Elektrokemijsko ponašanje vodikovog peroksida i amonijaka na elektrodama od ugljikove paste modificirane sulfidima prijelaznih metala

Vukadin, Jela

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:616770

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE

ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE VODIKOVOG PEROKSIDA I AMONIJAKA NA ELEKTRODAMA OD UGLJIKOVE PASTE MODIFICIRANE SULFIDIMA PRIJELAZNIH METALA

DIPLOMSKI RAD

JELA VUKADIN

Matični broj: 180

Split, listopad 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE

ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE VODIKOVOG PEROKSIDA I AMONIJAKA NA ELEKTRODAMA OD UGLJIKOVE PASTE MODIFICIRANE SULFIDIMA PRIJELAZNIH METALA

DIPLOMSKI RAD

JELA VUKADIN
Matični broj: 180
Split, listopad 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

ELECTROCHEMICAL BEHAVIOUR OF HIDROGEN PEROXIDE AND AMMONIA ON CARBON PASTE ELECTRODES MODIFIED WITH SULPHIDES OF THE TRANSITION METALS

DIPLOMA THESIS

JELA VUKADIN

Parent number: 180

Split, listopad 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet

Preddiplomski studij kemijske tehnologije

Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Mentor: doc. dr. sc. Marijo Buzuk

Pomoć pri izradi: /

ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE VODIKOVOG PEROKSIDA I AMONIJAKA NA ELEKTRODAMA OD UGLJIKOVE PASTE MODIFICIRANE SULFIDIMA PRIJELAZNIH METALA

Jela Vukadin, 180

Sažetak: U ovom radu je ispitivano elektrokemijsko ponašanje elektroda od ugljikove paste modificiranih različitom količinom ternarnih sulfida u svrhu elektrokemijskog određivanja vodikovog peroksida i amonijaka. Elektrokemijski procesi uočeni na ovako modificiranim elektrodama ukazuju na mogućnost indirektnog određivanja vodikovog peroksida i amonijaka. Ova metoda se zasniva na formiranju stabilnih kompleksa vodikovog peroksida i amonijaka s metalnim ionima ternarnih sulfida. Mjerenja su vršena pri tri pH vrijednosti (pH=5, 7 i 9) te je kao optimalna pH vrijednost odabrana pH=5. Elektroanalitičko određivanje vodikovog peroksida i amonijaka vršeno je voltametrijom s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV).

Ključne riječi: vodikov peroksid, amonijak, elektrokemijsko određivanje, ciklička voltametrija, voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude, sulfidi, modifikacije, elektroda od ugljikove paste

Rad sadrži: 71 stranicu, 48 slika, 4 tablice, 0 priloga, 27 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.Doc. dr. sc. Ivana Škugor Rončević – predsjednik

2.Doc. dr. sc. Maša Buljac – član

3.Doc. dr. sc. Marijo Buzuk – član-mentor

Datum obrane: (29. listopada 2018.**)**

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split

Faculty of chemistry and technology

Graduate Study on Chemical Technology

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Chemistry and Technology, session no. 3.

Mentor: Marijo Buzuk – PhD, assistant prof.

Technical assistance: /

ELECTROCHEMICAL BEHAVIOUR OF HYDROGEN PEROXIDE AND AMMONIA ON CARBON PASTE ELECTRODES MODIFIED WITH SULPHIDES OF THE TRANSITION METALS

Jela Vukadin, 180

Abstract: This paper investigated the electrochemical behaviour of carbon paste electrodes modified by a different amount of ternary sulphides for the purpose of electrochemical determination of hydrogen peroxide and ammonia. The electrochemical processes observed on such modified electrodes indicate the possibillity of indirect determination of hydrogen peroxide and ammonia. This method is based on the formation of stable hydrogen peroxide and ammonium complexes with metallic ternary sulphide ions. Measurements were carried out at three pH values (pH=5, 7 and 9) and pH 5 was chosen as the optimal pH value. Electro-analytical determination of hydrogen peroxide and ammonia was performed by a voltammetric with a rectangular acoustic signal (SWV).

Keywords: peroxide, ammonia, electrochemical determination, cyclic voltammetry, squarewave voltammetry, sulphides, modification, carbon paste electrodes

Thesis contains: 71 pages, 48 figures, 4 tables, 0 supplements, 27 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ivana Škugor Rončević – PhD, assistant prof. chair person

2. **Maša Buljac – PhD, assistant prof. member**

3. Marijo Buzuk- PhD, assistant prof. suprvisor

Defence date: (October 29th 2018.)

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Marija Buzuka, u razdoblju od travnja do listopada 2018. godine.

Zahvala

Zahvaljujem se prije svega svojoj obitelji i prijateljima koji su mi uvijek bili bezuvjetna podrška kao i svim profesorima i kolegama s kojima sam provela vrijeme tijekom školovanja.

Isto tako, srdačno se zahvaljujem i svom mentoru doc. dr. sc. Mariju Buzuku na stručnoj pomoći i savjetima, te na izdvojenom vremenu i strpljenju.

Zadatak diplomskog rada

1. Utvrđivanje elektrokemijskog ponašanja nemodificirane i modificirane elektrode pri pH=5, 7, 9.
2. Utvrđivanje elektrokemijskog ponašanja vodikovog peroksida i amonijaka na elektrodama (modificiranim i nemodificiranim) od ugljikove paste.
3. Elektroanalitičko određivanje vodikovog peroksida i amonijaka na osnovu rezultata dobivenih iz predhodne dvije točke.
4. Odabir i optimiranje elektrokemijske metode za određivanje vodikovog peroksida i amonijaka na elektrodama modificiranim sa različitim ternarnim sulfidima.

SAŽETAK

U ovom radu je ispitivano elektrokemijsko ponašanje elektroda od ugljikove paste modificiranih različitom količinom ternarnih sulfida u svrhu elektrokemijskog određivanja vodikovog peroksida i amonijaka. Elektrokemijski procesi uočeni na ovako modificiranim elektrodama ukazuju na mogućnost indirektnog određivanja vodikovog peroksida i amonijaka. Ova metoda se zasniva na formiranju stabilnih kompleksa vodikovog peroksida i amonijaka s metalnim ionima ternarnih sulfida.

Mjerenja su vršena pri tri pH vrijednosti (pH=5, 7 i 9) te je kao optimalna pH vrijednost odabrana pH=5. Elektroanalitičko određivanje vodikovog peroksida i amonijaka vršeno je voltametrijom s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV).

Ključne riječi: vodikov peroksid, amonijak, elektrokemijsko određivanje, ciklička voltametrija, voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude, sulfidi, modifikacije, elektroda od ugljikove paste

SUMMARY

This paper investigated the electrochemical behaviour of carbon paste electrodes modified by a different amount of ternary sulphides for the purpose of electrochemical determination of hydrogen peroxide and ammonia. The electrochemical processes observed on such modified electrodes indicate the possibillity of indirect determination of hydrogen peroxide and ammonia. This method is based on the formation of stable hydrogen peroxide and ammonium complexes with metallic ternary sulphide ions. Measurements were carried out at three pH values (pH=5, 7 and 9) and pH 5 was chosen as the optimal pH value. Electro-analytical determination of hydrogen peroxide and ammonia was performed by a voltammetric with a rectangular acoustic signal (SWV).

Keywords: hidrogen peroxide, ammonia, electrochemical determination, cyclic voltammetry, squarewave voltammetry, sulphides, modification, carbon paste electrodes

Sadržaj

1 OPĆI DIO 3

1.1 Uloga vodikovog peroksida u biološkim (enzimskim) reakcijama 5

Oksidaze 5

1.1.1. Enzimske reakcije koje imaju kao produkt/reaktant vodikov peroksid 7

1.2 Uloga amonijaka u biološkim (enzimskim) reakcijama 15

1.2.1 Enzimske reakcije koje imaju kao produkt/reaktant amonijak 15

1.2.1.2 Karbaomil fosfat sintetaza 16

1.2.1.3 Nitrogenaza 17

1.2.1.4 Glutaminska sintetaza 18

1.2.1.5 Glutaminaza 19

1.2.1.6 Glutamat dehidrogenaza (GLDH, GDH) 20

1.2.1.7 Asparaginaza 20

1.3 Elektrokemijsko određivanje H_2O_2 na elektrodama (od ugljikovih materijala) modificiranim metalnim oksidima ili sulfidima 21

1.4 Elektrokemijsko određivanje NH_3 na elektrodama (od ugljikovih materijala) modificiranim metalnim oksidima ili sulfidima 23

1.5 Enzimski senzori (bio-senzori) 23

1.5.1 Biosenzori za glukozu 24

1.5.2 Elektrokemijski senzori na bazi heterogenih ugljikovih materijala 26

Čvrsta matrica 30

1.5.2.1 Nemodificirane ugljik pasta elektrode 30

1.5.2.2 Modificirane ugljik pasta elektrode 30

1.5.2.3 Modificirane ugljik pasta elektrode u anorganskoj analizi 31

1.6.1 Voltametrija 37

1.6.1.1 Voltametrija s linearnim signalom pobude 37

1.6.1.2 Ciklička voltametrija 38

2 EKSPERIMENTALNI DIO 41

2.1. Priprava otopina 42

2.1.1. Priprava osnovnog elektrolita 42

2.1.2. Priprava otopine kalijevog nitrata, KNO_3 42

2.1.3. Priprava otopine CH_3COONa 42
2.1.4. Priprava otopine octene kiseline, CH_3COOH 42
2.1.5. Priprava otopine acetatnog pufera pH 4 43
2.1.8. Priprava otopine fosfatnog pufera; pH 7 43
2.1.9. Priprava otopine amonijačnog pufera, pH 9 43
2.1.10. Priprava otopine boratnog pufera, pH=9 43
2.1.11. Priprava otopine vodikovog peroksida 43
2.1. Aparatura i elektrodni materijal 44
2.2.1. Aparatura 44
2.2.2.Priprava radnih elektroda 44
3 REZULTATI I RASPRAVA 46
4 ZAKLJUČAK 67
5 LITERATURA 69

UVOD

U ovom radu su prikazani utjecaji različitih parametara na elektroanalitički signal. Elektroanalitičke metode čine skupinu analitičkih postupaka kod kojih informaciju odnosno podatak o koncentraciji, aktivitetu ili nekom drugom, npr. termodinamičkom podatku određivane molekulske vrste (atoma, iona ili molekule) dobivamo posredstvom međusobno razmjernih odnosno analognih električnih veličina, tj. s pomoću električnog napona, električne struje ili električnog naboja.

