



European Regional Development Found, POIG Programme:
MNS-DIAG “Micro- and Nano- Systems for Chemistry
and Biomedical Diagnostics” (POIG.01.03.01-00-014/08-02)



PART I:

Electrochemical detection of tricyclic antidepressants and saliva sample collection and pretreatment

BEATA ROZUM, M. DAWGUL, D. G. PIJANOWSKA

Nałęcz Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering, Polish Academy of Sciences

„Micro- and nano- systems technology for modern industrial applications”
Warsaw, 20-21.02.2013



COLLABORATION

MNS-DIAG, Subproject 1., Part A, POIG.01.03.01-00-014/08-02
Lab-on-a-chip with electrochemical detection for psychoactive substances
analysis in saliva samples (E-LoC)

**Nałęcz Institute of
Biocybernetics and
Biomedical Engineering, PAS**

Prof. D.G. Pijanowska

B. Rozum (Ph.D.)
K. Dudziński (Ph.D.)
M. Dawgul (Ph.D.)

M. Filipiak (student)
R. Darlak (student)



**Faculty of Chemistry,
Jagiellonian University**

Prof. P. Koscielniak

h.D)
łuszný (Ph.D)
cz (Ph.D)

Institute of Electron Technology

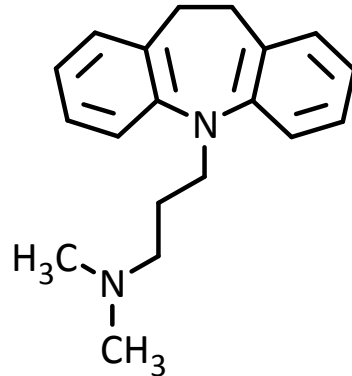


P. Knihnicki (M.Sc.)
A. Moos (M.Sc.)

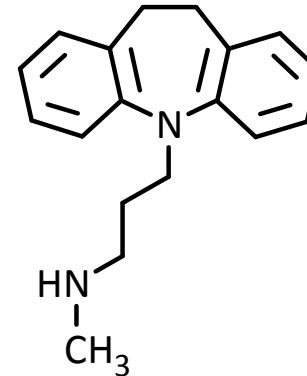
J. Nowak (student)



ANALYTES - Tricyclic antidepressant drugs (TCAs)



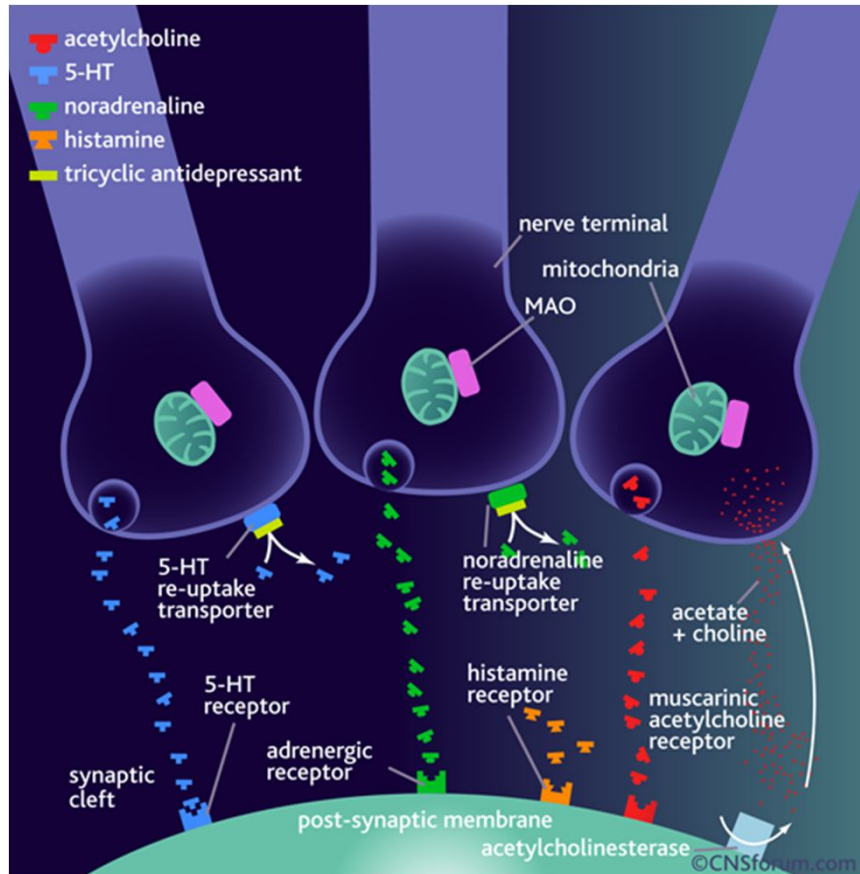
IMIPRAMINE (IMI)



DESIPRAMINE (DES)

- ✓ Structure contains three rings of atoms
- ✓ First trial of Tofranil in 1955 in Münsterlingen Hospital in Switzerland
- ✓ Applied for affective or 'mood' disorders treat (depression, neurosis, etc.)
- ✓ Drug realisation is cytochrome P450 dependent, controlled genetically, by external factors (other drugs and substances) and individually (age, race, health status)

ANALYTES - Tricyclic antidepressant drugs (TCAs)



- ✓ Re-uptake of biogenic amines (mainly: noradrenaline, serotonin) blocking.
- ✓ Some TCAs can block reuptake of dopamine as well
- ✓ Operate with muscarine, serotonergic (5HT1 & 5HT2) and histamine receptors

http://www.cnsforum.com/imagebank/item/Drug_TCA_efficacy/default.aspx
European Neuropsychopharmacology, 16 (2006) S625–S632

ANALYTES - Tricyclic antidepressant drugs (TCAs)

- ✓ Not classified as addictive drugs, but some discontinuation syndrome symptoms can be observed
 - ✓ Side-effects mainly related to the antimuscarinic properties of TCAs
 - ✓ Strong amplification of side-effects especially while TCAs are overdosed
- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> dry mouth and nose, | <input type="checkbox"/> drowsiness, |
| <input type="checkbox"/> blurry vision, | <input type="checkbox"/> emotional blunting (apathy/anhedonia), |
| <input type="checkbox"/> lowered gastrointestinal motility
or constipation, | <input type="checkbox"/> confusion, |
| <input type="checkbox"/> urinary retention, | <input type="checkbox"/> restlessness and weakness, |
| <input type="checkbox"/> cognitive/memory impairment, | <input type="checkbox"/> dizziness, |
| <input type="checkbox"/> increased body temperature, | <input type="checkbox"/> hypersensitivity, |
| <input type="checkbox"/> changes in appetite and weight, | <input type="checkbox"/> muscle twitches, |
| <input type="checkbox"/> sweating, | <input type="checkbox"/> hypotension, |
| <input type="checkbox"/> sexual dysfunction, | <input type="checkbox"/> tachycardia, |
| <input type="checkbox"/> nausea and vomiting, | <input type="checkbox"/> irregular heart rhythms, |
| <input type="checkbox"/> anxiety. | <input type="checkbox"/> hallucinations, |
| | <input type="checkbox"/> delirium and coma. |

TACs DETERMINATION METHODS

✓ Separation by:

