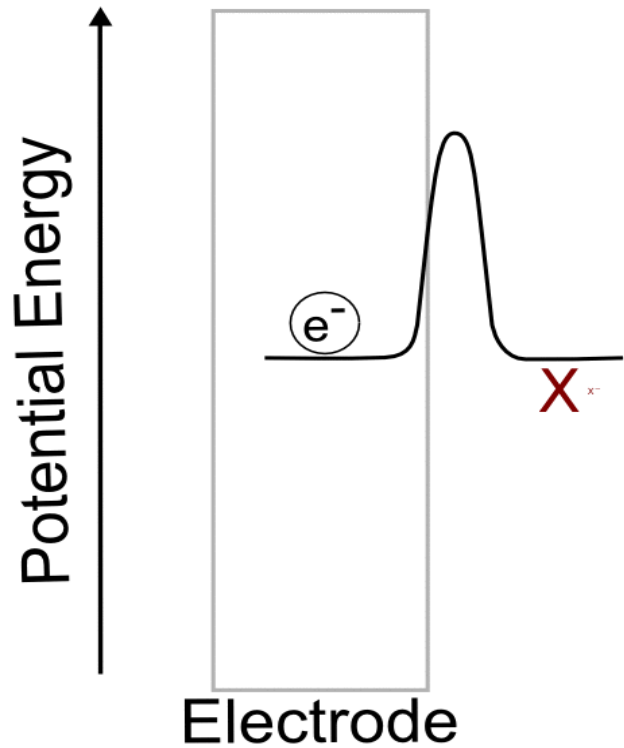
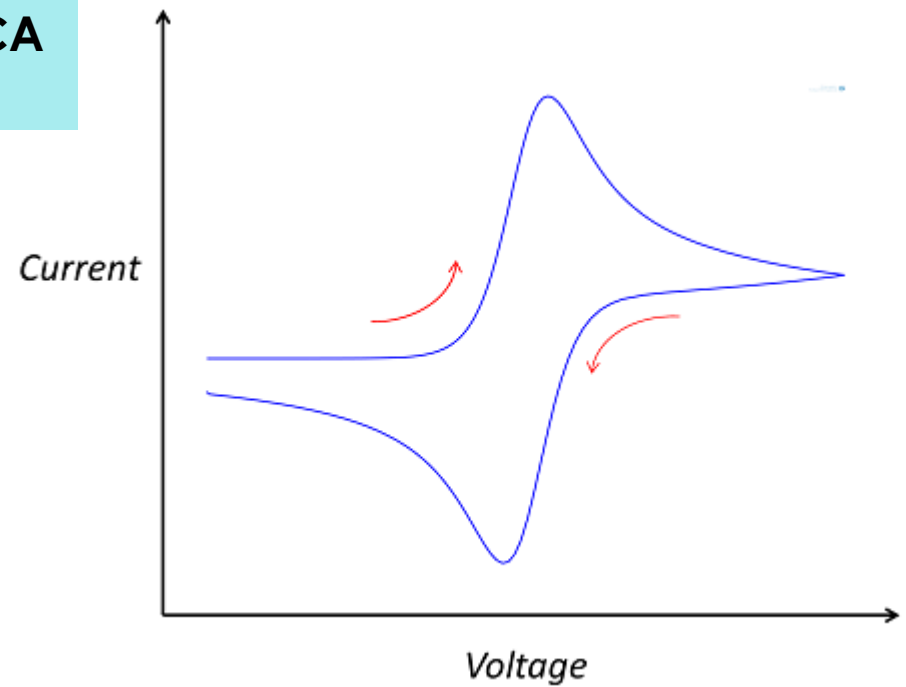
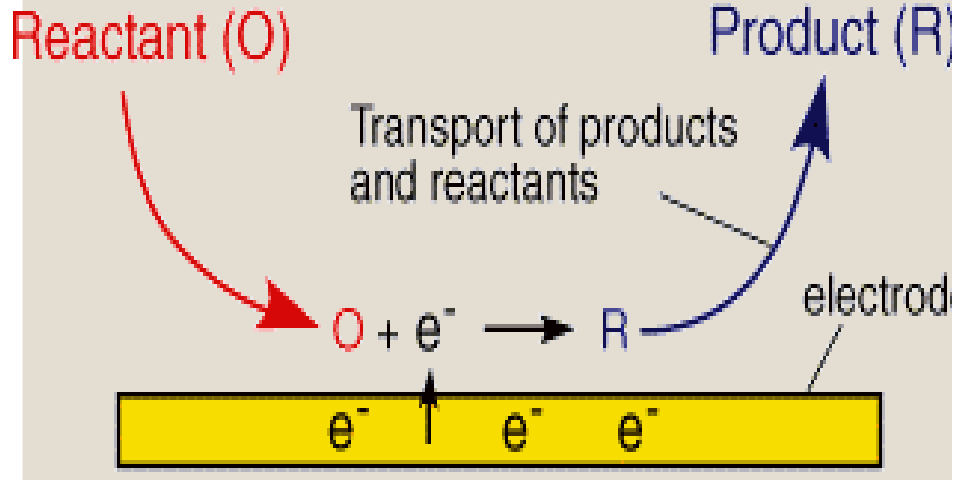
Значи во системот ќе имаме присутни оловни јони, хлоридни јони, Калиумови катјони, водородни јони и хидроксидни јони

Вкупниот полнеж во  
растворот  
МОРА да е  
НУЛА т.е.  
Растворот  
Во целина  
Е  
ЕЛЕКТРО-  
НЕУТРАЛЕН!!!



Забелешка:  $\text{H}^+$  и  $\text{OH}^-$   
доаѓаат од  
дисоцијацијата на водата

# 1. РЕАКЦИИ ВО КОИ ТРАНСФЕР НА МАСА СЕ ОДВИВА СО ДИФУЗИЈА





**Батлер-Волмерова** равенка – дава релација на струја со брзина на електронски трансфер и концентрации на аналити

$$\frac{I}{nFA} = k_s e^{-\alpha\phi} [c(Ox)_{x=0} - e^{\phi} c(Red)_{x=0}]$$

$\phi = nF(E - E^\circ) / RT$  бездимензионален потенцијал

$k_s$  константа на брзина на пренос на електрони ( $\text{cm s}^{-1}$ )

$\alpha$  коефициент на електронски трансфер

$A$  активна површина на работна електрода ( $\text{cm}^2$ )

- Контролирано нанесување
- Потенцијална разлика меѓу W и R електрода

Надворешен извор

Промена на површинска концентрација на редокс парот

- Трансфер на маса на аналит од внатрешноста на р-р кон W електрода или обратно

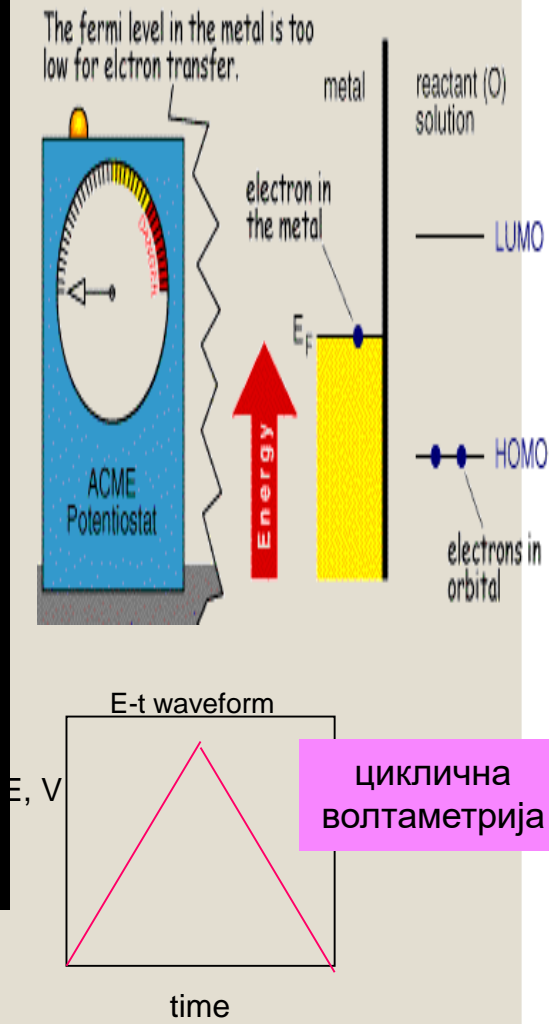
- Флукс од аналит на гранична површина електрода-електролит

