

Original

非接触型電気伝導度検出を用いた小型キャピラリー電気泳動システムによる無機陰イオンの迅速分離

* 田中喜秀¹・山本冴音²・脇田慎一¹・齊藤惠逸²

Fast Separation of Inorganic Anions by Miniaturized Capillary Electrophoresis System with Contactless Conductivity Detection

* Yoshihide Tanaka¹, Sayane Yamamoto², Shin-ichi Wakida¹, Keiitsu Saito²

¹ Health Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

1-8-31, Midorigaoka, Ikeda, Osaka 563-8577, Japan

² Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University

3-11, Turukabuto, Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan

Abstract

A rapid analytical method for inorganic anions has been developed using a laboratory-built CE system. The miniaturized CE system was constructed from a 10 cm uncoated fused-silica capillary, sample and electrolyte vials, a power supply instrument, two platinum electrodes, a capacitively coupled contactless conductivity detector (C⁴D), and a cool plate to keep at constant temperature of the C⁴D. Although hydrodynamic and electrokinetic injection techniques have been widely used in CE, we employ a continuous sample introduction method. The procedure is relatively simple and has the advantage that it does not require pressure control and vial exchange, so it is suitable for the miniaturized CE system. Six anions (chloride, sulfate, nitrate, nitrite, fluoride, phosphate) were successfully separated and detected at sub-ppm levels within 80 seconds using a 9 mM histidine (His)/15 mM malic acid aqueous buffer solution (pH 3.6) containing 50 mM N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (DDAPS). The RSD values for six replicate injections of a mixed standard solution were found to be in the ranges of 0.76–2.81% for migration times and 0.77–8.55% for peak areas, respectively. The developed method was applied for the analysis of inorganic anions in tap water, river water, mineral water, orange juice, and vegetable juice. These results indicate that the miniaturized CE-C⁴D system is suitable for the rapid analysis of inorganic anions in various samples.

Keywords: capillary electrophoresis, capacitively coupled contactless conductivity detector (C⁴D), miniaturized system, inorganic anion, water, juice

¹独立行政法人産業技術総合研究所 健康工学研究部門
ストレスシグナル研究グループ
〒563-8577 大阪府池田市緑丘1-8-31

Tel: 072-751-8309

Fax: 072-751-9517

E-mail: yoshihide-tanaka@aist.go.jp

²神戸大学大学院 人間発達環境学研究科
〒657-8501 神戸市灘区鶴甲3-11

1. はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) は、生化学、医薬品、環境、食品など様々な分野で利用されており、特にイオン性成分に対して高速・高分離性能を有し、イオンクロマトグラフィー (IC) のアプリケーション分野と重なるところが多い。中空キャピラリーを用いる CE は、泳動溶液の組成を変更するだけで多様な分離選択性を獲得でき、分析前の平衡化時間も短くて済み、かつ省試薬、省廃液、低ランニングコストなどの優位性を持つ。しかしながら、CE では市販されている検出器の種類に限られており、特に紫外吸収の弱い無機イオン分析は、間接吸光度検出法などを利用するのが一般的である [1]。また、CE キャピラリーに導入できる分析試料量も微量 (nL レベル) で、検出感度の点では IC に比べて見劣りする。

IC では電気伝導度検出法が一般的であり、CE でも 1980 年代から非接触型電気伝導度検出器 (Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector, C⁴D) の研究開発が進められてきた。1980 年に Gas ら [2] がキャピラリー等速電気泳動で陰イオン類を検出したのを皮切りに、Zemann ら [3] は、現在の市販装置の基本となる、いわゆる“同軸 (coaxial) 型”の構造を開発し、検出ユニット内に構築したコイル状もしくは環状の電極に、キャピラリーを通すだけの簡単な構造で電気伝導度検出を可能とした。この構造は、電極が液体の流れと接することがないため、電極自体の汚染や消耗がほとんどないことを最大の特長として挙げることができる。また、キャピラリーのどの位置にも設置できるため、他の検出器との併用も可能である。しかしながら、近年 CE 用の C⁴D が市販されているにもかかわらず、CE-C⁴D はそれほど普及していない。高電圧印加や泳動溶液のバックグラウンド電気伝導度の影響で、ベースラインが不安定となりやすいことが大きな要因と思われる。このように、CE-C⁴D 特有の課題があり、CE-C⁴D に適した泳動緩衝塩の種類も限られ [4-6]、広範な CE アプリケーションには対応できていないのが現状である。

産業界では、試料採取現場で直ちに測定結果が出るオンサイト分析のニーズが高まっており、分析装置は小型化・ポータブル化する傾向にある。IC の小型化も進められてきたが、サプレッサー機構、送液ポンプ、充填カラム、移動相のボトルなどを必要とするため、設置面積が A3 サイズで重量も約 10kg となる [7]。中空キャピラリーカラムを用いた小型 IC システム [8,9] も開発されたが、分離性能は劣り、分析時間として 20 分以上を必要とするなど、オンサイト分析に適しているとは言えない。一方、CE はキャピラリー、高電圧電源、検出系、泳動溶液バイアルのみの構成でシステム化できるため、小型化には適しており、いくつかの小型 CE システムが報告されている [10-13]。しかしながら、加圧法という一般的な CE の試料導入法は、小型化・ポータブル化を目指した際に最適とは言えない。そこで C⁴D が小型化という観点からは優位性の高い検出器であることから、本研究では将来的