☐ Chromatography

☐ Electrophoresis



✓ Detection by:

☐ Spectrophotometry

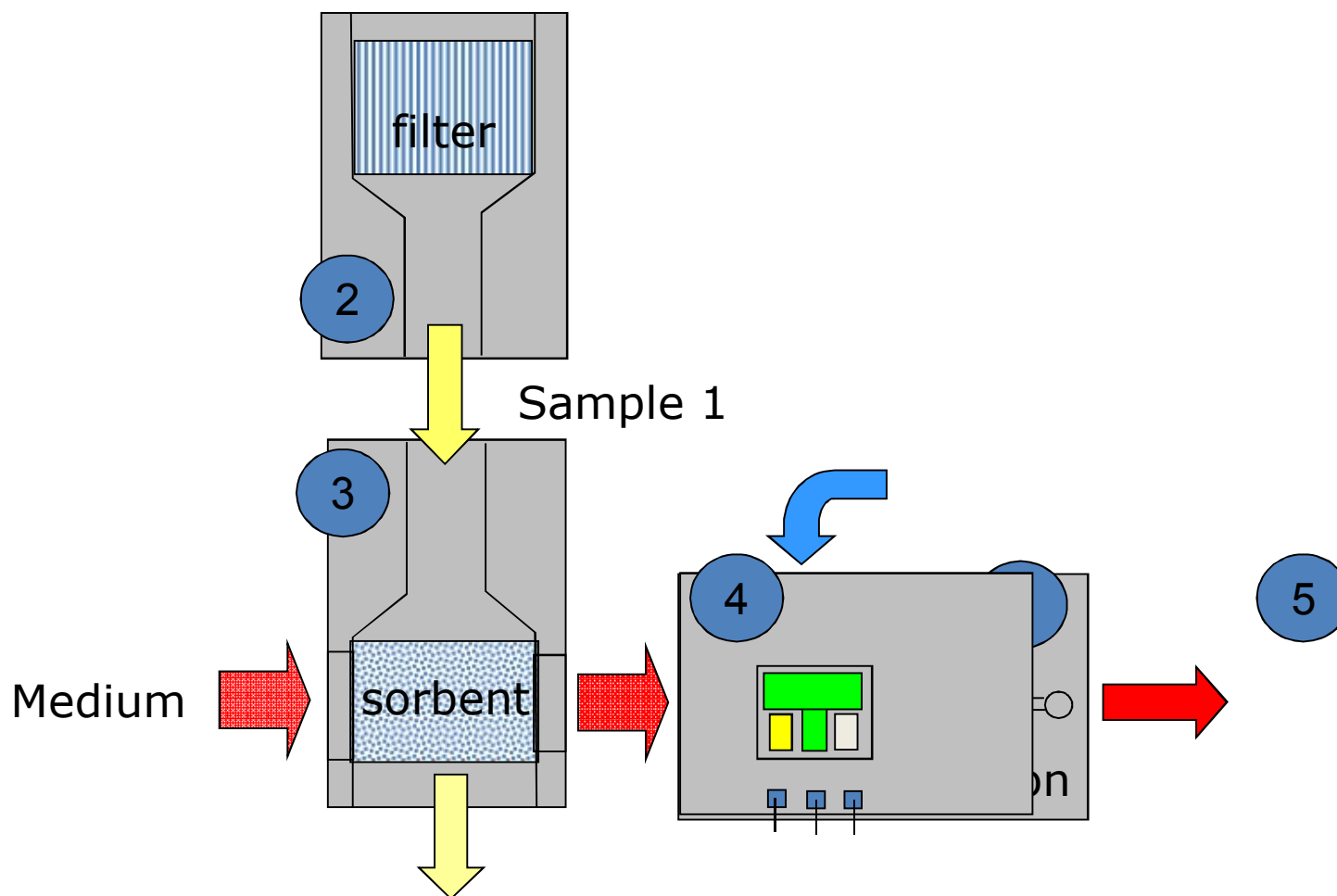
☐ Electrochemical

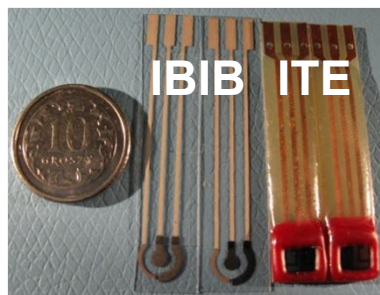


APPROACH

- ✓ Design and fabrication lab-on-a-chip with amperometric electrodes for detection of psychotropic drugs content in saliva (oral fluid).

Sample 0





WORKING ELECTRODE MATERIAL

Electrode	pH	E working range [V]	Ep range [mV]	Linear range of conc. [μM]	Sensitivity [$\text{nA}/\mu\text{M}$]	R^2
SP graphite	2	0.0 – 1.2	835 – 850	1 – 100	23	0.9819
	5		770 – 870	1 – 25	68	0.8454
	7		870 – 785	1 – 25	86	0.9257
SP carbon	2	0.0 – 1.2	855 – 895	1 – 100	15	0.9871
	5		805 – 910	1 – 25	59	0.9806
	7		750 – 855	1 – 25	88	0,9789
Platinum	2	0.0 – 1.1	–	–	–	–
	5		–	–	–	–
	7		800 – 870	5 – 75	9	0.8884
Gold	2	0.0 – 0.8	730	10 – 2000	284	0.9857
	5		400	10 – 200	433	0.8800
	7		520	5 – 200	603	0.9064

GOLD THIN-FILM WORKING ELECTRODE



10th Conference "Electron Technology" ELTE2010,
Wrocław, 22 - 25 September 2010

Microelectrodes for Amperometric Psychotropic Drug Detection

Anna Baraniecka^{1,2}, Beata Rozum¹, Marek Dawgul¹, Dorota G. Pijanowska^{1,2},
Marianna Górska², Rafał Dobrowolski², Anna Szerling²,
Krzysztof Domański², Piotr Grabiec², Jan M. Lysko²

¹Nalecz Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering, Polish Academy of Sciences,
ul. Ka. Trojdena 4, 02-109 Warszawa, Poland

²Institute of Electron Technology, Al. Lotników 32/46, 02-668 Warszawa, Poland

Key words: amperometric detection, psychotropic drug detection, silicon technology

ABSTRACT

Design and technology of silicon microchips with electrodes for amperometric detection of psychotropic drugs content in saliva were proposed. Each silicon microchip consists of three metal electrodes with individual bonding pads. Pt/Ti or Au/Ti two metal layers were applied, where Ti nano-layer serves to improve electrode adhesion to the SiO₂ layer (Fig. 1). One of the electrodes is applied as a reference electrode. It is selectively covered by the thick silver layer and then chlorinated. Technology is based on the "lift-off" technique - standard photolithography with use of the thick photoresist layer, metal thin layers deposition and resist dissolution. Chips were assembled on PCB and insulated with the epoxy resin. The electrodes were tested for determination of imipramine - tricyclic compound, used as an antidepressant.

