Senzori za određivanje arsena u prirodnim vodama

Mrzljak, Hrvoje

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:883842

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Hrvoje Mrzljak

SENZORI ZA ODREĐIVANJE ARSENA U PRIRODNIM VODAMA

Voditelj rada: dr.sc. Lidija Furačv.pred.

Članovi ispitnog povjerenstva: dr.sc. Lidija Furač, viši predavač,

dr.sc. Dajana Kučić,poslijedoktorand

dr.sc.Petar Kassal, poslijedoktorand

Zagreb, rujan 2016.

SAŽETAK

Anorganski arsen, pojam koji obuhvaća trovalentni i peterovalentni arsen, predstavlja veliki toksikološki problem arsena u vodama. Zadnjih 40-tak godina diljem svijeta razvijene su mnoge metode određivanja arsena. Kemijski senzori imaju prednost u tome što omogućavaju jednostavno određivanje koncentracije analita u realnom vremenu. U ovom radu, opisane su neke od metoda otkrivanja arsena u vodama. Objašnjeni su temeljni principi rada pojedinog senzora, njegova granica kvantifikacije i koncentracijski raspon u kojem je moguće identificirati arsen. Posebna podskupina senzora, biosenzor, je korišten zbog ekološkog pristupa problemu i niže granice detekcije arsena u vodama.

Ključne riječi: arsen, senzor, određivanje arsena, biosenzor,

SUMMARY

Inorganic arsenic, a term that includes trivalent and fivevalent arsenic, represents a major toxicological problem of arsenic in water. In the last 40 years, many methods of determing arsenic have been developed around the world. Chemical sensors allow simple determination of analyte concentrations in real time. In this paper, some of the methods of detection of arsenic in water are described. The basic principles of operation of each sensor are explained, and the detection limit and concentration range in which it is possible to identify arsenic are discussed. A special subgroup of sensors, a biosensor, was used because of the ecological approach to the problem and a lower detection limit of arsenic in water.

Keywords : arsenic, sensor, determination of arsenic, biosensor

Sadržaj

1. Kemijski senzori.....1

1.1. Materijali za kemijske senzore.....3

1.2. Ion selektivne optode.....9

2. Općenito o arsenu.....10

2.1. Arsen.....10

2.2. Spojevi arsena.....11

2.3. Arsen u vodi za piće.....13

2.4. Klinička slika toksikologije arsena.....14

3. Kemijski senzori za arsen.....16

3.1.Elektrokatalitički F-dopirani CdO senzor za arsen.....16

3.2Selektivni arsenov senzor baziran na ultra tankom grafenovom oksidu.....25

3.3.Kolorimetrijski senzor za određivanje arsena u vodi za piće.....32

3.4. Primjena As-ionski utisnutog polimera kao membranske elektrode u potenciometriji.37

3.5. Anodna ″stripping″ voltametrija.....44

4. Biosenzori.....52

4.1. Biočip s *E.coli* za određivanje arsena.....53

4.2. WCB-11 stanični biosenzor.....56

5. Rasprava.....60

6. Zaključak.....61

7. Literatura.....62

1.Kemijski senzori

Kemijski senzor je uređaj koji transformira kemijsku informaciju, u rasponu koncentracija specifičnu za analit u ukupnom sastavu nekog uzorka, u analitički koristan signal. Kemijska informacija može potjecati od kemijske reakcije analita ili fizičkog svojstva istraživanog uzorka.

Kemijski senzor je bitan dio analizatora. Osim senzora analizator može sadržavati uređaje koji obavljaju sljedeće funkcije: uzorkovanje, transport uzorka, obrada signala, obrada podataka. Analizator može biti dio automatiziranog sustava. Analizator radi prema planu uzorkovanja kao funkcija vremena.

Kemijski senzori sadrže dvije osnovne funkcionalne grupe: receptorski dio i sondu. Neki senzori mogu imati i separator, na primjer membranu. U receptorskom dijelu senzora kemijska informacija se transformira u oblik energije koju može izmjeriti sonda. Sonda je dio uređaja koji transformira energiju u kemijsku informaciju uzorka u pogodan analitički signal. Sonda ne pokazuje selektivnost.

Receptorski dio kemijskih senzora može se temeljiti na raznim principima:

- FIZIČKI: gdje se ne odvija kemijska reakcija. Primjeri fizičkih senzora su: mjerenje apsorbancije, indeksa loma, vodljivosti, temperature, promjena mase, itd.
- KEMIJSKI: odvija se kemijska reakcija uz sudjelovanje analita daje analitički signal
- BIOKEMIJSKI: biokemijski proces je izvor analitičkog signala. Tipičan primjeri su mikrobni potenciometrijski senzori ili imuno senzori. Oni se smatraju podskupinom kemijskih senzora, a zovu se biosenzori.

U nekim slučajevima nije moguće odrediti radi li senzor po kemijskim ili fizičkim principima (na primjer u slučaju adsorpcije).

Senzori su dizajnirani da rade pod dobro definiranim uvjetima pojedinog analita u određenoj vrsti uzorka. U strogo definiranim uvjetima rada, signal analita može biti neovisan o drugim komponentama u uzorku, čime je omogućeno određivanje analita bez veće prethodne obrade uzorka. Zadovoljavajući reproducibilni senzori mogu se koristiti u serijama za višekomponentnu analizu pomoću kalibracije softvera i obrade signala. Takvi sustavi za višekomponentne analize nazivaju se polja senzora (engl. *sensor arrays*).

Podjela senzora

Razvoj instrumenata, mikroelektronike i računala omogućuje razvoj senzora za korištenje većine do sad poznatih kemijskih, bioloških i fizikalnih načela koja se koriste u kemiji. Kemijski senzori se mogu klasificirati prema operativnom principu sonde:

a.Optički uređaji- transformiraju promjene optičkih pojava, koje su rezultat interakcije analita sa dijelom receptora. Ova skupina se može dalje podijeliti prema vrsti optičkih osobina koje su primijenjene u kemijskim senzorima:

- APSORBANCIJA: mjeri se u transparentnom mediju, uzrokovano je apsorptivnosti samog analita ili reakcijom s nekim prikladnim indikatorom.
- REFLEKSIJA: mjeri se u netransparentnom mediju, uglavnom pomoću imobiliziranih indikatora
- LUMINISCENCIJA: mjeri se intenzitet emitirane svijetlosti kemijskim reakcijama u sustavu receptora
- FLOURESCENCIJA: mjeri se učinak emisije izazvane zračenjem
- INDEKS LOMA: mjeri se rezultat promjene u pripremi otopine
- OPTOTERMALNI EFEKT: djelovanje se temelji na mjerenju toplinskog učinka uzrokovanog apsorpcijom svijetla
- RASPRŠENJE SVIJETLOSTI: temelji se na učinku uzorkovanih čestica određenih veličina prisutnih u uzorku

Mnogo primjena od tih pojava u senzorima postalo je moguće zbog korištenja optičkih vlakna u različitim konfiguracijama. Takvi uređaji se također nazivaju i optode. Treba naglasiti da se optička vlakna danas uobičajeno koriste samo u tehničkim uređajima koji se primjenjuju u velikoj skupini optičkih senzora, a temelje se na raznim principima.

b.Elektrokemijski uređaj- transformira učinak elektrokemijske interakcije analita s elektrodom u koristan signal. Takvi učinci mogu biti električki stimulirane ili može rezultirati u spontanoj interakciji bez električne stimulacije. Elektrokemijski uređaji se mogu podijeliti u sljedeće podskupine:

- VOLTAMETRIJSKI SENZORI: uključuje i amperometrijske uređaje, u kojem se struja mjeri u DC (izmjenična struja) ili AC (istosmjerna struja) načinom. U ovu podskupinu mogu se uključivati senzori temeljeni na kemijski inertnim elektrodama,

kemijski aktivnim elektrodama i modificiranim elektrodama. U podskupinu su također uključeni senzori sa i bez (galvanski članak) vanjskog izvora struje.

- POTENCIOMETRIJSKI SENZORI: u kojoj je potencijal indikatorske elektrode (ion selektivna elektroda, metal / metalni oksid elektroda, redoks elektroda) mjeri u odnosu na referentnu elektrodu.
- KEMIJSKI OSJETILNI TRANZISTOR S UČINKOM POLJA (CHEMFECT) – u kojoj je učinak interakcije između analita i aktivnog premaza pretvara u ″transportnu″ struju (engl.*source-drain current*).Interakcije između analita i premaza su, s kemijskog stanovišta, slične onima koje se mogu naći u potenciometrijskim ion selektivnim senzorima.

c. Električni uređaji – temeljeni su na mjerenjima, gdje se ne odvijaju elektrokemijski procesi, ali signal proizlazi iz promjena električkih svojstava koja su uzrokovana interakcijom analita.

- POLUVODIČKI SENZORI METALNIH OKSIDA: koriste se uglavnom kao detektori u plinskoj fazi, na temelju povratnih procesa analita u komponentama plina
- ORGANSKI POLUVODIČKI SENZORI: temelji se na stvaranju kompleksa prijenosa naboja, koji modificira gustoću naboja na podlozi.
- SENZORI ELEKTRIČNE VODLJIVOSTI
- SENZORI ELEKTRIČNE PERMITIVNOSTI

d. Uređaji osjetljivi na promjenu mase - temelje se na transformacijama promjene mase na specifično modificiranim površinama u promjenu svojstva materijala. Promjena mase uzrokovana je nakupljanjem analita. U ovu podskupinu spadaju:

- PIEZOELEKTRIČNI UREĐAJI: koriste se uglavnom u plinskoj fazi, ali mogu biti korisni i u otopinama, temelje se na mjerenju promjene frekvencije na ploči od kvarcnog oscilatora, a uzrokovane su adsorpcijom mase analita na oscilator.
- SAW UREĐAJI (engl. *surface acoustic wave devices*): ovisi o izmjeni brzini širenja generiranog vala koji utječe na taloženje mase određenog analita.

e. Magnetski uređaji – temelje se na promjeni paramagnetskih svojstava plina koji se analizira (na primjer kisik)

f. Termometrijski uređaji – temelje se na mjerenju toplinskih učinaka neke specifične kemijske reakcije ili adsorpcije koja uključuje analit. U ovoj skupini učinak topline može se mjeriti na različite načine, primjerice u takozvanim katalitičkim senzorima vrućine reakcija izgaranja ili enzimskim reakcijama gdje se mjeri upotrebom termistora (temperaturno osjetljivi poluvodič na bazi keramike).

g. Druga fizikalna svojstva – kao što je na primjer X-,β-, γ- zračenje može biti osnova za kemijski senzor (na primjer Geiger-Müllerovo brojilo) koji se koristi za određivanje nekog kemijskog sastava.

Ova klasifikacija predstavlja jednu od mogućih podjela senzora. Senzori, na primjer, mogu biti klasificirani prema metodi koji se koristi za mjerenje nekog učinka, a samo po primarnom efektu. Kao primjer mogu se dati takozvani katalitički uređaji u kojima se razvija toplinski efekt u primarnom procesu mjerenja promjene u provodljivosti u termistoru. Također, električni uređaji često se stavljaju jednu kategoriju zajedno s elektrokemijskim uređajima.

Senzori su također klasificirani prema potrebi za detektiranje ili utvrđivanje određenog analita. Primjeri su senzori za pH, metalne ione, određivanje kisika ili drugih plinova. Druga osnova za klasifikaciju kemijskih senzora može se podijeliti prema načinu primjene, na primjer senzori namijenjeni za *in vivo*, ili senzori za praćenje procesa i tako dalje.

Također, moguće je koristiti razne klasifikacije dok kod su temeljni principi jasno definirani i načela su logično raspoređena. [1]

1.1. Razvoj materijala za kemijske senzore

Većina primjena kemijskih senzora temelje se na širokoj pozadini mjernih načela i kemijske reaktivnosti koje su se razvile u analitičkim i drugim granama kemije. Mnoge temeljne ideje, uređaji i materijali prilagođeni su od drugih znanosti i tehnologija :

- Jeftina *optička vlakna* iz komunikacijske industrije su primijenjeni u spektroskopiji na temelju senzora izravnog čitanja (engl. *Direct-reading)* i bliskom polju mikroskopa *(*engl. *Near-field microscopy).*

- *Litografska tehnologija* se naširoko koristi u proizvodnji modernih mikroelektronika i iskorištena je za izradbu minijaturnih elektro kemijskih uređaja kao što su interdigitalne elektrode, mikro elektrode i kemijski osjetljivi unipolarni tranzistori.
- *Napredni piezoelektrični materijali* koji se koriste kao mikropozincioniranje, ovi materijali su omogućili nove oblike mikroskopije, kao što su elektrokemijsko skeniranje, skeniranje tuneliranjem i mikroskopiranjem atomskih sila. Dostupnost ovih mikropozicionera je također kritična za kemijska istraživanja vrlo malih dimenzija (nanometri).
- Ultra osjetljivo svijetlo za detekciju pomoću *naboj sparenog uređaja* (engl. *Charge coupled devices)*, koje su razvijene za astronomiju, za otkrivanje laserski inducirane fluorescencije kod izuzetno malih populacija molekula.

Istraživanja u navedenim područjima uključuju primjenu novih tehnologija za analitičku kemiju i istraživanja kemijskih senzora. To je istinsko multidisciplinarno područje, s doprinosima analitičke kemije, inženjera elektrotehnike i stručnjaka u drugim područjima. U početnim fazama istraživanja, interes je uglavnom bio usmjeren na istraživanje i dokazivanje načela po kojima se nova tehnologija može primijeniti za mjerenje kemijskih tvari. Otvoreni pristup za specijaliziranu opremu i objekte, kao što su one potrebne za litografsko strukturiranje, može biti od presudne važnosti za poticanje interesa i napredak, dok se primjena pojavljuje u specifičnim analitičkim mjerenjima i kemijskim senzorima. Kemijski senzor moguće je poboljšati odabirom materijala koji potiče veću selektivnost kod interakcije s određenim analitom. Tablica 1. daje sažetak materijala potrebne za izravno čitanje (*engl. Direct-reading)* kemijskih senzora. Gotovo svi zahtjevi su prikazani u smislu funkcionalnosti materijala, a ne vrsti materijala (na primjer keramičke, polimer, poluvodiča) kako bi se izbjegla neodgovarajuća pretpostavka na temelju postojećih rješenja. Ograničenja postojeće kemije ili tehnologije mogu se primijeniti u bilo kojoj fazi razvoja senzora. Tablica 2. daje sažetak ključnih materijala za različite kemijske senzore. Najčešća ograničenja tih materijala za kemijski senzor vjerojatno se odnosi na kemiju gdje je potreban adekvatni selektivni odgovor na ciljani analit. Priličan potencijal postoji uporabom novih materijala čime je poboljšana selektivnost kemijskih senzora. Jedna strategija za rješavanje tog problema je razvoj minijaturnih separatora s velikim brzinama (*engl. High-speed seprations*). Ti separatori povećavaju molekularnu selektivnost, ali s druge strane smanjuje osjetljivost detektora. Minijaturizirani analitički sustavi su relativno novo područje istraživanja u analitičkoj kemiji, ali njihov razvoj uvelike može nadopuniti sposobnosti postojećih izravnih senzora za

očitovanje (*engl. Direct-reading sensors*). Publicirani su brojni materijali u projektiranju i izradi minijaturnih razdvajanja na bazi analitičkih sustava koji imaju nisku cijenu izrade:

- Premazi i filmovi s poboljšanim svojstvima za posebne zahtjeve senzora (npr. kemijske selektivnosti, kromatografske učinkovitosti, stabilnosti pod električnim gradijentom, učinkovitosti elektrokataliza).
- Materijali koji poboljšavaju osjetljivost detektora i raspon povećanja učinkovitosti (optička vlakna).
- Svjetlovodni materijali s poboljšanim svojstvima u infracrvenom spektralnom području.
- Tehnologije za ekonomično smanjenje sustava senzora.
- Praktične primjene minijaturnih sustava senzora formiranih na čipu.
- Sustavi kemijskih senzora s povećanom pouzdanosti i kontrolom.

Tablica 1. Materijali potrebnih za selektivno direktno čitanje kemijskih senzora (engl. *Direct-reading chemical sensors*) [2]

Oblici materijala	Primjena	Funkcionalni zahtjevi	Mogući mehanizmi
Membrane	Amperometrija Konduktometrija Potenciometrija Elektrokemijski senzori	Selektivnost analita Stabilnost	Vezivanje analita Particioniranje Trajna selektivnost Katalitička reaktivnost Osjetilna elektrodna polja
Premazi/ tanki filmovi	Amperometrija Konduktometrija Potenciometrija Elektrokemijski senzori Optička vlakna i piezoelektrični uređaji Akustični površni valovi (SAW uređaji)	Selektivnost analita, Stabilnost	Vezivanje analita Particioniranje U svojstvima enzima i antitijela Osjetilne elektrode Optička vlakna Valovodna polja *(*engl. *Waweguide arrays)* Trajna selektivnost Elektrokatalitička aktivnost Luminiscencija Viskoelastične promjene
Rasuti materijali	Amperometrija Elektrokemijski senzori	Selektivnost analita Stabilnost	Kruti ili polimerni elektroliti sa selektivnim veznim mjestima
Vlakna (optička)	Optička vlakna Valovodi	Prošireni operativni raspon za valnu duljinu	Poboljšana proširena infracrvena transparentnost i refleksija

Novi materijali mogu dovesti do poboljšanja u selektivnosti kemijskih senzora. Razvoj brzih i minijaturnihsustava kromatografske i kapilarne elektroforeze s detektorima koji su osjetljivi na određene kemijske strukture, važni su za opća kemijska istraživanja, te za praćenja stanja okoliša. U tom slučaju, zahtjev za praćenje određenog analita u širokom rasponu koncentracija i u različitim mjestima gdje su potrebni strogi zahtjevi za kemijsku osjetljivost senzora i selektivnost. Potreba da se sastave i eventualno redefiniraju regulatorni zahtjevi za praćenje toksina, važan je pokretač u razvoju ekoloških kemijskih senzora. Formiranje

senzora za masivnu proizvodnju posebno je važno za profesionalno praćenje stanja okoliša s obzirom na potrebu za niskom cijenom u skladu s regulatornim zahtjevima.

Tablica 2.Karakteristike materijala za kemijske senzore s razdvajanjem analita [2]

Tip senzora	**Potrebe materijala**
Visoko učinkovita tekućinska kromatografija (HPLC)	Materijali za poboljšanu osjetljivost detektora za plin i otopine sredstva za ispiranje Poboljšan dizajn i materijal za fuziju od mikrokanalnog krova
Plinsko tekućinska kromatografija	Stacionarna faza premaza s poboljšanom kromatografskom učinkovitosti na silicijevskim kanalnim zidovima
Kapilarna zonska elektroforeza	Poboljšan dizajn i materijal za fuziju od mikrokanalnog krova Materijali za manje i bolje detektore Poboljšane karakteristike raspada i izolacije oksidnih i nitridnih premaza na siliciju
Optička vlakna	Poboljšani optički materijali za mjerenje u infracrvenom i blisko-infracrvenom području Materijali za povećan učinak detektora u infracrvenom i blisko-infracrvenom području Poboljšani premazi vlakana za povećanu selektivnost za ciljane vrste analita Poboljšano čvrsto stanje lasera za lasersku induciranu fluorescentnu detekciju
Piezoelektrični maseni senzor	Materijali za poboljšanu selektivnost premaza Bolje razumijevanje masenog odziva alternativnih mehaničkih pobuđenja u kontaktu s tekućim i viskoznim medijima
Elektrokemijski amperometrijski senzori	Elektrodni premazi sa poboljšanom selektivnosti, stabilnosti i brzinom elektrokatalize. Poboljšana kemijska robusnost uzorka na metalnim elektrodama

Ove karakteristike materijala su vrlo slične nekim ranije identificiranim materijalima, a važne su za poboljšanje selektivnosti drugih kemijskih senzora. Treba naglasiti da je selektivnost specifična za određeni spoj ili klasu spojeva.

Mala mogućnost dvojnih primjena (ili drugih sekundarnih primjena), planirano je za premaze razvijene za otkrivanje bojnih otrova. Ipak, opće pouke u razvoju kemijski selektivnih materijala (razumijevanje bolje uloge električnih i kemijskih sila na površini i graničnih pojava, molekularne karakterizacije, ion-specifične membrane i modificirane površine s katalitičkim ili enzimatskim svojstvima, i tako dalje) može biti široko primjenjiva i trebalo bi biti od pomoći u izradi materijala koji ispunjavaju određene funkcionalne zahtjeve[2].