なポータブル化を指向した簡易型の CE-C⁴D システムを構築し、小型化・ポータブル化に有利である連続的試料導入法 [14] を採用し、無機陰イオンの分析法を検討した。

2. 実験

2.1 装置

装置は、Figure 1 の小型 CE-C⁴D システムを構築した。CE キャピラリーは、Polymicro Technologies 社製の内径 25 μ m、長さ 10cm の熔融石英 (フューズドシリカ) キャピラリーを用いた。泳動溶液用のバイアルは、Agilent キャピラリー電気泳動システム用のポリプロピレン製バイアル (容量 1 mL) の側面にドリルで穴を開け、Figure 1 (b) のようにミニフィッティング (Cat. No. VPI 126、適用チューブ内径: ϕ 1.5~2.5mm 用、アイシス社製) を挿入して作製した。C⁴D 検出器は、Innovative Sensor Technologies 社製の TraceDec を使い、有効長が 7 cm となるように CE キャピラリーを挿入した。この C⁴D センサーは、Figure 1 (c) に示すように同軸上に管状の 2 つの電極 (作用電極とピックアップ電極) が配置されており、作用電極に交流電圧をかけて、キャピラリー内の溶液に高周波交流シグナルを照射させる。このシグナルはキャピラリー壁を通過し、試料中のイオン性物質が通過する際に電流変化が生じ、ピックアップ電極で電圧シグナルに変換して電気伝導度として記録される。なお、C⁴D センサーは電気泳動中の温度変化を抑えるために、25.0 $^{\circ}$ C に設定したクーリングプレート (CP-085、サイニクス社製) 上に設置した。電気泳動は、LabSmith 社製の高電圧電源 (HVS448) を用いて行った。また、電気泳動中の電流値は、デジタルマルチメーター PC5000 (三和電気計器社製) を接続してモニタリングした。

2.2 試薬・試液

ビス (2-ヒドロキシエチル) イミノトリス (ヒドロキシメチル) メタン (Bis-Tris)、2-モルホリノエタンスルホン酸 (MES)、6-アミノカプロン酸 (EACA) および 1,3-ビス [トリス (ヒドロキシメチル) メチルアミノ] プロパン (Bis-Tris propane) は同仁化学研究所社製もしくは Sigma 社製のものを用いた。N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホン酸 (DDAPS) は Affymetrix 社製のものを用いた。その他の試薬は、試薬特級もしくは同等以上のものを用いた。溶液の調製・希釈は、超純水製造装置 Milli-Q Gradient (日本ミリポア社製) で精製した超純水 (ミリ Q 水) を用いた。陰イオン標準試料は、Fluka 社製の陰イオン標準溶液 (Multielement Anion HPCE standard solution No. 2923: 臭化物イオン、塩化物イオン、硝酸イオン、硫酸イオン、フッ化物イオン、リン酸イオンを各 100ppm 含有) を希釈して、もしくは試薬特級品を溶解・希釈して調製したものを用いた。泳動溶液は、特に記載のない限り、50mM の DDAPS を含む 9 mM ヒスチジン/15mM リンゴ酸緩衝液 (pH3.6) を用