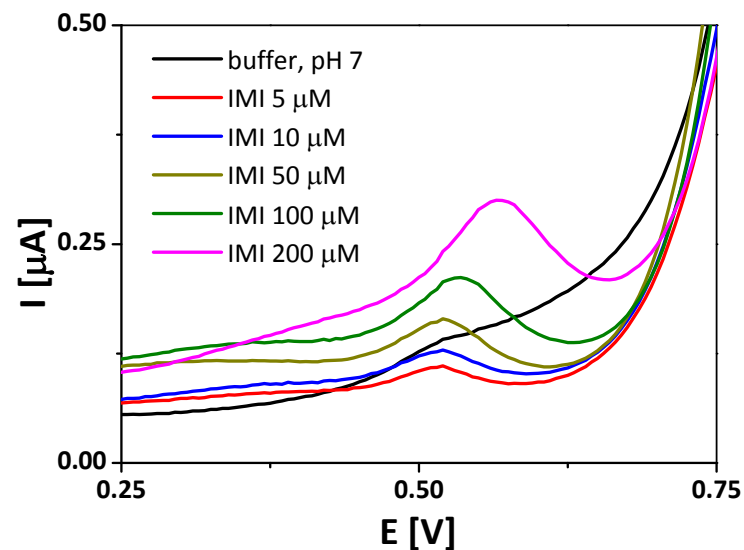


Fig. 1. Amperometric thin-film Pt/Ti electrodes on silicon assembled on PCB



MNS-DIAG "Micro- and Nano- Systems for Chemistry and Biomedical Diagnostics" - Project financed by the EU (European Regional Development Fund) within the POIG Programme.

pH	Sensitivity [$\mu\text{A}/\mu\text{M}$]	R ²	Ep [mV]	Linear range of conc. [μM]
2	0.2843	0.9857	730	10 – 2 000
5	0.4329	0.8800	400	10 – 200
7	0.6032	0.9064	520	5 – 200



GRAPHITE WORKING ELECTRODES



Technika sensorowa

Biuletyn Polskiego Towarzystwa Techniki Sensorowej
dotowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Biochemiczne metody do oznaczania substancji psychoaktywnych

doc. dr hab. inż. DOROTA G. PIJANOWSKA, mgr BEATA ROZUM,
prof. dr hab. inż. WŁADYSŁAW TORBICZ

Instytut Bocychemii i Inżynierii Biomedycznej im. Madeja Nalecz PAN, Warszawa

Obecnie powszechnie używane są substancje psychoaktywne, jako leki lub używki działające w różny sposób na centralny układ nerwowy. Celem ich użycia może być wywołanie zmiany nastroju lub świadomości, a w medycynie, jako leki łagodzące ból, nasenne, stymulujące prawidłowe reakcje przy różnego rodzaju odchyleniach psychicznych, w tym depresji czy leczeniu uzależnień, np. narkomani. Mogą też być one używane jako materiały bojowe. Substancje te oddziałują na jeden lub wiele neuroprzekazników, ich nadużywanie prowadzi do uzależnień i może być niebezpieczne dla zdrowia i życia osób je stosujących.

Celem artykułu jest omówienie prac, w tym prac własnych, poświęconych dwóm grupom substancji psychoaktywnych: (1) benzodiazepinom, stosowanym jako leki przeciwlękowe (miazepam, prazepam, alprazolam, nasenne (fenzepam, nitrazepam, etazolam), czy przeciwdrgawkowe (diazepam, klonazepam) i (2) trójcyklicznym lekom przeciwdepresyjnym (np. imipramina, desypramina, klomipamina, amitrypylina, nortrypylina, prtrytylina, doksepina), przeciwdziałającym przewlekłym depresjom lękowym, nerwowym, bólowi neuropatycznym, bezsenności, bulimii, uzależnieniom czy nadpobudliwości psychoruchowej (ADHD) u dzieci. Substancje te, podobnie jak alkohol, stwarzają wiele zagrożeń dla osób je stosujących i otoczenia, np. w ruchu drogowym, stąd „Prawo o ruchu drogowym” i inne przepisy regulują dopuszczalne stężenia takich substancji we krwi kierowców. W związku z tym istnieje potrzeba szybkiego i w miarę taniego sposobu wykonywania tych substancji z dużą czułością w warunkach terenowych. W odniesieniu do benzodiazepin, obecnie podlega wykorzystaniu w takich warunkach przede wszystkim wieloparametryczne testy immunologiczne, które pozwalają na jakościową analizę substancji psychoaktywnych i ich metabolitów. Do głównych ograniczeń metod opartych na testach immunologicznych można zaliczyć ich niedostateczną, tzw. czułość progową. Natomiast nie opracowano metod do wykonywania trójcyklicznych leków przeciwdepresyjnych w warunkach terenowych, lecz są one głównie oznaczane za pomocą kosztownych metod laboratoryjnych np. wysokocięciowej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją optyczną.

W ostatnich latach rozwiązaniem zyskującym popularność w zakresie diagnostyki biochemicznej są mikrosystemy typu

lab-on-a-chip [1,2]. Systemy te posiadają liczne zalety, m.in. dużą szybkość analizy (od kilku do kilkuset sekund), bardzo dobrą wydajność, małą ilość zużywanych reagentów (nawet rzędu nanolitów) oraz z pewnością prostotę obsługi i pełną automatyzację pomiarów. Pozwalają one również na połączenie szeregu operacji związanych z procedurą pomiarową, w tym ważkie przygotowanie próbki.

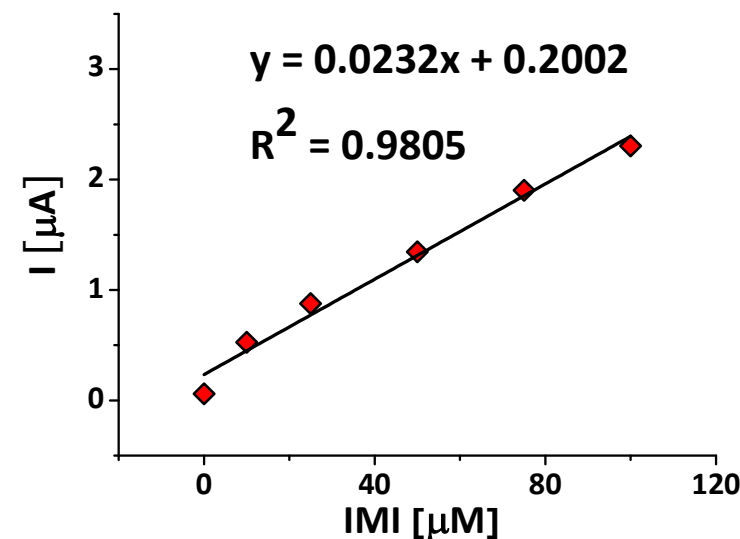
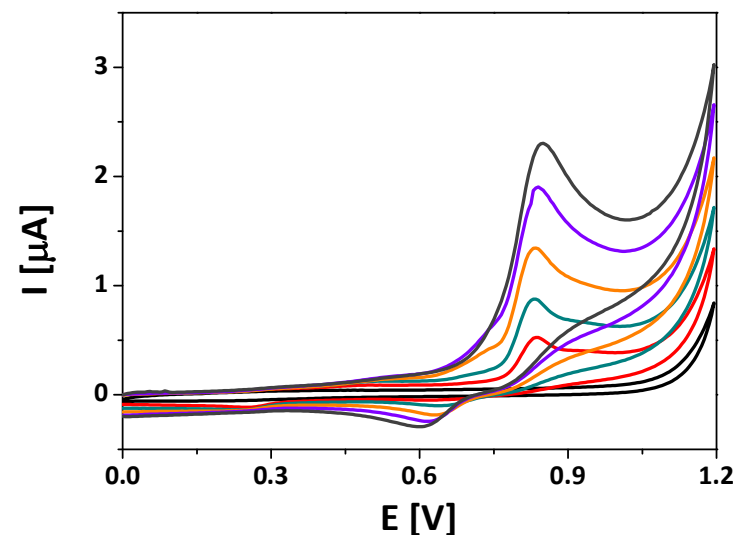
W IBIB PAN, w ramach projektu MNS-DIAG, podjęto prace nad opracowaniem analizatora typu lab-on-a-chip do oznaczania leków psychoaktywnych z grup benzodiazepin i trójcyklicznych leków przeciwdepresyjnych. W skład tego analizatora wchodzi układ: przepływowy do przygotowania próbki pomiarowej, detekcyjny i sterujący.