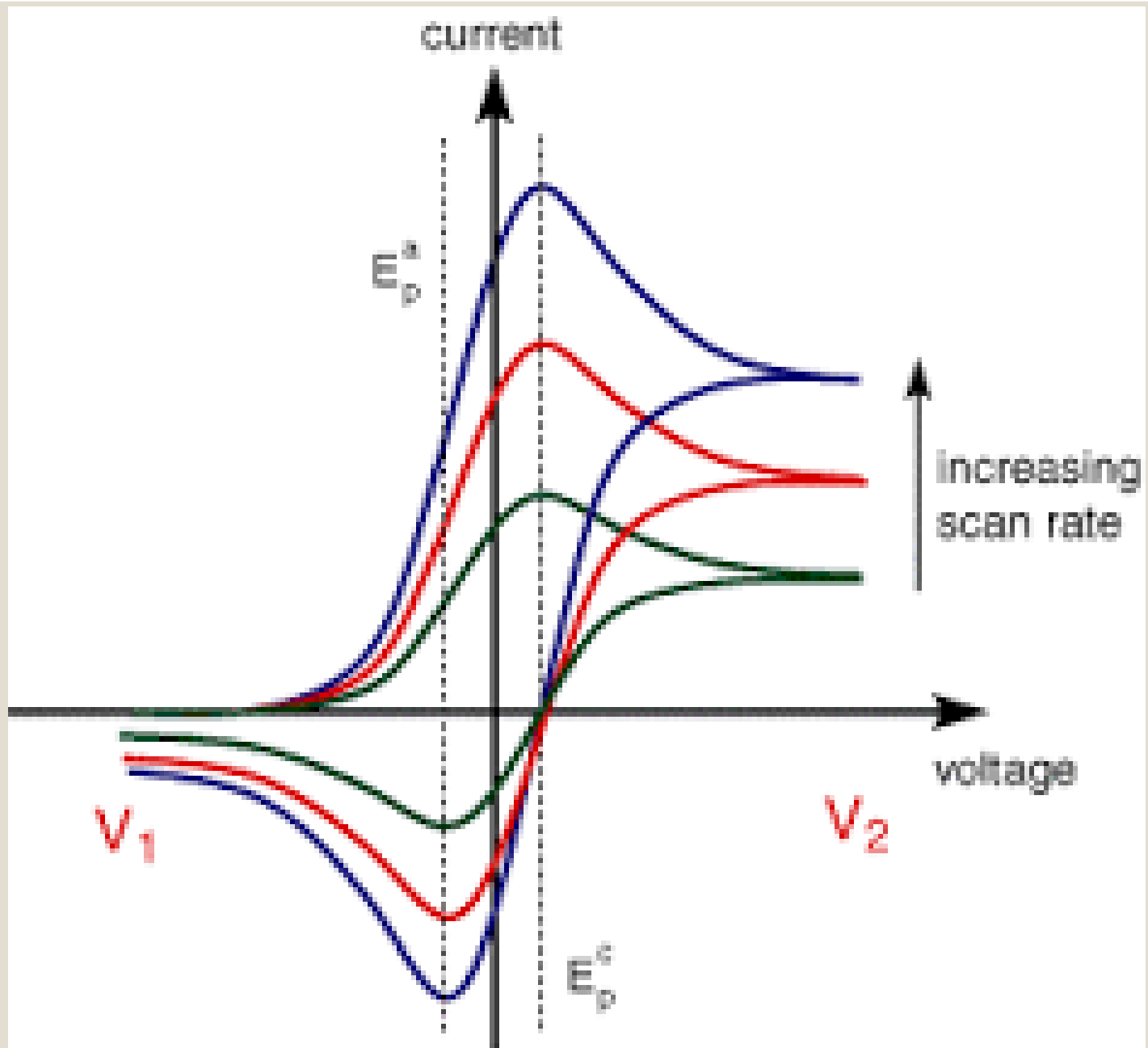
Фарадеева струја

# Cyclic voltammogram of hydroxy-ferrocene.

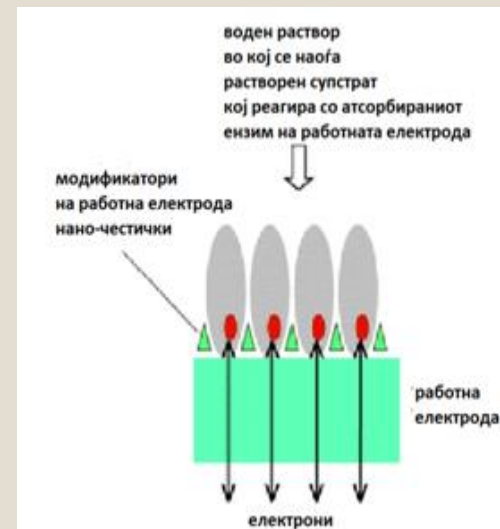
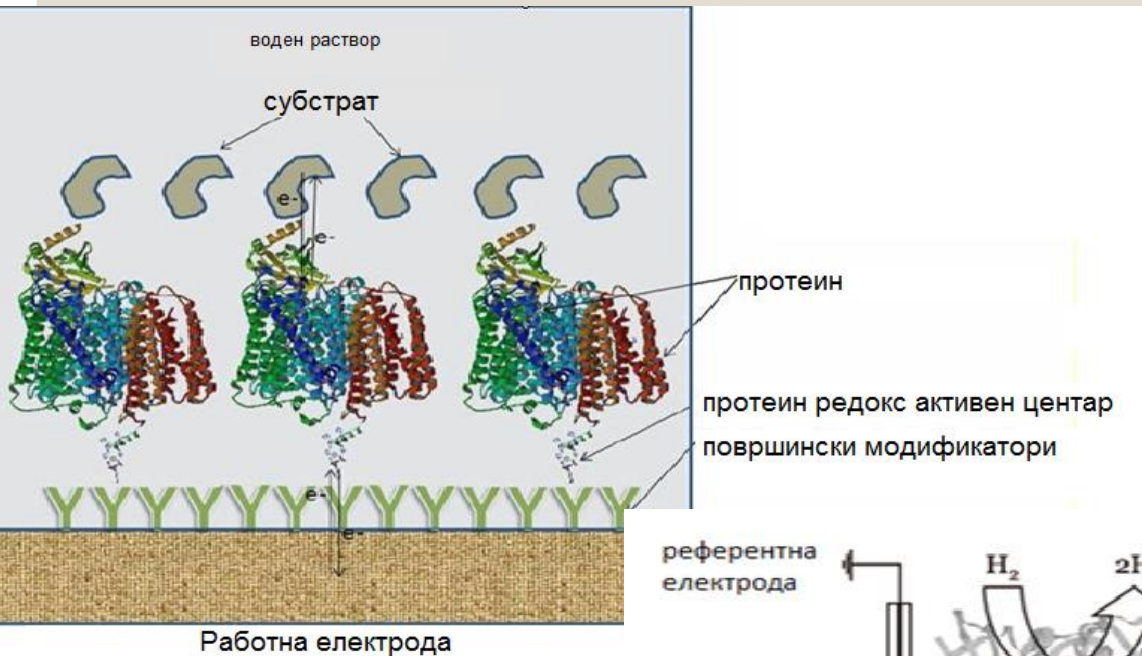


10

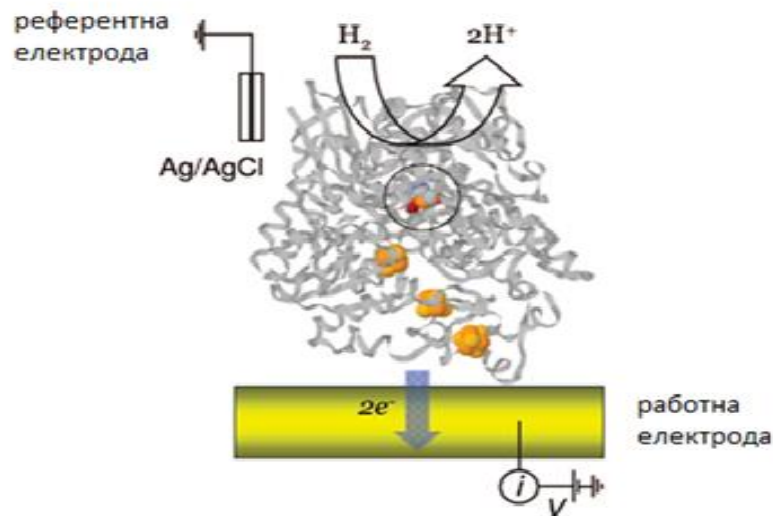




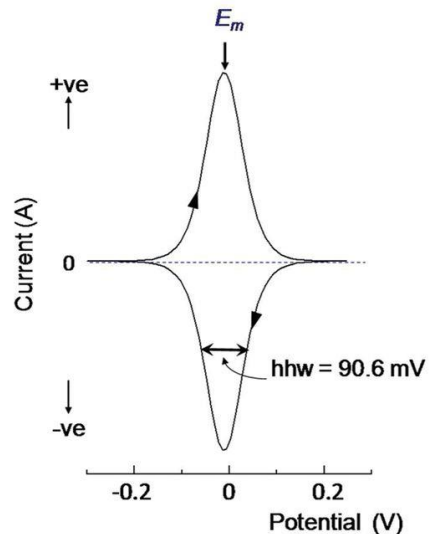
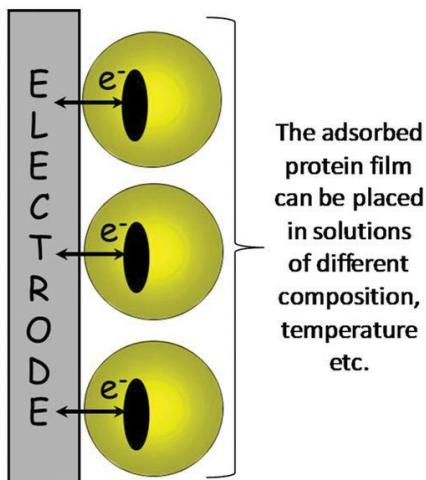
# ПОВРШИНСКИ РЕДОКС РЕАКЦИИ-И РЕАКТАНТИТЕ И ПРОДУКТИТЕ СЕ ЦВРСТО АДСОРБИРАНИ НА ПОВРШИНАТА ОД РАБОТНАТА ЕЛЕКТРОДА=ЕНЗИМСКИ РЕАКЦИИ



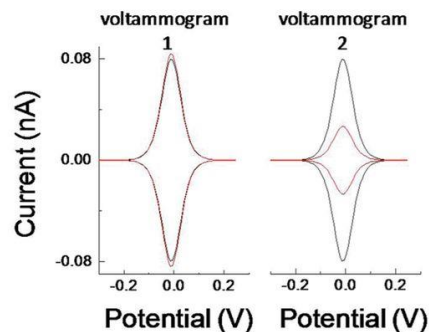
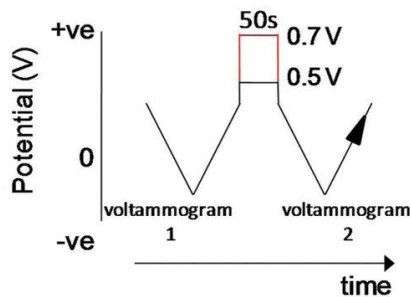
W со наночестички- за да се подобри спроводливоста помеѓу работната електрода и зимот



A



B



Доколку се аплицира циклична волтамертија како работна техника во ПФВ, може:

- да се следи механизмот на ензимско-супстрантата реакција и
- да се определат термодинамички и кинетички параметри на истата