1.2.Ion selektivne optode

Ion selektivne optode pripadaju skupini optičkih kemijskih senzora, koje su privukle interes 1970-tih. Općenito svrha uporabe ion selektivnih optoda je selektivnost prema određenom ionu što je povezano sa selektivnim kompleksiranjem ionofora s analitom. To je jedan od razloga zbog čega je ion selektivna optoda napredovala poslijednih 10 godina. Za dobivanje membrane ion selektivne optode ionofor se može ugraditi u hidrofobne membrane kao što su plastificirane poli (vinil- klorid) (PVC) membrane, zajedno s lipofilnim pH indikatorom, a koristi se u kontaktu s otopinom koja sadrži primarni ion. U ovom slučaju (kada je, na primjer, kation primarni ion), ekstrakciju primarnog kationa uzrokuje lipofilni pH indikator koji se deprotonira čime se održava elektroneutralnost u fazi membrane. Stoga, većina ion selektivnih optoda mjere proces otpuštanja protona u fazu otopine uzorka nakon ekstrakcije primarnog kationa u lipofilne membranske faze koje se mjere spektrofotometarskom metodom. Ion selektivne optode su podijeljene na četiri različite vrste zbog različitih analitičkih svrha [3]:

1. Protočne analitičke optode
2. Svjetlovodne optode
3. Pločaste optode (film optode)
4. Optode optičkih vlakana

2. Općenito o arsenu

2.1.Arsen

Elementarni arsen je polumetal koji se u periodnom sustavu elemenata nalazi u V. skupini zajedno sa dušikom, fosforom, antimonom i bizmutom. Atomski broj mu je 33, a relativna atomska masa 74,922 (tablica 3). Elektronska konfiguracija arsena je [Ar] $3d^{10}$ $4s^2$ $4p^3$. Arsen se javlja u dvije alotropske modifikacije: nestabilnoj žutoj heksagonalne strukture i stabilnijoj sivoj sa slojevitom strukturom. α-arsen ili žuti arsen gustoće 2,0 g/cm^3 nastaje naglim hlađenjem arsenovih para. On je mekan poput voska i ne vodi električnu struju. Zbog svoje nestabilnosti on već pri sobnoj temperaturi, a osobito pod utjecajem svijetlosti brzo i lako prelazi u sivu modifikaciju[5]. α- arsen ili sivi arsen gustoće 5,8 g/cm^3 je krt i bez sjaja. Pri atmosferskom tlaku sublimira pri temperaturi 613 °C, a pri tlaku od 36,4 kPa što je tlak vlastitih para,tali se pri 817 °C. Parama arsena do 800°C odgovara formula As_4 , a iznad 1700 °C As_2. S vlažnim zrakom reagira već pri sobnoj temperaturi, a zagrijan na zraku gori modrim plamenom stvarajući gusti dim As_2O_3 koji ima miris po češnjaku.



Slika 1.Arsen

Pri sobnoj temperaturi izravno se spaja s fluorom i klorom, a zagrijan i s bromom, jodom te sumporom. Ne spaja se sa dušikom, borom, silicijem i ugljikom. Jake oksidativne kiseline, kao što je koncentrirana dušična (zlatotopka), oksidiraju ga u arsenovu kiselinu dok ga u

razrijeđena dušična kiselina oksidira u arsenastu kiselinu [4]. Amorfni crni arsen dobiva se sublimacijom arsena bez prisutnosti zraka. Nastaje i razgradnjom arsenovodika zagrijavanjem pri čemu se izlučuje u obliku pare stvarajući zrcalni odnos (takozvano ″arsensko zrcalo″). Ova reakcija se koristi za dokazivanje malih količina arsena u slučaju sumnje na trovanje (Marshova proba). Zagrijavana na 360 °C prelazi u stabilni sivi arsen uz razvijanje topline. Arsen ima jedan izotop, arsen-75, koji nije radioaktivan [5, 6].

Tablica 3.Neka fizikalna svojstva arsena

Kemijski simbol	**As**
Atomski broj	33
Atomska težina	74,92160
Talište	Arsen se ne tali- sublimira na 616 °C
Oksidi	As_2O_3 i As_2O_5

2.2.Spojevi arsena

Arsenovi se spojevi obično klasificiraju prema njihovoj kemijskoj građi na trovalentne i peterovalentne (As^{3+} i As^{5+}), na anorganske i organske. Arsen s kisikom, klorom i sumporom stvara vrlo toksične anorganske spojeve,a s ugljikom i vodikom organske koji su manje toksični. U oksidiranom stanju adsorpcija arsena uvjetovana je reakcijama s oksidima minerala, najčešće željeza, a u reduciranom stanju s mineralnim sulfidima. Zbog svoje široke primjene u industriji i poljodjelstvu , arsen i njegovi spojevi predstavljaju veliku toksikološku opasnost za ekosustav. Spojevi arsena u pravilu su zabranjeni za upotrebu.

2.3.Arsen u vodi za piće

Arsen se u vodama nalazi u anorganskom i organskom obliku. Organski spojevi arsena, na primjer metilarsenska i dimetilarsenska kiselina nalaze se u znatno manjoj količini u odnosu na anorganske spojeve kao što su arsenit i arsenat.



Sika 2. Struktura arsenat iona (AsO_4^{3-}) i arsenit iona (AsO_3^{3-})

Morska voda sadržava arsen u količini od 15 μgL^{-1}, dok razine arsena u rijekama i jezerima ne prelaze vrijednost od 10 $\mu g\ L^{-1}$. Posebnu pogibao za čovjeka i životinje predstavlja voda iz arteških bunara, koja, zbog prolaska kroz podzemlje koje je bogato arsenom, sadržava arsen u velikim količinama. Slučaj kroničnog otrovanja takvom vrstom vode opisan je u Tajvanu. Epidemija je zabilježena 1960.- 1965. godine, a voda je sadržavala od 0,1 do 1,5 mg As.[7,8]

Koncentracije arsena pronađene u podzemnim vodama u nekim dijelovima svijeta uvelike prelaze maksimalno dopuštene koncentracije (MDK). Najviše koncentracije arsena u vodi zabilježene su u zemljama jugoistočne Azije (Indija, Kina, Bangladeš, Filipini, Tajvan) s 400 do 3400 μgL^{-1}, zatim u zemljama jugoistočne Amerike (Čile,Argentina, Meksiko) od 140 do 300 μgL^{-1} te u nekim dijelovima SAD-a i Japana. Više od 50 milijuna ljudi na području Bangladeša zatrovano je konzumiranjem vode s masenom koncentracijom arsena od 1 mgL^{-1}. Visoke koncentracije arsena u vodi zabilježene su na područjima s termalnom aktivnošću. Tako je zabilježena najviša koncentracija od 8,5 mgL^{-1} u termalnim vodama Novog Zelanda [9].

Početkom 2000. godine analizirani su uzorci vode za piće u gradovima Istočne Slavonije. Rezultati ispitivanja su pokazali su da vodoopskrbni sustavi istočne Hrvatske sadrže povećane koncentracije organskih tvari, a neki imaju i arsen iznad maksimalno dopuštene koncentracije.

Međutim koncentracije arsena u našoj vodi su barem desetak puta niže nego one u Bangladešu i nema pokazatelja da bi se kod nas pojavljivali štetni učinci poput tamošnjih. [9]

Američka Agencija za Zaštitu Okoliša isto kao i Svjetska Zdravstvena Organizacija su MDK arsena u vodi za piće smanjile sa 50 μgL^{-1} na 10 μgL^{-1}.

Tablica 4.Maksimalne dozvoljene koncentracije nekih metala u vodi za piće [10]:

Metal	**MDK, μgL^{-1}**
Cu	2000,0
Cr	50,0
Ni	30,0
Cd	5,0
Pb	10,0
As	10,0

U prirodnim vodama najčešće dolazi u anorganskom obliku kao oksidiran trovalentni arsenit (As(III) ili peterovalentan arsenat (As(V))) i to $H_2AsO_4^-$;$HAsO_4^{2-}$;H_3AsO_3 i $H_2AsO_3^-$. Redoks potencijal i pH vrijednost glavni su čimbenici koji utječu na oblik arsena u vodi. Kod snižene pH vrijednosti (< 6,9) dominantan oblik je $H_2AsO_4^-$, dok je pri višim pH vrijednostima to $HAsO_4^{2-}$. [9]

2.4.Klinička slika trovanja arsenom

Otrovnost arsena i njegovih spojeva ovisi i mijenja se s brojem valencija. Na osnovi istraživanja smatra se da trovalentni oblici arsena reagiraju sa tiolnim (-SH) skupinama u vitalnim staničnim enzimima, poglavito piruvat oksidazi, čime dolazi do kočenja reakcija u Krebsovom ciklusu i tako se onemogućava razgradnja ugljikohidrata, masti i bjelančevina. To dovodi do smanjena oksidacije stanica i zato arsen djeluje paralitički na glatku muskulaturu krvnih žila čime se svrstava u vaskularne otrove. Ovaj mehanizam djelovanja osnova je pojačanja permeabilnosti malih krvnih žila probavnog trakta i teške slike akutnog otrovanja. Paraliza glatkoga mišića žila također uzrokuje širenje krvnih žila, pa je posljedica oštećenje

srca i krvnih žila. Arsen djeluje na DNK, zbog čega mu se pripisuje mutageno i kancerogeno djelovanje.

Nakon resorpcije iz probavnog trakta, pluća i putem kože, arsen se kratkotrajno, do 24 h, zadržava u krvnom optoku vezan uz globulinsku frakciju hemoglobina, a toksičniji trovalentni spojevi prevode se u manje toksične peterovalentne, te na kraju u organske spojeve arsena. Prosječno biološko poluvrijeme izlučivanja iznosi 10 sati za anorganske i 30 sati za organske spojeve arsena. Bubreg je najvažniji put izlučivanja iz organizma. Koncentracija arsena u urinu odraz je izloženosti unutar 1-3 dana, u općoj populaciji iznosi do 50 μgL^{-1}, u profesionalno izloženih osoba ne smije prijeći 70 μgL^{-1} – to je biološka granična vrijednost, a količina od 200 μgL^{-1} znak je akutnog trovanja. Arsen je kumulativni otrov i pohranjuje se u organizmu, a zbog svoje karakterističnosti i sklonosti prema –SH skupinama prisutnim u kreatininu i aminokiselinama cisteinu i cistina (dimer cisteina (S-S veza)), najviše se pohranjuje u noktima,kosi i koži. Nastali talozi u kosi i noktima mogu se otkriti već nakon 2 tjedna izloženosti, a najčešće nakon nekoliko mjeseci, pa čak i godina. Koncentracija arsena u kosi i noktima služi kao biološki pokazatelj izloženosti arsenu u zdravstvenom nadzoru profesionalno izloženih osoba. U općoj populaciji nađe se oko 1 ppm arsena u uzorku kose, količina od 0,1 do 0,5 mg upućuje na kronično, a količina od 1 do 3 mg upozorava na akutno otrovanje. .[7]

Akutno trovanje najčešće se pojavljuje nakon gutanja kontaminirane hrane ili vode, a u profesionalnoj je izloženosti rijetkost. Ono se očituje probavnim smetnjama, primjerice grčevima u trbuhu, povraćanjem, mirisom po češnjaku. Srčane smetnje očituju se promjenama u EKG snimci- aritmijom(poremećen srčani ritam), hipotonijom (slab tonus mišića), ventrikularnom tahikardijom i fibrilacijom, sve do kardinalnog šoka. Od neuroloških simptoma prisutna je glavobolja, vrtoglavica, kolvulzije (zdravstveno stanje u kojem se mišići brzo grče i opuštaju čime uzrokuju nekontrolirano trzanje tijela), a nerijetko nastaje koma. Žutica, oligurija (smanjen volumen mokraće u 24 h(< 500 mL)), proteinurija (povećana količina proteina u urinu(<200 mg/24 h) i hematurija (krv u mokraći) simptomi su pojava kojih je posljedica oštećenja bubrega i jetre. Zbog djelovanja arsena na dišni sustav dolazi do pečenja, crvenila sluznice očiju, nosa i ždrijela, kašlja i bolova u prsnome košu. Podkožno otrovanje očituje se kožnim promjenama, primjerice znojenjem, akutnim dermatitisom i čirevima.

Kronični tip trovanja obuhvaćava gotovo većinu sustava: srčano-žilni, kožni, dišni, periferno-živčani sustav i jetru. Posljedica kronične izloženosti pojava je i promjena na kromosomima u obliku kromosomskih aberacija čime se očituje mutageno djelovanje, dok se kancerogeno djelovanje očituje karcinomom kože i pluća, angiosarkom jetre, limfomom i leukemijom. Otrovanje arsinom uzrokuje hemolizu već unutar 2-24 h nakon udisanja, a otrovanje može završiti akutnim zatajenjem bubrega i uremijom. [7]

3. Kemijski senzori za arsen

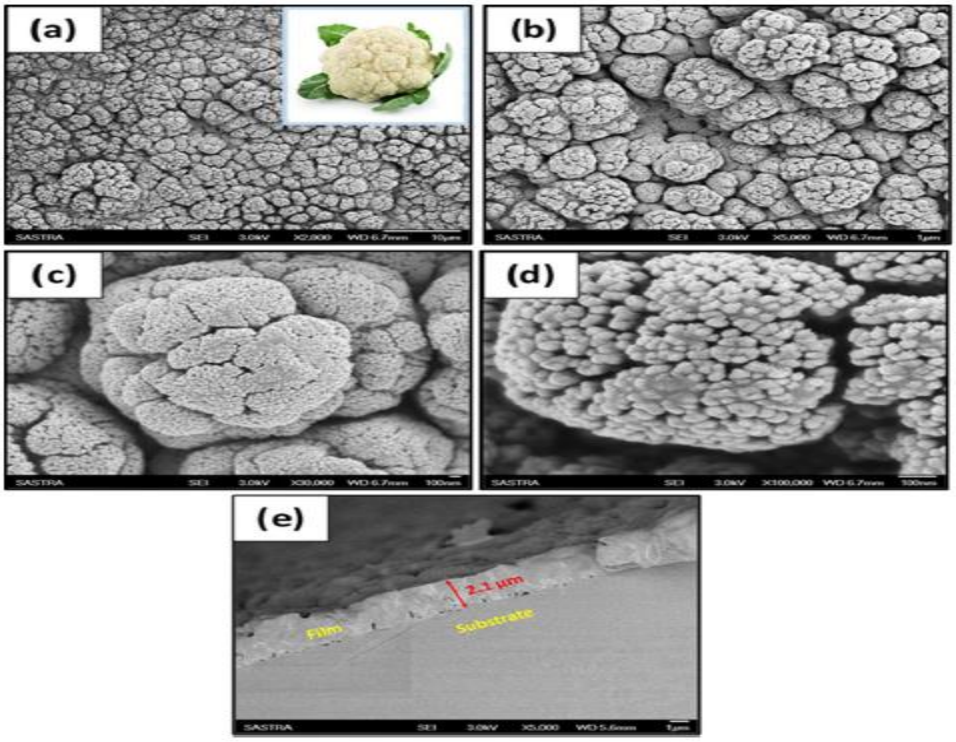
3.1 Elektrokatalitički strukturni fluor dopirani CdO tanki film senzor za arsen

Fluor dopirani kadmijev oksid (F-dopirani CdO) tanki film ima strukturu sličnoj cvjetači u kojoj tanki film djeluje elektrokatalitički u redoks reakcijama arsena u vodi. F-dopirani CdO tanki film ima granicu detekcije od 4.55×10^{-3} ppb što je manje od maksimalno dopuštene koncentracije (10 ppb) za arsen u vodi za piće.

FE-SEM (polje emisijski skenirajući elektronski mikroskop) mikrograf fluor dopiranog CdO tankog filma prikazani su na četiri različita uvećanja na slici 3.(a-d). Ti mikrografi su otkrili stvaranje filma s oblikom nano strukturnih cvjetača. Film se sastoji od pažljivo upakiranih kuglastih građevnih blokova koji su gotovo homogeno raspoređeni na podlozi. Detaljniji pogled na FE-SEM sliku pod povećanjem pokazuje da svaki kuglasti građevinski blok je sastavljen od nekoliko sferno oblikovanih zrna grubo raspoređenih u rasponu veličina od 30 nm do 60 nm. Debljina F-dopiranog filma s karfiolnom strukturom je promatrana pomoću FE-SEM. Slika prikazuje poprečni presjek F-dopiranog CdO filma dužine 2.1 μm. EDS spektar F-dopiranog CdO tankog filma je prikazan na slici. Potvrđena je prisutnost kadmija, kisika i fluora. Prisutnost zlatnog (Au) pika, koji se ne očekuje u ovom filmu, je rezultat raspršenog zlata koji se koristio prije snimanja kako bi se uklonili učinci punjenja. Kada je raspršena vodena otopina kadmijevog acetata dihidrata i amonijev fluorid na vruću podlogu, dogodio se

termički raspad vodene otopine gdje je dobiven žućkasti film koji dobro prijanja na podlozi. Kemijska reakcija tijekom stvaranja filma dana je sljedećom jednadžbom:

$$Cd(CH_3COO_2) \text{ x } 2\ H_2O + H_2O \xrightarrow{523K} CdO + CH_4 \uparrow + H_2 \uparrow + CO_2 \uparrow \quad (1)$$



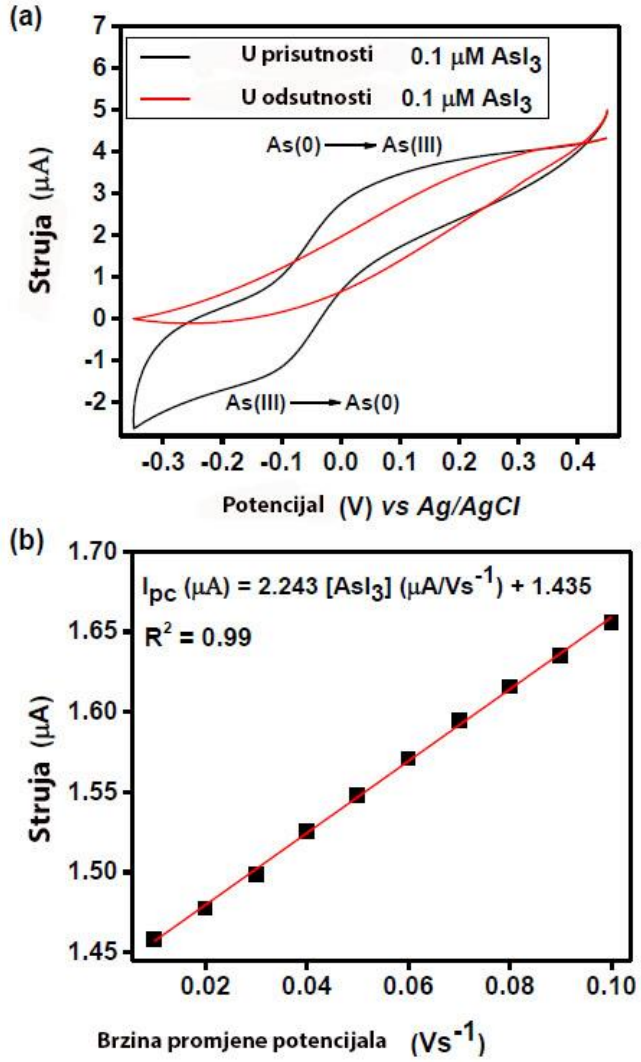
Slika3.Slika snimljena FE-SEM mikroskopom pod različitim povećanjem: a) 2000 x, b) 5 000 x, c) 30 000 x, d) 100 000 x, e) poprečni presjek F-dopiranog CdO tankog filma [11]

Kinetika rasta ima ključnu ulogu u određivanju oblika tih nanostruktura. U prikazanoj reakciji, CdO kristali u početku nastaju od Cd^{2+} i OH^- iona, tijekom hidrolize kadmija stvara se hidroksid. Kako je ta otopina raspršena na vruću podlogu, prekursor prolazi kroz termičku razgradnju i nukleaciju gdje se formiraju CdO klasteri.

Pri sobnoj temperaturi mjereni su elektroničke karakteristike F-dopiranog CdO tankog filma metodom van der Pauw-a. F-dopirani CdO tanki film izlaže se električnoj vodljivosti 8.563 Ω^{-1} cm^{-1}, ukupna koncentracija naboja iznosi 1,64x 10-16 cm^{-3} s koeficijentom -396,13 cm^3 C^{-1}. Negativna vrijednost koeficijenta ukazuje na dominaciju negativno nabijene elektronske

gustoće čime je potvrđen n-tip poluvodiča takvog F-dopiranog CdO tankog filma. Ovaj filma je pokazao otpornost od 0.13 Ωcm, površnu koncentraciju od 8.18 x 10^{-12} cm^{-2}, i pokretljivost od 3151 cm^2 V^{-1} s^{-1}.

