

**УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП**  
**ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ**  
**СТУДИСКА ПРОГРАМА ПО АНАЛИТИКА НА ЛЕКОВИ**



**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

**Теоретска и експериментална студија за примена на  
електрохемиски регенеративни електродни механизми во  
аналитиката на лекови во услови на циклична скалеста  
волтаметрија**

Theoretical and experimental study on application of electrochemical  
regenerative electrode mechanisms in drug analysis under conditions of  
cyclic staircase voltammetry

М-р Софија Петковска

Штип, декември 2022

# СОДРЖИНА

## Кратенки/ Abbreviations

## Краток извадок

## Abstract

<b>1.0</b>	<b>ВОВЕД</b> .....	<b>9</b>
	Волтаметрија .....	9
1.1.	Принципи на волтаметриските техники .....	9
1.2.	Некои важни дефиниции кај волтаметриските техники .....	13
1.3.	Инструментација во волтаметриските експерименти .....	16
1.4.	Потенциостат .....	16
1.5.	Главни карактеристики на цикличната волтаметрија (CV).....	18
1.6.	Дефинирање на критериуми за реверзибилност во циклична волтаметрија.....	22
1.7.	Примена на цикличната волтаметрија за следење на механизмот на некои едностепени електродни реакции поврзани со хемиски реакции .....	26
<b>2.</b>	<b>ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА</b> .....	<b>31</b>
2.1.	Примена на волтаметријата за анализа на интеракции помеѓу лекови .....	31
<b>3.</b>	<b>ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО</b> .....	<b>35</b>
<b>4.</b>	<b>МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ НА РАБОТА</b> .....	<b>39</b>
4.1	Дефиниции во математичките модели за студираниите електродни механизми .....	39
4.2	Материјали и методи за волтаметриските експерименти дизајнирани за студирање на интеракции на лекови .....	42
<b>5.</b>	<b>Резултати</b> .....	<b>44</b>
5.1.	Карактеристики на теоретските волтамограми на регенеративните механизми во услови на циклична скалеста волтаметрија .....	44
5.1.1	(А) Дифузионски регенеративен електроден ЕС' механизам поврзан со иреверзибилна регенеративна хемиска реакција .....	44

5.1.2 (Б) Регенеративен електрохемиски механизам за студирање на липофилни лекови, што можат да стапат во иреверзибилни интеракции со хидрофилни или липофилни лекови .....	54
5.1.3 (В) Модел за регенеративна електрохемиска реакција на два хидрофилни лекови (дифузионен регенеративен EC'rev механизам).....	62
5.1.4 (Г) Површински реверзибилен регенеративен електроден механизам (површински EC'rev механизам).....	72
<b>6. ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>87</b>
6.1 Дискусија на експерименталните резултати.....	87
6.1.1 Циклична волтаметрија на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone и студија на интеракциите на соединението со други супстанции согласно регенеративниот електрохемиски механизам .....	92
6.1.2 Циклична волтаметрија на витамин B2 и студија на интеракциите на витамин B2 со други супстанции согласно регенеративниот електрохемиски механизам .....	103
6.1.3 Циклична волтаметрија на калиум хексацијаноферат (II)-K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] и студија на интеракциите на K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] со други супстанции согласно регенеративниот електрохемиски механизам .....	111
<b>7. ЗАКЛУЧОЦИ.....</b>	<b>120</b>
<b>8. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES) .....</b>	<b>124</b>
<b>Дополнителен материјал .....</b>	<b>131</b>
<b>Рецензирани и објавени трудови (стручни, научни и апликативни) произлезени од истражувањето, печатени во меѓународни списанија со фактор на влијание (Impact Factor) .....</b>	<b>138</b>
<b>Учество на стручни конгреси и симпозиуми.....</b>	<b>139</b>

**Комисија за утврдување на подобност на тема:**

**Претседател:** **Проф. д-р Емилја Јаневиќ Ивановска**  
редовен професор , Факултет за Медицински науки,  
Универзитет „Гоце Делчев“-Штип

**Член:** **Проф. Д-р Андрија Шмелцеровиќ**  
редовен професор, Медицински факултет  
Универзитет Ниш, Република Србија

**Ментор:** **Проф. д-р Рубин Гулабоски**  
редовен професор, Факултет за медицински науки,  
Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

**Членови на комисија за оценка и одбрана за докторска дисертација:**

**Интерен ментор:** **Проф. д-р Рубин Гулабоски**  
редовен професор, Факултет за медицински науки,  
Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

**Екстерен ментор:** **Проф. Д-р Андрија Шмелцеровиќ**  
редовен професор, Медицински факултет  
Универзитет Ниш, Република Србија

**Претседател:** **Проф. д-р Емилја Јаневиќ Ивановска**  
редовен професор, Факултет за Медицински науки,  
Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

**Член:** **Проф. Д-р Елена Дракалска-**  
вонреден професор, Факултет за Медицински науки,  
Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

**Член:** **Проф. Д-р Зорица Арсова Сарафиновска**  
редовен професор, Факултет за Медицински науки,  
Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

**Научно поле: Фармација**

**Научна област: Аналитика на лекови**

**Датум на одбрана: 22.12.2022 година**

## **БЛАГОДАРНОСТ / ACKNOWLEDGMENTS**

Посебна искрена благодарност и огромна почит за интерниот ментор проф. д-р Рубин Гулабоски за несебичната помош и поддршка во секој сегмент од изработката на дисертацијата. Искрениот другарски однос, посветеноста, мотивираноста за работа и научен пристап кон работите е премалку за да се објасни големината на професорот Гулабоски.

Благодарам професор Гулабоски.

Искрена благодарност до екстерниот ментор проф. д-р Андрија Шмелцеровиќ за корисните сугестии и поддршката во изработката на докторската дисертација.

Изразувам голема благодарност и до членовите на комисијата за одбрана, проф. д-р Емилија Јаневиќ Ивановска, проф. Елена Дракалска и проф. д-р Зорица Арсова Сарафиновска за корисните сугестии и помошта во изработката на докторската дисертација.

Благодарност до моето семејство за поддршката во текот на изработката на докторскиот труд и во целокупната моја работа. Несебичната поддршка во секоја смисла од моето семејство од почетокот на мојата едукација до денес, ми овозможи денеска да застанам пред сите Вас и да го крунисам моето образование со докторски труд. Благодарам тато, мамо, Аце, Елена, Ана и Мартин.

## Листа на кратенки и ознаки

„E“ - во електроодните механизми означува „електрохемиска реакција“

E - во воламетриските експерименти е симбол за електрооден потенцијал (или потенцијална разлика)

C' - во електроодните механизми означува регенеративна хемиска реакција

$k_s^{\circ}$  - е симбол за стандардна константа за брзина на пренос на електрони

D - е симбол за коефициент на дифузија

$\alpha$  - е симбол за коефициент на пренос на електрони

$E^{\circ}$  - е симбол за стандарден редокс потенцијал

A - е симбол за површината на работната електрода

v - е симбол за брзина на промена на потенцијалот во циклична волтаметрија

dE - е симбол за потенцијален чекор во циклична волтаметрија

$K_{chem}$  - е симбол за бездимензионален хемиски параметар поврзан со брзината на регенеративната реакција

$K_{eq}$  - е ознака за константа на хемиска рамнотежа

K - е симбол за бездимензионален кинетички параметар на трансфер на електрони

$k_c'$  - е симбол за вистинската константа на хемиска регенеративна реакција помеѓу два лекови што сапуваат во хемиска интеракција

$k_f$  - е симбол за константата на брзина на директната хемиска реакција

$k_b$  - е симбол за константата на брзина на повратната хемиска реакција

T - е симбол за термодинамичка температура

R - е симбол за универзална гасна константа

F - е симбол за Фарадеева константа

$\Psi_{max-плато}$  - е симбол за бездимензионалната максимална лимитирачка струја (или струјата на плато од steady state цикличните волтамограми)

I - е симбол за јачина на струја

- Терминот „протеин-филм волтаметрија“ е идентичен со терминот „површински електроодни реакции“
- Терминот „steady state“ цикличен волтамограм означува волтаметрииска крива што има константни својства при различни експериментални и инструментални услови
- Термините „циклична волтаметрија“ и „циклична скалеста волтаметрија“ се идентични во рамките на дисертацијата.

## Краток извадок

Цикличната волтаметрија е една од најпознатите електрохемиски техники што се употребува како за квантитативно определување и студирање на механизмите на електрохемиска трансформација на голем број лекови и физиолошки активни супстанции, така и за определување на релевантни кинетички и термодинамички параметри што се во непосредна корелација со електрохемиската активност на испитуваните лекови. Примената на цикличната волтаметрија во квантитативната анализа на т.н. „редокс лекови“ се базира на пропорционалноста помеѓу Фарадеевата струја и концентрацијата на дефиниран редокс лек. Во услови кога даден редокс активен лек стапува во хемиска интеракција со друг лек, цикличната волтаметрија дава можност за определување на релевантни физички параметри што се поврзани со кинетиката и термодинамиката на интеракциите помеѓу тие два лекови. Кога два лекови стапуваат во интеракции при кои доаѓа до регенерација на почетната редокс форма на електрохемиски активниот лек, тогаш таквиот тип на механизам се класифицира како „електрохемиски регенеративен механизам“, а често и како „електрохемиски каталитички механизам“. Во рамките на докторската работа се разработени четири теоретски електрохемиски регенеративни механизми во услови на циклична скалеста волтаметрија. Притоа, за сите електродни механизми се претставени едноставни методи за мерење на кинетиката на интеракции помеѓу дефинирани лекови, како и методи за мерење на кинетиката и термодинамиката (константата на стабилност) на лекови кај кои постои хемиска рамнотежа уште пред апликација на електроден потенцијал. Дел од методите и резултатите од теоретските модели за соодветните електрохемиски регенеративни механизми се потврдени со експерименти во кои редокс активни супстанции 2,6-dihydroxy-benzoquinone, Рибофалвин и  $K_4[Fe(CN)_6]$  стапуваат во интеракции од регенеративна природа со други лекови. Притоа, за системите каде постојат таков тип на интеракции помеѓу 2,6-dihydroxy-benzoquinone, рибофлавин и  $K_4[Fe(CN)_6]$  и студирани лекови и суплементи, пресметани се соодветните вредности на константите на брзина на хемиски интеракции.

**Клучни зборови:** регенеративен електрохемиски механизам; интеракции на лекови; циклична волтаметрија; константа на брзина на хемиски интеракции; електрохемија

## **Abstract**

Cyclic voltammetry is one of the most known electrochemical tools both for quantification of physiologically active systems, and for getting insight into the mechanism of their electrode transformation. In addition, the cyclic voltammetry is suitable tool for the determination of relevant kinetic and thermodynamic parameters related to the redox transformation of various systems. The application of cyclic voltammetry for quantification of so-called “redox active drugs” is based upon the linear dependence between the Faradaic current and the molar concentration of a defined drug. If a given redox-active drug gets in chemical interaction with another defined drug, the cyclic voltammetry can provide means to get access to determine relevant kinetic and thermodynamic parameters related to those interactions between the two drugs. If the drug-drug interactions are of such a nature in which the initial form of the redox active drug is regenerated, then this type of electrode mechanism belongs to the class of “electrochemical regenerative” or “electrochemical catalytic” electrode mechanism. In this thesis, four different electrochemical regenerative electrode mechanisms are elaborated theoretically under conditions of cyclic staircase voltammetry. In addition, along to plethora of simulated voltammograms presented in this thesis, a set of simple criteria for recognizing any of elaborated mechanisms is also established. For any of the catalytic electrode mechanisms elaborated, we defined relevant methods for getting access to the kinetic and thermodynamic parameters that allow the strength of interactions between two drugs to be quantified. Part of the theoretical results are confirmed with the experiments of redox active systems 2,6-dihydroxybenzoquinone, Riboflavin and gallic acid that get in interactions of regenerative nature with defined drugs. For the drugs that get in regenerative interactions with 2,6-dihydroxybenzoquinone, Riboflavin and gallic acid, the rate constants of their chemical regenerative reactions have been determined by using the method evaluated from the theoretical models.

**Key words:** electrochemical regenerative electrode mechanism; drug-drug interactions; cyclic voltammetry; rate constant of chemical interactions; electrochemistry



## 1. ВОВЕД

### Волтаметрија

#### 1.1. Принципи на волтаметриските техники

Електрохемијата е гранка од физичката хемија што ги проучува процесите кај кои доаѓа до проток на струја како резултат на одвивање на некоја хемиска трансформација (Compton, Understanding Voltammetry, 2010; A. M. Bond, E. A. Mashkina, and A. N. Simono, 2014; Y. Saito, and T. Kikuchi, 2013; Komorsky-Lovric, S., Lovric, M. (2020); Komorsky-Lovric, S. Lovric, M. (1995); Lovric, M., (2010); Lovric (1995); Lovric et al. (1997); Molina et al, 2016; Molina et al. (2007); Heinze, J. (1984)]. Во суштина, електрохемиските реакции претставуваат оксидо-редукциски реакции при кои доаѓа до размена на електрони помеѓу два или повеќе реактанти и истите се најголемата класа на хемиски реакции во природата. Електрохемиските реакции се класифицирани како специфичен тип на хемиски реакции во кои доаѓа до размена на електрони помеѓу дефиниран аналит и даден електричен спроводник [P. H. Rieger (1993)]. Овој електричен спроводник во електрохемијата е наречен „работна електрода“, чиј потенцијал може да се контролира од надворешен извор. Во таков случај, размената на електрони помеѓу електродата и испитуваниот реактант ќе предизвика течење на електрична струја (т.н. Фарадеева струја), чија големина ќе зависи од површината на работната електрода, од бројот на електрони разменет во елементарен акт на електрохемиска трансформација, од брзината на дифузијата (кога трансферот на маса се одвива со дифузија), како и од концентрацијата на испитуваниот аналит. Покрај тоа, големината на оваа Фарадеева струја може да даде и податоци за својствата и реактивноста на аналитот што го испитуваме.

Едни од најчесто користените техники во електрохемијата се т.н. *волтаметриски техники* (Compton et al., Understanding Voltammetry, 2010) Волтаметриските методи претставуваат потенциодинамички електрохемиски техники во кои едниот реактант е *редокс-активен аналит* (лекот) што го испитуваме, а вториот реактант е работната електрода, на чија површина, преку надворешен извор, ја контролираме енергијата на надворешните електрони. Од волтаметриските техники, *цикличната волтаметрија* (A. J.

Bard, L. R. Faulkner, (2004); P. N. Barlett (1992)] е една од најупотребуваните техники што се користи за следните цели:

- за испитување на механизмите на електрохемиска трансформација на голем број лекови и физиолошки активни супстанции;
- за квантитативно определување на органски и неоргански супстанции
- за определување на кинетички и термодинамички параметри поврзани со процесот на електронски трансфер;
- за определување на кинетички и термодинамички параметри поврзани со процеси на интеракции на дефинирани лекови:
- за студирање на процеси на адсорпција, кристализација, изомеризација на површината на даден електричен спроводник;
- за определување на константа на стабилност на комплексни соединенија;
- за студирање на процеси на трансфер на јонизабилни лекови преку биомембрани и сл.

Кај сите волтаметриски техники, електричниот потенцијал (кој е пропорционален со енергијата на електроните) е движечка сила, додека резултантен параметар е струјата што се мери како резултат на пренос на електрони помеѓу работната електрода и испитуваниот аналит. Денес волтаметриските техники се присутни скоро во секоја хемиска, биохемиска и физичка лабораторија.

Како главни позитивни параметри при изборот на волтаметриските техники се брзото време на добивање на одговор, ниската цена на чинење, како и капацитетот за испитување на механизмите на електродна трансформација на голем број органски и неоргански супстанции. Волтаметриските техники се дефинираат како потенциодинамички електрохемиски техники што се користат за квалитативна и квантитативна анализа на секоја една супстанца што поседува хемиски потенцијал да разменува електрони со дефиниран електричен спроводник (работна електрода).

Кога при дефинирани услови, дефинирана супстанца (аналит) може да размени електрони со работната електрода (да се оксидира или да се

редуцира), тој анализ во електрохемијата го дефинираме со терминот „редокс активна супстанца“. Волтаметриските техники се инструментални методи што се користат многу често за квантитативно определување на различни неоргански и органски супстанции присутни во примероци од биолошки материјали, медицински материјали, медикаменти, индустриски материјали и слично [D. K. Grosser Jr. (1993)]. Потенцијалот за детекција на органски и неоргански анализи во многу мали концентрации ги прави волтаметриските техники исклучително атрактивни алатки во аналитичката хемија [Compton et al, Understanding Voltammetry, 2010]. Како главен недостаток кај волтаметриските техники најчесто се реферира загадувањето на работните електроди кога се анализираат комплексни примероци. Додека сигналот на екситација во сите волтаметриски техники е електричниот потенцијал што се нанесува помеѓу работната и т.н. референтна електрода, физичкиот параметар што се детектира кај овие техники е интензитетот на електричната струја што е резултат на размена на електрони помеѓу работната електрода и дефинираниот анализ. Волтаметриските експерименти се изведуваат во електрохемиски ќелии со форма како прикажаната на слика 1.

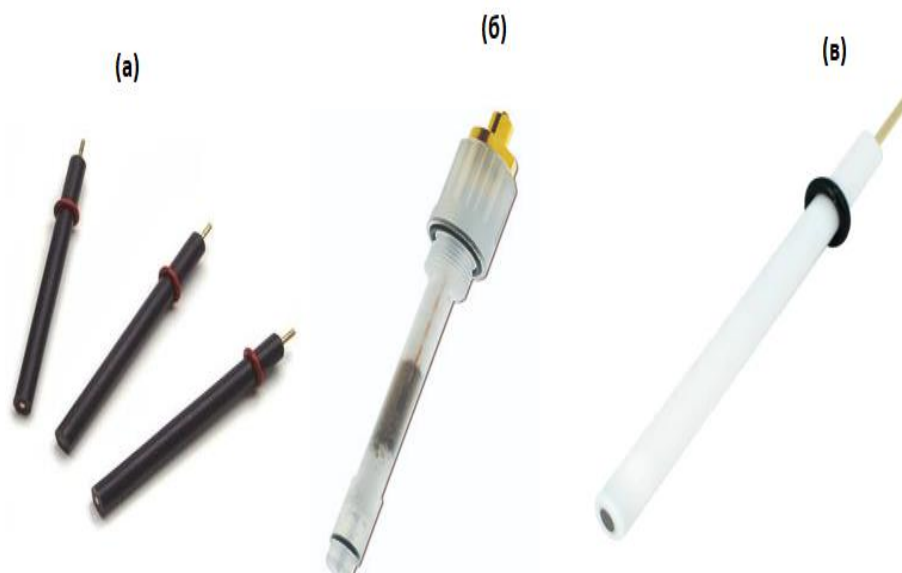


**Слика 1.** Приказ на една три-електродна електрохемиска ќелија  
**Figure 1.** Scheme of a three-electrode electrochemical cell

Електрохемиската ќелија што се користи во волтаметријата се состои од три електроди и тоа: *работна електрода*-спроводник што разменува електрони со аналитот; *референтна електрода*-е електрода со константен потенцијал и *помошна електрода* (слика 2).

*Работната електрода* е спроводник на електрони, најчесто дизајнирана од злато, графит, дијамант или платина. Површината од работната електрода е местото каде се одвива размена на електрони помеѓу електродата аналитот што е предмет на интерес во електрохемиската студија. Во волтаметриските експерименти, една од електродите мора да има константен потенцијал. Оваа електрода, дизајнирана на начин да има *константен и електрохемиски реверзибилен потенцијал* се нарекува *референтна електрода*.

*Помошната електрода* е електрода (најчесто со голема површина, изградена од платина или графит) на чија површина се одвива обратна електрохемиска реакција во однос на таа што се одвива на работната електрода. Оваа електрода овозможува балансирање на вкупниот полнеж во електрохемиската ќелија.



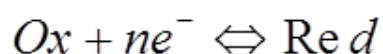
**Слика 2.** Дизајн на работна (а), референтна (б) и помошна електрода (в) што се употребуваат во волтаметриските техники

**Figure 2.** Design of a working electrode (a); reference electrode (b) and counter electrode (c) that are commonly used in voltametric experiments.

Кога молекули на анализот (редокс активниот лек во оваа дисертација) се присутни во електрохемиската ќелија, нанесениот електричен потенцијал може да предизвика размена на електрони помеѓу работната електрода и молекулите на анализот. Овој феномен ќе предизвика промени во концентрацијата на молекулите од анализот на површината на електродата. Притоа, на електродата ќе се иницира реакција на редукција или оксидација на молекулите од испитуваниот анализ. Промената на концентрацијата на молекулите од анализот на површината на работната електрода ќе биде проследена со транспорт на дополнителни молекули од анализот од внатрешноста на електролитниот раствор во ќелијата кон површината на работната електрода. Овие феномени ќе предизвикаат протекување на електрична струја, чиј интензитет ќе биде директно пропорционален со концентрацијата на анализот присутен во електрохемиската ќелија. Токму оваа едноставна зависност помеѓу магнитудата на измерената струја и концентрацијата на анализот што се испитува, ги прави волтаметриските техники корисни алатки кои се употребуваат во голем број анализи за квантификација на анализи од органска и неорганска природа.

## **1.2. Некои важни дефиниции кај волтаметриските техники**

Ако ја разгледаме наједноставната електрохемиска реакција од типот:



каде симболот „Ox“ се однесува на оксидираната форма на редокс анализот (електрохемиски активен лек во оваа дисертација) во електрохемиската ќелија, додека „Red“ е неговата редуцираната форма, најмалку два изрази можат да се применат за меѓусебната зависност на аплицираниот потенцијал и концентрациите на површината од работната електрода на Ox и Red формите од испитуваниот анализ (означени како  $c(Ox)_{x=0}$  и  $c(Red)_{x=0}$ , соодветно).

За т.н. термодинамички реверзибилни електрохемиски реакции, за меѓусебната зависност помеѓу аплицираниот потенцијал „ $E$ “ и концентрациите

на редокс формите на анализот  $c(Ox)_{x=0}$  и  $c(Red)_{x=0}$ , важи Нернстовата равенка што ја има следната форма:

$$E = E^\theta + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c(Ox)_{x=0}}{c(Re d)_{x=0}} \quad (I)$$

Во равенката (I), значењето на симболите е:

$R$ -универзална гасна константа ( $R = 8,3144 \text{ J/(mol K)}$ )

$T$ -термодинамичка температура (K)

$n$ -број на разменети електрони

$F$ -Фарадеева константа ( $96485 \text{ C/mol}$ )

$E^\theta$ -стандарден редокс потенцијал на парот Ox/Red

За електрохемиски системи кај кои постојат т.н. „кинетички пречки“ во процесот на размена на електрони, Батлер-Волмеровата равенка (II) во следната форма е најчесто употребуваниот израз:

$$\frac{I}{nFA} = k_s e^{-\alpha\varphi} [c(Ox)_{x=0} - e^\varphi c(Re d)_{x=0}] \quad (II)$$

Во изразот (II), значењето на симболите е:

$\varphi = nF(E - E^\theta)/RT$  е т.н. бездимензионален потенцијал

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

$\alpha$  -е коефициент на електронскиот трансфер

$A$ -е активна површина на работната електрода ( $\text{cm}^2$ ).

Значењето на останатите параметри во равенката (II) е идентично како тие во равенката (I).

Последната равенка (II) е корисна за пресметување на константните на брзина на пренос на електрони  $k_s$ . Кога изведуваме електрохемиски експерименти, со контролирано нанесување (од надворешен извор) на потенцијална разлика помеѓу работната и референтната електрода ќе предизвикаме промена на површинската концентрација на двете форми на редокс парот присутен во електрохемиската ќелија. Овој феномен ќе

предизвика дополнителен трансфер на маса на анализот од внатрешноста на растворот во електрохемиската ќелија кон работната електрода (или од површината на работната електрода кон растворот), при што ќе протече струја низ ќелијата. Струјата што протекнува како резултат на електродна трансформација на молекулите од електрохемиски активната компонента (аналитот) се нарекува *Фарадеева струја*. Големината на Фарадеевата струја е поврзана со флуксот од анализот на граничната површина електрода/електролит [Compton et al, Understanding Voltammetry, 2010]. Инструменталниот резултатен одговор што се добива во волтаметриските техники се нарекува *волтамограм*. Волтамограм е специфична крива што ја претставува зависноста помеѓу интензитетот на измерената струја- $I$  и нанесениот потенцијал- $E$  (т.н.  $I$ - $E$  крива).

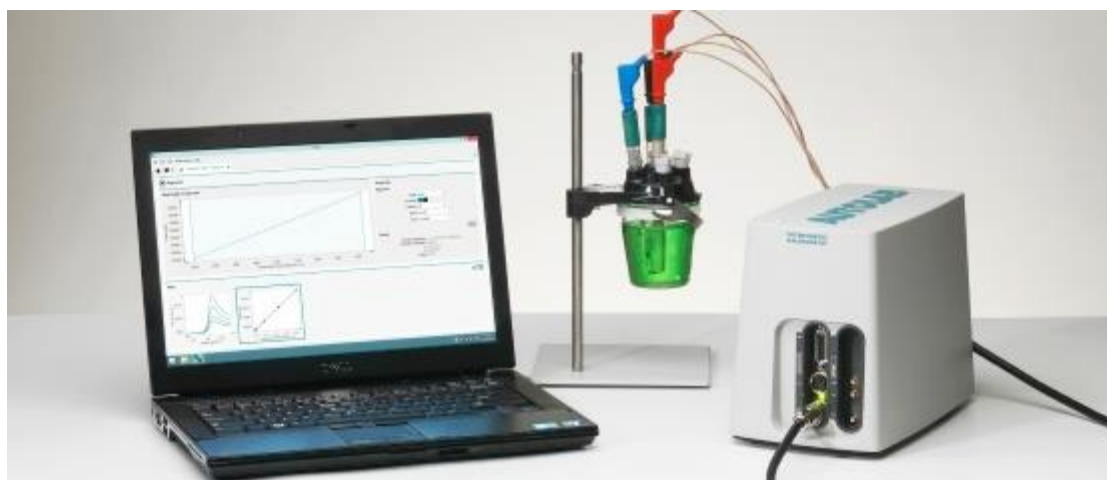
Карактеристични својства на секој волтамограм се: интензитет на струјата на максимумот (пикот); позицијата на струјниот максимум на потенцијалната оска (т.н. полубранов потенцијал во циклична волтаметрија); потенцијалната раздвоеност помеѓу оксидациониот и редукциониот пик во циклична волтаметрија (eng. peak-to-peak separation); полуширината на пикот (кај пулсните техники). Овие својства кај сите волтамограми главно зависат од; природата на анализот, природата на феномените на трансферот на маса, од бројот на разменети електрони во елементарен акт на електрохемиска трансформација помеѓу работната електрода и молекулите на анализот, од временската рамка на мерењето, како и од природата на хемиските реакции и површинските феномени што се случуваат на границата работна електрода/електролит во електрохемиската ќелија.

Позицијата на максимумот на пикот (или на пиковите) на потенцијалната оска е важен параметар што дава податоци за природата на анализот. За квантитативни аналитички цели, важно е да се знае интензитетот на Фарадеевата струја на волтамограмите. Фарадеевата струја се користи како квантитативна мерка за определување на концентрацијата на анализот и за кинетиката на редокс трансформацијата на молекулите од испитуваниот анализ на површината од работната електрода. Интензитетот (јачината) на Фарадеевата струја е функција од концентрацијата на анализот. Покрај тоа, Фарадеевата струја е функција и од други фактори како што се големината, формата и материјалот на работната електрода, омскиот отпор на

електролитниот систем, температурата, како и од бројот на електрони разменети во електродната реакција помеѓу работната електрода и молекулите од анализот.

### **1.3. Инструментација во волтаметриските експерименти**

Модерниот електроаналитички систем за волтаметриско мерење најчесто е составен од 3 модули: потенциостат, електрохемиска ќелија и компјутер (слика 3).



**Слика 3.** Потенциостат (десно) поврзан со три-електродна електрохемиска ќелија (средина) и со персонален компјутер. Карактеристичен систем што се користи во волтаметриските експерименти.

**Figure 3.** Potentiostat (right) connected to a three-electrode electrochemical cell (middle) and a personal computer. A set-up used in voltammetry

Кај голем дел од волтаметриските системи, потенциостатот може да оперира независно од другите компоненти присутни во целиот електрохемиски инструмент.

### **1.4. Потенциостат**

Потенциостатот е најважниот систем од секоја електрохемиска инструментација (слика 4).





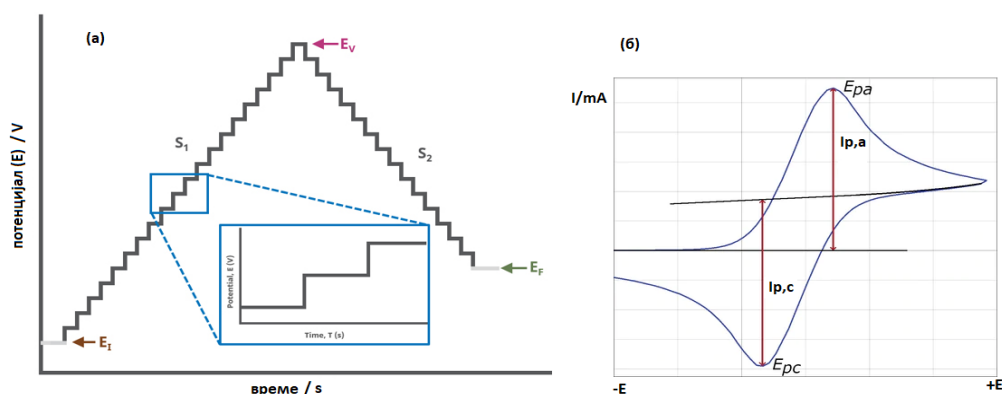
**Слика 4.** Потенциостат на AUTOLAB што е користен во дисертацијата  
**Figure 4.** AUTOLAB potentiostat that has been used in the experiments presented in this thesis

Во волтамметриските системи, улогата на потенциостатот е да го конвертира надворешниот потенцијал во соодветна потенцијална разлика што се нанесува помеѓу работната и референтната електрода. Притоа, електрохемискиот систем ги забележува промените на струјата што протекува низ електрохемиската ќелија. Оваа струја е резултат на сите хемиски и физички промени што се случуваат на границата работна електрода/електролит. Во склоп на потенциостат се интегрирани електрични кола, конвертори, амплификатори, како и микропроцесори со внатрешна меморија. Сите потенциостати дизајнирани после 1980-та оперираат дигитално. Кај овие потенциостати, како движечка сила во електрохемиските реакции главно се аплицира скалесто модулираниот потенцијал, при што во дадени потенцијални чекори се врши зголемување на потенцијалот за дадена константна вредност. Мерењето на струјата се врши во мал временски сегмент на крајот од линеарниот дел на скалестиот потенцијал. Главните придобивки од мерењето на струјата кај ваков скалесто-модулиран потенцијал се пресликуваат во минимизирање на капацитетните (непосакувани, паразитски) струи во однос на Фарадеевите струи [A. J. Bard, L. R. Faulkner, 2004.]. Главните електрохемиски техники што денес се применуваат како експериментални волтамметриски техники се цикличната и квадратно-брановата волтамметрија [Compton, Understanding voltammetry, 2010].

## 1.5. Главни карактеристики на цикличната волтамметрија (CV)

Цикличната волтамметрија (CV) е една од најприменуваните техники во електрохемиските студии. Нејзината примарна предност во однос на другите техники доаѓа од фактот дека таа дава сознание за двете полуреакции што се одвиваат на работната електрода, а во исто време дава информација и за хемиските и физичките феномени поврзани со електрохемиската реакција што се проучува. Така, CV се смета како еден вид на „електрохемиска спектроскопија“ [M. Eckert, F. Gutmann, H. Keyzer, 1986].

Во CV, почнувајќи од даден иницијален потенцијал што одговара на позицијата на точката  $E_i$  на слика 5а), потенцијалниот скалест сигнал се нанесува на работната електрода. После достигнувањето на дефиниран потенцијал што одговара на точката  $E_v$  на слика 5 а, ексцитациониот сигнал се движи во спротивна форма со идентичен чекор и се враќа до почетната вредност  $E_i$  (или  $E_F$ ).

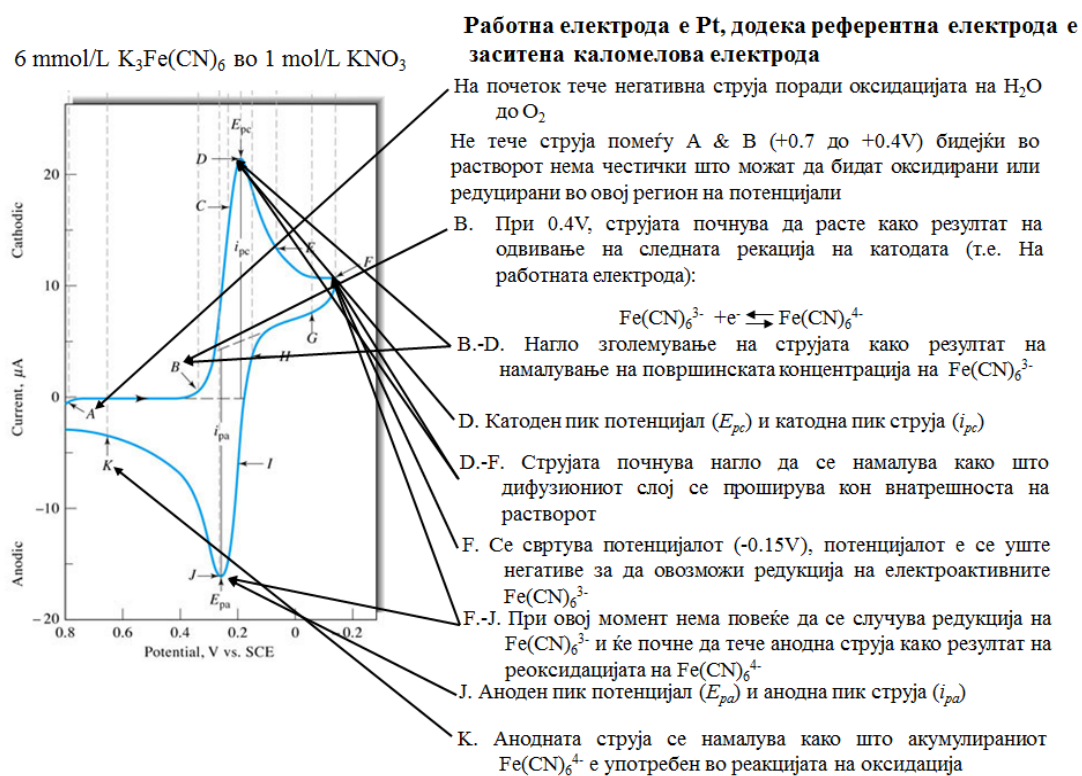


**Слика 5.** а) форма на потенцијалот (ексцитациониот сигнал во циклична скалеста волтамметрија); б) форма на експериментален цикличен волтамограм. Значењето на кратенките на сликата се; за сликата под (а):  $E_i$  е почетен потенцијал;  $E_F$  е краен потенцијал;  $E_v$  е потенцијал на свртување; за сликата под (б):  $E_{p,a}$  е потенцијал на анодниот пик  $E_{c,a}$  е потенцијал на катодниот пик;  $I_{p,a}$  е интензитет на струја на анодниот (оксидациски) пик;  $I_{p,c}$  е интензитет на струја на катодниот (редукциски) пик;

**Figure 5.** Form of the potential in cyclic staircase voltammetry (a); form of a cyclic staircase voltammogram (b). The meaning of the symbols is: (a):  $E_i$  starting potential;  $E_F$  is final potential;  $E_v$  is vertex potential; for (b):  $E_{p,a}$  is potential of the anodic (oxidation) peak;  $E_{c,a}$  is potential of the cathodic (reduction) peak;  $I_{p,a}$  is the magnitude of the current corresponding to anodic peak;  $I_{p,c}$  is magnitude of the current corresponding to the cathodic peak.

На ваков начин, преку инструменталниот одговор што се добива, постои можност за истовремен увид и во процесите на оксидација и во процесите на редукција што се случуваат на границата работна електрода/електролит, а се резултат на размена на електрони помеѓу молекулите на испитуваниот аналит и работната електрода. Најзначаен инструментален параметар во цикличната волтаметрија е брзината на промена на потенцијалот. Овој параметар се нарекува уште и брзина на скенирање и се бележи најчесто со симболот  $\nu$ . Брзината на промена на потенцијалот е дефинирана како промена на потенцијалот во единица време, или  $\nu = dE/t$ . Инструменталниот одговор што се добива во циклична волтаметрија е графикон на зависноста на измерената струја како функција од нанесениот потенцијал. Оваа крива во цикличната волтаметрија се нарекува „цикличен волтамограм„ (слика 5б). Цикличниот волтамограм е графикон што содржи еден, два или повеќе пикови. Секој од овие пикови отсликува дефиниран процес на размена на електрони помеѓу работната електрода и молекули од аналитот. Притоа, пиковите што се добиваат при т.н. анодна поларизација на работната електрода (т.е. при нанесување на позитивни потенцијали) се нарекуваат анодни (или оксидациски) пикови, додека пиковите што се добиваат при катодна поларизација на работната електрода се нарекуваат катодни (или редукциски) пикови. Кај најголем дел од потенциостатите струјата што се мери при катодна поларизација (од почетен позитивен кон краен негативен потенцијал, т.е. во редукциска насока) обично се дефинира како „негативна струја“ (има знак „-“), додека струјата што се мери во оксидациска насока (од негативен кон позитивен потенцијал) се дефинира како позитивна струја (има знак „+“). Постојат инструменти што функционираат според обратен редослед на предзнакот на катодната и анодната струја. Главни карактеристики на даден цикличен волтамограм се: потенцијалот на катодниот пик ( $E_{p,c}$ ); потенцијалот на анодниот пик ( $E_{p,a}$ ); интензитетот на струјата што одговара на катодниот пик ( $i_{p,c}$ ); интензитетот на струјата што одговара на максимумот од анодниот пик ( $i_{p,a}$ ) од цикличниот волтамограм. Покрај овие параметри, важен параметар во цикличните волтамограми е и т.н. *формален (или полубранов) потенцијал*  $E_f^{\circ}$  (или  $E_{p/2}$ ). Формалниот потенцијал е параметар што се дефинира како средна вредност од сумата на вредностите на потенцијалите на катодниот и анодниот пик ( $E_f^{\circ} = [E_{p,c} + E_{p,a}] / 2$ ). Во суштина, полубранобиот потенцијал е медијана

помеѓу  $E_{p,c}$  и  $E_{p,a}$  што се прикажани на слика 5б. Додека вредноста на полубрановиот потенцијал  $E_f^\ominus$  ни дава главно термодинамички информации поврзани со природата на испитуваниот аналит, вредностите на магнитудите на струите на катодните и анодните пикови даваат информации поврзани со концентрацијата на испитуваниот аналит. Покрај тоа, големината на струите на катодниот и анодниот пик даваат податоци и за брзината на размена на електрони што се случува помеѓу молекулите на аналитот и работната електрода. Рационално објаснување на најважните процеси што се одвиваат при електродните реакции во циклична волтамметрија се прикажани на слика 6. На оваа слика се објаснети карактеристичните феномени на експериментален волтамограм на соединението калиум хексацијаноферат (III).



**Слика 6.** Објаснување на најважните процеси што се отсликани на цикличен волтамограм добиен со електрохемиска реакција на 6 mmol/L  $K_3[Fe(CN)_6]$  на Pt работна електрода. Аналитот е растворен во електролитен воден раствор на  $KNO_3$  со  $c(KNO_3) = 1$  mol/L, а волтамограмот е снимен при брзина на скенирање од 75 mV/s [Гулабоски Р, Максимова В, Петропулос В, 2019].

**Figure 6.** Explanations of the most important processes of a cyclic voltammogram of 6 mmol/L  $K_3[Fe(CN)_6]$  on Pt working electrode. Analyte is dissolved in potassium nitrate with. Cyclic voltammogram is recorded at scan rate of 75 mV/s. [Гулабоски Р, Максимова В, Петропулос В, 2019].

Формата на цикличниот волтамограм дава информации за природата на електродната реакција, за бројот на електрони што се разменети во елементарниот чекор на електродна трансформација помеѓу молекулите од анализот и работната електрода, како и за хемиски реакции или физички феномени (атсорпција, кристализација и слично) што се тесно поврзани со електрохемиската реакција што се одвива на работната електрода.

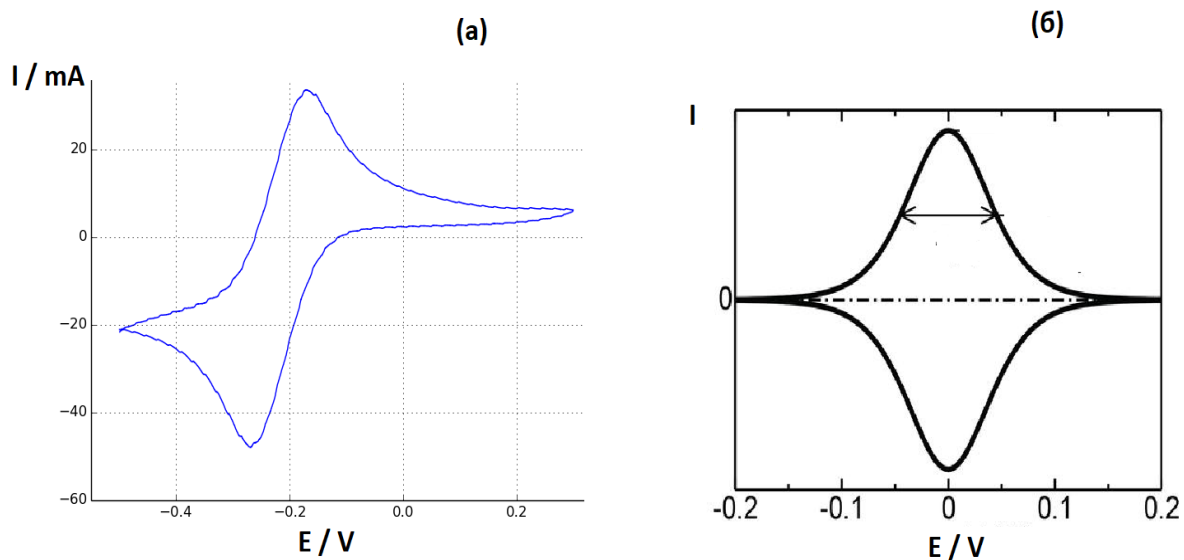
Така на пример, на слика 7а е прикажан цикличен волтамограм анализ каде трансферот на маса од растворот кон површината на работната електрода се одвива преку процес на дифузија, додека на слика 7б е даден цикличен волтамограм каде што електродната трансформација на молекулите од анализот се одвива од адсорбирана состојба.

Волтамограмот прикажан на слика 7б е карактеристичен волтамограм за техниката наречена „протеин-филм волтамметрија“ [F. A. Armstrong 2002; F. A. Armstrong et al. 2011, F. A. Armstrong, 1997; F. A. Armstrong, 2002; F. A. Armstrong, et al. 1997].

Како што може да се забележи од графицие прикажани на слика 7, формата на волтамограмите кај двата процеси дифузијски-контролиран (а) и површинска електродна реакција (б) значително се разликува.

Имено, кај дифузијски-контролираниот волтамограм (а) постои т.н. дифузијска опашка“ на крајот од волтамограмот, додека оваа карактеристика на постои кај цикличните волтамограми од површинските електродни реакции (б).

Според оваа едноставна воочлива карактеристика на цикличните волтамограми, може лесно да се утврди природата на процесите на трансфер на маса што се вклучени во електродната трансформација на молекулите од анализот што е од интерес (лекот во оваа дисертација).

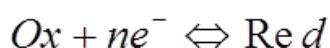


**Слика 7.** (а) Цикличен волтамограм карактеристичен за електрохемиска дифузиона реакција и (б) цикличен волтамограм карактеристичен за електрохемиски реакции кај кои анализот е адсорбиран на површината од работната електрода.

**Figure 7.** Features of a cyclic voltammogram typical of a diffusional electrode reaction (a) and that of a surface confined electrode reaction (b).

### 1.6. Дефинирање на критериуми за реверзибилност во циклична волтаметрија

Во електрохемијата, од голема важност е познавањето терминологијата за дефинирање на критериумите за т.н. „електрохемиската реверзибилност“ на електродните реакции. Да земеме за пример една електрохемиска реакција што може да се запише со следната реакциона шема:



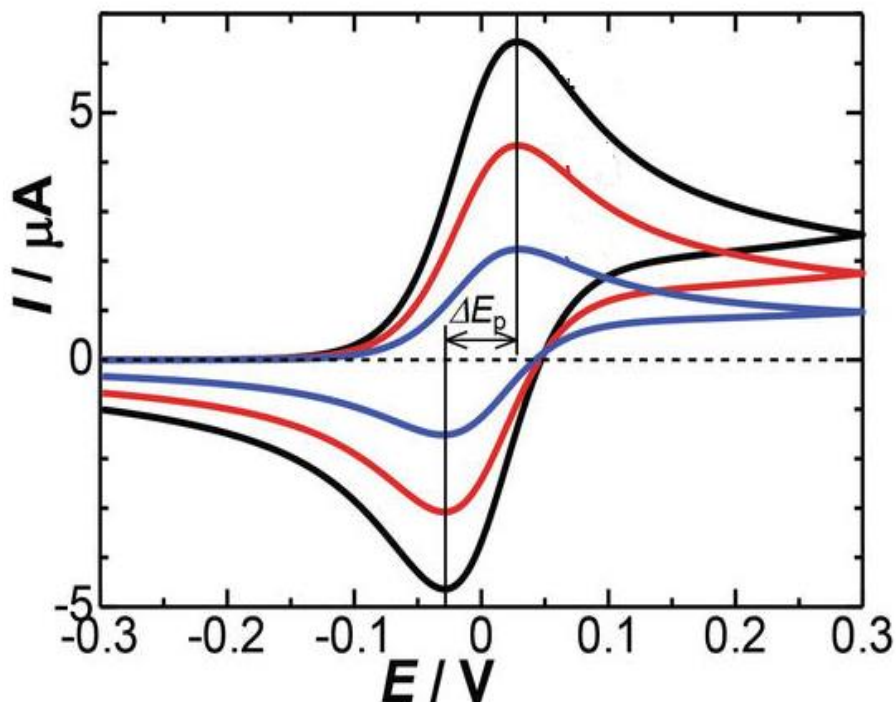
За електродната реакција од горната шема дефиницијата за електрохемиски реверзибилна реакција е кога брзината на трансфер на електрони помеѓу молекулите од анализот и работната електродата е значителна и при тој процес на размена на електродни не постојат термодинамички бариери за одвивање на електродната реакција. Кај електрохемиските реверзибилни процеси, брзината на редукција на анализот **Ox** во продукт **Red** е еднаква на брзината на ре-оксидација на продуктот на електрохемиската реакција **Red** во

почетната оксидирана форма на анализот **Ox** [Compton et al., Understanding Voltammetry, 2010]. Ако процесот на трансфер на електрони помеѓу електродата и молекулите од анализот е многу побрз од брзината на процесите на дифузија на електроактивните молекули од Ox и Red формите од растворот кон површината на работната електрода и обратно, тогаш велиме дека електродната реакција е електрохемиски реверзибилна. Во ваков случај, сепарација  $\Delta E_p$  помеѓу катодниот и анодниот пик од цикличниот волтамограм се дефинира со изразот [Compton et al., Understanding Voltammetry, 2010]:

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

Притоа, кај едноставен дифузиски контролиран електрохемиски реверзибилен процес, каде се разменува еден електрон помеѓу работната електрода и една молекула од анализот, сепарација помеѓу катодниот и анодниот пик  $\Delta E_p$  треба да изнесува околу 59 mV на 25 °C. Покрај тоа, за електрохемиски реверзибилни процеси, сепарација (потенцијалното раздвојување) помеѓу катодниот и анодниот пик  $\Delta E_p$  треба да аима константна вредност при различни брзини на промена на потенцијалот. Притоа, кај ваквите електрохемиски реверзибилни реакции, односот на интензитетите на струите на двата пикови на катодната и анодната струја од цикличните волтамограми ( $I_{p,c}/I_{p,a}$ ) треба да биде 1 или блиску до 1 при голем распон на брзини на промени на потенцијалот.

Ова се дефиниции за релевантните критериуми во циклична волтаметрија за т.н. електрохемиска реверзибилност што важат кај процесите каде трансферот на маса е контролиран со дифузија на молекулите од анализот. Приказ на волтамограми што отсликуваат електрохемиски реверзибилен процес е даден на слика 8.