Термодинамички параметри

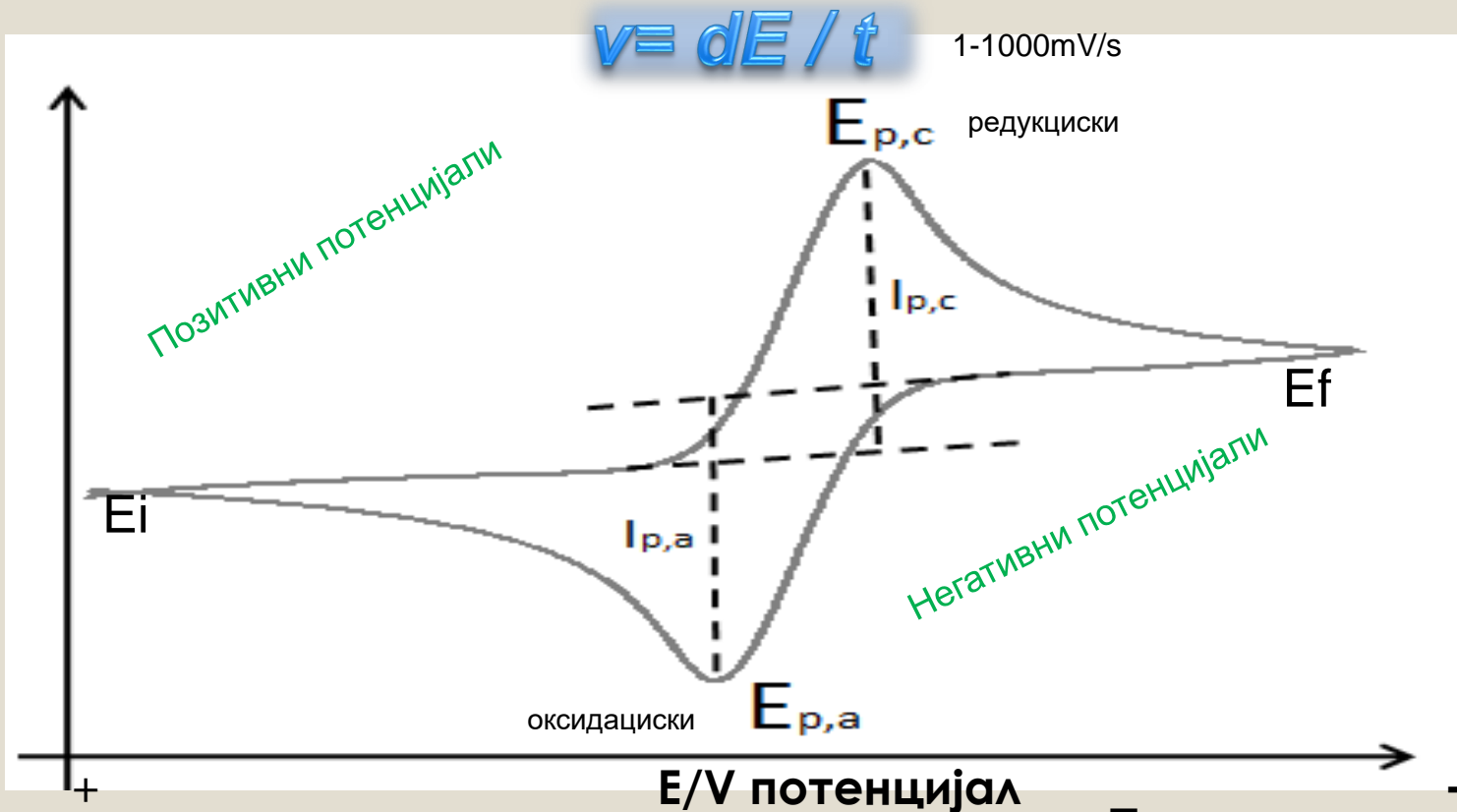
- Енергија на активација
- Енталпија.....

Кинетички параметри

- Константи на брзина на електронски трансфер
- Кинетика на хемиска реакција
- Фармакокинетички параметри.....



# Циклична волтамертија - електрохемиска спектроскопија



висината на пиковите  
(струја на пиковите)

= конц. на аналит;  
кинетиката на  
рекацијата на трансфер  
на e- од работната  
електрода до аналитот

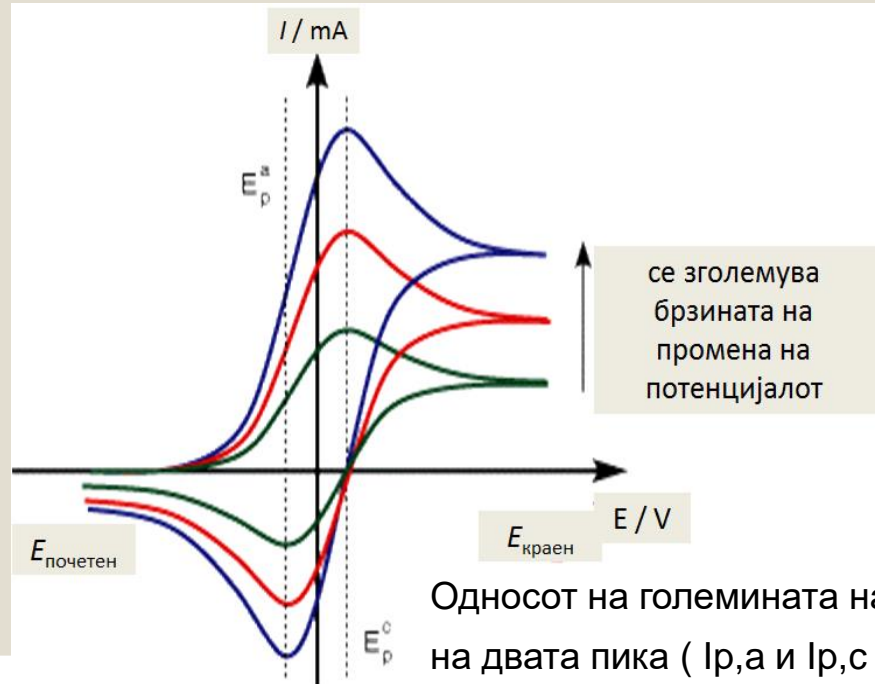
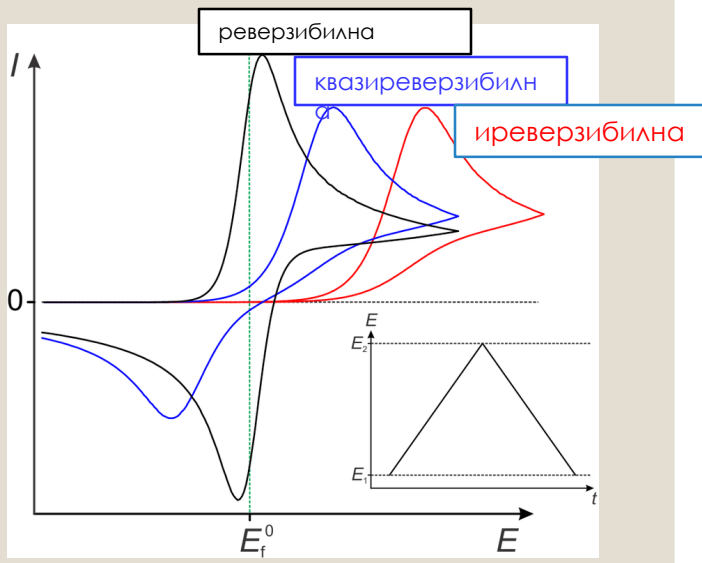
Термодинамички  
информации дава  
формалниот-полубранов  
потенцијал  $E^{f\ominus}$

$$E^{f\ominus} = \frac{E_{p,c} + E_{p,a}}{2}$$

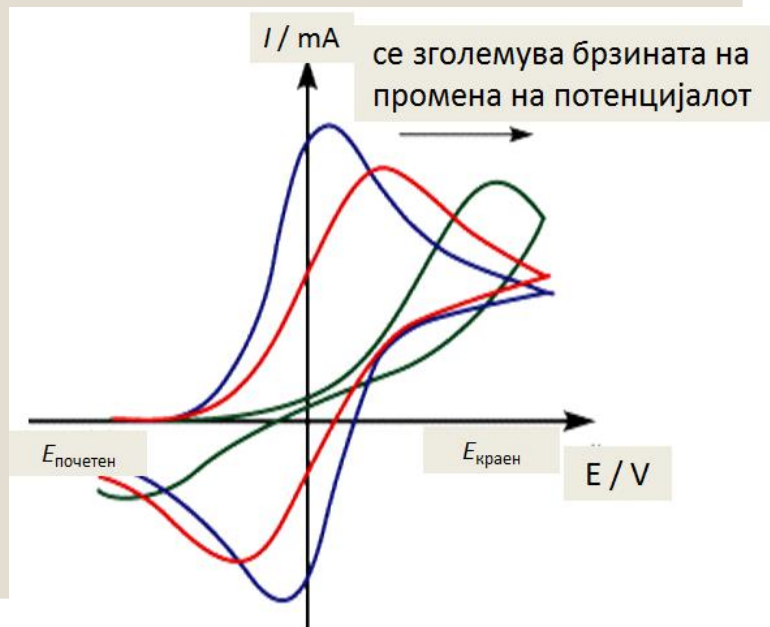
**Електрохемиски реверзибилна реакција** → брзината на трансфер на е<sup>-</sup> е многу голема

$$V[\text{редукција, Ox} \rightarrow \text{Red}] = V[\text{реоксидација, Red} \rightarrow \text{Ox}]$$