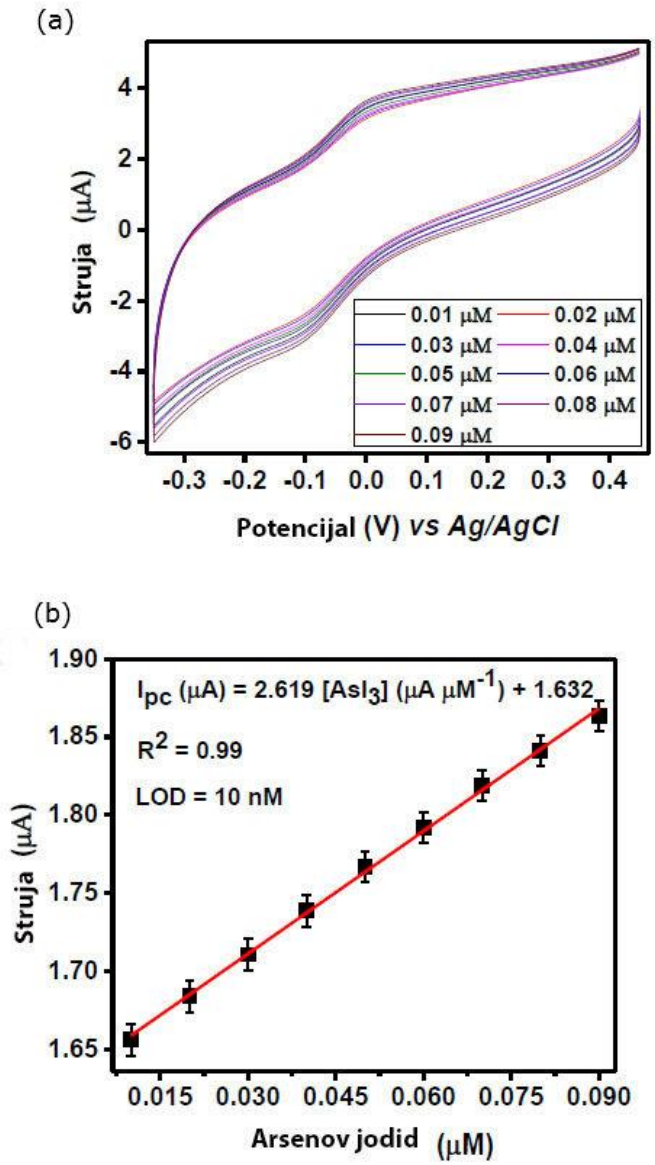
Slika 4.a i b prikazuje cikličke voltamograme F-dopiranog CdO tankog filma kao radne elektrode u prisutnosti i odsutnosti AsI_3 ($c(AsI_3)$= 0,1 μM). F- dopirani CdO tanki film nema katodni vrh u primijenjenom potencijalnom rasponu zbog odsutnosti AsI_3 na površinu F-dopiranog CdO tankog filma. Nakon dodavanja AsI3, struja oksidacije i redukcije je povećana na F-dopiranoj CdO elektrodi, što ukazuje da elektroda ima katalitički učinak na reakciju AsI_3. Kadodni pik opažen pri potencijalu od -0,10 V (vs. Ag/AgCl) posljedica je redukcije As(III) na As(0). S druge strane anodni pik na +0,05 V(vs. Ag/AgCl) posljedica je oksidacije As(0) na As (III)



Slika 4. (a) Usporedba cikličkih voltametrijskih krivulja za F-dopirani CdO film u prisutnosti AsI_3 ($c(AsI_3)$= 0,1 μM), (b) Graf ovisnosti struje o brzini promjene potencijala s AsI_3 ($c(AsI_3)$= 0,1 μM), u rasponu brzina potencijala od 0.01 do 0,1 Vs^{-1}[11]

Omjer katodne i anodne struje za F-dopirani CdO elektrodu je veći od vrijednosti 1.35 , što pokazuje da F-dopirani CdO elektroda može prenijeti veći broj elektrona u katodnom procesu nego u anodnom. Na temelju usporedbe i analize, katodni proces je objašnjen u daljnjem eksperimentu. Slika 5. a prikazuje ovisnost struje o brzini promjene potencijala (0,01 do 0,1 V s^{-1}) Dobra linearnost (Ipc (μA)= 2,243 [AsI_3] (μA uM^{-1}) + 1,435, R^2= 0,99) između katodne struje i brzine promjene potencijala je dobivena u rasponu od 0,01-0,1 V s^{-1}, što ukazuje da je elektroaktivan arsen adsorbiran na F-dopirani CdO elektrodnu površinu. Štoviše, u rasponu snimanja od 0,11-0,26 Vs^{-1}, separacija između dva potencijalna pika je

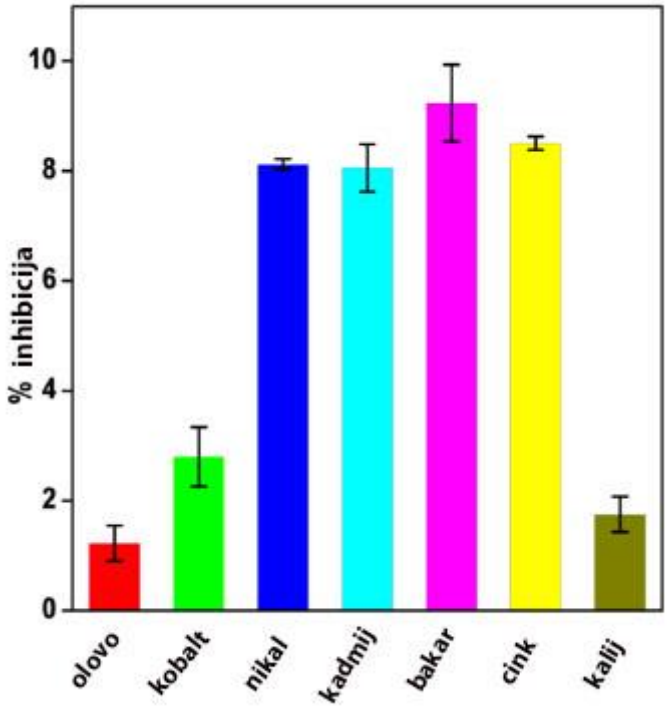
veći od 60 mV, što znači da adsorbiran arsenov jodid podliježe kvazirevezibilnom elektrokemijskom procesu. Slika 5. b pokazuje ciklički voltametrijski odgovor F-dopiranog CdO tankog filma u NaCl-u (c(NaCl)= 0,4 M) , pH= 7,4 za različite koncentracije arsenovog jodida od brzine promjene potencijala od 0,1 V s^{-1}. Uočeno je da dodavanjem arsenovog jodida raste strujni katodni vrh. Za F-dopiranu CdO elektrodu, linearno područje za identifikaciju arsena je između 4,55- 41 ppb (Ipc (μA) = 2.619 [AsI_3] (μAμM^{-1}) + 1.632, R^2 = 0.99), slika 5. b Granica detekcije (LOD= 3 Sb/ nagib, gdje je Sb standardna devijacija struje u nedostatku AsI_3 i nagiba osjetljivosti na F-dopiranu CdO elektrodu) je procijenjena iz kalibrirane linearne krivulje 4,55x10^{-3} s osjetljivošću od 5,747 x 10^{-3} μA ppb^{-1}. F-dopirani CdO tanki film ima granicu detekcije od 4,55 x 10^{-3} ppb što je manje od granice Svjetske zdravstvene organizacije (10 ppb) za arsen u vodi za piće. Osim toga, također senzor ima ponovljiv strujni odziv (srednja vrijednost odziva 2,8 μA) sa relativnom standardnom devijacijom od 3,7 %.



Slika 5. (a) Odziv cikličke voltametrije F-dopiranog tankog filma u NaCl-u (c(NaCl)= 0.4 M) (pH= 7,4) za različite koncentracije AsI_3 na brzini promjene potencijala od 0,1 Vs^{-1}, (b) Kalibracijska krivulja odstupanja za AsI_3 u rasponu koncentracija od 0,01 do 0,09 μM [11]

Selektivnost razvijene F-dopirane CdO elektrode potvrđena je mjerenjem inhibicije u prisustvu Pb^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} i K^{+} iona koncentracije od 0,5 uM, rezultati su prikazani na slici 6. Svi ovi metalni ioni imaju inhibiciju manju od 9 % što znači da razvijena F-dopirana CdO elektroda ima visoku selektivnost (84,5 %) prema As^{3+} ionima. Nadalje selektivnost koeficijenata (jednadžba 2) i omjer odziva (jednadžba 3) su također potvrdili selektivnost razvijene F-dopirane CdO elektrode prema As^{3+} ionima (Tablica 5). Niže vrijednosti selektivnosti koeficijenata i odziv omjera je pokazala da ometajući ioni nisu

selektivni za F-dopirani CdO elektrodu. Operativna stabilnost F-dopiranog CdO elektrode je potvrđeno da sadrži 91 % osjetljivosti u periodu od 30 dana.



Slika 6. Prikaz inhibicije ometajućim ionima, [11]

Selektivni koeficijent ($K_{i,j}^{amp}$)=$\frac{\Delta I_j}{\Delta I_t - \Delta I_j}$ x$\frac{\Delta c_i}{\Delta c_j}$ (2)

Odziv omjera ($R_{i,j}$) = $\frac{\Delta I_j}{\Delta I_i}$ (3)

Tablica 5. Selektivnost i odziv omjera F-dopiranog CdO kod detekcije As^{3+} iona u prisutnosti ometajućih iona [11]

Ometajući ion	**Arsen**	
	Selektivni koeficijent($K_{i,j}^{amp}$)	Odziv omjera ($R_{i,j}$)
Ni2+	0.018	0.018
Co2+	0.136	0.110
Zn2+	0.143	0.125
K+	0.026	0.025
Cu2+	0.157	0.130
Cd2+	0.134	0.118
Fe3+	0.043	0.041

Gdje je ΔI_i strujni odziv otopine analita, ΔI_j strujni odziv ometajuće otopine, ΔI_t je amperometrijski strujni odziv mješovite otopine, C_i koncentracija analita koji mjerimo, a C_j koncentracija ometajućih iona.

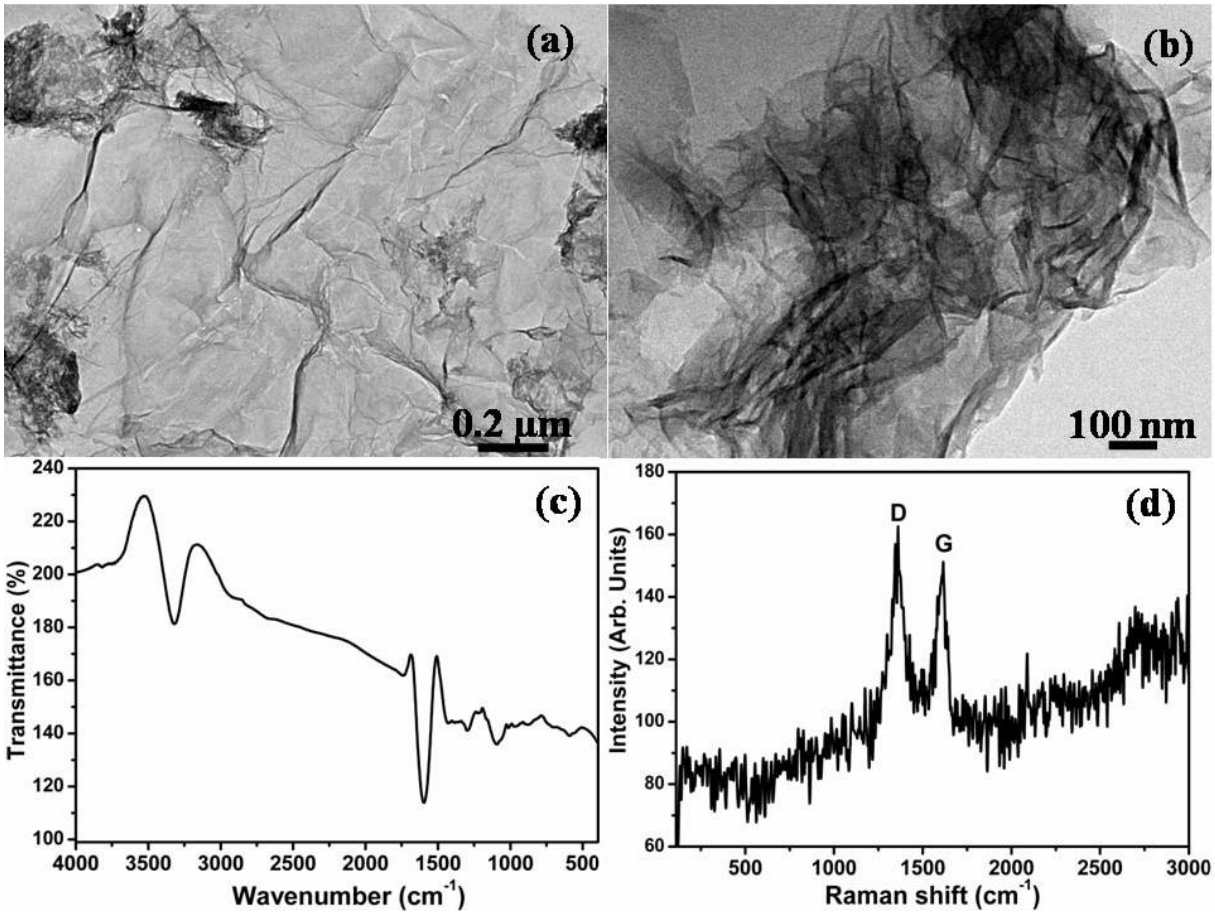
Zaključno, F-dopirani CdO tanki film je uspješno korišten za identifikaciju arsena u vodenim uzorcima. Ovaj senzor je više ekonomičniji za razliku od postojećih senzora s boljom granicom detekcije koja je niža od granice Svjetske Zdravstvene Organizacije za arsen. Budući da je F-dopirani CdO tanki film ekonomičan, ponovljiv, a također je više prikladan za elektrokemijsku analizu zbog bolje katalitičke djelotvornosti, ovim tipom senzora moguće je određivati arsen u vodi. [11]

3.2. Selektivni arsenov senzor baziran na ultra tankom grafenovom oksidu

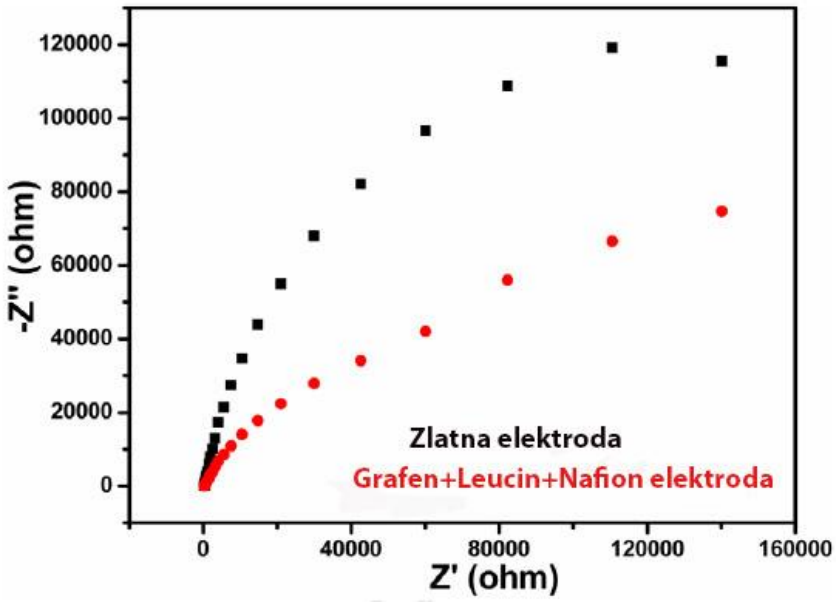
Izrađen je i okarakteriziran vrlo osjetljiv i selektivan elektrokemijski senzor za otkrivanje arsena koji koristi L-leucin kao element prepoznavanja, a temelji se na grafenovom oksidu. Izrađen senzor ima visoku osjetljivost od 30 μA ppm^{-1} cm^{-2} s granicom kvantifikacije od 0.5 ppm. Proizveden senzor je primjenjen u analizama realnih ekoloških uzoraka.

Opća morfologija pripremljenog GO (grafenovog oksida) je ispitana transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM). Slika 7. (a) i (b) pokazuje strukturu stabilnog, ultra

tankog (nano veličine), prozirne, suptilne bore poput svile. Nano listovi imaju veliku gustoću i sadrže nekoliko slojeva. Veličina tih nano listova je u rasponu od nekoliko stotina nanometara do nekoliko desetaka mikrometara (slika 7b). Kemijski sastav tako pripremljenog grafenovog nano lista je ispitivana Fourievom transformacijom infracrvene spektroskopije (slika 7 c). Vrh pika koji se pojavio između 3250-3000 cm^{-1} može se objasniti vibracijama OH skupina u molekulama vode. Vrh vibracije OH skupine je vidljiva na valnom području na 1350 cm^{-1}. Mali apsorpcijski vrh pojavljuje se na 2915 cm^{-1} zbog asimetričnog istezanja CH_2 skupine. Drugi pikovi nastali na valnom području pri 1630 cm^{-1} i 750 cm^{-1} su rezultat vibracije C=O i C=C skupine. Ovi pikovi se pojavljuju zbog činjenice da su na rubovima grafenovog oksida prisutne slobodne karboksilne i karbonilne grupe. Pik koji se pojavljuje na valnom području od oko 1100 cm^{-1} predstavlja vibraciju alkoholne skupine (-COH). Pripremljeni GO nano listovi opisani Ramanovom spektroskopijom (slika 7 d), koji pokazuje dva dobro definirana pika na valnom području na 1353 cm^{-1} (D pik) i 1593 cm^{-1} (G pik). D pik odgovara fotonima u k točkama u A_{1g} simetriji i D pik koji je povezan s E_2g fotonom sp^2 ugljikovog atoma. Nadalje, sintetizirani GO se koristi kao efikasni elektrodni materijal za izradu osjetljivog i selektivnog biosenzora za identifikaciju arsena. Obično se koriste zlatne elektrode koje su modificirane s GO i L-leucinom (Au/GO/Leucin/ Nafion elektroda) i ispitivane su osjetilne performanse cikličkom voltametrijom na sobnoj temperaturi. Za usporedbu, provođena je impedancija modificirane i gole elektrode, a rezultati su prikazani slikom 8. Rezultati su pokazali značajno smanjenje otpora modificirane elektrode, što znači da GO poboljšava proces provođenja struje i na taj način smanjuje otpor modificirane elektrode. U stvari, slojevi GO ponašaju se kao konduktor koji povećava osjetljivost sustava supstrat/elektroda, povećanjem prijenosa elektrona između faza. Dakle, slojevi GO daju veliku površinu kojom je omogućeno prepoznavanje bioelemenata i analita.