Na raznovrsnost elektroanalitičkih metoda utječe i vrsta električnog signala kojim izazivamo proces elektrolize, tj. tkz. signal pobude. Signalima pobude, naponom ili električnom strujom, provodimo proces elektrolize. Ako je signal pobude električni napon, kroz radnu elektrodu će teći električna struja, koja je rezultirajuća fizikalna veličina, tj. signal odziva. Možemo je mjeriti kao funkciju narinutog napona i tada govorimo o voltametrijskim metodama.

1 OPĆI DIO

Vodikov peroksid

Zbog važnosti vodikovog peroksida (H_2O_2) u biološkim sustavima i praktičnim primjenama, razvoj učinkovitih elektrokemijskih senzora H_2O_2 posebno je važan. Za razvoj H_2O_2 senzora primijenjeni su različiti materijali temeljeni na prijelaznim spojevima metala. Sinergijski učinak između nanotehnologije i elektrokemijskog određivanja H_2O_2 posebno predmet interesa zadnjih godina.

Vodikov peroksid (H_2O_2) je spoj s velikim značenjem u farmaceutskim, ekološkim, rudarskim, tekstilnim i prehrambenim industrijama. U živim organizmima osim poznatih štetnih efekata u stanicama, H_2O_2 također ima bitnu ulogu kao signalna molekula u reguliranju različitih bioloških procesa kao što je aktivacija imunološkog stanja, apoptoza, zatvaranje želuca i sl. H_2O_2 je također proizvod koji nastaje iz nekih klasičnih biokemijskih reakcija kataliziranih enzimima kao što je glukoza oksidaza (GOx), alkohol oksidaza (AlOx), laktat oksidaza (LOx), urat oksidaza (UOx), kolesterol oksidaza (ChoOx), D-aminokiselina oksida (DAAO), glutamat oksidaza (GlOx), lizin oksidaza (LyOx), itd. Konvencionalne tehnike za određivanje vodikovog peroksida kao što su fluorimetrija, kemiluminescencija, fluorescencija i spektrofotometrija su složene, skupe i dugotrajne. U usporedbi s njima elektrokemija može ponuditi jednostavnu, brzu, osjetljivu i jeftiniju cijenu analize.

H_2O_2 se može oksidirati ili reducirati izravno na običnim čvrstim elektrodama. Međutim, ti procesi u analitici ograničeni su kinetikom reakcije visok potencijal smanjiti će senzorsku osjetljivost izazvati interferencije od drugih postojećih elektroaktivnih vrsta u stvarnim uzorcima kao što su askorbat, urat, bilirubin itd. Stoga se sadašnje istraživanje otkrivanja H_2O_2 uglavnom fokusira na modifikacije elektroda kako bi smanjili visoki potencijal i povećali kinetiku prijenosa elektrona. Za ta razmatranja, upotrijebljen je veliki broj materijala kao što su redoks proteini, prijelazni metali, metalni oksidi, metalni ftalocijanini, metalni porfirini, redoks polimeri i ugljikove nano-cijevi.

1.1 Uloga vodikovog peroksida u biološkim (enzimskim) reakcijama

Vodikov peroksid nastaje u peroksisomima i kloroplastima reakcijama oksidacije. Također nastaje u mitohondrijima biljaka u transportnom lancu elektrona i oksidacijskoj fosforilaciji [1]. Kao jedan od reaktivnih spojeva kisika vodikov peroksid je prirodni produkt metabolizma te nastaje u neenzimskim i enzimskim reakcijama.

Vodikov peroksid može nastati na nekoliko načina: oksalat oksidaza katalizira stvaranje vodikovog peroksida i ugljikovog dioksida iz oksalata u prisutnosti kisika, a amino oksidaza katalizira oksidaciju biogenih amina u aldehide uz oslobađanje amonijaka i vodikovog peroksida. Vodikov peroksid inaktivira brojne metaloenzime jer u prisutnosti metala formira visokoreaktivni hidroksilni radikal.

Glavni štetni učinci vodikovog peroksida očituju se u poticanju lipidne peroksidacije i inaktivaciji enzima. Vodikov peroksid inaktivira Cu/Zn superoksid dismutazu (SOD) putem redukcije Cu^{2+} u Cu^{+} ione u reakcijskom središtu enzima. Razina H_2O_2 unutar stanice regulirana je enzim poput peroksidaze i katalaze. Obje skupine enzima imaju ulogu u otklanjanju H_2O_2. Osim štetnog djelovanja vodikov peroksid ima i pozitivnu ulogu. Naime, H_2O_2 je neutralna molekula pri pH vrijednosti ispod 10 te zbog toga može difundirati kroz biomembrane što mu omogućuje ulogu signalne molekule stresa koja djeluje na aktivaciju gena čiji će produkti uspostaviti novi stabilni metabolizam u biljnom organizmu [2].

Oksidaze

Oksidaza je svaki enzim koji katalizira oksidacijsko-redukcijske reakcije, osobito one u kojima je uključen molekularni kisik (O_2), kao akceptor elektona. Ove reakcije podrazumijevaju predaju atoma vodika ili vodikov kation, a kisik se reducira u vodu (H_2O) ili vodikov peroksid (H_2O_2) [3]. Neke oksidacijske reakcije, kao što je ona sa monoaminskom oksidazom ili ksantinskom oksidazom, obično ne uključuju slobodni molekularni kisik. Flavin-adenin-dinukleotid (FAD) je redoks kofaktor, točnije prostetička skupina proteina, uključena u nekoliko važnih enzimatskih reakcija u metabolizmu. Flavoprotein je protein koji sadrži dio flavina, a to može biti u obliku FAD ili flavin mononukleotida (FMN). Uz mnoge komponente kompleksa sukcinat dehidrogenaze postoji mnogo flavoproteina, uključujući α-ketoglutarat

dehidrogenazu i komponentu kompleksa piruvat dehidrogenaze. FAD može postojati u četiri različita oksidacijska stanja, flavin-N (5)-oksid, kinon, semikinon i hidrokinon [4].

FAD-oksidaze koriste molekularni kisik kao akceptor elektrona. Kao primjer može se istaknuti oksidacija glukoze katalizirana glukoza oksidazom pomoću FAD prostetičke skupine kao elektrona i vodikovog prijenosnika (Slika 1). Glukoza oksidaza iz *Aspergillus niger* široko se koristi u bioanalitičkoj kemiji, bilo kao analitički reagens ili kao materijal za prepoznavanje biosenzora glukoze. To je zato što je glukoza spoj velike analitičke primjene u praćenju dijabetesa, kao i u prehrambenoj industriji. Osim toga, relativno niska cijena i dobra stabilnost čine sustav glukoza/glukoza oksidaze vrlo prikladnim modelom za razvoj novih metoda u određivanju glukoze. Druge FAD ovisne oksidaze s širokim primjenama u senzorskoj znanosti sažete su u tablici 1. Posljednji enzim u ovoj tablici (laktat oksidaza) se oslanja na flavin mononukleotidnu prostetičku skupinu (FMD). Flavin-oksidaze koriste kisik i daju vodikov peroksid. Praćenje jednog od gornjih spojeva je opća metoda transdukcije za senzore temeljene na FAD-oksidazi. Kisik se, međutim, može zamijeniti umjetnim akceptorom elektrona koji omogućava rad bez kisika.

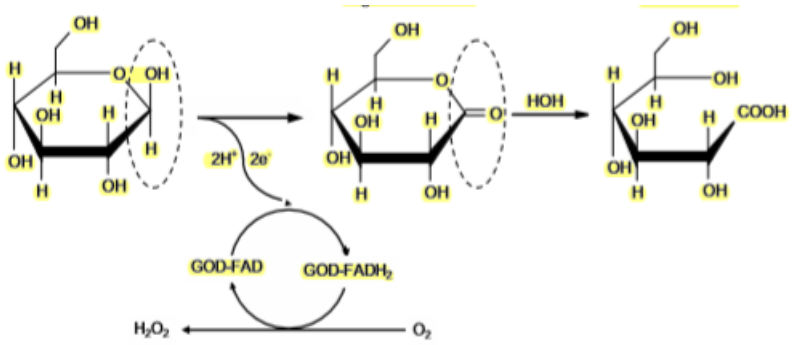
Tablica 1. Primjena oksidaze u biosenzorima

Enzim	Reakcija	Primjena
L-askorbat oksidaza (L-askorbat: oksidoreduktaza kisika) EC 1.10.3.3	L-askorbat +1/2 O_2→ dehidroaskorbat + H_2O	Prehrambena industrija
Tirozinaza (monofenol, L-dopa: oksidoreduktaza kisika) Katehol oksidaza (1,2-benzendiol: oksidoreduktaza kisika) EC 1.10.3.1	L-tirozin +L-dopa+O_2→ L- dopa + dopakinon + H_2O	
Katehol oksidaza (1,2-benzendiol: oksidoreduktaza kisika) EC 1.10.3.1	katekol+1/2O_2→(1,2-Benzokinon)+H_2O	
Laktaza (benzenediol:oksido oksidoreduktaze) EC 1.10.3.2	4 (Benzenediol)+1/2O_2→4 (Benzosemikinon)+H_2O	Okoliš

1.1.1. Enzimske reakcije koje imaju kao produkt/reaktant vodikov peroksid

Kao primjer uloge vodikovog peroksida u biološkim reakcijama mogu se navesti reakcije katalizirane sa:

1.1.1.1 Glukoza oksidaza

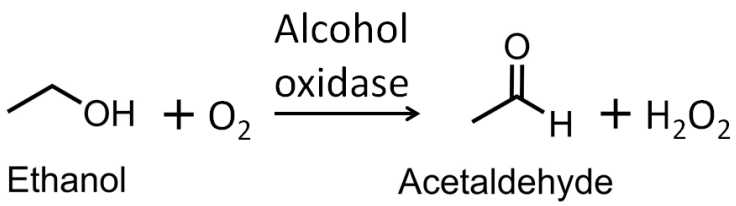


Slika 1- *Oksidacija glukoze katalizirana glukoza oksidazom (GOD)*

FAD i $FADH_2$ su oksidirani i reducirani oblici prostetičke skupine. Glukoza se oksidira nakon prijelaza elektrona i iona u oksidirani oblik prostetičke skupine (FAD) koji se reducira na $FADH_2$. FAD se regenerira oksidacijom $FADH_2$ molekulskim kisikom. Vodikov peroksid se stvara kao nusprodukt ove reakcije [6].