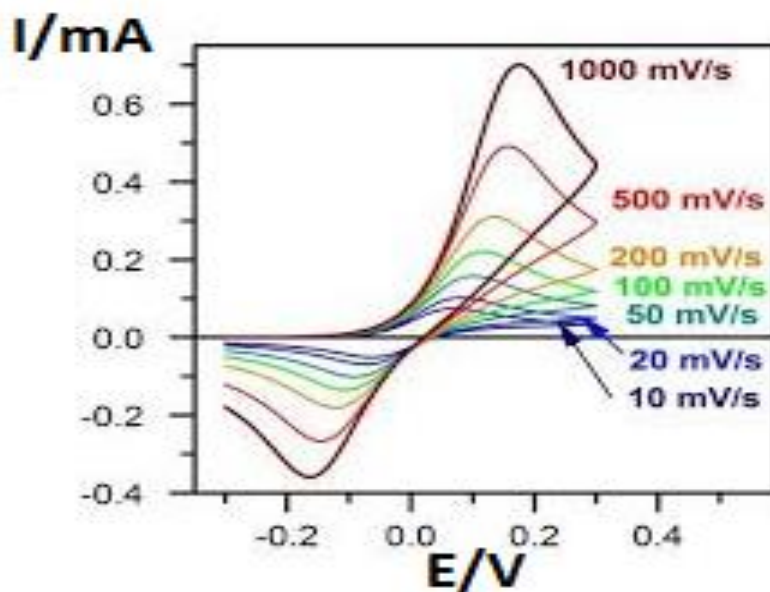
**Слика 8.** Циклични волтамограми на 0.1 mmol/L  $K_4[Fe(CN)_6]$  снимени во pH = 7, при брзини на скенирање на 10 mV/s (крива со сина боја), 50 mV/s (крива со црвена боја) и 100 mV/s (крива со црна боја). Константноста на сепарацијата помеѓу оксидацискиот и редукацискиот пик од цикличните волтамограми при различни брзини на промена на потенцијалот и зависноста на пик струите како функција од квадратен корен од брзина на промена на потенцијал се критериум за електрохемиски реверзибилен дифузионо контролиран електроден процес.

**Figure 8.** Cyclic voltammograms of 0.1 mmol/L  $K_4[Fe(CN)_6]$  recorded in buffer solution with pH = 7, at scan rates of 10 mV/s (blue curve); 50 mV/s (red curve), and 100 mV/s (black curve). The constant peak-to-peak separation between the anodic and cathodic peaks recorded at different scan rates, as well the linear dependence between the peak currents and the square root of applied scan rates are criteria to define diffusional electrode mechanism.

Доколку при експерименталните електрохемиски анализи се забележи отстапување од овие критериуми, тоа отстапување е индикатор за електрохемиска квазиревезрибилност или електрохемиска иреверзибилност. Овие појави се најчесто поврзани со бавен процес на размена на електрони помеѓу молекулите од анализот и работната електрода.

Приказ на циклични волтамограми што се поврзани со спор процес на размена на електрони помеѓу молекулите на анализот (лекот) и работната електрода се прикажани на слика 9.





**Слика 9.** Циклични волтамограми на 0.2 mM  $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$  снимени во  $KNO_3$  со концентрација од 0.05 mol/L. Волтамограмите отсликуваат одвивање на квазиреверзибилен едноелектронски дифузионо контролиран електроден процес, при кои потенцијалната сепарација помеѓу анодниот и катодниот пик се зголемува со зголемување на брзината на промена на потенцијалот. Волтамограмите се снимени при различни брзини на промена на потенцијалот што се дадени во графиконот.

**Figure 9.** Cyclic voltammograms of  $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$  recorded in water solution of 0.05 mol/L  $KNO_3$ . The voltammograms portray a quasireversible electrode mechanism, which is controlled by diffusion. In this case, the peak-to-peak separation between the oxidation and the reduction peaks depends on the applied scan rate.

Како што може да се забележи од слика 9, доаѓа до зголемување на потенцијалната сепарација помеѓу катодниот и анодниот пик со зголемување на брзината на промена на потенцијалот.

Овој феномен е важен индикатор што укажува на бавен процес на размена на електрони помеѓу работната електродата и молекулите (или јоните) од испитуваниот аналит.

Важно е да се дефинира дека во случаи кога се работи за електрохемиски реверзибилна и дифузионо контролирана електродна реакција на даден аналит, во тој случај концентрацијата на електроактивните молекули од аналитот е поврзана со магнитудата на та на пикот  $I_p$  преку т.н. Randles-Sevcik-овата равенка (IV) што е дефинирана со формулата:

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 n^{3/2} A c_o \sqrt{Dv} \quad (IV)$$

Во горната формула (IV), значењето на симболите е:

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

$c_o$  -почетна концентрација на електроактивниот аналит во растворот ( $\text{mol/L}$ )

$D$ -коефициент на дифузија на молекулите (или јоните) на аналитот ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ )

$n$ -број на разменети електрони помеѓу работната електрода и молекулите на аналитот

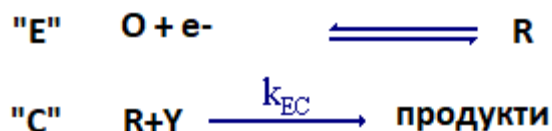
$v$ -брзина на промена на потенцијал ( $\text{V/s}$ )

Равенката (IV) има повеќекратна примена. Имено, бидејќи вредноста на јачината на струјата  $I_p$  е пропорционална со почетната концентрација  $c_o$  на аналитот присутен во електрохемиската ќелија, преку изразот (IV) е можно да се изврши квантитативно определување на испитуваниот аналит. Покрај тоа, преку зависноста на  $I_p$  од  $v^{1/2}$  може да се добијат информации дали процесот на трансфер на маса на молекулите на аналитот од електродата кон растворот и обратно е контролиран преку дифузија. Во ситуација кога трансферот на маса од молекулите на аналитот е контролиран од брзината на дифузија на молекулите од аналитот од растворот до површината на работната електрода и обратно, тогаш струјата на пикот  $I_p$  (и од катодниот и од анодниот пик) ќе биде линеарна функција од  $v^{1/2}$ . Притоа, од нагибот на правата линија на зависност  $I_p$  како функција од  $v^{1/2}$ , можно е да се определи магнитудата коефициентот на дифузија  $D$  на молекулите од аналитот (лекот).

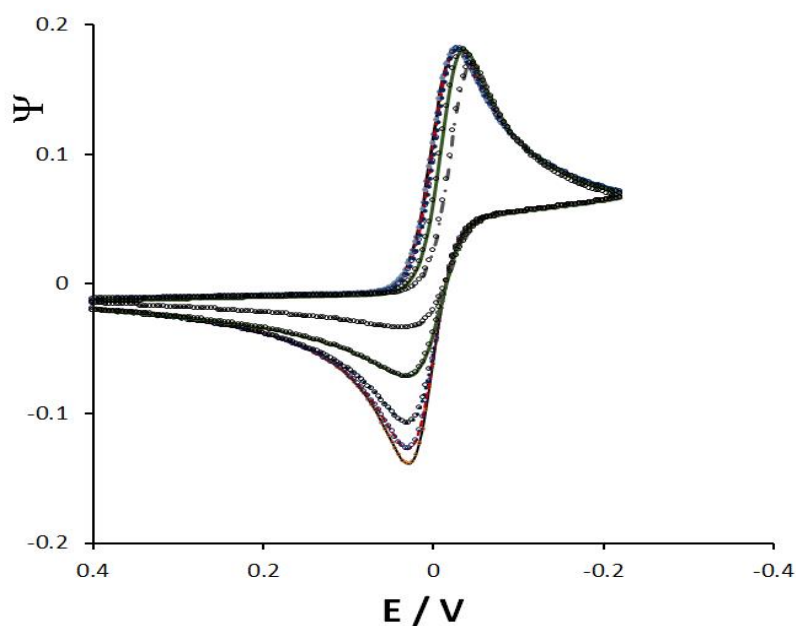
### **1.7. Примена на цикличната волтамметрија за следење на механизмот на некои едностепени електродни реакции поврзани со хемиски реакции**

Цикличната волтамметрија е техника што може да се употреби како инструментална алатка за квалитативно и квантитативно определување на голем број аналити. Покрај тоа, оваа техника може да се користи и како алатка што овозможува увид во механизмите во кои е вклучен аналитот што е од интерес. Така на пример, доколку продуктот (R) добиен при електродната трансформација на молекулите од аналитот („O“) може да стапи во

дополнителна иреверзибилна хомогена хемиска реакција во системот, таквиот механизам се нарекува „ЕС механизам“. Притоа, со „Е“ се дефинира електрохемискиот чекор од „ЕС“ реакцијата, додека симболот „С“ означува хемиска реакција. ЕС реакциониот механизам може да се претстави со следната шема:



За овој тип на електроден механизам, кај дифузиски контролиран процес на трансфер на маса на молекулите од анализот, цикличните волтамограми што се симулирани при различни брзини на промена на потенцијалот се прикажани на слика 10.

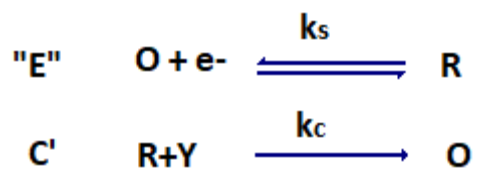


**Слика 10.** Приказ на циклични волтамограми за дифузиски „ЕС механизам“, симулирани при брзина на промена на потенцијалот од 10 mV/s и при различни концентрации на супстратот „Y“ (концентрацијата на супстратот „Y“ се зголемува од 1 mmol/L до 10 mmol/L со чекор на зголемување од 2 mmol/L кај секој од волтамограмите одејќи од тој со највисока анодна струја кон волтамограмот чиј пик има најниска анодна струја).

**Figure 10.** Cyclic voltammograms of a so-called “diffusional EC mechanism” calculated at scan rate of 10 mV/s. Cyclic voltammograms are simulated at concentration of substrate “Y” from 1 mmol/L to 10 mmol/L with step of increasing by 2 mmol/L going from voltammogram with highest to voltammogram with lowest backward (anodic) peak current.

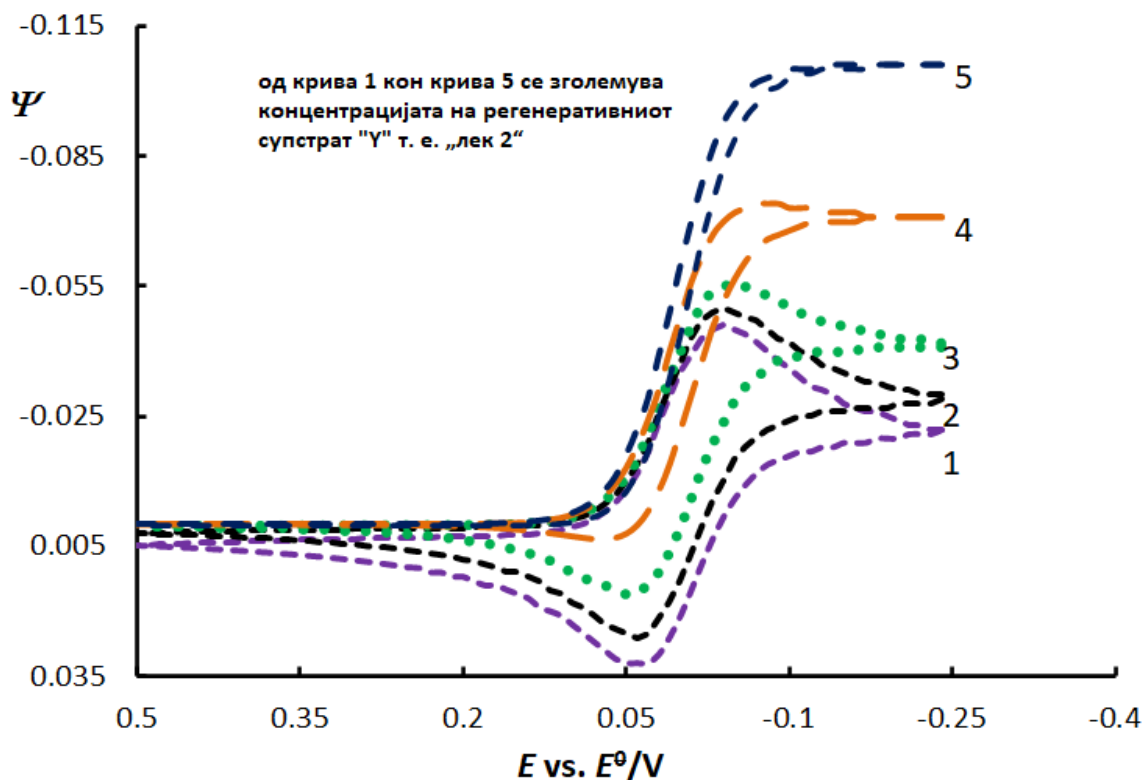
Од цикличните волтамограми на слика 10 може да се забележи дека зголемувањето на концентрацијата на супстратот „Y“ во техниката циклична волтаметрија не предизвикува промени во големината на струјата на редукциските пикови од волтамограмите. Меѓутоа, формата и магнитудата на струјата на оксидациските пикови на цикличните волтамограми на слика 10 силно зависи конценттацијата на супстратот „Y“. Притоа, со зголемување на концентрацијата на супстратот „Y“, интензитетот на оксидациските пикови од цикличните волтамограми се повеќе се намалува. Овој феномен се должи на зголемувањето на брзината на хемиската реакција помеѓу продуктот на електродната реакција „R“ и молекулите (или јоните) од супстратот „Y“ присутен во растворот, при што „R“ се конвертира во електрохемиски неактивен продукт (или продукти). При големи брзини на промена на потенцијалот, цикличните волтамограми добиени за овој „EC“ електроден механизам се идентични со цикличните волтамограми што се добиваат за едноставна реверзибилна електрохемиска реакција од типот  $O + ne^- \leftrightarrow R$ . Бидејќи при големи брзини на промена на потенцијалот, временската скала за одвивање на хемиската реакција е мала, во тој случај не постои доволно долго време за хемиска реакција на електрохемискиот продукт R и реактантот (супстратот) „Y“.

Друг важен електроден механизам што е значаен во електрохемијата, а може да се дијагностицира релативно едноставно со волтамметрија е т.н. електрохемиски-каталитички (или регенеративен) EC' електроден механизам [Gulaboski R, Mirceski, V (2015)]. Електродниот регенеративен EC' механизам може да се претстави со следната генералн шема:



Кај овој електроден механизам, со „E“ повторно е означен чекорот на електродната (електрохемиска) трансформација на „O“ во „R“, додека со симболот C' е означен хемискиот (каталитичкиот регенеративен) чекор. Со „Y“ е означен т.н. „електрохемиски неактивен“ супстрат што има својство хемиски да реагира со продуктот на електрохемиската реакција R, при што во таа хемиска реакција повторно се регенерираат молекулите од почетниот аналит

„O“. Цикличните волтамограми што го прикажуваат ефектот на зголемувањето на концентрацијата на реагенсот „Y“ кај електродниот регенеративен (EC') механизам се претставени на слика 11.



**Слика 11.** Влијание на концентрацијата на супстратот „Y“ врз својствата на цикличните волтамограми симулирани кај т.н. „дифузионен регенеративен EC' електроден механизам“ [R. Gulaboski, in *Electrochemical Dictionary*, 2<sup>nd</sup> edition 2012]

**Figure 11.** Influence of regenerative substrate “Y” concentration to the cyclic voltammograms simulated at diffusional regenerative EC' electrode mechanism [R. Gulaboski, in *Electrochemical Dictionary*, 2<sup>nd</sup> edition, 2012]

Како што се забележува од волтамограмите на слика 11, зголемувањето на концентрацијата на супстратот „Y“ е проследено со намалување на магнитудата на струјата на анодниот (оксидациски) пик. Во исто време, зголемувањето на концентрацијата на супстратот „Y“ предизвикува зголемување на интензитетот на редукцискиот пик од цикличните волтамограми. Овој феномен е резултат на зголемување на брзината на хемиската реакција на конверзија на електрохемиски генерираниот продукт „R“ во почетниот реактант „O“, што се случува при зголемување на

концентрацијата на супстратот „Y“. Така, со зголемување на концентрацијата на супстратот „Y“ во електрохемиската ќелија, оксидациската струја (што е директно пропорционална со концентрацијата на формата „R“) ќе се намалува пропорционално со зголемувањето на концентрацијата на супстратот „Y“. Притоа, струјата што соодветствува на процесот на редукција ќе се зголемува пропорционално со зголемувањето  $c(Y)$  поради зголемената регенерација на почетниот реактант O во текот на мерењето на струјата во електрохемискиот експеримент кај овој механизам. Покрај тоа, карактеристично својство на волтамограмите кај овој EC' механизам е и зголемувањето на вредноста на струјата што е измерена во подрачјето после одвивањето на Фарадеевиот процес (струјата што се детектира десно на крајот од волтамограмите) со зголемувањето на концентрацијата на супстратот „Y“. Овие карактеристики на цикличните волтамограми добиени при зголемување на концентрацијата на супстратот „Y“ се типични за дијагностицирање на регенеративниот EC' механизам (слика 11). Во суштина, теоретската и експерименталната студија на некои од карактеристиките на овој EC' регенеративен (или т.н. електрохемиски каталитички) електроден механизам, кај дифузии и површински електродни механизми, се главна цел во оваа дисертација.

Треба да се нагласи дека постојат огромен број на комплексни електродни механизми, што се проследени со електродни трансформации во два или повеќе чекори, комплицирани со различни хемиски реакции на секој од електродните чекори. Дури и кај ваквите комплексни електродни механизми, цикличната волтаметрија нуди можности и критериуми за дијагностицирање на ваквите електродни системи [J. M. Saveant, 2006].

## 2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

### 2.1. Примена на волтаметријата за анализа на интеракции помеѓу лекови

Во последниве триесетина години развиени се голем број на методи за волтаметриска детекција на лекови [M. Eckert, F. Gutmann, H. Keyzer, 1986; M. Stratmann, G. S. Wilson, 2002; H. Rieger, 1994; N. Barlett, 2008;]. Покрај студирањето на дифузионо-контролираните електродни механизми, големо внимание е посветено и на т.н. *површински електроди реакции* во услови на циклична волтаметрија [Gulaboski, R. Kokoskarova, P., Petkovska, S. (2020); J. M. Savéant, (2008); Compton R. et al, Understanding Voltammetry, 2010]. Површинските електродни механизми се значајни системи кај кои се овозможува квантификација на липофилни лекови и ензими во ниски концентрации [F. A. Armstrong, 1997; F. A. Armstrong, 2011; F. A. Armstrong 2002; Léger C., and P. Bertrand, (2008); Leger C. Et al (2003)]. Кај површинските реакции, почетната форма на лекот има својства силно да се адсорбира од водени раствори на површината од работната електрода. Голем број на лекови можат да се детектираат со волтаметриски техники на лесен и едноставен начин со техниката „протеин-филм волматерија“ [F. A. Armstrong, 2011]. Секако, евтината инструментација, брзото време на анализа и големите можности за анализа на механизмите на електродна трансформација на различни лекови ја прават цикличната волтаметрија погодна инструментална алатка во аналитиката на лекови. Покрај можностите за квантификација на голем број на хидрофилни и липофилни лекови, цикличната волтаметрија е погодна техника и за определување на брзината на хемиски интеракции помеѓу два дефинирани лекови, како и на константата на рамнотежа на реакцијата помеѓу два дефинирани лекови (или константа на комплексирање, кога се формира стабилен комплекс помеѓу лековите). Во нашиот скорешен прегледен труд, даден е приказ на голем број на физички параметри што се поврзани со хемиски интеракции на различни лекови, евалуирани со помош на циклична волтаметрија [Gulaboski et al., 2020]. Во Табела 1 од овој труд, прикажани се најголем дел од трудови од понов датум, во кој се студирани интеракциите помеѓу разни лекови (или помеѓу лекови и DNA) со употреба на волтаметриски техники.

**Табела 1.** Експериментални физички параметри за константи на стабилност помеѓу некои лекови, или помеѓу лекови и метални катјони или лекови и DNA, определени со волтаметриски техники

**Table 1.** Experimental physical parameters of the stability constants between defined drugs, drugs and metal cations, and drugs-DNA, determined by voltammetric techniques

Лекови што стапуваат во хемиска интеракција	Експериментални услови	Константа на стабилност	Референца
Novobiocin and cysteine	pH of 5.00; 7.00; and 9.00 HMD electrode	$3,06 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (in pH of 5.00) $1,06 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (pH of 7.0) $1,06 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (pH of 9.00)	[E. Bicer, P. Qetinkaya, J. Chil. Chem. Soc. 54 (2009) 46]
Anthracycline calf thymus DNA	pH = 7.00 Glassy carbon electrode	$4.44 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	[M. S. Ibrahim, <u>Anal. Chim. Acta</u> 443 (2001) 63]
Ortho 2-(5-fluoro-2,4 dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-N-(pyridin-2-yl) acetamide-DNA	pH = 7.16 Glassy carbon electrode	$2.33 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	[Da-An Qin, X-Q. Cai, Q. Miao, Z-H. Wang, M-L. Hu, Int. J. Electrochem. Sci., 9 (2014) 1608 ]
Meta 2-(5-fluoro-2,4 dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-N-(pyridin-2-yl) acetamide -DNA	pH = 7.16 Glassy carbon electrode	$6.60 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	[Da-An Qin, X-Q. Cai, Q. Miao, Z-H. Wang, M-L. Hu, Int. J. Electrochem. Sci., 9 (2014) 1608]
flutamide (4-nitro-3-trifluoromethylisobutylanilide)-DNA	pH = 7.00 CPE (carbon paste electrode)		[K. Pradeep, R. Brahman, A. Dar, K. S. Pitre, <u>Arab. J. Chem.</u> 9 (2016) S1884]
moxifloxacin (MOXI) in tablets-Cu(II) ion	pH = 8.00 HMDE		[M. A. G. Trindade, P. A. C. Cunha, T. A. de Araújo, G. M. da Silva, V. S. Ferreira, <u>Eclética Química</u> 31 (2006) dx.doi.org/10.1590/S0100-46702006000100004]
Omeprazole-azithromycin	pH = 7.40 Glassy carbon electrode	$3.930 \mu\text{M}^{-1}$	[M. A. Ghandour, A. Hassan, H. M. Ali, Int. J. Pharm. Sci. Res. 13 (2017) 5183]
Omeprazole-clarithromycin	pH = 7.40 Glassy carbon electrode	$0.985^{-1}$	[M. A. Ghandour, A. Hassan, H. M. Ali, Int. J. Pharm. Sci. Res. 13 (2017) 5183]
Omeprazole-roxithromycin	pH = 7.40 Glassy carbon electrode	$0.321 \mu\text{M}^{-1}$	[M. A. Ghandour, A. Hassan, H. M. Ali, Int. J. Pharm. Sci. Res. 13 (2017) 5183]
Omeprazole- doxycycline	pH = 7.40 Glassy Carbon electrode	$8.230 \mu\text{M}^{-1}$	[M. A. Ghandour, A. Hassan, H. M. Ali, Int. J. Pharm. Sci. Res. 13 (2017) 5183]
Doxorubicin (DXH)-DNA	pH = 7.40 Glassy Carbon	$5.00 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	[F. Perveen, N. Arshad, R. Qureshi, J. Nowsherwan, A.



	electrode		Sultan, B. Nosheen, H. Rafique, Plos One, 13 (2018) doi: 10.1371/journal.pone.0205764]
Epirubicin (EpiDXH)-DNA	pH = 7.40 Glassy Carbon electrode	$0.11 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	[F. Perveen, N. Arshad, R. Qureshi, J. Nowsherwan, A. Sultan, B. Nosheen, H. Rafique, Plos One, 13 (2018) doi: 10.1371/journal.pone.0205764]
Daunorubicin (DNR)-DNA	pH = 7.40 Glassy Carbon electrode	$17.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	[F. Perveen, N. Arshad, R. Qureshi, J. Nowsherwan, A. Sultan, B. Nosheen, H. Rafique, Plos One, 13 (2018) doi: 10.1371/journal.pone.0205764]
Doxorubicin hydrochloride- calf thymus DNA	pH = 7.40 Glassy carbon electrode	$1.05 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	[P. S. Guin, S. Das, Int. J. Electrochem. (2014) doi.org/10.1155/2014/517371]
Acetaminophen (paracetamol) - antidepressant drugs ((a) fluoxetine, (b) sertraline and (c) nortriptyline)	pH = 7.0 Glassy carbon electrode		[D. Nematollahi, B. F. Barnaji, A. Amani, Iran. J. Pharm. Res. 14 (2015) 1115.]
Cobalt(III) Schiff Base Complex [trans-[Co(salen)(DA) <sub>2</sub> ][ClO <sub>4</sub> - CT-DNA	pH=7.40 Glassy carbon electrode	$1.31 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	[S. Ambika, Y. Manojkumar, S. A. B. Gowdhami, K. K. M Sundaram, R. V. Solomon, P. Venuvanalingam, M. A. Akbarsha, M. Sundararaman, Sci. Rep. 9 (2019) doi: 10.1038/s41598-019-39179-1]
Cobalt(III) Schiff Base Complex trans-[Co(salophen)(DA) <sub>2</sub> ][ClO <sub>4</sub> (DA – dodecylamine)]- CT-DNA	pH=7.40 Glassy carbon electrode	$3.15 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	[S. Ambika, Y. Manojkumar, S. A. B. Gowdhami, K. K. M Sundaram, R. V. Solomon, P. Venuvanalingam, M. A. Akbarsha, M. Sundararaman, Sci. Rep. 9 (2019) doi: 10.1038/s41598-019-39179-1]
Dopamine (DA)- herring sperm deoxyribonucleic acid (ds-DNA)	pH = 7.00 Glassy carbon electrode modified with silver-doped Poly Cysteine membrane	$1.08 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	[X. Wang, L. Sun, N. Zou, Z. Yu, Int. J. Electrochem. Sci., 10 (2015) 7320]
Epinephrine (Epi)- Fe <sup>3+</sup>	pH = 7.40 Boron-doped diamond electrode		[J. Korac, D. M. Stankovic, M. Stanic, D. Bajuk-Bogdanovic, M. Zizic, J. Bogdanovic Pristov, S. Grguric-Sipka, A. Popovic-Bijelic, I. Spasojevic, Sci. Reports 8 (2018) doi:10.1038/s41598-018-21940-7]
Epinephrine (Epi)- Fe <sup>2+</sup>	pH = 7.40		[J. Korac, D. M. Stankovic, M.

	Boron-doped diamond electrode		Stanic, D. Bajuk-Bogdanovic, M. Zizic, J. Bogdanovic Pristov, S. Grguric-Sipka, A. Popovic-Bijelic, I. Spasojevic, Sci. Reports 8 (2018) doi:10.1038/s41598-018-21940-7]
Cu(II) complex-DNA	Glassy carbon electrode	$27.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	[N. Arshad, S. I. Farooqi, Cyclic Voltammetric Appl. Biochem. Biotechnol. 186 (2018) 1090]
Zn(II) complex-DNA	Glassy carbon electrode	$64.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	[N. Arshad, S. I. Farooqi, Cyclic Voltammetric Appl. Biochem. Biotechnol. 186 (2018) 1090]
Ceftriaxone with phenylalanine	pH = 7.00 Glassy carbon electrode	$1.32 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	[H. S. Sayiner, T. Bakir, F. Kandemirli, Bulg. Chem. Comm. 50 (2018) 398]
Pyrimethamine with dsDNA	pH = 7.00 Glassy carbon electrode	$4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	[A. E. Radi, H. M. Nassef, M. I. Attallah, Anal. Meth. 10 (2015) 4159]
[CuL <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub> xH <sub>2</sub> O where L= 1-amidino-O-ethylurea with DNA	pH = 7.20 Pt electrode	$1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	[A. B. Devi, N. R. Singh, M. D. Devi, J. Chem. Pharm. Res. 3 (2011) 789]
Noglamycin with DNA	pH of 7.00 Glassy carbon electrode	$4.44 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	[M. S. Ibrahim, Anal. Chim. Acta 443 (2001) 63]
Ciprofloxacin with DNA	pH = 7.00 Glassy carbon electrode modified with multiwalled nano tubes +DNA	$2.90 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	[L. Fotouhi, Z. Atoofi, M. M. Heravi, Talanta 103 (2013) 194]
Tyrosine with DNA	pH = 7.00 Glassy carbon electrode	$3.98 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	[L. Fotouhi, R. Tabatabaee, Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 121 (2014) 152]
Sulfadiazine with DNA	pH = 7.00 GCE modified with nano multiwalled tubes	$2.87 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	[L. Fotouhi, A. B. Haskavayi, M. M. Heravi, Int. J. Biol. Macromol. 53 (2013) 101]

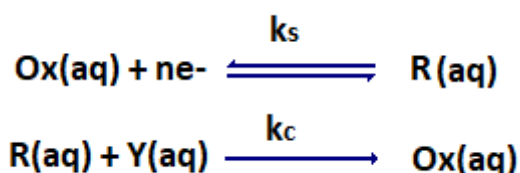
\*M<sup>-1</sup> = mol<sup>-1</sup>dm<sup>3</sup>: \*\*HMDE-живина електрода: GCE – glassy carbon electrode

Голема број на податоци за интеракциите на метиленско сино со различни класи на лекови, евалуирани со употреба на квадратно-бранова волтеметрија, можат да се најдат и во [Милкица Јанева, 2022, *Докторска дисертација*, УГД Штип].

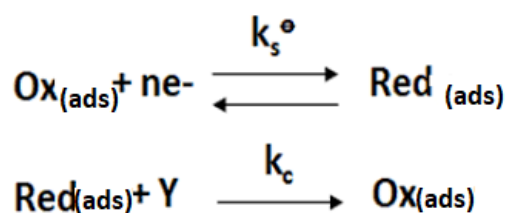
### 3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Главната цел на докторскиот труд е да се разработат едноставни методи во услови на циклична скалеста волтаметрија за примена на електрохемиските регенеративни електродни механизми во аналитиката на евалуација на интеракции помеѓу два дефинирани лекови. Притоа, планирано е да се развијат математички теоретски модели за четири регенеративни електродни механизми и тоа:

**A.** Регенеративен дифузиски електрохемиски (EC') механизам за студирање на хидрофилни лекови (и двата лекови што се студираат се добро растворливи во вода и не постојат адсорпциски феномени на нивните молекули на површината од работната електрода), што можат да стапат во иреверзибилни интеракции;



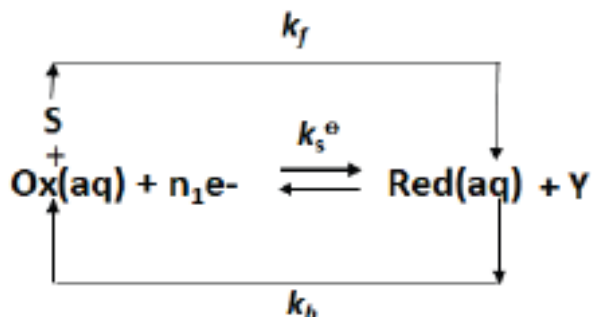
**B.** Регенеративен електрохемиски механизам за студирање на липофилни лекови што можат да стапат во иреверзибилни интеракции со хидрофилни или липофилни лекови (површински EC' механизам), според следната реакциона шема:



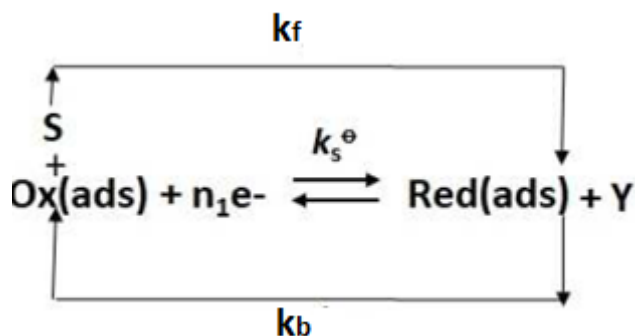
**B.** Следен теоретски модел што ќе биде разработен во овој докторски труд е моделот за *Регенеративна електрохемиска реакција на два хидрофилни лекови*, каде постои *реверзибилна хемиска рамнотежа* помеѓу хидрофилен лек „O„ и лекот „S„

Ова е нов теоретски модел, каде се дефинира дека постои *хемиска рамнотежа помеѓу два хидрофилни лекови уште пред апликација на потенцијал*. Овој модел, покрај определувањето на константа поврзана со

брзина на интеракција помеѓу двата лекови, овозможува да се пресмета и константата на стабилност (доколку се формира стабилен комплекс) помеѓу двата лекови



Г. Последниот теоретски модел што ќе биде обработен во докторскиот труд е моделот за Регенеративна електрохемиска реакција на *липофилен електрохемиски активен лек (Ox)* и *друг хидрофилен лек "S"* каде постои *реверзибилна хемиска рамнотежа* помеѓу лекот „O„ и лекот „S„.



И овој модел е целосно нов и е решен за прв пат во услови на циклична скалеста волтаметрија.

Терминологија кај ови механизми претставен со шемите погоре е следната: "Ox" е симбол за оксидираната форма на дефиниран „електрохемиски„ активен лек (пр. 2,5-dihydroxy benzoquinone, и сл.) што може да се редуцира до продукт „Red“ на работната електрода. Со „Y“ е означен лекот што го даваме во системот или т.н. регенеративен реагенс, кој има својство да реагира со продуктот на електрохемиската реакција Red и при таа хемиска реакција повторно да се регенерира почетниот аналит Ox. Регенеративен реагенс "Y" треба да е електрохемиски неактивен (во подрачјето каде што се случува електрохемиската активност на аналитот "Ox") и да е присутен во поголема концентрација од "Ox". "S" е супстрат кај

механизмите со реверзибилна регенеративна реакција, што реагира со почетната форма на лекот „Ox“ и постои хемиска рамнотежа уште пред аплицирање на потенцијална разлика. Со симболот „ $k_s$ “ е означена стандардна константа на пренос на електрони што ја отсликува брзината на размена на електрони помеѓу работната електрода и редокс формите на лековите „Ox“ и „Red“, „ $k_c$ “ е константа на хемиска реакција кај механизмите со иреверзибилна хемиска регенеративна реакција, додека  $k_f$ ,  $k_b$ , се ознаки за константите на брзината на директната и повратната хемиска реакција во механизмите со реверзибилна регенеративна хемиска реакција. Оznakите „aq“ и „ads“ означуваат водорастворлив и адсорбиран, соодветно.

Теоретските модели се евалуирани со решавање на соодветни диференцијални равенки за дефинираните системи. Аналитичките решенија од теоретските модели се аплицирани во симулациски програм MATHCAD каде се извршени сите релевантни симулации. Преку теоретските модели за горенаведените електродни механизми, разработени се методи за квантитативно определување на дефинирани лекови. Покрај тоа, во ситуација каде постојат интеракции помеѓу два дефинирани лекови според моделите на електрохемиски регенеративен механизам, разработени се соодветни методи за определување на кинетиката на хемиските интеракции, како и за определување на константата на стабилност, во ситуации кога има реверзибилна регенеративна хемиска реакција помеѓу двата испитувани анализи (лекови).

Како моделни компоненти за електрохемиски активни лекови во експерименталниот дел на докторскиот труд се тестирани, витамин B<sub>2</sub>, K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] и 2,5-dihydroxy benzoquinone, додека интеракциите на овие референтни супстанции ќе бидат студирани со класа на други лекови и витамини, со кои моделните компоненти можат да реагираат според моделите за регенеративни електрохемиски механизми. Притоа, за ситуациите каде постојат интеракции помеѓу овие две супстанции и други дефинирани лекови според регенеративен механизам, определени се и константите на брзина на тие хемиски интеракции.

Како експериментална техника во дисертацијата е користена цикличната скалеста волтаметрија (eng. cyclic staircase voltammetry), како дел од техниките на електрохемискиот интегриран потенциометриски систем PGSTAT 128 N.

Како работна електрода е употребена графитна електрода дизајнирана од стаклест јаглерод (eng. glassy carbon electrode). Референтна електрода е Ag/AgCl/заситен раствор од KCl. Експериментите се изведувани во пуферски системи со физиолошки вредности на pH на собна температура. При константни инструментални услови, експериментите се изведувани со промена на концентрацијата на вториот лек “Y” во електрохемиската ќелија, што е неопходен предуслов за определување на кинетички параметри поврзани со електрохемиските регенеративни механизми при интеракции на два аналити.

Резултатите од теоретските симулирања и експерименталните испитувања се претставени во форма на графици и волтамограми, преку чии карактеристики се дефинирани одредени зависности и се дизајнираат методи за определување на релевантни кинетички и термодинамички параметри. Преку теоретските модели, дизајнирање се методи за евалуирање на кинетички и термодинамички параметри од експерименти на познати системи што реагираат според електрохемиски регенеративен механизми. Притоа, направени се соодветни заклучоци од резултатите добиени од теоретските модели и експерименталните резултати, при што се дискутирани и позитивните страни, но и ограничувањата на разработените теоретски методи.

## 4 МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ НА РАБОТА

### 4.1 Дефиниции во математичките модели за студираниите електродни механизми

Математичките модели за дифузионен EC' механизам поврзан со иреверзибилна регенеративна реакција (А) [Petkovska, Gulaboski, 2019 Gulaboski, R. Petkovska, S. (2018)], за површински EC' електроден механизам поврзан со иреверзибилна хемиска реакција (Б) [Gulaboski, R., Kokoskarova, P., Petkovska, S. (2018)], како и за дифузионен EC' механизам поврзан со реверзибилна регенеративна реакција (В) [Petkovska, S., Gulaboski, R. (2019)] и за површински EC' механизам поврзан со реверзибилна регенеративна реакција (Г) [Petkovska, S., Gulaboski, R. (2020)] се решени и симулирани во услови на циклична скалеста волтаметрија. Притоа моделите за дифузионен EC' механизам поврзан со реверзибилна регенеративна реакција [Gulaboski, R., Petkovska, S. 2019] и за површински EC' механизам поврзан со реверзибилна регенеративна реакција се решени за прв пат од страна на нашата група [Petkovska, S., Gulaboski, R. 2020]. Работните фајлови за сите електродни механизми претставени во оваа дисертација се презентирани во програмата MATHCAD и се дадени во Дополнителниот материјал од дисертацијата. Првите два електродни механизми елаборирани во дисертацијата се симулирани врз база на модели за дифузиони и површински електродни реакции поврзани со иреверзибилни регенеративни хемиски реакции, а се обработени врз основа на соодветните математички модели публикувани во [Mirceski, V., Gulaboski, R. (2003); Gulaboski, R., Petkovska, S. (2018); Compton et al. Understanding Voltammetry, (2010)]. Симулираните теоретски циклични волтамограми презентирани во дисертацијата се функција на параметрите на применетиот потенцијал (потенцијален чекор  $dE$ , и времетрањето на потенцијалниот пулс  $t$ ). Покрај тоа, својствата на симулираните циклични волтамограми зависат и од коефициентот на пренос на електрони  $\alpha$ , од константата на рамнотежа на дефинирана хемиска реакција  $K_{eq}$  (во случај кога постои хемиска рамнотежа кај регенеративната реакција во соодветните математички модели), како и од два бездимензионални кинетички параметри  $K$  и  $K_{chem}$ . Бездимензионалниот

кинетички параметар  $K$  е поврзан со брзината на хетерогениот трансфер на електрони помеѓу работната електрода и молекулите на редокс-активниот лек (опишан како „лек 1“ во оваа дисертација). Овој кинетички параметар се дефинира со изразот  $K = k_s^\circ \times t$  (кај површинските механизми) и  $K = k_s^\circ \times (t/D)^{0.5}$  (кај дифузионо-контролираните механизми обработени во дисертацијата). Со  $k_s^\circ$  (единица  $s^{-1}$  кај површинските електродни механизми, и единици  $cm\ s^{-1}$  кај дифузионите електродни механизми) е дефинирана стандардната константа на брзина на пренос на електрони,  $D$  (единици  $cm^2\ s^{-1}$ ) е коефициентот на дифузија на електроактивните форми на лекот, додека со  $t$  (единици  $s$ ) е означено времетраењето на пулсот во циклична скалеста волтаметрија. Во симулациските модели за дифузионите регенеративни ЕС' механизми (А и В), коефициентот на дифузија беше земен да има константна вредност од  $0.000005\ cm^2\ s^{-1}$  или  $0.000003\ cm^2\ s^{-1}$ , додека времетраењето на пуслевите од цикличните скалести пуслеве од аплицираниот потенцијал беше  $0.01\ s$  или  $0.05\ s$  кај елаборираните механизми. За пресметување на теоретските волтамограми, потенцијалниот чекор беше поставен на  $dE = 2\ mV$ ,  $dE = 4\ mV$  или  $dE = 10\ mV$  во симулациите кај сите електродни механизми студирани во оваа дисертација. Својствата на симулираните циклични волтамограми за ЕС' механизмите зависат и од бездимензионален хемиски параметар  $K_{chem}$ , дефиниран како  $K_{chem} = \varepsilon t$ , каде  $\varepsilon$  е хемиски параметар ( $s^{-1}$ ) дефиниран како  $\varepsilon = (k_f + k_b)$  (за реакции каде постои хемиска рамнотежа во моделите (В) и (Г)).  $k_f$  и  $k_b$  се константи на брзина на директната и повратната реакција во дефинираната хемиска регенеративна реакција од хемиската рамнотежа кај моделите (В) и (Г). Кај моделите (В) и (Г), својствата на симулираните циклични волтамограми се функција и од константата на рамнотежа на хемиската реакција дефинирана со изразот  $K_{eq} = k_f/k_b$ . За електродните механизми каде постојат иреверзибилни регенеративни хемиски реакции кај моделите (А) и (Б), хемискиот параметар е дефиниран со изразот  $K_{chem} = k_c' \times c(Y) \times t$ , каде  $k_c'$  е реалната константа на брзината на иреверзибилната регенеративна хемиска реакција. *Важно е да се потенцира дека кога се студираат хемиски интеракции на два лекови во регенеративните механизми, вредноста на  $K_{chem}$  е пропорционална со константата на брзината на интеракциите помеѓу тие два лекови, додека  $K_{eq}$  кореспондира на константата на рамнотежа на хемиската реакција (или константа на стабилност помеѓу дефинираните два лекови,*



доколку се формира стабилен или умерено стабилен комплекс при интеракцијата на двата лекови). Кај моделите со реверзибилна регенеративна хемиска реакција (В) и (Г), вредноста на  $K_{eq}$  ја дефинира рамнотежната количина на електроактивните видови на површината на работната електрода. Од друга страна, вредноста на параметарот  $K_{chem}$  е директно поврзана со брзината на хемиска реакција помеѓу редокс формата “Red” и супстратот “Y” (терминот „регенеративен супстрат „Y” е синоним „лек 2“ во оваа дисертација) во временската рамка на мерење на струјата во секој потенцијален пулс. Во сите симулации, иницијалниот потенцијал беше дефиниран да има позитивна вредност, а скенирањето во цикличната волтаметрија беа дефинирани кон негативен потенцијал на завртување. По достигнувањето на потенцијалот на завртување (vertex potential), потенцијалот со ист потенцијален чекор беше аплициран кон неговата почетна вредност. Во сите пресметки вредноста на стандардниот редокс потенцијал на редокс парот Ox/Red беше дефинира да изнесува 0.00 V. Во сите модели, редуциската (катодна) струја беше дефинирана со негативен предзнак, а оксидациската (анодна) струја беше дефинирана со позитивен, во согласност со европската конвенција за електрохемија. Кај дифузишки регенеративни електродни механизми (А) и (В), бездимензионалната струја на цикличните волтамограми ( $\Psi$ ) беше нормализирана со изразот:  $\Psi = I/[nFAc^*(Ox)]^{-1} \times [t^{0.5}D^{0.5}]$ . Кај површинските регенеративни механизми (Б) и (Г), бездимензионалната струја е нормализирана со изразот:  $\Psi = It/[nFA\Gamma^*(Ox)]^{-1}$ . Сите симулации во теоретскиот дел на дисертацијата беа реализирани со употреба на комерцијално достапниот пакет MATHCAD 14. Детални објаснувања за секој елабориран механизам се дадени во работните MATHCAD фајлови во дополнителниот материјал на дисертацијата.

#### **4.2. Материјали и методи за волтаметриските експерименти дизајнирани за студирање на интеракции на лекови**

Сите волтаметриски експерименти без изведени на електрохемиската инструментација PGSTAT 128 N. Електрохемиската ќелија беше составена од сад во кој беше ставен 50 mL фосфатен пуфер со  $\text{pH} = 7.40$ , припремен со употреба на ултра-чиста дејониизирана вода со иницијална кондуктивност од  $0.05 \mu\text{S}$ . Сите употребувани лекови беа употребени како чисти супстанции (произведени во Sigma-Aldrich, Fisher Chemical, CPA chem, Alkaloid и Merck). Во пуферскиот раствор во ќелијата беа вронети три електроди и тоа: работна електрода дизајнирана од стаклест јаглерод (glassy carbon electrode) со дијаметар од 0.5 cm на работната површина, сребро-сребро хлоридна Ag/AgCl (заситен раствор на KCl) референтна електрода, додека графитна прачка со голема површина беше употребена како помошна електрода. Концентрацијата на електрохемиски активната супстанца 2,5-dihydroxy benzoquinone, витамин B2 или калиум хексацијаноферат II- $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (редокс лековите означени „лек 1“ во дисертацијата) во електрохемиската ќелија беше константна во текот на изведувањето на волтаметриските експерименти и изнесуваше 0.1 mol/L (за витамин B2) или 0.25 mmol/L (за 2,5-dihydroxy benzoquinone и  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ). Работните инструментални параметри, доколку поинаку не е наведено, беа: потенцијален инкремент  $dE = 2 \text{ mV}$ , времетраење на пулсот  $t = 0.01 \text{ s}$ . Во експериментите каде се студираа интеракциите помеѓу електрохемиски активните системи (2,5-dihydroxy benzoquinone, витамин B2 и  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) и други дефинирани лекови („лек 2“), концентрацијата на вториот лек во електрохемиската ќелија се зголемуваше во границите помеѓу 0.5 mmol/L и 0.1 mol/L. Како „лек 2“ беа употребени водороден пероксид, натриум хипохлорит, калиум перманганат, јод, натриум бихромат, натриум хлорат, 5-флуороурацил, аспирин, ибупрофен, кофеин, аналгин, диклофенак, спазмекс (за експериментите со 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone како лек 1), како и галска киселина, аспирин, ибупрофен, кофеин, парацетамол, фиклофенак, липоична киселина, лимонска киселина, витамин Ц, цистеин, ресвератрол, допамин, куркумин, витамин B12, орто крезол, глутатјон, спазмекс, кетопрофен, епикатехин, пирацетам и кафеинска киселина (за експериментите со витамин

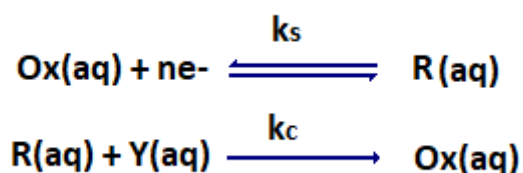
В2 и калиум хексацијаноферат II употребени како „лек 1“). При секое додавање на дефинирана концентрација од вториот лек во електрохемиската ќелија (при константа концентрација на „лек 1“), се снимаа најмалку 5 волтамограми и се земаше средната вредност од волтаметриските одговори за т.н. „гранична струја“ што беше неопходна за екстракција на кинетичките параметри на регенеративната хемиска реакција. За пресметување на константата брзина на интеракции и константата на хемиска рамнотежа помеѓу дефиниран лек („лек 2“) и редокс-активните системи („лек 1“) беше употребен метод на фитирање на експерименталните и теоретските вредности за интензитетот на максималните граничните струи на плато од т.н. “steady state” циклични волтамограми. Дијагностицирањето на електродните механизми на интеракција беше евалуирано преку споредба на својствата на експерименталните и теоретските волтаметриски одговори како функција од концентрацијата на вториот лек.