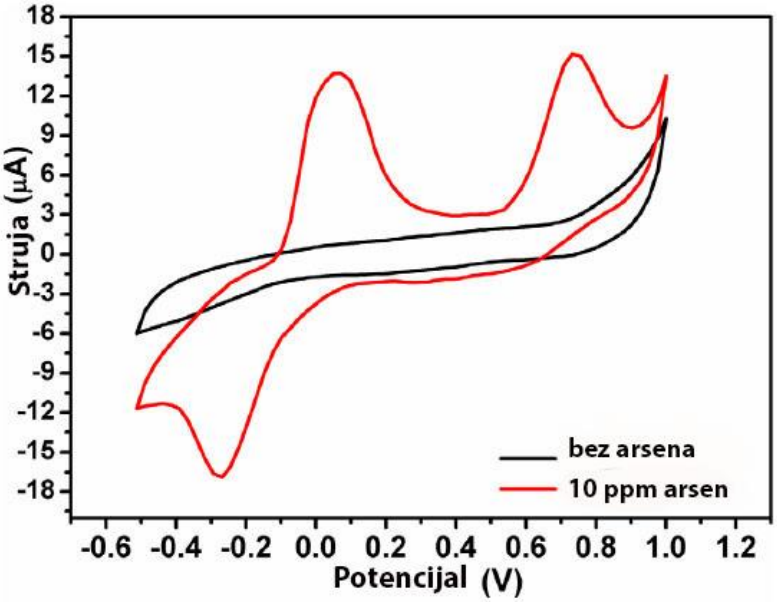


Slika7. (a) Slika grafenovog oksida običnim mikroskopom, (b) Slika grafenovog oksida dobivena transmisijskim elektronskim mikroskopom, (c) FTIR i (d) Ramanov spektar pripremljenog grafenovog oksida [12]



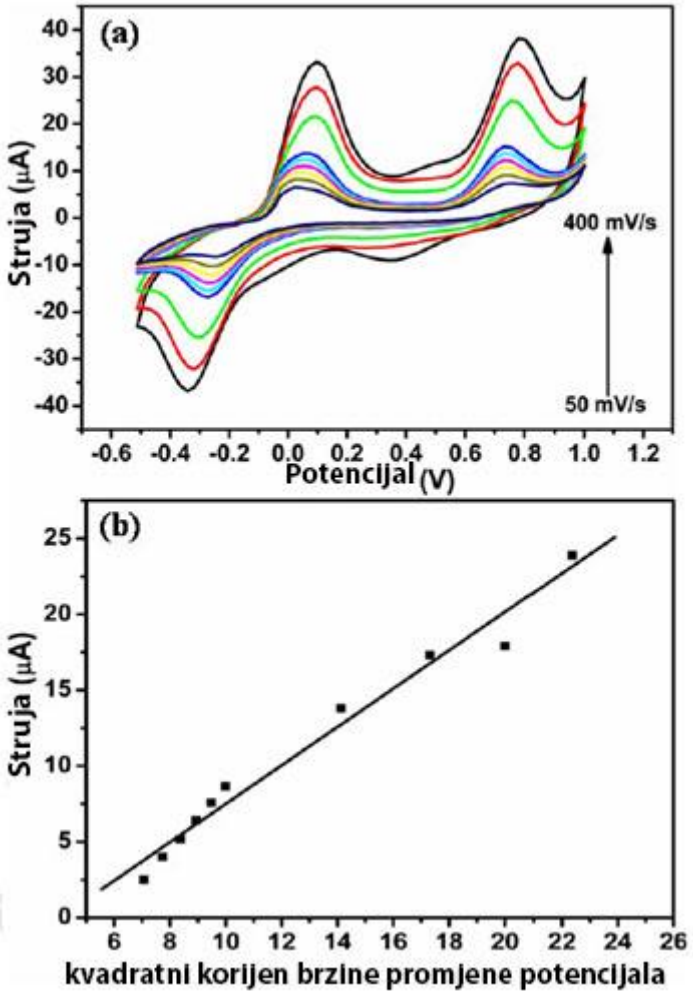
Slika8.Graf impedancije dobiven za zlatnu elektrodu i Grafen+leucin+nafion elektrodu [12]

Slika 9. predstavlja ponašanje modificirane elektrode prema arsenu. Kao što je vidljivo iz grafa cikličkog voltamograma, u odsutnosti arsena nema elektrokemijskog odziva, nakon dodatka 10 ppm arsena došlo je do elektrokemijske reakcije pri brzini od 100 mV s^{-1}. Prisustvo arsena proizvodi tri dobro definirana pika. Pikovi na 0,1 V i 0,78 V su anodni pikovi oksidacije, dok vrh na -0,25 V pripada katodnom vrhu redukcije. Pik na području od 0,1 V odgovara oksidaciji As^0 na As^{3+} i pik na području 0,75V koji odgovara oksidaciji As^{3+} na As^{5+}. Priroda identifikacije arsena preko modificirane elektrode dodatno je ispitana proučavanjem utjecaja brzine promjene potencijala.



Slika 9. Ciklički voltamogram bez (crna linija) i sa (crvena linija) 10 ppm arsenom u citratnom puferu (c(citrat)= 0.1 M)) (pH=5) kod brzine promjene potencijala 100 mVs^{-1}[12]

Slika 10. prikazuje odziv cikličkog voltamograma modificirane elektrode s 10 ppm arsena u otopini citratnog pufera, pH= 5 s različitim brzinama promjene potencijala (50 mV s^{-1}- 400 mV s^{-1}). Povećanjem brzine promjene potencijala, rastu vrhovi oksidacije i redukcije. Nadalje pomicanjem vrhova s povećanjem brzine promjene potencijala, ukazuje da je proces pod difuzijskom kontrolom. Slika 10. a prikazuje odzive cikličkih voltamograma pri različitim koncentracijama u rasponu arsena od 5 ppm do 50 ppm. Vidljivo je kako povećanjem koncentracije arsena dolazi do povećanja anodnog vrha oksidacije i katodnog vrha redukcije. Nadalje, uočeno je da pri pH=5, pokazuje poboljšan odziv na konverziju As(III) na As(V) slika 10 .

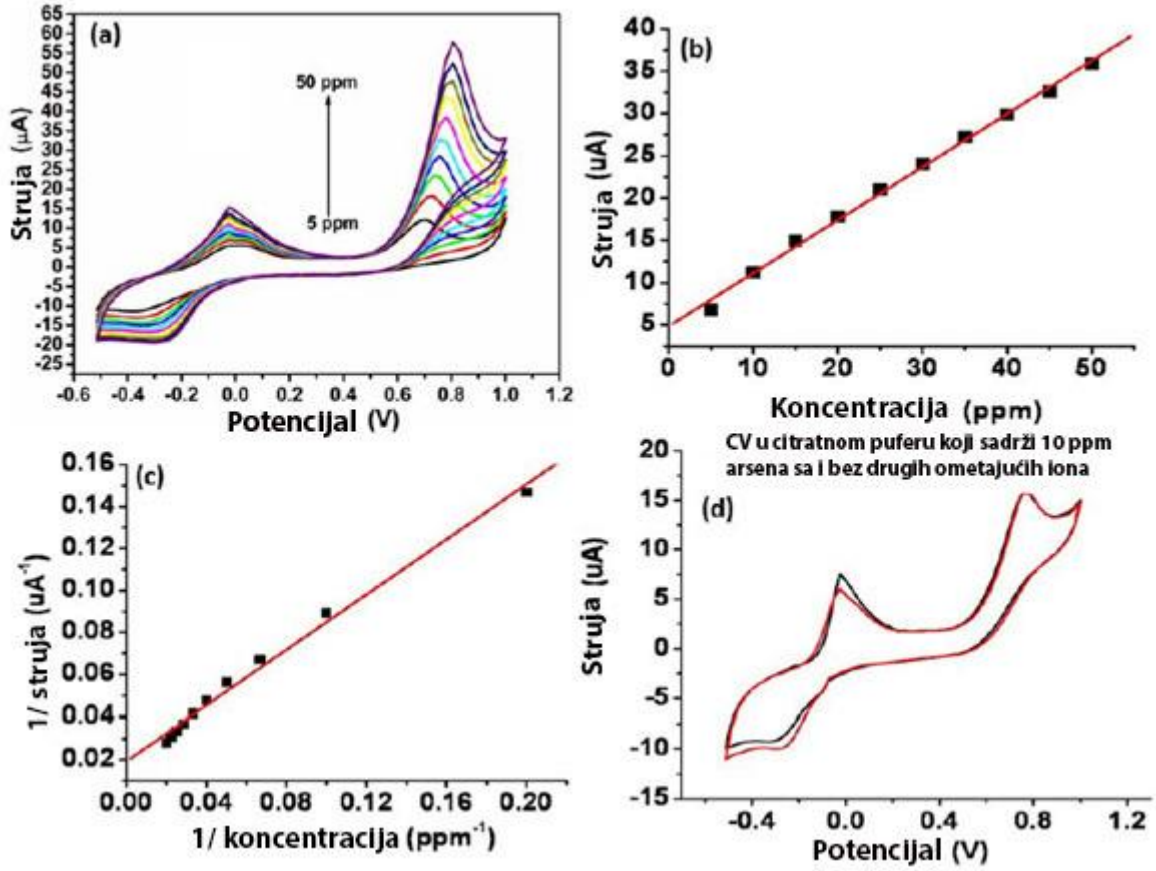


Slika 10. (a) Ciklički voltamogram modificirane Au/GO/Leucin/Nafion elektrode u citratnom puferu (sadrži 10 ppm arsena) kod različitih brzina promjene potencijala, (b) Graf prikazuje odnos kvadratnog korijena brzine promjene potencijala u ovisnosti o struji [12]

Na temelju krivulje odziva na slici 11.a , dobiven je graf ovisnosti struje u odnosu na koncentraciju. Osjetljivost proizvedenog senzora je izračunata iz grafa ovisnosti struje o koncentraciji i dobivena je vrijednost od 30 $\mu Appm^{-1}cm^{-2}$. Vremenski odziv je manji od 2 sekunde i granica detekcije za modificiranu Au/GO/ Leucin/Nafion iznosi 0,5 ppm.

Selektivnost dobivenog senzora je potvrđena cikličkom voltametrijom modificirane Au/GO/Leucin/Nafion elektrode s 10 ppm otopine arsena u prisustvu drugih ometajućih iona poput Zn^{2+}, Pb^{2+}, Hg^{2+}, Cd^{2+} iste koncentracije. Slika 11.d predstavlja odziv cikličkog voltamograma modificirane elektrode za koncentraciju 10 ppm arsena u prisutnosti i

odsutnosti drugih ometajućih iona pri brzini promjene potencijala od 200 mVs^{-1}. Rezultati mjerenja su pokazali kako nema mnogo razlika u dva odziva snimljenih na moguće inteferencije. To dokazuje da modificirana Au/GO/Leucin/Nafion elektroda može selektivno Identificirati arsen u vodama.



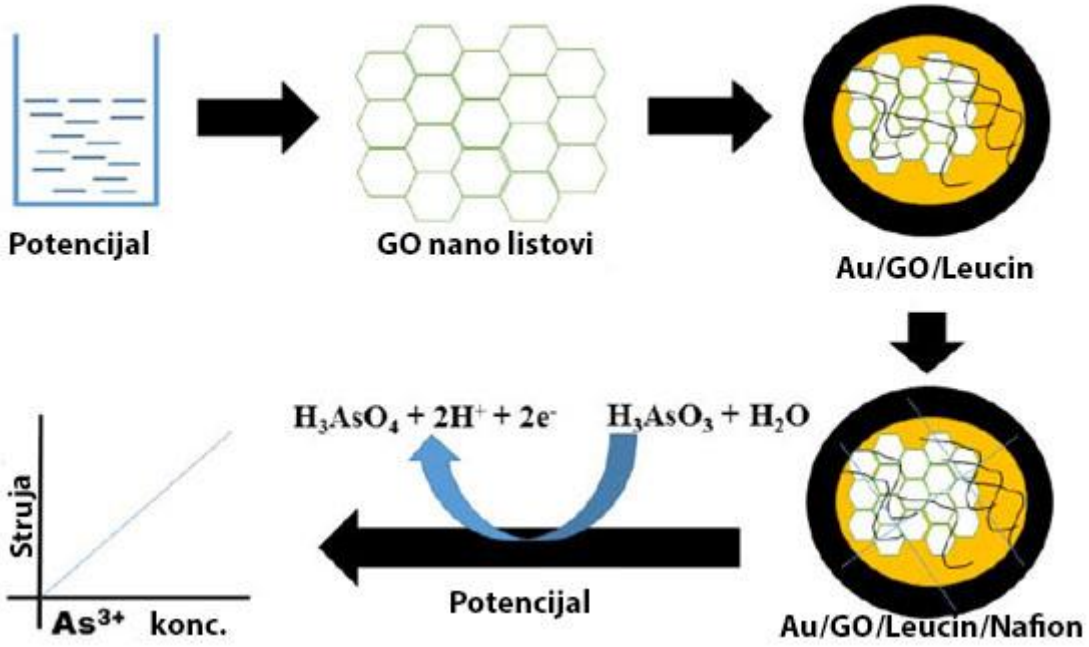
Slika11. (a) odziv cikličke voltametrije modificirane elektrode kod različitih koncentracija arsena, (b) Graf ovisnosti koncentracije arsena o struji, (c) Graf ovisnosti inverzne koncentracije arsena o inverznoj promjeni struje, (d) odziv cikličke voltametrije modificirane elektrode u prisutnosti i odsutnosti ometajućih iona [12]

Slika 12. prikazuje shematski prikaz modificirane Au/GO/Leucin/Nafion elektrode za identifikaciju arsena. Uočeni rezultati jasno pokazuju da modificirana elektroda učinkovito se koristi za identifikaciju arsena u različitim uzorcima kod pH=5. Pomak pika s povećanjem koncentracije arsena ukazuje da je proces pod difuzijskom kontrolom. Tu je uočena i promjena preostalih dva pika, ali promjena pika As(III) do As(V) je puno značajnija kod

pH=5. Ta razlika se može objasniti činjenicom da je došlo do formiranja leucin-OH kompleksa koji čini senzor više osjetljivim prema As(III) ionu prema sljedećem mehanizmu

$$H_3AsO_3 + H_2O \rightarrow H_3AsO_4 + 2\,H^+ + 2\,e^- \qquad (4)$$

Nadalje, provjerena je stabilnost Au/GO/Leucin/Nafion elektrode tako da je isprana s citratnim puferom i pohranjena na 4°C tijekom jednog mjeseca, nakon čega je elektroda imala učinkovit odziv na detekciju arsena. To potvrđuje korisnost predložene elektrode za učinkovitu identifikaciju arsena u manje vremena.



Slika 12.Shematski prikaz modificirane Au/GO/Leucin/Nafion elektrode za identifikaciju arsena[12]

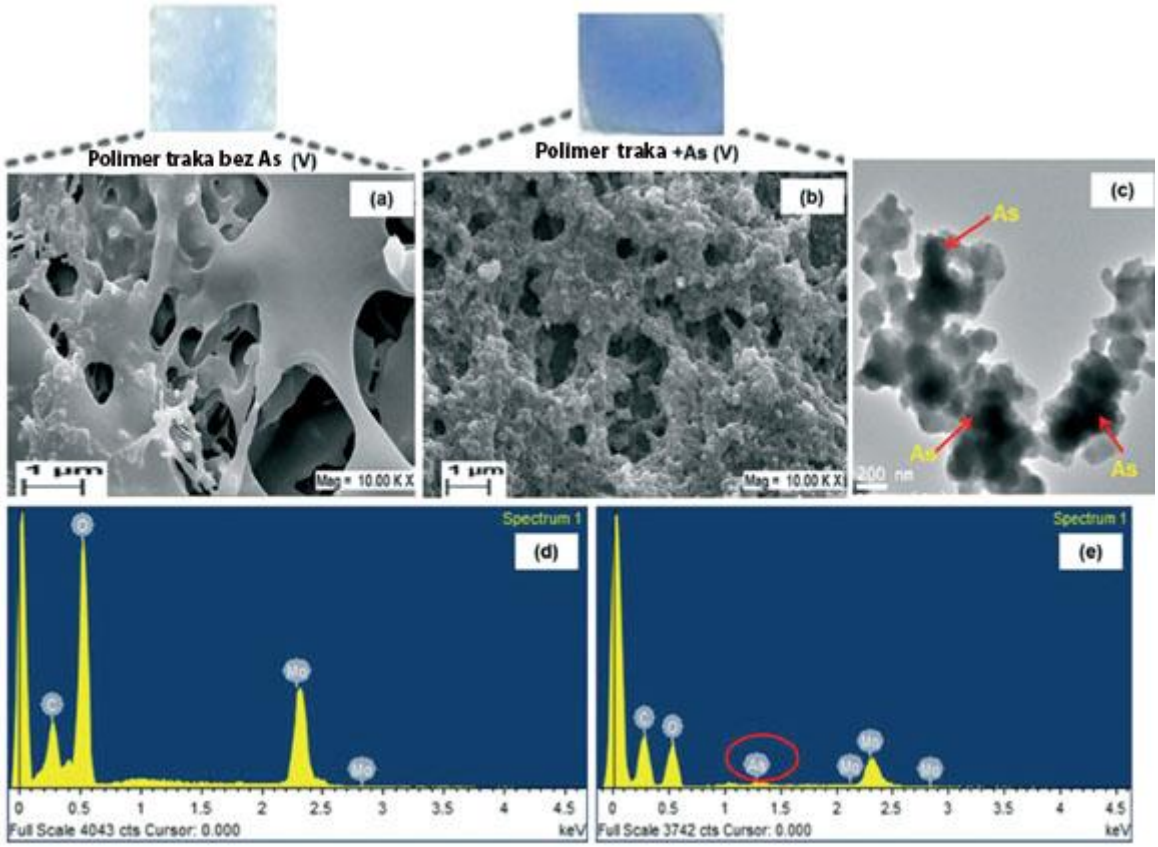
Zaključno, predstavljena je izrada i karakterizacija osjetljivog i selektivnog arsenovog senzora pomoću L-leucina kao element biološkog prepoznavanja na temelju grafenovog oksida. Modificirana elektroda pokazuje izvrsnu osjetljivost približno 30 μA $ppm^{-1}cm^{-2}$ uz najnižu granicu detekcije od 0,5 ppm. Zbog veće specifične površine senzor ima poboljšanu osjetljivost na prijenos elektrona između L-leucin modificiranog grafenovog oksida i elektrode. Izrađen senzor je također pokazao visoku selektivnost, jer metalni ioni poput cinka,

olova nemaju utjecaj na rezultate mjerenja kod rutinskog određivanja arsena u vodi za piće. [12]

3.3. Kolorimetrijski senzor za određivanje arsena u vodi za piće

Istražen je i predstavljen novi polimerni hidrogel kolorimetrijski senzor za otkrivanje arsena(V). Metoda se temelji na stvaranju plavo obojenog antimonil-arseno- molibdenog kompleksa u prisutnosti amonijevog molibdata, kalijevog antimonil tartarata i askorbinske kiseline. Svi ovi reagensi se nalaze u polimernom hidrogelu koji se sastoji od polivinil alkohola, akrilamida i glutaraldehida. Plastične detektorske trake su obložene s ovim hidrogelom.

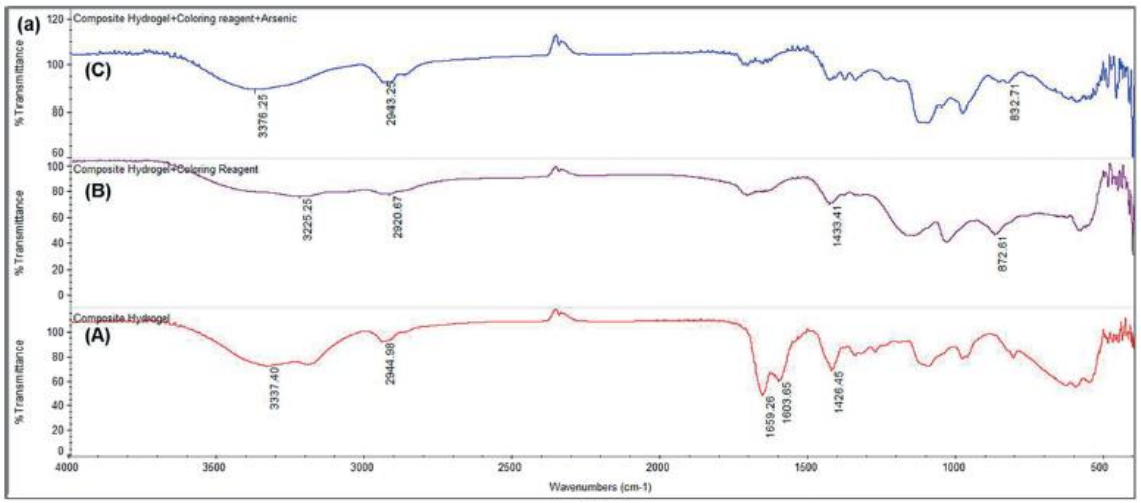
Slika 13.a pokazuje tipičnu SEM sliku MLPH-a (amonijev molibdat napunjen u PAM PVA hidrogelu) prije adsorpcije arsenata (namočene u vodi iz slavine). Vidljiva je porozna struktura gdje su pore međusobno povezane. Površina je glatka zbog amorfne prirode hidrogela i homogenog uklještenja molibdena unutar hidrogela. Odgovarajuće funkcionalne grupe za PAM (poliakrilamid), PVA, molibdate i As(V) mogu se potvrditi FTIR. Prisustvo As pikova unutar hidrogela je potvrđeno EDX analizom. Porozna struktura MLPH omogućuje adsorpciju arsenata iz vodene otopine, zbog učinkovite difuzijske udaljenosti koju kontrolira prosječna udaljenost između susjednih pora. Prema slici 13. b vidljivo je da nakon adsorpcije arsenata, morfologija hidrogela se promijenila. Površina je postala gruba zbog adsorpcije arsenata u hidrogel. Tamne regije viđene u TEM analizi (slika 13. b) posljedica su adsorpcije arsena unutar polimernog hidrogela.