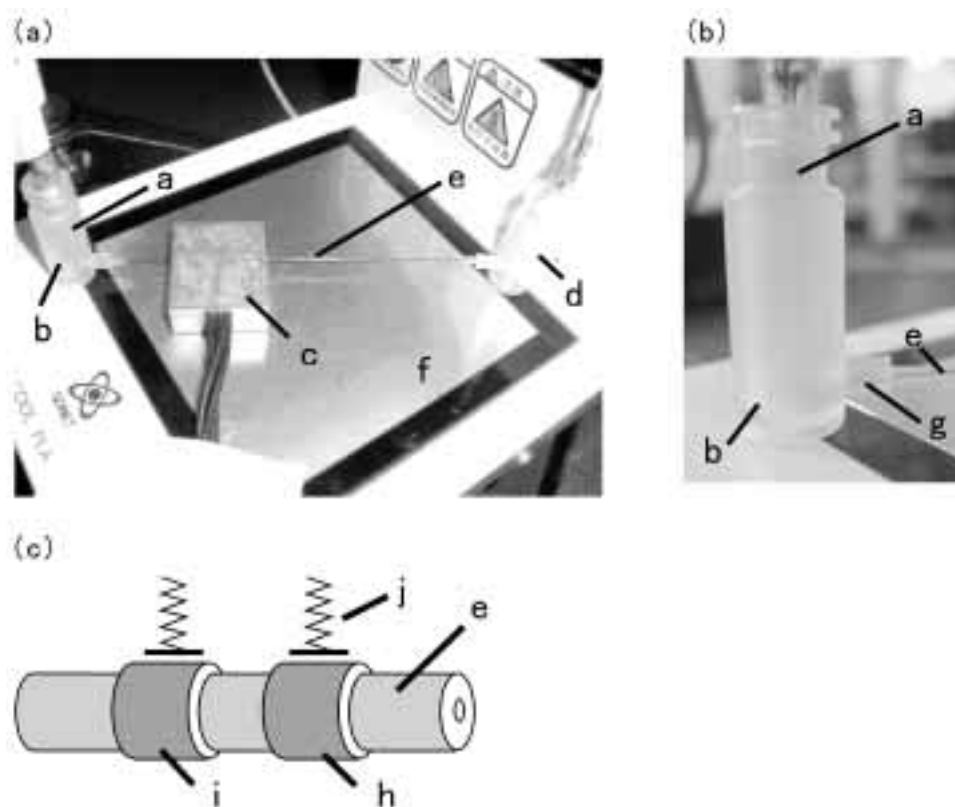


Figure 1. Photographs of a laboratory-built CE-C⁴D system and schematic diagram of C⁴D with the axial electrode arrangement. a: platinum electrode, b: outlet vial, c: C⁴D sensor, d: inlet vial, e: CE capillary, f: cool plate, g: tube fitting, h: working electrode, i: pick-up electrode, j: high voltage AC waveform.

いた。

2.3 試料溶液

水道水とミネラルウォーターは、そのまま実試料とした。河川水は、大土神社付近（兵庫県神戸市）の六甲川で採水し、コスモナイスフィルター（ナカライテスク社製、水系タイプ、孔径0.45 μ m）でろ過し、実試料とした。オレンジジュースは、市販のものを5分間遠心分離し、上澄み液を実試料とした。野菜ジュースは、5分間遠心分離して得た上澄み液を、ミリQ水で20倍に希釈して実試料とした。

2.4 CE-C⁴Dの分析操作

CEキャピラリーは、針の先端にテフロンチューブを取り付けたマイクロシリンジを用いて泳動溶液を充填した。キャピラリーの内容積に対して5倍量以上の泳動溶液を通液後、キャピラリーの両端を泳動溶液バイアルに挿入した。試料導入は、落差法もしくは連続的試料導入法を用いた。落差法では、キャピラリーの試料導入側を試料溶液を入れたバイアルに交換して、このバイアルを一定時間上げることで、試料プラグとして導入した。試料導入側を泳動溶液バイアルに戻し、両バイアル内に白金電極を浸漬し、試料出口側のバイアル

に3.0kVの電圧を印加して、電気泳動を行った。連続的試料導入法の操作手順はFigure 2に示した。あらかじめ、試料溶液と泳動溶液とを等量混合した溶液を調製した。このときモル濃度が2倍の泳動溶液をあらかじめ調製し、これに試料溶液を等量混合し、泳動溶液の緩衝塩濃度を近似させた。キャピラリーの試料導入側は、この液を入れたバイアルを装着し、そのまま電気泳動を行った。連続的試料導入法では電気泳動中に試料成分が導入され続け、各成分の電気泳動移動度の差に基づき、異なる速度でキャピラリー内を移動し、順次検出されることになる。なお、C⁴Dのパラメータは、次のように設定して測定した。

Setup-wizard	Type : CE、Capillary : $\leq 50\mu\text{m}$ 、Sensor : HS
Parameter	Frequency : $2 \times \text{HIGH}$ 、Voltage : -18dB 、Gain : 200%
Filter menu	Frequency : 1/3、Cutoff : 0.01

C⁴Dのデータ取得は、付属のソフトウェア（TraceDec Monitor Ver.0.07）を用いた。データ解析は、TraceDec Monitorで記録したデータファイル（CDFファイル形式）を、Agilent社製のChemStationでCSVファイル形式に変換後、Microsoft Excelで微分し[15]、CHROMuLAN Ver.0.79（PiKRON社製）