Do wykonania układu przepływowego zostanie użyty polidimetylosiloksan (PDMS). PDMS jest materiałem trudnym do łączenia z innymi materiałami i nielubiany jest dokonywanie funkcjonalnej modyfikacji jego powierzchni, co często utrudnia integrację tego bloku z blokiem detekcyjnym. Ze względu na powszechność zastosowań PDMS do wykonania analizatorów przepływowych, wiele uwagi poświęcono badaniom właściwości chemicznych, mechanicznych i optycznych tego polimeru, a w szczególności właściwości powierzchni i odporności chemicznej kanałów przepływowych wykonanych w tym materiale oraz możliwości łączenia PDMS z innymi materiałami [3-11]. Jednakże, ze względu na trudności w dostępie do literatury danych technologicznych, konieczne jest prowadzenie własnych prac badawczych w tym zakresie. Szczegółowa analiza tej ważnej problematyki nie będzie omawiana w niniejszym artykule.

Na jakość parametrów bloku detekcyjnego mają wpływ: sposób (zasada) pomiaru oraz materiały czyste chemicznie, użyte do jego wykonania. Celem jest, aby technologia modułu detekcyjnego zapewniła w przyszłości możliwość zintegrowania go z innymi modułami, jako układ scalony wykonany za pomocą miękkiej fotolitografii w PDMS, czy też jako układ zintegrowany w krzemie. Moduł detekcyjny, oprócz głównego celu, jakim jest oznaczanie leków trójcyklicznych i benzodiazepin, będzie zawiązał również czułości temperatury i pH próbki. W celu wyboru optymalnej metody oznaczania tych związków, konieczna jest analiza rozwiązań dotychczas stosowanych.

ELEKTRONIKA 8/2010

137



GRAPHITE WORKING ELECTRODES/FIA

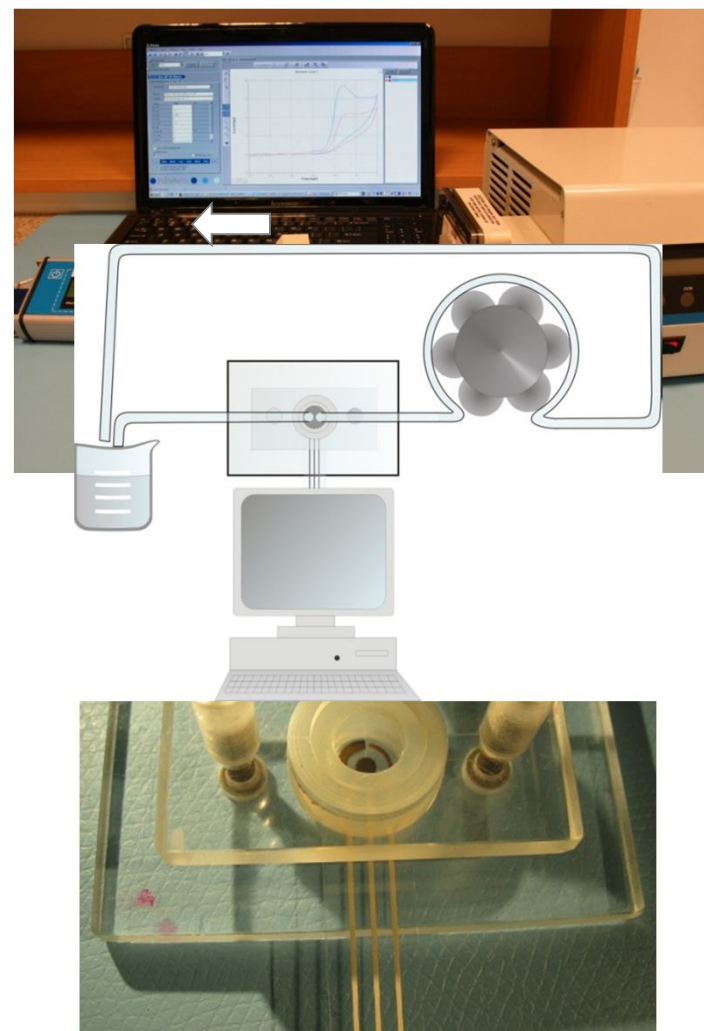


VIII Polska Konferencja Chemii Analitycznej
Analityka dla społeczeństwa XXI wieku
Kraków, 4-9 lipca 2010 r.



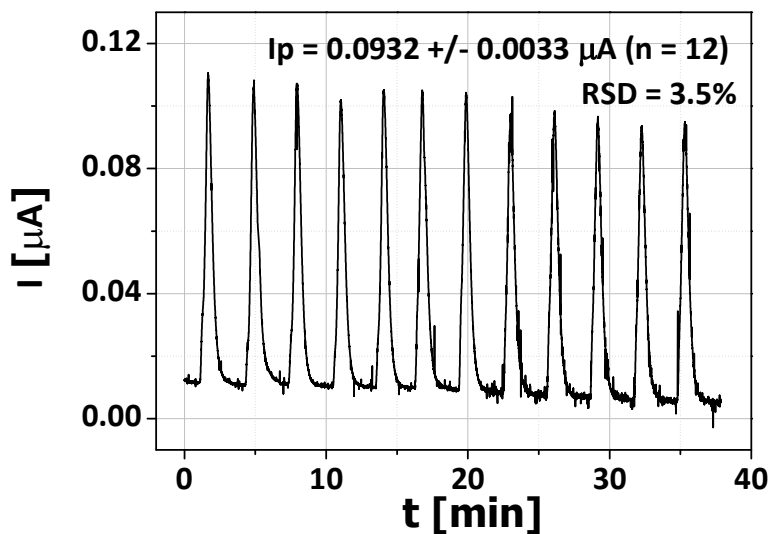
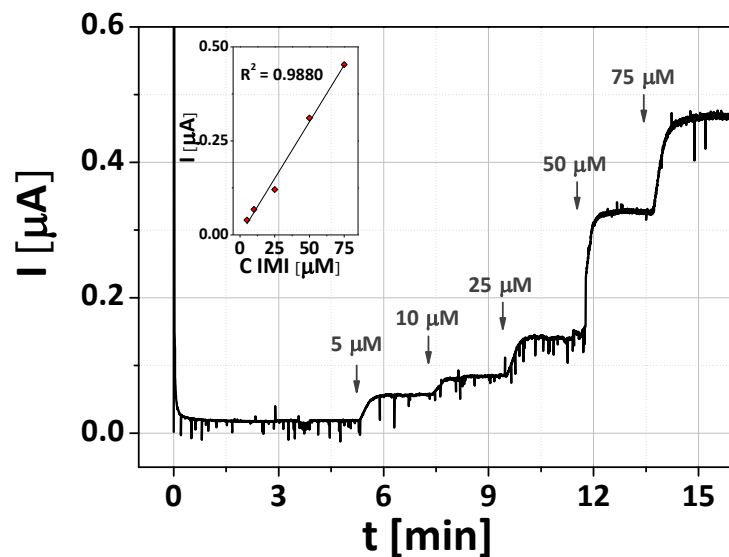
17th INTERNATIONAL CONFERENCE ON FLOW INJECTION ANALYSIS
INCLUDING RELATED TECHNIQUES