Slika13.Mikroskopske slike:(a) Slika porozne strukture molibdena napunjenog s PAM-PVA kopolimerom u izvorskoj vodi bez arsena, (b)molibden napunjen s PAM-PVA kopolimerom nakon adsorpcije arsena, Slike dobivene spektroskopijom X –zrakama: (d) molibden napunjen PAM-PVA kopolimerom i (e) molibden napunjenPAM-PVA kopolimerom nakon adsorpcije arsena[13]

Na slici 14. je prikazan FTIR spektar MLPH prije i nakon adsorpcije arsenata. Široki pikovi na 3337 cm^{-1} (krivulja A), 3225 cm-1 (krivulja B) i na 3376 cm^{-1} (krivulja C) mogu se objasniti preklapanjem vezanog vodika za OH skupinu zbog ne reaktivnosti hidroksilnih veza u PVA polimeru i vibracije –NH veza u amonij molibdat tetrahidratu. CH istezanje se uočilo na valnom području 2944 cm^{-1} (krivulja A), 2920 cm^{-1} (krivulja B) i 2943 cm^{-1} (krivulja C). Specifična adsorpcijske vrpce prikazane su na krivulji A na valnom području na 1659 cm^{-1}, posljedica su C=O skupine, na 1603 cm^{-1} koji odgovara NH skupina i na valnom području od 1426 cm^{-1} koji pripada C-N stezanju (sve tri vrpce pripadaju amidnoj vezi) u PAM-u. Međutim prve dvije vrpce nestaju dok je treća vrpca pomaknuta na 1433 cm^{-1} u MLPH. To se događa zbog uklapanja molibdata unutar polimernog hidrogela (krivulja B). U krivulji B,

vrhunac se pojavljuje na 872 cm^{-1} zbog asimetrične vibracije Mo-O veze molibdata koji nestaje u krivulji C zbog stvaranja arsenato molibdenovog kompleksa. Karakteristična vrpca na 832 cm^{-1} zabilježena u spektru MLPH nakon adsorpcije arsenata (krivulja C) , posljedica je vibracije As-O veze. Ovaj pik nije prisutan u krivuljama A i B, jer se pojavljuje zbog adsorpcije arsenata u PVA koja je cijepljena PAM trakom.



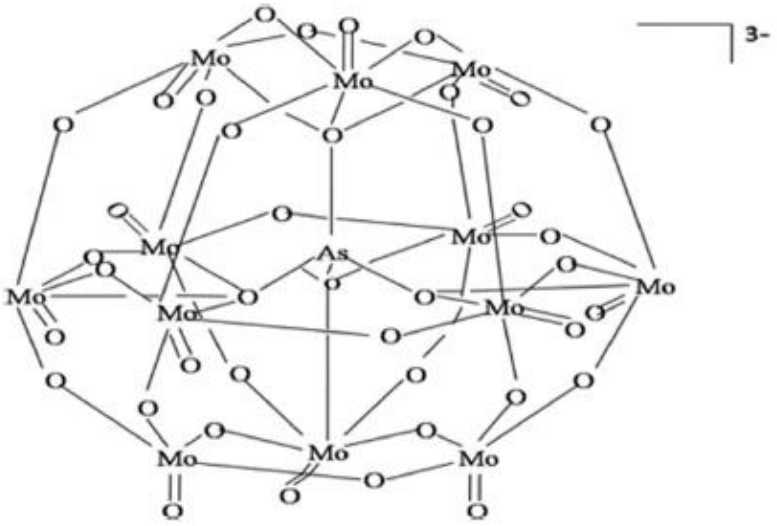
Slika 14. FTIR spektar (krivulja A) PAM-PVA polimer umrežen glutaraldehidom, (krivulja B) molibden napunjen PAM-PVA polimerni hidrogel, (krivulja C)molibden napunjen PAM-PVA polimerni hidrogel nakon adsorpcije arsena[13]

MLPH (prije i nakon adsorpcije arsenata) je okarakterizirano EDX-om (spektroskopijom X-zrakama). Odgovarajući EDX spektri MLPH-a prije adsorpcije As(V) slika 13.d pokazuje pikove koji odgovaraju ugljiku, kisiku, i molibdenu čime je potvrđena prisutnost molibdena na površini smjese. Prisutnost pika koji odgovara arsenu u EDX spektru slika 13.e, prikazuje sorpciju arsena u polimernoj matrici.

Poznato je da molibdenov oksid s arsenatom stvara hetero poli kiselinu (tj. antimonil arseno molibdenov kompleks) koji se pretvara u molibdensko modrilo u prisutnosti L- askorbinske kiseline (u redukcijskim uvjetima) (reakcije 5 i 6). Kalij antimonil (III) tartarat ubrzava reakciju. Ista reakcija događa se u fazi hidrogela nakon adsorpcije arsenata. Arsenov molibdenov kompleks prikazan je kemijskom strukturom na slici 15 .

$$AsO_4^{3-} + 12(NH_4)_2MoO_4 + 24H^+ \rightarrow (NH_4)_3AsO_4 \cdot 12Mo^{+6}O_3 + 21NH_4^+ + 12H_2O \quad (5)$$

$(NH_4)_3AsO_4 \cdot 12Mo^{+6}O_3$ + (redukcijsko sredstvo)→ (molibdensko modrilo) + (slabije redukcijsko sredstvo) (6)



Slika15. Struktura arseno molibdatovog kompleksa i formiranje α- Keggin aniona [13]

Standardna otopina arsenata u rasponu od 10 do 250 μg L^{-1} je korištena u ovoj metodi. Intenzitet plave boje se povećava povećanjem koncentracije arsenata. Za područja u kojima voda sadrži značajne količine arsena(III) zajedno s arsenom(V), arsen(III) se može oksidirati pomoću nekog oksidacijskog sredstva. Test u oksidiranim uzorcima daje vrijednost ukupnog arsena [arsen(III) + arsen(V)]. Takav senzor nije strogo ograničen samo na As(V), već neizravno može dati procjenu As(III) prema razlici [ukupan As – As(V)].

Optimalno vrijeme za stvaranje kompleksa je 20 minuta na sobnoj temperaturi. Senzor ima granicu kvantifikacije od 10 μgL^{-1} arsenata koji su prisutni u vodi (za vizualno promatranje). Trake mogu identificirati arsenate u vodi za piće u rasponu koncentracija od 10 do 250 μgL^{-1}.

Metodom detekcije arsenata korištenjem molidbenskog modrila kao senzora može imati interferenciju od strane fosfata u koncentracijama iznad 100 μgL^{-1}. Znači fosfati nemaju utjecaj na mjerenje arsenata sve dok mu je koncentracija manja od 100 μgL^{-1}. U slučaju željeza kao ometajućeg iona, nađeno je da u oba slučaja [3 mgL^{-1} željeza + 10 μgL^{-1} As(V) i 3 mgL^{-1} + 250 μgL^{-1} As(V)], boja senzora se poklapa s bojom trake koja je uronjena u otopinu arsenata masene koncentracije od 10 μgL^{-1} i 250 μgL^{-1} bez željeza.

Zaključno, opisan je polimerni hidrogel kolorimetrijski senzor na bazi traka koji je korišten za otkrivanje arsenata u vodi. Ovaj sistem je baziran na reakciji arsenata s amonijevim molibdatom čime se stvara arseno-molibdanov kompleks u prisutnosti askorbinske kiseline kao redukcijskog sredstva. Golim okom moguće je promjenom boje nakon uranjanja trake otkriti arsen do koncentracije od 10 μg L^{-1}. Senzorske trake pokazuju selektivnost u prisutnosti manje od 100 μg L^{-1} fosfata i manje od 3 mg L^{-1} željeza. Kolorimetrijskim senzorom identifikacija As(V) je jednostavna, izuzetno jeftina, precizna, prenosiva, jednostavna za korištenje za analizu vodenih uzoraka zbog vizualne identifikacije. Trake se također uspješno koriste za mjerenje totalnog arsena i fosfata s manjim promjenama u procesu mjerenja. Trake imaju stabilnost četiri mjeseca i mogu ih koristiti laici zbog već spomenute jednostavne uporabe. [13]

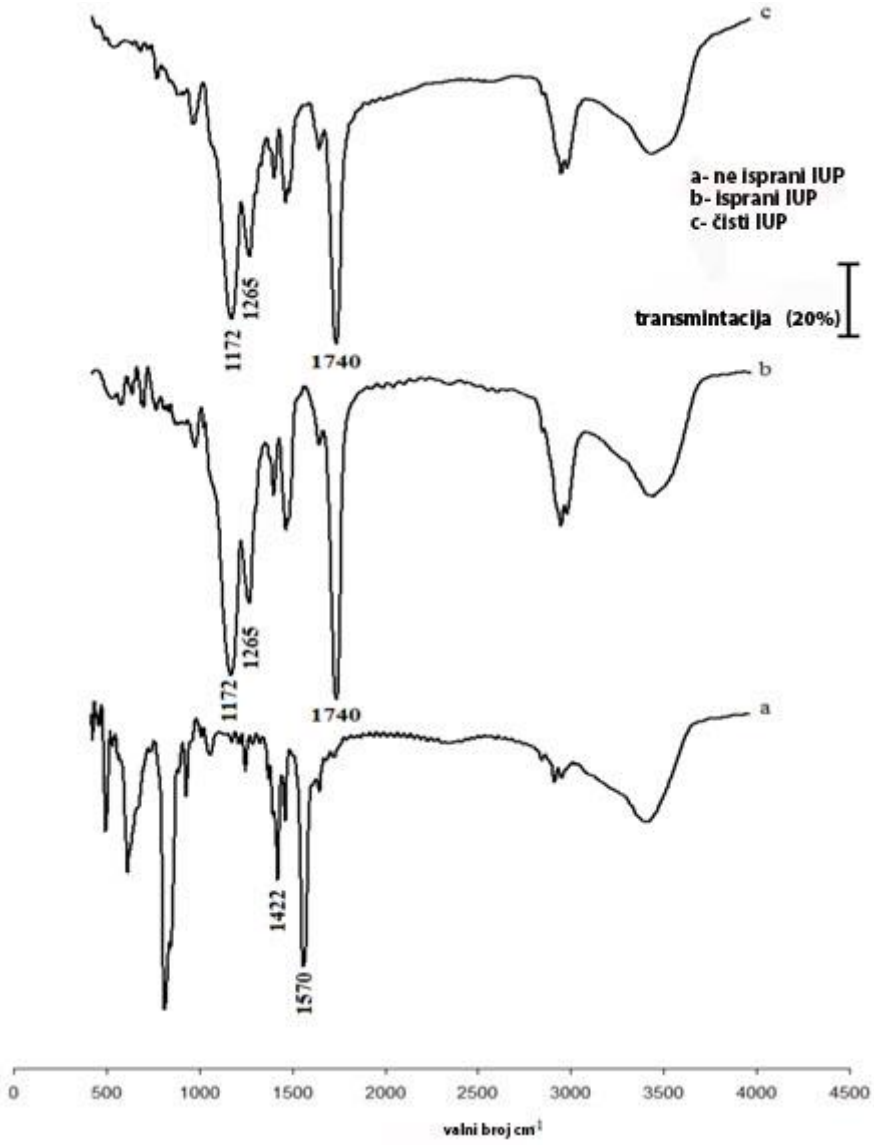
3.4.Primjena As ionski utisnutog polimera (IUP) kao membranske elektrode u potenciometriji

Ionski utisnut polimer (engl. *Ion imprinted polymer*) je primjer novosintentiziranog identifikacijskog elementa PVC membranske elektrode koja se koristi u potenciometrijskom određivanju arsena u vodama.

Nedavno je istražena i predložena nova priprema arsenovog utisnutog polimera korištenjem arsenovog metakrilata kao predloška za membransku elektrodu u potenciometriji. Za nano sintezu takvog As(III) utisnutog polimera korištena je precipitacijska polimerizacija. Metakrilatna kiselina i etilen glikoldimetil krilat su korišteni kao funkcionalni monomeri i vezna sredstva. Kako bi okružili funkcionalne monomere oko arsenovog (III) iona, natrijev arsenat i metakrilna kiselina zagrijavani u prisutnosti hidrokinona stvarajući arsenov metakrilat.

Naime za dokazivanje učinkovitosti As(III) utisnutog polimera korištene su membrane ne ispranog polimera (prije uklanjanja arsena), ispranog polimera (nakon uklanjanja arsena) i čistog polimera kao slijepe probe. Prema slici 16. može se vidjeti u IR spektru ne ispranog polimera da nema vrpce na području od 1690- 1750 cm^{-1} i 1200-1300 cm^{-1},koje se odnose na istezanje karbonilne (-C=O) i hidroksilne (-OH) skupine metakrilne kiseline, što je ukazivalo

na promjenu karboksilne skupine. Ipak prisutnost dviju vrpci na 1570 i 1422 cm^{-1} ukazuje na simetrična i asimetrična istezanja i vibracija karboksilne ($-COO^-$) skupine, zbog reakcije arsenita s molekulama metakrilne kiseline, koja se provodila prije polimerizacije. Također IR spektar ispranog polimera (u kojem je uklonjen arsen) nema vrpce na 1560 i 1422 cm^{-1} nego na valnom području od 1740 i 1265 cm^{-1} kao i čisti polimer (slijepa proba) što dokazuje da nema više arsenata u metakrilnoj kiselini tj. on je ispran.

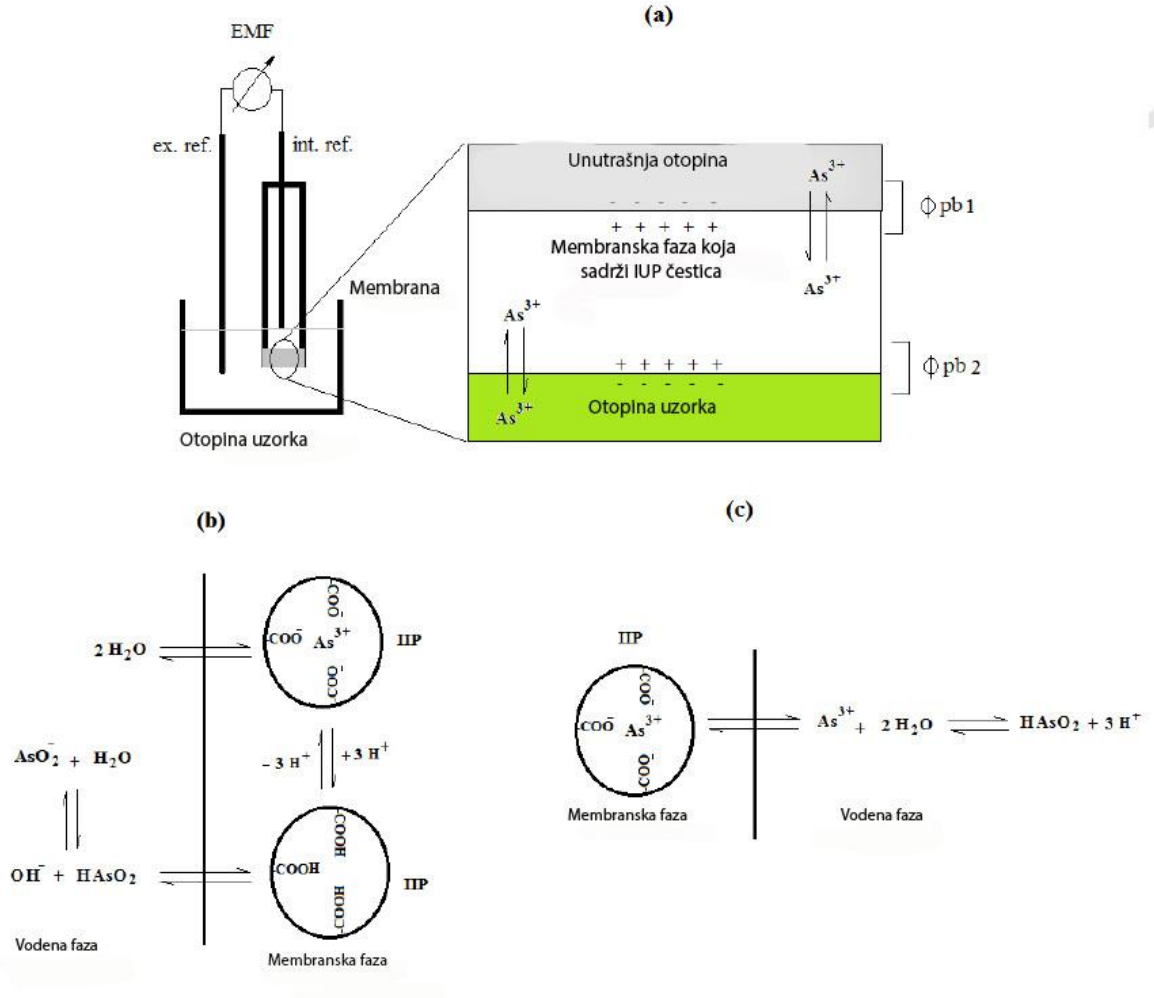


Slika 16.FT-IR spektar $NaAsO_2$, (a) neispranog IUP-a, (b) ispranog IUP-a i (c) čistog polimera [14]

Vrpce u IR spektru od 590,710,856 i 858 cm^{-1} ukazuju na As-O vezu u ionu AsO_2^- što znači da je arsen adsorbiran na površini IUP-a kao AsO_2^-. Drugim riječima adsorbirani arsen koji

ulazi u IUP selektivna mjesta kao As^{3+} koordiniran je s karboksilnim skupinama metakrilne kiseline u IUP šupljinama.

FT-IR analizom potvrđeno je da IUP apsorbira arsen kao As^{3+} ione. IUP bazirana membranska elektroda pokazuje Nernstov odziv (20,5mV $dekada^{-1}$) za arsenit u širokom koncentracijskom području, budući da su membrane izgrađene od ne utisnutog polimera koji nepokazuje osjetljivost na asenit (u istim uvjetima ispitivanja). Rezultati ukazuju da su utisnute šupljine kompatibilne s As^{3+} ionima koje su smještene u IUP materijalu, a odgovorni su za osjetljivost IUP senzora na arsenite. Nadalje, Nernstov nagib od oko 20.5 mV $dekada^{-1}$, dobiven za IUP baziran senzor, ukazuje da je arsen smješten kao As^{3+} tijekom ravnotežne reakcije koja je uspostavljena između membrane i vodene faze. Shematski prikaz principa adsorpcije arsena na IUP membransku elektrodu, prikazan je na slici 17.



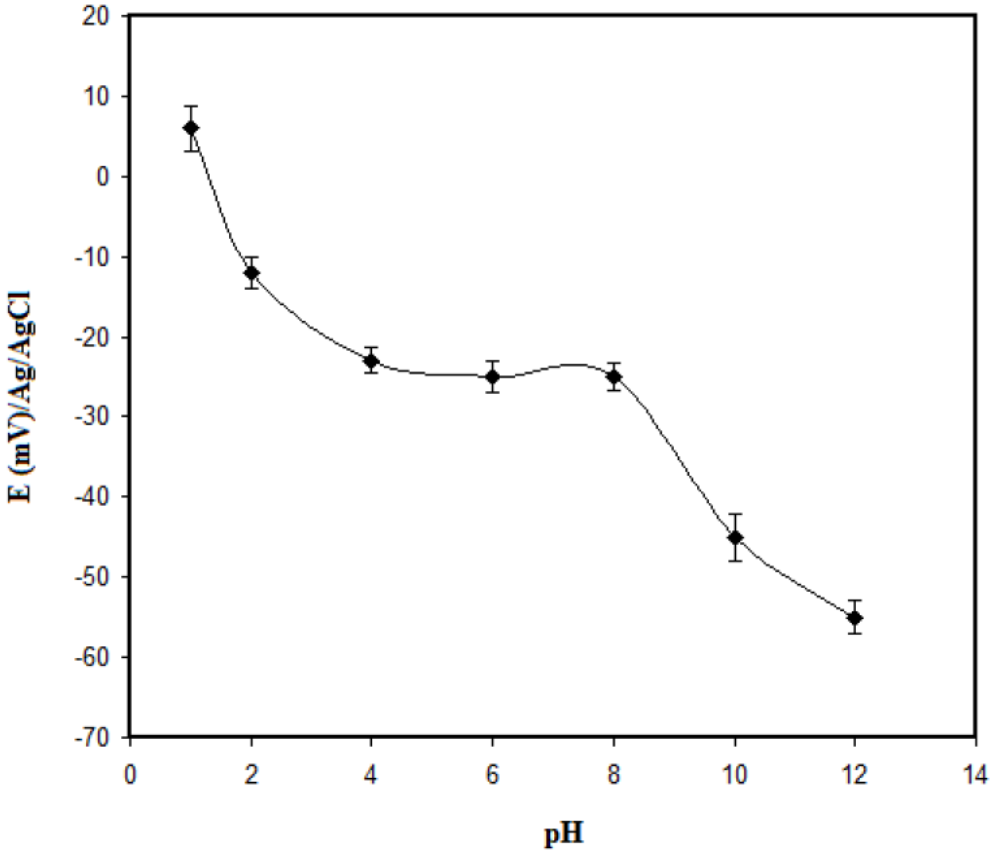
Slika 17.Shema (a) prikazuje predložene fazne granične potencijale, stabilizirane na obje strane IUP membrane, nakon izlaganja otopini arsenita. Shema (b) prikazuje predloženim mehanizmom kojim membrana veže As(III) ione. Shema (c) prikazuje mehanizam prepoznavanja faznog graničnog potencijala, kao rezultat ravnotežne izmjene As(III) iona, stvorene između IUP bazirane membrane i otopine [14].