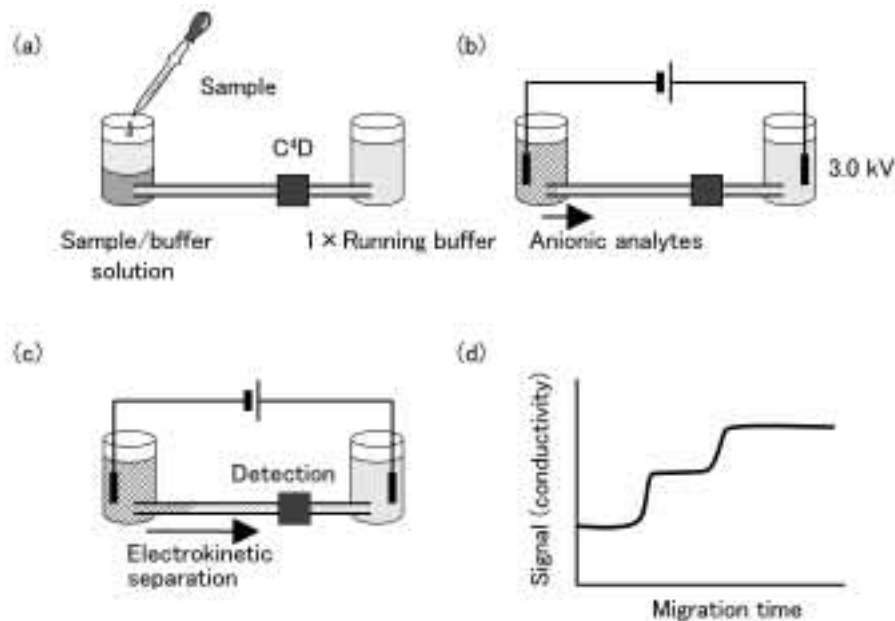


Figure 2. Schematic diagram of CE-C^dD analysis using a continuous sample introduction method. (a) A sample/buffer solution is prepared by mixing equal amounts of the buffer solution with concentration twice (2×running buffer) and an aqueous sample, and both ends of a capillary are inserted into the vials after filling the capillary with a running buffer (1×running buffer), (b) platinum electrodes are inserted in the vials, and a high electric voltage of 3 kV is applied, (c) the anionic analytes migrate toward the anode based on their electrophoretic mobility, (d) a stepwise electropherogram is given due to the changes in conductivity.

を用いてピーク面積を算出した。緩衝液のイオン強度は、PeakMaster 5.3を用いて算出した。

3. 結果と考察

3.1 泳動溶液の検討

CEの無機陰イオン分析では、リン酸塩緩衝液などの中性からアルカリ性の泳動溶液を用い、かつカチオン性コーティングキャピラリーもしくは泳動溶液に陽イオン性界面活性剤などを添加して、電気浸透流 (EOF) を反転させる分析条件が一般的である[16]。しかしながら、CE-C^dDでは電気伝導度の低い泳動溶液のほうが好ましく、MES/His、トリスヒドロキシメチルアミノメタン/2-シクロヘキシルアミノエタンスルホン酸 (Tris/CHES)、His/酢酸というように生化学用緩衝剤、アミノ酸、有機酸などを組み合わせた緩衝液が利用されている[4-6]。また、コーティング剤や陽イオン性界面活性剤を用いると、我々の実験では対イオン (臭化物イオンなど) 由来のピークが生じるなど、分析上の問題がしばしば発生した。その上、小型CE装置では、電源の小型化を見据えて印加電圧を下げるほうが望ましく、可搬性の向上のために短い (10cm以下) キャピラリーを用いることで分析の迅速化は達成できる[11]。そこで、本研究ではEOFが抑制される酸性の泳動溶液に着目し、Table 1の泳動溶液を検討した。

Table 1. List of background electrolyte used in the study.

Acid	Base	pH	References
MES	His	6.0~6.3	[3], [6], [19]
MES	Bis-Tris	6.3~6.5	-
Glu	His	5.2~5.4	[19]
Acetic acid	His	3.8~4.4	[5], [6], [19]
Succinic acid	His	3.5	-
Malic acid	His	3.2~4.0	-
Asp	EACA	4.0~4.2	[20]
Asp	Bis-Tris propane	4.0~4.2	[20]

酸性の泳動溶液を用いることで、弱酸の無機陰イオンである亜硝酸イオン (pKa=3.29)、フッ化物イオン (pKa=3.17)、リン酸イオン (pKa₁=2.12) の分離選択性を調節することが可能となる。その結果、His/GluおよびHis/リンゴ酸では電気泳動時のベースラインが安定し、他の泳動溶液に比べてベースラインノイズも小さく、CE-C^dDに適した泳動溶液であることが判明した。特に、pH3.6のHis/リンゴ酸緩衝液で、Figure 3のように弱酸イオンの良好な分離が得られた。一方、その他の泳動溶液では、特に微分後の電気泳動図のノイズが大きくなり、成分以外の同定できないピークも出現して分析を妨害した。また、pH 4以上の泳動溶液を用いると、10cmのキャピラリーでは、弱酸イオンの分離が不十

分となった。なお、連続的試料導入法では電気泳動中に試料が導入され続け、各成分の移動速度が異なるため、C⁴DではFigure 3 (a)のように階段状のシグナルが得られ、段階的に検出される。これを微分することでFigure 3 (b)の電気泳動図に変換される。

両性イオン界面活性剤であるN-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホン酸 (DDAPS) やN-テトラデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホン酸 (TDAPS) は、泳動溶液に添加することで、特に硝酸イオン、亜硝酸イオン、ヨウ化物イオン、臭化物イオンの分離選択性を変化させることが知られている[17,18]。そこで、Figure 3の塩化物イオン、硝酸イオン、硫酸イオンの分離を向上させるために、泳動溶液に50mM DDAPSを添加した。また、Table 2に示すpH3.2~4.0のHis/リンゴ酸緩衝液で50mM DDAPSを含む泳動溶液を調製し、pHに対する各イオン成分の泳動挙動を比較した。その結果、pH3.2ではフッ