KRAKOW, JULY 3 – 8, 2011

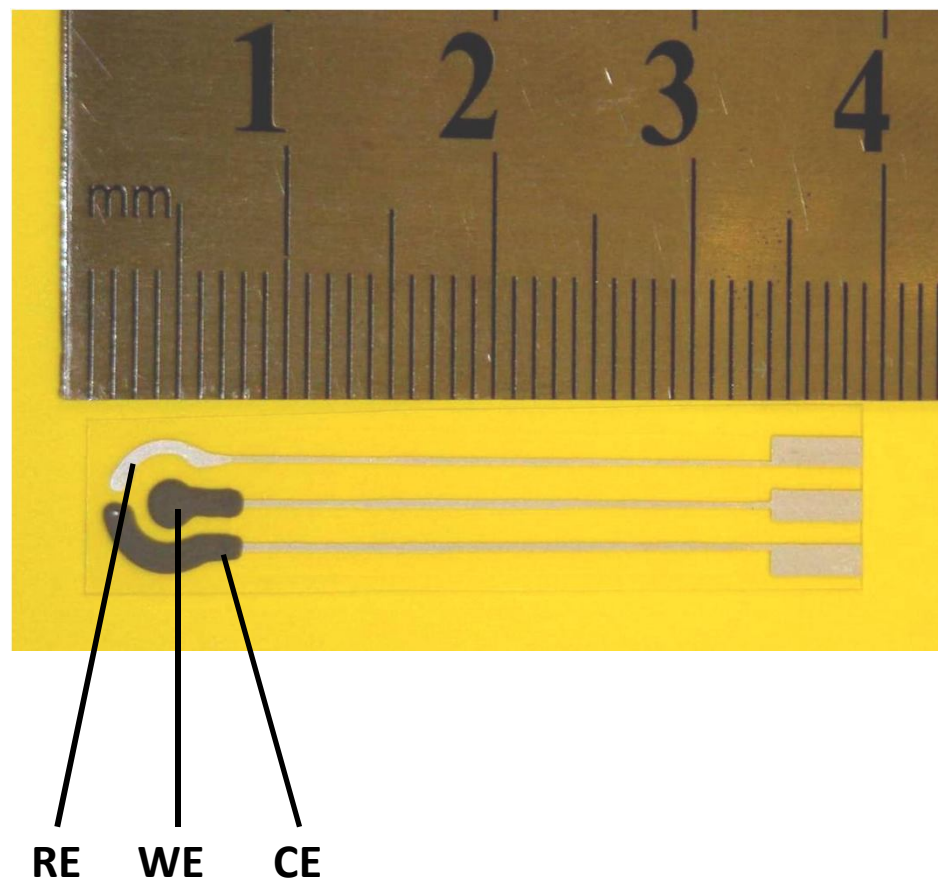


GRAPHITE WORKING ELECTRODES/FIA

Flow rate[$\mu\text{l}/\text{min}$]	Sens. [nA/ μM]	Uncertainty range [%]	R^2
100	2.1	1.1 – 2.3	0.9990
300	3.0	2.1 – 3.7	0.9963
500	2.9	1.0 – 2.3	0.9988
700	3.9	1.5 – 2.0	0.9987
1000	3.4	0.6 – 6.8	0.9922



NEW TECHNOLOGY OF SENSORS FABRICATION



ROBOT-FABRICATED ELECTRODES

ELECTROCHEMICAL MODULE AND AMPEROMETRIC SENSORS FOR TRICYCLIC ANTIDEPRESSANTS DETERMINATION

B. ROZUM, K. DUDZIŃSKI, D.G. PIJANOWSKA*,
Nalecz Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering, Polish Academy of Sciences
*e-mail: dpijanowska@ibib.waw.pl; tel: (48 22) 6599143 ext.: 141
P. KNIHNICKI, P. KOŚCIELNIAK, A. MOOS, J. NOWAK, M. WIECZOREK,
R. WIETECH-POŚLUSZNY, M. WOŹNIAKIEWICZ
Faculty of Chemistry Jagiellonian University

INTRODUCTION

Imipramine (IMI) and desipramine (DEZY) belong to a group of tricyclic antidepressants (TCA), which are widely employed in psychiatric disorders, like: depression, neurosis, etc. Our approach is to design and fabricate lab-on-a-chip with electrophoretic separation module and amperometric electrodes for detection of psychotropic drugs content in saliva.

ELECTROPHORETIC MODULE

Electrophoretic module with sensing gold electrodes

Electrophoretic module on the thermoelectric cooling device

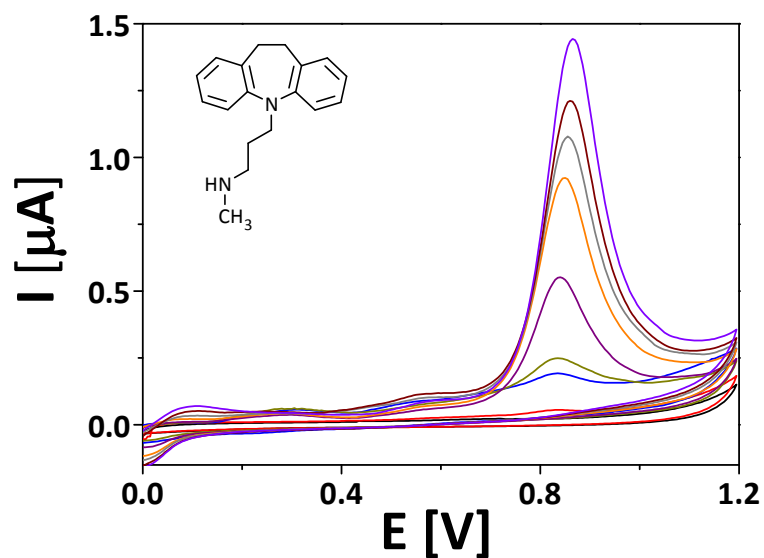
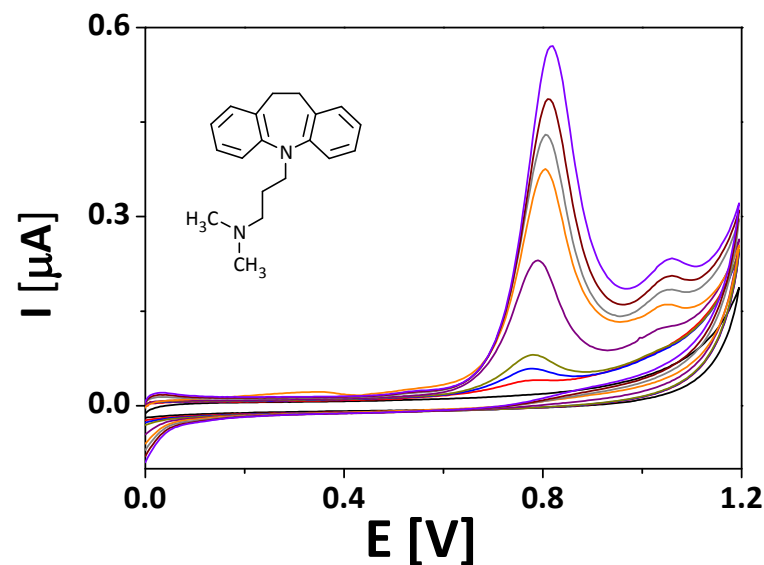
The module is double T type, and it is working at voltages: 250 V by sample injection and 300 V by electrophoresis. The main channel length is 65 mm. The preliminary investigations were performed with dyes: fluoresceine and rhodamine R. The separation procedure takes 14 min.