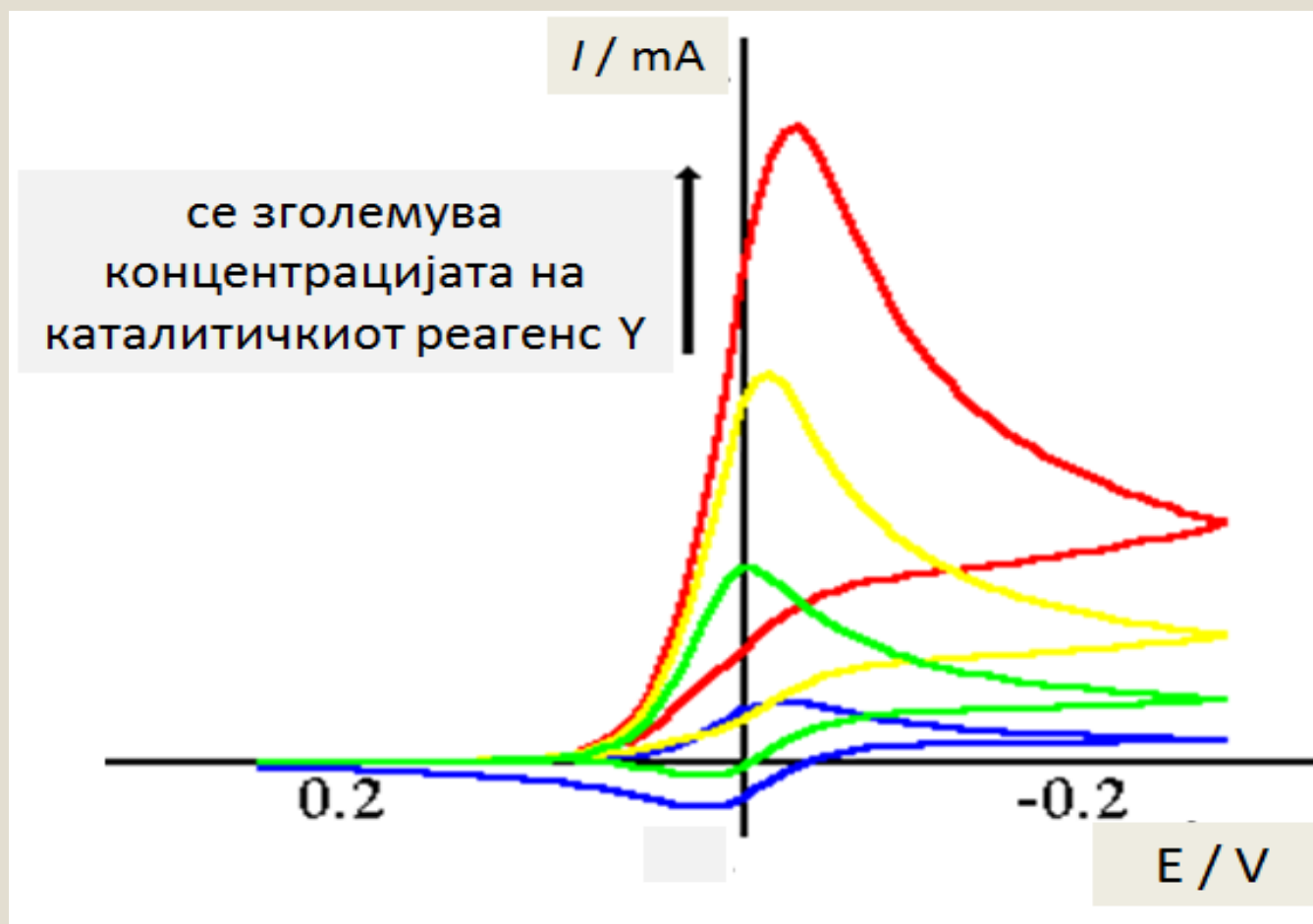
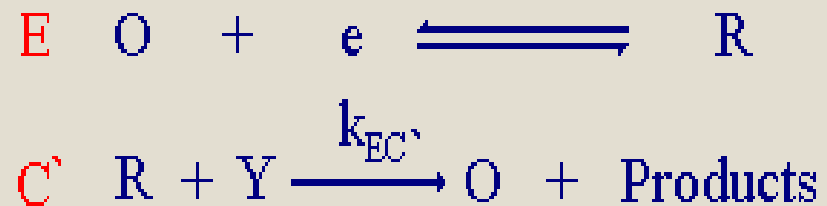
$$\Delta E_p \left| E_{p,c} - E_{p,a} \right| = 2,303 \frac{RT}{nF}$$



Односот на големината на пик струите на двата пика ( $I_{p,a}$  и  $I_{p,c}$ )  $\approx 1$

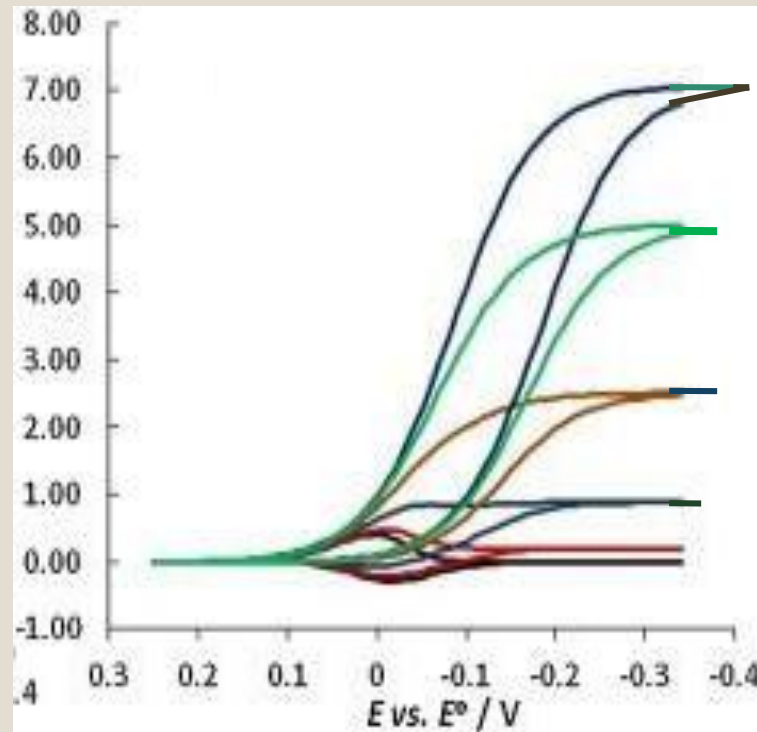


# Каталитички ЕС механизам (регенеративен)



Развиен е теоретски модел, преку кој може во техниката ПФВ на т.н **РЕГЕНЕРАТИВЕН ЕЛЕКТРОКАТАЛИТИЧКИ МЕХАНИЗАМ** да се определи кинетиката на ензимско-супстратната реакција

Математички модел



Теоретски, цикличните волтамограми се функција од:

- Брзината на промена на потенцијалот,
  - Температурата  $T$ ,
  - Потенцијалниот чекот  $dE$ ,
  - Бројот на разменети електрони помеѓу електродата и реактантите  $n$ ,
  - Електронскиот коефициент на трансфер  $\alpha$ , како и од
- 
- $\lambda$  – бездимензионален кинетички параметар на електродната реакција
  - $\gamma$  – бездимензионален хемиски (каталитички) параметар кој ја одсликува кинетиката на ензимско-супстратната реакција

Бездимензионалната струја од симулираните циклични

волтамограми е дефинирана:  $\Psi = I_{\tau} [nFAI^*_{(Ox)}]^{-1}$

$I$  – симбол за струјата

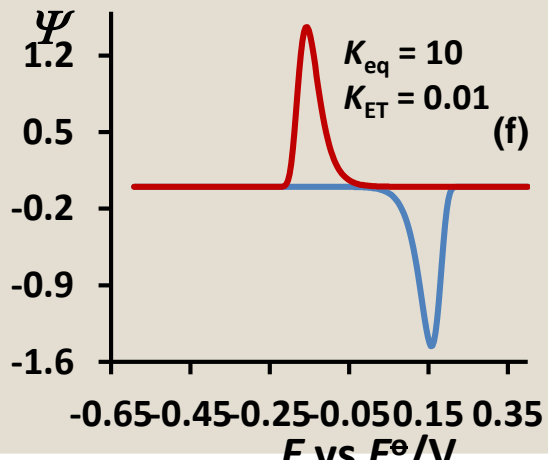
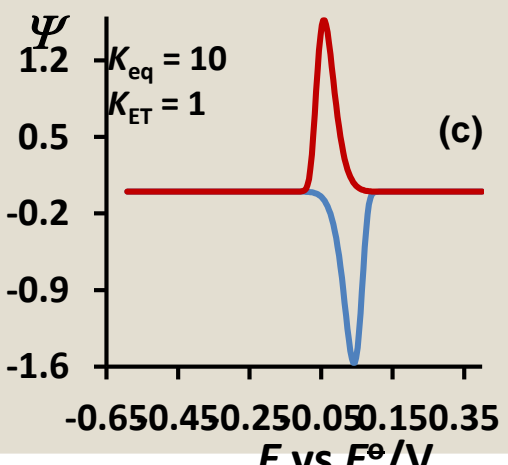
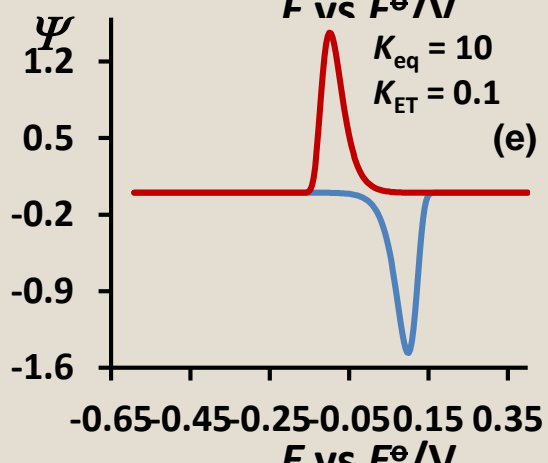
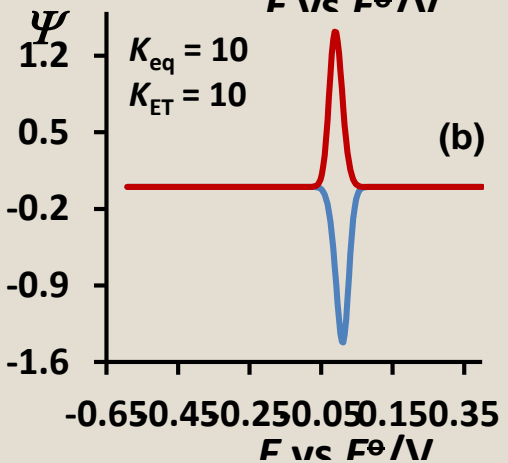
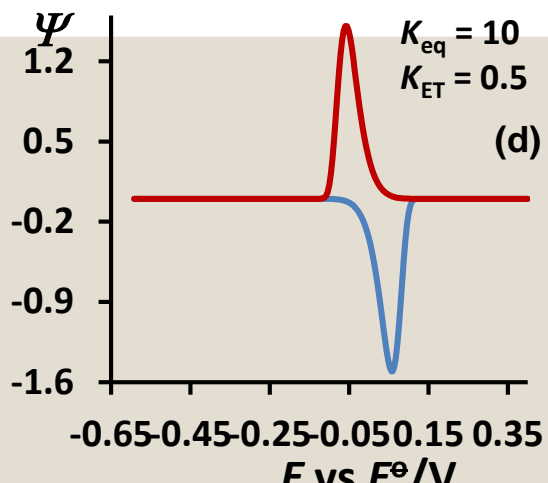
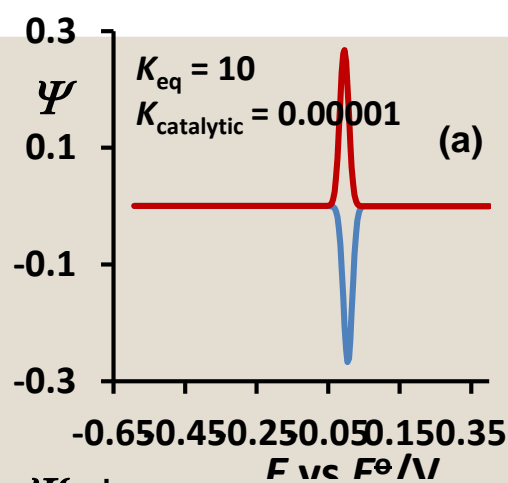
$F$  – фарадеева струја