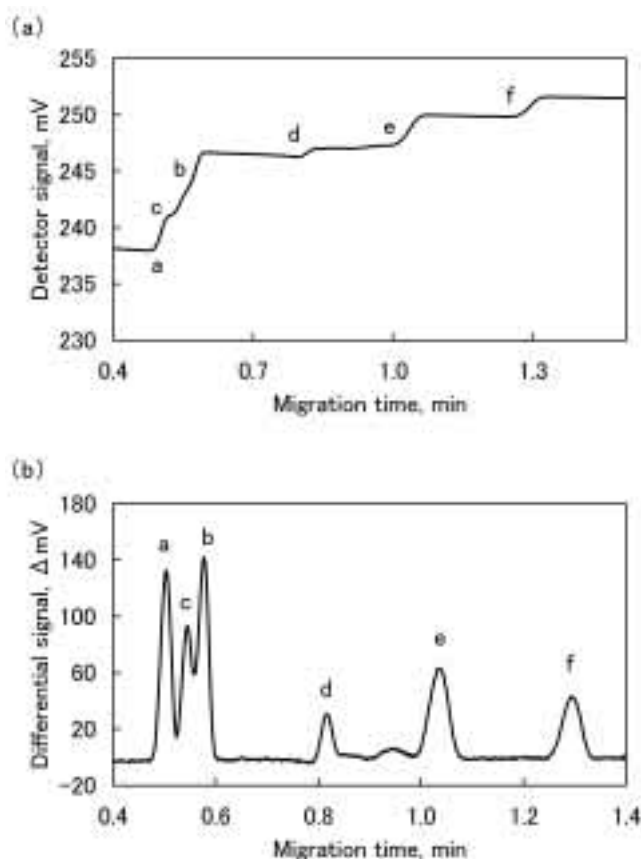


Figure 3. CE-C⁴D analysis of standard anions using a continuous sample introduction method. (a) Raw electropherogram obtained from the detector, (b) differentiated electropherogram. Individual peaks were identified as follows: a: chloride, b: sulfate, c: nitrate, d: nitrite, e: fluoride, f: phosphate. Conditions: CE capillary, 25 μ m i.d. and 10 cm total length (7 cm length to detector); running buffer, 9 mM His/15 mM malic acid at pH 3.6; applied voltage, -3 kV; sample concentrations in inlet vial, 5 ppm of each anion except for phosphate (25 ppm).

Table 2. List of background electrolyte at different pH values.

pH	His(mM)	Malic acid (mM)	Ion strength ¹⁾ (mEq/L)
3.2	9.0	26.65	11.35
3.4	9.0	19.25	10.65
3.6	9.0	14.85	10.27
3.8	9.0	12.05	10.13
4.0	9.0	10.20	10.17

¹⁾ The values are calculated by PeakMaster 5.3

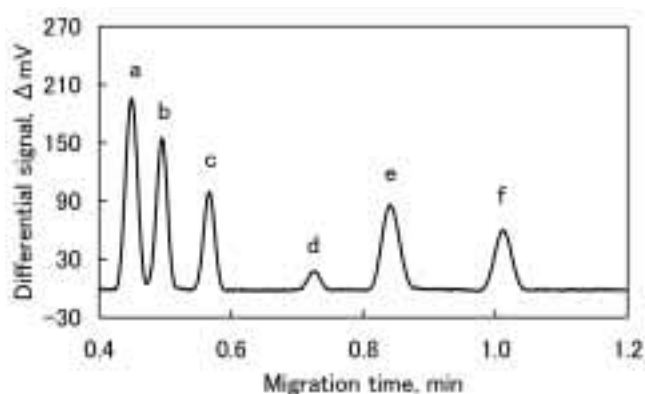


Figure 4. A representative differentiated electropherogram showing successful separation of six anions. Running buffer, 9 mM His/15 mM malic acid containing 50 mM DDAPS at pH 3.6. Individual peaks were identified as follows: a: chloride, b: sulfate, c: nitrate, d: nitrite, e: fluoride, f: phosphate. Other conditions are the same as in Figure 3.

化物イオンとリン酸イオンとの完全分離には至らず、pHが3.4以上で完全分離を達成した。一方、pHが3.6より大きくなるにつれて、リン酸イオンのピーク高さが減少する傾向が認められた。各成分間の分離係数が大きく、かつリン酸イオンのピーク高さが減少が小さかったことから、泳動溶液のpHは3.6とした。6成分を完全分離した結果をFigure 4に示す。