## 5. РЕЗУЛТАТИ

### 5.1. Карактеристики на теоретските волтамограми на регенеративните механизми во услови на циклична скалеста волтаметрија

#### 5.1.1 (A) Дифузиски регенеративен електроден EC' механизам поврзан со иреверзибилна регенеративна хемиска реакција

Овој електроден механизам (A) е соодветен за студирање на хидрофилни лекови, што можат да стапат во иреверзибилни хемиски интеракции од регенеративна природа според следната реакциона шема:



Кај овој регенеративен електроден механизам претставен со шемата погоре, на почетокот во електрохемиската ќелија е присутна оксидираната форма Ox(aq) од „лекот 1“, (оксидираната форма на 2,5-dihydroxy benzoquinone, на пример) што може да се редуцира примамјќи електрони од работната електрода до продукт Red(aq). Притоа и Ox(aq) и Red(aq) се добро растворливи во вода и не покажуваат адсорпциски својства на површината на работната електрода. Со „Y“ е означен „лекот 2“ што го даваме во системот. Кај овој механизам, „Y“ е т.н. регенеративен реагенс, што има својство хемиски да реагира со продуктот на електрохемиската реакција Red(aq) и при таа хемиска реакција повторно да се регенерира почетниот аналит Ox(aq). Регенеративниот реагенс Y треба да е електрохемиски неактивен (во подрачјето каде што се случува електрохемиската активност на аналитот Ox) и да е присутен во поголема концентрација од Ox.

Математички, регенеративниот дифузионен електроден механизам (A) може да се претстави преку следните равенки:

$$[dc(\text{Ox})/dt] = D[\delta^2 c(\text{Ox})/dx^2] + c(\text{Red})k_c \quad (1)$$

$$[dc(\text{Red})/dt] = D[\delta^2 c(\text{Red})/dx^2] - c(\text{Red})k_c \quad (2)$$

Диференцијалните равенки (1-2) беа решени при следните почетни и гранични услови:

$$(a) t = 0, x \geq 0, c(\text{Ox}) = c^*(\text{Ox}), c(\text{Red}) = 0;$$

$$(b) t > 0, x \rightarrow \infty, c(\text{Ox}) \rightarrow c^*(\text{Ox}), c(\text{Red}) \rightarrow 0;$$

$$(c) t > 0, x = 0:$$

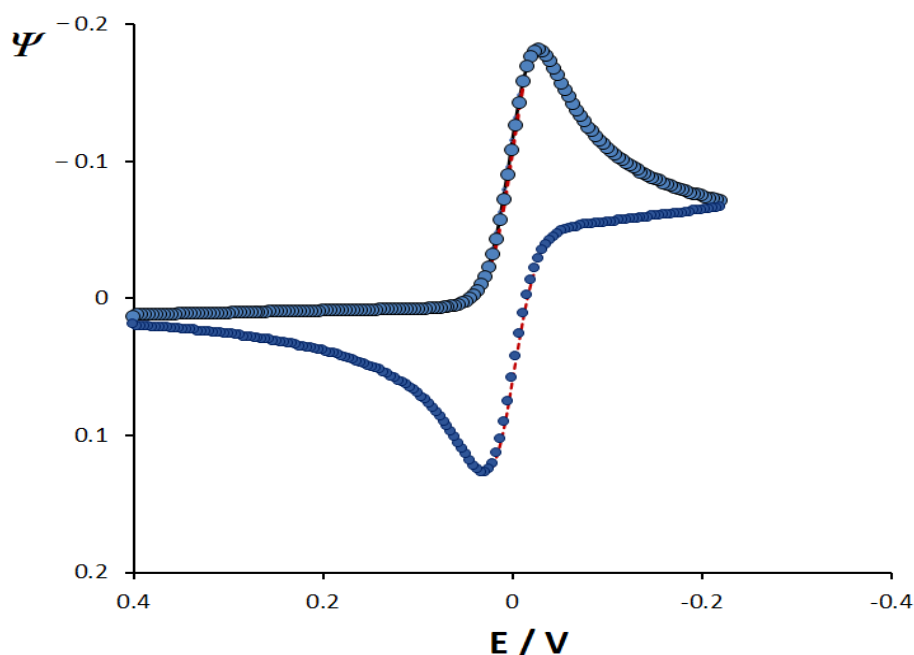
$$D[dc(\text{Ox})/dt] = -D[dc(\text{Red})/dt] = [I/(nFS)]; \text{ и}$$

$$I/(nFA) = k_s \exp(-\alpha\phi) [c(\text{Ox})_{x=0} - \exp(\phi)c(\text{Red})_{x=0}]$$

Во горните равенки,  $t$  е симбол за време (s);  $x$  е растојанието до површината на работната електрода (cm);  $c$  е симбол за концентрација, додека  $c^*$  е симбол за почетната аналитичка концентрација на формата Ox;  $D$  е симбол за коефициентот на дифузија ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ );  $k_s$  е симбол за константата на брзина на пренос на електрони ( $\text{cm s}^{-1}$ );  $I$  (единици ампер A) е симбол за јачина на електричната струја;  $n$  е симбол за бројот на електрони што се разменуваат во елементарен акт на електрохемиска трансформација помеѓу работната електрода и Ox(aq) формата на „лекот 1“;  $\alpha$  е симбол за коефициентот на електронски трансфер (неговата вредност беше  $\alpha = 0.5$  во сите симулации во оваа дисертација);  $F$  е симбол за Фарадеевата константа ( $96485 \text{ C/mol}$ );  $A$  е симбол за површината од работната електрода ( $\text{cm}^2$ ); со  $\phi = nF/RT(E-E^0)$  е дефиниран т.н. „бездимензионален потенцијал“ каде  $E$  е симбол за електродниот потенцијал, додека со  $E^0$  е означен стандардниот електроден потенцијал на редокс парот Ox/Red;  $R$  е симбол за универзалната гасна константа ( $8.314 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ), додека  $T$  е симбол за термодинамичката температура (K). Со  $k_c$  е означена константата на брзината на регенеративната “каталитичката” хемиска реакција  $\text{Red} + \text{Y} \rightarrow \text{Ox}$ . Овој параметар е дефиниран со изразот  $k_c = k_c' \times c(\text{Y})$ . Во последната формула,  $k_c'$  е вистинската константа на регенеративната хемиска реакција со единици  $\text{s}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$ , додека  $c(\text{Y})$  е моларната концентрација на супстратот „Y“ (лекот 2) што обично е присутен во повисока концентрација од почетната концентрација на Ox формата од „лекот 1“. Рекурентните формули што се добиени со решавање на овој електроден механизам, што овозможуваат симулирање на цикличните волтамограми од овој механизам во услови на циклична скалеста волтаметрија, се презентирани во оригиналниот MATHCAD работен фајл што е даден во Дополнителниот материјал на крајот од оваа дисертација. Во симулациите за овој (а и за сите

останати механизми) вредноста на потенцијалниот чекор беше 2 mV, додека времетраењето на пулсот на цикличните скалести потенцијални сегменти беше 0.01 s. Кај овој механизам, коефициентот на дифузија на Ox и Red формите од „лекот 1“ беа дефинирани со една вредност од  $D = 0.000005 \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ .

Цикличен волтамограм на електродната реакција на „лекот 1“ во отсуство на регенеративниот супстрат “Y” во услови на скалеста циклична волтаметрија е прикажан на слика 12.



**Слика 12.** Симулиран цикличен волтамограм за регенеративниот електроден механизам (A) во отсуство на супстрат „Y“. Симулирањето на овој волтамограм беше извршено при следните услови: Коефициент на дифузија  $D = 0.000005 \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ ; времетраењето на пулсот на цикличните скалести потенцијални сегменти  $t = 0.01 \text{ s}$ ; коефициентот на електронски трансфер  $\alpha = 0.5$ ; потенцијалниот чекор  $dE = 2 \text{ mV}$ ; константата на брзина на пренос на електрони  $k_s = 0.005 \text{ cm s}^{-1}$ ; Температура  $T = 298 \text{ K}$ , број на разменети електрони  $n = 1$ .

**Figure 12.** Cyclic voltammogram of electrode mechanism (A) recorded in absence of regenerative substrate „Y“. The simulation conditions were: diffusion coefficient  $D = 0.000005 \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ ; time duration of potential steps  $t = 0.01 \text{ s}$ ; electron transfer coefficient  $\alpha = 0.5$ ; potential step  $dE = 2 \text{ mV}$ ; standard rate constant of electron transfer  $k_s = 0.005 \text{ cm s}^{-1}$ ; temperature  $T = 298 \text{ K}$ , number of electrons exchanged  $n = 1$ .

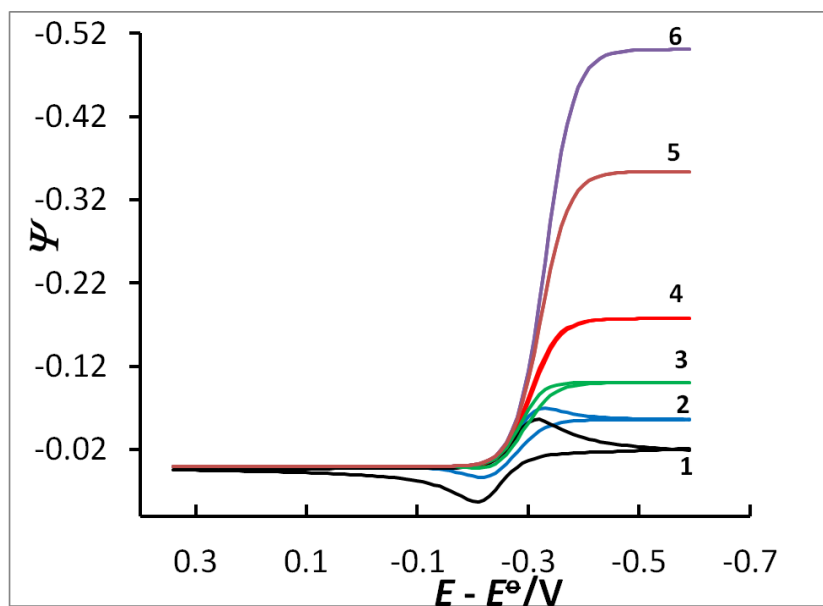
Односот на струите на катодниот (редукциски) пик и анодниот (оксидациски) пик од симулираниот волтамограм на слика 12 е блиску до 1, додека сепарацијата (потенцијалното раздвојување) помеѓу катодниот и анодниот пик е околу 60 mV. Овие два параметри се скоро константни при брзини на промена на потенцијалот од 2 mV/s до 100 mV/s. Друга карактеристика на цикличните волтамограми на механизмот (A) е т.н. „дифузиона опашка“ што се појавува на негативни потенцијали, како и линеарната зависност на интензитетот на измерените струи што одговараат и ка катодниот и на анодниот пик како функција од квадратен корен од брзината на промена на потенцијалот [Compton et al, Understanding Voltammetry, (2010); Molina et al. (2016)].

Во отсуство на регенеративен супстрат „Y“, својствата на симулираните циклични волтамограми се функција од коефициентот на пренос на електрони  $\alpha$ , како и од бездимензионалниот кинетички параметар  $K$ , како што е покажано во монографијата [Compton et al, Understanding Voltammetry, 2010].

Кај овој регенеративен електроден механизам (A), за да се добие увид во брзината на интеракциите помеѓу „лекот 1“ и „лекот 2“, значајно е да се студира влијанието на хемискиот параметар  $K_{chem}$ .

И во симулациите и во реалниот експеримент, овој тип на симулации кореспондира на студирањето на влијанието на концентрацијата на регенеративниот супстрат „Y“ т.е.  $c(Y)$  врз својствата на цикличните волтамограми.

Тоа е затоа што бездимензионалниот хемиски параметар е дефиниран како  $K_{chem} = k_c' \times c(Y) \times t$ . Зголемувањето на концентрацијата на лекот „Y“ доведува до промени во цикличните волтамограми, што се видливи преку промените на струјата како што е прикажано на слика 13.



**Слика 13.** Теоретски циклични волтамограми симулирани за дифузионен регенеративен EC' механизам каде постои иреверзибилна регенеративна реакција на редуцираната форма од „лекот 1,“ и супстратот „Y“ (лекот 2). Кривите го прикажуваат влијанието на концентрацијата на супстратот „Y“ врз својствата на цикличните волтамограми.  $c(Y) = 0 \text{ mol/L}$  (1);  $0.01 \text{ mol/L}$  (2);  $0.02 \text{ mol/L}$  (3);  $0.035 \text{ mol/L}$  (4);  $0.05 \text{ mol/L}$  (5) и  $0.07 \text{ mol/L}$  (6). При овие симулации, вредноста на константата на брзина на пренос на електрони беше  $k_s = 0.01 \text{ cm s}^{-1}$ . Останатите услови при симулациите беа идентични како тие на слика 12.

**Figure 13.** Cyclic voltammograms simulated for a diffusional regenerative EC' electrode mechanism coupled with irreversible chemical reaction between the reduced form of “drug 1” and the regenerative substrate „Y” (drug 2). The patterns show the effect of the substrate „Y” to the features of cyclic voltammograms волтамограми.  $c(Y) = 0 \text{ mol/L}$  (1);  $0.01 \text{ mol/L}$  (2);  $0.02 \text{ mol/L}$  (3);  $0.035 \text{ mol/L}$  (4);  $0.05 \text{ mol/L}$  (5) and  $0.07 \text{ mol/L}$  (6). For this set of simulations, the standard rate constant of electron transfer was set to  $k_s = 0.01 \text{ cm s}^{-1}$ . Other conditions were same as those used in figure 12.

Од својствата на цикличните волтамограми прикажани на слика 13 е можно да се определи квантитативно лекот “Y”, како и силата на интеракции (кинетиката на хемиските интеракции) помеѓу лекот “Y” и “Red” формата на „лекот 1“ [Gulabosoki, and Petkovska, 2018]. Промените што се јавуваат во цикличните волтамограми како резултат на зголемување на концентрацијата на супстратот „Y“ се преставени преку неколку значителни сегменти на кривите прикажани на слика 13 (крива 2 до крива 6). На слика 13, волтамограмот означен со број 1 е резултат на електродната трансформација  $Ox + ne^- = Red$  на испитуваниот „лек 1“, снимен во отсуство на лекот “Y”. Овој почетен

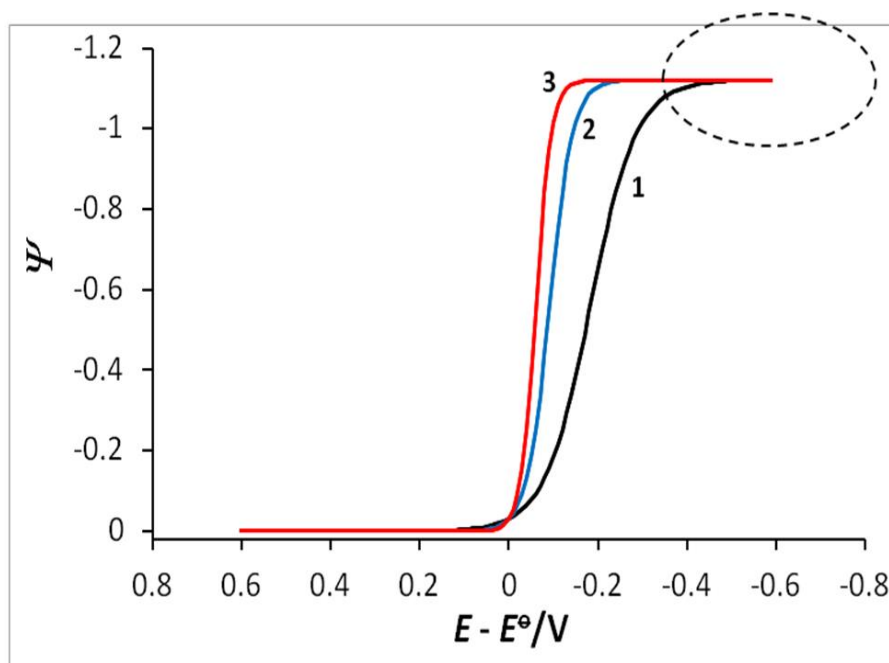


волтамограм има идентични својства како тие што се опишани кај волтамограмот на слика 12. Во присуство на регенеративниот супстрат „Y“, во зависност од неговата концентрација, се добиваат циклични волтамограми со својства како волтамограмите прикажани на кривите 2 до 6 на слика 13. Од волтамограмите на слика 13 може визуелно да се препознае дека доаѓа до промена и во струјата и во формата на волтамограмите, промени што се јавуваат со постепено зголемување на концентрацијата на „лекот 2“ т.е. на регенеративниот супстрат „Y“. Како што се зголемува концентрацијата на регенеративниот супстрат „Y“, така доаѓа до промена на формата на цикличните волтамограми од дифузионо контролирани криви со волтамограми чија форма е детерминирана од брзината на регенеративната хемиска реакција. Овој ефект се препознава преку намалувањето на струјата на оксидацискиот пик (повратната компонента од цикличните волтамограми) и соодветно зголемување на струјата поврзана со процесот на редукција т.е. директната компонента од цикличните волтамограми (волтамограми 2-4 на слика 13). Овој феномен се појавува како резултат на дополнителна регенерација на почетниот материјал т.е. формата Oх од „лекот 1“ како резултат на одвивање на регенеративната реакција помеѓу формата Red од „лекот 1“ и регенеративниот супстрат „Y“. Дополнителната количина на Oх што се генерира во текот на временскиот интервал на мерењето на струјата на потенцијалните чекори е проследено со соодветно зголемување на струјата поврзана до катодниот пик (процесот на редукција). Во исто време, доаѓа до намалување на повратната (оксидациската) струјна компонента од цикличните волтамограми, како резултат на хемиското иреверзибилно губење на содржината на Red формата од „лекот 1“. При условите дефинирани на слика 13, кога концентрацијата на регенеративниот супстрат „Y“ ќе надмине вредности поголеми од 0.03 mol/L (волтамограмите 4, 5 и 6 на слика 13), тогаш се добиваат т.н. „steady-state“ волтамограмски криви кои имаат сигмоидална форма. При високи концентрации на регенеративниот супстрат „Y“, **катодната и анодната компонента од цикличните “steady state” волтамограми стануваат идентични по вредност.** При вакви услови (криви 4-6 на слика 13), брзината на регенеративната хемиска реакција Red + Y → Oх е многу поголема отколку брзината на размена на електрони на Oх и Red со работната електрода. Поради тоа, се обезбедува постојано количество од

редокс формата  $Ox$  што е способна да претрпи електрохемиска трансформација на површината од работната електрода. Последователно, струите измерени и во редукциска и во оксидациска насока, во суштина ќе бидат редукциски струи што одговараат на електродната трансформација од типот  $Ox + ne^- \rightarrow Red$ . Токму карактеристиките на „steady-state“ цикличните волтамограми (што се добиваат при големи концентрации на регенеративниот супстрат „Y“) се една од главните цели на теоретско студирање во оваа дисертација, а во насока да се студираат интеракциите на два дефинирани лекови преку својствата регенеративните електродни механизми.

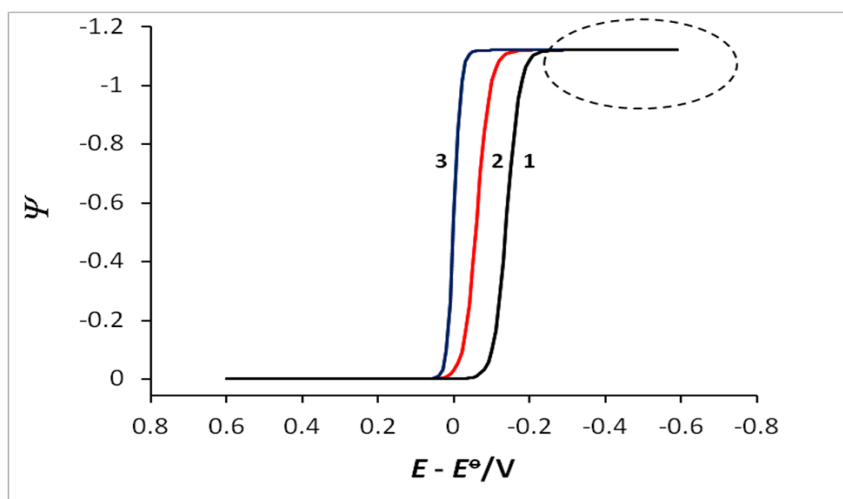
Како што е наведено во дискусијата на слика 12, карактеристиките на теоретските циклични волтамограми зависат од бројот на разменети електрони ( $n$ ) помеѓу работната електрода и молекулите на редокс „лекот 1“, од коефициентот на пренос на електрони, од потенцијалниот чекор ( $\alpha$ ), како и од вредноста на бездимензионалниот кинетички параметар  $K$  ( $K = k_s^0 \times (t/D)^{0.5}$ ) што во себе ги обединува стандардната константа на пренос на електрони помеѓу работната електрода и „лекот 1“, брзината на дифузија на електроактивните молекули од „лекот 1“, како и времетраењето ( $t$ ) на потенцијалниот сегмент во кој се мери струјата во циклична скалеста волтаметрија. Во услови на „steady-state“ циклични волтамограми добиени при висока концентрација на регенеративниот супстрат „Y“ во механизмот (A), направена е серија од теоретски симулации во кои се студирани влијанијата на  $n$ ,  $K$  и  $\alpha$  врз карактеристиките на „steady-state“ цикличните волтамограми. Овие зависности се прикажани на волтамограмите на слика 14, слика 15 и слика 16, соодветно. Од „steady-state“ цикличните волтамограми прикажани на сликите 14, 15 и 16, може да се забележи дека својствата на овие волтаметриски криви се комплексна функција од параметрите  $n$ ,  $K$  и  $\alpha$  во подрачјето на потенцијали каде што се јавуваат пиковите од цикличните волтамограми. Единствено при многу негативни потенцијали, струјата на платото од сигмоидалните криви од овие „steady-state“ циклични волтамограми не зависи од  $n$ ,  $K$  и  $\alpha$ . Оваа т.н. „максимална струја на платото“ (заокружените региони на волтамограмите на сликите 14, 15 и 16) е функција само од вредноста на хемискиот параметар  $K_{chem}$ , односно од концентрацијата на регенеративниот супстрат „Y“. Ова својство на сигмоидалните „steady-state“ волтамограми укажува на фактот дека

зависноста на „максимална струја на платото“ како функција од концентрацијата на регенеративниот супстрат „Y“ (лекот 2) може да се искористи за определување на константата на брзина на хемиски интеракции помеѓу „лекот 1“ и молекулите на регенеративниот супстрат „Y“.



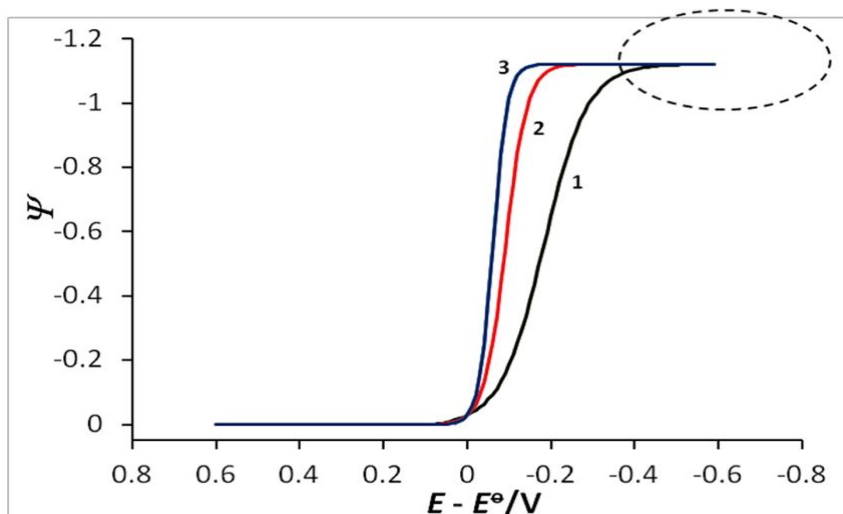
**Слика 14.** Влијание на бројот на разменети електроди помеѓу работната електрода и редокс формите на „лек 1“ врз својствата на цикличните „steady state“ волтамограми снимени при голем вишок на супстратот „Y“, при вредности на бездимензионалниот хемиски параметар  $K_{chem} = 1.256$ , при вредност на бездимензионалниот кинетички параметар на трансферот на електрони  $K = 0.032$ , каде бројот на разменети електрони  $n = 1$  (1); 2 (2) и 3 (3). Останатите услови при симулациите се идентични како условите на слика 13.

**Figure 14.** Effect of the number of exchanged electrons in electrode reaction on the features of the cyclic voltammograms calculated for  $K_{chem} = 1.256$ ,  $K = 0.032$ , and  $n = 1$  (1); 2 (2) and 3 (3). All the other simulation parameters were same as those in figure 13.



**Слика 15.** Влијание на кинетиката на пренос на електрони помеѓу работната електрода и „лехот 1“ (изразено преку вредноста на  $K$ ) врз својствата на теоретските волтамограми симулирани при вредности за  $K_{chem} = 1.256$ , и  $K = 0.000032$  (1);  $0.032$  (2) и  $32$  (3). Останатите параметри во овие симулации се идентични како на слика 13.

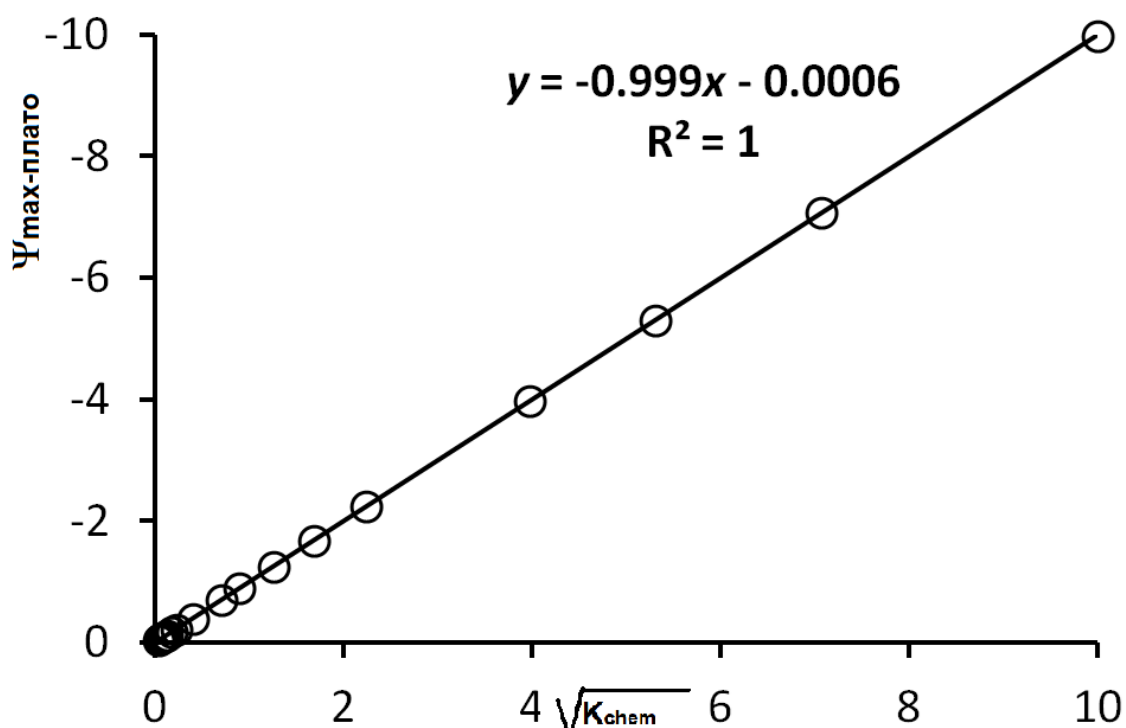
**Figure 15.** Effect of the kinetics of the electrode reaction (via  $K$ ) on the features of cyclic voltammograms, calculated for  $K_{chem} = 1.256$ , and  $K = 0.000032$  (1);  $0.032$  (2) and  $32$  (3). All the other simulation parameters were the same as those in figure 13.



**Слика 16.** Влијание на вредноста на коефициентот на електронски трансфер  $\alpha$  врз својствата на цикличните волтамограми симулирани при вредности на  $K_{chem} = 1.256$ ,  $K = 0.032$ , и  $\alpha = 0.25$  (1);  $0.5$  (2) и  $0.75$  (3). Останатите услови при овој сет на симулации беа идентични со тие на слика 13.

**Figure 16.** Effect of the electron transfer coefficient  $\alpha$  of the electrode reaction to the features of the cyclic voltammograms calculated for  $K_{chem} = 1.256$ ,  $K = 0.032$ , and  $\alpha = 0.25$  (1);  $0.5$  (2) and  $0.75$  (3). All the other simulation parameters were the same as those in figure 13.

На слика 17 е претставена зависноста на интензитетот на „максималните струи на плато“ ( $\Psi_{\text{max-плато}}$ ) од сигмоидалните ‘steady-state’ циклични волтамограми како функција од квадратен корен од бездимензионалниот хемиски параметар  $K_{\text{chem}}$ . Функцијата на слика 17 одговара на соодветна зависност на „максималните струи на плато“ како функција од моларната концентрација на регенеративниот супстрат „Y“. Како што може да се види од правата на слика 17, постои силна линеарна зависност помеѓу  $\Psi_{\text{max-плато}}$  и  $(K_{\text{chem}})^{0.5}$ , со коефициент на корелација од 1.



**Слика 17.** Зависност на максималните гранични (каталитички) струи на “платоата” од симулираните циклични волтамограми како функција од квадратен корен од вредностите на хемискиот бездимензионален параметар  $K_{\text{chem}}$  (што е соодветно на квадратен корен од вредноста на моларната концентрација на регенеративниот супстрат “Y” т.е. „лек 2“). Останатите параметри употребени во овој сет на симулации беа идентични со тие на слика 13.

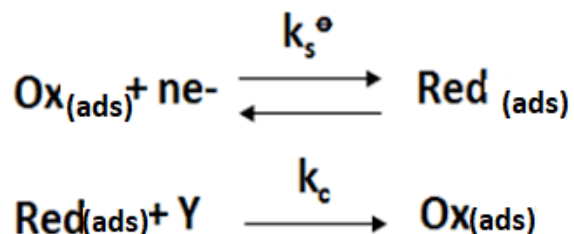
**Figure 17.** Dependence of the maximal “plateau” catalytic currents of simulated cyclic voltammograms on the square-root of dimensionless chemical parameter  $K_{\text{chem}}$  (which corresponds to square root of molar concentration of regenerative substrate “Y”). All other simulation parameters were same as those in figure 13.

Во реалниот волтаметриски експеримент, струјата што одговара на платото на максимумот од сигмоидалните циклични волтамограми ( $I_{\text{max-плато}}$ ) кај

овој механизам треба да биде линеарна функција од квадратен корен од концентрацијата на регенеративниот супстрат  $[c(Y)]^{0.5}$ . Притоа, нагибот на линеарната права на зависноста  $I_{\text{max-плато}}$  vs.  $[c(Y)]^{0.5}$  ќе биде дефиниран со изразот: **наклон** =  $|(k_c')^{0.5}[nFAc^*(Ox)t^{0.5}D^{0.5}]$ . На овој начин, доколку ги знаеме податоците за бројот на разменети електрони  $n$ , вредноста на коефициентот на дифузија  $D$  за реакцијата на „лекот 1“ ( $Ox + ne^- \leftrightarrow Red$ ) во отсуство на регенеративен супстрат „Y“, и доколку ги правиме експериментите при константна брзина на промена на потенцијал (тогаш ќе ја знаеме вредноста на  $t$ ), тогаш од последната равенка од наклонот на правата што ја претставува линеарната зависност  $I_{\text{max-плато}}$  vs.  $[c(Y)]^{0.5}$ , може да се определи вредноста на константата на хемиска реакција ( $k_c'$ ) помеѓу „лек 1“ и супстратот „Y“. Овој физички параметар (вредноста на  $k_c'$ ) ни дава информации за *брзината на хемиски интеракции помеѓу двата испитувани лекови*.

### 5.1.2. (Б) Регенеративен електрохемиски механизам за студирање на липофилни лекови, што можат да стапат во иреверзибилни интеракции со хидрофилни или липофилни лекови

Овој т.н. *површински регенеративен електроден механизам* (модел Б) може да се претстави со следната реакциона шема:



Математички, *површинскиот регенеративен ЕС' електроден механизам* (Б) може да се опише со следните диференцијални равенки:

$$[d\Gamma(Ox)/dt] = -I/(nFS) + \Gamma(Red)k_c \quad (3)$$

$$[d\Gamma(Red)/dt] = I/(nFS) - \Gamma(Red)k_c \quad (4)$$

За овој електроден механизам, диференцијалните равенки (3-4) се решени при следните почетни и гранични услови:

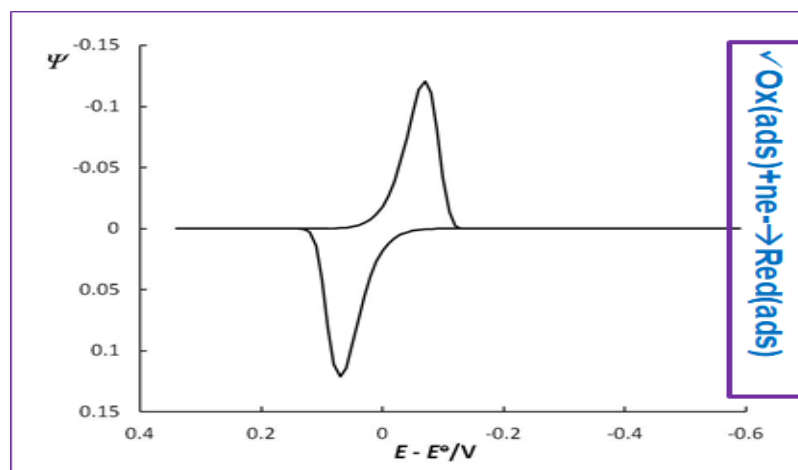
$$d) t = 0; \Gamma(Ox) = \Gamma^*(Ox); \Gamma(Red) = 0$$

$$e) t > 0; \Gamma(Ox) + \Gamma(Red) = \Gamma^*(Ox)$$

$$f) I/(nFA) = k_s \exp(-\alpha\phi) [\Gamma(Ox) - \exp(\phi)\Gamma(Red)]$$

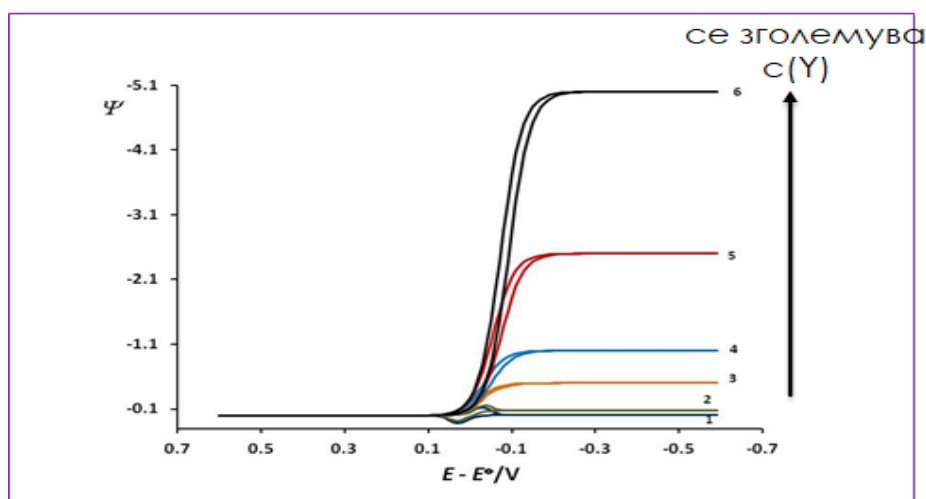
Во горните изрази,  $\Gamma^*(Ox)$  е почетната површинска концентрација адсорбирана (ads) на површината од работната електрода на формата  $Ox$  од „лекот 1“ ( $mol\ cm^{-2}$ ),  $\Gamma$  е симбол за површинска концентрација,  $k_s$  е стандардната константа за брзина на пренос на електрони помеѓу работната електрода и адсорбираните форми на редокс парот  $Ox(ads)/Red(ads)$  со единици ( $s^{-1}$ ), додека значењето на останатите симболи е идентично како кај електродниот регенеративен механизам (A). Формулите што овозможуваат пресметување на цикличните волтамограми кај овој регенеративен механизам (B) се претставени во соодветниот MATHCAD file во Дополнителните материјали од оваа дисертација.

На слика 18 е прикажан цикличен волтамограм за овој површински електроден механизам (B), што е симулиран во отсуство на регенеративен супстрат „Y“ во електрохемиската ќелија. Главни карактеристики на цикличните волтамограми за површинските механизми (слика 18) што ги разликуваат од цикличните волтамограми кај дифузионите механизми (слика 12) се острата форма на катодните и анодните пикови и отсуството на т.н. „дифузиона опашка“ на понегативни потенцијали (во подрачјето на потенцијали што се наоѓа после пиковите). Овие карактеристики се добро дефинирани на цикличниот волтамограм за површински регенеративен EC' механизам (B) прикажан на слика 18. Едно од арактеристичните својства кај површинските електродни механизми во услови на циклична волтаметрија е линеарната зависност на интензитетот на струјата што одговара на пиковите од цикличниот волтамограм како функција од брзината на промена на потенцијалот  $v$  [Compton et al, 2010, Mirceski, Gulaboski, 2003]. И кај овој површински регенеративен електроден механизам (B), важен сегмент е да се студира влијанието на бездимензионалниот хемиски параметар  $K_{chem}$  (што во реалните експерименти одговара на промената на концентрацијата на регенеративниот супстрат „Y“) врз својствата на цикличните волтамограми. таква една зависност е прикажана на слика 19.



**Слика 18.** Цикличен волтамограм на површински регенеративен EC' електроден механизам, симулиран во отсуство на супстрат „Y“. Параметрите употребени при оваа симулација беа: температура  $T = 298$  K; вредност на бездимензионалниот кинетички параметар на електронски трансфер  $K = 0.2$ ; број на разменети електрони  $n = 2$ ; вредност на коефициентот на електронски трансфер  $\alpha = 0.5$ , потенцијален чекор  $dE = 4$  mV, времетраење на потенцијалниот пулс  $t = 0.05$  s.

**Figure 18.** Cyclic voltammogram of a surface EC' mechanism calculated in absence of substrate “Y”. The simulation parameters are: temperature  $T = 298$  K; dimensionless electrode kinetic parameter  $K = 0.2$ ; number of electrons  $n = 2$ ; electron transfer coefficient  $\alpha = 0.5$ , potential step  $dE = 4$  mV, time increment  $t = 0.05$  s



**Слика 19.** Влијание на бездимензионалниот хемиски регенеративен параметар  $K_{chem}$  врз својствата на симулираните циклични волтамограм, симулирани при следните услови:  $K_{chem} = 0.005$  (1);  $0.075$  (2);  $0.5$  (3);  $1$  (4);  $2.5$  (5) и  $5$  (6). Останатите услови при симулациите беа идентични како тие на слика 18.

**Figure 19.** Effect of dimensionless catalytic chemical parameter  $K_{chem}$  to the features of calculated cyclic staircase voltammograms. The cyclic voltammograms were simulated for:  $K_{chem} = 0.005$  (1);  $0.075$  (2);  $0.5$  (3);  $1$  (4);  $2.5$  (5) and  $5$  (6). Other simulations parameters were identical as those in Figure 18.



Промените што се јавуваат во цикличните волтамограми (слика 19) како резултат на зголемување на концентрацијата на супстратот „Y“ (што соодветствува на зголемувањето на  $K_{chem}$  на слика 19) се преставени преку слични промени на волтаметриските криви како и кај механизмот (A) (слика 13, крива 2 до крива 6). На слика 19, волтамограмот означен со број 1 е резултат на електродната трансформација  $Ox(ads) + ne^- = Red(ads)$  на испитуваниот „лек 1“ од адсорбирана состојба на површината од работната електрода, снимен во отсуство на лекот “Y”.

Овој почетен волтамограм има идентични својства како тие што се опишани кај волтамограмот на слика 18. Во присуство на регенеративниот супстрат „Y“, се добиваат циклични волтамограми со својства како волтамограмите што се прикажани на кривите 2 до 6 на слика 19. Со постепено зголемување на концентрацијата на “лекот 2” т.е. на концентрацијата на регенеративниот супстрат „Y“, доаѓа до промена на формата на цикличните волтамограми во форма што е главно диктирана од брзината на регенеративната хемиска реакција помеѓу „Y“ и  $Red(ads)$  формата од „лекот 1“.. Притоа, доаѓа до намалување на струјата на оксидациониот пик и соодветно зголемување на струјата поврзана со процесот на редукција од цикличните волтамограми (тоа се волтамограми 2-4 на слика 19). Овој феномен се појавува како резултат на дополнителна хемиска регенерација на почетниот материјал т.е. формата  $Ox(ads)$  од „лекот 1“ како резултат на одвивање на хемиска реакција помеѓу формата  $Red(ads)$  од „лекот 1“ и супстратот „Y“.

Дополнителниот материјал на  $Ox$  што хемиски се создава во текот на временскиот интервал на мерењето на струјата е проследен со соодветно зголемување на интензитетот на струјата од катодниот пик (што го отсликува процесот на редукција). Паралелно на овие промени, доаѓа до намалување на интензитетот на повратната (оксидационата) струјна компонента од цикличните волтамограми, што е резултат на хемиското иреверзибилно губење на содржината на  $Red(ads)$  формата од „лекот 1“.

При условите дефинирани на слика 19, кога вредноста на бездимензионалниот хемиски параметар  $K_{chem}$  ќе надмине вредности поголеми од 1 (волтамограмите 4, 5 и 6 на слика 19), тогаш и кај овој површински регенеративен електроден механизам се добиваат т.н. „steady-state“ волтамограмски криви кои имаат сигмоидална форма. И кај овој електроден

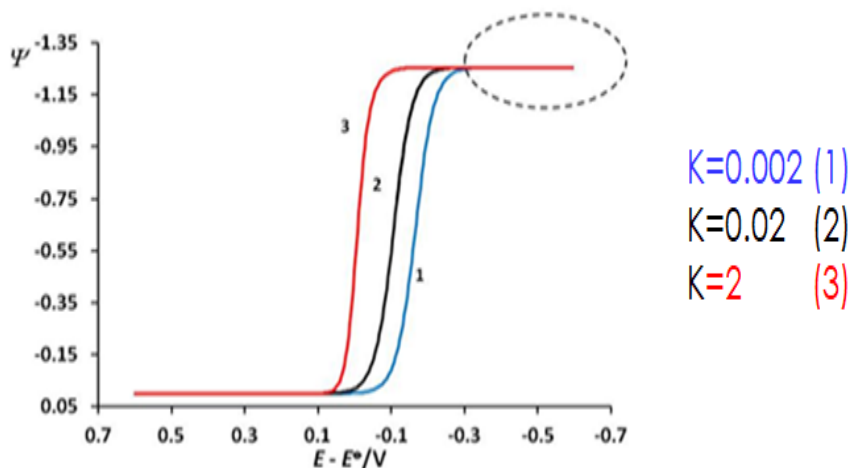
механизам (Б), при значителни концентрации на регенеративниот супстрат „Y“, струите на катодната и анодната компонента од цикличните “steady state” волтамограми стануваат идентични по вредност. Овој феномен (криви 4-6 на слика 19), се случува при услови кога брзината на регенеративната хемиска реакција  $\text{Red(ads)} + Y \rightarrow \text{Ox(ads)}$  е многу поголема отколку брзината на размена на електрони на Ox и Red со работната електрода.

Притоа, на површината од работната електрода се обезбедува перманентно ново количество од редокс формата Ox(ads) што е способна да претрпи електрохемиска трансформација на површината од работната електрода дури и на потенцијали што се понегативни од потенцијалите каде се појавуваат пиковите во отсуство на „Y“. Последователно, при вакви услови на големи концентрации на супстратот „Y“, струите измерени и во редукциска и во оксидациска насока, во суштина ќе бидат редукциски струи што одговараат на електродната трансформација од типот  $\text{Ox} + ne^- \rightarrow \text{Red}$ .

На сликите 20, 21 и 22 се прикажани влијанијата на бездимензионалниот кинетички параметар K, бројот на разменети електрони n и коефициентот на електронски трансфер  $\alpha$ , врз својствата на steady-state цикличните волтамограми од површинскиот регенеративен електроден механизам (Б).

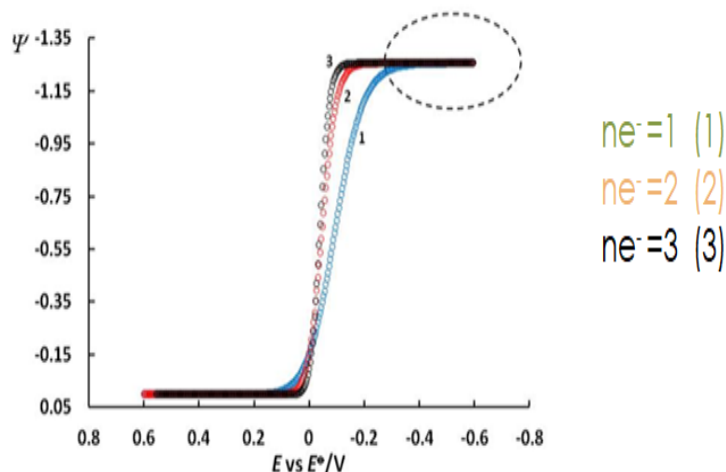
И кај овој електроден механизам, својствата на steady-state цикличните волтамограми покажуваат комплексна форма како функција од наведените параметри (K, n и  $\alpha$ ) во подрачјето на потенцијали каде се јавуваат пиковите во отсуство на супстратот “Y” (слика 18).

Само при крајни негативни потенцијали, граничната максимална струја на платото (заокружените делови на волтамограмите од сликите 20, 21 и 22) не зависи од вредностите на параметрите K, n и  $\alpha$ , а зависи само од  $K_{\text{chem}}$  (т.е. од  $c(Y)$ ), како што е покажано на слика 19.



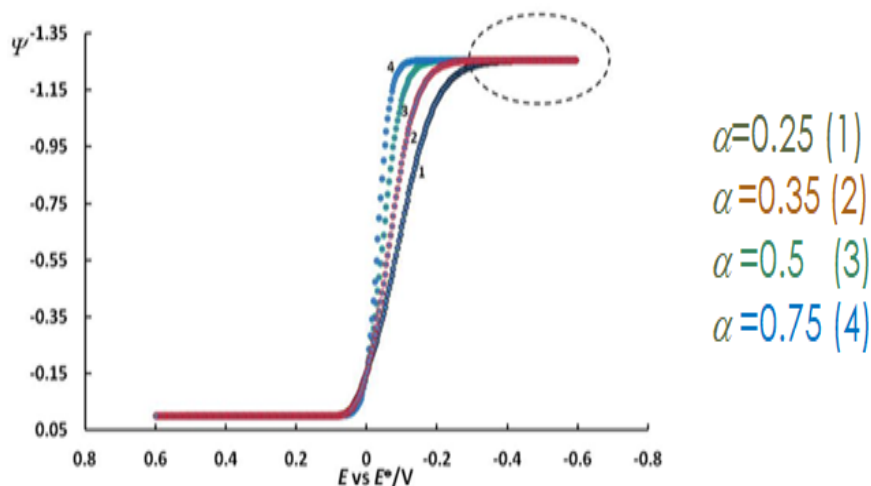
**Слика 20.** Влијание на кинетиката на трансферот на електрони помеѓу електродата и редокс активниот „лек 1“ (изразени преку вредностите на бездимензионалниот кинетички параметар  $K$ ) врз својствата на „steady state“ цикличните волтамограми симулирани при вредности на  $K = 0.002$  (1);  $0.02$  (2) и  $2$  (3). Другите услови при овој сет на симулации беа:  $K_{chem} = 1.256$ ,  $T = 298$  K;  $n = 2$  and  $\alpha = 0.5$ ,  $dE = 10$  mV, и  $t = 0.005$  s.

**Figure 20.** Effect of the kinetics of the electrode reaction ( $K$ ) to the features of cyclic voltammograms, calculated for  $K = 0.002$  (1);  $0.02$  (2) and  $2$  (3). Other simulation parameters were:  $K_{chem} = 1.256$ ,  $T = 298$  K;  $n = 2$  and  $\alpha = 0.5$ ,  $dE = 10$  mV,  $t = 0.005$ s.



**Слика 21.** Влијание на бројот на електрони ( $n$ ) разменети помеѓу работнапта електрода и редокс „лекот 1“ врз својствата на цикличните “steady-state” волтамограми симулирани при следните услови;  $n = 1$  (1);  $2$  (2) и  $3$  (3). Другите услови употребени при овој сет на симулации беа:  $K_{chem} = 1.256$ ,  $K = 0.2$ ,  $T = 298$  K;  $\alpha = 0.5$ ,  $dE = 10$  mV, и  $t = 0.005$  s.