1.1.1.2 *Alkohol oksidaza*

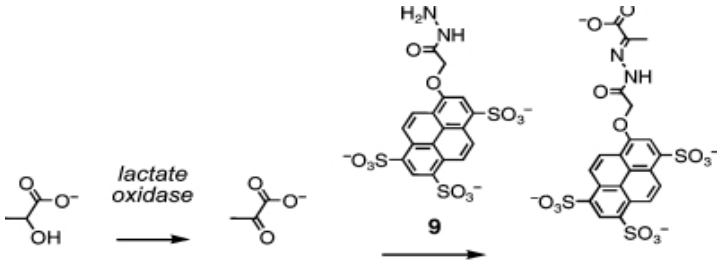
Ovaj enzim katalizira reakciju u kojoj nastaju vodikov peroksid i aldehid. Pripada skupini oksidoreduktaza. Također, ovaj se enzim naziva i etanol oksidaza [7].



Slika 2- *Oksidacija alkohola katalizirana alkohol oksidazom*

1.1.1.3 *Laktat oksidaza*

Laktat oksidaza je enzim koji pripada skupini oksidoreduktaza. Katalizira reakciju sinteze piruvata. Sustavno ime ove vrste enzima je: (S)-laktat: kisik 2-oksidoreduktaza [8].

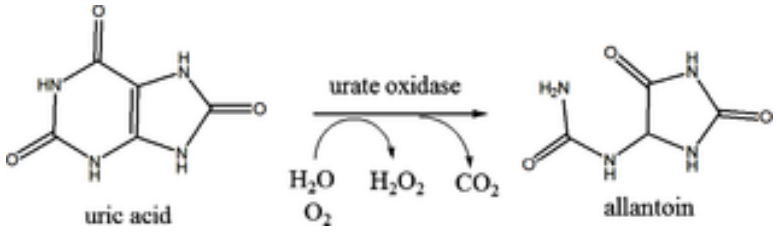


laktat piruvat

Slika 3- *Sinteza piruvata katalizirana laktat oksidazom*

1.1.1.4 *Urat oksidaza*

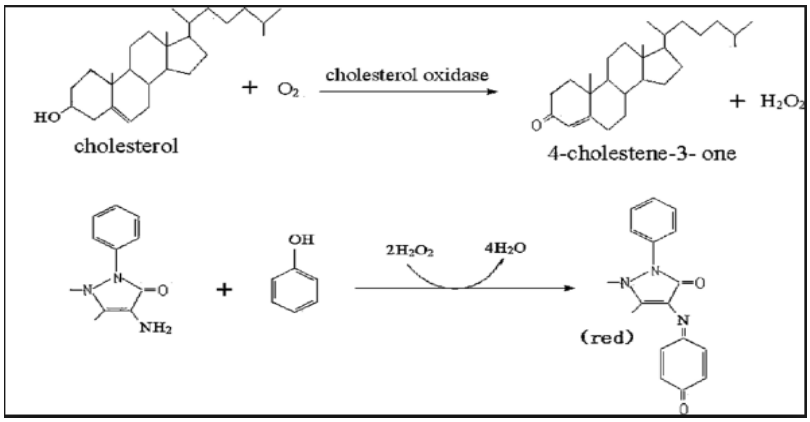
Urat oksidaza katalizira reakciju oksidacije mokraćne kiseline u alantoin. Urat oksidaza je prva u nizu od tri enzima koja pretvara mokraćnu kiselinu u alantoin. Unutar aktivnog mjesta urat oksidaze nalazi se katalitičko mjesto koje zadržava mokraćnu kiselinu i njene analoge u istoj orijentaciji i zajedničkom katalitičkom mjestu [9].



Slika 4- *Oksidacija mokraćne kiseline u alantoin*

1.1.1.5 *Kolesterol oksidaza*

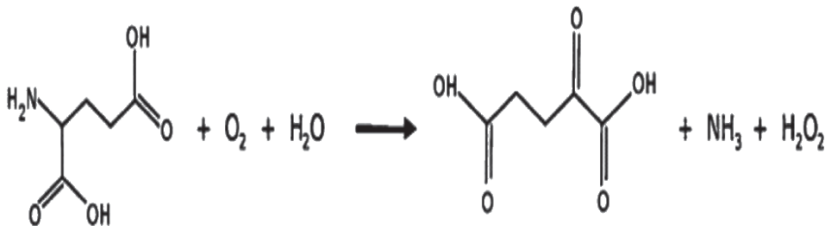
Ovaj enzim pripada skupini oksidoreduktaza, posebno onih koji djeluju na -OH skupinu donora, s kisikom kao akceptorom. Kolesterol oksidaza sudjeluje u biosintezi žučne kiseline [10].



Slika 5- *Oksidacija kolesterola uz enzim kolesterol oksidaza*

1.1.1.6 *Glutamat oksidaza*

L-glutamat oksidaza je enzim koji pripada skupini oksidoreduktaza [11].

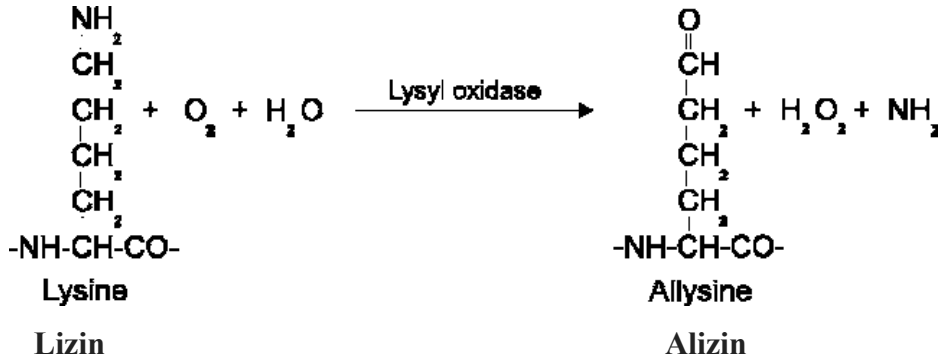


L-glutamat **2-oksoglutarat**

Slika 6- *Oksidacija L-glutamata katalizirana s glutamat oksidazom*

1.1.1.7 *Lizin oksidaza*

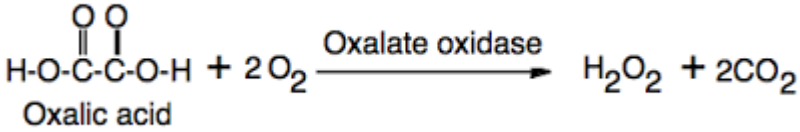
L-lizin je enzim koji pripada skupini oksidoreduktaza. Sustavno ime ove klase enzima je L-lizin: kisik 2-oksidoreduktaza (deaminiranje). Ovaj enzim sudjeluje u degradaciji lizina [12].



Slika 7*- Prikaz reakcije katalizirane enzimom lizin oksidaza*

1.1.1.8 Oksalat oksidaza

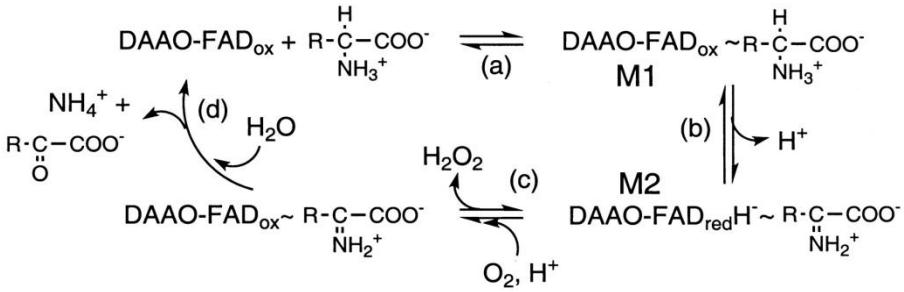
Oksalat oksidaza pripada skupini oksidoreduktaza, posebno onih koji djeluju na aldehidnu ili okso skupinu donora s kisikom kao akceptorom. Ovaj enzim sudjeluje u metabolizmu glioksilata i dikarboksilata [13].



Slika 8*- Prikaz reakcije katalizirane s enzimom oksalat oksidaza*

1.1.1.9 *D-amino kiselinska oksidaza (DAAO)*

D-amino kiselinska oksidaza je enzim koji ima funkciju da oksidira D-amino kiseline u odgovarajuće imino kiseline, pri čemu nastaje amonijak i vodikov peroksid. To rezultira brojnim fiziološkim učincima u različitim sustavima, osobito u mozgu. Dok se D-amino kiselinska oksidaza razlikuje u određenoj mjeri između različitih organizama, struktura je u osnovi ista kod većine eukariota, isključujući biljke [14].



Slika 9- *Prikaz reakcije katalizirane s enzimom DAAO*

1.1.1.10 *Superoksid dismutaza*

Superoksid dismutaza (SOD) je enzim koji katalizira razgradnju superoksida (O^{2-}) na vodikov peroksid i molekularni kisik.

$$2O_2^+ + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (1)$$

Superoksid nastaje u svim staničnim djelovima u kojima je prisutan lanac elektrona i gdje se formira superoksidni radikal. Proizvodi se kao nusprodukt metabolizma kisika, uzrokuje mnoge vrste oštećenja stanica. Dakle, SOD je važna antioksidacijska obrana u gotovo svim živim stanicama koje su izložene kisiku.

SOD katalizira razgradnju superoksida:

$$2HO_2 \rightarrow O_2 + H_2O_2 \qquad (2)$$

Fosfolipidne membrane su nepropusne za nabijene superoksidne molekule. Stoga je važno da se superoksid dismutaze nalaze i u djelovima u kojima superoksid nastaje kako bi ga mogle razgraditi. Na temelju metalnih kofaktora superoksid dismutaze se dijele u četiri skupine: željezo (Fe SOD), mangan (Mn SOD), nikal (Ni^{3+} SOD) i bakar-cink (Cu-Zn SOD) superoksid dismutaze. One se nalaze u različitim odjeljcima unutar stanice: Mn SOD se nalazi u

mitohondrijima, Fe SOD u kloroplastima, a Cu-Zn SOD u kloroplastima i citosolu. Svaka SOD forma je nezavisno regulirana ovisno o stupnju stresa u pojedinom staničnom odjeljku.

Opći oblik koji se primjenjuje na sve različite metalno koordinirane oblike SOD, može se napisati na sljedeći način:

$M^{(n+1)}\text{-SOD} + O_2^- \rightarrow M^{n+}\text{-SOD} + O_2$ (3)

$M^{n+}\text{-SOD} + O_2^- \rightarrow M^{(n+1)}\text{-SOD} + H_2O_2$ (4)

Gdje je M=Cu(n=1); Mn(n=2); Fe(n=2); Ni(n=2).