AMPEROMETRIC SENSORS

Sensors (IBIB PAS) were tested for the determination of imipramine and desipramine. Measurements were carried out using working and counter graphite electrodes. An external reference saturated calomel electrode (SCE: Thermo, Poland) was applied. Electrochemical measurements were performed using PalmSens potentiostat (Palm Instruments B.V., Netherlands), employing cyclic voltammetry (CV).

Imipramine (IMI) Desipramine (DEZ)

This research was financed by the EU (European Regional Development Fund) within the POIG Programme: MNS-DIAG "Micro- and Nano-Systems for Chemistry and Biomedical Diagnostics" (POIG.01.03.01-02-02/04/08-02)



ROBOT-FABRICATED ELECTRODES



A new Approach to Tricyclic Antidepressants Detection Based on Graphite Microsensors Fabricated by an Innovative Method

Beata Rozum, Marek Dawgul, Jerzy Kruk, Władysław Torbicz, Dorota G. Pijanowska

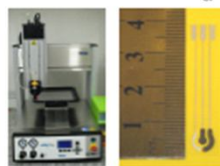
Nalecz Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

INTRODUCTION

Tricyclic antidepressant compounds belong to the group of psychotropic drugs, which are widely applied for affective or 'mood' disorders treatment (depression, neurosis, bulimia nervosa, etc.). Despite their therapeutic action, TACs can cause serious side-effects including: chest pain, blurred vision and panic attacks. Toxic-effects can be induced especially when overdosed and/or drugs high-dose is combined with alcohol. Therefore, the detection of TAC concentration in patients' body fluids became an important analytical task. Nowadays, chromatography, electrophoresis, spectrophotometry and electrochemistry are the most frequently used methods of TACs determination. In this study, we propose a simple method for quantitative tricyclic antidepressants detection using amperometric microsensors fabricated in a new technology.

THE FABRICATION OF ELECTROCHEMICAL SENSORS

- ✓ Novel method of deposition based on a desk-top XYZ-dispensing robot (325 Ultra TT, EFD, USA)
- ✓ Lines down to 0.2 mm width and ca. 0.05 mm thick
- ✓ Complex geometric patterns for electrical contact pads, conductive paths, sensing areas and insulation layers
- ✓ Full compatibility of commercially available materials designed for screen-printing: silver (5000 DuPont), graphite (1.951, ITME, Poland) and insulation (7365 DuPont) pastes onto a polyester foil (Autostat CT7)
- ✓ The complete electrochemical cells consisting of graphite working and counter and silver/silver chloride reference electrode
- ✓ Advantages: materials lost and costs reduction, flexibility in design and patterning applicable for both rapid prototyping of test samples and mass production



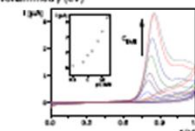
Robot 325 Ultra TT and complete three-electrode sensors.

RESULTS

- ✓ The determination of TACs with cyclic voltammetry (CV)



Measurement system: potentiostat (PalmSens Instruments BV), calomel reference electrode (Radiometer), graphite sensor.

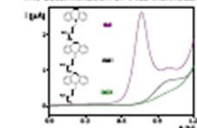


Typical cyclic voltammograms for IMI and corresponding calibration graph (inset) in 50 mM phosphate buffer solution pH 7, 0.1 M KCl. Scan rate: 100 mV/s. Inset: linear plot of peak current vs concentration.

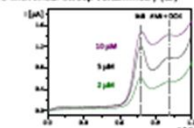
Analytical parameter	Tricyclic Antidepressant Drug		
	IMI	AMI	DOX
Sensitivity [nA/μM]	213.0	34.2	32
Oxidation potential [mV]	770	970	980
R ²	0.9161	0.9598	0.9853

Analytical characteristics of proposed detection method for three selected TACs in concentration ranged from 0.1 to 10 μM. Optimal conditions: 50 mM phosphate buffer solution pH 7, 0.1 M KCl. Cyclic voltammetry, potential range: 0.0 V – 1.2 V, scan rate 100 mV/s. Inset: 5 mM Drug incubation time: 2 min.

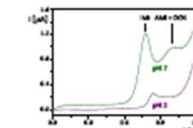
- ✓ The determination of TACs individually and in mixture with linear sweep voltammetry (LSV)



Typical linear sweep voltammograms for individual TACs (depicted in the graph) of 10 μM concentration in 50 mM phosphate buffer pH 7, 0.1 M KCl. Scan rate 100 mV/s.



Simultaneous detection of IMI, AMI, DOX of different concentrations (2, 5 and 10 μM of each drug) in mixture.



Simultaneous detection of IMI, AMI, DOX of 1 μM concentration each in mixture in buffer solutions of different pH (depicted in the graph).

CONCLUSIONS

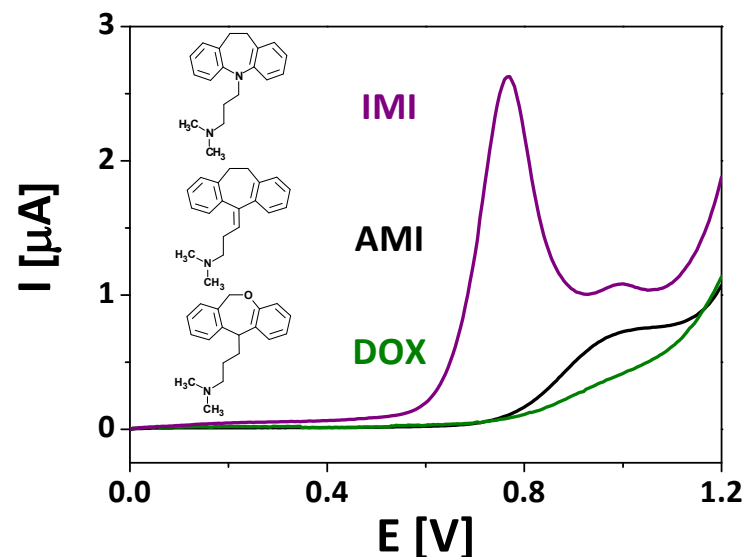
- ✓ Innovative method for the fabrication of thick-film sensors on solid support using a desk-top XYZ-dispensing robot
- ✓ Complete electrochemical cells consisting of graphite working and counter electrodes and silver/silver chloride reference electrode suitable for the detection of tricyclic antidepressant drugs
- ✓ Imipramine is determined with the highest sensitivity (213 nA/μM) and the lowest potential of peak current (~0.77 V) comparing to other TACs
- ✓ Imipramine, amitriptyline and doxepin quantification individually as well as in the mixtures is possible
- ✓ Imipramine can be selectively determined in the presence of other TACs when buffer solution of pH 2 is used as a background electrolyte