**Figure 21.** Effect of the number of exchanged electrons to the features of the cyclic voltammograms. Presented voltammograms are calculated for  $n = 1$  (1);  $2$  (2) and  $3$  (3). Other simulation parameters were:  $K_{chem} = 1.256$ ,  $K = 0.2$ ,  $T = 298$  K; and  $\alpha = 0.5$ ,  $dE = 10$  mV,  $t = 0.005$  s.



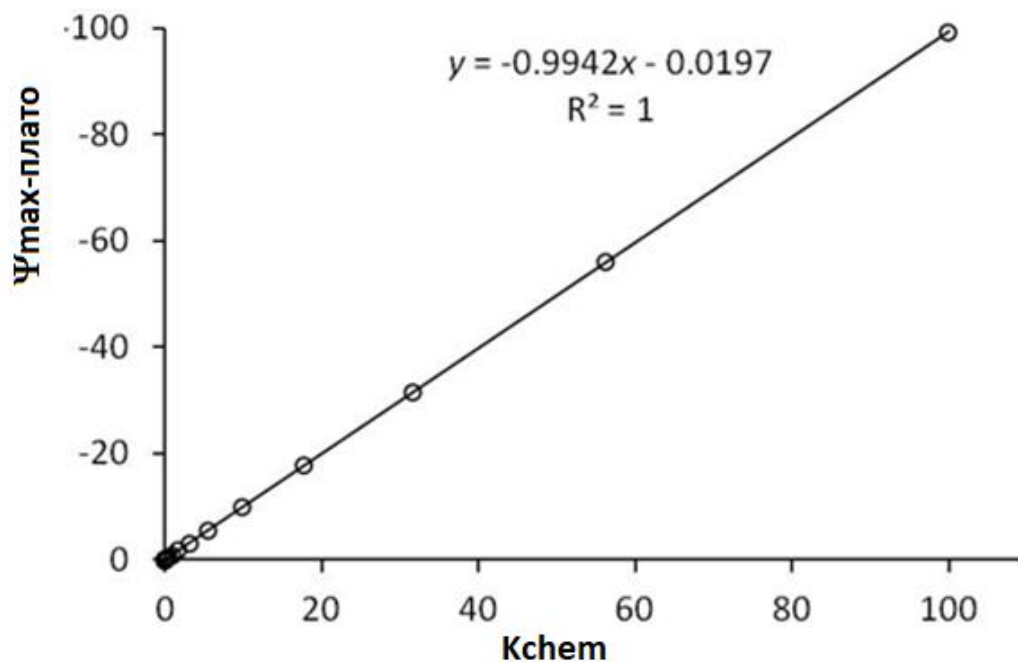
**Слика 22.** Влијание на коефициентот на електронски трансфер  $\alpha$  врз својстата на цикличните волтамограми симулирани при  $\alpha = 0.25$  (1);  $0.35$  (2);  $0.5$  (3) и  $0.75$  (3). Останатите услови при овој сет на симулации беа:  $K_{\text{chem}} = 1.256$ ,  $K = 0.2$ ,  $T = 298$  K;  $n = 2$ ,  $dE = 10$  mV,  $t = 0.005$  s.

**Figure 22.** Effect of the electron transfer coefficient of electrode reaction  $\alpha$  on the features of the cyclic voltammograms. Voltammograms are calculated for  $\alpha = 0.25$  (1);  $0.35$  (2);  $0.5$  (3) and  $0.75$  (3). Other simulation parameters were:  $K_{\text{chem}} = 1.256$ ,  $K = 0.2$ ,  $T = 298$  K;  $n = 2$ ,  $dE = 10$  mV,  $t = 0.005$  s.

Во подрачјата на максималната гранична струја на платото од steady state волтамограмите (заокружените подрачја на волтамограмите на сликите 20, 21 и 22), интензитетот на струјата  $i_{\text{max-плато}}$  е **линеарна функција од хемискиот кинетички параметар  $K_{\text{chem}}$**  (слика 23). Да се потсетиме дека кај овој механизам хемискиот параметар е дефиниран со изразот  $K_{\text{chem}} = k_c \times c(Y)$ .

Тоа значи дека интензитетот на граничните струи на плато  $i_{\text{max-плато}}$ , во реалниот експеримент, ќе биде линеарна функција од моларната концентрација  $c(Y)$  на супстратот „Y“ (лек 2).

Важно е да се наведе дека ова својство кај површински регенеративен електроден механизам (Б) е различно од тоа кај дифузиониот регенеративен механизам (А), каде  $i_{\text{max-плато}}$  беше линеарна функција од квадратен корен од моларната концентрација на супстратот „Y“.



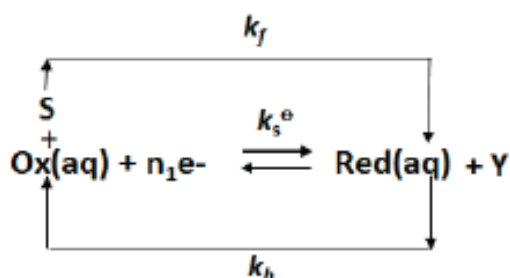
**Слика 23.** Зависност на максималните гранични струи на платото  $I_{\text{max-плато}}$  од симулираните циклични „steady-state“ волтамограми како функција од бездимензионалниот хемиски кинетички параметар  $K_{\text{chem}}$ . Симулационите параметри употребени при конструкцијата на оваа зависност беа идентични како тие на слика 19.

**Figure 23.** Dependence of maximal catalytic currents  $I_{\text{max-плато}}$  of simulated cyclic steady-state voltammograms as a function of dimensionless catalytic parameter  $K_{\text{chem}}$ . All the other simulation parameters were the same as those in figure 19.

Знаејќи дека во реалниот експеримент, наклонот на правата на зависноста од слика 23  $I_{\text{max-плато}}$  vs.  $c(Y)$  е дефиниран со изразот: **наклон** =  $|(k_c') [nFA\Gamma^*(Ox)t^{-1}]|$ ; тогаш од наклонот на правата линија од зависноста  $I_{\text{max-плато}}$  vs.  $c(Y)$  може да се определи вредноста на константата на брзината на регенеративната хемиска реакција  $k_c'$ , чија вредност е во директна корелација со брзината на хемиски реакции помеѓу супстратот „Y“ и Red(ads) формата од „лек 1“.

### 5.1.3 (B) Модел за регенеративна електрохемиска реакција на два хидрофилни лекови (дифузионен регенеративен EC'rev механизам)

Кај овој електроден механизам, претпоставуваме дека постои иницијална реверзибилна хемиска рамнотежа при реакција помеѓу хидрофилен лек „O„ и супстрат „S„. Ова е целосно нов теоретски модел за прв пат решен и презентираан во трудот [Petkovska, Gulaboski, 2019]. Во овој дифузионен електроден регенеративен механизам поврзан со регенеративна хемиска реакција, постои хемиска рамнотежа помеѓу два хидрофилни лекови уште пред апликација на потенцијал, како што е прикажано на следната реакциона шема:



Преку теоретските резултати од овој модел, покрај определувањето на константа поврзана со брзина на интеракција помеѓу двата лекови, ќе биде овозможено да се разработи и метод за да се пресмета и константата на рамнотежа на хемиската реакција помеѓу два дефинирани лекови.

Во услови на планарна дифузија, овој електроден механизам (B) може да се претстави со следните диференцијални равенки (5) и (6):

$$\left[ \frac{\partial c(\text{Ox})}{\partial t} \right] = D \left( \frac{\partial^2 c(\text{Ox})}{\partial x^2} \right) + k_b c(\text{Red}) - k_f c(\text{Ox}) \quad (5)$$

$$\left[ \frac{\partial c(\text{Red})}{\partial t} \right] = D \left( \frac{\partial^2 c(\text{Red})}{\partial x^2} \right) - k_b c(\text{Red}) + k_f c(\text{Ox}) \quad (6)$$

Диференцијалните равенки (5) и (6) се решени при следните почетни и гранични услови:

(a)  $t = 0$ ; за сите вредности на  $x$  (каде  $x$  е растојание до површината на работната електрода)  $c(\text{Ox}) + c(\text{Red}) = c^*(\text{Ox})$ ;  $[k_f / k_b] = K_{\text{eq}}$

б) за  $t > 0$  за сите вредности на  $x$ :  $c(\text{Ox}) + c(\text{Red}) = c^*(\text{Ox})$ ; и  $[k_f / k_b] = K_{\text{eq}}$

Меѓутоа, за  $t > 0$ , и  $x = 0$ , при аплицирање на електроден потенцијал, тогаш сите проемни во концентрациите на  $Ox$  и  $Red$  на површината од работната електрода (за  $x = 0$ ) ќе предизвика протекување на електрична струја. При вакви услови, на површината на работната електрода важи Butler-Volmer-овиот израз со следната форма:

$$(в) t > 0; x = 0; I / (nFA) = k_s x \exp(-\alpha\Phi) [c(Ox) - \exp(\Phi) c(Red)]$$

Со  $k_f$ ,  $k_b$  и  $K_{eq}$  се означени константата на брзина на директна и повратна хемиска реакција помеѓу  $Ox$  формата од „лек 1“ и супстратот „S“, додека  $K_{eq}$  е константата на рамнотежа на таа хемиска реакција. Значењето на сите останати симболи во овој електроден механизам е идентично како и кај електродниот механизам (A) претставен во оваа дисертација. Решенијата на диференцијалните равенки (5) и (6) беа реализирани со примена на метод на нумеричка интеграција [Mirceski, Komorsky-Lovric&Lovric, 2007]. Формулите преку кои можат да бидат пресметани теоретските волтамограми во услови на циклична скалеста волтаметрија за овој модел се претставени во работниот MATCAD фајл што е достапен во Дополнителните материјали од оваа дисертација.

Бездимензионалната струја ( $\Psi$ ) на цикличните волтамограми кај овој регенеративен електроден механизам е дефинирано со изразот  $\Psi = It^{0.5}/[(D^{0.5}nFAc^*(Ox))]$ . Во последната формула, со  $t$  е дефинирањето времетраењето на потенцијалниот чекот во циклична скалеста волтаметрија,  $I$  е симбол за јачината на електричната струја, додека значењето на другите параметри е идентично како во моделите (A) и (B). Својствата на цикличните волтамограми од овој дифузионен регенеративен електроден механизам поврзан со реверзибилна регенеративна реакција (дифузионен ECrev' механизам) зависат од неколку параметри поврзани со хемискиот чекор и со чекорот на трансфер на електрони. И кај овој електроден механизам, бездимензионалниот кинетички параметар ( $K$ ) што ја отсликува брзината на размена на електрони помеѓу работната електрода и редокс формите  $Ox$  и  $Red$  на „лекот 1“ е дефиниран со изразот  $K = k_s t^{0.5} D^{-0.5}$ . Покрај од вредноста на  $K$ , својствата на теоретските волтамограми кај механизмот (B) зависат и од константата на рамнотежа на хемиската реакција  $K_{eq}$ , како и од вредноста на бездимензионалниот хемиски регенеративен параметар  $K_{chem}$  што е дефиниран со изразот:  $K_{chem} = (k_f + k_b) \times t$ . Во присуство на вишок од

супстратите “S” и “Y” во електрохемиската ќелија, константите на директната и повратната хемиска реакција  $k_f$  и  $k_b$  се дефинирани со изразите:  $k_f = k_f' \times c(S)$  и  $k_b = k_b' \times c(Y)$ .

Тоа значи дека во реалните експерименти, вредноста на хемискиот регенеративен параметар  $K_{chem}$  може да се менува со промена на концентрациите на супстратите “S” и “Y” во електрохемиската ќелија. Во сите симулации за овој електроден механизам (B), времето на потенцијалниот пулс (потенцијалниот сегмент каде се мери струјата) беше поставено на вредност од  $t = 0.01$  s; додека вредноста на потенцијалниот чекор беше  $dE = 4$  mV.

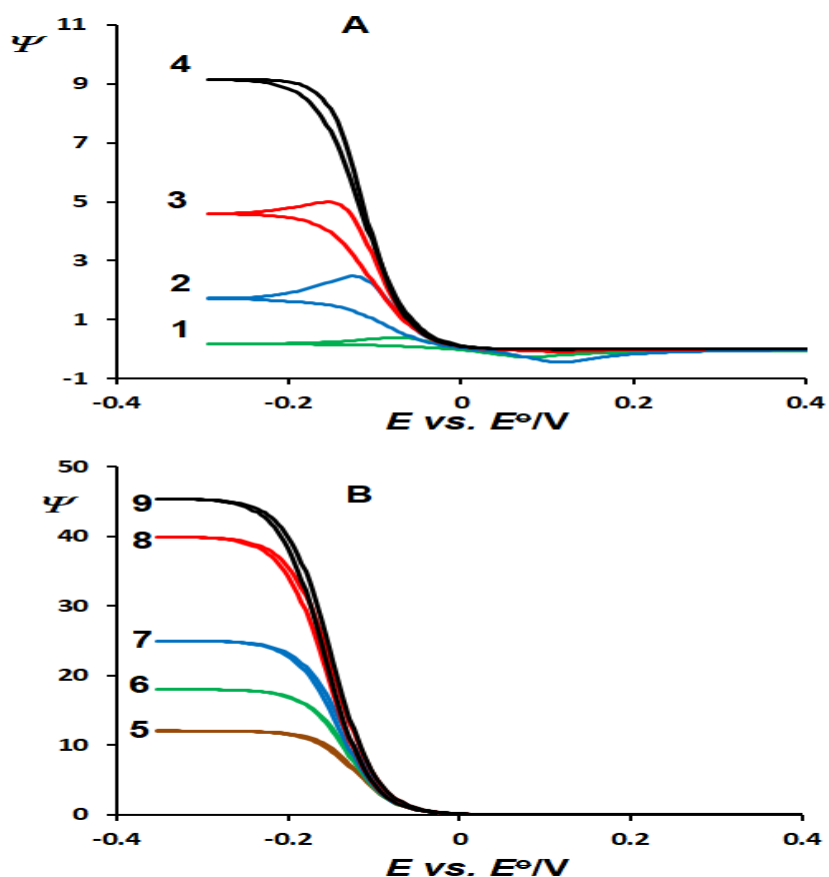
Кај овој механизам, редуциската струја беше дефинирана со позитивен предзнак, додека оксидациската (повратна) компонента на цикличните волтамограми имаше негативен предзнак, што е во согласност со американската конвенција за волтаметрија.

На слика 24 (панели A и B) се прикажани циклични волтамограми за електродниот регенеративен механизам (B), каде при голема вредност на константата на рамнотежа  $K_{eq}$  е студирано влијанието на хемискиот параметар  $K_{chem}$  врз својствата на волтаметриските криви.

Како што може да се забележи од волтамограмите на слика 24, зголемувањето на вредноста на бездимензионалниот хемиски параметар  $K_{chem}$  доведува до идентични промени на формата и својствата на цикличните волтамограми како и кај механизмот (A). При вредности на  $K_{chem} > 0.2$  (крива 4 на слика 24A и сите криви на слика 24B), цикличните волтамограми добиваат “steady-state” сигмоидална форма.

Во ваква ситуација, граничната максимална струја на платоата од цикличните волтамограми е зависна само од вредноста на  $K_{chem}$  (т.е. од концентрацијата на супстратот “Y”) како и кај електродниот механизам (A) обработен во оваа дисертација.





**Слика 24.** Циклични волтамограми на дифузионен регенративен EC'rev механизам симулирани при вредност за константата на рамнотежа на хемиската реакција  $K_{eq} = 1000$ , како и при неколку мали и умерени вредности на хемискиот чекор (панел А) и големи вредности на брзината на хемискиот чекор (панел В) изразени преку вредноста на бездимензионалниот хемиски регенративен параметер  $K_{chem}$ . Вредностите на  $K_{chem}$  беа: 0.001 (1); 0.0316 (2); 0.1 (3) 0.224 (4) (за панелот А); и 0.316 (б); 0.562 (6); 1 (7); 4 (8) и 10 (9) (за панелот В). Вредноста на бездимензионалниот параметар на електродната реакција беше  $K = 0.1$ . Другите параметри употребени во овој сет на симулации беа: потенцијален чекор  $dE = 4 \text{ mV}$ ; времетраење на потенцијалниот пулс  $t = 0.01 \text{ s}$ ; вредност на коефициентот на електронски трансфер  $\alpha = 0.5$ ; температура  $T = 298 \text{ K}$ ; коефициент на дифузија  $D = 5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ .

**Figure 24.** Cyclic voltammograms of diffusional regenerative EC'rev mechanism calculated for value of equilibrium constant  $K_{eq} = 1000$ , and for several small and moderate values (panel A) and large values (panel B) of chemical parameter  $K_{chem}$ . The values of  $K_{chem}$  were set to: 0.001 (1); 0.0316 (2); 0.1 (3) 0.224 (4) for Panel A; and 0.316 (b); 0.562 (6); 1 (7); 4 (8) and 10 (9) for Panel B. The value of dimensionless kinetic parameter of electrode reaction was set to  $K = 0.1$ . The other simulation parameters were: step potential  $dE = 4 \text{ mV}$ ; duration of potential step  $t = 0.01 \text{ s}$ ; electron transfer coefficient  $\alpha = 0.5$ ; temperature  $T = 298 \text{ K}$ ; diffusion coefficient  $D = 5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ .

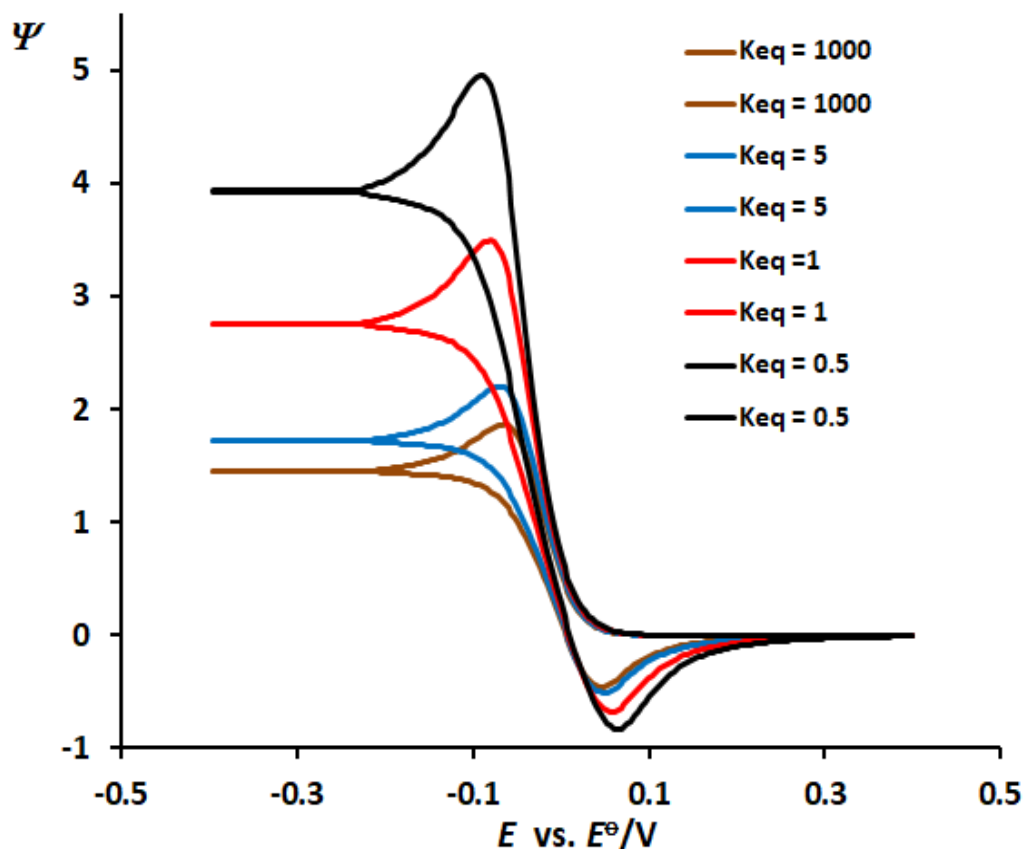
Бидејќи вредноста на константата на рамнотежа  $K_{eq}$  го пределува количеството на  $Ox$  и  $Red$  што можат да претрпат трансформација на површината на работната електрода, вредноста на  $K_{eq}$  ќе влијае врз сите карактеристични параметри на цикличните волтамограми. На слика 25 се прикажани циклични волтамограми за овој механизам, што се симулирани при вредност за бездимензионалниот хемиски параметар  $K_{chem} = 0.0316$ , при вредност за бездимензионалниот кинетички параметар на трансфер на електрони од  $K = 0.5$ , како и при неколку вредности на  $K_{eq}$ .

Како што може да се забележи од волтамограмите на слика 25, сите релевантни карактеристични параметри на цикличните волтамограми т.е. висината на пиковите, потенцијалната сепарација помеѓу редукцискиот и оксидацискиот пик  $\Delta E_p$  ( $\Delta E_p = |(E_{p,c} - E_{p,a})|$ ), како и големината на максималните гранични струи измерени при крајни негативни потенцијали се функција од  $K_{eq}$ . На слика 26 е прикажана зависноста потенцијалната сепарација помеѓу редукцискиот и оксидацискиот пик  $\Delta E_p$  како функција од  $\log(K_{eq})$ .

Кривите на слика 26 се симулирани при три вредности на хемискиот параметар  $K_{chem}$ , при вредност за  $K = 0.5$ .

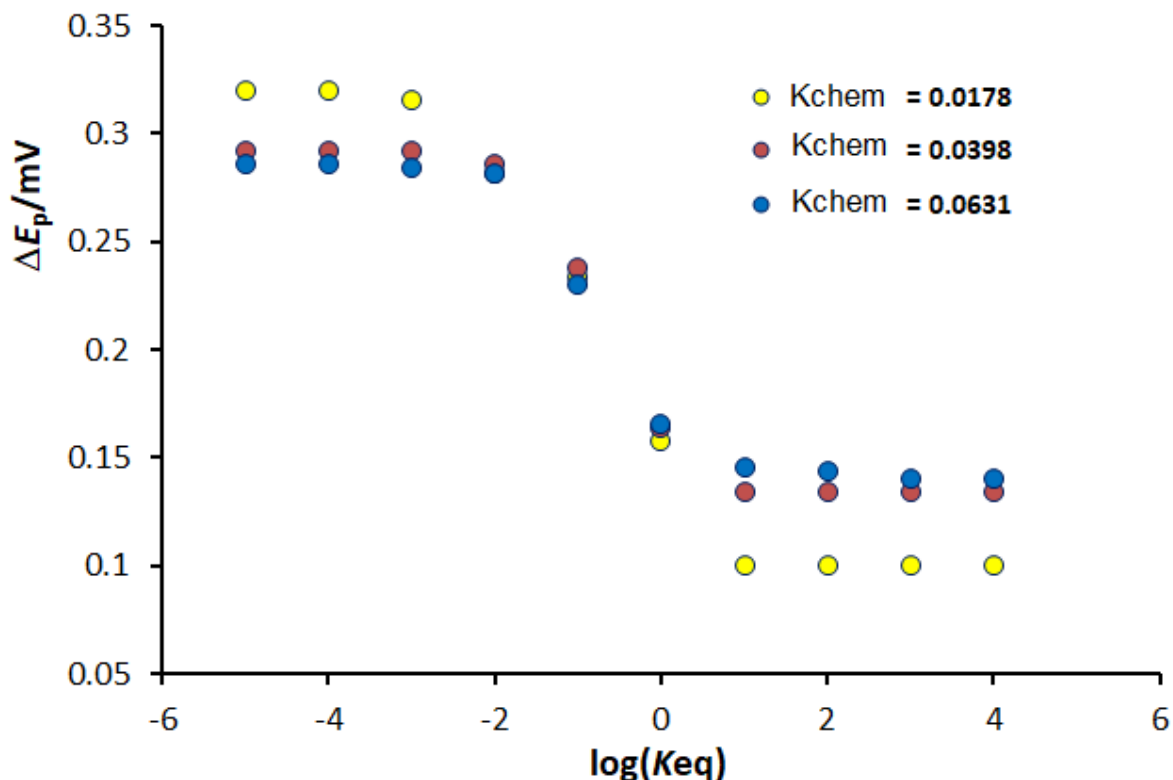
Во принцип, зголемувањето на вредноста на рамнотежната константа  $K_{eq}$  е проследено со намалување на потенцијалната сепарација помеѓу редукцискиот и оксидацискиот пик  $\Delta E_p$ . Така на пример, при зголемување на вредноста на  $K_{eq}$  од 0.001 до 100 (при  $K_{chem} = 0.0178$ , вредноста на  $\Delta E_p$  се менува од 320 mV на 100 mV.

Во регионот на вредности  $-1.5 < \log(K_{eq}) < 1$ , постои линеарно намалување на вредноста на  $\Delta E_p$  со зголемување на вредноста на  $K_{eq}$ . Нагибот на таа права во овој регион изнесува  $-58 \text{ mV}/\log(K_{eq})$ , и оваа вредност на наклонот е независна од вредноста на  $K_{chem}$ .



**Слика 25.** Циклични волтамограми на дифузиски регенеративен EC'rev механизам симулирани како функција од вредноста на константата на ранотежа на хемискиот регенеративен чекор  $K_{eq}$ . Волтамограмите се пресметани при вредност на бездимензионалниот хемиски регенеративен параметар  $K_{chem} = 0.0316$ . При овие симулации, вредноста на бездимензионалниот параметар на брзина на пренос на електрони беше  $K = 0.5$ . Останатите услови при овој сет на симулации беа идентични како тие употребени на слика 24.

**Figure 25.** Cyclic voltammograms of diffusional catalytic EC'rev mechanism calculated as a function of equilibrium constant of chemical reaction  $K_{eq}$ . Curves are simulated for value of dimensionless chemical regenerative parameter  $K_{chem} = 0.0316$ . The value of dimensionless kinetic parameter of electrode reaction was set to  $K = 0.5$ . Other simulation conditions were same as those in figure 24.

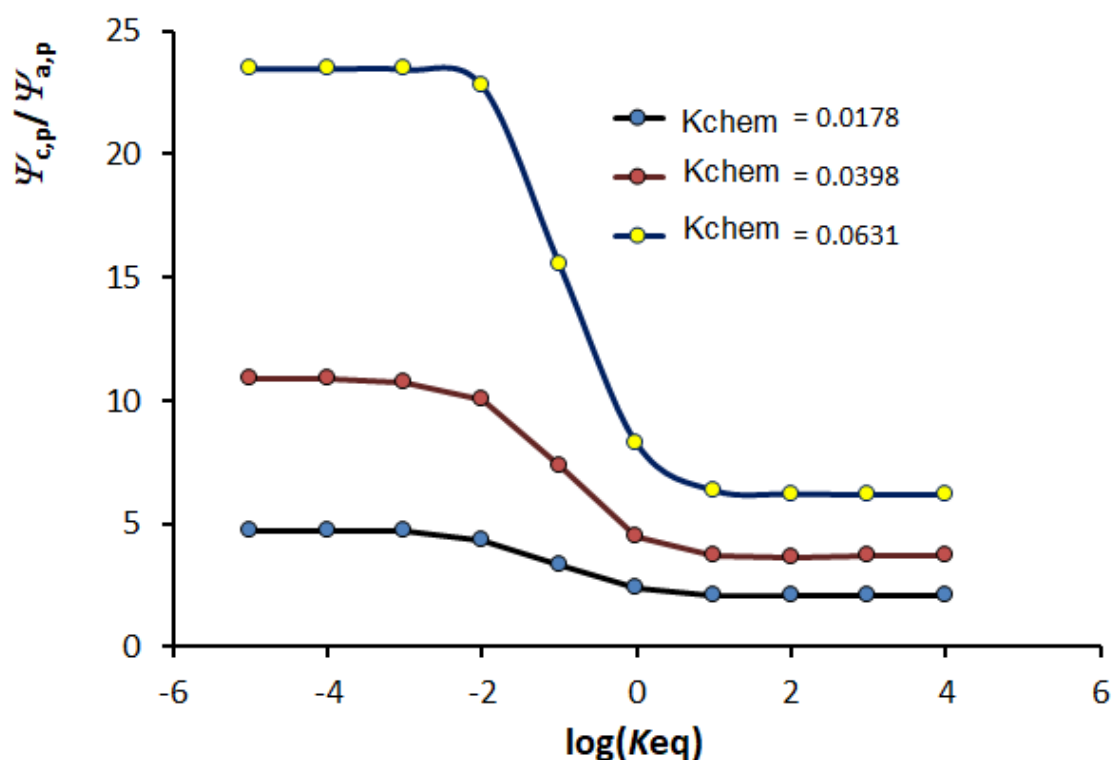


**Слика 26.** Влијание на потенцијалната сепарација помеѓу катодниот и анодниот пик ( $\Delta E_p = |(E_{p,c} - E_{p,a})|$ ) на симулираните циклични волтамограми како функција од  $\log(K_{eq})$ . Волтамограмите се симулирани при три различни вредности за бездимензионалниот хемиски регенеративен параметар  $K_{chem}$  (вредностите на  $K_{chem}$  се дадени во граfiците). При овие симулации, вредноста на бездимензионалниот параметар на брзина на пренос на електрони беше  $K = 0.5$ . Останатите услови при овој сет на симулации беа идентични како тие употребени на слика 24.

**Figure 26.** Dependence of the peak-to-peak potential separation ( $\Delta E_p = |(E_{p,c} - E_{p,a})|$ ) of cyclic voltammograms as a function of  $\log(K_{eq})$ . Curves are calculated for three different values of catalytic parameter  $K_{chem}$  (values of  $K_{chem}$  are given in the chart). The value of dimensionless kinetic parameter of electrode reaction was set to  $K = 0.5$ . Other simulation conditions were same as those reported in figure 24.

При умерени вредности на хемискиот параметар  $K_{chem}$ , се забележува форма на сигмоидална зависност помеѓу интензитетите на редукциските (катодните) во однос на оксидациските (анодните) струи на пиковите ( $\Psi_{c,p}/\Psi_{a,p}$ ) како функција од  $\log(K_{eq})$  (Слика 27). Во подрачјето на вредности на рамнотежната константа од  $-1.5 < \log(K_{eq}) < 0.5$  постои линеарна зависност на односот  $\Psi_{c,p}/\Psi_{a,p}$  со зголемување на вредноста на  $K_{eq}$ . Во вакво сценарио, наклоните на правите на односот  $\Psi_{c,p}/\Psi_{a,p}$  како функција од  $\log(K_{eq})$  се

функција од вредноста на  $K_{chem}$ . Наклоните на правата на зависноста  $\Psi_{c,p}/\Psi_{a,p}$  vs.  $\log(K_{eq})$  од слика 27 се дефинирани со вредностите:  $-7.26$  (за  $K_{chem} = 0.0631$ );  $-2.781$  (за  $K_{chem} = 0.0398$ ); и  $-0.966$  (за  $K_{chem} = 0.0178$ ). Знаејќи ги овие теоретски вредности, ако ја знаеме вредноста на хемискиот бездимензионален параметар  $K_{chem}$ , тогаш можеме да ги употребиме вредностите на наклоните од зависностите  $\Psi_{c,p}/\Psi_{a,p}$  vs.  $\log(K_{eq})$  за да се пресмета вредноста на константата на рамнотежа ( $K_{eq}$ ) кај овој електроден регенеративен механизам.



**Слика 27.** Влијание на односно на струите од катодните vs. анодните пикови  $\Psi_{c,p}/\Psi_{a,p}$  како функција од  $\log(K_{eq})$ . Волтамограмите беа симулирани при три различни вредности за бездимензионалниот хемиски регенеративен параметар  $K_{chem}$  (вредностите на  $K_{chem}$  се дадени во графиците). При овие симулации, вредноста на бездимензионалниот параметар на брзина на пренос на електрони беше  $K = 0.5$ . Останатите услови при овој сет на симулации беа идентични како тие употребени на слика 24.

**Figure 27.** Dependence of the ratio of peak currents of cathodic vs. anodic peaks  $\Psi_{c,p}/\Psi_{a,p}$  as a function of  $\log(K_{eq})$ . Curves are calculated for three different values of catalytic parameter  $K_{catalytic}$  (values of  $K_{catalytic}$  are given in the chart). The value of dimensionless kinetic parameter of electrode reaction was set to  $K = 0.5$ . Other simulation conditions were same as in Figure 24.

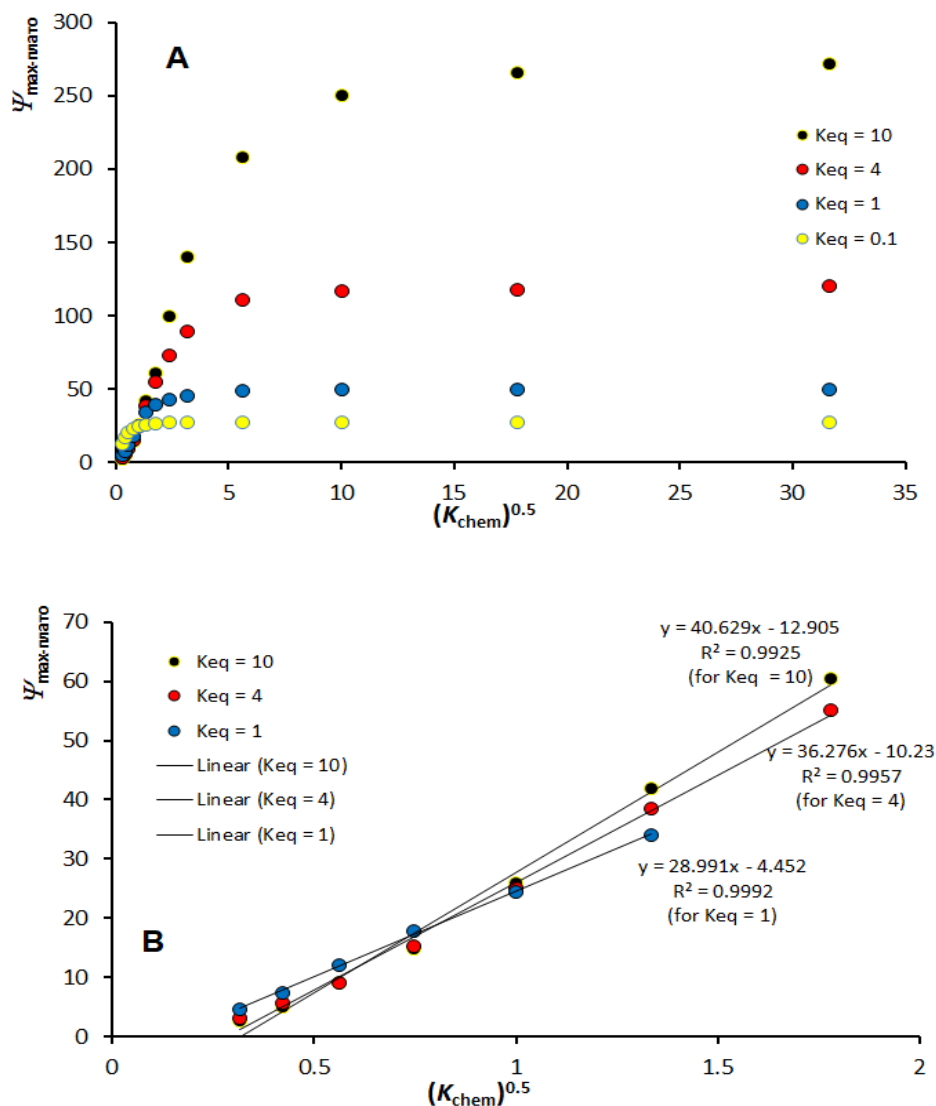
Слично како и кај регенеративниот механизам со иреверзибилна хемиска реакција (A), кога брзината на хемиската реакција е многу поголем од брзината на електродна реоксидација  $\text{Red}(\text{aq}) - \text{ne}^- \rightarrow \text{Ox}(\text{aq})$ , тогаш повторно се добиваат „steady-state“ циклични волтамограми (види волтамограми на слика 24B). Својствата на овие “steady state” циклични волтамограми зависат од параметрите на хемиска реакција ( $K_{\text{eq}}$  и  $K_{\text{chem}}$ ), но не зависат од параметрите на електродната реакција ( $k_s$  и  $\alpha$ ).

Кај овој механизам, големината на максималната струја на плато  $\Psi_{\text{max-плато}}$  како функција од квадратен корен на бездимензионалниот хемиски параметар се прикажани на слика 28A. На кривите претставени на слика 28A постојат сегменти на линеарна зависност помеѓу  $\Psi_{\text{max-плато}}$  и  $(K_{\text{chem}})^{0.5}$  и равенките на овие зависимости се дадени во графиконот на слика 28B.

Равенките на правите на зависноста  $\Psi_{\text{max-плато}}$  и  $(K_{\text{chem}})^{0.5}$  претставени на слика 28B можат да се употребат [на сличен начин како и кај механизмот (A)] за пресметување на константата на брзина на регенеративна хемиска реакција кај овој електроден механизам, доколку е претходно определена вредноста на  $K_{\text{eq}}$ .

При експериментите кај овој електроден механизам, со цел да се испитаат интеракциите помеѓу редокс активниот лек („лек “) и супстратот „Y“ („лек 2“), потребно е да се менува само концентрацијата на супстратот „Y“ (лек 2“) во електрохемиската ќелија.

Притоа, потребно е експериментите да се изведуваат при константна брзина на промена на потенцијал (константни вредности на  $dE$  и  $t$ ), како и при константна вредност на концентрацијата на супстратот „S“ присутен на почетокот на експериментот.

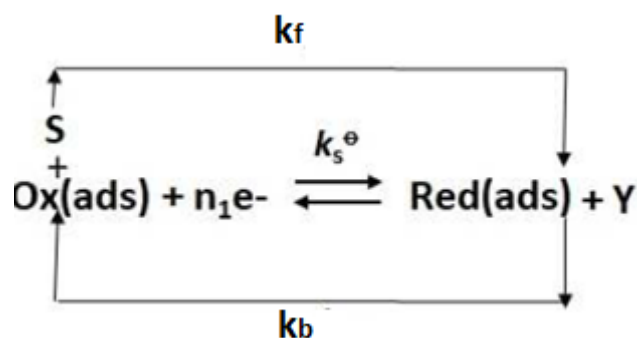


**Слика 28.** (А) Зависност на максималните гранични струи на плато  $\Psi_{max-plateau}$  од цикличните steady-state волтамограми како функција од квадратен корен од бездимензионалниот хемиски регенеративен параметар  $K_{chem}$ . Волтамограмите се симулирани при вредности на константата на рамнотежа на хемиската реакција  $Keq = 0.1; 1; 4$  и  $10$ . На графиконот (В) се прикажани линеарните сегменти од кривите на сликата (А), заедно со равенките на линеарните прави. При овие симулации, вредноста на бездимензионалниот параметар на брзина на пренос на електрони беше  $K = 0.5$ . Останатите услови при овој сет на симулации беа идентични како тие употребени на слика 24.

**Figure 28.** (A) Dependence of the limiting currents  $\Psi_{max-plateau}$  of steady-state cyclic voltammograms on square-root of catalytic parameter  $K_{chem}$ . Curves are simulated for  $Keq$  of 0.1; 1; 4 and 10. Panel (B) shows the linear parts of the corresponding curves in panel A, with equations of the linear lines. The value of dimensionless kinetic parameter of electrode reaction was set to  $K = 0.5$ . Other simulation conditions were same as in figure 24.

### 5.1.4 (Г) Површински реверзибилен регенеративен електроден механизам (површински EC<sup>'rev</sup> механизам)

И овој теоретски модел е целосно нов и за прв пат решен во услови на циклична скалеста волтаметрија и презентираан во трудот [Petkovska, Gulaboski, 2020]. Кај овој модел, се претпоставува дека постои иницијална рамнотежа помеѓу *липофилен електрохемиски активен лек (Ox(ads))* и *друг хидрофилен лек "S"*. Моделот за овој површински реверзибилен регенеративен механизам може да се опише со следната реакциона шема:



Математички, овој теоретски модел може да се претстави со следните диференцијални равенки (7-8);

$$d\Gamma(\text{Ox})/dt = -I/(nFA) + k_b\Gamma(\text{Red}) - k_f\Gamma(\text{Ox}) \quad (7)$$

$$d\Gamma(\text{Red})/dt = I/(nFA) - k_b\Gamma(\text{Red}) + k_f\Gamma(\text{Ox}) \quad (8)$$

Диференцијалните равенки (7) и (8) се решени при следните потечни и гранични услови:

$$(a) \quad t = 0; \Gamma(\text{Ox}) + \Gamma(\text{Red}) = \Gamma^*(\text{Ox});$$

$$(b) \quad t > 0; \Gamma(\text{Ox}) + \Gamma(\text{Red}) = \Gamma^*(\text{Ox});$$

При условите  $t = 0$  и  $t > 0$ , важи дека рамнотежните концентрации на електроактивните честички Ox и Red адсорбирани на површината од работната електрода се детерминирани од вредноста на константата на рамнотежа  $K_{eq}$ , дефиниран со изразот:  $K_{eq} = [k_f/k_b]$ . Притоа, струјата што тече низ електрохемиската ќелија при  $t > 0$  е дефинирана со изразот (c);

$$(c) \quad t > 0; I/(nFA) = k_s^\ominus \exp(-\alpha\Phi) [\Gamma(\text{Ox}) - \exp(\Phi)\Gamma(\text{Red})]$$

Рекурентните формули што се решение за овој математички модел за површински реверзибилен регенеративен EC<sup>'rev</sup> механизам (во услови на



циклична скалеста волтаметрија) се дадени во Дополнителните материјали во форма на MATHCAD симулациски фајл на крајот од дисертацијата.

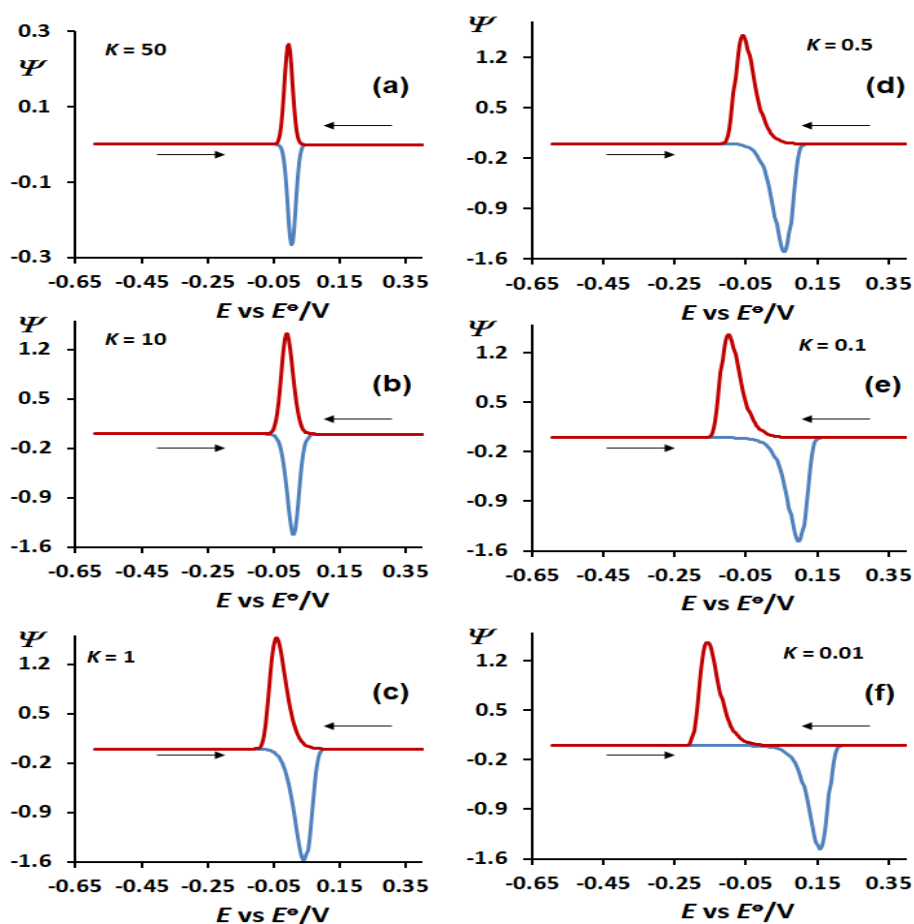
Идентично како и кај електродниот регенеративен механизам (Б) и кај овој електроден механизам бездимензионалната струја е дефинирана со изразот:  $\Psi = It / [(nFA) \Gamma^*(Ox)]$ . Во последната равенка, со  $t$  е дефинирано времетраењето на потенцијалните чекори во кои се мери струјата во циклична скалеста волтаметрија. Значењето на ознаките и симболите во последната формула кај овој механизам е идентично со ознаките објаснети за механизмот (Б) претставени погоре во оваа дисертација.

Теоретските циклични волтамограми на површинскиот регенеративен реверзибилен ECrev' механизам се функција од неколку бездимензионални параметри. Покрај од бездимензионалниот електроден кинетички параметар  $K$ , дефиниран со изразот  $K = k_s \times t$ , својствата на теоретските циклични волтамограми завизат и од вредност на константата на рамнотежа дефинирана со  $K_{eq} = k_f/k_b$ , како и од вредноста на бездимензионалниот хемиски регенеративен параметар  $K_{chem}$  што е дефиниран како  $K_{chem} = \epsilon \times t$ . Во последнава равенка „ $\epsilon$ “ е т.н. хемиски параметар што е поврзан со брзината на хемиската регенеративна реакција со изразот  $\epsilon = (k_f + k_b)$ , каде  $k_f$  и  $k_b$  се константните на брзина на директна и повратна хемиска реакција. Како што е објаснето во електродниот механизам (В), при концентрации на супстратите “S” и “Y” поголеми одошто почетната концентрација на Ox (лекот 1) во електрохемиската ќелија,  $k_f$  и  $k_b$  се поврзани со концентрациите на овие супстратие преку следните релации:  $k_f = k_f' \times c(S)$  и  $k_b = k_b' \times c(Y)$ .  $k_f'$  и  $k_b'$  се ознаки за вистинските константи на брзина на директната и повратната реакција со единици ( $\text{mol}^{-1} \text{cm}^3 \text{s}^{-1}$ ), додека  $c(S)$  и  $c(Y)$  се моларните концентрации на супстратите “S” и “Y” присутни во електрохемиската ќелија, соодветно. Согласно последните дефиниции, вредноста на бездимензионалниот хемиски параметар  $K_{chem}$  може да се менува со пормена на концентрациите на супстратите “S” или “Y”. Во рамките на овој модел, во симулациите беа употребени следните параметру: времетраење на потенцијалните чекори во циклична скалеста волтаметрија  $t = 0.001 \text{ s}$ , големина на потенцијален чекор  $dE = 4 \text{ mV}$ , додека концентрацијата на супстратот “S” беше константна ( $c(S) = 0.1 \text{ mol/L}$  во сите симулации). Целосниот работен MATHCAD симулационен фајл за овој електроден

механизам (Г) се наоѓа во Дополнителните материјали од оваа дисертација, каде се дадени и сите рекурентни формули неопходни за симулирање на овој електроден механизам. Во отсуство на значителна брзина на регенеративната хемиска реакција, цикличните волтамограми од овој електроден механизам покажуваат својства како за обична површинска електродна реакција [Armstrong et al, 2002]. На слика 29 се претставени серија од циклични волтамограми за овој електроден механизам симулирани при вредности за бездимензионалниот електроден параметар ( $K$ ), при вредност на константата на рамнотежа од  $K_{eq}=10$ , и при многу мала вредност на бездимензионалниот хемиски регенративен параметер  $K_{chem}$  ( $K_{chem} = 0.00001$ ). При вакви услови, при мала вредност на брзината на хемиската реакција, се добиваат циклични волтамограми што се типични за површински електродни механизми од типот  $Ox(ads)+ne = Red(ads)$ .