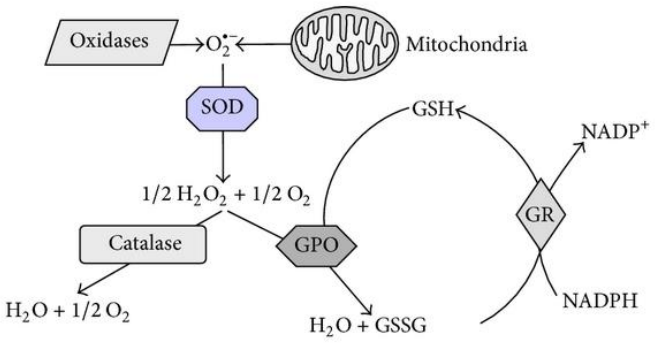
U nizu takvih reakcija oksidacijsko stanje i naboj metalnog kationa mijenjaju se između n i n+1, +1 i +2 za bakar, ili +2 i +3 za ostale metale.

1.1.1.11 *Peroksidaze*

Biljne peroksidaze su glikoproteini koji sadrže protohematin IX kao prostetičku skupinu. Ti enzimi kataliziraju oksidaciju staničnih komponenti (npr. fenolnih spojeva, askorbinske kiseline, glutationa i dr.) koristeći vodikov peroksid kao supstrat koji služi kao akceptor protona. Reakcije katalizirane peroksidazama uklanjaju suvišak vodikovog peroksida iz stanice pri čemu se peroksid reducira do vode. Peroksidaze se dijele u dvije skupine s obzirom na specifičnost supstrata. Prvoj skupini pripadaju askorbat peroksidaza (APX) i glutation peroksidaza, a njihova glavna funkcija je uklanjanje suviška H_2O_2 te lipidnih peroksida kako ne bi nastali jako reaktivni radikali koji oksidiraju brojne stanične komponente i na taj način uzrokuju oštećenja stanice. Peroksidaze za redukciju H_2O_2 koriste reducirajući supstrat, a to je u biljaka uglavnom askorbat.

Drugu skupinu čine nespecifične peroksidaze (POx) koje sudjeluju u procesima razgradnje auksina, zarastanja rana itd. Ove peroksidaze koriste vodikov peroksid za različite oksidacijske reakcije, a kao donori elektrona mogu poslužiti različite molekule kao na primjer pirogalol i gvajakol.

Glutation peroksidaza (GPx) opći naziv enzimske vrste s aktivnošću peroksidaze čija je glavna biološka uloga zaštititi organizam od oksidacijskog oštećenja. Biokemijska funkcija glutation peroksidaze je pretvorba lipidnih hidroperoksida u njihove odgovarajuće alkohole i smanjenje slobodnog vodikovog peroksida u vodi.



Slika 10 - *Glutation peroksidaza*

Glutation peroksidaza 1 (GPxl) je najbrojnija skupina, koja se nalazi u citoplazmi gotovo svih tkiva sisavaca, čiji je preferirani supstrat vodikov peroksid.

Glutation peroksidaza 2 (GPx2) je crijevni i ekstracelularni enzim.

Glutation peroksidaza 3 (GPx3) je izvanstanični enzim, posebno bogat u plazmi.

Glutation peroksidaza 4 (GPx4) ima visoku prednost u odnosu na lipidne hidroperokside; to se izražava u gotovo svakoj stanici sisavaca, iako na znatno nižim razinama. Do sada je identificirano osam različitih izoformi glutation peroksidaze (GPx1-8) kod ljudi.

Glavna reakcija je:

$$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GS–SG + 2H_2O \qquad (5)$$

gdje GSH predstavlja reducirani monomerni glutation, a GS-SG predstavlja glutation disulfid. Mehanizam uključuje oksidaciju senola, selenocisteinskog ostatka vodikovim peroksidom. Ovaj postupak daje derivat sa skupinom selenenske kiseline (RSeOH). Selenenska kiselina se zatim pretvara selenol dvostupanjskim postupkom koji započinje reakcijom sa GSH da se dobije GS-SeR i voda. Druga GSH molekula reducira GS-SeR intermedijar natrag u selenol, oslobađajući GS-SG kao nusproizvod.

$$RSeH + H_2O_2 \rightarrow RSeOH + H_2O \qquad (6)$$

$$RSeOH + GSH \rightarrow GS\text{-}SeR + H_2O \qquad (7)$$

$$GS\text{-}SeR + GSH \rightarrow GS\text{-}SG + RSeH \qquad (8)$$

Glutation reduktaza zatim reducira oksidirani glutation te završava ciklus:

$GS–SG + NADPH + H^+ \rightarrow 2\ GSH + NADP^+$ (9)

Gdje su NADPH (reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat) i $NADP^+$ (nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat) [15].

1.1.1.12 Katalaza

Katalaza je tetramerni enzim koji sadrži željezo skupinu, a katalizira raspad vodikovog peroksida na molekularni kisik i vodu.

$$2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\ H_2O \qquad (10)$$

Prisutna je u svim aerobnim eukariotima, a nalazi se u peroksisomima i glioksisomima. U peroksisomima uklanja vodikov peroksid koji nastaje oksidacijom masnih kiselina i fotorespiracijom. Katalaza može vodikov peroksid ukloniti na dva načina: direktnom dismutacijom ili oksidacijom alkohola, formalaldehida ili nitrita vodikovim peroksidom. Postoje tri glavne izoforme katalaze: KAT1, KAT2 i KAT3. Geni koji ih kodiraju nalaze se na različitim kromosomima, a njihova je ekspresija nezavisno regulirana KAT1 i KAT2 se nalaze u peroksisomima i citosolu dok se KAT3 nalazi u mitohondrijima [15].

1.2 Uloga amonijaka u biološkim (enzimskim) reakcijama

Pri normalnoj temperature i tlaku amonijak je bezbojan plin, oštra, karakteristična mirisa, lakši od zraka, lako topljiv u vodi. Toksičan je i korozivan prema pojedinim materijalima.

Amonijak je važan izvor dušika za žive sustave. Iako dušika ima u velikim količinama u atmosferi, svega je nekoliko živih bića sposobno koristiti taj dušik. Dušik je neophodan za sintezu aminokiselina, koje su osnova građe proteina. Neke biljke ovise o amonijaku i drugim dušikovim spojevima koji se nalaze u zemljištu kao materije koje se raspadaju.

Amonijak je važan i za normalnu i abnormalnu fiziologiju kod životinja. Amonijak se stvara putem normalnog metabolizma aminokiselina i toksičan je u velikim koncentracijama. Jetra pretvara amonijak u ureu kroz cijeli niz reakcija koji je poznat kao ciklus uree. Disfunkcija jetre, kao što se javlja kod ciroze, može prouzročiti povećane koncentracije amonijaka u krvi, hiperamonemiju. Slično tome, poremećaji kod enzima odgovornih za funkcioniranje ciklusa uree, kao što je enzim ornitin transkarbamilaza, dovode do hiperamonemije.

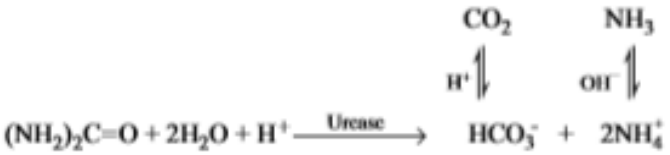
Amonijak je važan za normalnu kiselo-baznu ravnotežu kod životinja. Nakon formiranja amonijaka iz glutamina, α-ketoglutarat može se razgraditi, pri čemu nastaju dvije molekule bikarbonata koje tada služe kao puferi prehrambenih kiselina. Amonijak se izlučuje putem urina, što dovodi do smanjenja kiselosti. Amonijak može difundirati putem bubrežnih cjevčica, reagirajući s vodikovim ionom [9].

1.2.1 Enzimske reakcije koje imaju kao produkt/reaktant amonijak

Kao primjer uloge amonijaka u biološkim reakcijama mogu se navesti reakcije katalizirane sa:

1.2.1.1 Ureaza

Urea se široko koristi kao gnojivo te kao izvor dušika je važna sirovina za kemijsku industriju. Ciklus uree počinje u mitohondriju prvom reakcijom kondenzacije amonijevog iona NH_4^+ s ionom hidrogenkarbonata HCO_3^- i s jednom molekulom fosfata. Ovu reakciju katalizira enzim karbamil fosfat sintetaza i kao konačni produkt formira se molekula karbamil fosfata. U reakciji se troše dvije molekule ATP (adenozin tri-fosfat).



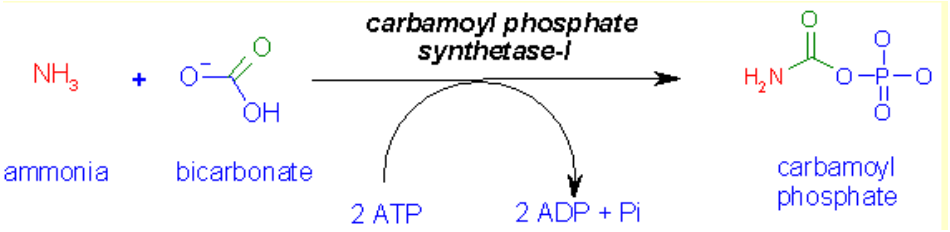
Slika 11- *Prikaz reakcije katalizirane s ureazom*

Enzimatska hidroliza uree

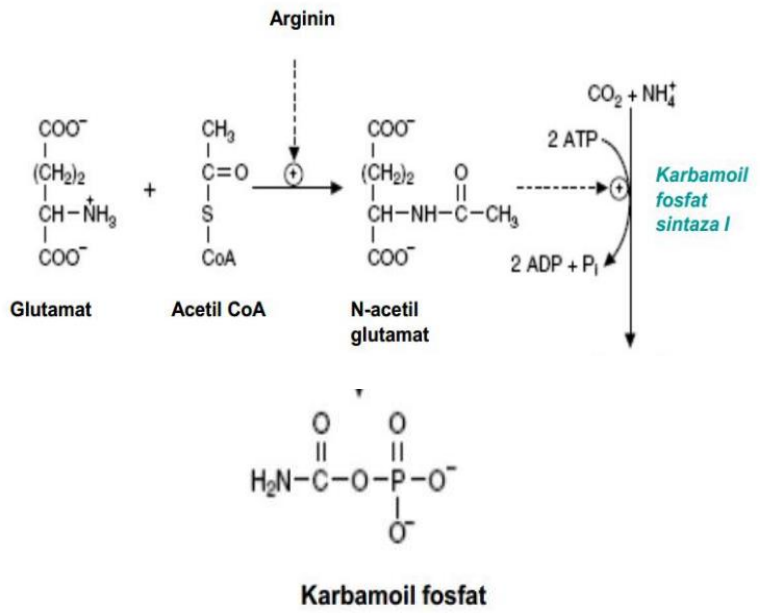
Ciklus sinteze uree se događa u jetri. Započinje u mitohondrijima a završava se u citosolu. Sintetizirana urea se ne skladišti već se preko bubrega izlučuje u vanjsku sredinu.