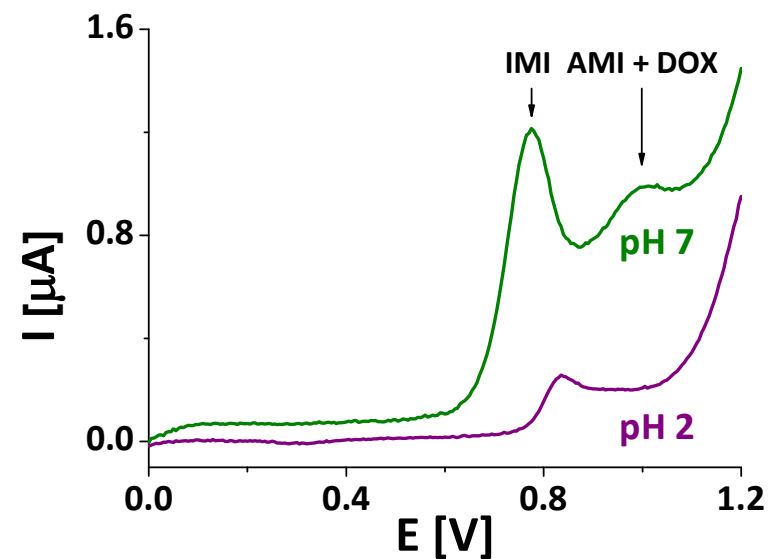
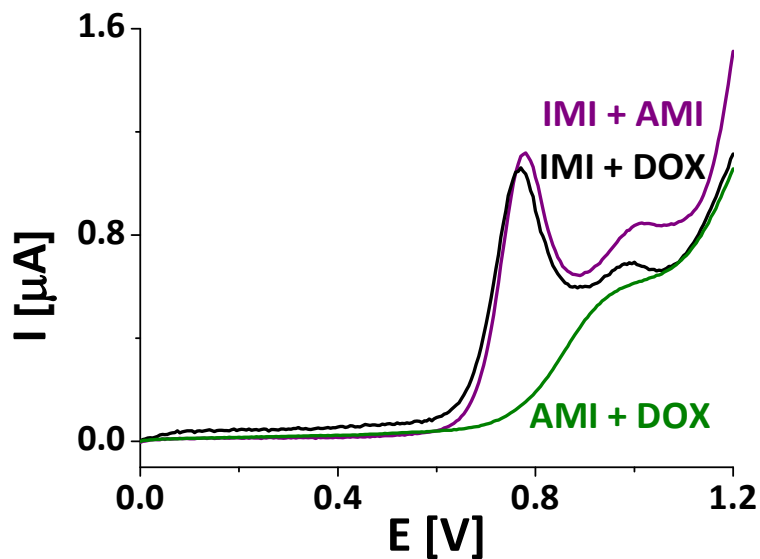
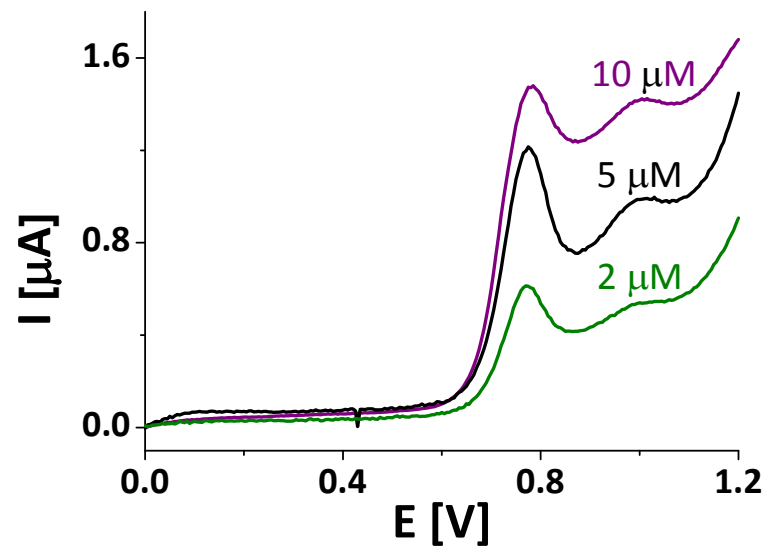
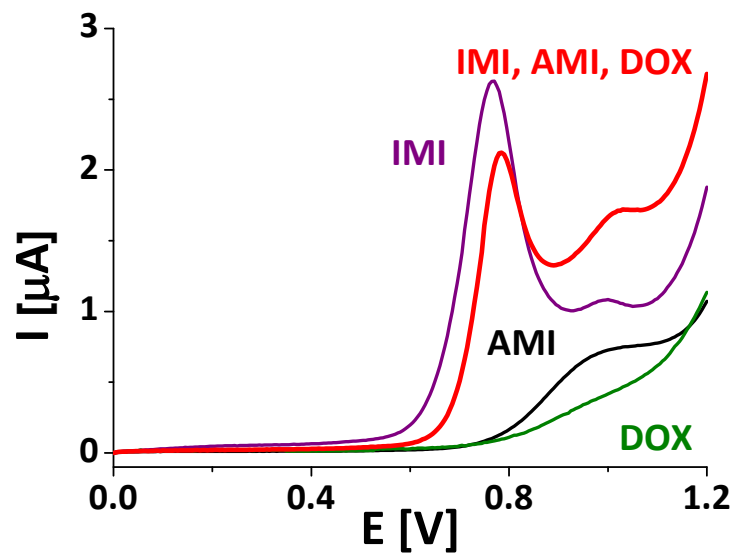
This research was financed by the EU (European Regional Development Fund) within the POIG Programme MNS-DIAG "Micro- and Nano- Systems for Chemistry and Biomedical Diagnostics" (POIG.01.01.00-00-00-00-00)



Optimized	TCA		
	IMI	AMI	DOX
Linear conc. range [μM]	1 – 25	0.1 – 25	0.1 – 10
Sens. [nA/μM]	86.0	27.6	32.0
Oxidation E [V]	0.780	1	1