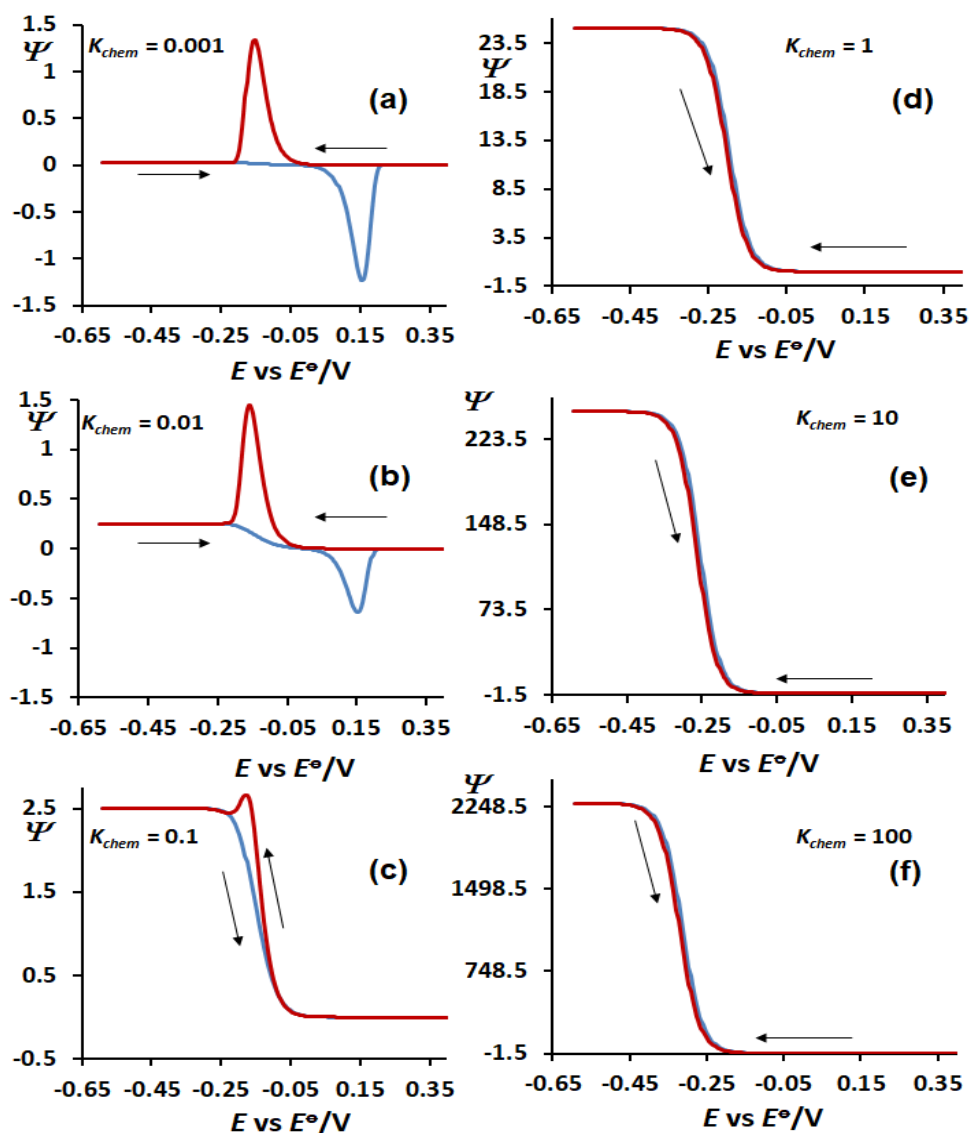
Ако вредноста на константата на рамнотежа е многу голема ( $K_{eq} > 1000$ ), во таква ситуација менувањето на вредноста на хемискиот регенеративен параметар  $K_{chem}$  предизвикува промени на цикличните волтамограми идентични како и кај “едноставната” површински регенеративен механизам (ECirr’ механизмот Б), каде постои иреверзибилна регенеративна хемиска реакција (слика 30). Во вакво сценарио, зголемувањето на вредноста на хемискиот регенеративен параметар  $K_{chem}$  ќе предизвика намалување на интензитетот на струјата на оксидациската струјна компонента и соодветно зголемување на редукциската струјна компонента од цикличните волтамограми (слика 30 2a–c). При овие услови, дополнителна карактеристика е зголемувањето на максималната гранична струја на крајот од цикличните волтамограми. Во ситуации кога вредноста на хемискиот регенеративен параметар  $K_{chem} > 0.5$ , се добиваат сигмоидални (steady-state) циклични волтамограми (слика 30, 2d–f), чии гранични максимални струи се функција само од вредноста на  $K_{chem}$  [Petkovska, S., Gulaboski, R. 2020]. При многу голем вредности на  $K_{chem}$  се добиваат идентични сигмоидални криви, со идентични струи и на редукциската и на оксидациската компонента од цикличните волтамограми. Во ваква ситуација, брзината на хемиската реакција  $Red(ads)+Y \rightarrow Ox(ads)+S$  е многу поголема отколку електродната трансформација  $Red(ads) - ne^- \rightarrow Ox(ads)$ . Како резултат на овој феномен, и двете струи што се јавуваат се во суштина редукциски струи. Притоа,

лимитирачките максимални струи на т.н. steady-state циклични волтамограми во вакво сценарио зависат само од вредноста на хемискиот регенеративен параметар  $K_{chem}$  (а тоа значи од  $c(Y)$ , при константна вредност на  $c(S)$ ), но не зависат од другите параметри на електродниот чекор ( $K, \alpha$ ). Ситуациите опишани на слика 29 и слика 30 се две гранични ситуации на комплексниот површински регенеративен EC'rev механизам ( $\Gamma$ ).



**Слика 29.** Циклични волтамограми на површински регенеративен EC'rev електроден механизам пресметани како функција од вредноста на бездимензионалниот кинетички параметар  $K$ . Волтамограмите се симулирани при вредност  $Keq = 10$ , и при мала брзина на хемиската реакција ( $K_{chem} = 0.00001$ ). Останатите симулациски параметри беа:  $T = 298$  K;  $n = 2$ ;  $\alpha = 0.5$ ,  $dE = 4$  mV, временски инкремент на потенцијалниот пулс  $t = 0.001$  s. Вредностите на бездимензионалниот кинетички параметар  $K$  се дадени во графициите.

**Figure 29.** Cyclic voltammograms calculated as a function of kinetics of dimensionless electron transfer parameter  $K$ . Voltammograms are simulated for an equilibrium constant of chemical regenerative reaction  $Keq = 10$ , and for small rate of regenerative reaction ( $K_{chem} = 0.00001$ ). The other parameters used in simulations are:  $T = 298$  K;  $n = 2$ ;  $\alpha = 0.5$ ,  $dE = 4$  mV, time increment  $t = 0.001$  s. The magnitudes of dimensionless electron transfer parameter  $K$  are given in the charts.



**Слика 30.** Влијание на брзината на хемиската реакција врз својствата на цикличните волтамограми за површински регенеративен ECrev' електроден механизам, симулирани при  $K = 0.1$  и  $Keq = 1000$ . Останатите параметри користени во симулациите за овие волтамограми беа идентични како условите на слика 29.

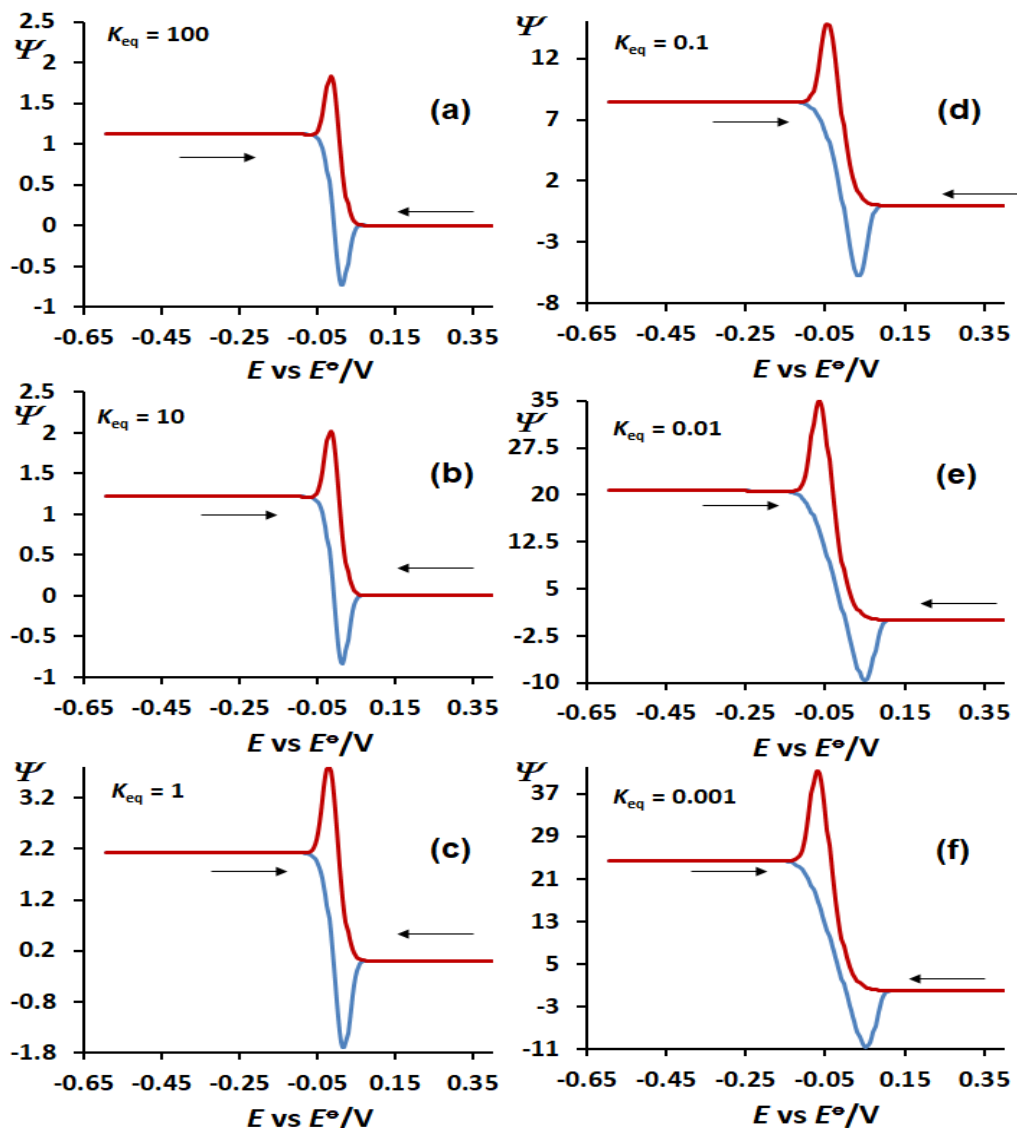
**Figure 30.** Influence of chemical reaction rate to the features of theoretical cyclic voltammograms of a surface catalytic ECrev' mechanism, simulated for  $K = 0.1$  and  $Keq = 1000$ . The other parameters in simulation model were identical as those in figure 29.

Влијанието на вредноста на константата на рамнотежа на хемиската реакција  $Keq$ , врз својствата на цикличните волтамограми за површинскиот реверзибилен регенеративен EC'rev механизам се прикажани на слика 31, 32 и 33. Како што може да се забележи од кривите на слика 31, константата на хемиска рамнотежа  $Keq$ , влијае врз сите релевантни параметри на цикличните

волтамограми кај овој регенеративен механизам (висината на катодниот и анодниот пик; потенцијалната сепарација помеѓу катодниот и анодниот пик, како и на големината на максималната гранична струја  $\Psi_{\text{max-плато}}$ ). Така на пример, големината на однос на катодни vs. анодни струи се менува од 1.20 (при  $K_{\text{eq}} = 100$ ) до 1.55 (при  $K_{\text{eq}} = 0.01$ ). Притоа, намалувањето на вредноста на  $K_{\text{eq}}$  од 100 до 0.01 е проследено со поместување на потенцијалот на катодниот пик за 45 mV негативна насока, и на анодниот пик за 45 mV во позитивна насока. На слика 32 е претставена зависноста на потенцијалната сепарација помеѓу катодниот и анодниот пик ( $|\Delta E_p|$ ) како функција од  $\log(K_{\text{eq}})$ . Кривите на слика 32 се симулирани при вредност на хемискиот бездимензионален регенеративен параметар  $K_{\text{chem}} = 0.0447$ , при три вредности за бездимензионалниот електроден кинетички параметар  $K$ . Сигмоидалните зависност прикажани на слика 32 се карактеристични за т.н. ЕС електроден механизам [Compton et al. 2010]. Линеарна зависност на овие криви на слика 32 помеѓу  $|\Delta E_p|$  и  $\log(K_{\text{eq}})$  постои во регионот  $2.0 < \log(K_{\text{eq}}) < 1$ . Бидејќи наклоните на линеарните делови од кривите на зависноста  $|\Delta E_p|$  vs.  $\log(K_{\text{eq}})$  на слика 32 се идентични, тие можат да се искористат за пресметување на вредноста на  $K_{\text{eq}}$ , доколку вредности за  $n$ ,  $\alpha$  и  $k_s$  за реакција  $\text{Ox(ads)} + n e^- = \text{Red(ads)}$  се познати или се определени со методологија опишана во [Armstrong et al, 2002].

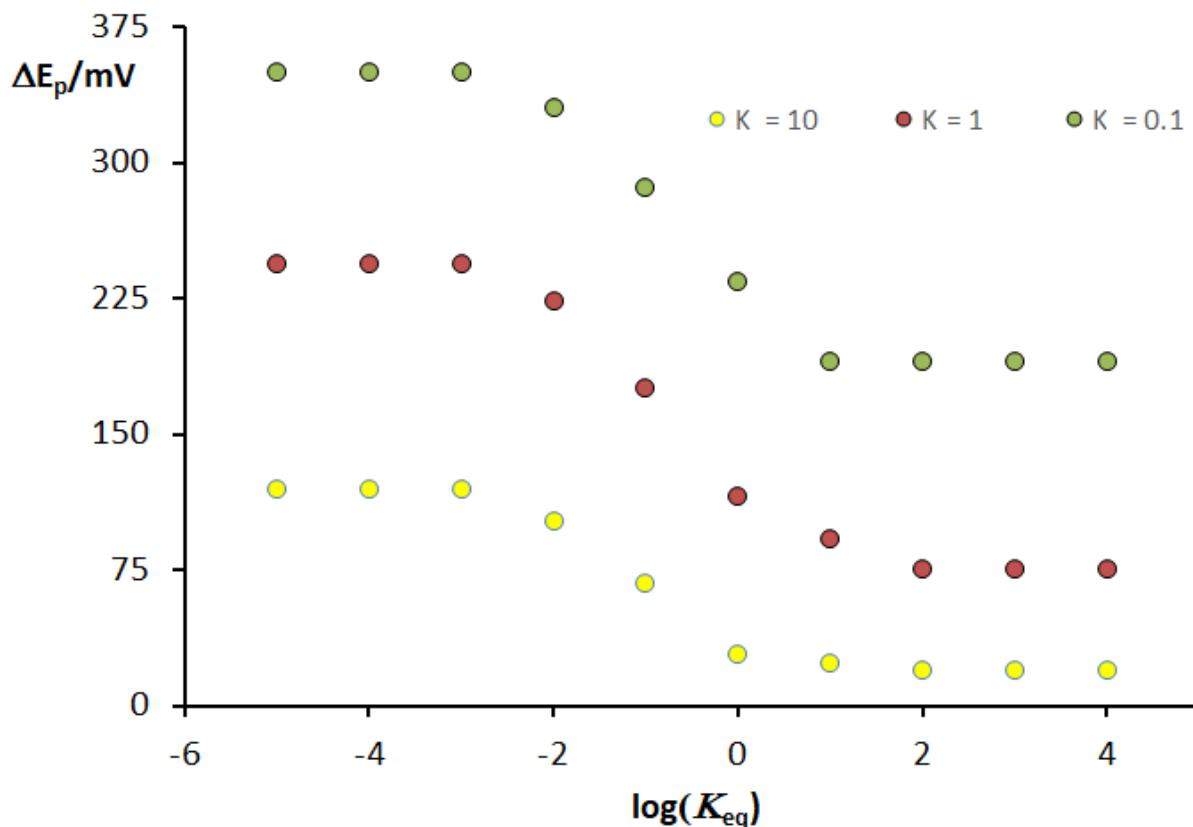
Како што е покажано во трудовите [Compton et al, 2010], вредноста на т.н. “максимална гранична струја на плато,, од steady-state цикличните волтамограми ( $\Psi_{\text{max-плато}}$ ) кај регенеративните ЕС механизми може да се употреби за квантитативни намени, како и за определување на параметри поврзани со брзината на регенеративната хемиска реакција. На слика 33 се прикажани криви од анализата на  $\Psi_{\text{max-плато}}$  од цикличните волтамограми што се симулирани како функција од  $K_{\text{eq}}$ . При големи вредности на хемискиот регенеративен параметар  $K_{\text{chem}}$  (крива со жолти точки на слика 33), може да се забележи дека големината на максималната гранична струја на платото  $\Psi_{\text{max-плато}}$  не зависи од  $K_{\text{eq}}$ . При умерени вредности на хемискиот кинетички параметар  $K_{\text{chem}}$ , постои сигмоидална зависност помеѓу  $\Psi_{\text{max-плато}}$  и  $K_{\text{eq}}$  (криви со црни, плави црни и црвени точки на слика 33). Она што треба да се нагласи е дека максималната гранична струја на платото не зависи од вредноста на  $n$ ,

$K$  и  $\alpha$ , Ова е исклучително важно за определување на брзината на интеракции помеѓу двата лекови, бидејќи за определување на константата на брзина на интеракции преку овој механизам, не е неопходно да се знаат вредностите на електродната реакција  $Ox(ads) + ne = Red(ads)$ .



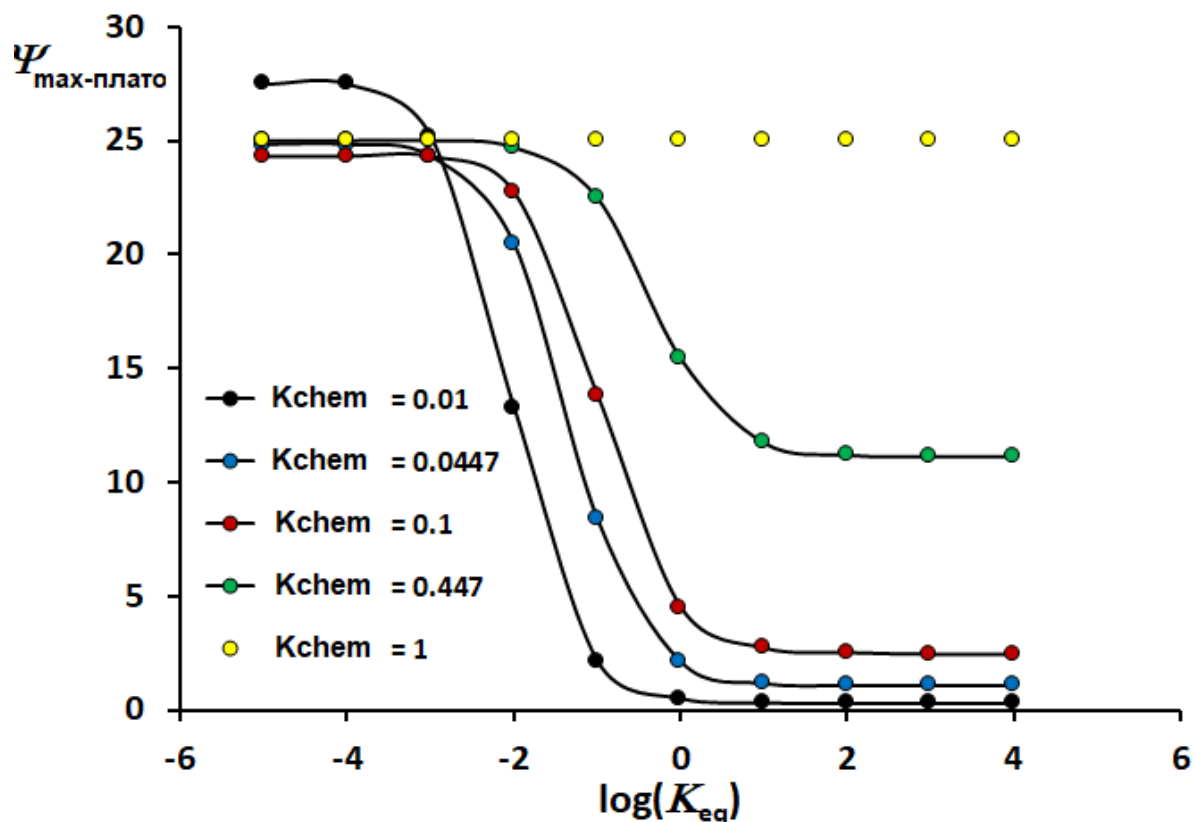
**Слика 31.** Влијание на вредноста на константата на рамнотежа на хемиската реакција врз својствата на цикличните волтамограми, симулирани при вредности на  $K = 10$   $K_{chem} = 0.0447$ . Останатите услови при овој сет на симулации беа идентични како и параметрите на слика 29.

**Figure 31.** Effect of equilibrium constant of chemical reaction to the characteristics of theoretical cyclic voltammograms, simulated for  $K = 10$  and  $K_{chem} = 0.0447$ . The other parameters in simulation model were identical as in figure 29.



**Слика 32.** Зависност на потенцијалната сепарација помеѓу катодните и анодните пикови  $|\Delta E_p|$  од симулираните циклични волтамограми како функција од  $\log(K_{eq})$ . Кривите се симулирани при вредности на бездимензионалниот кинетички параметар на електронски трансфер  $K = 0.1$ ,  $K = 1$ , and  $K = 10$ , и при вредност на бездимензионалниот кинетички параметар на хемиската регенеративна реакција  $K_{chem} = 0.0447$ . Останатите параметри користени при овој сет на симулации беа идентични како параметрите наведени во слика 29.

**Figure 32.** Peak-to-peak separation  $|\Delta E_p|$  of simulated cyclic voltammograms as a function of  $\log(K_{eq})$ . Curves are calculated for  $K = 0.1$ ,  $K = 1$ , and  $K = 10$ , and for  $K_{chem}$  of 0.0447. The other parameters used in simulation model were identical as in figure 29.



**Слика 33.** Влијание на вредноста на  $K_{eq}$  врз големината на максималните гранични струи од steady state цикличните волтамограми ( $\Psi_{\text{max-плато}}$ ). Волтамограмите се симулирани при пет различни вредности на  $K_{chem}$  (вредностите на  $K_{chem}$  се дадени во графиците) и при  $K = 10$ . Останатите услови при овие симулации беа идентични како и условите презентирани на слика 29.

**Figure 33.** Effect of  $K_{eq}$  of chemical reaction to the magnitude of maximal limiting currents  $\Psi_{\text{max-плато}}$  of calculated cyclic voltammograms. Curves are simulated for five different values of  $K_{chem}$  (values are given in the chart) and for  $K = 10$ . The other parameters used in simulations were identical as those in figure 29.

Како што е дискутирано и во претходните електродни механизми обработени во оваа дисертација, еден од најважните параметри што е потребно да се анализираат кај регенеративните EC' механизми е брзината на хемиската регенеративна (каталитичка) реакција. Како што е наведено и претходно, брзината на регенеративната хемиска реакција во овој модел е претставена преку вредноста на бездимензионалниот хемиски регенеративен параметар  $K_{chem}$ , чија вредност, пак, зависи од концентрацијата на супстратот „Y“. На симулираните волтамограми на слика 32 е прикажано влијанието на хемискиот регенеративен параметар  $K_{chem}$ . Волтамограмите на слика 34 се

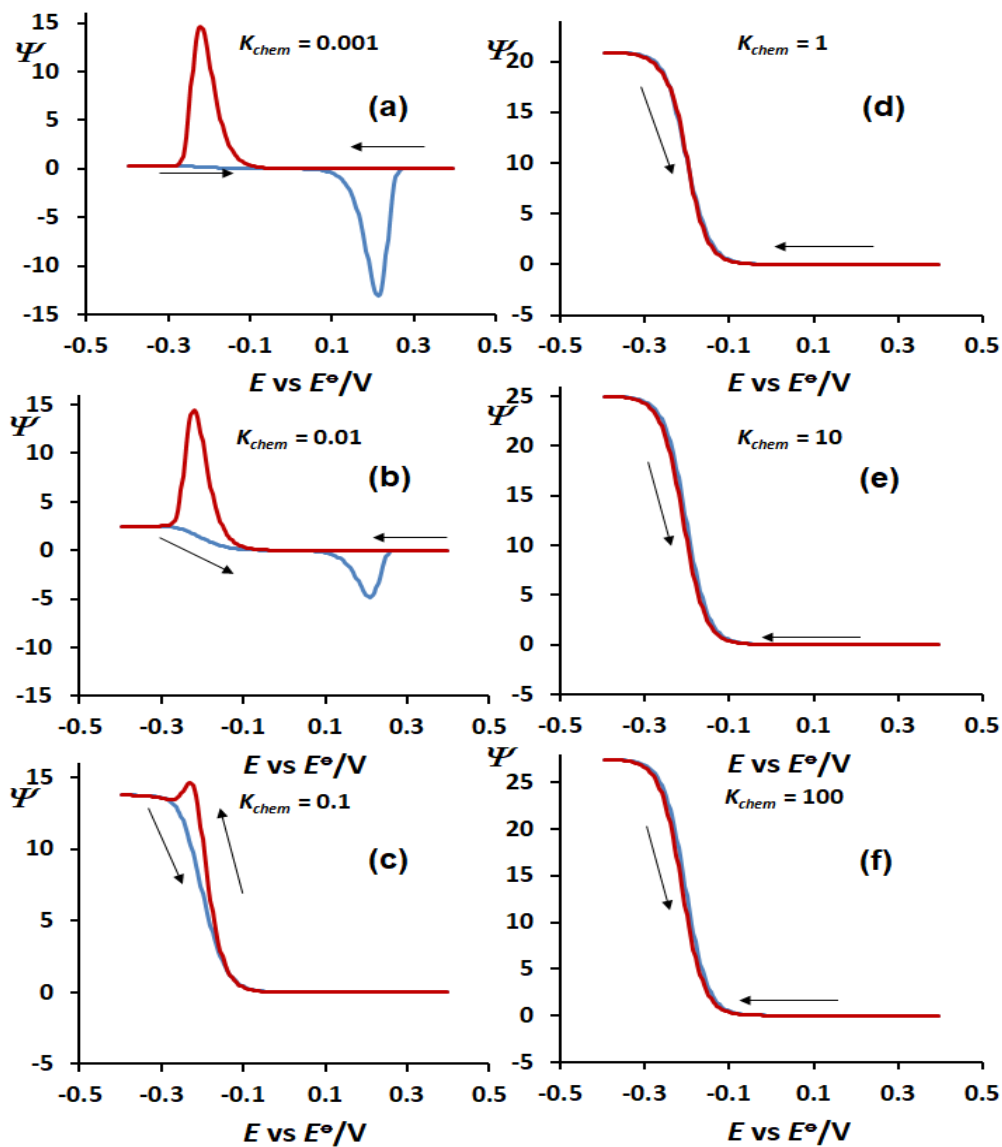


симулирани при умерени вредности на бездимензионалните параметри  $K$  и  $K_{eq}$ . Во принцип, зголемувањето на вредноста на  $K_{chem}$ , предизвикува слични ефекти врз цикличните волтамограми како дискутираните за механизмите (А), (Б) и (В). При овие услови, при вредност на хемискиот регенеративен параметар  $K_{chem} > 0.5 \cdot Y$ , цикличните волтамограми добиваат т.н. „steady-state“ форма, каде при негативни потенцијали постои „плато“ наместо дефинирани пикови (Слика 3, криви d–e). Оваа ситуација се случува кога брзината на регенеративната хемиска реакција  $Y + Red(ads) \rightarrow Ox(ads) + S$  е многу поголема отколку брзината на електродната трансформација  $Red(ads) + ne^- \rightarrow Ox(ads)$ . При вакви услови, целокупното количество на  $Red(ads)$  претрпува многу брза хемиска трансформација до формата  $Ox(ads)$ . Овој феномен ќе предизвика повеќекратно одвивање на реакцијата  $Ox(ads) + ne^- \rightarrow Red(ads)$  при сите потенцијали, што ќе резултира со појава на „steady-state“ циклични волтамограми како тие на слика 34 d–f. Кај овој површински регенеративен механизам (Г), максималните гранични струи на платото од цикличните волтамограми ( $\Psi_{max-плато}$ ) се линеарна функција од  $K_{chem}$  при дадени услови (а тоа значи од концентрацијата на „лек 2“  $c(Y)$ ). Секако, за овој површински регенеративен  $E_{Crev}$  механизам каде има реверзибилна хемиска реакција, целокупната слика е покомплексна поради постоењето на хемиска рамнотежа.

На слика 35 се претставени зависностите на полубрановиот потенцијал (eng. mid-peak potential  $E_{mid,p}$ ) како функција од  $K_{chem}$ . Да напоменеме дека  $E_{mid,p}$  е дефиниран со изразот  $E_{mid,p} = (E_{p,c} + E_{p,a})/2$  (во ситуација кога постојат добро дефинирани пикови), или тоа е средичната точка помеѓу двете платоа на растечкиот дел од кривата кај steady-state цикличните волтамограми. Кривите на слика 35 се пресметани при неколку вредности на  $K_{eq}$ . При мали и големи вредности на  $K_{eq}$  (слика 35 А), постои сигмоидална зависност помеѓу  $E_{mid,p}$  и  $\log(K_{chem})$ . Линеарните делови од кривите на слика 35А имаат идентичен наклон (слика 35В), од чија вредност на наклонот може да се пресмета вредноста на  $K_{chem}$ . За да се реализира тоа, потребно е да ги знаеме вредностите на стандардната константа на електронски трансфер ( $k_s$ ), вредноста на стандардниот редокс потенцијал  $E^{\circ}_{Ox/Red}$ , како и вредностите на бројот на разменети електрони помеѓу електродата и „лек 1“  $n$  и коефициентот

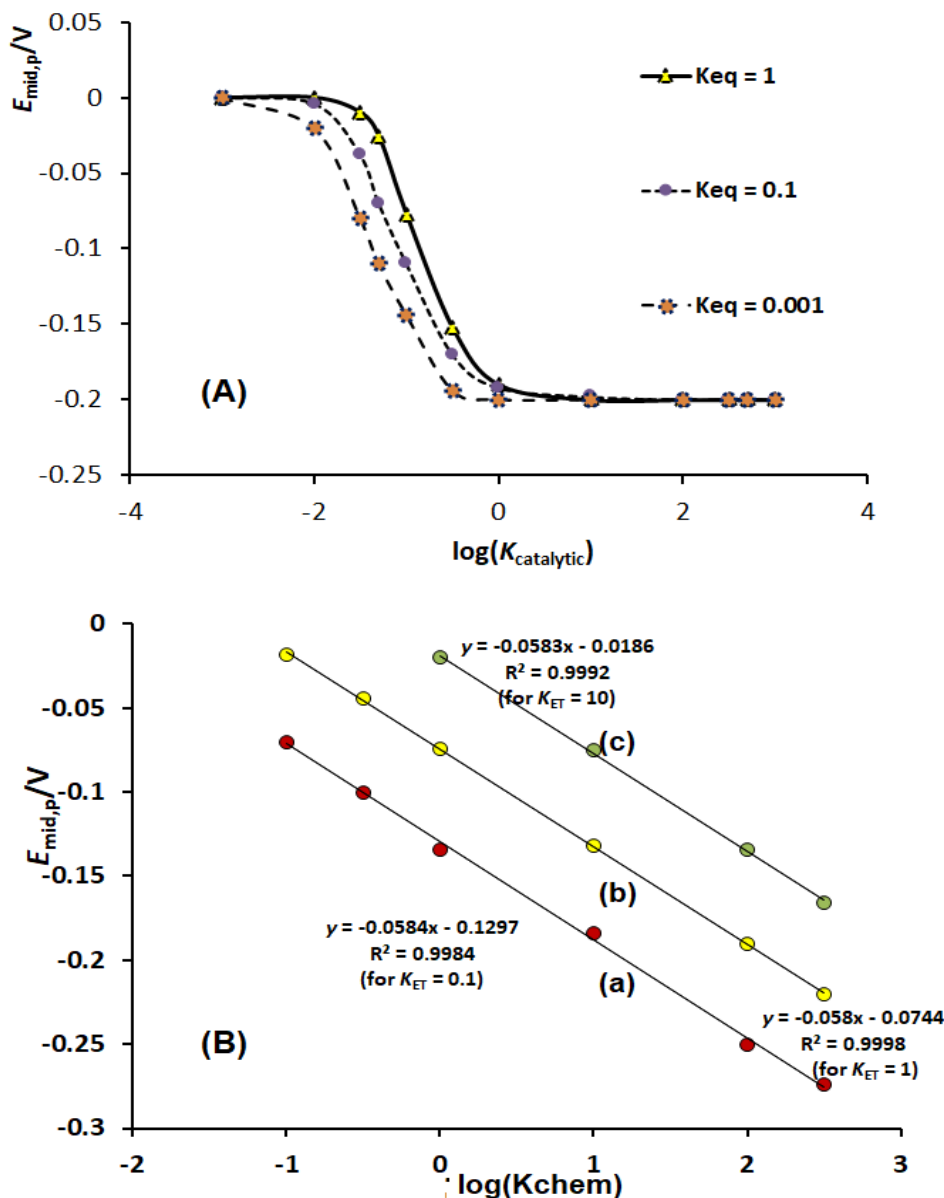
на пренос на електрони  $\alpha$  за едноставната некатализирана реакција  $Ox(ads) + ne^- = Red(ads)$ .

Како и кај едноставниот површински регенеративен механизам (Б) и кај овој регенеративен површински механизам (Г), максималните гранични струи на платоата ( $\Psi_{\text{max-плато}}$ ) од steady-state цикличните волтамограми зависат линеарно од  $K_{chem}$ . Тоа значи дека во експериментот ќе постои линеарна зависност од концентрацијата на регенеративниот супстрат  $c(Y)$  на експерименталните криви од слика 36. Карактеристично кај овој електрооден механизам е што наклоните на линеарните делови од кривите на зависноста  $\Psi_{\text{max-плато}}$  vs.  $K_{chem}$  се функција од  $Keq$ , во подрачјето на мали и умерени вредности на  $Keq$ . Сепак, при вредности на  $Keq > 1000$ , постои линеарна зависност на  $\Psi_{\text{max-плато}}$  vs.  $K_{chem}$  (слика 37), со идентичен наклон на правите без разлика на вредноста на бездимензионалниот електрооден кинетички параметар  $K$ . Како што е претходно опишано во оваа дисертација, наклонот на правата  $\Psi_{\text{max-плато}}$  vs.  $K_{chem}$  на слика 37 овозможува да се пресмета вредноста на хемискиот кинетички параметар „ $\epsilon$ “ кај овој површински регенеративен реверзибилен ECrev' механизам, кога вредноста на  $Keq > 1000$ . При вакви услови, како што е опишано во трудот [Petkovska, Gulaboski, 2019], вредноста на хемискиот кинетички параметар „ $\epsilon$ “ може да се пресмета во експерименти што се дизајнирани така што во електрохемиската ќелија постепено се зголемува концентрацијата на регенеративниот супстрат „Y“- $c(Y)$ . Притоа, откако ќе се добијат „steady-state“ циклични волтамограмим, со прикажување на вредноста на максималните гранични струи како функција од  $c(Y)$ , треба да се добијат прави слични како таа на слика 37. Наклонот на правата на зависноста  $\Psi_{\text{max-плато}}$  vs.  $c(Y)$  е дефиниран со изразот: **наклон** =  $|(e)[nFA\Gamma^*(Ox)t^{-1}]|$ . Така, доколку правиме експерименти при константа брзина на промена на потенцијал (константна вредност на временскиот параметар  $t$ ) и доколку ги знаеме останатите параметри од последната равенка за вредноста на наклонот, може да се пресмета вредноста на хемискиот параметар „ $\epsilon$ “, чија вредност е во директна корелација со константата на брзината на интеракции помеѓу „лекот 1“ и супстратот „Y“ (лекот 2). Притоа, на овој начин може да ја пресметаме вредноста на „ $\epsilon$ “, без да ни требаат да ги знаеме вредностите на електроодната реакција на лекот 1 ( $k_s$  и  $\alpha$ ).



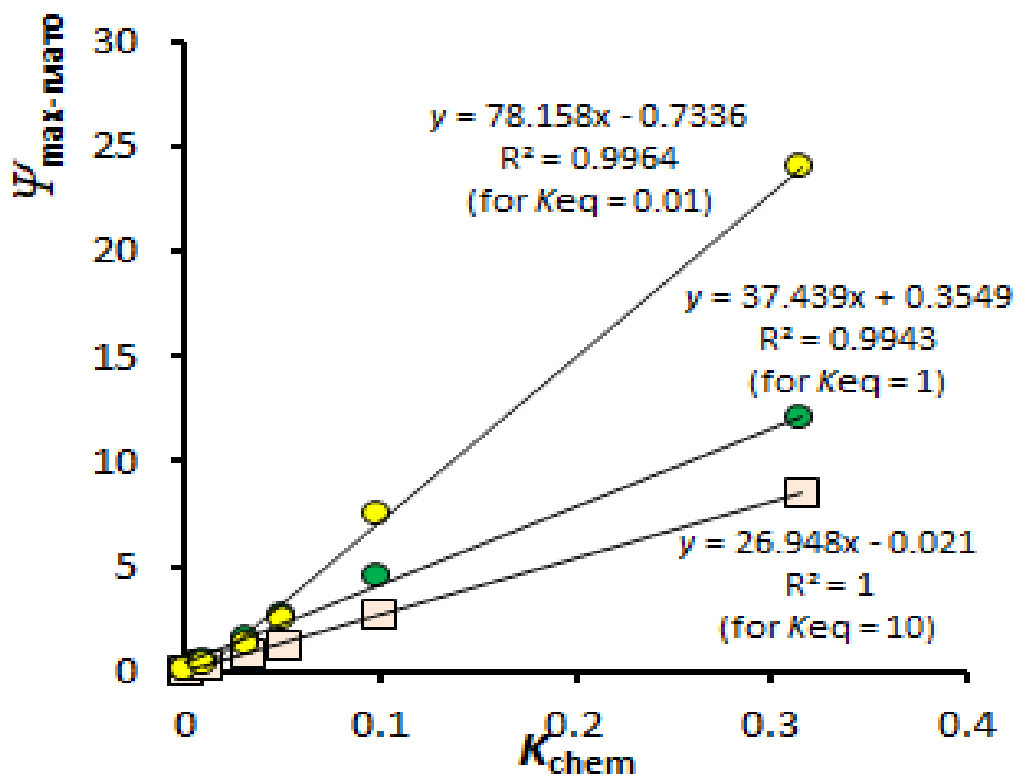
**Слика 34.** Влијание на брзината на хемиската регенеративна реакција врз својствата на цикличните волтамограми симулирани за површински регенеративен ECrev' механизам. Волтамограмите се симулирани при 6 вредности за бездимензионалниот хемиски кинетички параметар  $K_{chem}$  (вредностите за  $K_{chem}$  се дадени во графициите), при вредности за  $K = 0.1$  и  $K_{eq}=1$ . Останатите услови за симулациите беа идентични како и на слика 29.

**Figure 34.** Influence of chemical reaction rate to theoretical cyclic voltammograms of a surface catalytic ECrev' mechanism. Voltammograms are simulated for six values of  $K_{chem}$  (values are presented in the charts), for  $K = 0.1$ , and  $K_{eq}=1$ . The other parameters used in simulation model were identical as in figure 29.



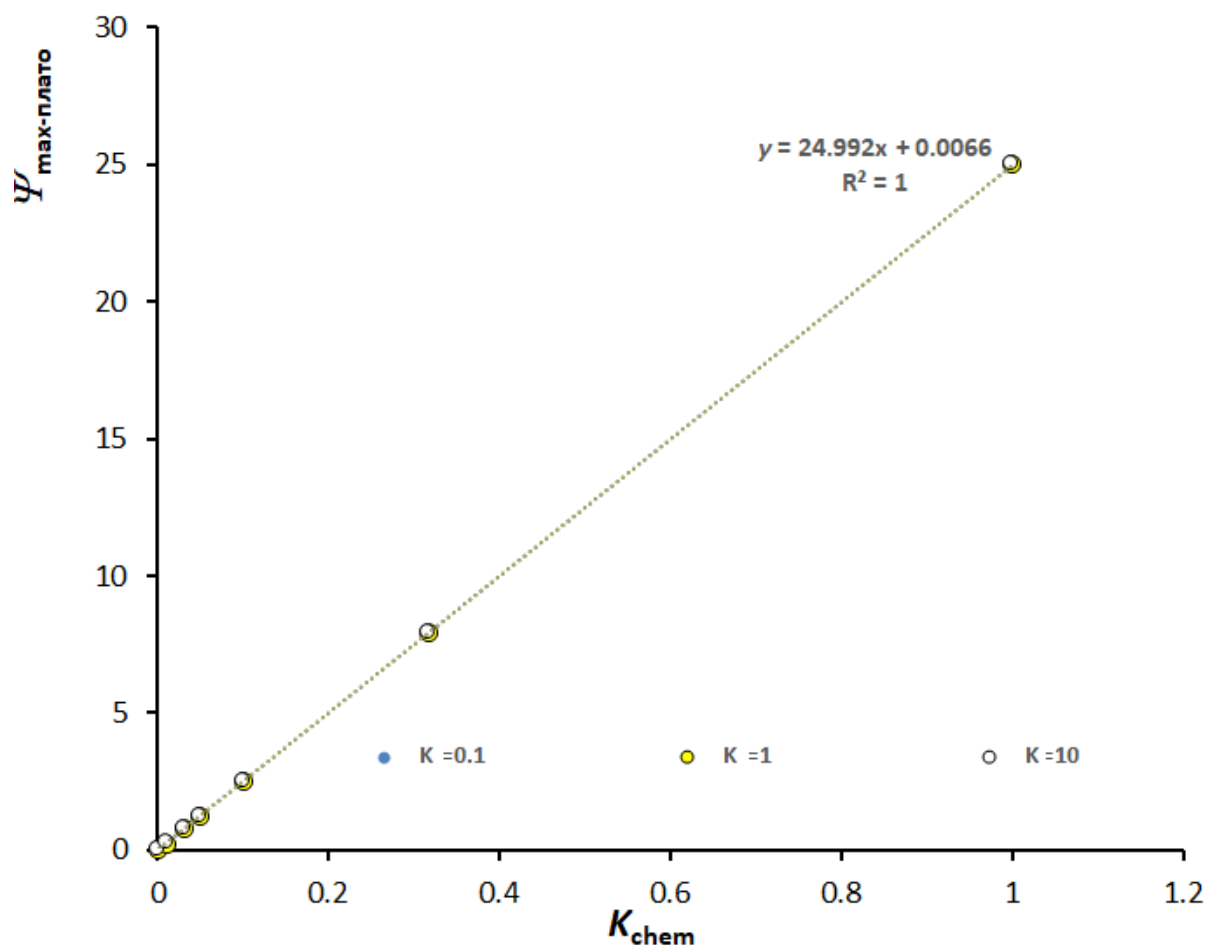
**Слика 35.** (А) Влијание на брзината на хемиската регенеративна реакција врз вредноста на полубрановите потенцијали ( $E_{mid,p}$ ) од теоретските циклични волтамограми. Волтамограмите се симулирани при  $K = 10$  и при неколку различни вредности на  $Keq$ . На графиконот (В) се претставени линеарните сегменти од зависностите на  $E_{mid,p}$  vs.  $\log(K_{chem})$ , пресметани при  $Keq=1000$  и при вредности на  $K = 0.1$  (а), 1 (б) и 10 (с). Останатите услови во симулациите беа идентични со тие на слика 29.

**Figure 35.** (A) Effect of rate of chemical reaction to the mid-peak potentials  $E_{mid,p}$  of theoretical cyclic voltammograms. Curves are simulated for  $K = 10$  and for several values of equilibrium constant  $Keq$ . Panel (B) shows only the linear segments of dependence  $E_{mid,p}$  vs.  $\log(K_{chem})$ , estimated for  $Keq=1000$  and for  $K$  of 0.1 (a), 1 (b) and 10 (c). Other parameters in simulation model were same as in figure 29.



**Слика 36.** Влијание на бездимензионалниот хемиски кинетички параметар  $K_{chem}$  врз големината на максималната гранична струја од цикличните steady state волтамограми. Кривите беа симулирани при неколку различни вредности на  $K_{eq}$  и при вредност на бездимензионалниот кинетички параметар на електронски трансфер  $K = 1$ . На графиконот се прикажани и равенките на линеарни зависимости на  $\Psi_{max-плато}$  vs.  $K_{chem}$  за три вредности на  $K_{eq}$ . Останатите услови при симулациите за овие графици беа идентични како и условите на слика 29.

**Figure 36.** Influence of dimensionless chemical rate parameter  $K_{chem}$  to the magnitudes of maximal limiting currents of calculated cyclic voltammograms. Curves are simulated at four different values of  $K_{eq}$  values (values of  $K_{eq}$  are given in the chart) and for  $K = 1$ . The graph shows the dependence  $\Psi_{max-plateau}$  vs.  $K_{chem}$  linear dependences, calculated for three values of  $K_{eq}$ , together with equations corresponding to linear regression lines. The other parameters used in simulation model were identical as in figure 29.



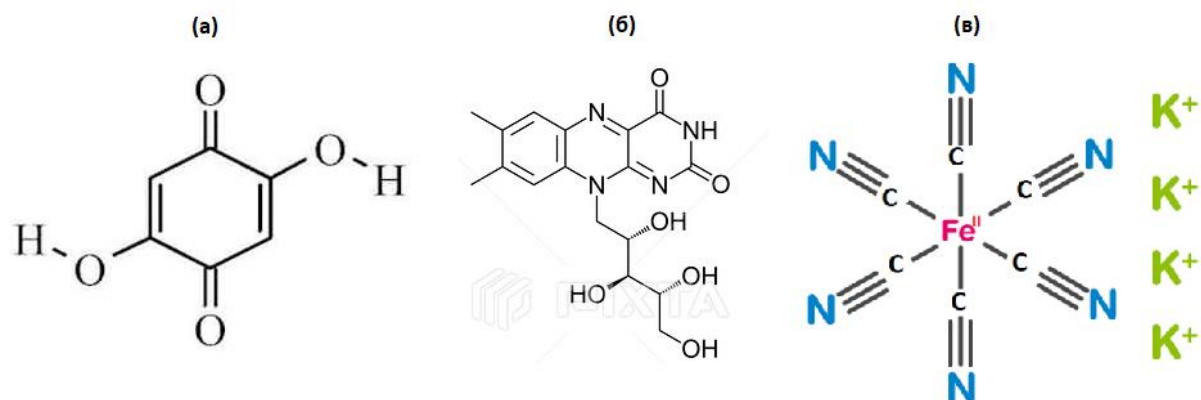
**Слика 37.** Влијание на брзината на хемиската регенеративна реакција (изразена преку вредноста на бездимензионалниот кинетички параметар  $K_{chem}$ ) врз големината на максималната гранична струја на плато од цикличните steady state волтамограми. Волтамограмите беа симулирани при вредност на константата на рамнотежа на хемиската реакција  $K_{eq}=1000$  и при вредности на бездимензионалниот кинетички параметар поврзан со трансферот на електрони  $K$  од 0.1; 1; и 10. Од наклонот на линеарната права на оваа слика може да се пресмета вредноста на хемискиот регенеративен параметар „ $\epsilon$ “. Останатите услови при симулациите беа идентични како условите на слика 29.

**Figure 37.** Influence of rate of regenerative chemical reaction ( $K_{chem}$ ) to the magnitude of maximum of limiting currents of cyclic voltammograms. Voltammograms are simulated for  $K_{eq}=1000$  and for  $K$  values of 0.1; 1; and 10. The slope of the linear line allows estimation of catalytic parameter  $\epsilon$ . The other parameters used in simulation model were identical as those in Figure 29.

## 6. ДИСКУСИЈА

### 6.1. Дискусија на експерименталните резултати

Како моделни редокс-активни системи во оваа дисертација се избрани соединенијата **2,5-dihydroxy 1,4-benzoquinone**, **витамин В2** и калиум хексацијаноферат II ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ), чии структури се прикажани на слика 38.



**Слика 38.** Структури на редокс активните системи што беа употребени како моделни супстанции во експерименталниот дел на дисертацијата; 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone (a), витамин В2 (б) и  $K_4[Fe(CN)_6]$  (в).

**Figure 38.** Structures of redox-active systems that were used as model compounds in this thesis: 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone (a), vitamin B2 (б) and  $K_4[Fe(CN)_6]$  (в).

Соединението 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone спаѓа во групата на хидрокси кинони и неговата примена во хемијата и фармацијата е главно како хелатор за метални јони (Gulaboski, R., Markovski, V., Jihe, Z. (2016) Chambers, J. O. (1974) Bogeski I, Gulaboski R, et al. (2011) Gulaboski R, Bogeski I, et al. (2013);). 2,5-dihydroxy 1,4-benzoquinone е кинонски систем што е добро растворлив во вода, а неговата редуцирана форма покажува значителни антиоксидативни својства (Gulaboski et al. 2016). Покрај неговата употреба во индустријата за органски бои, во трудот [Amin Mir, et al. (2021)] е елаборирано дека комплексите на 2,5-dihydroxy 1,4-benzoquinone со јоните на бакар, сребро и злато покажуваат значителни анти-микробни својства.