Takva As(III) IUP nano čestica u poli (vinil kloridu),plastificirana s difenilftlatom je uspješno iskorištena kao arsenov identifikacijski element PVC membranske elektrode. Naime u potenciometrijskim mjerenjima arsena sa drugim ionima,prikazanim tablicom 6., ukazuje na visoku selektivnost za As^{3+} u širokom koncentracijskom području (7,0 x 10^{-7} $molL^{-1}$ do 1,0 x 10^{-1} mol L^{-1}), sa najnižom granicom detekcije od 5,0 x 10^{-7} mol L^{-1}.

Tablica 6.- Vrijednosti selektivnih potenciometrijskih koeficijenata IUP membranskih elektroda dobiveni metodom usklađenih potencijala[14]

Ometajući ion	$\boldsymbol{LogK_{As,X}^{MPM}}$
Se(II)	-3.29
Cr(III)	-3.30
Bi(III)	-2.28
Yb(III)	-3.29
La(III)	-3.17
Dy(III)	-3.20
Gd(III)	-3.36
Pr(III)	-3.29
Mn(II)	-2.04
Zn(II)	-2.08
Ni(II)	-3.29
Ca(II)	-3.84
Mg(II)	-3.77
Fe(III)	-2.65
Pb(II)	-2.21
Co(II)	-2.26
Hg(II)	-2.24
Cu(II)	-3.13
Ag(I)	-2.13
Cd(II)	-2.14
As(V)	-3.11

Senzor za As(III) testiran je promjenom pH otopine u rasponu od 1 do 12. Rezultati su prikazani slikom 18.. Kao što se može vidjeti potencijal je konstantan u rasponu od 4,0 do 9,0. Pomak potencijala, primijećen na nižim vrijednostima pH, može biti rezultat odziva membrane na H^+, kod viših vrijednosti pH,(pH>8) pomak se odnosi na prevenciju ekstrakcije As(III) iona do membrane. Kod alkalnog pH arsen egzistira kao AsO_2^-,jer $HAsO_2$ nije pogodan za ekstrakciju u fazi membrane uravnotežene s IUP čestima membrane. Možda zato jer negativno nabijeni arsenovi ioni se odbijaju na površini membrane koja je zbog deprotonizacije karboksilnih grupa u alkalnom mediju negativno nabijena. Dakle, pH 6,5 je izabran za određivanje As^{3+} iona u predloženom senzoru.



Slika 18. Graf učinka utjecaja pH otopine arsena na potenciometrijski odziv IUP membranske elektrode[14]

Metoda usklađenih potencijala (MUP) je korištena za mjerenje selektivnosti potenciometrijskih koeficijenata. Navedeni koeficijenti opisuju preferenciju razvijene membranske elektrode za pojedini inferetni (ometajući) ion. Prema MUP-u, specifična aktivnost primarnih iona je dodana referentnoj otopini (1,0 x10^{-5} mol L^{-1}, arsenita), i sniman je potencijal. U drugom eksperimentu, ometajući ioni (X^-) uzastopce se dodaju u identičnu referentnu otopinu sve dok mjereni potencijal se ne poklapa s dobivenim potencijalom prije dodavanja primarnih iona. MUP selektivni koeficijent, $K_{As,X}^{MUP}$ daje odnos aktivnosti primarnog iona i aktivnosti ometajućeg iona:

$$K_{As,X}^{MUP} = \frac{a_{AS}}{a_X} \qquad (7)$$

Prema tablici 6.,MUP je potvrđen selektivni koeficijent za As (III) selektivnu elektrodu, koji je pripremljen s IUP pri konstantne pH vrijednosti od 6,0. Prema tome kada je IUP senzor korišten za mjerenje arsena, svi drugi ioni ne mogu ometati identifikaciju arsena.

Zaključno, FT- IR spektar je pokazao da je arsen ekstrahiran na IUP mjestima u obliku As^{3+}, gdje je stabilizirana putem koordinacijskih veza s karboksilnom kiselinom funkcionalnih mjesta. IUP je uspješno korišten kao identifikacijski element PVC membranske elektrode. Nernstov nagib oko 20 mV $dekada^{-1}$, dobiven je za IUP membranu, potvrđena je rezultatima FT-IR eksperimentom. Time je potvrđeno da je razvijen prvi senzor za arsenov kation (As^{3+}) – selektivnu membransku elektrodu. Visoka selektivnost, donja granica detekcije i široko linearno područje su karakteristike za razvijeni As^{3+} senzor. Senzor je pokazao zadovoljavajuće rezultate kada se koristio za određivanje arsena u realnom uzorku. [14]

3.5. Anodna ″stripping″ voltametrija (ASV)

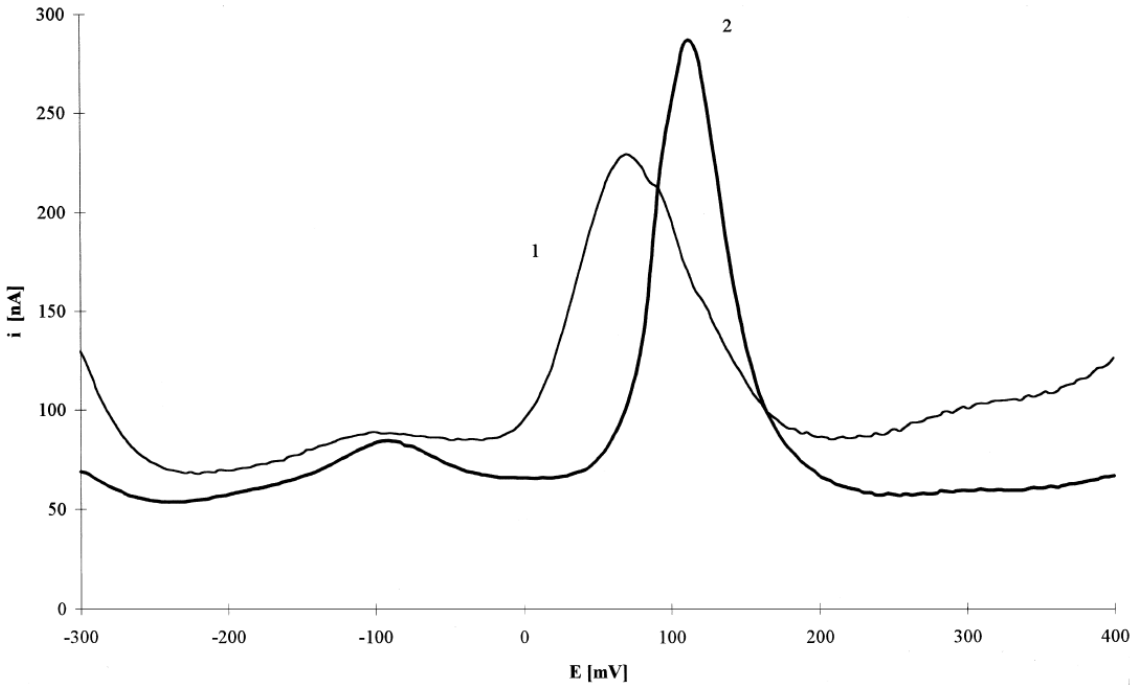
Kao najbolji elektrolit za detekciju trovalentnog arsena metodom anodne stripping voltametrije je sumporna kiselina($c(H_2SO_4)$= 1 M) i klorovodična kiselina (c(HCl)= 0.1 M). Iako je klorovodična kiselina neophodna, njezina koncentracija ne smije biti veća od 0,15 M.

Za skeniranje anodnog potencijala je primijenjena linearna voltametrija ili diferencijalna pulsna voltametrija. Nađeno je da izmjeren signal raste linearno sa rastućom brzinom promjene potencijala u rasponu od 10 do 400 mV s^{-1}. Zbog eliminacije strujnog kapaciteta u DPV (diferencijalna pulsna voltametrija), primjena ovog načina mjerenja je više pogodna. U oba modela mjerenja linearna zavisnost između koncentracije As^{3+} i anodnog strujnog pika dobiven je širok raspon koncentracija (između 0,2 i 250 μgL^{-1}), kada se primjenjuju različiti putovi elektrolize. Nagib kalibracijske linije dobivene s vremenom elektrolize od 100 s imalo je vrijednost 3,3 nA/μgL^{-1}, regresijski koeficijent odgovarajuće ovisnosti imalo je vrijednost 0,9991. Granica detekcije je iznosila 0,15 μgL^{-1}, uz primjenu vremena elektrolize od 300 s.

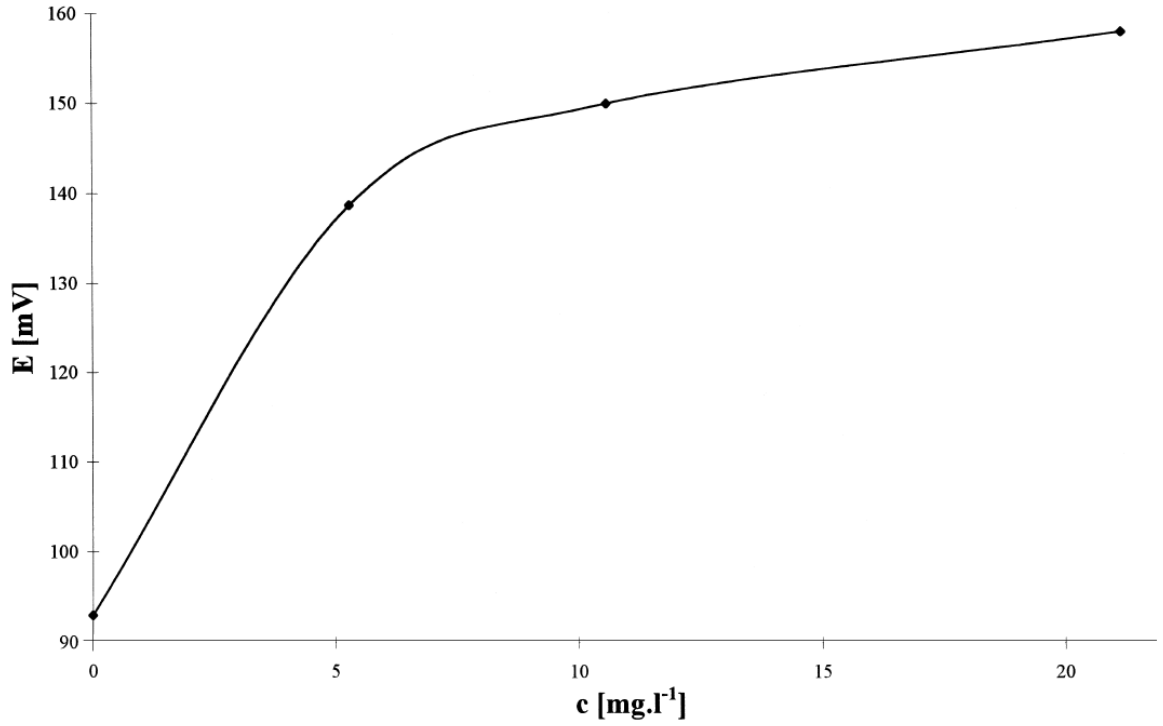
U ″stripping″ voltametriji preporučeno je određivanje trovalentnog arsena u prisutnosti hidrazina kako bih se spriječila oksidacija arsena (III). Međutim ,kasnije je otkriveno kada su arsen (III) ioni držani u kiseloj otopini elektrolita (1 M H_2SO_4 i 0,1 M HCl), nije bilo promjene u koncentraciji As(III) tijekom 8 sati nakon miješanja u obje otopine sa i bez hidrazina.

Za primjenu opisane metode u ekološkim analizama, istražen je utjecaj tenzida na anodnu krivulju. Triton X-100 je korišten kao površinski model koji oponaša tenzide koji se nalaze u prirodi.

Nađeno je da prisutnost Triton X-100 pozitivno utječe na prirodu arsenovog pika. Kao što je prikazano na slici 19. nakon dodatka Tritona X-100 arsenov pik postaje više simetričan i neznatno povećan, i istodobno vrhunac potencijala je pomaknut k više pozitivnim vrijednostima. Ovaj efekt je primijećen kod linearne voltametrije i diferencijalne pulsne voltametrije. Ovisnost pomaka pika o koncentraciji arsena s Triton X-100 prikazan je na slici 20. Pomak vrha potencijala je najvjerojatnije uzrokovan adsorpcijom Triton X-100 na površinu zlatne elektrode i može se objasniti u sljedećim redcima.



Slika 19.- Utjecaj Tritona-X 100 na DPASV pik koncentracije As(III): krivulja (1)- As(III) u 1M H_2SO_4 i 0,1 M HCl, krivulja (2) – Krivulja (1) + Triton X-100 (10 mg l^{-1}), elektrodni potencijal – 0,30 V, vrijeme elektrolize 30 s, pauza 30 s, potencijal čišćenja 2,50 V, brzina promjene potencijala 20 mV s^{-1}[15]



Slika 20.Graf ovisnosti utjecaja Tritona X-100 na DSASV pik arsena (III) koncentracije 2,5 µg l^{-1} u 1 M H_2SO_4 i 0,1 M HCl,elektrodni potencijal -0,30 V, vrijeme elektrolize 150 s, pauza 30 s, potencijal čišćenja 2,50 V , vrijeme čišćenja 2 s, brzina promjene potencijala 20 mVs^{-1}[15]

AdsorpcijaTritona X-100 na površinu elektrode može se opisati sljedećom relacijom:

$$\frac{\theta}{1-\theta}\exp\Sigma A_i\theta^i = bc \qquad (8)$$

Površinska pokrivenost θ, gdje A_i predstavlja interakcijski koeficijent, b adsorpcijski koeficijent Tritona.

Pretpostavimo dalje da efektivni udio konstante kod zadane elektrodne reakcije je linearna kombinacija konstantni k_0 i k_1 kada površina nije pokrivena (θ=0) i potpuno pokrivena (θ=1) od strane Tritona. To je opisano jednadžbom:

$$K_{ef} = k_0(1-\theta) + k_1\theta \qquad (9)$$

Konačno, ako pretpostavimo da je voltametrijski anodni strujni pik i_p arsena pri konstantnoj koncentraciji As(III),c As, i uz potpuno povećanje koncentracije Tritona, c, slijedi odnos:

$$i_p = k_1k_{ef}\exp\left(\frac{anF}{RT}\Delta Ep\right) = k_2c_{As} = k_3 \qquad (10)$$

gdje su a, k_1, k_2 i k_3 konstante, n je broj izmijenjenih elektrona, F je Faradajeva konstantna, R je opća plinska konstantna i T je termodinamička temperatura, eksperimentalne uvjete možemo napisati unutar konstantne:

$$k_{ef}\exp\left(\frac{anF}{RT}\Delta Ep\right)= K, \qquad (11)$$

gdje je K konstantna. Za relativno male vrijednosti promjene ΔEp može se aproksimirati:

$$k_{ef}\,(1+ anF\Delta Ep/RT) = K \qquad (12)$$

i zbog toga vrlo približno:

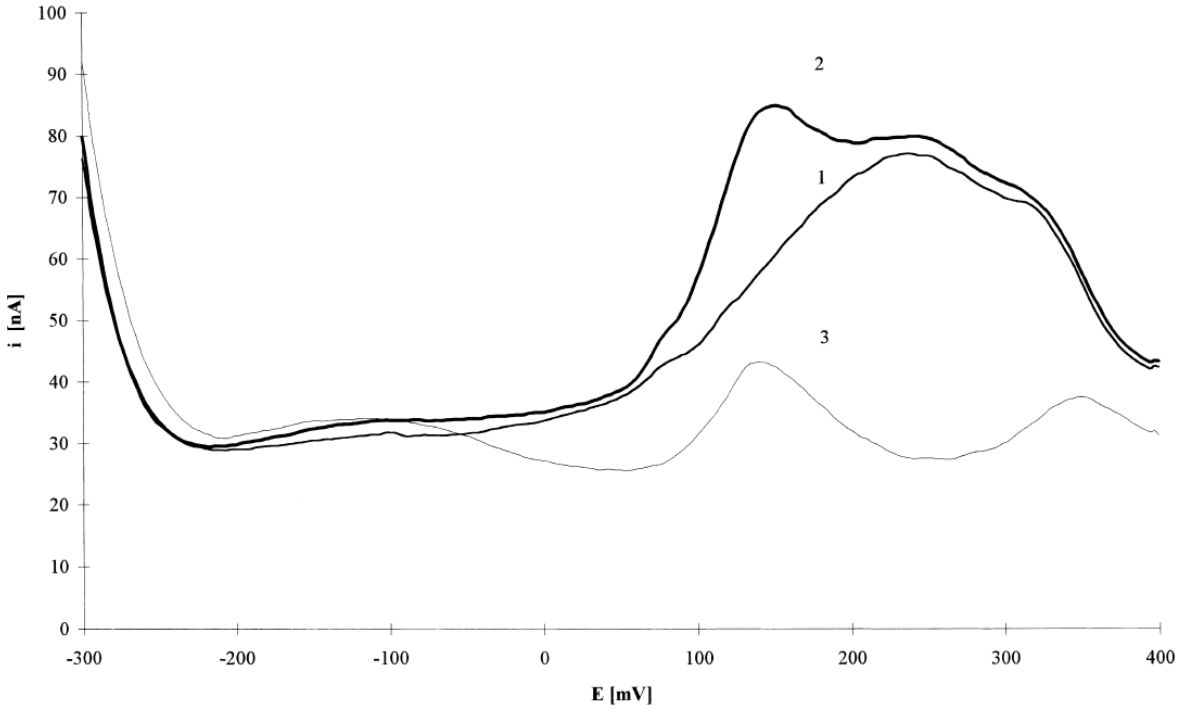
$$k_{ef} + k_4\Delta Ep = K \qquad (13)$$

Čak i u prisutnosti Triton X-100 ovisnost strujnog anodnog vrha o koncentraciji As^{3+} ostala je linearna.