3.2 直線性と分析再現性

泳動溶液として50mM DDAPSを含む9 mM His/15mMリンゴ酸緩衝液 (pH3.6) を用い、無機陰イオン標準試料を用いて、本法の直線性と分析再現性を評価した。Figure 5とTable 3に結果を示す。各成分の泳動時間の再現性 (%RSD) は、弱酸イオンの0.76~1.88%に対して、強酸イオンが2.04~2.81%と高く、この差はDDAPSとの相互作用に起因するものと推測している。検量線の傾きと残差標準偏差を用いて算出した各成分の検出限界 (limit of detection, LOD) は0.05~2.12ppmで、亜硝酸イオンとリン酸イオンは、他のイオンに比べて検出感度が見劣りした。また、今回は5 ppmの試料溶液でピーク面積の再現性 (%RSD) を求めたため、定量限界に近い濃度で算出した亜硝酸イオンやリン酸イオンの再現性 (%RSD) は、それぞれ6.96%、8.55%となった。直線

Table 3. Validation results obtained from repetitive measurements of anion standard solution (n=3) by continuous capillary electrophoresis with the miniaturized CE-C⁴D system. Conditions are same as in Figure 4.

Anion ¹⁾	Migration time (%RSD)	Peak area (%RSD)	LOD ²⁾ (ppm)
Chloride	2.04	1.58	0.52
Sulfate	2.81	1.13	0.05
Nitrate	2.45	0.77	0.15
Nitrite	0.76	6.96	2.12
Fluoride	1.88	3.34	0.13
Phosphate	1.08	8.55	1.90

1) Analyte concentration in inlet vial was 5 ppm.

2) LOD was calculated according to the following equation:

$$\text{LOD} = 3.3 \times \text{residual standard deviation} / \text{slope of calibration curve}$$

性に関しては、連続的試料導入法と用いても良好な結果が得られた。

3.3 分析アプリケーション

CE-C⁴Dの実試料分析として、水道水、河川水、ミネラルウォーター、オレンジジュース、ならびに野菜ジュースの計5種類を検討した。その結果、メンブランフィルターによるろ過、遠心分離、希釈という簡単な前処理で、Figure 6に示すように塩化物イオン、硫酸イオン、硝酸イオン、リン酸イオンを測定できた。なお、Figure 6 (e)の野菜ジュースは、20倍希釈でも水道水やオレンジジュースに比べて塩化物イオンや硫酸イオンの濃度が高く、連続試料導入法ではキャピラリー内を移動中に電気泳動拡散が起こり、ピークのプロード化が生じた。その結果、硫酸イオンと硝酸イオンとの分離が損なわれ、DDAPSの濃度を50mMから70mMに増加して