Рибофлавинот (витамин В2) е витамин што е релативно добро растворлив во вода. Овој витамин кристализира како портокалово-жолти кристали и во чиста форма е послабо растворлив во вода. Рибофлавинот е

составен дел на коензимите флавин мононуклеотид (FMN) и флавин аденин динуклеотид (FAD), супстанции што учествуваат во голем број на редокс реакции што се составен дел на метаболичките патишта. Рибофлавиноот се апсорбира во цревата после хидролиза на коензимите. Циркулира врзан за албумините и имуноглобулините и се конвертира во активна форма во цитоплазмата на повеќето ткива. Вишокот рибофлавин најчесто се излучува преку урината. Мала количина на рибофлавин е присутна во храната како слободен рибофлавин, кој е врзан за изоалоксазински прстен кој пак е врзан за страничната низа на рибитол. Предуслов за апсорпција на диететски рибофлавин е хидролизата на FAD и FMN во рибофлавин, реакција што е катализирана од неспецифични фосфатази во мембраната на ентероцитите. Апсорпцијата се одвива претежно во проксималното тенко црево, апсорпцијата оди до просечно 30 mg рибофлавин преку еден оброк. Се екскретира преку урината и се зголемува линеарно со зголемено внесување на рибофлавин, кој е со полуживот на апсорпција од 70 минути. Првично, слободниот рибофлавин се внесува во ентероцитите и е подложен на АТФ зависна фосфорилација катализирана од цитосолна флавокиназа за да се формира FMN. Поголемиот дел од FMN се конвертира во FAD од FAD зависна синтетаза. Неспецифични фосфатази делуваат на интрацелуларните фламини за да овозможат транспорт низ базолатералната мембрана. Рибофлавиноот може да навлезе во плазмата од тенкото црево или во слободна форма или во форма на FMN. FMN и FAD играат клучна улога како кофактори во енергетскиот метаболизам и се неопходни за функцијата на коензимите во бројни оксидоредукциски реакции. Рибофлавиноот се користи во додатоци за исхрана и за третман на воспаленија предизвикани од вирусни инфекции, потоа за глоситис, катаракта, мигренозни болки. Оксидативниот стрес има круцијална улога во патогенезата на голем број болести, вклучувајќи исхемични повреди, дијабетис и ангина пекторис. Оксидативниот стрес е клучен фактор во стареење на клетките и дегенеративните болести. Приложени се бројни докази за рибофлавиноот како суплемент што помага во намалување на оксидативниот стрес преку подобрување на активноста на антиоксидантните ензими. Рибофлавиноот ја активира и синтезата на нормалниот екстрацелуларен матрикс и ги редуцира реактивните кислородни радикали. Активноста на важни ензими како што се супероксидна дисмутаза, каталаза и глутатион пероксидаза зависат од



количината на рибофлавинот. Рибофлавинот игра важна улога во антиоксидативниот статус внатре во клетката како дел од ензимите глутатион редуктаза и ксантин оксидаза. Рибофлавинот во форма на FAD е неопходен за глутатион редуктаза да може да го редуцира оксидираниот глутатион. Инфекциите што се јавуваат како маларија може да го стимулираат имуниот систем што води кон формира на реперфузиона оксидативна повреда што може да ја оштети плазма мембраната на еритроцитите, загрозувајќи го интегритетот на самата клетка, на еритроцитот. Рибофлавинот го редуцира нивото на метхемоглобинот. Рибофлавинот ја активира фагоцитната активност на неутрофилите и макрофагите и го стимулира размножувањето на неутрофилите и моноцитите. Докажано е дека рибофлавинот игра значајна улога во опстојувањето на макрофагите. Намалена концентрација на рибофлавин ќе предизвика само негативен ефект во однос на клеточната пролиферација [Suwannasom, N. et al (2020)]. Рибофлавинот се користи како терапија во третман за превенција од катаракта. Рибофлавинот се вклучува во терапијата поради антиоксидативните својства и потенцијалот за врзување на слободните радикали. Постојат студии што покажуваат дека од 33% до 51% се намалува ризикот од појава на катаракта поврзана со возраста кај мажи и жени кои имаат диететски внес од 1.6 до 2.2 mg дневно во споредба со поединци со внес од 0.8 mg дневнорибофлавин. Рибофлавин како суплемент користен кај пациентите значително ги намалува мигренозните болки и бројот на денови кога болката се манифестира. Најзначајна карактеристика е констатирана дека после третиот месец од третманот, што укажува на тоа дека продолжена употреба на рибофлавин како суплемент дава значително резултати кај пациентите со мигренозни болки [Buehler, B. A. et al (2011)].

Галската киселина е земена како претставник на полифенолни антиоксиданти, соединенија што интензивно се користат како одбранбени системи за заштита на организмот од штетните ефекти на реактивните честички на кислородот. Галската киселина (gallic acid) е полифенолно соединение познато под името 3,4,5-трихидроксibenзоева киселина. Галската киселина (слично како и голем број на полифенолни деривати) се јавува како природен секундарен метаболит во различни растенија, зеленчук, плодови, овошје. Во фамилијата на полифеноли, галската киселина е трифенолно соединение со ниска молекуларна тежина што покажува одлични

антиинфламаторни и анти-оксидативни својства. Има значајни фармаколошки својства што се манифестираат во намалување на воспаленијата, а има и антимикробно и антибактериско дејство. Чистата галска киселина е во вид на бели или светло кафеави игличести кристали, со точка на топење од 235-240 °C. Структурно е нестабилна, губи кристална вода кога се загрева на 100–120°C. Бројни студии покажуваат дека галската киселина ја има во корените, стеблата, лисјата, плодовите, кожата, цветовите и семките на многу лековити растенија, како што се *Phyllanthus A.* (Euphorbiaceae), *Momordica C.* (Cucurbitaceae), *Achillea S.* (Asteraceae), *Mentha S.* (Lamiaceae) и *Abutilon P.* (Malvaceae). Концентрацијата на галската киселина изолирана од лековити растенија варира во опсег од 0.001–135.08 mg/g. Помеѓу сите лековити растенија, концентрацијата на галска киселина е најголема кај *Phyllanthus A.* а потоа кај *Momordica C.* и *Achillea S.*

Инфламацијата е одбрамбена реакција на повеќе физиолошки и патофизиолошки процеси, со цел да се активираат заштитните механизми што се спротивставуваат на оштетување на ткивото. Хорнично или акутното воспаление го стимулира ослободувањето на воспалителни медијатори како што се интерлеукините 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), тумор некрозис факторот- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), азотен оксид (NO) простагландинот E2 (PGE2). Воспалителните процеси може да водат кон појава на кардиоваскуларни болести, атеросклероза и дисфункционалност на имуниот систем. Од овие причини мора да биде користена антиинфламаторна терапија при појава на вакви воспалителни процеси. Во моментот, нестероидните антиинфламаторни лекови даваат добри ефект во клиничката пракса, но неизбежни се и сериозните несакани ефекти, што се јавуваат со употребата на оваа група лекови, кои понекогаш се и фатални. Во текот на спроведуваните истражувања од други автори, докажано е дека галската киселина има моќни терапевтски ефекти во терапија на различни болести поврзани со воспалителните процеси [Bai J. Et al. (2021)]. Премногу високо ниво на слободни радикали може да доведе до липидна пероксидација што предизвикува оштетување на клеточните протеини, липидната мембрана, нуклеинските киселини и на крај резултира со оштетување на ткивото и најчесто доведува до несакана патологија. Нерамнотежата помеѓу продукцијата и елиминацијата на реактивни кислородни радикали и реактивни азотни радикали водат кон создавање на stady-state

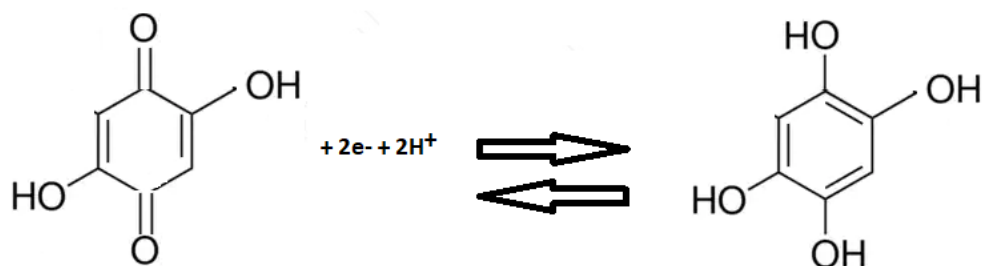
состојба, односно состојба во која концентрацијата на кислородните радикали е хронично зголемена со трајни последици на клетката, се дефинира како оксидативен стрес. Реактивните кислородни радикали се радикали што содржат кислород како што се водороден пероксид, хидроксилни радикали, супероксиди, peroоксидни радикали, хипохлорна киселина, додека пак азотните радикали се азотен оксид, азот оксид. Галската киселина и нејзините деривати покажуваат големи примени во фармацевтската, козметичката, прехранбената, печатарската и индустријата за фарбање. Кога се користи како суплемент, галската киселина може да го спречи процесот на оксидација на мастите и маслата во различни производи. Притоа, покажано е дека галската киселина може да ја инхибира меланогенезата за да ја надмине пигментацијата и да ги заштити клетките од ултравиолетовото или јонизирачкото зрачење, поради што се и користи во многу козметички производи. Постојат различни извештаи за галската киселина за нејзина медицинска примена, со докажани антибактериски, антиалергиски, антиинфламаторни својства. Галската киселина покажува антибактериски ефекти против широк спектар на патогени, вклучувајќи *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Streptococcus mutans*, *Chromobacterium violaceum*, *Campylobacter jejuni*, и *Listeria* [Gao, J. et al (2012)].

Додека електрохемиските својства на витамин B2 и  $K_4[Fe(CN)_6]$  се релативно добро познати во литература, волтаметриските својства на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone се многу малку испитувани (Gulaboski et al. 2013). За секој од моделните системи, во дисертацијата накратко се прикажани нивните електрохемиски својства во услови на циклична скалеста волтаметрија. При студирањето на интеракциите на овие моделни системи со други лекови, соодветно на дискусиите за механизмот на електрохемиски регенераивен механизам, при консантни инструментални и експериментални услови, како и при константна концентрација на моделните компоненти (лек 1, т.е. т.е. 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone, витамин B2 и  $K_4[Fe(CN)_6]$ ), во електрохемиската ќелија се менува само концентрацијатата на вториот лек („лек 2“). Притоа, преку зависностите на граничните максимални струи на платото како функција од концентрацијата на „лек 2“ (или квадратен корен од моларната концентрација на „лек 2“ кај дифузионите модели) се утврдува типот на

регенеративниот механизам во кој стапуваат во интеракција „лек 1“ и „лек 2“. Со поклопување на линеарните делови од експерименталните и теоретските зависимости на граничните струи на плато при дефинираните услови, определени се и константите на интеракции помеѓу студираните лекови, во случаи кога постојат интеракции според електрохемиски регенеративен механизам.

### 6.1.1 Циклична волтаметрија на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone и студија на интеракциите на соединението со други супстанции согласно регенеративниот електрохемиски механизам

Најважните волтаметриски својства на соединението 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone во услови на циклична скалеста волтаметрија се прикажани на слика 39. Во пуферски системи со  $\text{pH} = 7.4$ , 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone покажува квазиреверзибилно однесување пресликано преку еден пар на редукциско-оксидациски пикови, што е типично за кинонските системи во пуферирани раствори (Gulaboski et al, 2016). Електрохемиската редукција на оксидираната форма на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone е проследена со размена на 2 електрони и 2 протони ( $\text{H}^+$  јони) и може да се претстави со следната шема (Gulaboski et al, 2013; Gulaboski et al, 2016):

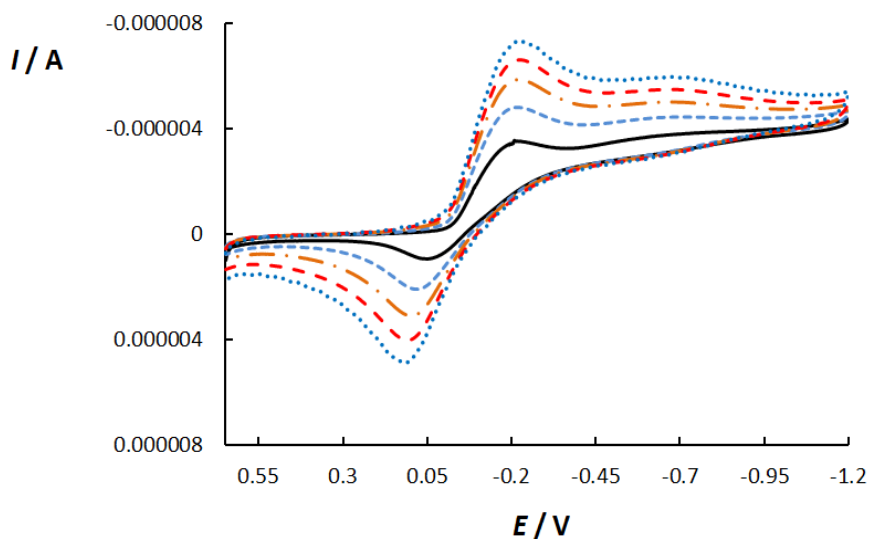


**Шема 1.** Електрохемиска конверзија на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone (лево) до 2,5-dihydroxy-1,4-hydroquinone (десно)

**Scheme 1.** Electrochemical conversion of 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone (left) to 2,5-dihydroxy-1,4-hydroquinone (right)

Со зголемување на брзината на промена на потенцијалот ( $v$ ), пик струите и на редукцискиот и на оксидацискиот пик од 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone се зголемуваат линеарно со  $v^{1/2}$  (слика 39). Ова е еден индикатор за електродна

реакција во која трансферот на маса од растворот кон електродата се одвива со дифузија (Compton et al, Understanding Voltammetry, 2012).



**Слика 39.** Циклични волтамограми на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone со концентрација од 0.25 mmol/L снимени во фосфатен пуфер со pH = 7.4 при брзини на промена на потенцијал од 5, 10, 15, 20 и 25 mVs<sup>-1</sup>, почнувајќи од волтамограмот со најниска кон тој со највисока струја, соодветно. Почетниот потенцијал беше 0.6 V, додека вредноста на потенцијалниот чекор беше 4 mV.

**Figure 39.** Cyclic voltammograms of 0.25 mM 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone recorded in phosphate buffer with pH of 7.4 at scan rates of 5, 10, 15, 20, and 25 mVs<sup>-1</sup>, starting from voltammogram with lowest toward that with highest current, correspondingly. Starting potential was set to 0.6 V, while potential step used was 4 mV.

Од слика 39 се забележува дека со зголемување на брзината на промена на потенцијал се зголемува и потенцијалната сепарација помеѓу директниот (редукциски) и повратниот (оксидациски) пикови на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone. Ова е индикатор за електродни системи што се карактеризираат со спор чекор на размена на електрони помеѓу работната електрода и аналитот (Compton et al, 2010).

За дифузииски контролирани електродни реакции, за определување на коефициентот на дифузија на електрохемиски активниот аналит (2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone) може да се определи и коефициентот на дифузија (D) со примена на Randles-Sevcik-овата равенка (Compton et al, Understanding Voltammetry, 2010) која ја има следната форма:

$$I_p = 269000 \times n^{3/2} \times A \times D^{1/2} \times c(\text{аналит}) \times v^{1/2}$$

Значењето на симболите во горната Randles-Sevcik-ова равенка е:

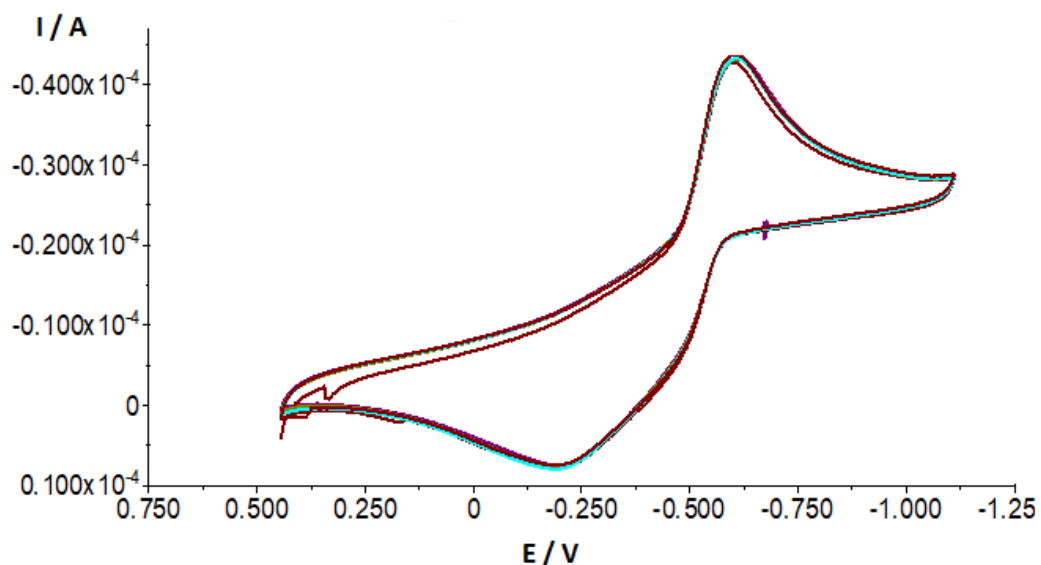
- $I_p$  е струја на максимумот на пикот (и катодниот и анодниот) во ампери
- $n$  = број на разменети електрони помеѓу работната електрода и редокс анализот (лекот 1) (во случајот на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone  $n = 2$ )
- $A$  = површина на работната електрода во  $\text{cm}^2$  (во случајот на работната електрода во нашите експерименти површината на работната електрода е  $0.36 \text{ cm}^2$ )
- $F$  = е Фарадеева константа  $9500 \text{ C mol}^{-1}$
- $D$  = коефициент на дифузија  $\text{cm}^2/\text{s}$
- $c(\text{аналит})$  = е концентрацијата на анализот (лек 1) во  $\text{mol}/\text{cm}^3$
- $v$  = брзина на промена на потенцијалот  $\text{V}/\text{s}$
- $R$  = е универзална гасна константа  $8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
- $T$  = температура во  $\text{K}$
- константата што има вредност  $2.69 \times 10^5$  на  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  има единици  $\text{C mol}^{-1} \text{ V}^{-1/2}$

Согласно добиениот наклон на правата на зависност на  $I_p$  како функција од  $v^{1/2}$  (што важи и за двата пика од волтамограмите на слика 39), со употреба на Randles-Sevcik-овата равенка, пресметаната вредност на коефициентот на дифузија на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone е  $D = 3.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ . Користејќи ја оваа вредност за коефициентот за дифузија, со метода на преклопување („фитување“) на експерименталните и теоретските волтамограми (симулирани при идентични услови), пресметаната вредност на константата на брзина на пренос на електрони ( $k_s^\ominus$ ) помеѓу работната електрода и 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone изнесува  $k_s^\ominus = 0.00075 \text{ cms}^{-1}$  (под претпоставка дека вредноста на коефициентот на пренос на електрони  $\alpha = 0.5$ ). Пресметаните вредности за  $D$  и  $k_s^\ominus$  за соединението 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone се пресметани за прв пат во оваа дисертација.

При испитувањето на интеракциите на на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone со дефинирани супстанции (лекови или суплементи), при константни

експериментални и инструментални услови и при константна концентрација на анализот (на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone), се менува (зголемува) само концентрацијата на „лек 2“ во електрохемиската ќелија. При секоја концентрација на „лек 2“, се снимаат последователни волтамограми и се споредуваат со волтамограмите на на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone во отсуство на „лек 2“. Притоа, доколку двата лекови реагираат според регенеративен електрохемиски механизам, зголемувањето на концентрацијата на „лек 2“ ќе доведе во намалување на повратната и зголемување на струјата на директната струјна компонента на цикличните волтамограми. Покрај тоа, при значително високи концентрации на „лек 2“ (најмалку еден ред на величина повисоки отколку концентрацијата на „лек 1“), ќе се добијат сигмоидални „steady state“ циклични волтамограми, чија струја на горното плато ќе биде функција само од концентрацијата на „лек 2“ (види слики 13-17). Преку соодветните зависности на овие максимални струи на платото како функција од квадратен корен од моларната концентрација на супстратот „Y“ т.е. „лекот 2“ може да се определи и константата на брзина на хемиската регенеративна реакција помеѓу „лек 1“ и „лек 2“ согласно соодветните изрази евалуирани во теоретските модели елаборирани во оваа дисертација.

На слика 40 се прикажани циклични волтамограми на на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone снимени во отсуство и во присуство на кетопрофен присутен во концентрации од 0.5 mmol/L до 10 mmol/L. Како што може да се забележи од волтамограмите на слика 40, зголемувањето на концентрацијата на кетопрофен во електрохемиската ќелија, дури и при значително високи концентрации, не предизвикува значителни промени во цикличните волтамограми на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone. Овие факти имплицираат дека 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone и кетопрофен не стапуваат во хемиска интеракција согласно регенеративните електрохемиски механизми.



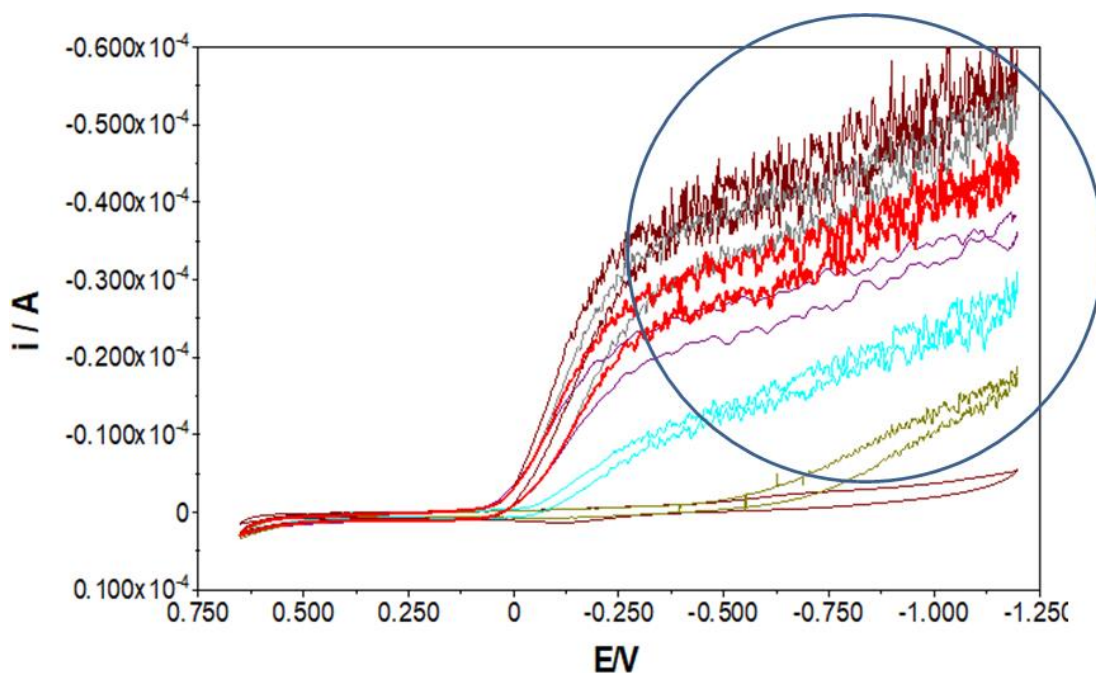
**Слика 40.** Циклични волтамограми на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone со концентрација од 0.25 mmol/L снимени во фосфатен пуфер со pH = 7.40 во отсуство и во присуство на кетопрофен со концентрации од 0.5 mmol/L; 1 mmol/L; 5 mmol/L и 10 mmol/L. Брзината на промена на потенцијалот во овие експерименти беше 75 mV/s.

**Figure 40.** Cyclic voltammograms of 0.25 mmol/L 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone recorded in phosphate buffer with pH = 7.40 in absence, and in presence of ketoprofen with concentrations of 0.5 mmol/L; 1 mmol/L; 5 mmol/L and 10 mmol/L. The applied scan rate was 75 mV/s.

Во присуство на натриум хипохлорит (NaClO), кој е познато оксидациско средство, цикличните волтамограми на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone добиваат сосема нова структура. Имено, при електрохемискиот чекор на размена на електрони со работна електрода, почетната форма на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone претрпува редукција во која учествуваат и 2 протони. Притоа, редуцираната форма (2,5-dihydroxy-1,4-**hydroquinone**) може во присуство на NaClO да биде реоксидирана во почетната форма т. е. во 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone. Присуството на NaClO во електрохемиската ќелија во концентрации поголеми од 0.4 mmol/L (крива со црвена боја на слика 41) доведува до појава на steady-state симгоидални циклични волтамограми (слика 41). При овие концентрации (англискиот термин е region of total catalysis), формата и својствата на цикличните волтамограми не зависат од брзината на промена на потенцијалот (слика 42), како што е елаборирано во соодветните теоретски модели. Покрај тоа, максималната струја на горното плато на

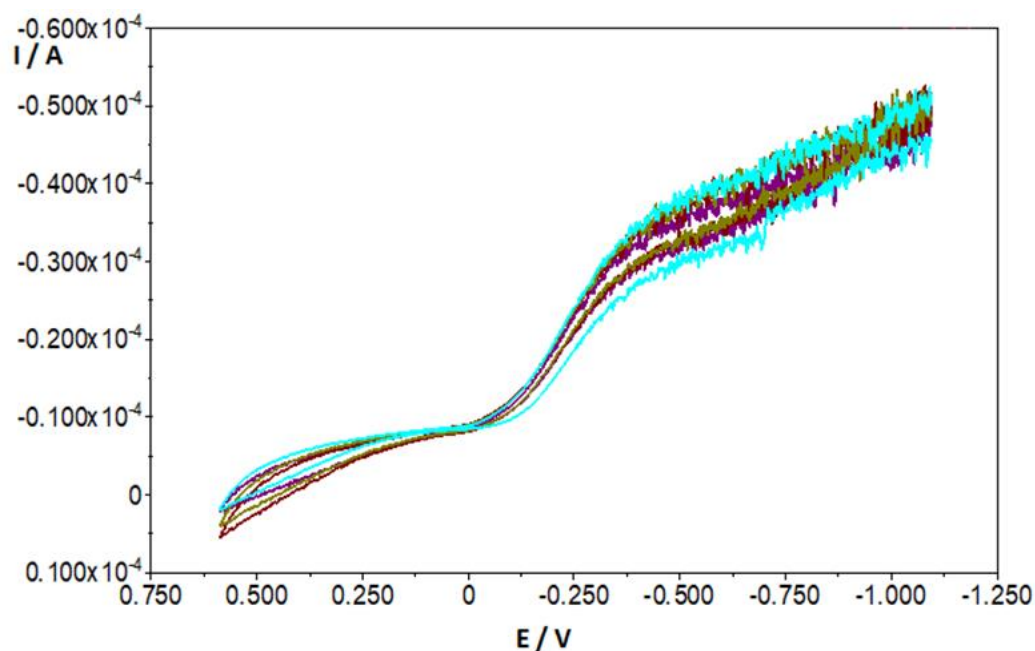


кривите од цикличните волтамограми прикажани на слика 41 е линеарна функција од квадратен корен од концентрацијата на NaClO. Овие податоци укажуваат дека електродниот регенеративен механизам на интеракции на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone со NaClO се одвива според моделот (A) за регенеративен дифузишки електрохемиски (EC') механизам.



**Слика 41.** Циклични волтамограми на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone со концентрација од 0.25 mmol/L снимени во фосфатен пуфер со pH = 7.40 во присуство на NaClO со концентрации од 0 mmol/L (кривата со најниска струја) и 0.2 mmol/L; 0.35 mmol/L; 0.45 mmol/L; 0.55 mmol/L; 0.7 mmol/L and 0.9 mmol/L (соодветно на кривите со последователно растење на струите). Брзината на промена на потенцијалот во овие експерименти беше 20 mV/s.

**Figure 41.** Cyclic voltammograms of 0.25 mmol/L 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone recorded in phosphate buffer with pH = 7.40 in presence of NaClO with concentrations of 0 mmol/L (curve with lowest current) and 0.2 mmol/L; 0.35 mmol/L; 0.4 mmol/L; 0.55 mmol/L; 0.7 mmol/L and 0.9 mmol/L. Applied scan rate was 20 mV/s.

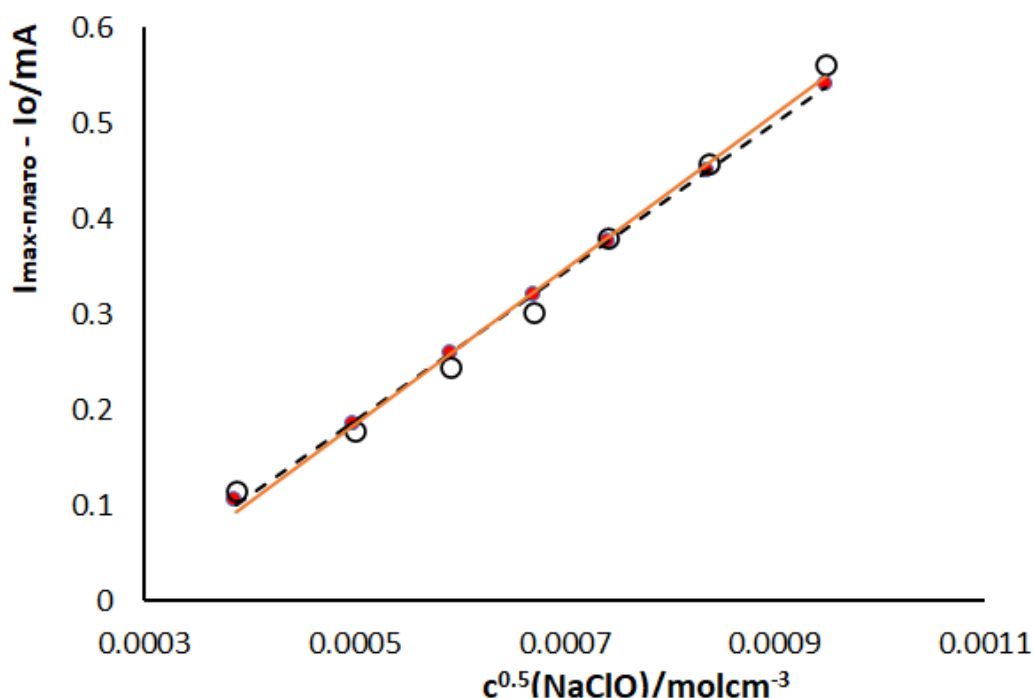


**Слика 42.** Cyclic voltammograms of 0.25 mmol/L 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone recorded in phosphate buffer with pH = 7.40 in presence of NaClO with concentration of 0.9 mmol/L. Applied scan rates were 5 mV/s, 10 mV/s, 15 mV/s and 20 mV/s. Obviously, the scan rate does not influence the shape of the voltammograms in presence of large excess of catalytic agent

**Figure 42.** Cyclic voltammograms of 0.25 mmol/L 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone recorded in phosphate buffer with pH = 7.40 in presence of NaClO with concentration of 0.9 mmol/L. Applied scan rates were 5 mV/s, 10 mV/s, 15 mV/s and 20 mV/s. Obviously, the scan rate does not influence the shape of the voltammograms in presence of large excess of catalytic agent

На слика 43 е прикажана зависноста на разликата од максималните струи што одговараат на платоата од волтамограмите на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone снимени во присуство на NaClO (заокружениот дел на слика 41) и струјата на платото на волтамограмот од 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone снимен во отсуство на NaClO како функција од  $c^{0.5}(\text{NaClO})$  (права со празни кругови). Притоа, правата со полни кругови е еквивалентна теоретска зависност, симулирана при идентични услови како тие применети за слика 41. Најдобро совпаѓање меѓу двете прави на слика 43 има за вредност на константата на брзина на хемиска (регенеративна) реакција ( $k_c'$ ) помеѓу 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone и NaClO од  $k_c' = 2480 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^3\text{s}^{-1}$ . Оваа вредност за  $k_c'$  е за прв пат определена за интеракции помеѓу  $\text{ClO}^-$  (хипоклоритните) јони и редуцираната форма на соединението 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone. На идентичен начин како тој прикажан и на слика 40, 41 и 43 беа испитуваните и

потенцијалните интеракции на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone со други супстанции и лекови и релевантите резултати за тие интеракции се прикажани во табела 2.

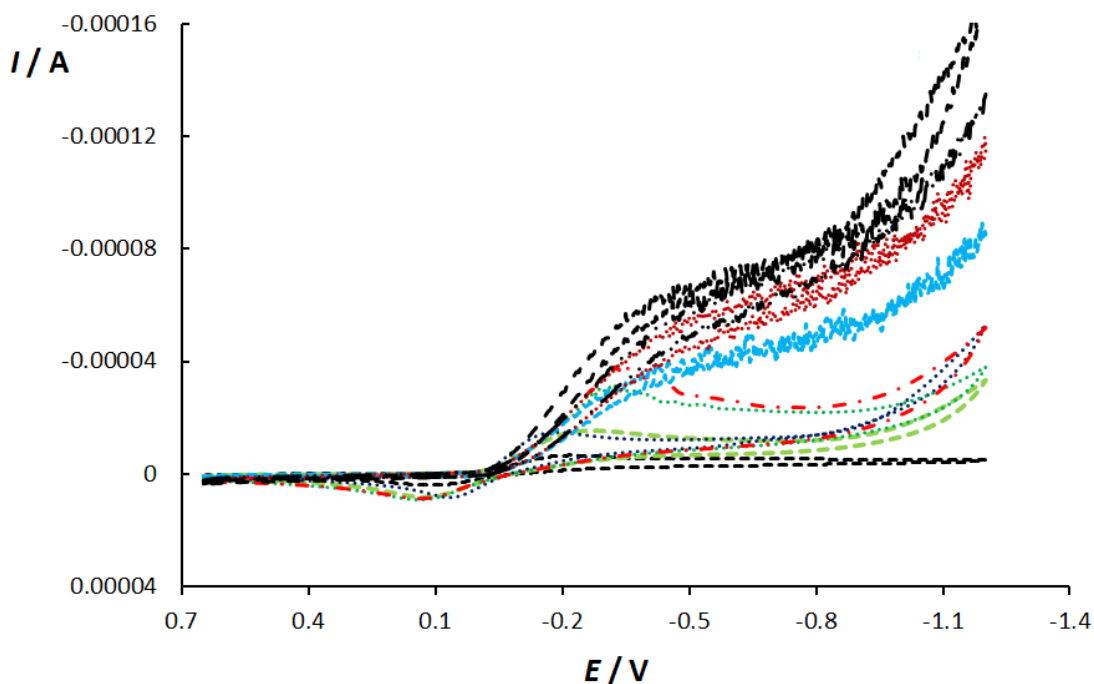


**Слика 43.** Зависност на разликата на струите на максималното плато ( $I_{\text{max-плато}}$ ) снимени во присуство на NaClO и струјата од 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone ( $I_0$ ) снимена во отсуство на NaClO, како функција од квадратен корен од моларната концентрација на NaClO во електрохемиската ќелија. Останатите услови се идентични како тие на слика 41. Правата со празни кругови е експериментално добиена, додека правата со полни точки со црвена боја е теоретски симулирана при идентични услови како и во експериментот и при вредност на константата на хемиска реакција од  $k_c' = 2480 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^3\text{s}^{-1}$ .

**Figure 43.** Dependence of the difference of maximal limiting currents ( $I_{\text{max-плато}}$ ) recorded in presence of various concentrations of NaClO and the limiting current of 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone ( $I_0$ ) recorded in absence of NaClO, as a function of the square root of molar concentrations of NaClO present in electrochemical cell. Other conditions are identical as those reported for figure 41. The linear line with empty circles corresponds to experimental data, while the full red circles correspond to theoretical data simulated under identical conditions as the experimental voltammograms, for the magnitude of chemical rate constant of regenerative reaction  $k_c' = 2480 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^3\text{s}^{-1}$ .

На слика 44 се прикажани цикличните волтамограми што го прикажуваат регенеративниот електрохемиски механизам на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone во присуство на водороден пероксид. Како што може да се забележи од слика

44, волтамограмите и во овој случај имаат слични својства како тие прикажани на слика 41 во присуство на NaClO. Определената вредност на константата на брзина на хемиски интеракции помеѓу водороден пероксид и редуцираната форма на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone изнесува  $k_c' = 1620 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^3\text{s}^{-1}$ . Информации за хемиските интеракции од регенеративна природа помеѓу дефинирани лекови или суплементи и редуцираната форма на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone се дадени во табела 2.



**Слика 44.** Циклични волтамограми на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone со концентрација од 0.25 mmol/L снимени во фосфатен пуфер со pH = 7.40 во отсуство на водороден пероксид (крива со црна боја со најниска струја) и во присуство на водороден пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) со концентрации од 0.1 mmol/L; 0.25 mmol/L; 0.35 mmol/L; 0.45 mmol/L; 0.55 mmol/L; 0.65 mmol/L и 0.75 mmol/L одејќи од втората крива со најниска крива кон кривата со највисока струја, соодветно. Брзината на скенирање во овие експерименти беше 20 mV/s.

**Figure 44.** Cyclic voltammograms of 0.25 mmol/L 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone recorded in phosphate buffer with pH = 7.40 in absence (black curve with lowest currents) and in presence of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in concentrations of 0.1 mmol/L; 0.25 mmol/L; 0.35 mmol/L; 0.45 mmol/L; 0.55 mmol/L; 0.65 mmol/L and 0.75 mmol/L. Scan rate explored in these experiments was 20 mV/s.

**Табела 2.** Податоци за механизам на регенеративни хемиски интеракции на лекови што беа испитувани со циклична скалеста волтаметрија во присуство на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone (електрохемиски активен лек, присутен во концентрација од 0.00025 mol/L). Сите експерименти беа изведени во фосфатен пуферски раствор со pH = 7.4. Во табелите се дадени и пресметаните вредности за константите на брзина хемиска регенеративна реакција на дефинираните лекови со редуцираната форма на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone.

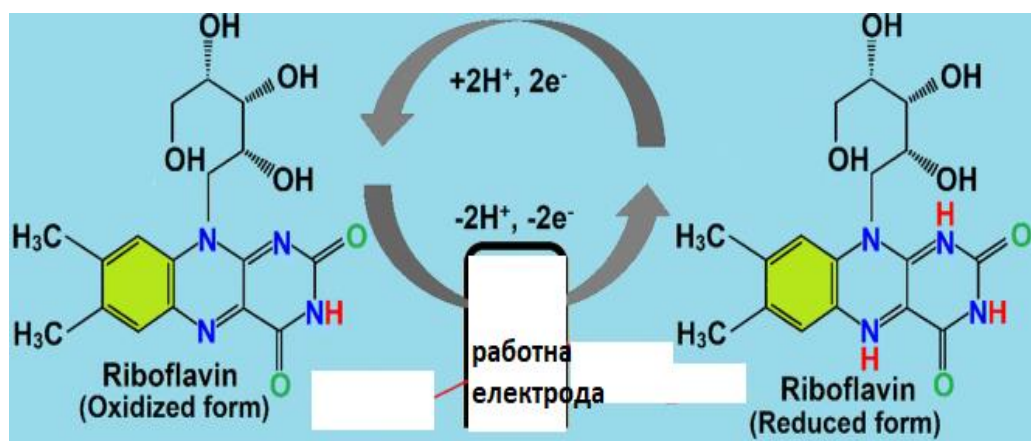
**Table 2.** Data about regenerative chemical interactions of defined medicaments with 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone, obtained by cyclic staircase voltammetry. 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone was present in electrochemical cell at 0.00025 mol/L concentration. All experiments were conducted in phosphate buffer with pH = 7.40. In the table information are provided about determined values of chemical reactions rate constants (or catalytic rate constants) between the defined medicament and 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone.

Име на дефинирана супстанца („лек 2“) чии интеракции се испитуваат со редуцираната форма на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone	Информации за интеракции на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone со дефинирани лекови или супстрати	Пресметани вредности на константата на брзина на хемиски регенеративни интеракции $k_c'$ ( $\text{mol}^{-1}\text{cm}^3\text{s}^{-1}$ )	Забелешка
Натриум хипохлорит (NACIO)	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>2480</b>	Силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Водороден пероксид $\text{H}_2\text{O}_2$	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>1620</b>	Силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Калиум перманганат $\text{KMnO}_4$	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>520</b>	умерени интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)

Јод (раствор од I <sub>2</sub> )	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>1210</b>	Силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Натриум бихромат Na <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>360</b>	умерени интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Натриум хлорат NaClO <sub>3</sub>	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>415</b>	умерени интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
кармофур carmofur	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>140</b>	умерени интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
5-флуороурацил 5-fluorouracil	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>220</b>	умерени интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Аспирин aspirin	Нема интеракции	/	/
Ибупрофен Ibuprofen	Нема интеракции	/	/
Кофеин Caffeine	Нема интеракции	/	/
Аналгин Metamizole	Нема интеракции	/	/
Диклофенак Diclofenac	Нема интеракции	/	/
Спазмекс Trosipium	Нема интеракции	/	/

### 6.1.2 Циклична волтаметрија на витамин В2 и студија на интеракциите на витамин В2 со други супстанции согласно регенеративниот електрохемиски механизам

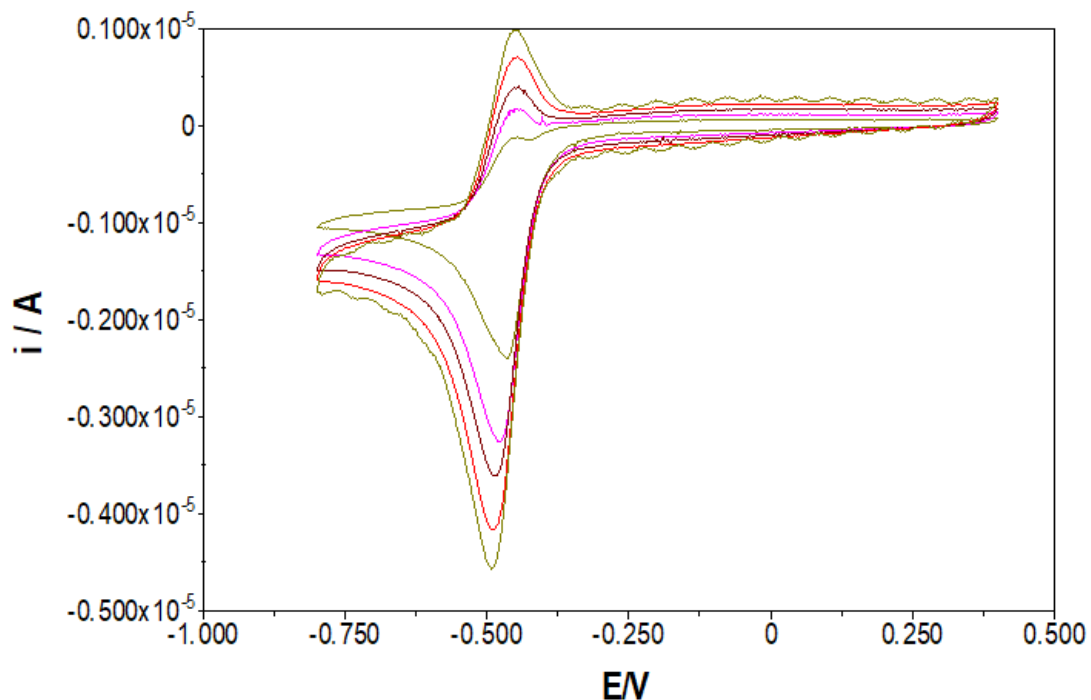
Волтаметриските својства на витамин В2 се добро познати во литература [Bard A. J. Faulkner L. R. (1980); Lovander, M. D., et al. (2018)] и ова соединение многу често се користи како моделен систем што покажува висок степен на електрохемиска реверзибилност. Конверзијата на редуцираната форма на витаминот В2 (Riboflavin) во оксидираната форма се одвива со размена на 2 електрони со работната електрода и 2 H<sup>+</sup> јони од растворот, како што е прикажано на следната шема:



**Шема 2.** Електрохемиска конверзија на оксидираната форма на рибофлавин (лево) до редуцираната форма на Рибоглавин (десно)

**Scheme 2.** Electrochemical conversion of oxidized form of Riboflavin (left) to its reduced form (right)

На слика 45 се претставени циклични волтамограми на витамин В2 снимени во фосфатен пуфер со pH = 7.40 при неколку брзини на промена на потенцијалот. Како што може да се забележи од волтаметриските криви на слика 45, со зголемување на брзината на промена на потенцијалот, не доаѓа до значително зголемување на потенцијалната сепарација помеѓу оксидацискиот и редуциските пикови од витамин В2, што укажува на висок степен на електрохемиска реверзибилност кај ова соединение. Покрај тоа, интензитетот на струјата на пиковите и од оксидациските и од редуциските пикови е пропорционален со квадратен корен од брзината на промена на потенцијалот, што е карактеристично својство за дифузионо контролирани електродни реакции (Compton et al, Understanding Voltammetry, 2010).



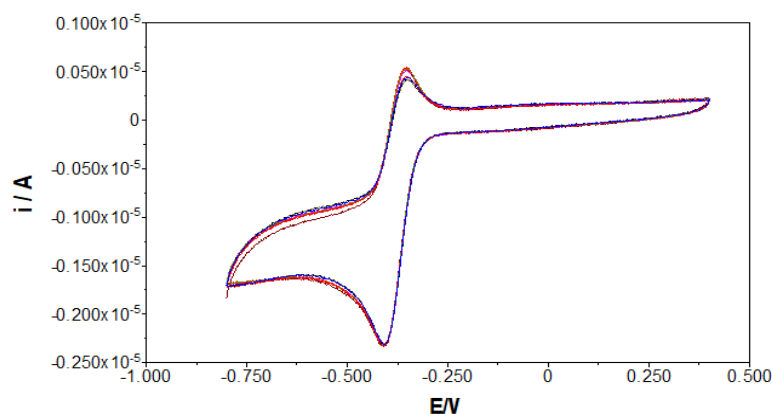
**Слика 45.** Циклични волтамограми на витамин В2 со концентрација од 0.25 mmol/L, снимени во фосфатен пуфер со рН = 7,40 при брзини на скенирање од 5 mV/s; 10 mV/s; 15 mV/s; 20 mV/s и 25 mV/s (од волтамограмот со најниска струја кон волтамограмот со највисока струја, соодветно).

**Figure 45.** Cyclic voltammograms of 0.25 mmol/L Vitamin B2 recorded in phosphate buffer with pH = 7.40 at scan rates of 5 mV/s; 10 mV/s; 15 mV/s, 20 mV/s and 25 mV/s (from voltammogram with lowest currents to the voltammogram with highest currents, correspondingly).