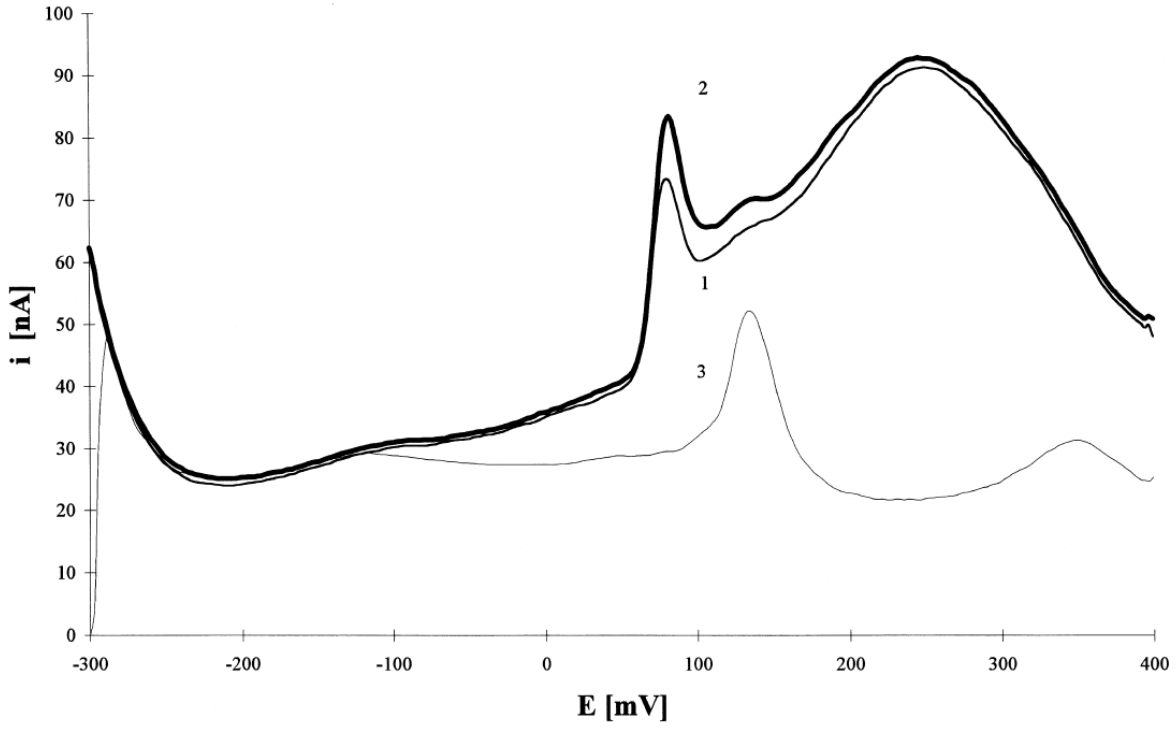
Prije voltametrije potrebno je eliminirati tenzide u reakciji sa H_2O_2 i UV zračenjem. Ovi postupci, međutim dovode do oksidacije arsena (III) do arsena (V), koji nije elektrokemijski aktivan. Uslijed opisanog učinka Triton X-100 na voltametrijsko ponašanje arsena (III), može se zaključiti da uklanjanje tenzida nije potrebno u određivanju arsena po opisanom ASV u uzorcima koje sadrže male količine tenzida. Ova tvrdnja je potvrđena mjerenjem arsena (III) u uzorcima vode iz slavine i rijeke atomskom apsorpcijskom spektroskopijom (AAS), a opisana je ASV. Uzorci su zakiseljeni, dodan je hidrazin klorid kako bi spriječio oksidaciju arsena (III). Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 7., gdje je također prikazan oporavak arsena postignut u tim uzorcima od strane ASV. Razne količine arsena (od 6 do 60 μgL^{-1}) dodatno su dodane u vodu iz slavine i rijeke i arsen je određen pomoću opisane ASV metode. Ovisnost odgovarajućeg DPASV strujnog vrha u odnosu na koncentraciju arsena (III) je linearna, kod istih eksperimentalnih uvjeta (vrijeme elektrolize) nagib dobivenih linija su gotovo identične koncentracijama arsena u destiliranoj vodi (slijepa proba).

Kao što je prije navedeno koncentracija kloridnih iona u elektrolitu ne smije prelaziti 0,15 mol L^{-1}. Nađena je prisutnost od 0,6 $molL^{-1}$ iona natrijeva klorida u elektrolitu koja je uzrokovala oštar pik na potencijalu od 85 mV i drugi širok pik na potencijalu od 240 mV. To je uzrokovalo negativniji pik koji praktično jednak prisutnošću približno 2 μgL^{-1} As, unutar istih eksperimentalnih uvjeta. Identičan efekt je primijećen kada je opisana metoda primijenjena za detekciju arsena u morskoj vodi koja je zakiseljena sumpornom

kiselinom.Niske koncentracije arsena (u μg L^{-1} i manje) ne mogu biti detektirane ovom metodom, jer u tom slučaju vrijeme elektrolize predugo traje. Ovaj fenomen je prikazan voltametrijskm krivuljama dobivenim mjerenjem zakiseljenih uzoraka morske vode Slika 21. i 22..



Slika 21.- DPASV za arsen u otopini natrijevog klorida: krivulja(1)- 0,6 M NaCl koja sadrži 1 M H_2SO_4, krivulja (2) – krivulja (1) + 20 μgL^{-1} As, krivulja (3) – krivulja(2) sa automatskom izmjenom elektrolita, elektrodni potencijal -0,30 V , vrijeme elektrolize 30 s, vrijeme pauze 30 s,potencijal čišćenja 2,50 V,vrijeme čišćenja 5 s, uz brzinu promjene potencijala 20 mVs^{-1}[15].



Slika 22. Graf DPASV voltamogrami arsena u morskoj vodi: krivulja (1)- morska voda koja sadrži 1 M H_2SO_4,krivulja (2)- krivulja (1) + 2,5 μgL^{-1} As, krivulja (3)- krivulja (2) sa automatskom izmjenom elektrolita, elektrodni potencijal -0,30 V,vrijeme elektrolize 90 s, pauza 30 s, potencijal čišćenja 2,50 V, vrijeme čišćenja 5 s, brzina promjene potencijala 20 mVs^{-1}[15]

Kako bi se uklonio utjecaj kloridnih iona primijenjena je metoda ″srednje razmjene″ (engl. *medium-exchange*). Razmjenom otopine uzorka s otopinom baznog elektrolita nakon elektrolize ostvaruje se automatski programom koji kontrolira pumpu. Na taj način bilo zakiseljena otopina uzorka ili alkalni elektrolit je vođen do detektora koji je umetnut na glavu zlatne elektrode. Dobiven oblik krivulje je prikazan na slici 21.i 22. , rezultati mjerenja su prikazani u tablici 7. Ovi rezultati pokazuju da se opisani postupak može koristiti za određivanje arsena u morskoj vodi bez prethodne obrade uzorka filtracijom ili UV zračenjem.

Tablica 7. – Identifikacija arsena u različitim uzorcima[15]

Uzorak	Identificirani As (µg/l)	Dodani As (µg/l)	Nađeni As (µg/l)
H2O	0,0	4,0	3,8
Voda iz slavine	1,2[a]	4,0	5,2
Voda iz slavine	1,6[b]	4,0	5,6
Voda iz rijeke	20,0[a]	6,0	26,5
Voda iz rijeke	21,0[b]	6,0	27,2
0,6,M NaCl	0,0	45,0	38,5
	0,0	5,0	5,3[c]
Morska voda	1,6	2,5	5,5[c]
	2,0	2,5	5,0[c]

[a]Plamena AAS, [b]ASV, [c]ASV podržan izmjenom elektrolita (engl. *electrolyte exchange*)

Smetnje mogu biti uzrokovane prisutnosti visokih količina bakrovih (II) i olovnih (II) iona. Ti ioni se talože istovremeno s arsenovim (III) ionima za vrijeme elektrolize na potencijalu -0,30 V, potencijalne vrijednosti dobivenih anodnih pikova su -0,06 V za olovo i 0,34 V za bakar.Dodatno je uočeno da Triton X-100 uzrokuje blagi pomak potencijalnih anodnih pikova olova ili bakra ka više pozitivnim vrijednostima, slično kao što je gore napisano za anodni vrh arsena.

Prednost opisanog postupka je da primjena zlatne elektrode za anodnu ″stripping″ voltametriju u detekciji arsena otklanja potrebu za redukcijom As^{5+} prije mjerenja[15].

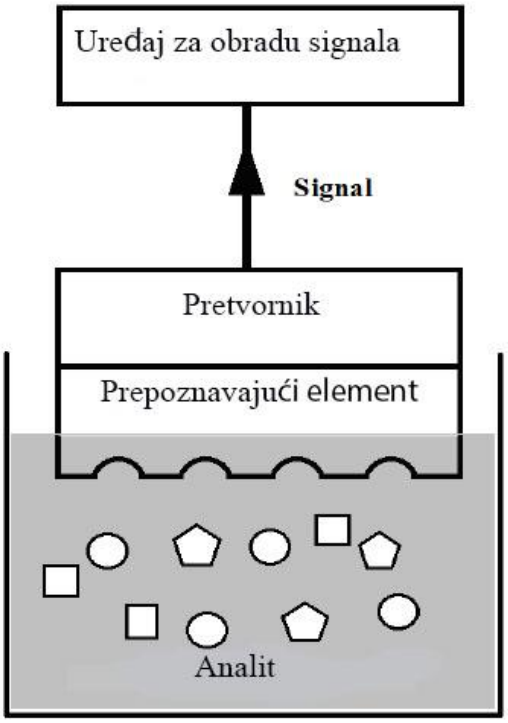
4. Biosenzori

Biosenzori su analitički uređaji koji koriste osjetljivi biološki materijal u svrhu prepoznavanja određene molekule, te pružaju informacije o prisutnosti i količini određene molekule u obliku signala koji je prikladan za snimanje i obradu.

Biosenzori se sastoje od triju osnovnih komponenata:element za prepoznavanje, što je bioselektivna membrana koja uključuje različite biološke strukture, fizičke sonde, elektronički sustav za pojačavanje signala, snimanje i razumljiv prikaz podataka.

Element za prepoznavanje je osnovna komponentna bilo kojeg senzora. Senzor može selektivno reagirati s jednim ili više analita među velikim brojem drugih tvari. Sve vrste bioloških struktura: enzimi, antitijela, nukleinske kiseline,pa čak i žive stanice korištene su

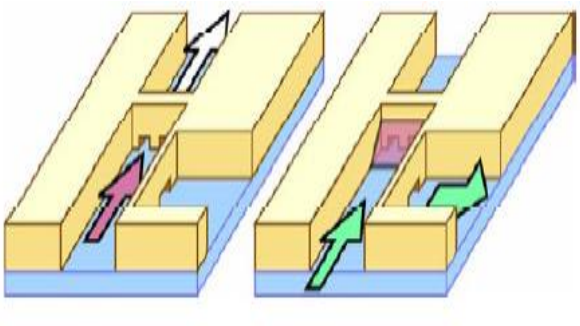
kao element za prepoznavanje u biosenzorima. Pretvornik pretvara promjenu uzrokovano reakcijom između selektivnog biološkog sloja i analita u električni ili optički signal. Taj signal je onda mjeren pomoću fotoosjetljivog i/ili elektroničkog uređaja. [16]



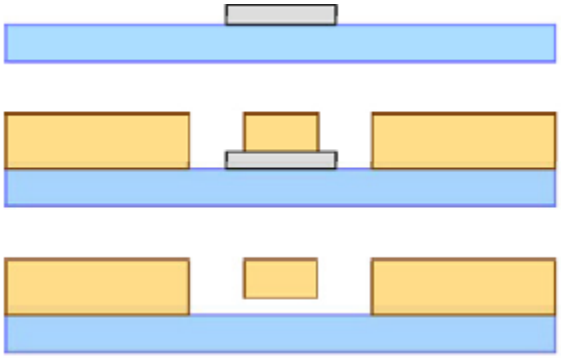
Slika 23. Shematski prikaz biosenzora[16]

4.1.Biočip s *E.coli* za određivanje arsena

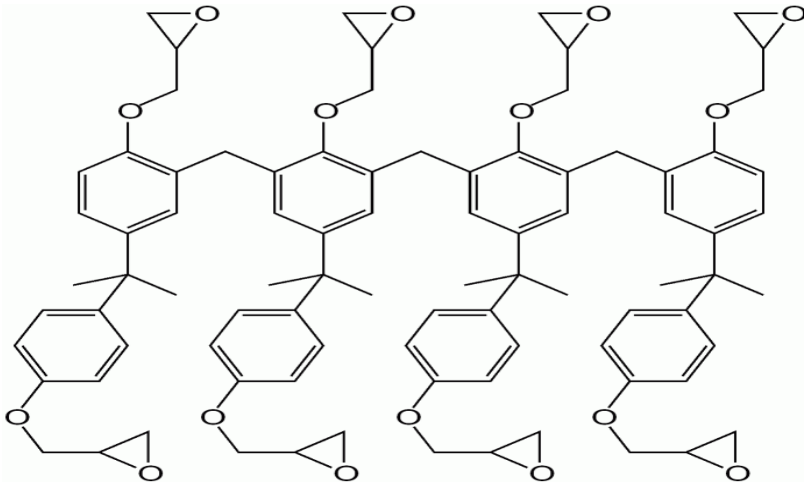
Čipovi koriste filtre u kanalima gdje se nalaze bakterije koje služe kao senzor, dok uzorak slobodno protječe između njih. Kao što je prikazano na slici 24, filter se prvo napuni s bakterijama u laboratoriju, a zatim se nadopunjuje vodenim uzorkom. Kanali su definirani s 5 μm debelim SU-8 (negativni premaz baziran na epoksidu), dok su filter praznine napravljene s 0,5 μm debelih tankih žrtvenih zakrpa od raspršenog amorfnog silikona pod SU-8 slojem. Kao supstrat korišteno je polirano borsilikatno staklo.



Slika 24. Opći princip rada uređaja[17].



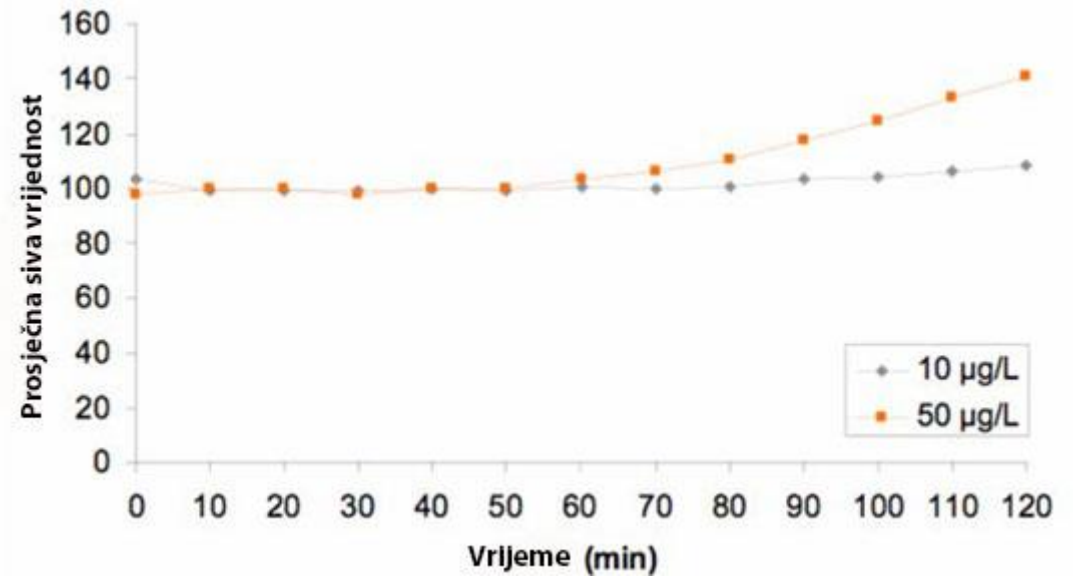
Slika25.Tijek protjecanja. Kanali i filtri su izrađeni od amorfnog silikonskog sloja unutar SU-8 sloja[17]



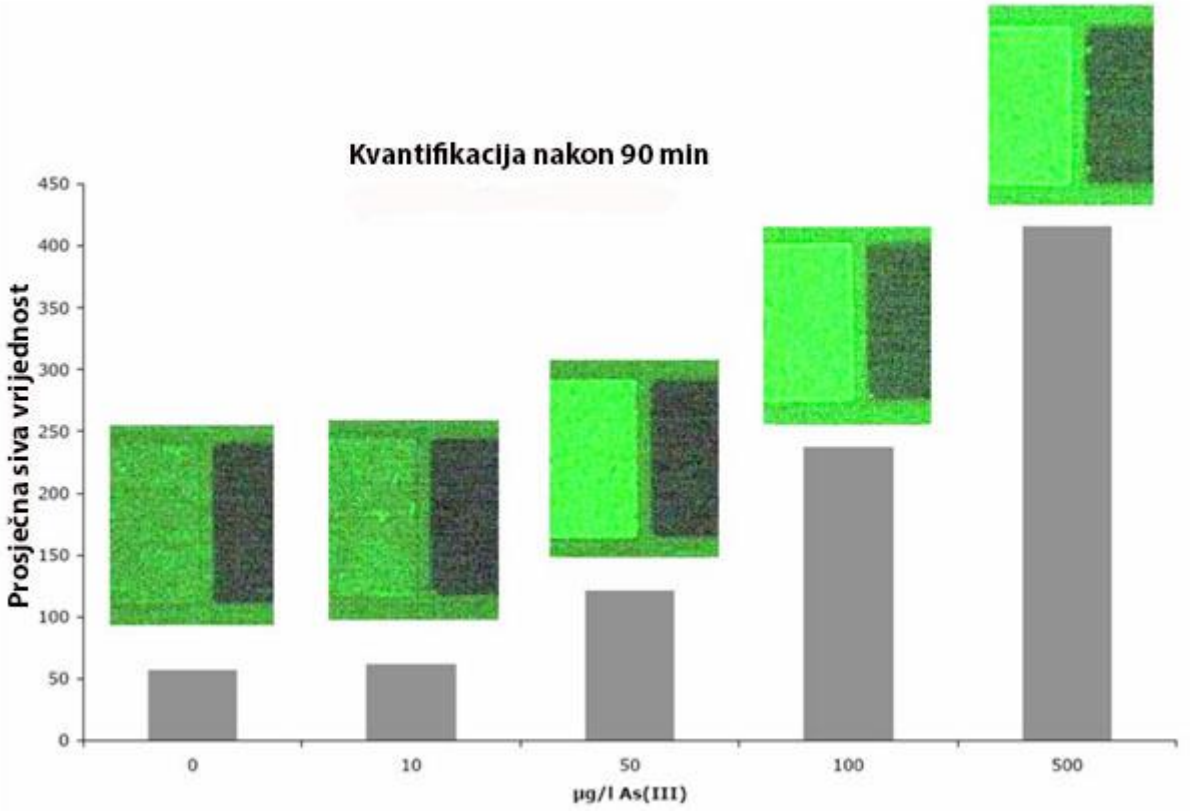
Slika 26. SU-8 molekula

Kao fluorescentni biosenzor je korišten *E. coli* DH5α pProbe-gfp(tagless)-arsR-ABS. Ovaj posebni soj je projektiran da bi se stvorio fluorescentni signal, zbog proizvodnje zelenog fluorescentnog proteina (ZFP) kao odgovor na arsenite koju detektiraju bakterije. Oni su projektirani za proizvodnju ArsR proteina, koji inače kontroliraju sintezu grupe proteina umiješane u otpornost arsenita, ali sada potiskuju ekspresiju gena za ZFP. Kada arseniti (As^{3+}) ulaze u stanicu uzrokuju derepresiju (inhibicija reprecije tvari proizvedene od strane regulatornog gena s rezultatom da je operator gen slobodan da pokrene proces formiranja polipeptida) prema arsR, što dovodi do formiranja ZFP. Akumulacija GFP u stanici ovisi o koncentraciji arsenita i vremenu izloženosti, stoga , količina fluorescentnog signala je funkcija vremena izloženosti i koncentracije arsenita koja je u dodiru s stanicom.

Za korištenje mikrofluidnog uređaja, biosenzor je kultiviran preko noći u Luria Brothu i resuspendiran u minimalnom mediju s kulturom zamućenosti na 600 nm. Bakterije su pomiješane s otopinom arsenita različitih koncentracija, a neposredno prije punjena smjesa je pipetirana na uređaj. Protok tekućine kroz kanale čipa postiže se kapilarnom silom. Bistra polja i fluorescentne slike snimljene su svakih 10 minuta tijekom nakupljanja stanica u filteru pomoću obrnutog fluorescentnog mikroskopa. Prikupljene slike su analizirane programom za određivanje prosječne vrijednosti sivog fluorescentnog signala iz induciranih stanica, koja služi kao mjera prosječne stanične indukcije. Rezultati mjerenja s čipom prikazani su na slici 27. i slici 28. Kao što se vidi, u pozadini fluorescencija je približno jednaka onoj SU-8. Nakon 1 sata inkubacije, fluorescencija počinje rasti, ovisno o količini analita. Međutim granica detekcije za predložen biosenzor je 50 $\mu g\ L^{-1}$,dok je 10 μgL^{-1} arsenata prema MDK. [17]



Slika 27. Prosječna fluorescencija za ZFP biosenzor kao funkcija vremena[17]



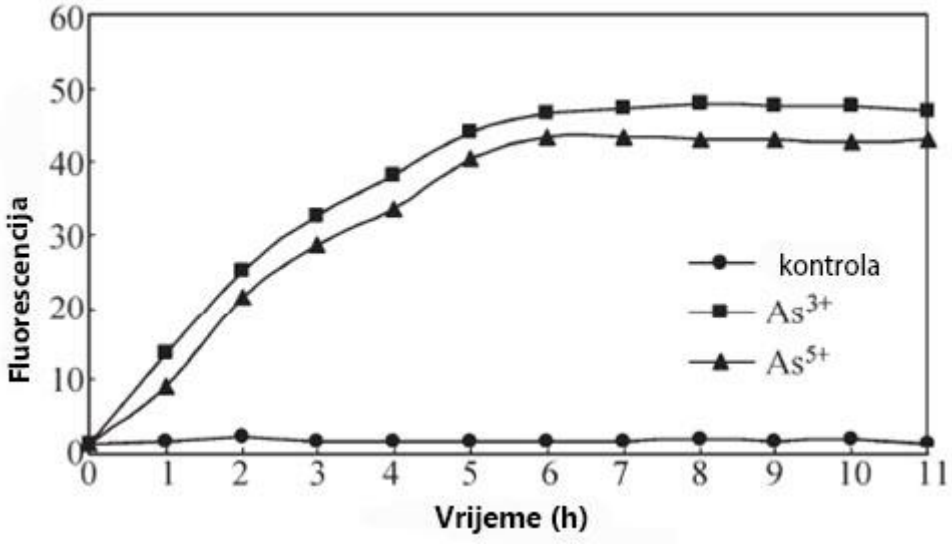
Slika 28.- Prosječna fluorescencija ZFP biosenzor izložen različitim koncentracijama arsenita, zajedno s odgovarajućim fluorescentnim slikama[17].