1.2.1.2 Karbaomil fosfat sintetaza

Citrulin izlazi iz mitohondrija u citosol i spaja se s jednom molekulom aspartata i formira argininsukcinat. Ovu reakciju kondenzacije katalizira argininsukcinat sintetaza. Sinteza citrulina zahtijeva prethodnu sintezu karbamil fosfata (CP).



Slika 12- *Sinteza karbamil fosfata*



***Slika 13**- Prikaz reakcije sinteze karbamil fosfata*

1.2.1.3 Nitrogenaza

Fiksacija dušika je proces u kojem se dušik (N_2) iz Zemljine atmosfere pretvara u amonijak (NH_3). Atmosferski dušik i njegov molekularni oblik (N_2) su relativno inertni: ne reagiraju lako s drugim kemikalijama za formiranje novih spojeva. Proces fiksacije oslobađa atom dušika iz trostruke veze diatomskog oblika [16].

Prirodna i sintetska fiksacija dušika, od suštinske važnosti je za sve oblike života, jer je dušik potreban za biosintetiziranje osnovnih gradivnih blokova biljaka, životinja i drugih oblika života. Fiksacija dušika se prirodno javlja u zemljištu fiksiranjem u bakterijama koje su povezane s nekim biljkama. Neke od ovih bakterija koje imaju vrlo bliske odnose s biljkama imaju simbiotsku fiksaciju dušika.

Od mikroorganizama koji mogu fiksirati dušik mogu se izdvojiti prokarioti pod nazivom diazotrofi. Neke više biljke i neke životinje (termiti), formiraju zajednice sa diazotrofima.

Biološka fiksacija dušika (BNF) nastaje kada se atmosferski dušik pretvara u amonijak pomoću enzima nitrogenaza. Ukupna reakcija BNF-a je:

$N_2 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2$ (11)

Enzimi koji su odgovorni za aktivnost nitrogenaze, vrlo su podložni uništenju kisikom. Iz tog razloga, u prisustvu kisika, mnoge bakterije prestaju proizvodnju enzima.

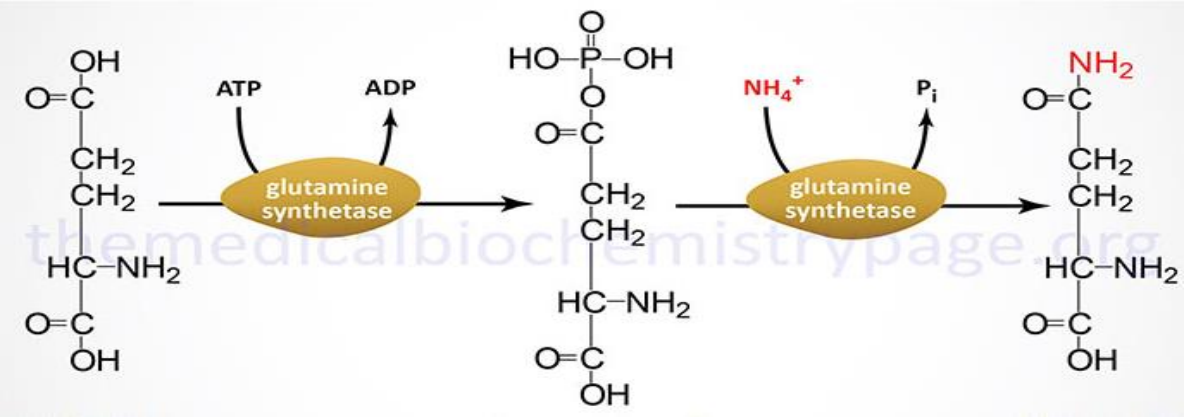
Iz munja u grmljavinama, raznih sagorijevanja i vulkana, od dušika i kisika u zraku nastaju dušikovi oksidi, koji reagiraju s kapljicama vode u atmosferi i stvaraju dušičnu kiselinu. U toj reakciji stvaraju se kisele kiše koje dospijevaju u tlo [16].

$N_2 + O_2 \rightarrow 2NO$ (12)

$4NO + 3\ O_2 + 3H_2O \rightarrow 4HNO_3$ (13)

1.2.1.4 Glutaminska sintetaza

Reakcija katalizirana glutaminskom sintetazom je:

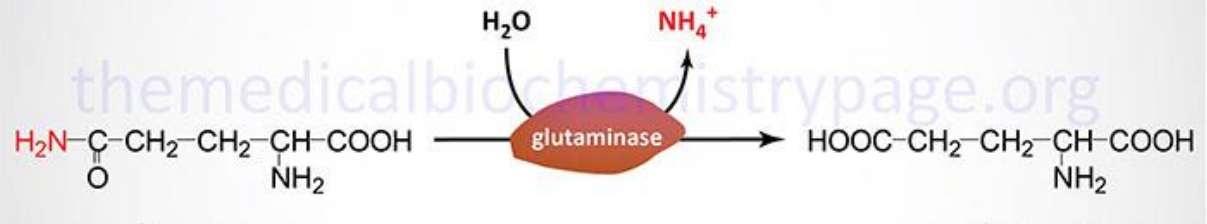


Glutamat **γ-glutamilfosfat** **glutamin**

Slika 14- *Reakcija katalizirana enzimom glutamin sintetaza*

Reakcija glutaminske sintetaze također je važna iz nekoliko aspekata. Prvo daje glutamin, jednu od 20 glavnih aminokiselina. Drugo, kod životinja, glutamin je glavna aminokiselina pronađena u krvožilnom sustavu. Njegova je uloga nositi amonijak iz i na različitim tkivima, ali uglavnom iz perifernih tkiva do bubrega, gdje je amidni dušik hidroliziran enzimom glutaminaze (Slika 15). Ovaj proces regenerira glutamat i slobodni amonijev ion, koji se izlučuje u urinu.

1.2.1.5 Glutaminaza



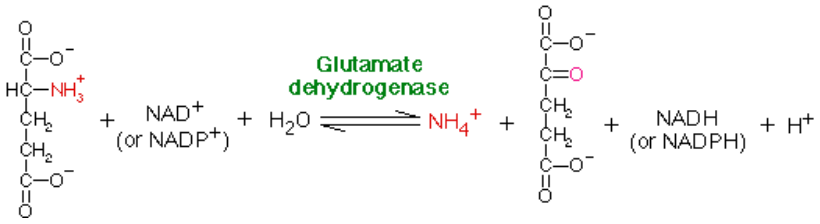
Glutamin **glutamat**

Slika 15- Prikaz reakcije u kojoj sudjeluje enzim glutaminaza

Primarna tkiva koja eksprimiraju glutaminazu su mozak i bubreg. U mozgu je uloga glutaminaze u sintezi neurotransmitera glutamata. U bubrezima je uloga glutaminaze u ravnoteži između kiselina i baza. Međutim, jetra također izražava i glutaminsku sintetazu i glutaminazu, ali enzimi su lokalizirani u različitim podskupovima hepatocita. Time se osigurava da jetra nije ni proizvođač ni potrošač glutamina. Enzimi ciklusa uree nalaze se u istim stanicama kao i one koje sadrže glutaminazu. Rezultat diferencijalne raspodjele tih dvaju jetrenih enzima omogućuje kontrolu ugradnje amonijaka.

Kada se pojavi acidoza, tijelo će transportirati više glutamina od jetre do bubrega. To omogućava očuvanje bikarbonatnog iona budući da ugradnja amonijaka u ureu zahtijeva bikarbonat. Kada glutamin ulazi u bubreg, glutaminaza oslobađa jedan mol amonijaka koji generira glutamat, a zatim glutamat dehidrogenaza otpušta još jedan mol amonijaka koji proizvodi 2-oksoglutarat (α-ketoglutarat). Amonijak će ionizirati na amonijev ion (NH_4^+) koji se izlučuje [9].

1.2.1.6 Glutamat dehidrogenaza (GLDH, GDH)



Glutamat **α-ketoglutarat**

Slika 16- *Prikaz reakcije u kojoj sudjeluje enzim GLDH*

Glutamat dehidrogenaza (GLDH, GDH) je enzim koji, kao i neki drugi enzimi potrebni za sintezu uree koja pretvara glutamat u α-ketoglutarat i obrnuto je prisutan u većini mikroba i mitohondrijima eukariota. Kod životinja, proizvedeni amonijak se obično koristi kao supstrat u ciklusu uree. Glutamat dehidrogenaza također ima vrlo nizak afinitet za amonijak i stoga bi toksični nivoi amonijaka trebali biti prisutni u tijelu za reverznu reakciju (to jest, α-ketoglutarata i amonijaka na glutamate i $NADP^+$).

Enzim predstavlja ključnu vezu između kataboličkih i anaboličkih puteva, te je stoga sveprisutan u eukariotima.

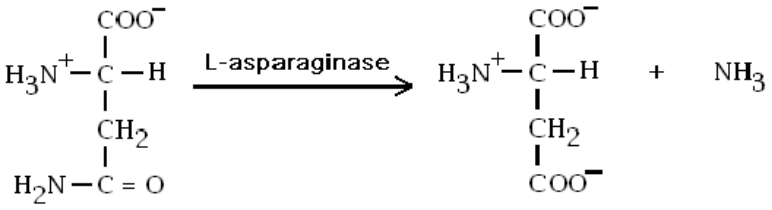
GLDH se može mjeriti u medicinskom laboratoriju za procjenu funkcije jetre. Povišena razina GLDH u serumu ukazuje na oštećenje jetre, a GLDH igra važnu ulogu u diferencijalnoj dijagnostici bolesti jetre, posebno u kombinaciji s aminotransferazama. Bolesti jetre kao što su toksično oštećenje jetre ili hipoksična bolest jetre, karakterizirane su visokom razinom GLDH u serumu [11].

1.2.1.7 Asparaginaza

Asparaginaza je enzim koji se koristi kao lijek i za proizvodnju hrane. Kao lijek L-asparaginaza se koristi za liječenje akutne limfoblastične leukemije (ALL) te akutne mijeloidne leukemije (AML).

Asparaginaza djeluje na način da razgrađuje aminokiselinu L-asparagin na L-aspartatnu kiselinu i amonijak. Nalazi se na popisu osnovnih lijekova svjetske zdravstvene organizacije.

Također se asparaginaza može koristiti u različite industrijske i farmaceutske svrhe. Najčešća uporaba asparaginaze je pri proizvodnji hrane [17].