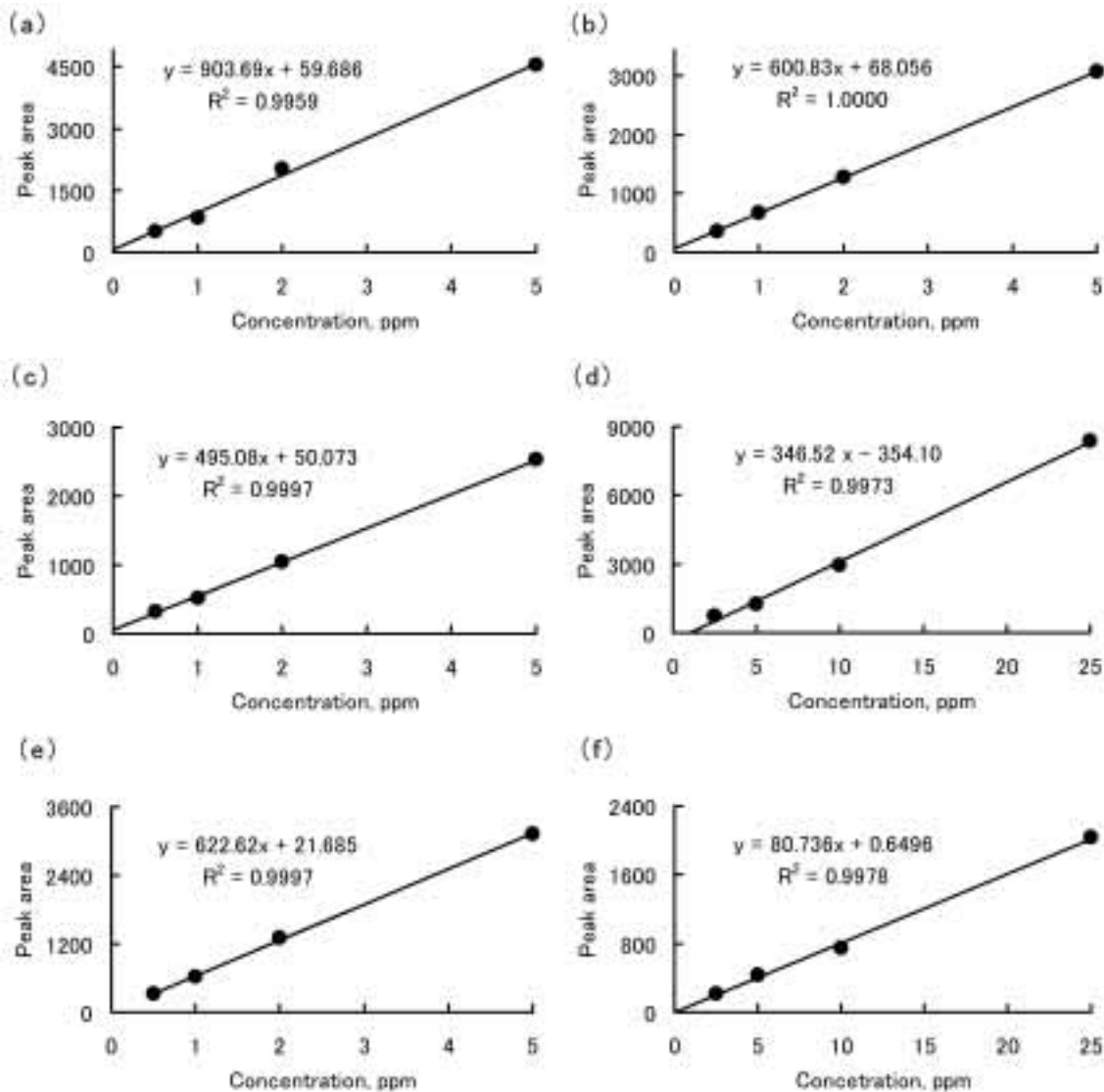


Figure 5. Calibration curves obtained with anion standard solutions: (a) chloride, (b) sulfate, (c) nitrate, (d) nitrite, (e) fluoride, (f) phosphate. Conditions are the same as in Figure 4.