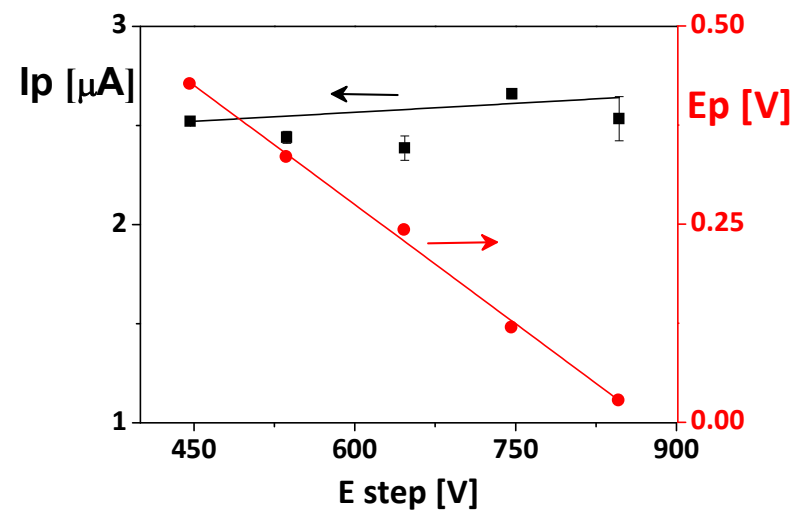
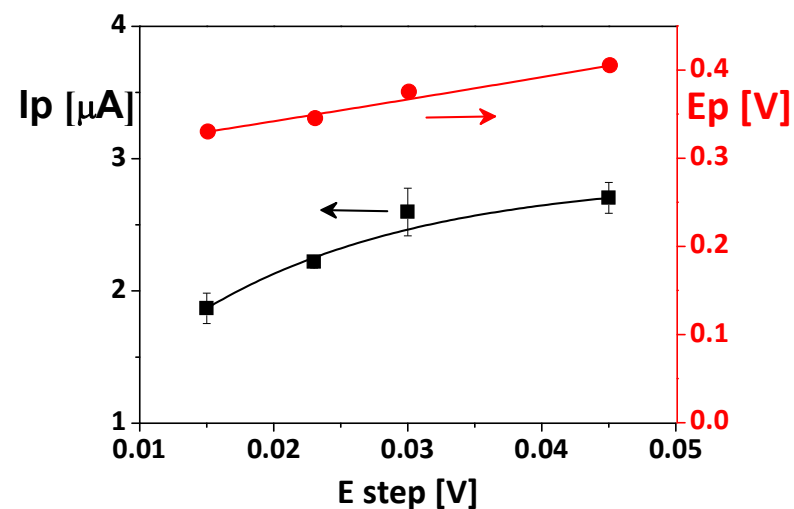
ROBOT-FABRICATED ELECTRODES



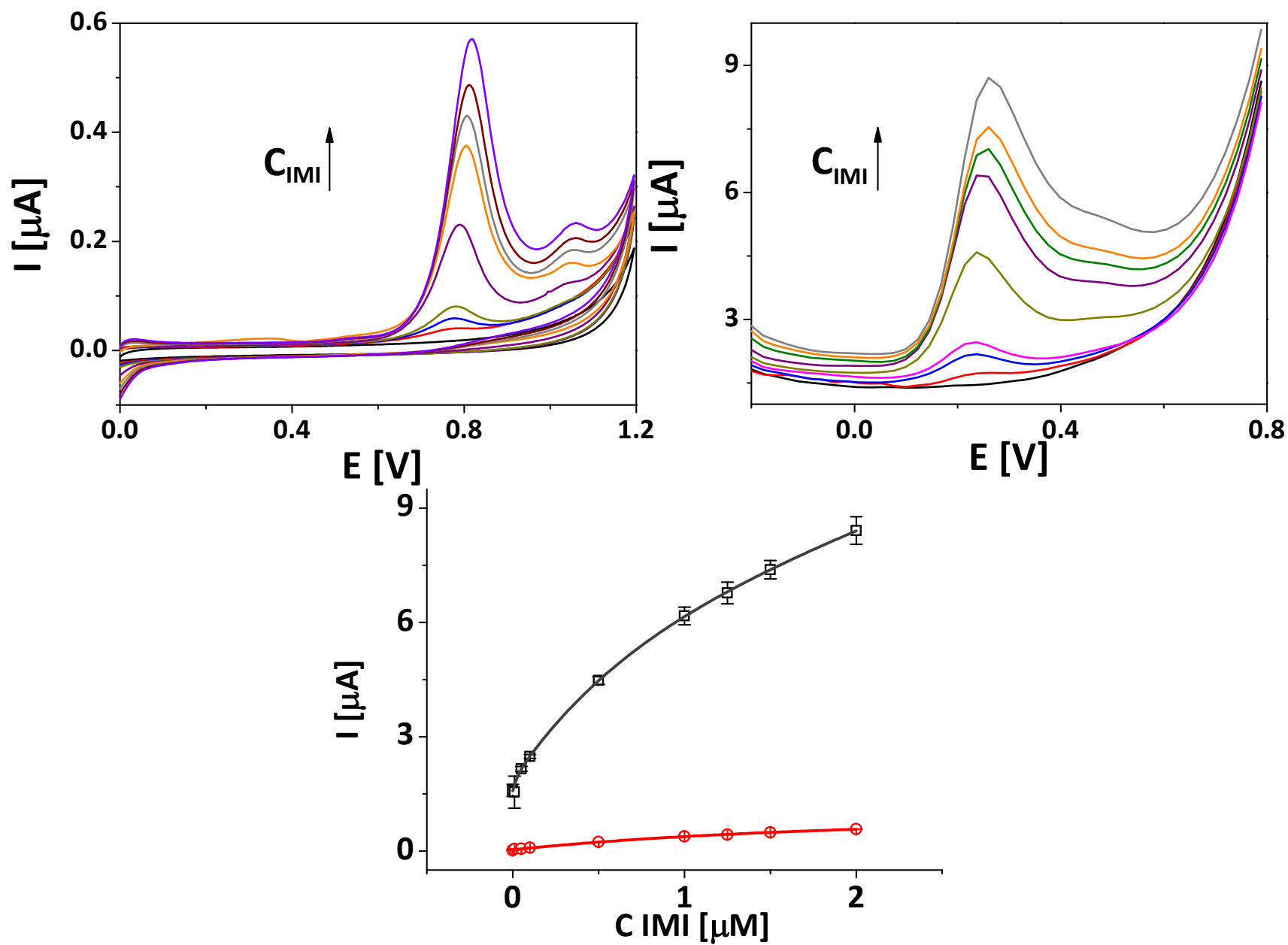
Parameters optimized for IMI:

<i>L.p.</i>	<i>Parameter</i>	<i>Value</i>
1	E_{BEG}	0 V
2	E_{END}	1 V
3	E_{STEP}	0,023 V
4	E_{PULSE}	0,650 V
5	E_{COND}	0 V
6	E_{DEP}	0 V
7	Scan rate	0,030 V/s
8	t_{PULSE}	0,010 s
9	t_{COND}	0 s
10	t_{DEP}	0 s
11	t_{EQ}	2 s

DPV



DPV





RESULTS:

- Graphite and gold sensors chosen for TCAs detection;
- New sensor fabrication method with microdosing robot;
- Measurements in the stationary and flow-mode conditions;
- Detection of TCAs in mixture;
- DPV increases the sensitivity of TCAs determination;

NEXT:

- Attempts of saliva samples analysis.

THANK YOU VERY MUCH