L-asparagin **L-asparaginaza** **L-aspartatna kiselina** **amonijak**

Slika 17*- Prikaz reakcije u kojoj sudjeluje enzim L-asparaginaza*

1.3 Elektrokemijsko određivanje H_2O_2 na elektrodama (od ugljikovih materijala) modificiranim metalnim oksidima ili sulfidima

1.3.1 Razvijanje elektrokemijskog senzora baziranog na elektrodama ugljika koje su modificirane nano-kompozitom reduciranog grafenskog oksida i nanočestica $CuFe_2O_4$ za određivanje vodikovog peroksida

Za određivanje vodikovog peroksida (H_2O_2) dizajniran je vrlo osjetljivi voltametrijski senzor temeljen na elektrodama ugljika za nanočesticu $CuFe_2O_4$ (RGO / $CuFe_2O_4$ / CPE). Elektrokatalitička redukcija H_2O_2 ispitivana je primjenom različitih tehnika kao što su ciklička voltametrija (CV), kronoamperometrija, amperometrija. Nanočestice $CuFe_2O_4$ sintetizirane su metodom ko-taloženja i karakterizirane s elektronskom mikroskopijom skeniranja (SEM), transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM), rendgenskom difrakcijom (XRD). Zatim je pripravljena elektroda s grafitom modificirana s nanočesticama RGO i $CuFe_2O_4$ prikladna za određivanje vodikovog peroksida. Pod optimalnim uvjetima (pH 5), modificirana elektroda pokazala je brz amperometrijski odgovor od < 2s, dobar linearni raspon od 2 do 200 μM, niske granice detekcije od 0,52 μM za određivanje vodikovog peroksida. Isto tako, vršna struja

diferencijalne pulsne voltametrije (DPV) vodikovog peroksida linearno se povećava s povećanjem koncentracije od 2 do 10 uM i 10 do 1000 uM. Dobivena granica detekcije za vodikov peroksid procijenjena je na 0,064 μM pomoću DPV. Dizajniran senzor uspješno je primijenjen za ispitivanje vodikovog peroksida u biološkim i farmaceutskim uzorcima kao što su mlijeko, zeleni čaj i krem boje za kosu i otopini za ispiranje usta.

1.3.2 Visoko osjetljivi elektrokemijski biosenzor za procjenu oksidacijskog stresa temeljenog na grafenskom nanokompozitu pomiješanom sa zlatom, Fe_3O_4 i platinastim nanočesticama

Visoke razine H_2O_2 se odnose na visoki oksidacijski stres i povezane su s karcinomom, autoimunim i neurodegenerativnim bolestima i drugim srodnim bolestima. U ovom je istraživanju napravljen osjetljiv H_2O_2 biosenzor za procjenu oksidacijskog stresa na osnovi nanokompozita grafen oksida (RGO) pomiješanog s Au, Fe_3O_4 i Pt nanočesticama (RGO / $AuFe_3O_4$ / Pt) modificirane staklene ugljikove elektrode (GCE) i koristi se za otkrivanje otpuštenog H_2O_2 iz stanica raka i procjenu oksidacijskog stresa izazvanog zbog H_2O_2 u živim stanicama. Elektrokemijsko ponašanje nanokompozita RGO / $AuFe_3O_4$ / Pt pokazuje dobru osjetljivost, nizak prenapon od 0 V, niske granice detekcije od ~ 0,1 μM, velik linearan raspon od 0,5 μM do 11,5 mM i izvrsnu ponovljivost. Tako pripremljeni biosenzor primijenjen je u mjerenju protoka H_2O_2 iz živih stanica uključujući zdrave normalne stanice i tumorske stanice pod vanjskom stimulacijom. Rezultati pokazuju da je ovaj novi biosenzor temeljen na nanokompoziciji obećavajući kandidat neenzimatskog H_2O_2 senzora koji ima mogućnost primjene u kliničkoj dijagnostici za procjenu oksidativnog stresa različitih vrsta živih stanica [18].

Isto tako **MnO / C** nanokompozitne elektrode pripremljene su uranjanjem vodljive Ni pjene ili Ti folija u otopinu Mn-oleata / heksana dulje vrijeme. Ove elektrode bile su korištene za detekciju vodikovog peroksida (H_2O_2) u rasponu potencijala od 0,01-3,0 V korištenjem Ag / AgC1 referentne electrode. Uočena je značajna promjena gustoće struje u prisutnosti H_2O_2. Postignuta je ravnoteža unutar vremenskog razdoblja od 5-10 s. Ograničenje detekcije za ove senzore je 2 μM [18].

1.4 Elektrokemijsko određivanje NH_3 na elektrodama (od ugljikovih materijala) modificiranim metalnim oksidima ili sulfidima

Do sada je korišteno nekoliko metoda za dobivanje visoko osjetljivog NH_3 senzora. Primjerice, kemijska stabilnost i izvrsna vodljivost senzora zasnovanih na SnO_2 čini ih kandidatima za određivanje NH_3. Međutim zahtjev visoke temperature za optimalnu funkciju, kao i problem s osjetljivosti i selektivnosti su određeni nedostaci povezani s uređajima na bazi SnO_2. Izvršena je usporedba čistih SnO_2 i SnO_2 / PPy senzora. Uočeno je da čisti SnO_2 pokazuje ne samo loš odgovor na NH_3, nego također zanemarivu vodljivost na sobnoj temperaturi, dok su senzori bazirani na SnO_2 / PPy pokazali pojačanu osjetljivost prema NH_3 plinu.

Titanov dioksid (TiO_2) također je iskorišten za razvoj nanokompozita s grafenom. Takvi kompoziti su postali važni za primjene zbog grafena, njegovih egzotičnih oblika, i različite osobine TiO_2 kao što je visoka temperaturna stabilnost itd [19].

1.5 Enzimski senzori (bio-senzori)

Enzimski senzor može se smatrati kombinacijom pretvornika i tankog enzimskog sloja, koji normalno mjeri koncentraciju supstrata. Enzimska reakcija transformira supstrat, a reakcijski produkt se može detektirati pomoću pretvornika. Koncentracija bilo koje tvari može biti mjerena pod uvjetom da njena prisutnost utječe na brzinu enzima. Prva enzimska elektroda korištena u potenciometriji bila je elektroda za mjerenje koncentracije mokraće (urea). Temelji se na reakciji uree s vodom pod utjecajem enzima ureaze:

$$CO(NH_2)_2 + 2H_2O \text{ (ureaza)} \rightarrow 2NH_4^+ + CO_3^{2-} \qquad (14)$$

Koncentracija mokraće određuje se mjerenjem aktiviteta produkata enzimske reakcije, koji su u relaciji s koncentracijom mokraće u ispitivanom uzorku.

Aktivitet nastalih produkata možemo u tom slučaju izmjeriti na nekoliko načina. Naime, možemo mjeriti aktivitet iona NH_4^+ pomoću staklene elektrode selektivne za ione NH_4^+ (staklena elektroda za monovalentne katione). Možemo povećanjem pH prevesti ione NH_4^+ u molekule NH_3 i koncentraciju nastalog NH_3 odrediti s pomoću elektrode za plinove (NH_3-

elektroda). Isto tako možemo mjeriti aktivitet iona CO_3^{2-} pomoću elektrode s tekućom membranom (CO_3^{2-} elektroda) ili CO_3^{2-} smanjenjem pH prevesti u CO_2 i mjeriti koncentraciju CO_2 elektrodom za plinove (CO_2 elektroda). Bilo kojim od tih načina mjerenja koncentracije produkata možemo odrediti i koncentraciju polazne supstance, tj. mokraće. U praksi se najčešće koristi mjerenje aktiviteta iona NH_4^+ ili molekula NH_3. Naprava za mjerenje (enzimska elektroda) pripravlja se tako da se na osjetljivu površinu indikatorske elektrode nanosi sloj polimernog gela (npr. poliakrilamidni gel) u kojem se nalazi biokatalizator ureaza i pufer otopina. Polimerni gel prekrije se papirom za dijalizu. Na taj način spriječava se difuzija enzima iz polimernog sloja u ispitivani uzorak. Kada je elektroda uronjena u ispitivani uzorak, mokraća sadržana u uzorku, kroz dijafragmu, difundira u polimerni gel. Tu se odvija katalitička reakcija pri kojoj nastaju produkti na koje selektivno reagira indikatorska elektroda mjerne naprave. Ta se elektroda koristi za određivanje mokraće u uzorcima krvi odnosno urina. Poznate su mnoge druge enzimske elekrode. Tako se za određivanje koncentracije glukoze koristi elekroda s **glukoza-okzidazom** kao enzimom i selektivnom elektrodom za jodide (enzimatskom reakcijom nastaje H_2O_2). Kod elektroda za aminokiseline enzimi **su L- ili D-oksidaza aminokiselina**, a indikatorska je elektroda staklena elektroda selektivna za ione NH_4^+. Sulfati se određuju pomoću naprave sa **sulfat-reduktazom** kao enzimom i Ag_2S-selektivnom elektrodom. Na tržištu je malo tih elektroda. Međutim, mnogo različitih enzimskih elektroda izrađuju i primjenjuju sami korisnici. Enzimske elektrode, osim za analitičke svrhe, koriste se i za određivanje kinetike enzimatskih reakcija odnosno za mjerenje aktivnosti enzima. [20]

1.5.1 Biosenzori za glukozu

Biosenzori za glukozu najuspješniji su amperometrijski biosenzori. Upotrebljavaju se za mjerenje koncentracije glukoze u prehrambenim proizvodima, u kliničkoj analizi plazme i krvi, odnosno u biološkim tkivima. Malene naprave za mjerenje glukoze napravljene su kao osobni pribor za dijabetičare. Različiti su načini mjerenja koncentracije glukoze amperometrijskim senzorima. Većina se temelji na katalitičkoj reakciji oksidacije glukoze s pomoću enzima glukoza-oksidaze (GOD) u prisutnosti molekularnoga kisika. [20]

1.5.1.1 Biosenzor za glukozu uz molekularni kisik kao oksidans

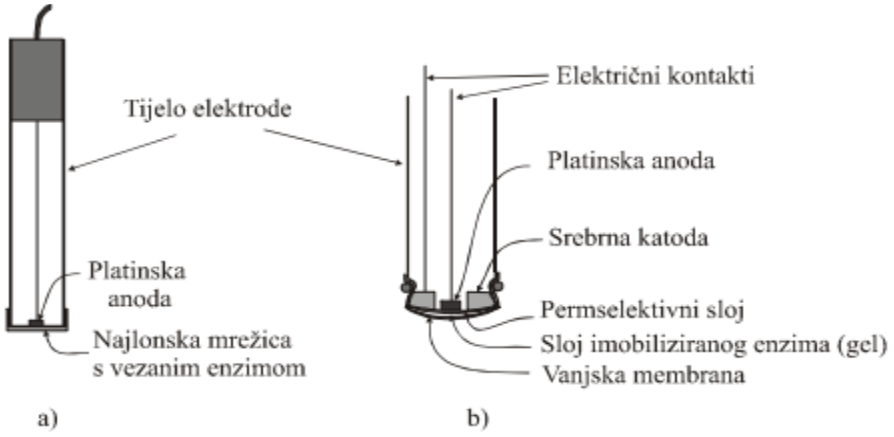
Reakcija se temelji na parcijalnoj reakciji oksidacije aldehidne skupine glukoze u karboksilnu skupinu, te parcijalnu reakciju redukcije molekularnoga kisika:

$$O_2 + 2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2O_2 \qquad (15)$$

Glukoza-oksidaza u katalitičkoj reakciji prelazi iz oksidiranog oblika u reducirani oblik i natrag.