$A$  – површина на работната електрода

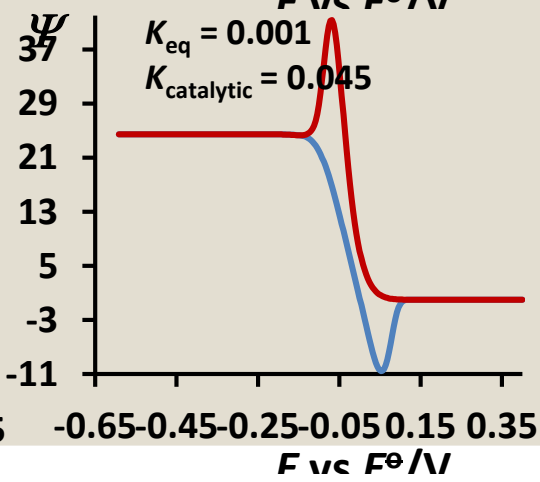
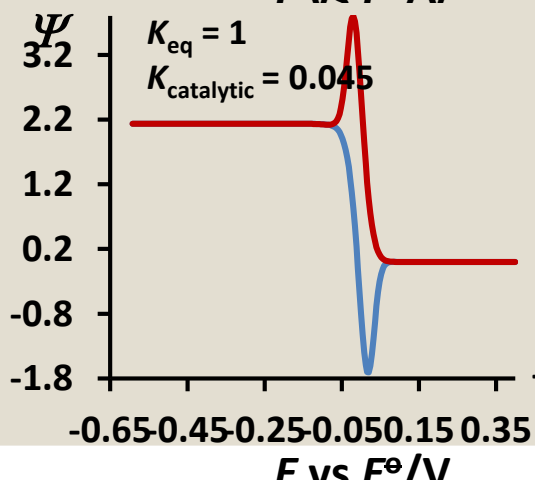
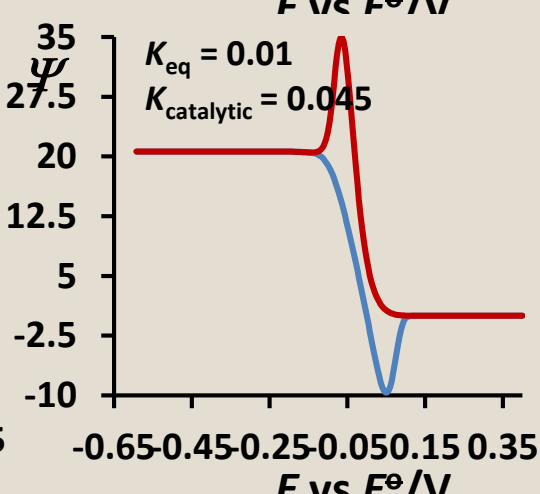
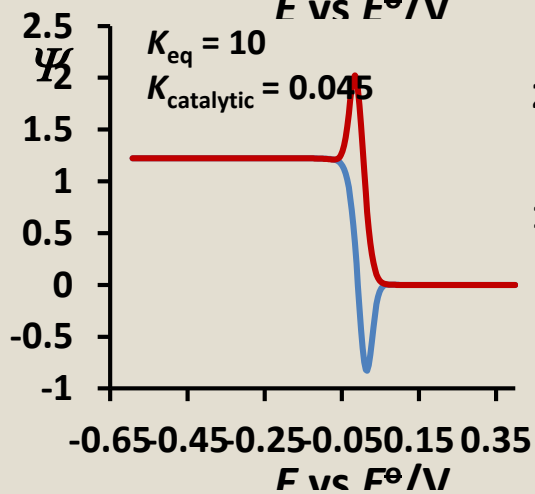
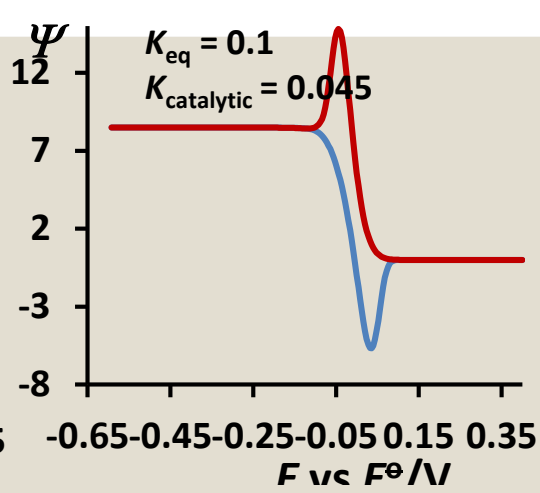
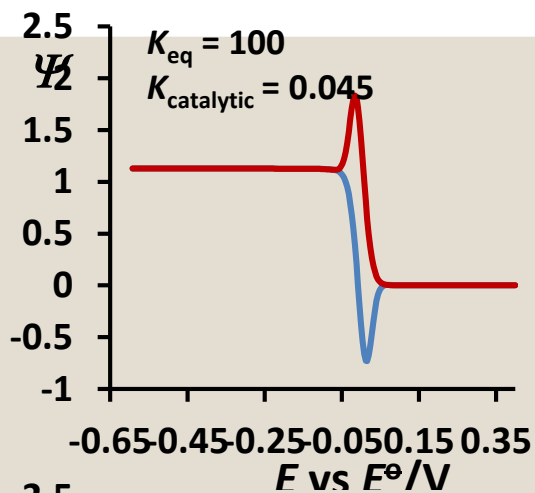
$I^*(Ox)$  – почетна конц. на реактант

адсорбиран на работната електрода

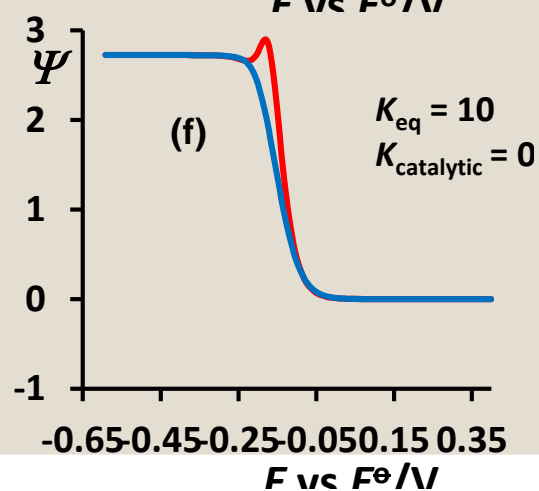
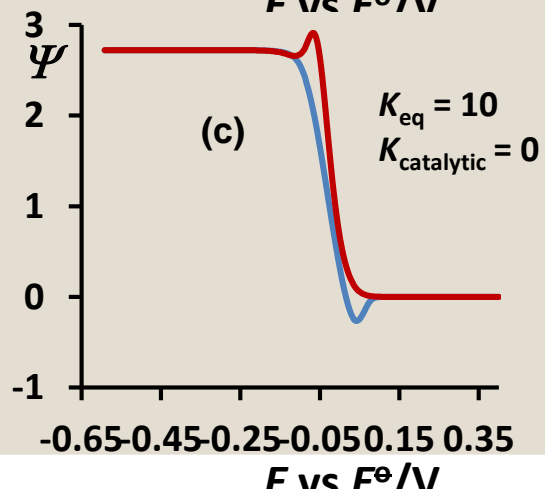
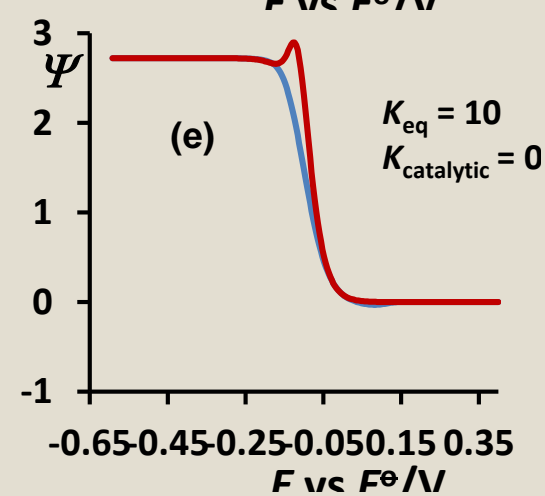
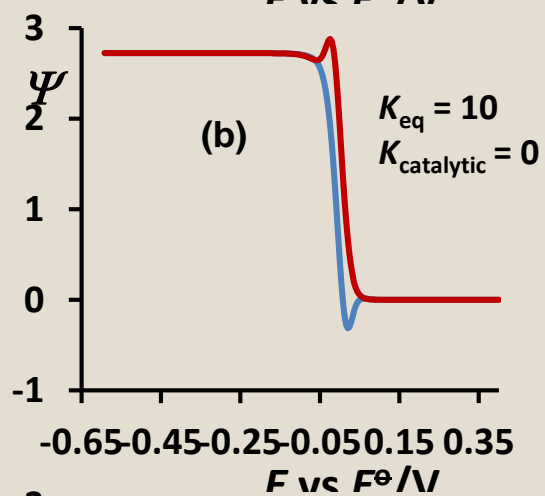
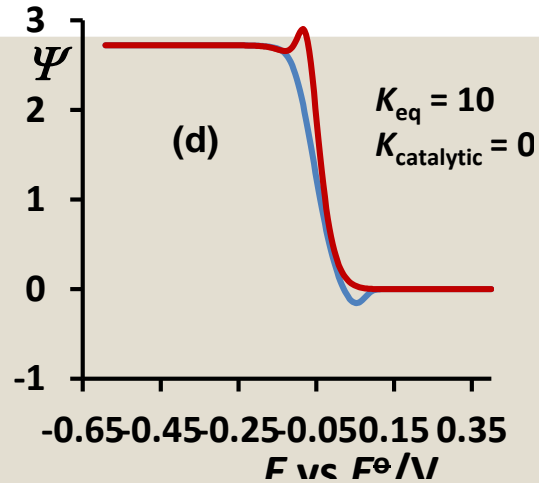
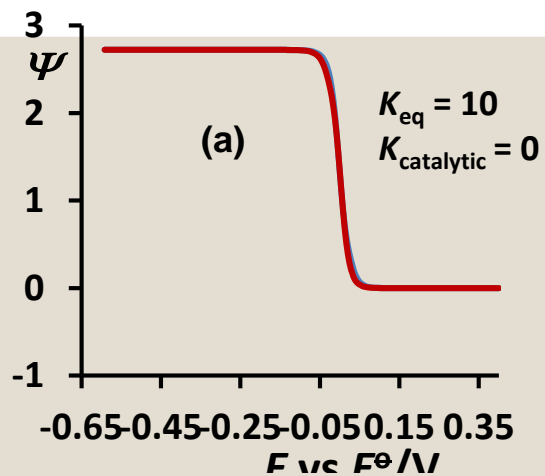