4.2. WCB-11- stanični biosenzor

WCB-11 stanični biosenzor dobiven je uvođenjem phiYFP u *E.coli*DH5α kao reporter gena pomoću kojeg je izrađen stanični biosenzor za određivanje arsena.

Soj senzora, DH5α (ars-puc18-yfp), je kultiviran s 8 μmolL^{-1} arsenata u 2 sata prije mjerenja fluorescencije. Pozitivan odziv biosenzora na arsenit je uočen s fluorescentnim mikroskopom.

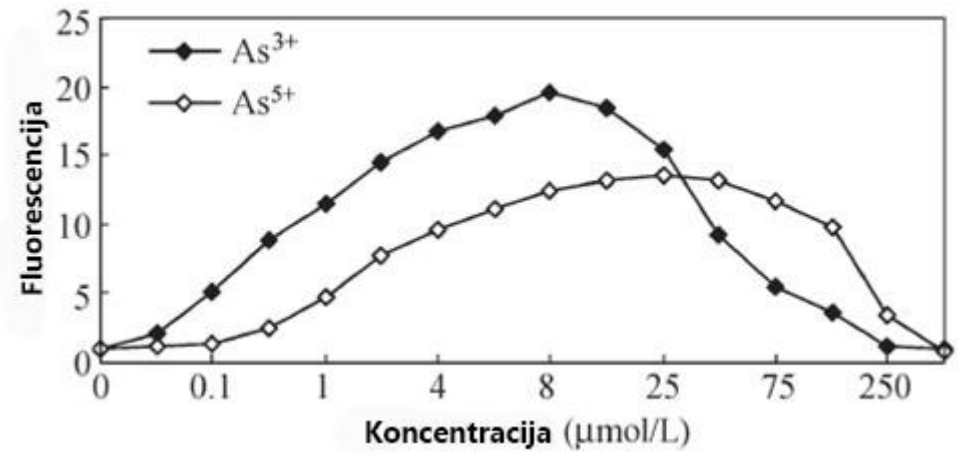
Indukcija žutog fluorescentnog senzora ovisi o vremenu kada je tretiran s 5 μmol L^{-1} otopinom arsenita i arsenata. Kao što je prikazano na slici 29., intenzitet fluorescencije DH5α fluorescence (ars-puc18-yfp) je povećan s indukcijskim vremenom, dok je pozadinska fluorescencija manja cijelo vrijeme. DH5α (ars-puc18-yfp) soj bez otopine arsenita i arsenata je korišten kao kontrola.



Slika 29. Indukcijski vremenski tijek žute fluorescencije s efektorima. *E.coli* DH5α (ars-puc18-yfp) je kultivirana s 5 μmol L^{-1} As^{3+} i As^{5+} u raznim intervalima pri 30°C[18]

Fluorescencija DH5α stanice koje nose ars-puc18-yfp gen daju otpornost na arsen koji pak ovisi o dozi. Odgovor soja DH5αprema As^{3+} i As^{5+} ovisi o vremenu. Budući da indukcijsko razdoblje od 2 sata može proizvesti dovoljno fluorescentnog signala za eksperiment indukcije. Prema slici 30.Vidljivo je da žuta fluorescencija proizvedena od strane bakterija raste s porastom koncentracije As^{3+} i As^{5+} iona. Međutim, odziv nije linearan, već je parabolične distribucije na cijelom rasponu mjerenja. Indukcija žute fluorescencije arsenita (As^{3+}) je veća

od induciranog arsenata (As^{5+}). Intenzitet fluorescencije sa arsenatima raste do koncentracije od 25 $\mu molL^{-1}$. Nasuprot tome, žuta fluorescencija s arsenitima raste samo do koncentracije od 8 $\mu molL^{-1}$ i onda postupno pada prema višim koncentracijama.



Slika 30. Graf testa žute fluorescencije proizvedene kao odziv na različite koncentracije As^{3+} i As^{5+}. Fluorescencija DH5α (ars-puc18-yfp) je određen nakon 2 satne indukcije različitih koncentracija arsena[18]

Biosenzor otporan na arsen je razvijen za *E.coli* DH5α koji koristi phiYFP novi reporter gen. Senzor WCB-11 ima jasan odziv na arsen i uspješno inducira ekspresiju phiYFP. Povećanjem duljine indukcijskog vremena, pozadina ekspresije senzora je ostala na niskoj razini,a samim time žuti fluorescentni protein je stabilan dugo vremena.Uočeno je da phiYFP gen ima bolja svojstva od prirodnog ZFP-a,čime je prag detekcije kod koje WCB-11 proizvodi žutu fluorescenciju može biti niža, čime je poboljšana osjetljivost detekcije.

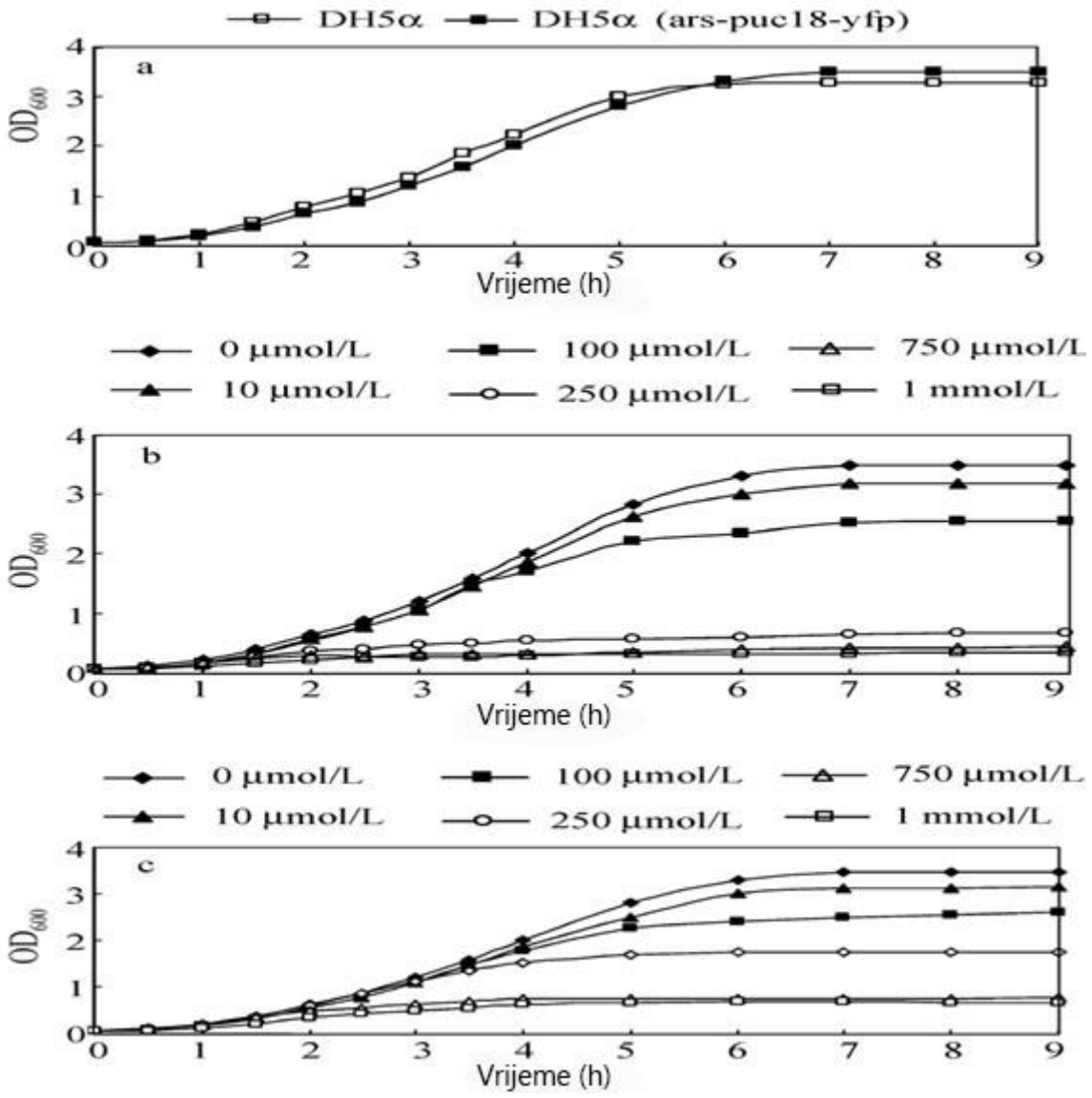
Poznato je da reporter geni mogu imati utjecaj na primjenu staničnog biosenzora. Tablica 8. sumira najvažnije karakteristike korištenih reporter gena. U ovom primjeru korišten je phiYFP kao novi reporter gen za konstrukciju i testiranje otpornosti na arsen staničnog biosenzora.

Tablica 8. Značajke reporter gena za razvoj staničnih biosenzora[18]

Gen	Protein	Prednosti	Nedostaci
luc	Luciferaza svizaca	Visoka osjetljivost Široko dinamičko područje Jednostavnost	Potrebni supstrati: ATP, O_2 i Mg^{2+}
lux	Bakterijska luciferaza	Brzi odziv Jednostavnost mjerenja	Temperaturno labilan (> 30 °C) Potreban O_2
lacZ	B- galaktozidaza	Različite identifikacijske metode Identifikacija golim okom	Potrebni supstrati Komplicirani kolorimetrijski testovi
gfp	Zeleni fluorescentni protein	Autofluorescencija, Nije potreban supstrat Visoka stabilnost	Zakašnjela ekspresija nakon sinteze proteina Visok pozadinski signal
crtA	Sfreroidenon	Identifikacija jedino golim okom Razvoj novog domaćina drugačijeg od E.coli	Niska osjetljivost Potrebni supstrati

Koncentracija efektora i duljina indukcijskog vremena glavni su čimbenici u određivanju razine intenziteta fluorescencije. Ostali čimbenici mogu utjecati na ekspresiju staničnog biosenzora, koja uključuju identitet domaćina, duljinu vremena inkubacije, sastav medija i fazu rasta sakupljenih stanica. Plazmidi izgrađeni u ovom biosenzoru sadrži arsR gen o/p regiju bez arsC gena, stoga promatrani odziv može se dobiti iz *E.coli* DH5α genoma.

Kao što je prikazano na slici 31., uvođenjem rekombinantnog plazmida imalo je utjecaja na rasta soja domaćina. Poznato je da soj domaćina može biti odgovoran za niz fizioloških učinaka nakon što je endogeni DNK fragment pretvoren u rekombinantni plazmid vektor. Ekspresija egzogenih gena dovodi do smanjena brzine rasta stanica domaćina. Međutim, zbog niže razine ekspresije phiYFP gena, rekombinantni plazmid ars-puc18-yfp ima mali utjecaj na stabilnost domaćina. Ova zapažanja sugeriraju da se yfp može koristiti kao marker za razvoj staničnog biosenzora.



Slika 31. Test tolerancije biosenzorskog soja s različitim koncentracijama As^{3+} i $As^{5+.}$ (a) rastuća krivulja DH5α stanica koja nosi ars-puc18-yfp plazmid, (b) rastuća krivulja DH5α (ars-puc18-yfp) sa različitim koncentracijama As(III), (c) rastuća krivulja DH5α (ars-puc18-yfp) sa različitim koncentracijama As(V)[18].

Nadalje rezultati su pokazali da različite koncentracije arsena imaju značajan utjecaj na rast domaćina, jer veća koncentracija arsena izaziva toksičnost u stanicama domaćina. Ta činjenica ograničava koncentracijsko područje za mjerenje arsena u vodi (koncentracija arsena mora se kontrolirati na razini u kojoj ne oštećuje stanicu domaćina)

Zaključno, biosenzor za detekciju arsena je razvijen za *E.coli* DH5α pomoću vektora T7-puc18-yfp, koji sadrži gen yfp kao novi reporter u području DNK koja je odgovorna za otpornost na arsen u *E.coli*. U ovom primjeru primijenjen je PhiYFP kao reporter u prokariotskoj bakteriji za identifikaciju arsena. Rezultati su pokazali da modificirana *E.coli* ima dobar odziv na arsen i ekspresiju PHIYFP gena. Kada je bakterija izložena različitim koncentracijama arsena, ekspresija žute fluorescencije ovisi o vremenu izloženosti i količini arsena. Štoviše, nepatogeni biosenzor WCB-11 je pokazao različite tolerancijske raspone za arsenite i arsenate. Poput drugih biosenzora, ovaj primjer ima nekih problema, uključujući ponovljivost, specifičnost i točnost. Međutim, u usporedbi s tradicionalnim fizikalno-kemijskim metodama otkrivanja, primjena ovog biosenzora može dati točnije podatke u nadzoru okoliša. Osim toga, relativna jednostavnost i niska cijena biosenzora može poslužiti kao motivacija za uklanjanje navedenih nedostataka[18].

5. Rasprava

Svi kemijski senzori za arsen korišteni u ovom radu osim biočipa i senzora koji je baziran na ultra tankom grafenovom oksidu, u stanju su detektirati arsen u uzorcima vode s granicom kvantifikacije od 10 ugL^{-1} i manje, što je ujedno i maksimalno dopuštena koncentracija arsena u vodi za piće koju je predložila Svjetska zdravstvena organizacija.

Kao najpogodnija metoda za mjerenje arsena pokazala se ciklička voltametrija zbog njezine preciznosti, točnosti, reproducibilnosti, pokazalo se da ima zadovoljavajuću granicu kvantifikacije i otklanja potrebu za redukcijom arsenata prije mjerenja.

Kolorimetarski senzor traka baziran na polimernom hidrogelu korišten je za identifikaciju arsena u različitim uzorcima vode. Metoda je jednostavna za korištenje, a temelji se na povećanom intenzitetu plavog obojena porastom koncentracije arsena. Za razliku od drugih senzora koji su opisani u ovom radu, kolorimetrijska test traka primarno određuje arsenate (As^{5+}).

Biosenzori za identifikaciju arsena, opisani u ovom radu, temelje se na modificiranoj prokariotskoj bakteriji *E.coli* kojoj je promijenjen prirodni mehanizam preko ars operona da izbacuje arsen iz stanice, umjesto toga bakterija prilikom detekcije arsena proizvodi fluorescentni protein koji stvara signal proporcionalan koncentraciji arsena

6. Zaključak

Arsen predstavlja toksikološki problem u određenim dijelovima svijeta, među njima i u Hrvatskoj. Dokazano je da povećana koncentracija arsena u vodi za piće uzrokuje brojne simptome kod ljudi od kojih je najštetnije karcinogeno djelovanje, a očituje se u obliku karcinoma pluća i kože.

U posljednje vrijeme znanstvenici razvijaju nove, brže i jednostavnije metode za identifikaciju arsena u realnim uzorcima. Postignuta su značajnija poboljšanja u preciznosti, točnosti i reproducibilnosti senzora. Njegova niska cijena, granica kvantifikacije koja mora biti manja od maksimalno dopuštene koncentracije od 10 $\mu g\ L^{-1}$ moraju biti karakteristike senzora za identifikaciju arsena u svakodnevnoj uporabi.

U ovom radu posebno se ističe kolorimetriska senzor traka koja je vrlo jednostavna za uporabu, ima zadovoljavajuću granicu kvantifikacije za arsen. Za razliku od elektrokemijskih senzora koji nisu u mogućnosti identificirati arsenate (As^{5+}) zbog njihove elektroneutralnosti, kolorimetriski senzor primarno određuje arsenate u vodenim uzorcima.

Biosenzori koji su opisani u ovom radu imaju prednost u ekološkom pristupu, nema potrebe za kalibracijom prije svakog mjerenja. Međutim, potrebno je uložiti dodatan napor kako bih mu se poboljšala točnost i specifičnost.

Razvijene su brojne metode otkrivanja arsena kojima je omogućeno praćenje štetnih koncentracija arsena u vodi, čime je smanjen rizik za ljudsko zdravlje i poboljšana kvaliteta života na zahvaćenim područjima. Unatoč tome, kontinuirano se radi na razvoju novih senzora koji će unaprijediti postojeće metode.

7. Literatura:

[1]Hulanicki A.,Glab S., Ingman F.: Chemical sensors definitions and classification.*Pure and appl. Chemistry, Vol 63, No 9 (1991), 1247-1250.*

[2]Chemical sensors, Dostupno na http://www.nap.edu/read/4782/chapter/10#83 , (pristup 15.8.2016)

[3] H. Hisamoto, Ion-selective optodes: current developments and future prospects, *Trends in Analytical Chemistry* 18 (1999) 513-520

[4] Arsen, As. Dostupno na http://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/as/ , (pristup 15.8.2016)

[5] Filipović, I. Lipanović, S.: Opća i anorganska kemija, Školska knjiga, Zagreb, 1995.

[6] Emsley, J.: Vodič kroz elemente, Izvori, Zagreb, 2005

[7] Bošnir, J., Čulig, J.: Metali i polumetali u okolišu, Zdravstveno Veleučilište, Zagreb, 2005.

[8]Plavišić, F.: Bojite li se otrova?, Hrvatski zavod za toksikologiju, 2009.

[9] Habuda-Stanić, M., Kuleš M.: Arsen u vodi za piće, Kem.ind., 51 (2002) 7-8

[10] Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće. Dostupno na http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/313787.html, ,(pristup 15.8.2016)

[11] Gumpu B.M., Mani K. G., Nesakumar N., Kulandaisamy A. J.,Babu J., Rayappan B. B. J., Electrocatalytic nanocauliflower structured fluorine doped CdO thin film as a potential arsenic sensor, *Sensors and Actuators B:Chemical*, Volume 234, (2016), 426-434

[12] Kumar S., Bhanjana G., Dilbaghi N., Kumar R., Umar A., Fabrication of highly sensitive and selective arsenic sensor based on ultra-thin graphene oxide,*Sensors and Actuators B:Chemical*,Volume 227, (2016), 29-34

[13] Joyati D., Priyabrata S.,A new dipstick colorimetric sensor for detection of arsenate in drinking water, *Environmental science-water research & technology*, Volume 2,Issue 4, (2016), 693-704

[14] Alizadeh T., Rashedi M.,Synthesis of nano-sized arsenic-imprintedpolymer and itsuse as As^{3+} selective ionophoreina potentiometricmembraneelectrode: Part 1, *Analytica Chimica Acta*, Volume 843,(2014), 7-17

[15] Kopanica M., Novotny L., Determination of arsenic (III) by anodic voltammetry in solutions, natural waters and biological material, *Analytica Chimica Acta,*Volume 368, (1998), 211-218

[16] Korotkaya E.V., Biosensors: design, classification, and applications in the food industry, *Foods and Raw Materials Vol 2,* (2014)

[17] Theytaz J., Braschel T., Lintel H., Renaud P., Diedel E., Merulla D., van deer Meer J., Biochip with *E.coli* bacteria for detection of arsenic in drinking water,*Procedia Chemistry*, (2009) 1003-1006

[18] Qing H., Li L., Wang Y., Zhao W., Qi H., Zhuang G., Construction of WCB-11: A novel phiYFP arsenic-resistant whole –cell biosensor, *Journal of Environmental Sciences,* (2010) 1469-1474