Со цел да се студираат интеракциите на витамин В2 со дефинирани супстанции и лекови според регенеративниот електрохемиски механизам, при константни услови (константна концентрација на витамин В2, константно рН и константна брзина на промена на потенцијалот), во електрохемиската ќелија единствениот параметар што се менуваше беше концентрацијата на супстратот (лек 2) што евентуално би реагирал со оксидираната форма на витамин В2. На слика 46 и 47 се прикажани циклични волтамограми на витамин В2 снимени во присуство на аспирин и ибупрофен. Како што може да се забележи од волтамограмите на сликите 46 и 47, дури и при релативно високи концентрации на аспирин и ибупрофен во електрохемиската ќелија, не се забележаа скоро никакви промени во својствата на волтамограмите од витамин В2. Овие податоци имплицираат дека витамин В2 не стапува во интеракции од регенеративен тип со аспирин и ибупрофен. Меѓутоа, во присуство на цистеин

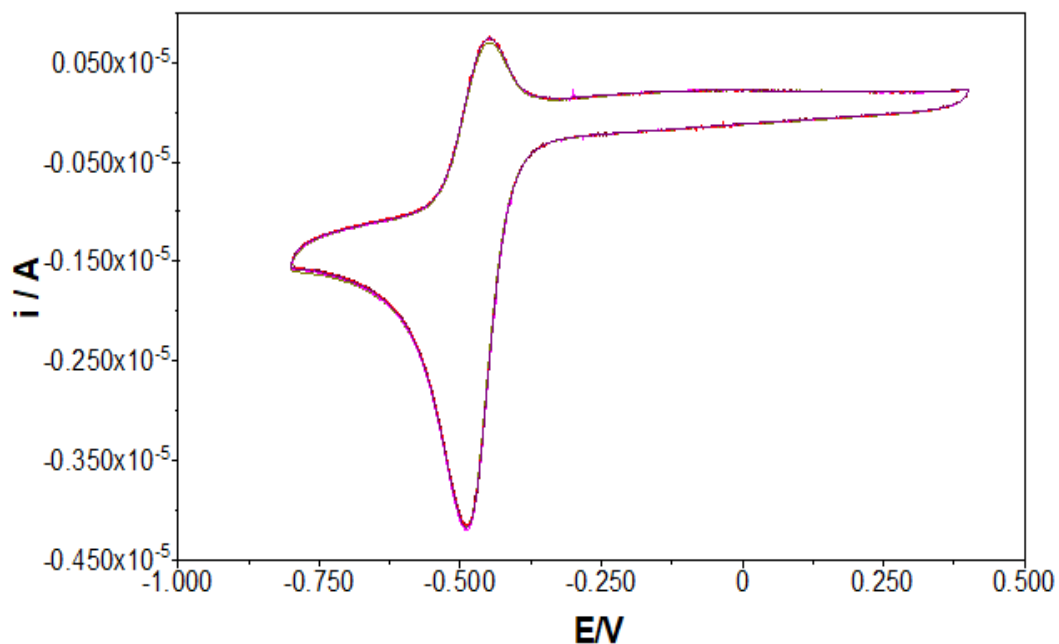


(слика 48), волтаметриските криви на витамин В2 добиваат својства карактеристични за дифузионен регенеративен електрохемиски механизам. Притоа, граничните струи на плато од волтамограмите се линеарна функција од квадратен корен од концентрацијата на цистеин, како што е елаборирано во теоретските модели за електрохемиски регенеративен механизам помеѓу два хидрофилни лекови презентирани во оваа дисертација. Покрај со цистеин, значителни интеракции од регенеративна природа беа идентификувани помеѓу оксидираните форми на витамин В2 и липоична киселина (слика 49), лимонска киселина, витамин Ц, допамин и глутатјон. Податоците од определените константи на брзина на хемиска регенеративна интеракција помеѓу витамин В2 и испитуваните лекови и суплементи се прикажани во табела 3. Овие податоци беа добиени на идентичен начин како што е претставено во поглавјето за интеракциите на 2,6-dihydroxy-1,4-benzoquinone (објаснувања за слика 43).



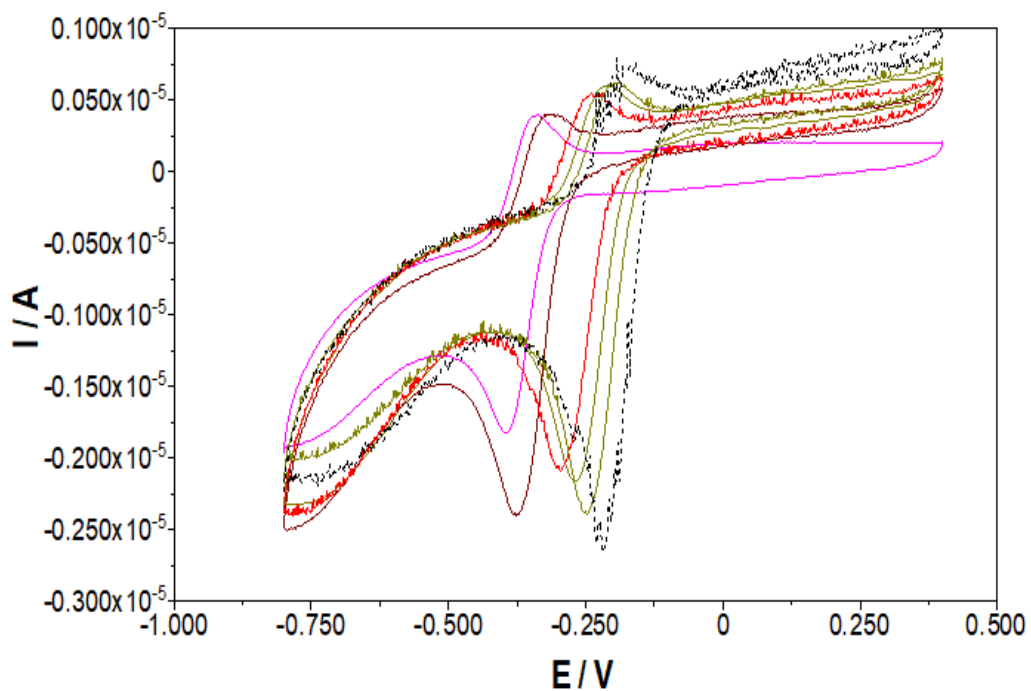
**Слика 46.** Циклични волтамограми на Витамин В2 со концентрација 0.25 mmol/L снимени во фосфатен пуфер со pH = 7.40 при брзина на промена на потенцијалот од 20 mV/s. Волтамограмите беа снимени во отсуство и во присуство на аспирин со концентрации од 1 mmol/L; 5 mmol/L; 10 mmol/L и 20 mmol/L. Бидејќи и при високи концентрации аспирин не предизвикува промени на својствата на волтамограмите од витамин В2, тоа е индикатор дека овие две супстанции не стапуваат во хемиски интеракции.

**Figure 46.** Cyclic voltammograms of 0.25 mmol/L Vitamin B2 recorded in phosphate buffer with pH = 7.40 at scan rate of 15 mV/s, recorded in absence and in presence of aspirin with concentrations of 1 mmol/L; 5 mmol/L; 10 mmol/L and 20 mmol/L. Since aspirin in high concentrations causes no changes in the shape of cyclic voltammograms of vitamin B2, it implies that no interactions occur between these two systems.



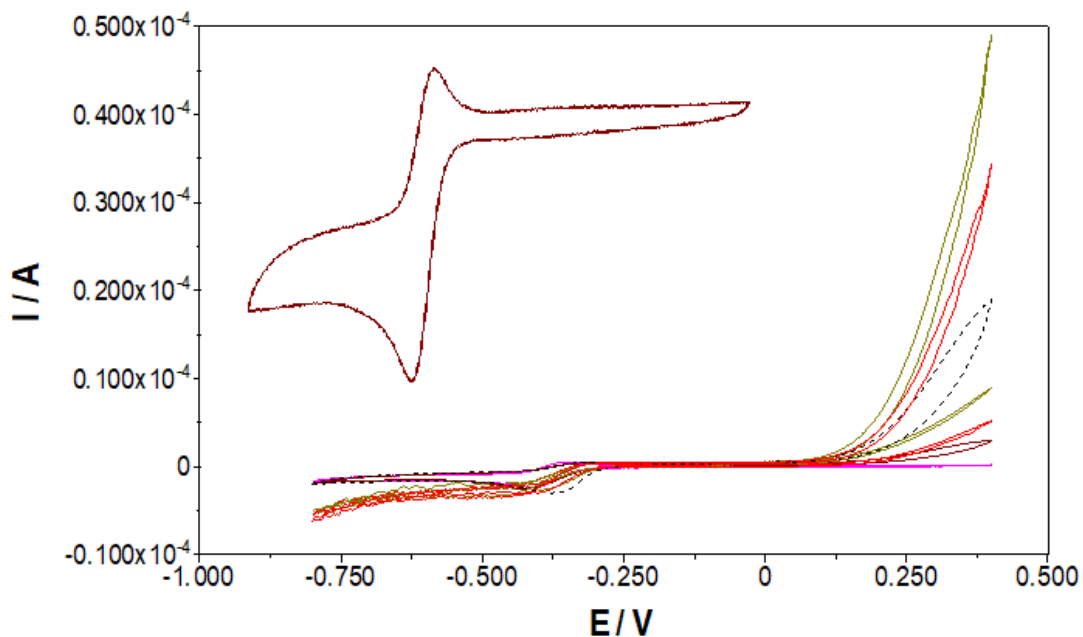
**Слика 47.** Циклични волтамограми на Витамин В2 со концентрација 0.25 mmol/L снимени во фосфатен пуфер со pH = 7.40 при брзина на промена на потенцијалот од 20 mV/s. Волтамограмите беа снимени во отсуство и во присуство на ибупрофен со концентрации од 1 mmol/L; 10 mmol/L; 15 mmol/L и 25 mmol/L. Бидејќи и при високи концентрации ибупрофен не предизвикува промени на својствата на волтамограмите од витамин В2, тоа е индикатор дека овие две супстанции не стапуваат во хемиски интеракции.

**Figure 47.** Cyclic voltammograms of 0.25 mmol/L Vitamin B2 recorded in phosphate buffer with pH = 7.40 at scan rate of 20 mV/s, recorded in absence and in presence of ibuprofen with concentrations of 1 mmol/L; 10 mmol/L; 15 mmol/L and 25 mmol/L. Since ibuprofen in high concentrations causes no changes in the shape of cyclic voltammograms of vitamin B2, it implies that no interactions occur between these two systems.



**Слика 48.** Циклични волтамограми на Витамин В2 со концентрација 0.25 mmol/L снимени во фосфатен пуфер со рН = 7.40 при брзина на промена на потенцијалот од 20 mV/s. Волтамограмите беа снимени во отсуство и во присуство на цистеин со концентрации од 1 mmol/L; 2 mmol/L; 3 mmol/L, 4 mmol/L; 5 mmol/L и 7 mmol/L (одејќи од вториот волтамограм од лево кон крајниот десен волтамограм, соодветно).

**Figure 48.** Cyclic voltammograms of 0.25 mmol/L Vitamin B2 recorded in phosphate buffer with pH = 7.40 at scan rate of 20 mV/s, recorded in absence and in presence of cysteine with concentrations of 1 mmol/L; 2 mmol/L; 3 mmol/L, 4 mmol/L; 5 mmol/L and 7 mmol/L from second voltammogram from the left to the final voltammogram to the right, correspondingly.



**Слика 49.** Циклични волтамограми на Витамин В2 со концентрација 0.25 mmol/L снимени во фосфатен пуфер со рН = 7.40 при брзина на промена на потенцијалот од 20 mV/s. Волтамограмите беа снимени во отсуство (волтамограмот е даден во инсетот горе лево) и во присуство на липоична киселина со концентрации од 1 mmol/L; 2 mmol/L; 3 mmol/L, 5 mmol/L; 8 mmol/L, 15 mmol/L и 20mmol/L (одејќи од вториот волтамограм волтамограм со најниска гранична струја кон волтамограмот со највисока гранична струја, соодветно).

**Figure 49.** Cyclic voltammograms of 0.25 mmol/L Vitamin B2 recorded in phosphate buffer with pH = 7.40 at scan rate of 20 mV/s, recorded in absence (voltammogram in the inset left upper panel) and in presence of lipoic acid with concentrations of 1 mmol/L; 2 mmol/L; 3 mmol/L, 5 mmol/L; 8 mmol/L, 15 mmol/L and 20 mmol/L (from second voltammogram to the final voltammogram with highest limiting current, correspondingly).

Информации за природата и јачината на хемиските интеракции од регенеративна природа помеѓу сет од дефинирани лекови или суплементи и оксидираната форма на Рибофлавин (Витамин В2) се дадени во табела 3.

**Табела 3.** Податоци за механизам на регенеративни хемиски интеракции на лекови што беа испитувани со циклична скалеста волтаметрија во присуство на Рибофлавин (Витамин В2-електрохемиски активен лек, присутен во концентрација од 0.00025 mol/L). Сите експерименти беа изведени во фосфатен пуферски раствор со pH = 7.4. Во табелите се дадени и пресметаните вредности за константите на брзина хемиска регенеративна реакција на дефинираните лекови со оксидираната форма на рибофлавин.

**Table 3.** Data about regenerative chemical interactions of defined medicaments with Riboflavin (Vitamin B2), obtained by cyclic staircase voltammetry. Redox active compound Vitamin B2 was present in electrochemical cell at 0.00025 mol/L concentration. All experiments were conducted in phosphate buffer with pH = 7.40. In the table information are provided about determined values of chemical reactions rate constants (or catalytic rate constants) between the defined medicament and рибофлавин.

Име на дефинирана супстанца („лек 2“) чии интеракции се испитуваат со оксидираната форма на Рибофлавин (Витамин В2)	Информации за интеракции на Рибофлавин со дефинирани лекови или супстрати	Пресметани вредности на константата на брзина на хемиски регенеративни интеракции $k_c'$ (mol <sup>-1</sup> cm <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> )	Забелешка
Липоична киселина Lipoic acid	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>2240</b>	силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Лимонска киселина Citric acid	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>2800</b>	силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Витамин Ц L-Ascorbic acid	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>3200</b>	Силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Цистеин L-cysteine	постојат интеракции од	<b>240</b>	умерени интеракции од

	регенеративна природа		регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Ресвератрол Resveratrol	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>290</b>	умерени интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Допамин Dopamine	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>1230</b>	силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Curcumin Куркумин	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>190</b>	умерени интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Витамин В12 Cyanocobalamin	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>1360</b>	силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
орто-крезол o-cresol	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>70</b>	слаби интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Глутатјон Glutathione	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>1870</b>	силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Галска киселина Gallic acid	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>330</b>	умерени интеракции од регенеративна природа

			(дифузионен регенеративен механизам)
Аспирин Aspirin	Нема интеракции	/	/
Ибупрофен Ibuprofen	Нема интеракции	/	/
Кофеин Caffeine	Нема интеракции	/	/
Парацетамол Acetaminophen	Нема интеракции	/	/
Аналгин Metamizole	Нема интеракции	/	/
Спазмекс Trosipium	Нема интеракции	/	/
Епикатехин (-)-Epicatechin	Нема интеракции	/	/
Кетопрофен Ketoprofen	Нема интеракции	/	/

### **6.1.3 Циклична волтаметрија на калиум хексацијаноферат (II)- $K_4[Fe(CN)_6]$ и студија на интеракциите на $K_4[Fe(CN)_6]$ со други супстанции согласно регенеративниот електрохемиски механизам**

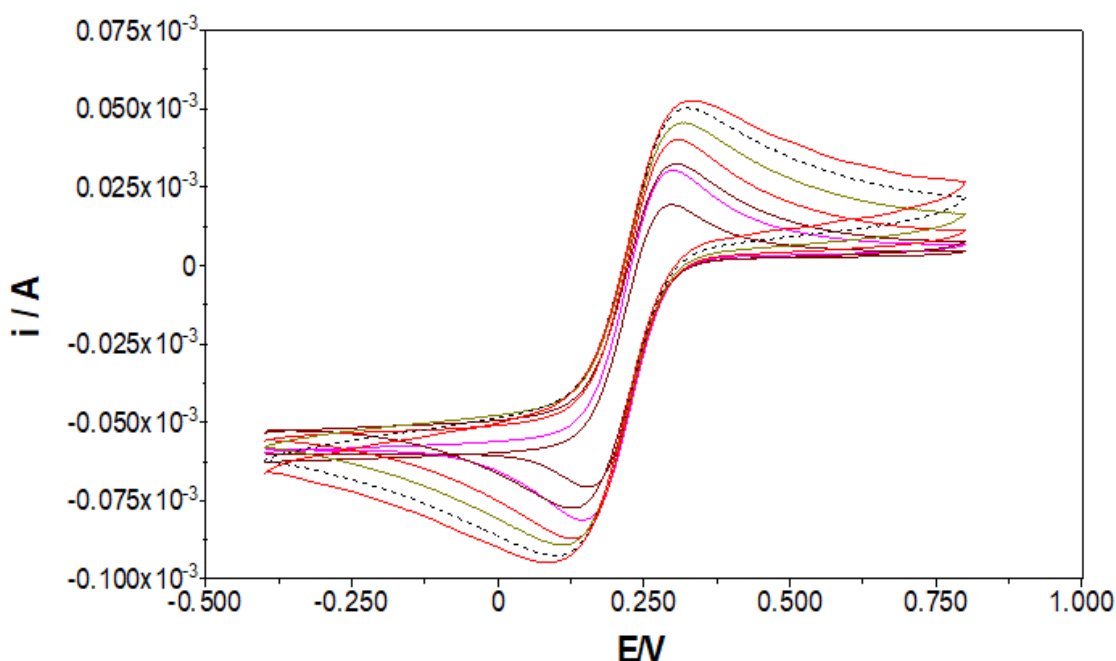
Соединението калиум хексацијаноферат (II)- $K_4[Fe(CN)_6]$  е електрохемиски активно соединение што во голем број случаи во волтаметријата се користи како моделна супстанца за докажување на разни електрохемиски механизми [Compton et al., Understanding voltammetry, 2010]. Во рамките на оваа дисертација, испитувани беа електрохемиските својства на калиум хексацијаноферат (II)- $K_4[Fe(CN)_6]$  со примена на циклеста скалеста волтаметрија, во пуфер со pH = 7.40. На слика 50 се прикажани серија на циклични скалести волтамограми на снимени при различни брзини на промена на потенцијалот. Електрохемискиот процес на оксидација на  $K_4[Fe(CN)_6]$  до  $K_3[Fe(CN)_6]$  може да се претстави со следната реакциона шема:



Од волтамограмите прикажани на слика 50 може да се забележи дека со зголемување на брзината на промена на потенцијалот доаѓа до зголемување на потенцијалната сепарација помеѓу оксидацискиот и редукцискиот пик на  $K_4[Fe(CN)_6]$  од 110 mV (при брзина на промена на потенцијал од 5 mV/s) до 225

mV (при брзина на промена на потенцијал од 40 mV/s). Покрај тоа, односот на висините на струите и на катодниот и на анодниот пик е блиску до 1. Притоа, пик струите и на катодниот и на анодниот пик се пропорционални со квадратен корен од брзината на промена на потенцијалот, што е карактеристично за дифузионо контролирани електродни редокс процеси. Од зависноста на пик струите и на катодниот и на анодниот пик како функција од брзината на промена на потенцијалот, со примена на Randles Sevcik-овата равенка може се определи и коефициентот на дифузија на  $K_4[Fe(CN)_6]$  и тој изнесува  $D = 6.5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , што е во согласност со литературните податоци [Compton et al., Understanding voltammetry, 2010]. Со цел да се студираат потенцијалните интеракции на дефинирани лекови со оксидираната форма на  $K_4[Fe(CN)_6]$  врз основа на регенеративниот електрохемиски механизам, при константна концентрација на  $K_4[Fe(CN)_6]$  во електрохемиската ќелија (0.25 mmol/L) и при константна брзина на промена на потенцијалот (20 mV/s), во електрохемиската ќелија се зголемуваше само концентрацијата на „лек 2“. Притоа, отсуството на промени во волтамограмите на  $K_4[Fe(CN)_6]$  при зголемување на концентрацијата на „лек 2“ се користи како индикатор дека не постојат интеракции помеѓу  $K_4[Fe(CN)_6]$  и испитуваниот лек. Во случај на интеракции од регенеративна природа помеѓу  $K_4[Fe(CN)_6]$  и даден лек, преку зависностите на граничните струи на плато од квадратен корен на концентрацијата на дефиниран „лек 2“ се определува константата на брзина на интеракции помеѓу тој лек и  $K_3[Fe(CN)_6]$ , на идентичен начин како и претходните два случаи со соединенијата Витамин В2 и 2,5-дихидрокси-1,4-бензокинон.

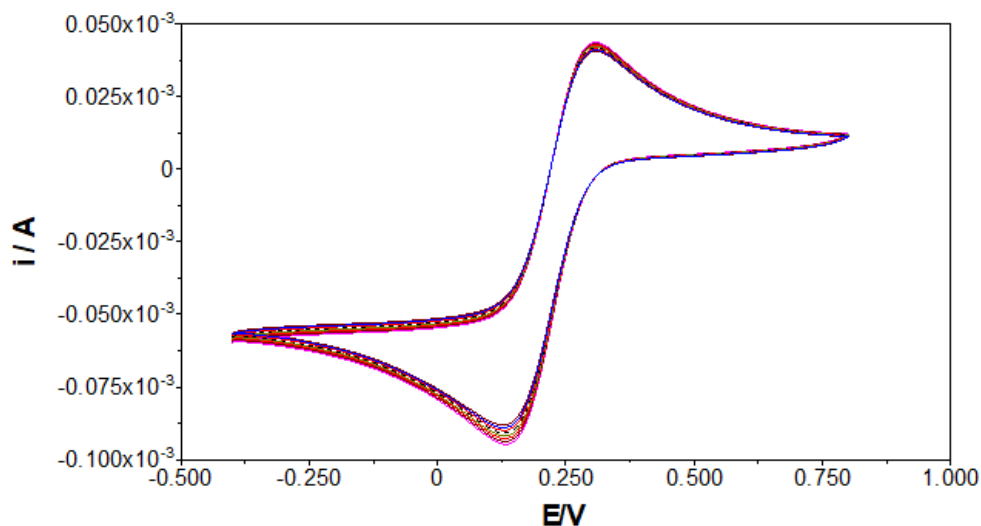




**Слика 50.** Циклични волтамограми на калиум хексацијаноферат (II)- $K_4[Fe(CN)_6]$  со концентрација од  $0.25 \text{ mmol/L}$ , снимени во фосфатен пуфер со  $pH = 7,40$  при брзини на скенирање од  $5 \text{ mV/s}$ ;  $10 \text{ mV/s}$ ;  $15 \text{ mV/s}$ ;  $20 \text{ mV/s}$ ,  $25 \text{ mV/s}$ ,  $30 \text{ mV/s}$ ,  $35 \text{ mV/s}$  и  $40 \text{ mV/s}$  (од волтамограмот со најниска струја кон волтамограмот со највисока струја, соодветно). Потенцијалниот чекор при овие експерименти беше  $2 \text{ mV}$ .

**Figure 50.** Cyclic voltammograms of potassium hexacyanoferrate (II)- $K_4[Fe(CN)_6]$  with concentration of  $0.25 \text{ mmol/L}$ . Voltammograms are recorded in phosphate buffer with  $pH = 7,40$  at scan rates of  $5 \text{ mV/s}$ ;  $10 \text{ mV/s}$ ;  $15 \text{ mV/s}$ ;  $20 \text{ mV/s}$ ,  $25 \text{ mV/s}$ ,  $30 \text{ mV/s}$ ,  $35 \text{ mV/s}$  and  $40 \text{ mV/s}$  (from voltammogram with lowest current towards voltammogram with highest current, respectively). The potential step used in this set of experiments was  $2 \text{ mV}$ .

На слика 51 се прикажани серија од циклични волтамограми на  $K_4[Fe(CN)_6]$  снимени во отсуство и во присуство на салицилна киселина во концентрации од  $1 \text{ mm/L}$  до  $25 \text{ mmol/L}$ . Како што може да се забележи од цикличните волтамограми на слика 51, зголемувањето на концентрацијата на салицилна киселина не доведува до промени на карактеристиките на волтамограмите од  $K_4[Fe(CN)_6]$ , што значи дека салицилна киселина не стапува во регенеративен електрохемиски механизам со  $K_4[Fe(CN)_6]$ .

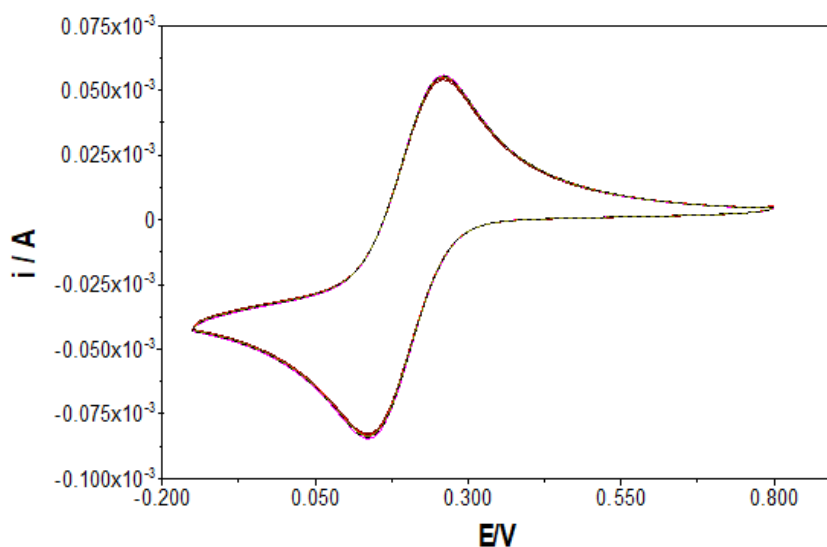


**Слика 51.** Циклични волтамограми на  $K_4[Fe(CN)_6]$  со концентрација 0.25 mmol/L снимени во фосфатен пуфер со  $pH = 7.40$  при брзина на промена на потенцијалот од 20 mV/s. Волтамограмите беа снимени во отсуство и во присуство на салицилна киселина со концентрации од 1 mmol/L; 5 mmol/L, 8 mmol/L, 10 mmol/L; 12 mmol/L, 15 mmol/L, 20 mmol/L и 25 mmol/L. Бидејќи и при високи концентрации салицилна киселина не предизвикува промени на својствата на волтамограмите од  $K_4[Fe(CN)_6]$ , тоа е индикатор дека овие две супстанции не стапуваат во хемиски интеракции.

**Figure 51.** Cyclic voltammograms of 0.25 mmol/L  $K_4[Fe(CN)_6]$  recorded in phosphate buffer with  $pH = 7.40$  at scan rate of 20 mV/s, recorded in absence and in presence of salicylic acid with concentrations of 1 mmol/L; 5 mmol/L, 8 mmol/L, 10 mmol/L; 12 mmol/L, 15 mmol/L, 20 mmol/L and 25 mmol/L. Since salicylic acid in high concentrations causes no changes in the shape of cyclic voltammograms  $K_4[Fe(CN)_6]$ , it implies that no interactions occur between these two systems.

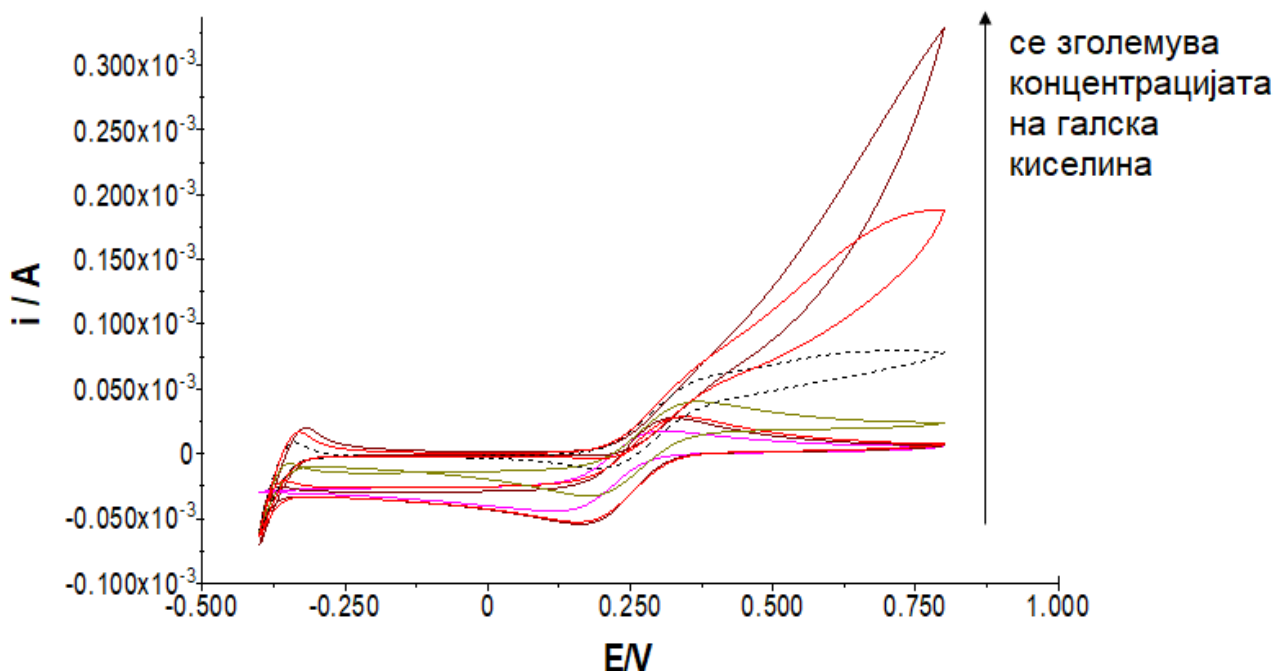
Слична ситуација во поглед на отсуство на интеракции на оксидираната форма од  $K_4[Fe(CN)_6]$  беше забележана и во присуство на диазепам (слика 52), ибупрофен, кетопрофен, гликоза, кофеин и други лекови и суплементи, за кои податоци се дадени во Табела 4. Меѓутоа, во присуство на галска киселина (слика 53), резорцинол (слика 54), цистеин, лимонска киселина, глутатјон, витамин С, допамин и липоична киселина, цикличните волтамограми на  $K_4[Fe(CN)_6]$  имаат својства карактеристични за дифузионен регенеративен електрохемиски механизам. Притоа, граничните струи на плато од волтамограмите на  $K_4[Fe(CN)_6]$  се линеарна функција од квадратен корен од концентрацијата на горенаведените лекови, како што е елаборирано во

теоретските модели за електрохемиски регенеративен механизам помеѓу два хидрофилни лекови презентирани во оваа дисертација. Податоците од определените константи на брзина на хемиска регенеративна интеракција помеѓу  $K_4[Fe(CN)_6]$  и испитуваните лекови и суплементи се прикажани во табела 4. Треба да се нагласи дека и овие податоци се добиени на идентичен начин како што е образложено во поглавјето за интеракциите на 2,6-dihydroxy-1,4-benzoquinone (објаснувања за слика 43).



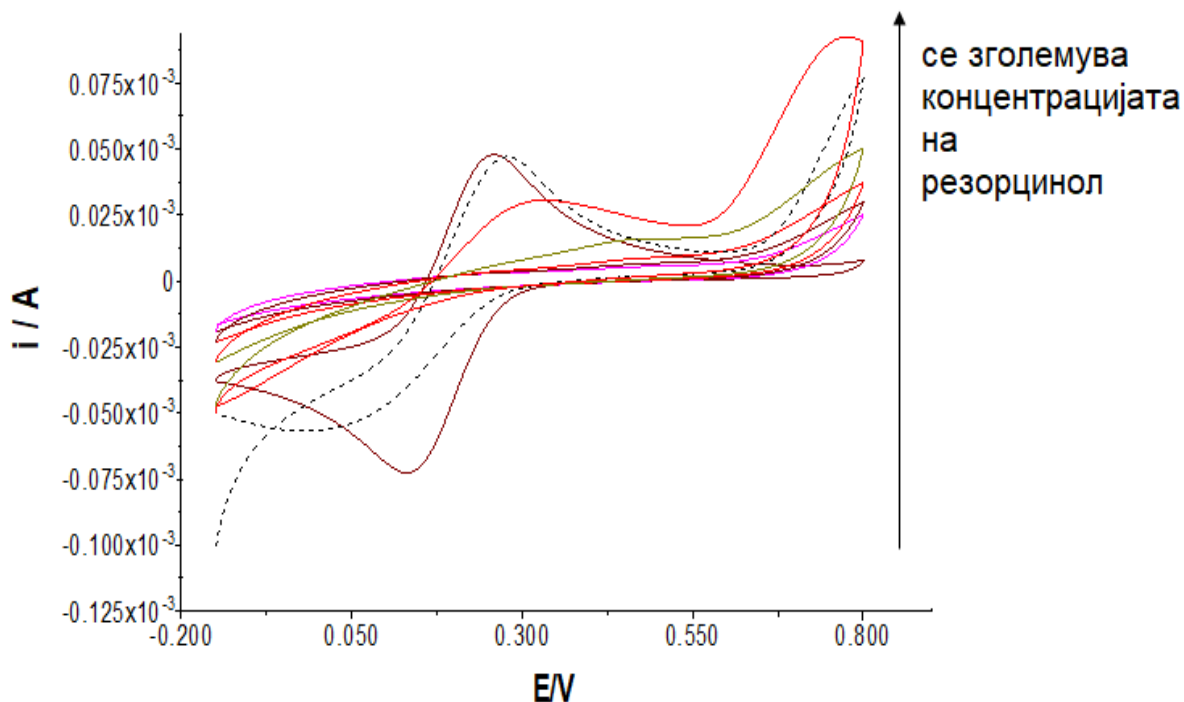
**Слика 52.** Циклични волтамограми на  $K_4[Fe(CN)_6]$  со концентрација 0.25 mmol/L снимени во фосфатен пуфер со  $pH = 7.40$  при брзина на промена на потенцијалот од 20 mV/s. Волтамограмите беа снимени во отсуство и во присуство на диазепам со концентрации од 1 mmol/L; 2 mmol/L, 4 mmol/L, 6 mmol/L; 8 mmol/L, 10 mmol/L and 15 mmol/L. Бидејќи и при високи концентрации лекот диазепам не предизвикува промени на својствата на волтамограмите од  $K_4[Fe(CN)_6]$ , тоа е индикатор дека овие две супстанции не стапуваат во хемиски интеракции.

**Figure 52.** Cyclic voltammograms of 0.25 mmol/L  $K_4[Fe(CN)_6]$  recorded in phosphate buffer with  $pH = 7.40$  at scan rate of 20 mV/s, recorded in absence and in presence of diazepam with concentrations of 1 mmol/L; 2 mmol/L, 4 mmol/L, 6 mmol/L; 8 mmol/L, 10 mmol/L, and 15 mmol/L. Since salicylic acid in high concentrations causes no changes in the shape of cyclic voltammograms  $K_4[Fe(CN)_6]$ , it implies that no interactions occur between these two systems



**Слика 53.** Циклични волтамограми на  $K_4[Fe(CN)_6]$  со концентрација 0.25 mmol/L снимени во фосфатен пуфер со pH = 7.40 при брзина на промена на потенцијалот од 20 mV/s. Волтамограмите беа снимени во отсуство и во присуство на галска киселина со концентрации од 1 mmol/L; 3 mmol/L; 5 mmol/L, 8 mmol/L; 12 mmol/L, 15 mmol/L, 20mmol/L и 25mmol/L (одејќи од вториот волтамограм волтамограм со најниска струја кон волтамограмот со највисока струја, соодветно).

**Figure 53.** Cyclic voltammograms of 0.25 mmol/L  $K_4[Fe(CN)_6]$  recorded in phosphate buffer with pH = 7.40 at scan rate of 20 mV/s, recorded in absence and in presence of diazepam with concentrations of 1 mmol/L; 3 mmol/L; 5 mmol/L, 8 mmol/L; 12 mmol/L, 15 mmol/L, 20mmol/L and 25mmol/L (from second voltammogram to the final voltammogram, correspondingly).



**Слика 54.** Циклични волтамограми на  $K_4[Fe(CN)_6]$  со концентрација 0.25 mmol/L снимени во фосфатен пуфер со pH = 7.40 при брзина на промена на потенцијалот од 20 mV/s. Волтамограмите беа снимени во отсуство и во присуство на резорцинол со концентрации од 2 mmol/L; 4 mmol/L; 6 mmol/L, 8 mmol/L; 10 mmol/L и 15 mmol/L (одејќи од вториот волтамограм волтамограм со најниска струја кон волтамограмот со највисока струја, соодветно).

**Figure 54.** Cyclic voltammograms of 0.25 mmol/L  $K_4[Fe(CN)_6]$  recorded in phosphate buffer with pH = 7.40 at scan rate of 20 mV/s, recorded in absence and in presence of diazepam with concentrations of 2 mmol/L; 4 mmol/L; 6 mmol/L, 8 mmol/L; 10 mmol/L and 15mmol/L (from second voltammogram to the final voltammogram, correspondingly).

**Табела 4.** Податоци за механизам на регенеративни хемиски интеракции на лекови што беа испитувани со циклична скалеста волтаметрија во присуство на  $K_4[Fe(CN)_6]$  ( $K_4[Fe(CN)_6]$  е електрохемиски активна супстанца, присутна во концентрација од 0.00025 mol/L). Сите експерименти беа изведени во фосфатен пуферски раствор со pH = 7.4. Во табелите се дадени и пресметаните вредности за константите на брзина хемиска регенеративна реакција на дефинираните лекови со оксидираната форма на  $K_4[Fe(CN)_6]$ .

**Table 4.** Data about regenerative chemical interactions of defined medicaments with redox active substance  $K_4[Fe(CN)_6]$ , obtained by cyclic staircase voltammetry. Redox active compound  $K_4[Fe(CN)_6]$  was present in electrochemical cell at 0.00025 mol/L concentration. All experiments were conducted in phosphate buffer with pH = 7.40. In the table information are provided about determined values of chemical reactions rate constants (or catalytic rate constants) between the defined medicament and oxidized form of  $K_4[Fe(CN)_6]$ .

Име на дефинирана супстанца („лек 2“) чии интеракции се испитуваат со оксидираната форма на $K_3[Fe(CN)_6]$	Информации за интеракции на $K_3[Fe(CN)_6]$ со дефинирани лекови или супстрати	Пресметани вредности на константата на брзина на хемиски регенеративни интеракции $k_c'$ ( $mol^{-1}cm^3s^{-1}$ )	Забелешка
Галска киселина Gallic acid	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>3450</b>	силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Резорцинол Resorcinol	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>2200</b>	силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Липоична киселина Lipoic acid	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>2520</b>	силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Лимонска киселина Citric acid	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>2760</b>	силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Витамин Ц L-Ascorbic acid	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>3800</b>	Силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Цистеин	постојат	<b>860</b>	умерени интеракции од

L-cysteine	интеракции од регенеративна природа		регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Ресвератрол Resveratrol	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>360</b>	умерени интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Допамин Dopamine	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>1470</b>	силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Curcumin Куркумин	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>320</b>	умерени интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Витамин В12 Cyanocobalamin	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>1610</b>	силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Глутатјон Glutathione	постојат интеракции од регенеративна природа	<b>1220</b>	силни интеракции од регенеративна природа (дифузионен регенеративен механизам)
Гликоза Glucose	Нема интеракции	/	/
Кофеин Caffein	Нема интеракции	/	/
Салицилна киселина Salicylic acid	Нема интеракции	/	/
Ибупрофен Ibuprofen	Нема интеракции	/	/
Парацетамол Acetaminophen	Нема интеракции	/	/
Аналгин Metamizole	Нема интеракции	/	/
Кетопрофен Ketoprofen	Нема интеракции	/	/
Пирацетам Piracetam	Нема интеракции	/	/

## 7 ЗАКЛУЧОЦИ

Својствата на четири електродни механизми на хидрофилни и липофилни редокс активни лекови во присуство на други лекови и суплементи со кои редокс лековите можат да стапат во регенеративна хемиска реакција се студирани теоретски и експериментално во услови на циклична скалеста волтаметрија. Притоа, во услови на оваа волтаметриска техника, моделите за дифузионен регенеративен електроден механизам поврзан со реверзибилна хемиска реакција и моделот за површински регенеративен електроден механизам поврзан со реверзибилна хемиска реакција се решени и претставени за прв пат во оваа дисертација. Во рамките на елаборираните теоретски модели, претставени се најважните својства на теоретските циклични волтамограми како функција од брзината на хемиските интеракции и од константата на рамнотежа на хемиските регенеративни реакции, кај моделите каде постои реверзибилна хемиска рамнотежа. Во принцип, најголема релевантност за разбирање на интеракциите на два лекови според регенеративните електродни механизми се добива преку студирањето на својствата на цикличните волтамограми како функција од концентрацијата на вториот лек. Притоа, кај сите електродни регенеративни механизми обработени во дисертацијата, дефинирани се едноставни дијагностички критериуми за експериментално препознавање на секој од елаборираните механизми. Покрај тоа, во дисертацијата се предложени едноставни теоретски зависимости што се соодветни за пресметување на кинетички и термодинамички параметри што се во директна корелација со кинетиката на хемиски реакции помеѓу два испитувани лекови кои стапуваат во хемиски интеракции според регенеративен механизам. Во следните заклучоци се наброени некои од најзначајните придобивки елаборирани во оваа дисертација:

- За прв пат се решени и публикувани теоретски модели во услови на циклична волтаметрија за електродни регенеративни механизми каде постои хемиска рамнотежа (моделите В и Г) и тоа за дифузиона (В) и за површинска едностепена електродна регенеративна реакција што е поврзана со последователна реверзибилна хемиска реакција.



- Покрај погоре-наведените електродни механизми, дискутирани се и својствата на дифузиони и површински едностепени електродни регенеративни механизми поврзани со иреверзибилна хемиска регенеративна реакција. Новите аспекти кај овие модели се дискутирани во поглед на примена на максималната лимитирачка струја за определување на кинетиката на интеракции на два лекови што стапуваат во регенеративна хемиска реакција.
- Кај сите теоретски модели, покажано е дека во услови на значително повисоки концентрации на „лекот 2“ во однос на редокс активниот „лек 1“, во ситуации кога доаѓа до интеракции помеѓу овие два лекови од регенеративна природа, се добиваат т.н. „steady state“ циклични воламограми со сигмоидална форма.
- Граничната максимална струја на горното плато ( $\Psi_{\text{max-плато}}$ ) од „steady state“ цикличните воламограми кај сите електродни механизми е функција само од кинетиката на хемиски интеракции, односно од концентрацијата на „лек 2“ во електрохемиската ќелија.
- Кај електродните регенеративни механизми каде трансферот на маса е контролиран со дифузија (А и В), граничната максимална струја на горното плато ( $\Psi_{\text{max-плато}}$ ) од „steady state“ цикличните воламограми е линеарна функција од квадратен корен од моларната концентрација на „лек 2“ т.е.  $c^{0.5}_{(\text{лек } 2)}$ .
- Кај површинските електродни регенеративни механизми (Б и Г), граничната максимална струја на горното плато ( $\Psi_{\text{max-плато}}$ ) од „steady state“ цикличните воламограми е линеарна функција од моларната концентрација на „лек 2“ т.е.  $c_{(\text{лек } 2)}$ .
- Овие две зависности може да послужат како едноставни дијагностички критериуми за препознавање на дифузионите од површинските електродни регенеративни механизми.
- Од вредноста на наклонот на правата на зависностите на  $\Psi_{\text{max-плато}}$  како функција од  $c^{0.5}_{(\text{лек } 2)}$  (за електродните механизми А и В) и од вредноста на наклонот на правата на  $\Psi_{\text{max-плато}}$  како функција од  $c_{(\text{лек } 2)}$  (за електродните механизми Б и Г) може да се пресмета константата на хемиски интеракции помеѓу „лек 1“ и „лек 2“ без да се знаат вредностите на

параметрите за електронскиот трансфер на електродната реакција помеѓу работната електрода и „лек 1“.

- За сите модел, третставени се работни криви што можат да се искористат за определување на кинетиката на хемиските интеракции помеѓу два дефинирани лекови што стапуваат во даден тип на регенеративен електрохемиски механизам
- Како моделни компоненти за експериментално демонстрирање на дел од теоретските резултати се употребени соединенијата 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone, Рибофлавин (витамин B2) и  $K_4[Fe(CN)_6]$ .
- Волтаметриските својства на овие моделни компоненти во услови на циклична скалеста волтаметрија се студирани во присуство на дефинирани лекови и суплементи.
- Во ситуациите каде постојат хемиски интеракции од регенеративна природа помеѓу формите од дефинираните моделни (редокс активни) системи и студирани лекови и суплементи, определени се константите на брзина на соодветните хемиски интеракции со употреба на методите што се елаборирани во теоретските модели.
- Во ситуациите каде не постојат промени на својствата на цикличните волтамограми од моделните редокс активни системи снимени како функција при значителни концентрации на студирани лекови и суплементи, се заклучува дека не постојат интеракции помеѓу моделните компоненти и дефинираните лекови или суплементи.
- Добиените податоци за кинетиката на интеракциите на 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone, Рибофлавин (витамин B2) и  $K_4[Fe(CN)_6]$  со дефинираните лекови се за прв пат определени во рамките на оваа дисертација.
- Вредностите на определените кинетички параметри за хемиските регенеративни интеракции помеѓу дефинираните лекови или суплементи даваат податоци за потенцијално синергетско дејство помеѓу студирани хемиски системи.
- Важно е да се нагласи дека електрохемиски активниот систем (или редокс-активен лек 1) треба да покажува електрохемиска активност во рамките на применетите потенцијали во техниката циклична скалеста волтаметрија. Тоа е неопходно за да се применат резултатите од моделите за електродните механизми презентирани во оваа дисертација.

- Математичките и теоретските модели во кои се обработени елаборираните системи во оваа дисертација се презентирани во четири оригинални научни трудови, публикувани во списанија со фактор на влијание, како и во еден ревијален труд, исто така публикуван во списание со фактор на влијание.
- Во дисертацијата, во слободна форма се дадени и работните верзии на MATHCAD фајловите за сите електродни механизми елаборирани во оваа дисертација. Истите може да бидат слободно употребени за симулирање на својствата на волтамограмите од соодветните електродните механизми презентирани во дисертацијата

## 8. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Ambika, S., Manojkumar, Y., Gowdhami, S. A. B., Sundaram, K. K. M., Solomon, R. V., Venuvanalingam, P., Akbarsha, M. A., Sundararaman, M. (2019) Biomolecular interaction, anti-cancer and anti-angiogenic properties of Cobalt(III) Schiff Base complexes, [Sci. Rep.](#) 9, doi: 10.1038/s41598-019-39179-1
2. Armstrong F. A. (2002) in Encyclopedia of Electrochemistry, Vol. 5 (Eds. A. J. Bard, M. Stratmann, G. S. Wilson), Wiley VCH, Weinheim, Germany.
3. Armstrong F. A., (1997); Applications of voltammetric methods for probing the chemistry of redox proteins in: Bioelectrochemistry: Principles and practice (G. Lenaz, G. Milazz eds), Birkhauser Verlag AG, Basel, Swiss.
4. Armstrong F. A., (2002); Voltammetry of Proteins. In: A. J. Bard, M. Stratmann, G. S. Wilson 16 (eds) Encyclopedia of Electrochemistry, vol. 9, Wiley VCH, Weinheim.
5. Armstrong F. A., Heering, H. A., Hirst, J. (1997) Reaction of complex metalloproteins studied by protein-film voltammetry, Chem. Soc. Rev. 26 , 169
6. Armstrong F. A., R. M. Evans, S. V. Hexter, B. J. Murphy, M. M. Roessler, Ph. Wulff, (2016); Guiding Principles of Hydrogenase Catalysis Instigated and Clarified by Protein Film Electrochemistry, Acc. Chem. Res., 49, 884;
7. Armstrong F. A. (2011) Voltammetry of Proteins. In: A. J. Bard, F. Arjmand, M. Aziz, S. Tabassum, Curr. Anal. Chem. 7, 71;
8. Armstrong, F. A. (1997) Bioelectrochemistry: Principles and Practice, vol. 5, (Eds. G. Lenaz, G. Milazz), Birkhauser Verlag AG, Basel, Swiss.
9. Armstrong F. A., (2015) Electrifying metalloenzymes in: Metalloproteins: Theory, calculations and experiments (A. E. Cho, W. A. Goddar III, eds), CRC Press, Taylor&Francis Group, London, New York.
10. Arshad, N., Farooqi, S. I. (2018) Cyclic Voltammetry, Appl. Biochem. Biotechnol. 186, 1090
11. Bai, J. Zhang, Y., Tang, C., Hou, Y., Ai, X., Chen, X., Zhang, Y., Wang, X., Meng, X. (2021) Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases, Biomedicine&Pharmacotherapy 133, 110985, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110985>

12. Bard A. J. Faulkner L. R. (1980) *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2<sup>nd</sup> Edition, Wiley, New York;
13. Bard A. J., and L. R. Faulkner, (2004); *Electrochemical methods. Fundamentals and 14 applications*, 3rd edition, John Wiley & Sons, Inc;
14. Bartlett P. N., (2008) *Bioelectrochemistry-Fundamentals, Experimental Techniques and 18 Application*, Wiley, Chichester.
15. Bertrand P, B. Frangioni, S. Dementin,, M. Sabaty, P. Arnoux, B. Guigliarelli, D. Pignol, Ch. Léger, (2007); *Effects of Slow Substrate Binding and Release in Redox Enzymes: Theory and Application to Periplasmic Nitrate Reductase*. *J. Phys. Chem. B*, 111, 10300;
16. Bicer, E., Qetinkaya, P. (2009) *A voltametric study on the interaction of novobiocin with cysteine: ph effect*, *J. Chil. Chem. Soc.* 54, 46-50.
17. Bogeski I, Gulaboski R, Kappl R, Mirceski V, Stefova M, Petreska J, Hoth M (2011) *Calcium binding and transport by Coenzyme Q*. *J Am Chem Soc* 133, 9293–9303;
18. Bond, A. M., Mashkina, E. A., Simono, A. N. (2014) *Developments in electrochemistry*, Ltd, Chichester: John Wiley & Sons.
19. Bruce, A., Buehler, M. D. (2011) *Vitamin B2: Riboflavin*, *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* 16, 88-90, doi: 10.1177/1533210110392943
20. Chambers, J. O. (1974) *Electrochemistry of quinones*. In: *The chemistry of quinoid compounds*, John Wiley&Sons, London, 737-792; 2,5-dihydroxy 1,4-benzoquinone;
21. Cizmek, L., Komorsky-Lovric, S., Lovric, M. (2015) *Comparison of cyclic and square-wave voltammetry of irreversible EC mechanisms*, *ChemElectroChem.* 2, 2027-2031.
22. Cizmek, L., Lovric, M. (2016) *Simulation of electrocatalytic mechanism followed by chemical reaction*, *J. Electroanal. Chem.* 768, 129-133.
23. Compton, R. G., Banks, C.E. (2010) *Understanding voltammetry*, 2<sup>nd</sup> edition, Imperial College Press, London.
24. Devi, B., Singh, N. R., Devi, M. D. (2011) *J. Chem. Pharm. Res.* 3, 789
25. Eckert, M., Gutmann, F., Keyzer, H. (1986) *Electrochemistry of drug interactions and incompatibilities in Modern Bioelectrochemistry* (F. Gutmann, H. Keyzer, eds.), Springer, Boston, USA.