$$GOD_{red} + O_2 + 2H^+ \rightarrow GOD_{oks} + H_2O_2 + 2e^- \qquad (16)$$

Za kvantifikaciju koncentracije glukoze u uzorku može se elektrokemijski mjeriti koncentracija H_2O_2 kao produkta reakcije ili promjena (smanjenje) koncentracije kisika u reakcijskom sloju. Mjerenjem jakosti struje anodne oksidacije H_2O_2 (povratna reakcija od reakcije prikazane prethodnom jednadžbom) pri potencijalu elektrode od oko +600 mV prema Ag/AgCl referentnoj elektrodi, utvrđuje se koncentracija H_2O_2. Ona je u relaciji s koncentracijom glukoze u ispitivanom mediju. To se može učiniti tako da se enzim kemijski veže na površinu najlonske mrežice kojom se prekrije površina platinske elektrode (anoda) ili uklapanjem enzima u polimerni gel.

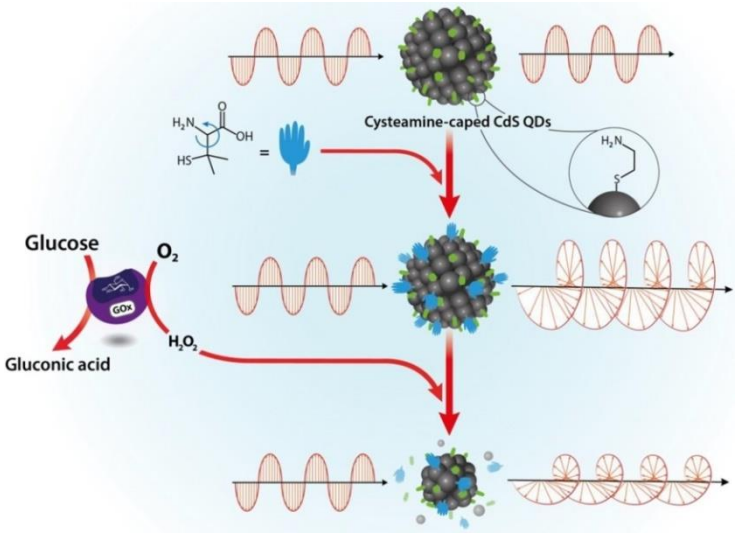


***Slika 18**- Biosenzori za glukozu zasnovani na anodnoj oksidaciji H_2O_2, s imobiliziranim enzimom na površini najlonske mrežice (a) I u polimernom gelu (b)*

Tim senzorima mogu se mjeriti koncentracije glukoze u granicama od 1,8 do 1000 mg/L, i to u prehrambenim namirnicama, kakve su sladoled, glukozni sirupi i prašci, mlijeko, melasa, u kojima praktično nema interferirajućih tvari. Vrlo je važno određivanje koncentracije glukoze u kliničkoj analizi (krvne) plazme i cjelovite krvi [21].

1.5.1.2 Biosenzor glukoze koji se temelji na kiralnim kadmijskim sulfidnim kvantnim točkama

Uspješno je razvijen novi pristup izradi biosenzora glukoze koji se temelji na kružnoj spektroskopiji (CD) korištenjem kvantnih točaka kadmij sulfida (CdS QDs) kao sonde senzora i pokazala je izvrsnu selektivnost i osjetljivost. Kiralni CdS QDs (DPA / Cys-CdS QDs) može se jednostavno pripremiti miješanjem CdS QDs (Cys-CdS QDs, akiralni QDs) sa D-penicilaminom (DPA). Pripremljeni DPA / Cys-CdS QDs aktivni su u kružnoj spektroskopiji zahvaljujući kiralnosti DPA. Načelo otkrivanja glukoze temelji se na uništenju kiralnih QD-a od strane H_2O_2 generiranog *in situ* iz enzimske reakcije glukoza oksidaze (GOx) i glukoze u prisutnosti otopljenog kisika. Ovaj senzor osigurava izvrsnu selektivnost za otkrivanje glukoze u odnosu na druge. Istraženi su i optimizirani parametri koji bi mogli utjecati na osjetljivost senzora. U optimiziranim uvjetima, utvrđeno je da je linearni radni koncentracijski raspon 50-250 μM s granicom detekcije (LOD) od 31 μM.



Slika 19- *Biosensor glukoze*

1.5.2 Elektrokemijski senzori na bazi heterogenih ugljikovih materijala

Heterogene elektrode su elektrokemijski senzori izrađeni od električki provodljivog ugljikovog materijala umiješanog u veznu matricu. Ugljikovi materijal i vezivna matrica mogu poslužiti kao kriteriji za klasifikaciju ove grupe senzora. I drugi aspekti mogu biti osnova

klasifikacije, kao što su fizički (pastozni ili čvrsti materijali), kemijski (modificirane ili nemodificirane elektrode ili biosenzori) ili prema kriteriju produkcije senzora (štampane elektrode ili elektrode na bazi debelog sloja). Uobičajna je klasifikacija bazirana na osobinama matrice.

Elektrode od ugljika

Najviše korištena tekuća matrica je bila osnova izrade brojnih senzor elektroda *(CPE – Carbon Paste Electrodes*). Rezultirajuća fizička konzistencija ovakvih elektroda je pasta. Pastozni elektrodni materijal je jednostavan za rukovanje i ispunu komercijalnih elektrodnih tijela ali i onih koja se veoma lako mogu napraviti u svakom laboratoriju.

Elektrode izrađene od ugljika trebaju zadovoljiti sljedeće osobine:

- netopljivost u mjernom elektrolitu, koji je najčešće vodena otopina, zbog sprječavanja dezintegracije elektrodnog materijala;
- mali prenapon zbog potrebe stabilnosti elektrode u dužem vremenskom periodu;
- elektrokemijska inertnost u području potencijala primjene za slučajeve potenciometrijskih i amperometrijskih mjerenja kako bi se postigla što manja ”pozadinska struja” (*background current*).

Prvobitna namjera je bila napraviti kapajuću, obnovljivu elektrodu po ugledu na živinu kapajuću elektrodu, ali koja može funkcionirati u području pozitivnih potencijala gdje živina elektroda nije upotrebljiva zbog oksidacije anodnog materijala.

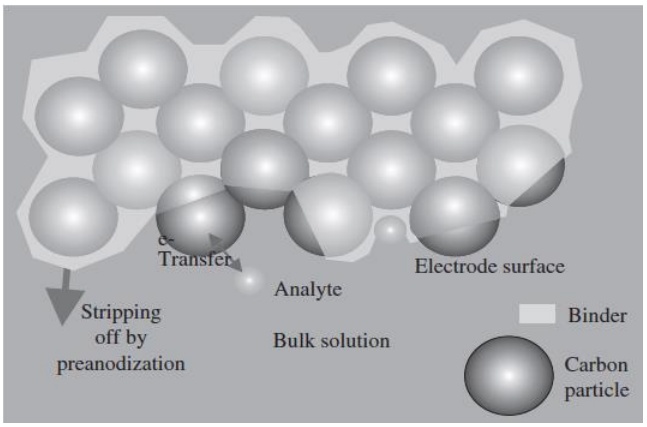
Daljnja istraživanja su imala za cilj da ispitaju mogućnost upotrebe CPE za praktičnu elektroanalizu, kao što je to moguće sa ostalim “čvrstim” elektrodama. Ove elektrode su korištene za brojna istraživanja u organskoj elektrokemiji. Nakon pada interesa za CPE one postaju odnedavno veoma atraktivne za elektroanalitičku kemiju, posebno zbog mogućnosti modifikacije ovih elektroda u mješavinu paste, što rezultira povećanjem selektivnosti i osjetljivosti. Pored toga upotrebom ovih elektroda mogu se promatrati mnoge enzimatski katalizirane reakcije što je dovelo do razvoja brojnih metoda za detekciju supstanci u biosustavima.

U novije vrijeme objavljena je veoma značajna studija u kojoj autor sumira osobine, pripremu i upotrebu kemijski modificiranih CPE kao elektrokemijskih senzora, gdje brojni primjeri demonstriraju širinu moguće primjene elektroda od ugljik paste u području elektrokemijske analize kao što je voltametrija, amperometrija i potenciometrija, ali također i kao elektrokemijskog detektora u protočnim sustavima.

Opisani su i načini konstrukcije i najvažniji načini primjene nemodificiranih i modificiranih elektroda u anorganskoj, biokemijskoj i farmaceutskoj analizi. Ubrzo zatim, objavljuje se studija o upotrebi CPE modificiranih enzimima, tkivima i ćelijama, u elektroanalitičke svrhe. Modifikacija se izvodi ili tako da se modificira površina elektrode ili se modificira cijela masa paste ("*bulk"* modifikacija).

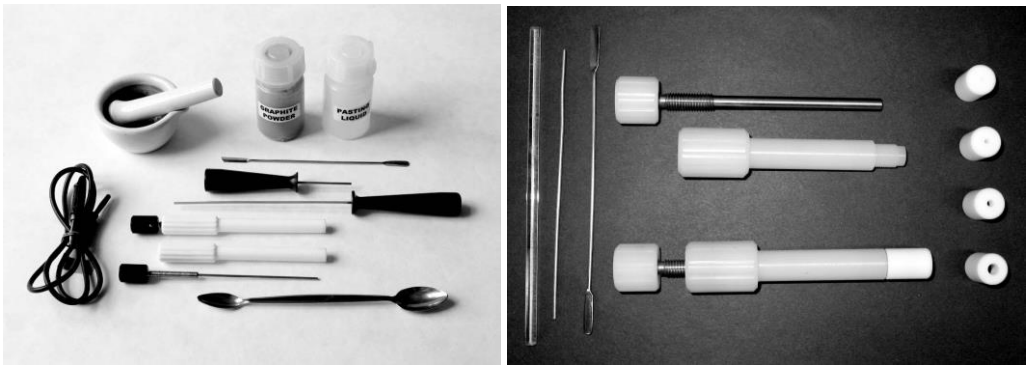
Najčešće korištene tekućine su parafinsko ulje, silikonsko ulje, bromonaftalen, trikrezilfosfat i drugi. Elektrodni materijali imaju odlučujući utjecaj na osobine amperometrijskih i voltametrijskih rezultata ispitivanja. Radna elektroda treba osigurati visoku signal/šum karakteristiku i reproduktivan odziv. Njen izbor ovisi o dva faktora: redoks osobina ispitivanog analita i osnovnoj struji (*background current*) u području potencijala potrebnog za mjerenje. Ostale osobine koje se uzimaju u obzir su: područje potencijala, električna provodljivost, reproduktivnost površine, mehaničke osobine, cijena, raspoloživost i toksičnost. Mnogi materijali su našli primjenu kao radne elektrode u elektrokemijskim mjerenjima, ali najpopularniji su živa, ugljik i plemeniti metali kao što su platina i zlato.