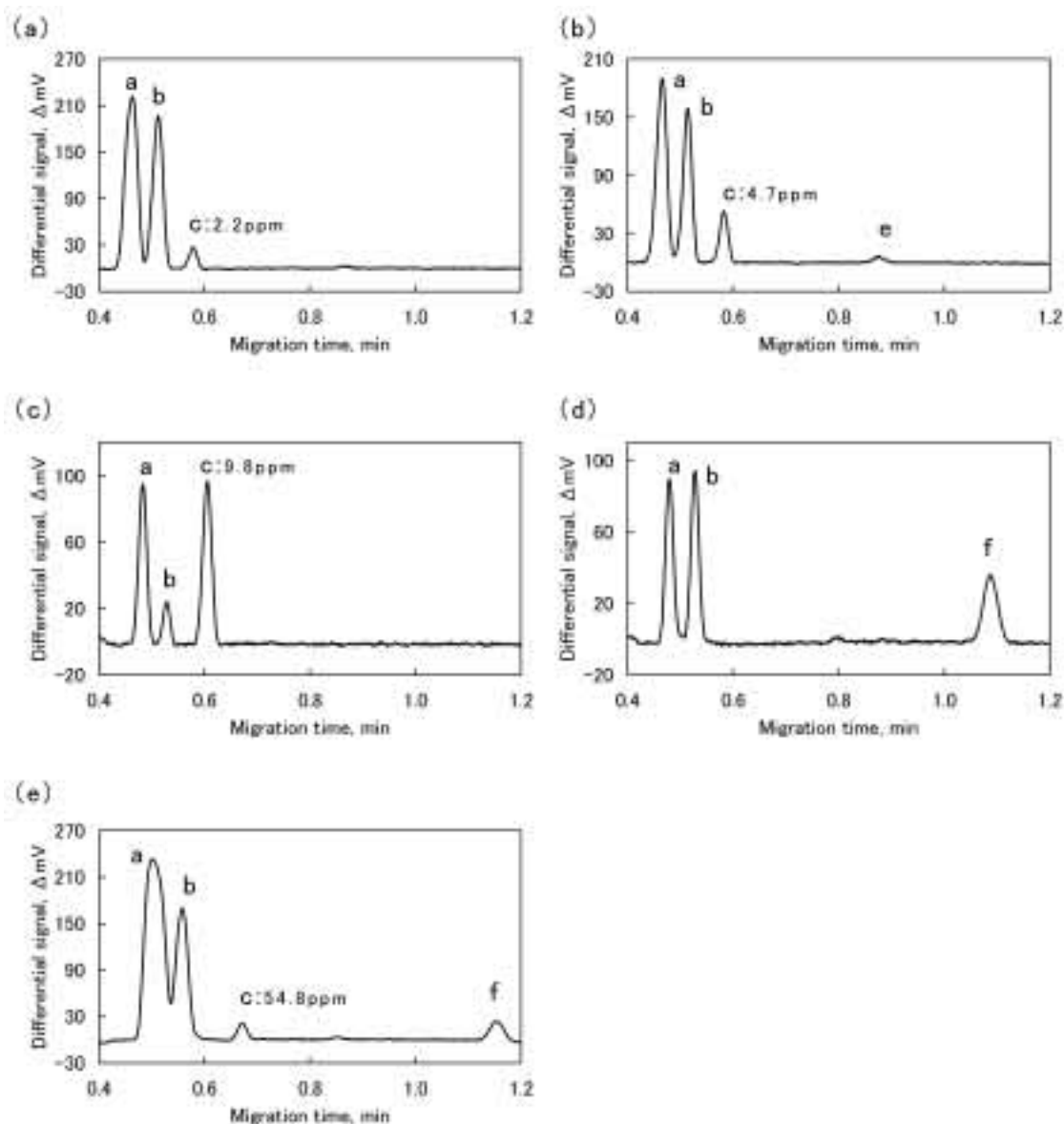


Figure 6. Environmental and soft drink applications of CE-C⁴D analysis. Samples: (a) tap water in Osaka, (b) water of Rokko River (Kobe), (c) a commercial mineral water, (d) a commercial orange juice (e) a commercial vegetable juice. Conditions are same as in Figure 4 except that the concentration of DDAPS was 70 mM for the analysis of vegetable juice. Peak identifications are the same as in Figure 4. The nitrate concentrations are calculated from the calibration curve as given in Figure 5.

DDAPS との相互作用が強い硝酸イオンの泳動時間を遅らせることで分離を達成した。なお、Figure 6 には硝酸イオン濃度を一例として示す。この値は、無機陰イオン標準試料を用いて作成した検量線から算出した概算値である。

4. まとめ

小型キャピラリー電気泳動システム-非接触型電気伝導度検出 (CE-C⁴D) システムを構築して、ポータブル化を指向する上で連続的試料導入法を採用し、無機陰イオンの迅速分析法を開発した。10cm のキャピラリーと50mM DDAPS を含む 9 mM His/15mM リンゴ酸緩衝液 (pH3.6) を用いること

により、80秒で無機陰イオン6成分の分離定量を達成した。さらに、環境水や飲料などの実試料分析に適用し、本法が充分適用可能であることを実証した。現時点で、連続的試料導入法を用いて海水のようにイオン強度の高い試料を分析すると、落差法よりも分離性能が損なわれ、適用できないことが判明している。また、検出感度の更なる向上など、CE-C⁴D を普及させるには、いくつかの課題は残されている。しかしながら、今回のような小型 CE-C⁴D システムで、産業界でニーズが高まっている試料採取現場での迅速分析を実現できる可能性は示唆された。

引用文献

- [1] Fritz, J. S. *J. Chromatogr. A* **2000**, 884, 261–275.
- [2] Gaš, B.; Demjaněnko, M.; Vacík, J. *J. Chromatogr.* **1980**, 192, 253–257.
- [3] Zemann, A. J.; Schnell, E.; Volgger, D.; Bonn, G. K. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 563–567.
- [4] Zemann, A. J. *Electrophoresis* **2003**, 24, 2125–2137.
- [5] Kubáň, P.; Hauser, P. C. *Electrophoresis* **2009**, 30, 176–188.
- [6] Kubáň, P.; Hauser, P. C. *Electrophoresis* **2011**, 32, 30–42.
- [7] Boring, C. B.; Dasgupta, P. K.; Sjögren, A. *J. Chromatogr. A* **1998**, 804, 45–54.
- [8] Kiplagat, I. K.; Kubáň, P.; Pelcová, P.; Kubáň, V. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 5116–5123.
- [9] Yang, B.; Zhang, F.; Liang, X. *Cent. Eur. J. Chem.* **2012**, 10, 472–479.
- [10] Hutchinson, J. P.; Johns, C.; Breadmore, M. C.; Hilder, E. F.; Guijt, R. M.; Lennard, C.; Dicinowski, G.; Haddad, P. R. *Electrophoresis* **2008**, 29, 4593–4602.
- [11] Ryvolová, M.; Preisler, J.; Brabazon, D.; Macka, M. *Trends Anal. Chem.* **2010**, 29, 339–353.
- [12] Kubáň, P.; Seiman, A.; Makarōtševa, N.; Vaher, M.; Kaljurand, M. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 2618–2625.
- [13] Blanco, G. A.; Nai, Y. H.; Hilder, E. F.; Shellie R. A.; Dicinowski, G. W.; Haddad, P. R.; Breadmore, M. C. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 9068–9075.
- [14] Pawliszyn, J.; Wu, J. *J. Chromatogr.* **1991**, 559, 111–118.
- [15] 馬田俊雄. 九州大学応用力学研究所報, **1999**, 85, 55–62.
- [16] Harakuwe, A. H.; Haddad, P. R. *J. Chromatogr. A* **1999**, 834, 213–232.
- [17] Woodland, M. A.; Lucy, C. A. *Analyst* **2001**, 126, 28–32.
- [18] Noblitt, S. D.; Schwandner, F. M.; Hering, S. V.; Collett Jr., J. L.; Henry, C. S. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 1503–1510.
- [19] Kubáň, P.; Evenhuis, C. J.; Macka, M.; Haddad, P. R.; Hauser, P. C. *Electroanalysis* **2006**, 18, 1289–1296.
- [20] Masár, M.; Bomastyk, B.; Bodor, R.; Horčičiak, M.; Danč, L.; Troška, P.; Kuss, H.–M. *Microchim. Acta* **2012**, 177, 309–316.