26. Fotouhi, L., Haskavayi, A. B., Heravi, M. M (2013) Interaction of sulfadiazine with DNA on a MWCNT modified glassy carbon electrode: determination of DNA, *Int. J. Biol. Macromol.* 53 (2013) 101
27. Fotouhi, L., Tabatabaee, R. (2014) A study of the interaction of tyrosine and DNA using voltammetry and spectroscopy methods, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 121, 152-156.
28. Fotouhi, L., Atoofi, Z., Heravi, M. M. (2013) Interaction of ciprofloxacin with DNA studied by spectroscopy and voltammetry at MWCNT/DNA modified glassy carbon electrode, *Talanta* 103, 194-200.
29. Gao, J., Hu, J., Hu, D., Yang, X. (2012) A Role of Gallic Acid in Oxidative Damage Diseases: A Comprehensive Review, 14, 8, <https://doi.org/10.1177/1934578X19874174>
30. Ghandour, M. A., Hassan, A., Ali, H.M. (2017) Electrochemical behavior of omeprazole interacting with Mycin derivatives and doxycycline, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 13, 5183-5190
31. Grosser D. K. Jr. (1993) *Cyclic Voltammetry-Simulation and analysis of reaction mechanisms*, Wiley VCH, New York.
32. Guin, P. S. Das, S. (2014) Exploration of electrochemical intermediates of the anticancer drug doxorubicin hydrochloride using cyclic voltammetry and simulation studies with an evaluation of its interaction with DNA, *Int. J. Electrochem.* [doi.org/10.1155/2014/517371](https://doi.org/10.1155/2014/517371)
33. Gulaboski, R. (2012) in *Electrochemical Dictionary*, 2<sup>nd</sup> edition (A. J. Bard, G. Inzelt, F. Scholz, Eds.), Springer, Berlin, Germany.
34. Gulaboski, R. Kokoskarova, P., Petkovska, S. (2018) Time independent methodology to assess Michaelis Menten constant by exploring electrochemical-catalytic mechanism in protein-film cyclic staircase voltammetry, *Croat. Chem. Acta*, 91, 377-382
35. Gulaboski, R., Petkovska, S. (2018) A time-independent approach to evaluate the kinetics of enzyme-substrate reactions in cyclic staircase voltammetry, *Analytical & Bioanalytical Electrochemistry* 10:566-575
36. Gulaboski, R., Kokoskarova, P., Petkovska, S. (2020) Analysis of Drug-Drug Interactions with Cyclic Voltammetry: An Overview of Relevant Theoretical Models and Recent Experimental Achievements. *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry*, 12, 345-364.

37. Gulaboski R, Bogeski I, Mirceski V, Saul S, Pasička B, Haeri HH, Stefova M, Petreska Stanoeva J, Mitrev S, Hoth M, Kappl R (2013) Hydroxylated derivatives of dimethoxy-1,4-benzoquinone as redox switchable earth-alkaline metal ligands and radical scavengers. *Sci Reports* 3, 1–8. doi:[10.1038/srep01865](https://doi.org/10.1038/srep01865)
38. Gulaboski, R., Mirceski, V. (2015) New aspects of the electrochemical-catalytic (EC') mechanism in square-wave voltammetry. *Electrochim Acta* 167, 219–225
39. Gulaboski, R., Markovski, V., Jihe, Z. (2016) Redox chemistry of Coenzyme Q-a short overview of the voltametric features, *J. Solid State Electrochem.* 20, 3229-3238;
40. Heinze, J. (1984) Cyclic voltammetry-electrochemical spectroscopy, *Ang. Chem.* 23, 831-847. <https://doi.org/10.1002/anie.198408313>
41. Helfrick JC, Mann MA, Bottomley LA (2016), Diagnostic criteria for the characterization of electrode reactions with chemical reactions following electron transfer by cyclic square wave voltammetry. *Electrochim Acta* 205:20 28;
42. Hille R., (2002); Molybdenum and tungsten in biology, *Trends Biochem. Sci.* 27, 360.
43. Ibrahim, M. S. (2001) Voltammetric studies of interaction of nogalamycin antitumor drug with DNA, *Anal. Chim. Acta* 443, 63-72
44. Jeuken L. J. C., S. D. Connell, P. J. F. Henderson, R. B. Gennis, S. D. Evans, R. J. Bushby, (2006); Redox Enzymes in Tethered Membranes; *J. Am. Chem. Soc.* 128, 1711.
45. Kobayashi M., S. Shimizu, (1999), Cobalt proteins; *Eur. J. Biochem.* 261, 1.
46. Komorsky Lovric S, Lovric M (1995) Kinetic measurements of a surface confined redox reaction. *Anal Chim Acta* 305:248–255
47. Komorsky-Lovric, S. Lovric. M (2020) Staircase cyclic voltammetry of electrocatalytic reaction inhibited by the product, *J. Solid State Electrochem.* 24, 2717-2721.
48. Korac, J., Stankovic, D. M., Stanic, M., Bajuk-Bogdanovic, D., Zizic, M., Bogdanovic, J., Pristov, Grguric-Sipka, S., Popovic-Bijelic, A., Spasojevic, I. (2018) Coordinate and redox interaction of epinephrine with ferric and ferrous ion at physiological pH, *Sci. Reports* 8, doi:10.1038/s41598-018-21940-7
49. Léger C., and P. Bertrand, (2008); Direct Electrochemistry of Redox Enzymes as a Tool for Mechanistic Studies, *Chem. Rev.* 108 2379, 24.

50. Leger C., S. J. Elliott, K. R. Hoke, L. J. C. Jeuken, A. K. Jones, F. A. Arsmtrong, (2003) Enzyme Electrokinetics: Using Protein Film Voltammetry to Investigate Redox Enzymes and Their Mechanisms; *Biochem.* 42, 8653
51. Lovander, M. D., Lyon, J. D., Parr, D. R., Wang, J., Parke, B., Leddy, J. (2018) Electrochemical properties of 13 vitamins: A critical review and assessment, *J. Electrochem. Soc.* 165, G18.
52. Lovric M. (1983); The theory of the EE mechanism with adsorption of the intermediate; *J. Electroanal. Chem.* 153, 1.
53. Lovric M., S. Komorsky-Lovric, (2012); Theory of Square-Wave Voltammetry of Two-Electron Reduction with the Adsorption of Intermediate; *Intern. J. Electrochem.* 596268;
54. Lovric M., (2010); Square-wave voltammetry, in *Electroanalytical Methods*, F. Scholz, Ed. Springer, Berlin, Germany, 2<sup>nd</sup> edition.
55. Lovric, M., Komorsky-Lovric, S., Scholz, F. (1997) Staircase voltammetry with finite diffusion space, *Electroanalysis*, 9, 575-577
56. Lovric. M (1995) Theory of differential staircase voltammetry, *Croat. Chem. Acta.* 68, 335-341.
57. Mirceski, V., Gulaboski, R. (2003) The surface catalytic mechanism: a comparative study with square-wave and staircase cyclic voltammetry, *J. Solid State Electrochem.* 7 (2003) 157-165.
58. Mirceski V., R. Gulaboski, I. Kuzmanovski, (1999); Mathcad-A Tool for Numerical Calculation of Square-Wave. Voltammograms; *Bull. Chem. Technol. Macedonia* 18, 57-62.
59. Mirceski, Komorsky-Lovric, S., Lovric, M (2007) Square-wave voltammetry, Theory and application (Scholz, F., editor) Springer, Berlin, Germany.
60. Molina A., J. Gonzales, (2016); Pulse voltammetry in physical electrochemistry and electroanalysis, in *Monographs in electrochemistry* (F. Scholz, ed.), Berlin Heidelberg, Springer, Germany.
61. Molina A., M. M. Moreno, C. Serna, M. Lopez-Tenes, J. Gonzalez, N. Abenza, (2007); Study of Multicenter Redox Molecules with Square Wave Voltammetry; *J. Phys. Chem. C* 111, 12446;
62. Nematollahi, D., B. Barnaji, B. F. Amani, A. (2015) Electrochemical synthesis and kinetic evaluation of electrooxidation of acetaminophen in presence of antidepressant drugs, *Iran. J. Pharm. Res.* 14, 1115-1122.



63. Nittiya S., Kao, I., Pruß, A., Georgieva, R., Bäuml, H. (2020) Riboflavin: The Health Benefits of a Forgotten Natural Vitamin, *International Journal of Molecular Sciences*. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 950; doi:10.3390/ijms21030950
64. Ozkan A., J. M. Kaufmann, P. Zuman, (2015); *Electroanalysis in biomedical and pharmaceutical sciences* (F. Scholz, editor), Springer, Berlin. Germany.
65. Perveen, F., Arshad, N., Qureshi, R., Nowsherwan, J., Sultan, A., Nosheen, B., Rafique, H. (2018) Electrochemical, spectroscopic and theoretical monitoring of anthracyclines interactions with DNA and ascorbic acid by adopting two routes: Cancer cell line studies, *Plos One*, 13, doi: [10.1371/journal.pone.0205764](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205764)
66. Petkovska, S., Gulaboski, R. (2020) Theoretical Analysis of a Surface Catalytic Mechanism Associated with Reversible Chemical Reaction Under Conditions of Cyclic Staircase Voltammetry, *Electroanalysis* 32, 992-1004
67. Petkovska, S., Gulaboski, R. (2019) Diffusional Electrochemical Catalytic (EC') Mechanism Featuring Chemical Reversibility of Regenerative Reaction-Theoretical Analysis in Cyclic Voltammetry, *Croatica Chemica Acta* 92, 495-502.
68. Powers H. J. (2003) Riboflavin (vitamin B-2) and health, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1352–1360, <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.6.1352>
69. Pradeep, K., Brahman, R., Dar, A., Pitre, K. S. (2016) Adsorptive stripping voltammetry of vitamin B1 at multi-walled carbon nano-tube paste electrode, [Arab. J. Chem.](#) 9, S1889-S1896.
70. Radi, E., Nassef, H. M., Attallah, M. I. (2015) *Anal. Meth.* 10, 4159
71. Rieger, P. H. (1993) *Electrochemistry*, 2<sup>nd</sup> Edition, Chapman Hall, New York.
72. Saito, Y., T. Kakiuchi, T. (2013) *Voltammetry: Theory, types and applications*, Nova Science Publishers, New York.
73. Saveant, J. M. (2006) *Elements of molecular and biomolecular electrochemistry*, Wiley, New Jersey, USA.
74. Savéant, J. M. (2008) Molecular catalysis of electrochemical reactions. Mechanistic aspects, *Chem. Rev.* 1008, 2348.
75. Sayiner, H. S., Bakir, T., Bandemirli, F. (2018) *Bulg. Chem. Comm.* 50, 398.
76. Sies H., L. Parker, (2004); *Quinones and quinone enzymes*, in *Methods in enzymology*, Academic Press, UK;
77. Smyth, M. R., Vos, J. G. (1992) *Analytical Voltammetry in Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, New York, USA.

78. Stratmann, M., Wilson, G. S. (2002) Encyclopedia of Electrochemistry, vol. 9, Wiley VCH, Weinheim, Germany.
79. Suwannasom, N., Kao, I., Pruß, A., Georgieva, R. (2020) Bäumlér, H. Riboflavin: The Health Benefits of a Forgotten Natural Vitamin, International Journal of Molecular Sciences. Int. J. Mol. Sci. 21, 950; doi:10.3390/ijms21030950
80. Trindade, M. A. G., Cunha, P. A. C., de Araújo, T. A., da Silva, G. M., Ferreira, V. S. (2006) [Eclética Química](#) 31, dx.doi.org/10.1590/S0100-46702006000100004
81. Qin, D-A., Cai, X-Q., Miao, Q., Wang, Z-H., Hu, M-L. (2014) Cyclic voltammetry and molecular docking study of the interactions of two 5-fluorouracil derivatives with DNA, Int. J. Electrochem. Sci., 9, 1608-1620.
82. Wang, X., Sun, L., Zou, N., Yu, Z. (2015) Electrochemical study on the interactions between dopamine and DNA using glassy carbon electrode modified with silver doped poly cysteine membrane, Int. J. Electrochem. Sci., 10, 7320-7330
83. Wijma H. J., L. J. C. Jeuken, M. Ph. Verbeet, F. A. Armstrong, G. W. Canters, (2007); Protein Film Voltammetry of Copper-Containing Nitrite Reductase Reveals Reversible Inactivation; J. Am. Chem. Soc. 129, 8557.
84. Милкица Јанева (2022) Примена на електродните механизми на површинско активни системи во аналитика на лекови-теоретска и експериментална студија во услови на квадратно-бранова волтаметрија, Докторска дисертација, УГД Штип.
85. Рубин Гулабоски, Викторија Максимова, Виолета Иванова Петропулос (2019) Инструментални фармацевтски анализи [Електронски извор]: учебник, Штип Универзитет "Гоце Делчев", Факултет за медицински науки.

# ДОПОЛНИТЕЛЕН МАТЕРИЈАЛ

## MATHCAD files

Дифузионен електрохемиски регенеративен механизам (EC' rev) поврзан со иреверзибилна хемиска регенеративна реакција  
 Симулациски фајл во услови на циклична скалеста воламетрија

Cyclic staircase voltammetry

DIFFUSIONAL CATALYTIC MECHANISM in CYCLIC VOLTAMMETRY

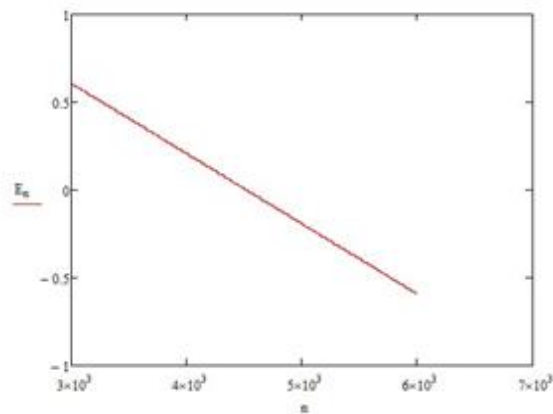
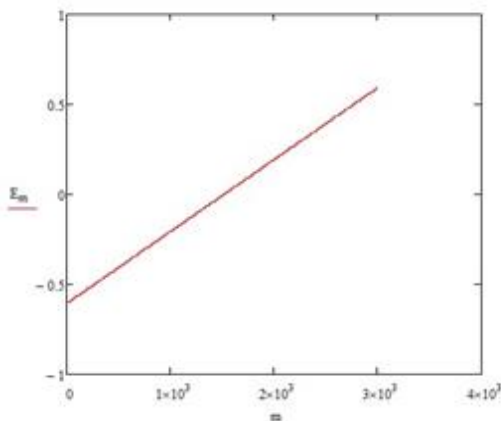
$$E_s = -0.6 \quad E_f = 0.6 \quad \Delta E = E_f - E_s \quad dE = 0.01 \quad \tau = 0.05 \quad d = \frac{\tau}{25} \quad \lambda = 1 \cdot \frac{\tau}{d}$$

$$m = \frac{\tau}{d} + 1 \cdot \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 + \frac{\tau}{d} \quad n = \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 + \frac{\tau}{d} + 1 \cdot \left( \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 \cdot 2 + \frac{\tau}{d} \right) \quad \frac{\Delta E}{dE} = 120$$

$$E_m = E_s + \left( \text{cell} \left[ \frac{m - \frac{\tau}{d}}{25} \right] \cdot dE - dE \right)$$

$$E_n = E_f - \left( \text{cell} \left[ \frac{n - \left( \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 + \frac{\tau}{d} \right)}{25} \right] \cdot dE - dE \right) \quad \frac{25}{0.04} = 625 \quad \frac{dE}{\tau} = 0.2 \quad \frac{dE}{\tau} = 0.2$$

$\lambda$  is dimensionless kinetic parameter related to electrode reaction  
 $z$  is dimensionless catalytic parameter related to regenerative reactions  
 $\alpha$  is electron transfer coefficient  
 $E_s$  is starting potential  
 $E_f$  is final potential  
 $dE$  is potential step  
 $\Psi$  is symbol for dimensionless current  
 $E_m$  is cathodic potential ramp in cyclic voltammetry  
 $E_n$  is anodic potential ramp  
 $Sk$  is integration factor  
 $\tau$  is duration of potential steps  
 $D$  is diffusion coefficient of Ox and Red



$$\Delta_s = 0.28 \quad \text{cox} = 0.0000008$$

$$k_s = 0.0245 \quad D = 5 \cdot 10^{-6}$$

$$\lambda = \frac{k_s \sqrt{\tau}}{\sqrt{D}} \quad \alpha = 0.5$$

$$\lambda = 2.45 \quad \log(\lambda) = 0.389 \quad k_c = 10^{-1.15}$$

kc-konstanta na kataliza

$$z = (k_c \cdot \tau)$$

$$F = 96500 \quad e1 = 1 \quad R = 8.314 \quad T = 298.15$$

$$\Phi_m = e1 \cdot \frac{F}{R \cdot T} (E_m) \quad b_n = e1 \cdot \frac{F}{R \cdot T} (E_n)$$

$$\Phi_{ac} = e1 \cdot \frac{F}{R \cdot T} E_s$$

$$z = 3.54 \times 10^{-3}$$

$$\frac{\lambda}{z} = 692.143$$

$$\log(z) = -2.451$$

$$\frac{z}{\lambda} = 1.445 \times 10^{-3}$$

$$k = 1.2 \left( \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 + \frac{\tau}{d} \right)$$

$$\Delta_{kc} = \text{erf}(\sqrt{z} \cdot \sqrt{k}) - \text{erf}(\sqrt{z} \cdot \sqrt{k-1})$$

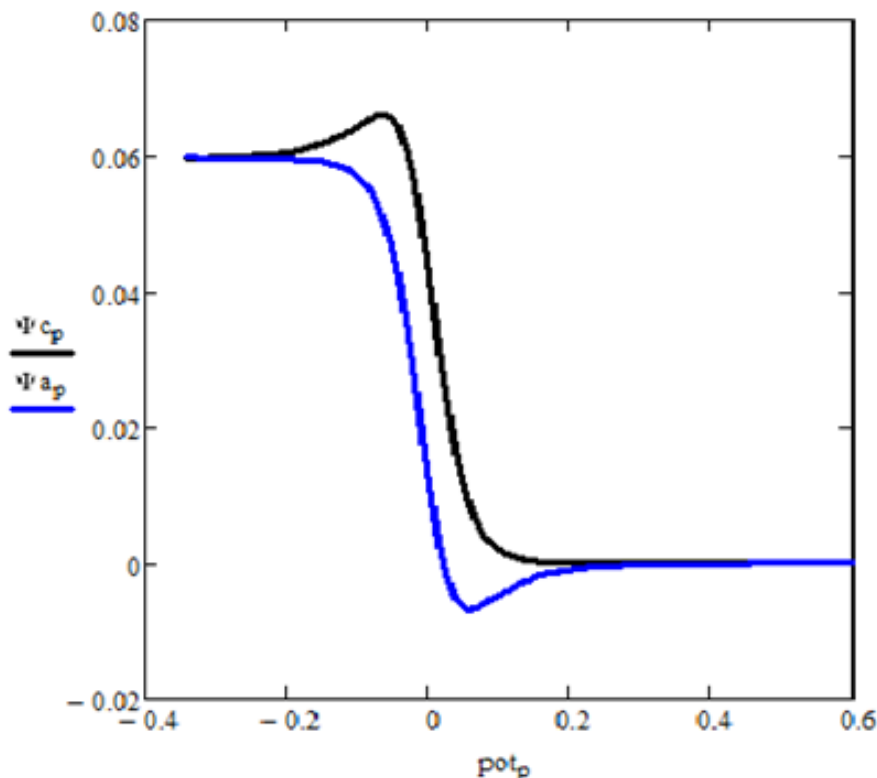
$$\Psi_1 := \lambda \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_1} \cdot \left[ 1 + \frac{\lambda \cdot S_1}{\sqrt{z}} + \frac{e^{(1-\alpha) \cdot \Phi_1 \cdot S_1}}{\sqrt{z}} \right]^{-1}$$

$$\Psi_s := \frac{\lambda \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_{ac}} - \frac{\lambda \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_{ac}}}{\sqrt{z}} \cdot \sum_{j=1}^{s-1} (\Psi_j \cdot S_{s-j+1}) - e^{\Phi_{ac} \cdot (1-\alpha)} \cdot \lambda \cdot \frac{1}{\sqrt{z}} \cdot \sum_{j=1}^{s-1} (\Psi_j \cdot S_{s-j+1})}{1 + \frac{\lambda \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_{ac}} \cdot S_1}{\sqrt{z}} + \frac{\lambda \cdot e^{(1-\alpha) \cdot \Phi_{ac}} \cdot S_1}{\sqrt{z}}}$$

$$\Psi_m := \frac{\lambda \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_m} - \frac{\lambda \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_m}}{\sqrt{z}} \cdot \sum_{j=1}^{m-1} (\Psi_j \cdot S_{m-j+1}) - e^{\Phi_m \cdot (1-\alpha)} \cdot \lambda \cdot \frac{1}{\sqrt{z}} \cdot \sum_{j=1}^{m-1} (\Psi_j \cdot S_{m-j+1})}{1 + \frac{\lambda \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_m} \cdot S_1}{\sqrt{z}} + \frac{\lambda \cdot e^{(1-\alpha) \cdot \Phi_m} \cdot S_1}{\sqrt{z}}}$$

$$\Psi_n := \frac{\lambda \cdot e^{-\alpha \cdot b_n} - \frac{\lambda \cdot e^{-\alpha \cdot b_n}}{\sqrt{z}} \cdot \sum_{j=1}^{n-1} (\Psi_j \cdot S_{n-j+1}) - e^{b_n \cdot (1-\alpha)} \cdot \lambda \cdot \frac{1}{\sqrt{z}} \cdot \sum_{j=1}^{n-1} (\Psi_j \cdot S_{n-j+1})}{1 + \frac{\lambda \cdot e^{-\alpha \cdot b_n} \cdot S_1}{\sqrt{z}} + \frac{\lambda \cdot e^{(1-\alpha) \cdot b_n} \cdot S_1}{\sqrt{z}}}$$

$$p := 26 \cdot \frac{\Delta E}{dE} \quad \Psi_{a_p} := (\Psi) \left( \frac{\tau}{d \cdot 25} + p \right) \cdot 25 \quad \Psi_{c_p} := (\Psi) \left[ \left[ \frac{\Delta E}{dE} \cdot 2 + \left( \frac{\tau}{25 \cdot d} \right) \right] - p \right] \cdot 25 \quad \text{pot}_p := Es + p \cdot dE$$



# ДОПОЛНИТЕЛЕН МАТЕРИЈАЛ (ЕЛЕКТРОДЕН МЕХАНИЗАМ Б)

MATCAD file за

Површински електрохемиски регенеративен механизам (EC'rev) поврзан со иреверзибилна хемиска регенеративна реакција-Симулациски фајл во услови на циклична скалеста воламетрија

$$\begin{aligned}
 & \text{tac} = 0.01 \\
 & E_s = -0.6 \quad E_f = 0.6 \quad \Delta E = E_f - E_s \quad dE = 0.01 \quad \tau = 0.01 \quad d = \frac{\tau}{25} \quad \lambda = 1 \cdot \frac{\text{tac}}{d} \\
 & m = \frac{\text{tac}}{d} + 1 \cdot \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 + \frac{\text{tac}}{d} \quad n = \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 + \frac{\text{tac}}{d} + 1 \cdot \left( \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 \cdot 2 + \frac{\text{tac}}{d} \right) \quad \frac{\Delta E}{dE} = 120 \\
 & E_m = E_s + \left( \text{ceil} \left( \frac{m - \text{tac}}{25} \right) \cdot dE - dE \right) \\
 & E_n = E_f - \left[ \text{ceil} \left( \frac{n - \left( \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 + \frac{\text{tac}}{d} \right)}{25} \right) \cdot dE - dE \right] \quad \frac{25}{0.04} = 625 \quad \frac{dE}{\tau} = 1 \\
 & \alpha = 0.5 \\
 & F = 96500 \quad U = 8.314 \quad T = 298.15 \\
 & \lambda = .32 \quad \gamma = 00.0000000092 \\
 & k = 1.2 \cdot \left( \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 + \frac{\text{tac}}{d} \right) \\
 & M_k = e^{-\frac{\gamma}{25} \cdot (k-1)} - e^{-\frac{\gamma}{25} \cdot k}
 \end{aligned}$$

SURFACE CATALYTIC MECHANISM EC' in CYCLIC VOLTAMMETRY

$$\phi_m = \frac{eI}{U-T} E_m \quad \phi_n = \frac{eI}{U-T} E_n \quad \phi_{ac} = \frac{eI}{U-T} E_s$$

$$\begin{aligned}
 \psi_1 &= \frac{\lambda e^{-\alpha \phi_1}}{1 + \lambda e^{-\alpha \phi_1} (1 + e^{\phi_1})} \frac{M_1}{\gamma} \\
 \psi_s &= \frac{\lambda e^{-\alpha \phi_s} \left[ 1 - \frac{1 + e^{\phi_s}}{\gamma} \sum_{j=1}^{\phi_s} (\psi_j \cdot M_{s-j+1}) \right]}{1 + \lambda e^{-\alpha \phi_s} (1 + e^{\phi_s})} \frac{M_1}{\gamma} \\
 \psi_m &= \frac{\lambda e^{-\alpha \phi_m} \left[ 1 - \frac{1 + e^{\phi_m}}{\gamma} \sum_{j=1}^{\phi_m} (\psi_j \cdot M_{m-j+1}) \right]}{1 + \lambda e^{-\alpha \phi_m} (1 + e^{\phi_m})} \frac{M_1}{\gamma}
 \end{aligned}$$

Katalitcka povrainska reakcija

$$\psi_n = \frac{\lambda e^{-\alpha \phi_n} \left[ 1 - \frac{1 + e^{\phi_n}}{\gamma} \sum_{j=1}^{\phi_n} (\psi_j \cdot M_{n-j+1}) \right]}{1 + \lambda e^{-\alpha \phi_n} (1 + e^{\phi_n})} \frac{M_1}{\gamma}$$

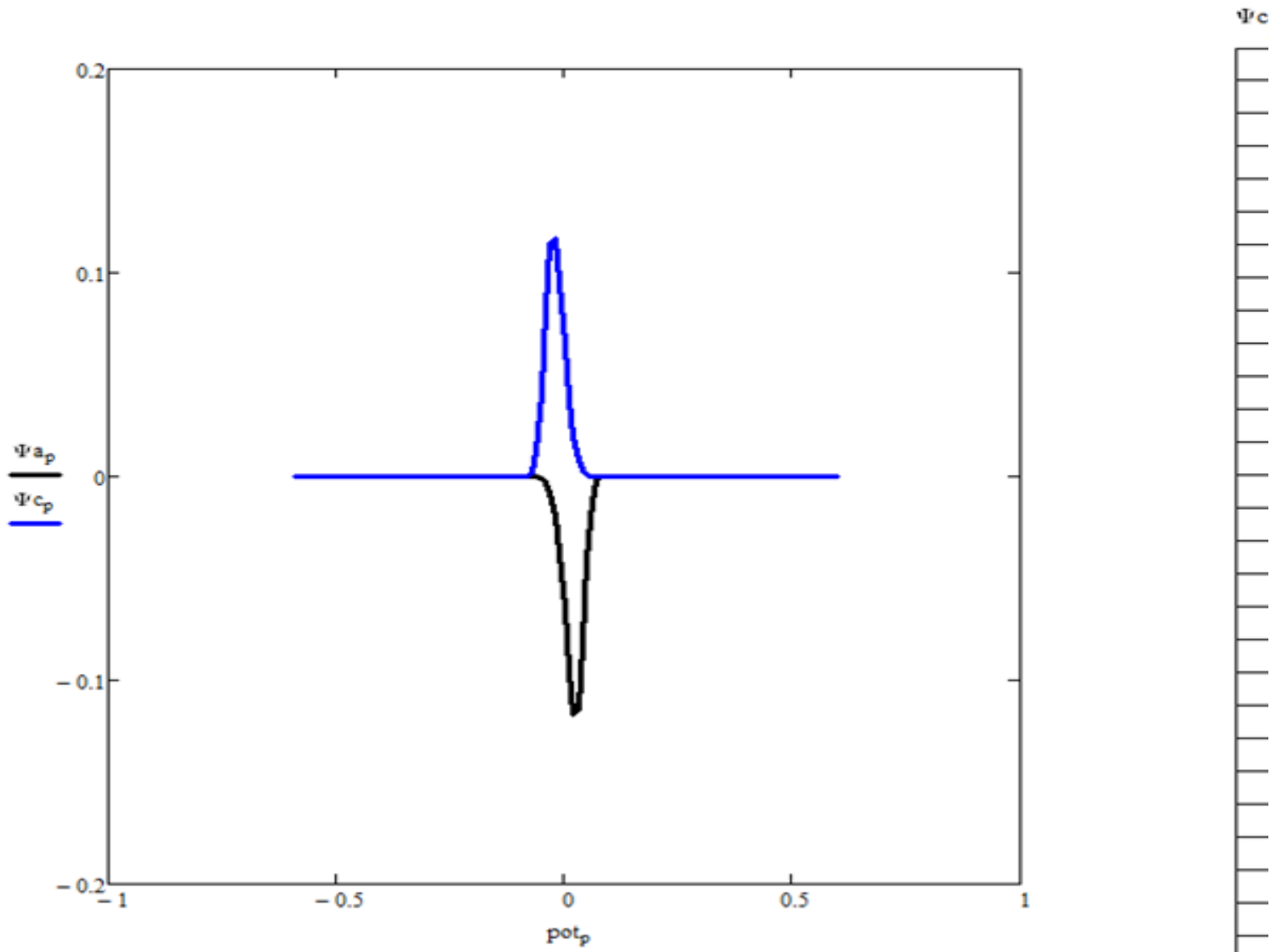
$\lambda$  is dimensionless kinetic parameter related to electrode reaction  
 $\gamma$  is dimensionless catalytic parameter related to regenerative reactions  
 $\alpha$  is electron transfer coefficient  
 $E_s$  is starting potential  
 $E_f$  is final potential  
 $dE$  is potential step  
 $\Psi$  is symbol for dimensionless current  
 $E_m$  is cathodic potential ramp in cyclic voltammetry  
 $E_n$  is anodic potential ramp  
 $M_k$  is integration factor

$$p := 1 \cdot \frac{\Delta E}{dE}$$

$$\Psi_{a_p} := (\Psi) \left( \frac{\tau}{d \cdot 25} + p \right) \cdot 25$$

$$\Psi_{c_p} := (\Psi) \left[ \left[ \frac{\Delta E}{dE} \cdot 2 + \left( \frac{\tau}{25 \cdot d} \right) \right] - p \right] \cdot 25$$

$$\text{pot}_p := E_s + p \cdot dE$$



## ДОПОЛНИТЕЛЕН МАТЕРИЈАЛ (ЕЛЕКТРОДЕН МЕХАНИЗАМ В)

MATNCAD file-

Дифузионен електрохемиски регенеративен механизам (EC'rev) поврзан со реверзибилна хемиска регенеративна реакција-Симулациски фајл во услови на циклична скалеста воламетрија

$$\tau_{ac} = 0.01 \quad \tau = 0.01 \quad D = 0.000005$$

$$el = 2 \quad \alpha = 0.5 \quad k_s = 0.002 \quad k_c = 10000 \quad d = \frac{\tau}{25}$$

$$E_s = -0.4 \quad E_f = 0.4 \quad \Delta E = E_f - E_s \quad dE = 0.004 \quad s = 1 \cdot \frac{\tau_{ac}}{d}$$

$$m = \frac{\tau}{d} + 1 \cdot \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 + \frac{\tau}{d} \quad n = \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 + \frac{\tau}{d} + 1 \cdot \left( \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 \cdot 2 + \frac{\tau}{d} \right)$$

$$E_m = E_s + \left( \text{ceil} \left( \frac{m - \frac{\tau}{d}}{25} \right) \cdot dE - dE \right) \quad k = 1 \cdot 2 \cdot \left( \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 + \frac{\tau}{d} \right)$$

$$E_n = E_f - \left[ \text{ceil} \left( \frac{n - \left( \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 + \frac{\tau}{d} \right)}{25} \right) \cdot dE - dE \right]$$

$$\frac{R}{\text{mol}} = 8.314 \quad F_{\text{mol}} = 96500 \quad T = 298$$

$$\phi_{ac} = \frac{el \cdot F}{R \cdot T} E_f \quad \phi_{\text{rev}} = \frac{el \cdot F}{R \cdot T} E_m \quad \phi_n = \frac{el \cdot F}{R \cdot T} E_n \quad S_{ik} = \text{erf} \left( \frac{\sqrt{K_{\text{catalytic}}} \cdot \sqrt{k}}{\sqrt{50}} \right) - \text{erf} \left( \frac{\sqrt{K_{\text{catalytic}}} \cdot \sqrt{k-1}}{\sqrt{50}} \right)$$

$$\Psi_s = \frac{K_{ET} \cdot e^{-\alpha \cdot \phi_{ac}}}{1 + K_{ET} \cdot e^{-\alpha \cdot \phi_{ac}} \cdot \left( 1 + e^{\phi_{ac}} \right) \frac{S_i \cdot K_{eq}}{K_{\text{catalytic}} \cdot (1 + K_{eq}) \cdot 25} + K_{ET} \cdot e^{-\alpha \cdot \phi_{ac}} \cdot \left( 1 + e^{\phi_{ac}} \right) \frac{S_i \cdot 1}{25 \cdot (1 + K_{eq})}}$$

EC catalytic mechanism with reversible regenerative reaction

### Symbols and abbreviations

KET-is dimensionless kinetic parameter of electron transfer

$k_s$  -is standard rate constant of electron transfer

$k_c$  - is rate constant of catalytic reaction

$K_{eq}$  - is equilibrium constant of regenerative chemical reaction

$K_{\text{catalytic}}$  - is dimensionless catalytic parameter

$D$  - is diffusion coefficient

$\alpha$  - is electron transfer coefficient

$el$  - is number of electrons

$\tau$  - is time frame of potential steps in cyclic staircase voltammetry

$d$  - is the time increment

$dE$  - is potential step height

$E_s$  - is starting potential

$E_f$  - is final potential

$E_m$  and  $E_n$  are potential ramps of cathodic and anodic scan, respectively

$R$  - is gas constant

$T$  - is thermodynamic temperature

$\phi_m$ ,  $\phi_{ac}$  and  $\phi_n$  are dimensionless potentials

$\Psi$  is dimensionless current

$S_k$  is numerical integration factor

$\Delta E$  is potential frame

$\Psi_c$  is cathodic current

$\Psi_a$  is anodic current

$$\Psi_m := \frac{KET \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_m} \left[ 1 - \frac{(1 + e^{\Phi_m}) \cdot Keq}{Kcatalytic \cdot (1 + Keq) \cdot 25} \cdot \sum_{j=1}^{m-1} (\Psi_j \cdot S_{m-j+1}) - \frac{(1 + e^{\Phi_m}) \cdot 1}{25 \cdot (1 + Keq)} \cdot \sum_{j=1}^{m-1} (\Psi_j \cdot S_{m-j+1}) \right]}{1 + KET \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_m} \cdot (1 + e^{\Phi_m}) \cdot \frac{S_1 \cdot Keq}{Kcatalytic \cdot (1 + Keq) \cdot 25} + KET \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_m} \cdot (1 + e^{\Phi_m}) \cdot \frac{S_1 \cdot 1}{25 \cdot (1 + Keq)}}$$

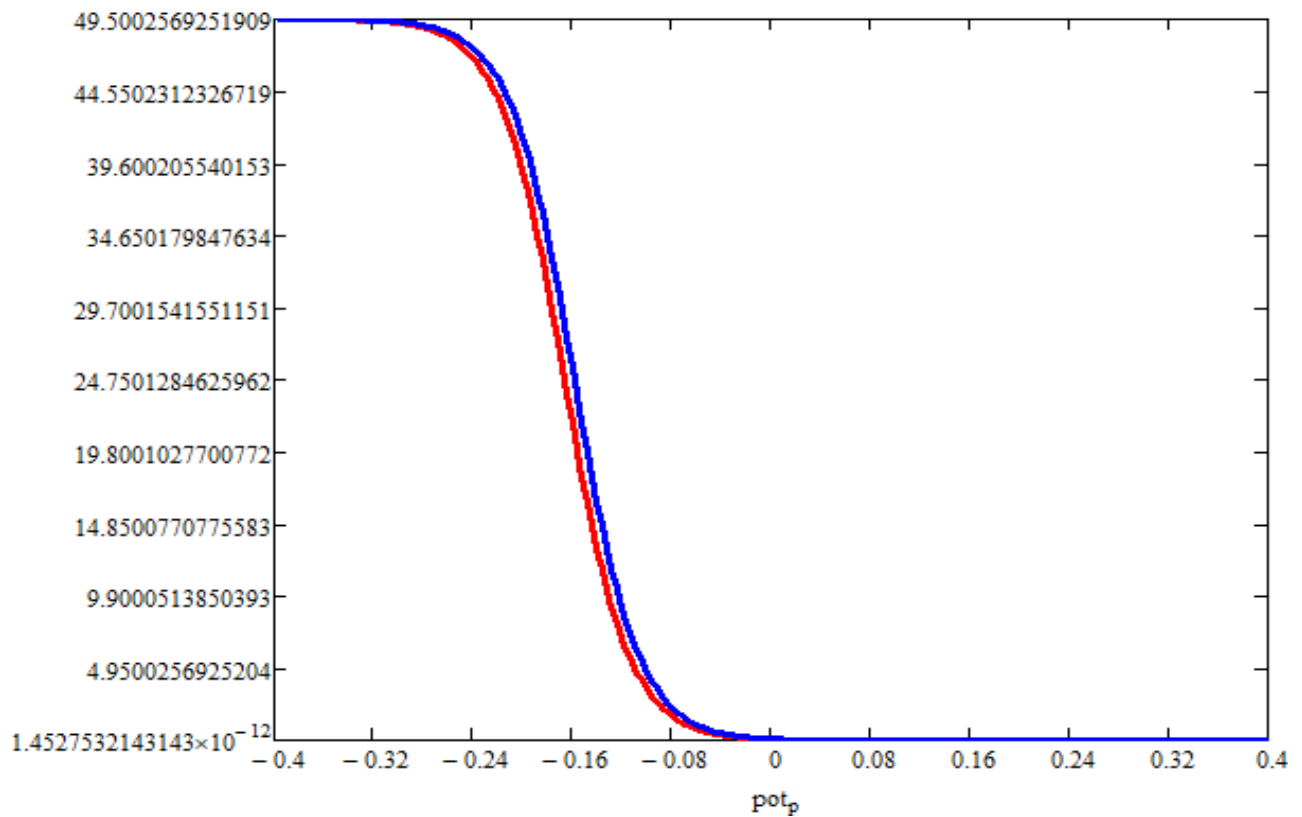
$$\Psi_n := \frac{KET \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_n} \left[ 1 - \frac{(1 + e^{\Phi_n}) \cdot Keq}{Kcatalytic \cdot (1 + Keq) \cdot 25} \cdot \sum_{j=1}^{n-1} (\Psi_j \cdot S_{n-j+1}) - \frac{(1 + e^{\Phi_n}) \cdot 1}{25 \cdot (1 + Keq)} \cdot \sum_{j=1}^{n-1} (\Psi_j \cdot S_{n-j+1}) \right]}{1 + KET \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_n} \cdot (1 + e^{\Phi_n}) \cdot \frac{S_1 \cdot Keq}{Kcatalytic \cdot (1 + Keq) \cdot 25} + KET \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_n} \cdot (1 + e^{\Phi_n}) \cdot \frac{S_1 \cdot 1}{25 \cdot (1 + Keq)}}$$

$$p := 1 \cdot \frac{\Delta E}{dE}$$

$$\Psi_{a_p} := (\Psi) \left( \frac{\tau}{d \cdot 25} + p \right) \cdot 25$$

$$pot_p := Es + p \cdot dE$$

$$\Psi_{c_p} := (\Psi) \left[ \left[ \frac{\Delta E}{dE} \cdot 2 + \left( \frac{\tau}{25 \cdot d} \right) \right] - p \right] \cdot 25$$





## ДОПОЛНИТЕЛЕН МАТЕРИЈАЛ (ЕЛЕКТРОДЕН МЕХАНИЗАМ Г)

MATHCAD file-

Површински електрохемиски регенеративен механизам (EC'rev) поврзан со реверзибилна хемиска регенеративна реакција-Симулациски фајл во услови на циклична скалеста воламетрија

Mathcad - [CYCLIC-surf catalys-ECrevers-sept 2019 OK]

File Edit View Insert Format Tools Symbolics Window Help

Normal Arial 14

My Site

$t_{ac} := 0.0001$   $\tau := 0.0005$   
 $e_l := 2$   $\alpha := 0.5$   $d := \frac{t_{ac}}{25}$   
 $E_s := -0.6$   $E_f := 0.4$   $\Delta E := E_f - E_s$   $dE := 0.004$   $\xi := 1 - \frac{t_{ac}}{d}$   
 $m := \frac{\tau}{d} + 1 - \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 + \frac{\tau}{d}$   $n := \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 + \frac{\tau}{d} + 1 - \left( \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 \cdot 2 + \frac{\tau}{d} \right)$   
 $E_m := E_s + \left( \text{ceil} \left( \frac{m - \frac{\tau}{d}}{25} \right) \cdot dE - dE \right)$   $k := 1.2 \cdot \left( \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 + \frac{\tau}{d} \right)$   
 $E_n := E_f - \left[ \text{ceil} \left[ \frac{n - \left( \frac{\Delta E}{dE} \cdot 25 + \frac{\tau}{d} \right)}{25} \right] \cdot dE - dE \right]$   
 $R_{gas} := 8.314$   $F_{Far} := 96500$   
 $T := 298$   
 $\Phi_{ac} := \frac{e_l F}{R \cdot T} E_s$   $\Phi_{em} := \frac{e_l F}{R \cdot T} E_m$   $\Phi_n := \frac{e_l F}{R \cdot T} E_n$   
 $\Psi_s := \frac{KET \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_{ac}}}{1 + KET \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_{ac}} \cdot (1 + e^{\Phi_{ac}}) \cdot \frac{S_1 \cdot K_{eq}}{\gamma \cdot (1 + K_{eq}) \cdot 25} + KET \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_{ac}} \cdot (1 + e^{\Phi_{ac}}) \cdot \frac{S_1 \cdot 1}{25 \cdot (1 + K_{eq})}}$   
 $\Psi_m := \frac{KET \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_m} \left[ 1 - \frac{(1 + e^{\Phi_m}) \cdot K_{eq}}{K_{catalytic} \cdot (1 + K_{eq}) \cdot 25} \sum_{j=1}^{m-1} (\Psi_j \cdot S_{m-j+1}) - \frac{(1 + e^{\Phi_m}) \cdot 1}{25 \cdot (1 + K_{eq})} \sum_{j=1}^{m-1} (\Psi_j \cdot S_{m-j+1}) \right]}{1 + KET \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_m} \cdot (1 + e^{\Phi_m}) \cdot \frac{S_1 \cdot K_{eq}}{K_{catalytic} \cdot (1 + K_{eq}) \cdot 25} + KET \cdot e^{-\alpha \cdot \Phi_m} \cdot (1 + e^{\Phi_m}) \cdot \frac{S_1 \cdot 1}{25 \cdot (1 + K_{eq})}}$

$k_s := 1000$   
 $KET := k_s \cdot \tau$   
 $K_{eq} := 1$   
 $K_{eq} := 10.00$   
 $K_{catalytic} := 10^{-1.250}$

**SURFACE CATALYTIC ECrev mechanism**  
 $K_{eq}$  - equilibrium constant of catalytic reversible chemical reaction  
 $K_{catalytic}$  - dimensionless rate parameter of regenerartive (catalytic) reaction  
 $KET$  - dimensionless rate parameter of electron transfer step  
 $\tau$  - duration of potential step  
 $e_l$  - number of electrons  
 $dE$  - potential step height  
 $\alpha$  - electron transfer coefficient  
 $S$  - numerical integration parameter  
 $\Phi$  - dimensionless potential  
 $E_m$  - cathodic potential ramp  
 $E_n$  - anodic potential ramp  
 $\Psi_m$  - cathodic dimensionless currents  
 $\Psi_n$  - anodic dimensionless currents  
 $k_s$  - standard rate constant of electrn transfer  
 $R$  - gas constant  
 $T$  - temperature  
 $F$  - Faraday constant

Press F1 for help. AUTO Page 1

EN 13:54 08.10.2019

**РЕЦЕНЗИРАНИ И ОБЈАВЕНИ ТРУДОВИ (СТРУЧНИ, НАУЧНИ И АПЛИКАТИВНИ) ПРОИЗЛЕЗЕНИ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО, ПЕЧАТЕНИ ВО МЕЃУНАРОДНИ СПИСАНИЈА СО ФАКТОР НА ВЛИЈАНИЕ (ИМПАКТ ФАКТОР)**

1. **S. Petkovska**, R. Gulaboski, "Theoretical Analysis of a Surface Catalytic Mechanism Associated with Reversible Chemical Reaction Under Conditions of Cyclic Staircase Voltammetry", *Electroanalysis* 32 (2020) 992-1004 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elan.201900698> (Impact Factor = 3.223)
2. **Sofija Petkovska**, Rubin Gulaboski, "Diffusional Electrochemical Catalytic (EC') Mechanism Featuring Chemical Reversibility of Regenerative Reaction-Theoretical Analysis in Cyclic Voltammetry", *Croatica Chemica Acta* 92 (4) (2019) 495-502. (Impact Factor = 0.83)
3. Rubin Gulaboski, Pavlinka Kokoskarova, **Sofija Petkovska**, "Analysis of drug-drug interactions with cyclic voltammetry-an overview of relevant theoretical models and recent experimental achievements" *Analytical&Bioanalytical Electrochemistry* 12 (2020) 345-364. (Impact Factor = 1.48)
4. Rubin 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. (Impact Factor = 0.83)
5. Gulaboski, R. **Petkovska, S.** A time-independent approach to evaluate the kinetics of enzyme-substrate reactions in cyclic staircase voltammetry, *Analytical&Bioanalytical Electrochemistry* 10 (2018) 566-575; (Impact Factor = 1.48)

## УЧЕСТВО НА СТРУЧНИ КОНГРЕСИ И СИМПОЗИУМИ

1. Janeva Milkica, **Petkovska Sofija**, Ristova Angela, Maksimova Viktorija, and Gulaboski Rubin (2018) *Ембелин – моќен природен антиоксидант и транспортер на калциумови јони*. in: Прв конгрес на студенти по општа медицина, 09-10 May 2018, Stip, Macedonia.

2. **Petkovska Sofija**, Janeva Milkica, Maksimova Viktorija and Gulaboski Rubin, Нова волтаметриска метода за определување на Michaelis-Menten кинетичката константа на ензимско-супстратните реакции во протеин-филм волтаметрија, in: Прв конгрес на студенти по општа медицина, 09-10 May 2018, Stip, Macedonia.