Циклични  
Волтамограми  
Снимени при  
Различна брзина  
На електродна  
Реакција, НО  
Во отсуство  
На регенеративна  
Каталитичка  
реакција



Циклични  
Волтамограми  
Во присуство  
На каталитичка  
Регенеративна  
реакција



Брзината на **E** реакција зависи од  $\lambda$ .

Брзината на **C** чекор зависи од  $\gamma$ .

$$\lambda = k_s \tau$$

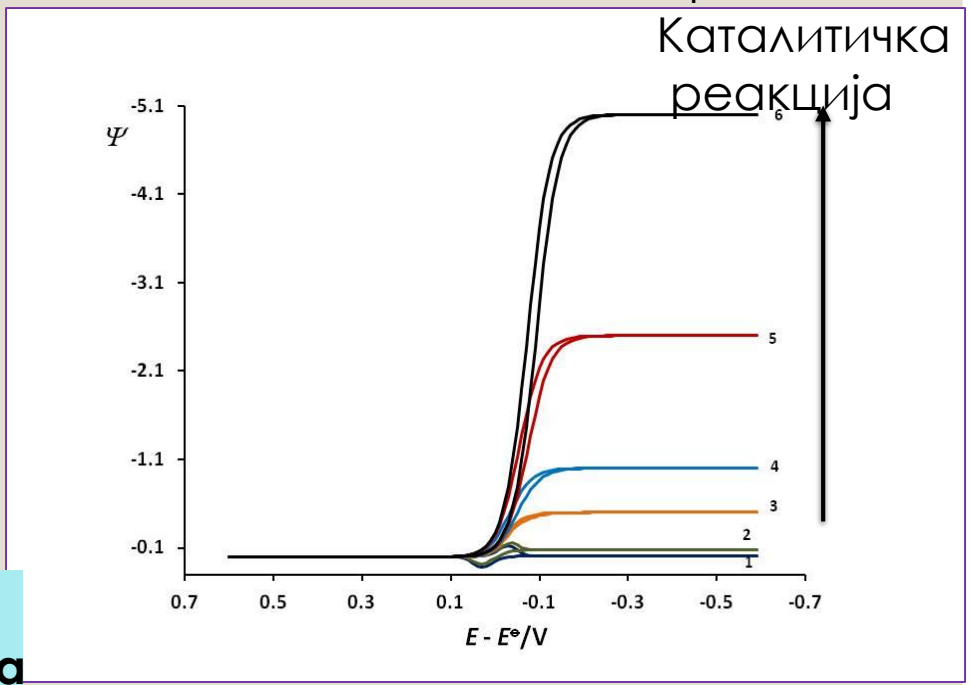
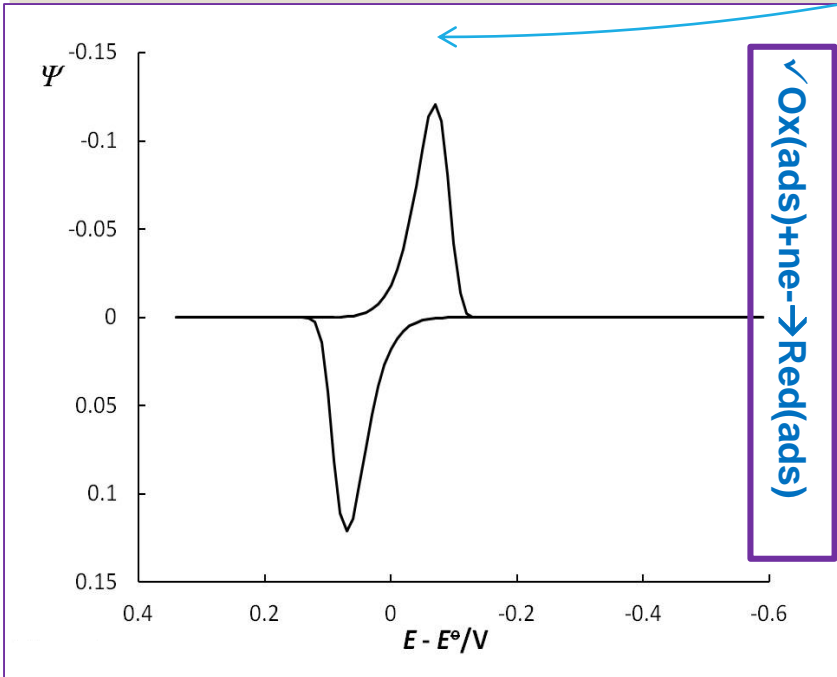
Стандардна константа на електронски трансфер

Времетраење на потенцијалн и импулси

$$\gamma = k_c \tau$$

Константа на брзина на регенеративна реакција

$$K_c = K_{cat}(\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}\text{L}) c(S)(\text{mol/L})$$



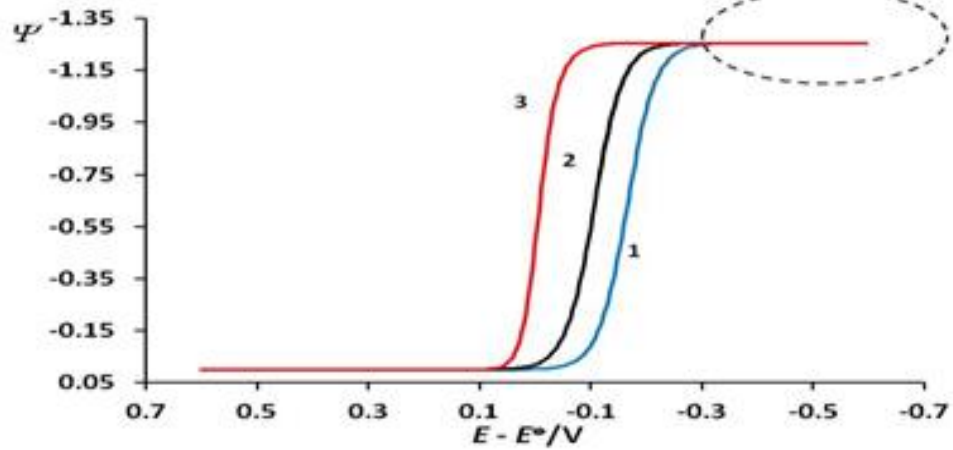
Отсуство на S

Присуство на S

Се зголемува брзина на Каталитичка реакција

**Вака изгледа цикличен Волтамограм на обична површинска Редокс реакција во која НЕМА КАТАЛИЗА т.е. Регенерација на почетниот реактант на површина од работна електрода**

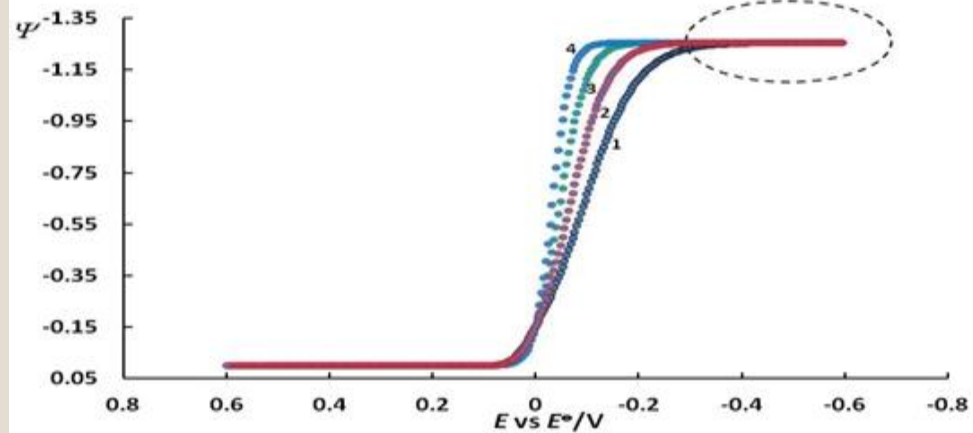




$$\lambda_{(1)} = 0.002$$

$$\lambda_{(2)} = 0.02$$

$$\lambda_{(3)} = 2$$

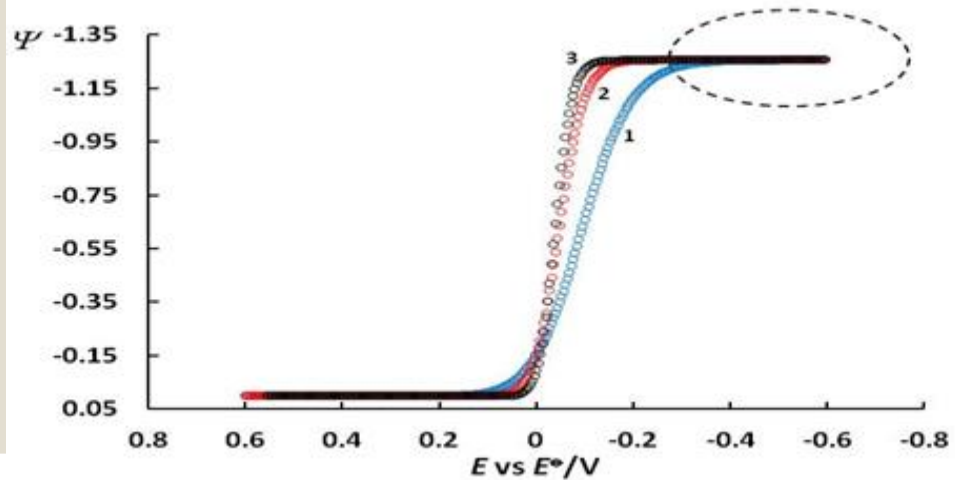


$$a_{(1)} = 0.25$$

$$a_{(2)} = 0.35$$

$$a_{(3)} = 0.5$$

$$a_{(4)} = 0.75$$

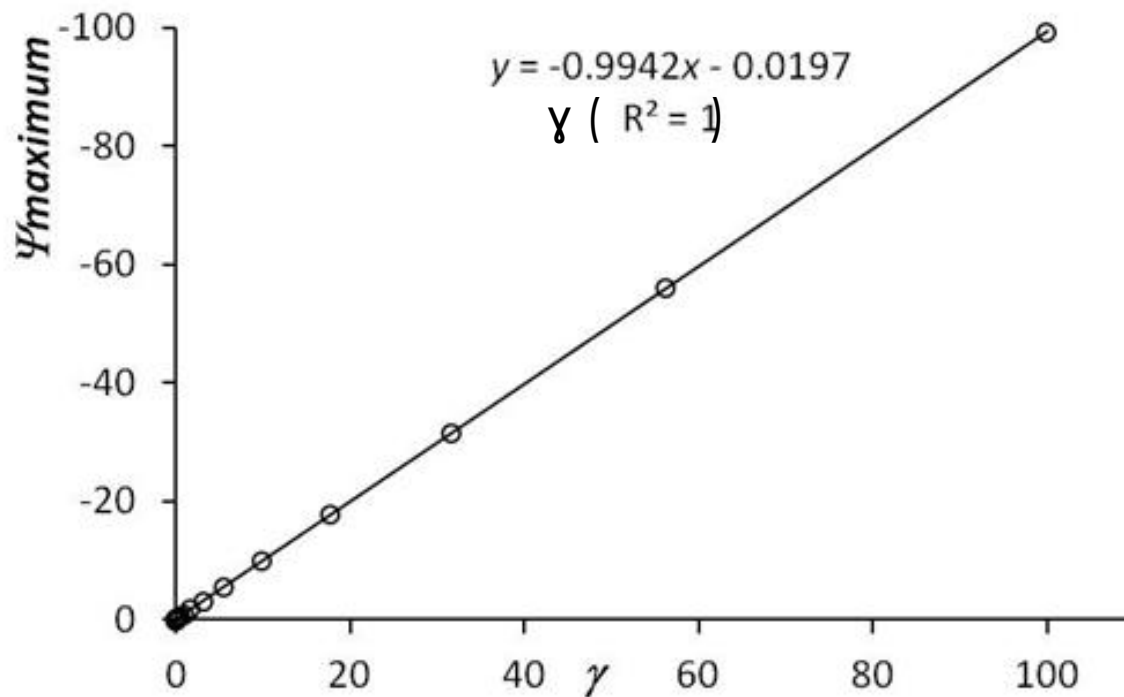


$$ne_{(1)}^- = 1$$

$$ne_{(2)}^- = 2$$

$$ne_{(3)}^- = 3$$





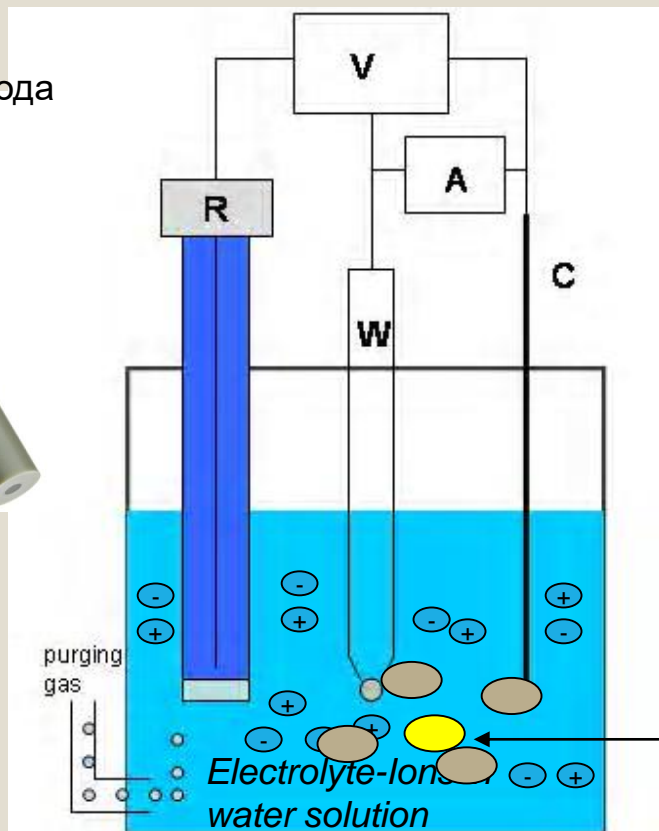
*Наклонот на линеарната зависност помеѓу  $\Psi_{\max}$  и  $\gamma$  овозможува проценка на вистинската вредност на стапката на константата на каталитичката хемиска реакција ( $k_{cat}$ ) !*

*Тоа е во исто време*

*Константа на брзина на интеракции помеѓу два лекови, доколку се студираат интеракциите помеѓу дефинирани лекови*

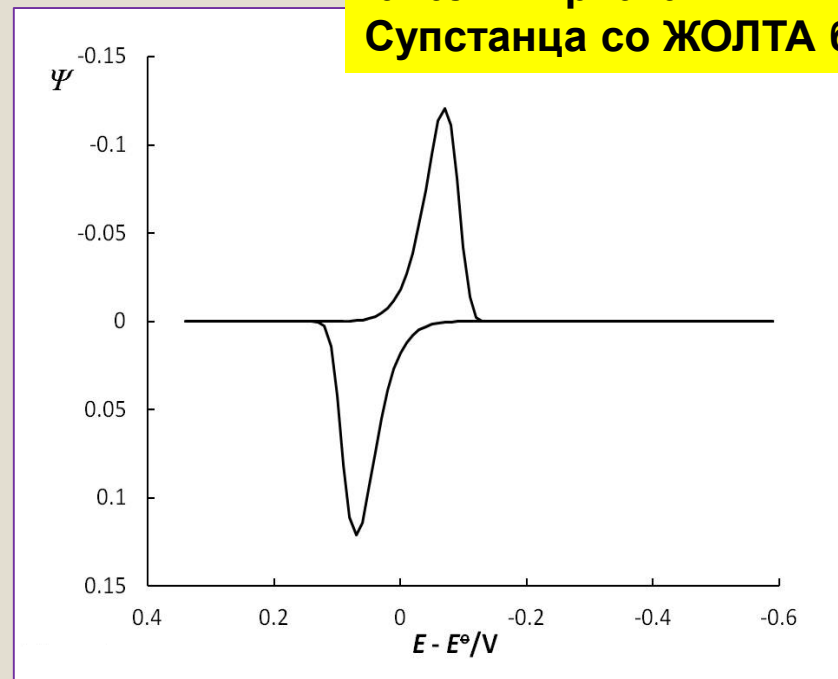
# Како се изведува еден експеримент во волтаметрија?

W-работна електрода



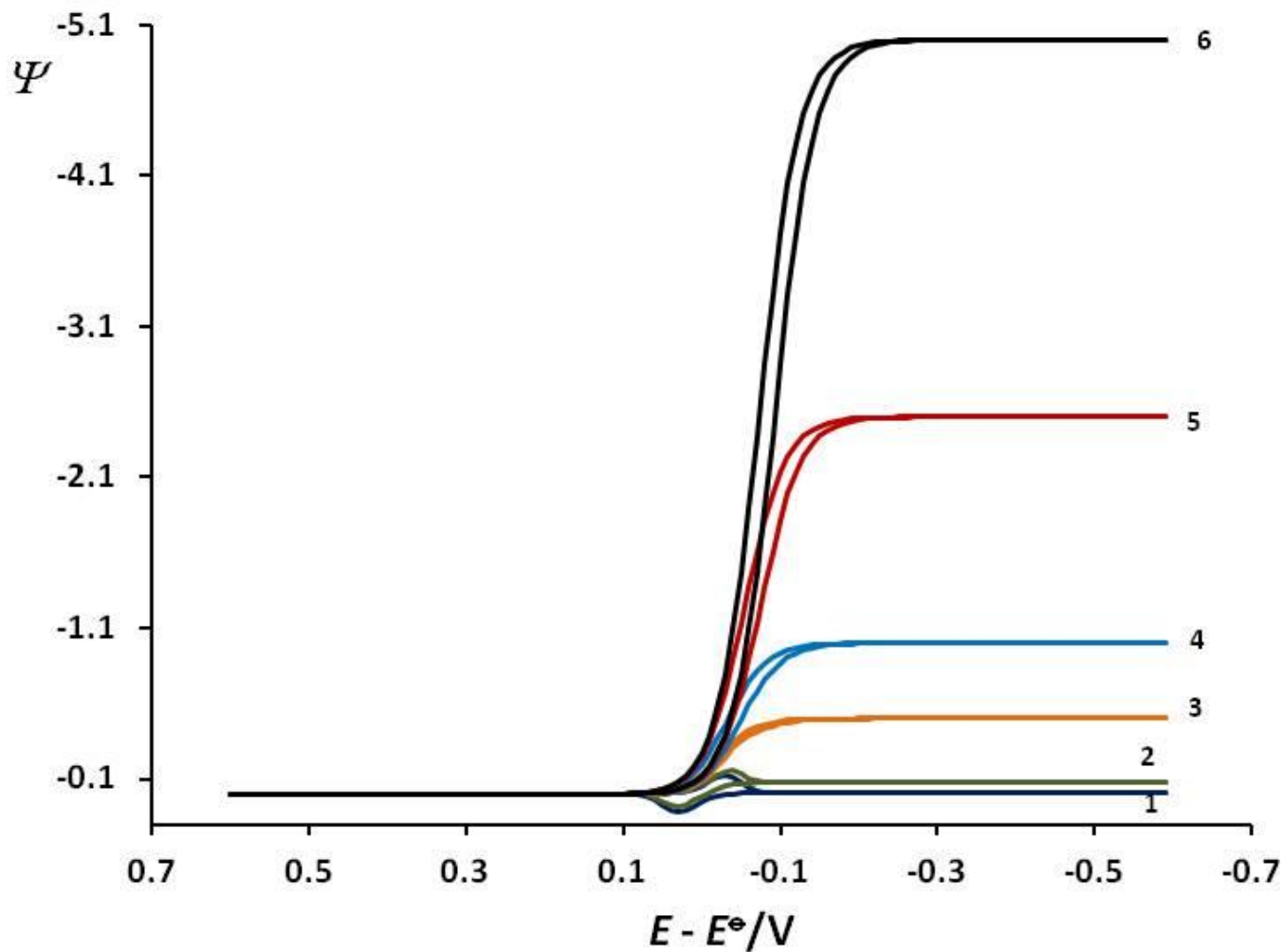
Во вториот чекор се ДОДАВА СУПСТРАТ и се зголемува постепено негова концентрација и се снимаат Волтамограми при секоја промена на концентрацијата на супстратот

Ова е цикличен Волтамограм САМО во Присуство на -аналит-првата Супстанца со ЖОЛТА боја



Испитувана Супстанца -аналит-ЖОЛТА  
Најпрво се следи негова Електрохемиска активност  
Најпрво ВО ОТСУСТВО на супстрат

Доколку има интеракции  
Со зголемување на концентрацијата  
на СУПСТРАТОТ, Се зголемува и  
струјата На волтамограмите



## Заклучок !

- Електрохемиска активност- функција од применетиот потенцијал
- Зависен само од брзината на регенеративната реакција
- Максимална гранична струја- функција од бездимензионалниот каталитички параметар ( $\gamma = k_c t$  и  $k_c = k_{cat} c(S)$ )

$I_{max}$  → функција од моларната конц. на каталитички агенс (S)

Наклонот од линеарната зависност  $I_{max}$  vs.  $c(S)$ : **наклон =  $l(k_{cat}) [nFA\Gamma^*(Ox) t^{-1}] l$**

Ако се познати;  
Бројот на разменети  
електрони,  
Површинските концентрации  
При константна брзина на  
скенирање



ја добиваме вредноста на MM  
константа (кеј ензимско  
супстратни реакции)  
Или на константа на брзина на  
Хемиски реакции помеѓу  
Два лекови ( $k_{cat}$ ) на многу  
едноставен начин од наклонот  
 $I_{max}$  vs.  $c(S)$ .

# КОИ СУПСТАНЦИ МОЖАТ ДАСЕ ИСПИТУВААТ со Волтаметрија?

-допамин, адреналин, витамин Ц, витамин Д  
Коензим Q, Бензокинони, Холестерол, кетоконазол, Цистеин, Тирозин...

-Органски физиолошки киселини

-Интеракции на лекови со мембрани

-ЕНЗИМСКО СУПСТРАТНИ РЕАКЦИИ

-АКТИВНОСТ НА КЛЕТКИ

-Антиоксиданти, Полифеноли,

-МОЖЕ ДА СЕ ИСПИТУВА

-Брзина на хемиски реакции

-Апсорпциски феномени

-Реакции на комплексирање

-МЕХАНИЗМИ НА РЕАКЦИИ

-Активност на ензими

.....



## REFERENCES

1. **R. Gulaboski**, V. Mirceski, R. Kappl, M. Hoth, M. Bozem, "Quantification of Hydrogen Peroxide by Electrochemical Methods and Electron Spin Resonance Spectroscopy" *Journal of Electrochemical Society*, 166 (2019) G82-G101.
2. **Rubin Gulaboski**, Valentin Mirceski, Milivoj Lovric, Square-wave protein-film voltammetry: new insights in the enzymatic electrode processes coupled with chemical reactions, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 23 (2019) 2493-2506.
3. Milkica Janeva, Pavlinka Kokoskarova, Viktorija Maksimova, **Rubin Gulaboski**, Square-wave voltammetry of two-step surface redox mechanisms coupled with chemical reactions-a theoretical overview, *Electroanalysis*, 2019  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elan.201900416>
4. **Gulaboski Rubin**, Milkica Janeva, Viktorija Maksimova, "New Aspects of Protein-film Voltammetry of Redox Enzymes Coupled to Follow-up Reversible Chemical Reaction in Square-wave Voltammetry", *Electroanalysis*, 31 (2019) 946-956 .
5. P. Kokoskarova, M. Janeva, V. Maksimova, **R. Gulaboski**, "Protein-film Voltammetry of Two-step Electrode Enzymatic Reactions Coupled with an Irreversible Chemical Reaction of a Final Product-a Theoretical Study in Square-wave Voltammetry", *Electroanalysis* 31 (2019) 1454-1464, DOI: 10.1002/elan.201900225
6. P. Kokoskarova, **R. Gulaboski**, Theoretical Aspects of a Surface Electrode Reaction Coupled with Preceding and Regenerative Chemical Steps: Square-wave Voltammetry of a Surface CEC' Mechanism, *Electroanalysis* (2019)  
[doi.org/10.1002/elan.201900491](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elan.201900491)  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elan.201900491>

7. **R. Gulaboski**, Theoretical contribution towards understanding specific behaviour of “simple” protein-film reactions in square-wave voltammetry”, *Electroanalysis*, 30. (2019) ISSN 1040-0397

8. **R. Gulaboski**, P. Kokoskarova, S. Petkovska, Time independent methodology to assess Michaelis Menten constant by exploring electrochemical-catalytic mechanism in protein-film cyclic staircase voltammetry, *Croat. Chem. Acta*, 91 (2018) 377-382.

9. V. Mirceski, D. Guziejewski, L. Stojanov, **R. Gulaboski**, Differential Square-Wave Voltammetry, *Analytical Chemistry* (2019)  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.9b03035>.

10. **R. Gulaboski**, I. Bogeski, P. Kokoskarova, H. H. Haeri, S. Mitrev, M. Stefova, Marina, J. Stanoeva-Petreska, V. Markovski, V. Mirceski, M. Hoth, and R. Kappl, *New insights into the chemistry of Coenzyme Q-0: A voltammetric and spectroscopic study.* *Bioelectrochem.* 111 (2016) 100-108.

11. **R. Gulaboski**, V. Markovski, and Z. Jihe, *Redox chemistry of coenzyme Q—a short overview of the voltammetric features,* *J. Solid State Electrochem.* 20 (2016) 3229-3238.

12. Haeri, Haleh H. I. Bogeski, **R. Gulaboski**, V. Mirceski, M. Hoth, and R. Kappl, *An EPR and DFT study on the primary radical formed in hydroxylation reactions of 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone.* *Mol. Phys.* 114 (2016) 1856-1866.

13. V. Mirceski, Valentin and **R. Gulaboski**, *Recent achievements in square-wave voltammetry (a review)*. **Maced. J. Chem. Chem. Eng.** 33 (2014). 1-12.
14. V. Mirceski, **R. Gulaboski**, M. Lovric, I. Bogeski, R. Kappl and M. Hoth, *Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress*, **Electroanal.** 25 (2013) 2411–2422.
15. **R. Gulaboski**, I. Bogeski, V. Mirčeski, S. Saul, B. Pasička, H. H. Haeri, M. Stefova, J. Petreska Stanoeva, S. Mitrev, M. Hoth and R. Kappl, "Hydroxylated derivatives of dimethoxy-1,4-benzoquinone as redox switchable earth-alkaline metal ligands and radical scavengers" **Sci. Reports**, 3 (2013) 1-8.
16. **R. Gulaboski**, V. Mirceski, I. Bogeski and M. Hoth, „Protein film voltammetry: electrochemical enzymatic spectroscopy. A review on recent progress,, **J. Solid State Electrochem.** 16 (2012) 2315-2328.
17. B. Sefer, **R. Gulaboski** and V. Mirceski, Electrochemical deposition of gold at liquid–liquid interfaces studied by thin organic film-modified electrodes, **J. Solid State Electrochem** 16 (2012) 2373-2381.
18. **R. Gulaboski**, P. Kokoskarova and S. Mitrev, "Theoretical aspects of several successive two-step redox mechanisms in protein-film cyclic staircase voltammetry" **Electrochim. Acta** 69 (2012) 86-96.
19. Bogeski, **R. Gulaboski\***, R. Kappl, V. Mirceski, M. Stefova, J. Petreska and M. Hoth, „Calcium Binding and Transport by Coenzyme Q,, **J. Am. Chem. Soc.** 133 (2011) 9293-9303.

20. V. Mirčeski, M. Lovrić and **R. Gulaboski**, "Theoretical and experimental study of the surface redox reaction involving interactions between the adsorbed particles under conditions of square-wave voltammetry.", ***J. Electroanal. Chem.***, 515 (2001) 91-99.

21. V. Mirčeski and **R. Gulaboski**, "Surface Catalytic Mechanism in Square-Wave Voltammetry", ***Electroanal.*** 13 (2001) 1326-1334.

**22. R. Gulaboski**, V. Mirčeski and F. Scholz, "An electrochemical method for determination of the standard Gibbs energy of anion transfer between water and n-octanol" ***Electrochem. Commun.*** 4 (2002) 277-283.

23. V. Mirčeski and **R. Gulaboski**, "A Theoretical and Experimental Study of Two-Step Quasireversible Surface Reaction by Square-Wave Voltammetry" ***Croat. Chem. Acta*** 76 (2003) 37-48.

**24. R. Gulaboski**, V. Mirčeski, Š. Komorsky-Lovrić and M. Lovrić, "Square-Wave Voltammetry of Cathodic Stripping Reactions. Diagnostic Criteria, Redox Kinetic Measurements, and Analytical Applications", ***Electroanal.*** 16 (2004) 832-842.