Elektrode na bazi ugljikovih materijala su veoma rasprostranjene u elektroanalizi najviše zbog veoma širokog područja potencijala, male osnovne struje, niske cijene, i pogodnosti za upotrebu u mnogobrojnim istraživanjima. Za razliku od metalnih elektroda, brzina prijelaza elektrona na površini ugljika je manja nego na površini metalnih elektroda. Brzina prijelaza elektrona je strogo ovisna o strukturi površine ugljika. Najviše upotrebljavani materijali za izradu elektroda su staklasti ugljik, ugljična pasta, ugljična vlakna, ugljični filmovi ili ugljikovi kompozitni materijali (npr. epoksi grafit, grafit impregriran smolama).



Slika 20- *Model obične ugljik elektrode*

Na slici 20 prikazana je elektroda izrađena od ugljikove paste. Čestice ugljika predstavljene u obliku kuglica osiguravaju električnu provodljivost pri konačno podešenoj konzistenciji paste odnosom ugljik/vezivo. Čestice ugljika su direktno izložene ispitivanoj otopini i one su centri na kojima se odvija elektrokemijska aktivnost pri amperometrijskim i voltametrijskim određivanjima. Pored slobodnih čestica ugljika koje su u direktnom kontaktu sa otopinom postoji i značajan broj pokrivenih slojem ulja. Ove su čestice nepristupačne za elektron prijelazne reakcije koje se pod odgovarajućim naponskim režimom događaju samo na dostupnim, uljem nepokrivenim česticama. Uobičajna ugljik komponenta je grafit ali se mogu upotrijebiti i ostali praškasti materijali na bazi ugljika kao npr. staklasti ugljik. Na slici je prikazan pribor i materijal za izradu elektoda od ugljika [22].



Slika 21- *Materijal i pribor za izradu elektroda od ugljika*

Čvrsta matrica

Umjesto u tekuće vezivo moguće je ugraditi elektroprovodljivi ugljikov prah i u čvrstu matricu. Prednosti ovakve matrice su poboljšana mehanička stabilnost i produžen rok upotrebe, odnosno čuvanja.

Nepolimerna matrica. Matrica je čvrste i nepolimerne strukture. U ovom je slučaju potrebno zagrijavati elektrodni materijal do točke taljenja i umiješati ”pastu” koja će hlađenjem očvrsnuti.

Polimerna matrica. Najviše upotrebljavana čvrsta veziva su polimeri. Oni mogu pri izradi elektrode biti u tekućem stanju ili u odgovarajućem organskom otapalu ili kao monomeri. U oba slučaja proces stvrdnjavanja je često praćen sa povećavanjem temperature, isparavanjem otapala ili sa polimerizacijom pomoću UV svjetlosti. Prema konačnom obliku dobijene elektrode razlikuju se film i masivne elektrode.

Elektrode debelog filma. To su senzori malih dimenzija površine oko 1 cm^2 ili manje i obično se proizvode tehnikom štampanja pomoću šablona, slično sito štampi (*Screen Printing),* pa se stoga nazivaju štampane elektrode (*Screen Printed Electrode, SPE*). Maska (*screen*) sa odgovarajućim otvorom za štampanje senzora definirane debljine (obično oko 20-100 μm) se postavi na inertnu podlogu (Al oksid ili polimerni materijal), a potom se mješavina veznog polimera sa suspendiranim karbon prahom nanosi kroz otvor na podlogu pomoću ravne ploče [23].

1.5.2.1 Nemodificirane ugljik pasta elektrode

Nemodificirane ugljik pasta elektrode se često upotrebljavaju u rutinskoj elektroanalitičkoj kemiji, najviše u striping analizi nakon depozicije analita u obliku metala (npr. srebro ili zlato). CPE su koristan amperometrijski detektor u protočno-injekcijskoj analizi (*flow injection analysis*), ali se kao takve najčešće upotrebljavaju u modificiranom obliku [24].

1.5.2.2 Modificirane ugljik pasta elektrode

Tijekom zadnja dva desetljeća intenzivno su ispitivane mogućnosti modifikacije elektrokemijskih senzora baziranih na ugljikovim pastama ili ugljikovih „tinti”. U novije

vrijeme je izdiferencirano pet načina modifikacije elektroda na bazi elektrokemijskog kreiranja funkcionalnih grupa na površini elektrode.

1. **Kovalentno vezivanje** modifikatora na funkcionalne grupe površine ugljik praha. Tipičan primjer je voltametrijsko određivanje tragova sadržaja srebra preko amino fukcionalnih liganada.
2. **Otapanje modifikatora** u vezivom sredstvu ugljikove paste je zbog svoje jednostavnosti često primjenjivana metoda modifikacije. Mogu se upotrebiti jako liofilni agensi za modifikaciju. Tipičan primjer za ovaj tip modifikacije je upotreba tekućne ion-izmjenjivačke smole.
3. **Direktno miješanje čvrstog modifikatora** u pastu elektrode može imati velike nedostatke zbog opadanja analitičkih performansi uslijed nehomogenosti kompozicije paste. Problem može biti minimiziran upotrebom vrlo sitnog praha modifikatora i intenzivnom homogenizacijom paste elektrode, što je vrlo često primjenjivana metoda zbog svoje jednostavnosti i brzine. Tipičan primjer je direktno miješanje katalizatora u pastu elektrode.
4. **Adsorpcija modifikatora** se često primjenjuje za "*in situ*" modifikaciju, kada se modifikator dodaje u otopinu analita gdje reagira sa ciljanom supstancom a nastali produkt i/ili modifikator se akumulira na elektrodnu površinu. Prekoncentracija na detektirajućem sloju se postiže sorpcijom modifikatora što povečava broj katalitičkih funkcionalnih grupa. Tipičan primjer za *"in situ*" modifikaciju CPE-da sa ion-uparenim reagensima, koji se može koristiti u striping voltametrijskoj određivanju iona teških metala, je molibden. Također se MnO_2 modifikator može iz otopine elektrolitički nanijeti na elektrodnu površinu oksidacijom Mn^{2+} iona.
5. **Modifikacija pomoću membrane** je jedna od mogućnosti za modificiranje površine senzora putem depozicije odgovarajućeg filma. Često se primjenjuje elektrodepozicija filma metala ili metalnih oksida. U području istraživanja biosenzora se često upotrebljavaju polimerni filmovi kao imobilizirajući slojevi za enzime i/ili kao protektivni slojevi za zaštitu elektrodne površine i otklanjanje ili smanjivanje interferencija [25].

1.5.2.3 Modificirane ugljik pasta elektrode u anorganskoj analizi

Modificirane ugljik pasta elektrode (m-CPE) su našle veoma široku primjenu u anorganskoj analizi pri određivanju anorganskih komponenti analita. Imobilizirani modifikator na površini elektrode se može eksploatirati ili preko akumulacije komponenata analita ili preko njegovog

katalitičkog aktiviteta. U najvećem broju slučajeva se zbog jednostavnosti pripreme elektrode modifikator dodaje direktno u mješavinu elektrodne paste. Miješanje se može obaviti uz lagano zagrijavanje paste ili uz dodatak male količine organskog otapala (kloroform, ugljikov tetraklorid) zbog lakšeg homogeniziranja vodonetopivog modifikatora u masi paste. Nakon isparavanja otapala na sobnoj temperaturi, pasta je spremna za upotrebu.

Tablica 2. sadrži najvažnije analitičke postupke koji koriste katalitičke efekte za određivanje anorganskih supstanci. Vodikov peroksid je veoma važan proizvod reakcija kataliziranih enzimima iz grupe oksidaza zbog njegove elektrokemijske reaktivnosti koja se može iskoristiti u analitičke svrhe. On se može katalitički oksidirati posredstvom nekih platinskih metala prethodno dispergiranih u ugljikovoj pasti. Ovakve se elektrode također mogu upotrebiti i za određivanje hidrazina. Redukcija H_2O_2 je također moguća i preko nekih kompleksa prijelaznih metala koji nekad mogu biti i u miješanim valentnim stanjima, kao što je $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$, $Co^{II,III}$ oksidi. Vrlo dobri modifikatori za određivanje H_2O_2 su također, peroksidase bilo u izoliranoj formi ili u sastavu biljnog materijala, kao što je HRP.

Ugljik paste elektroaktivne elektrode (CPE) sadrže krute tvari najčešće anorganske . Čvrste elektroaktivne supstance, koje se žele ispitivati voltametrijski, se dodaju direktno u elektrodni materijal isto kako se dodaju ostali čvrsti modifikatori. Voltametrijski odziv odgovara elektrokemijskim transformacijama ispitivane supstance. Na ovaj se način mogu ispitivati različite osobine supstance kao što su elektrokemijske redoks osobine, identifikacija faza, stehiometrija, oksidacijska stanja elemenata, morfološke karakteristike, kao i adsorpcijski i katalitički efekti. Također se i mnogi analitički podaci mogu dobiti ugradnjom odgovarajućeg analita u materijal elektrode od ugljikove paste. Ovo je jedinstvena osobina ugljikovih pasta elektroda.

Zavisno od upotrebljenog vezivnog sredstva za pravljenje elektrodne paste ("*pasting liquid*"), može se napraviti podjela na osnovu njihove električne provodljivosti na elektroneprovodna veziva i elektrolitička veziva.

Elektrode napravljene sa prvim vezivom mogu se upotrebljavati za ispitivanje elektrokemijskog ponašanja organskih supstanci koje se mogu suspendirati ili otopiti u tom vezivu. Čestice ispitivane supstance koje se nalaze ispod elektrodne površine nisu uključene u elektrokemijske reakcije za razliku od onih koje su na samoj površini elektrode u kontaktu s otopinom.

Tipična elektrolitska veziva su jake mineralne kiseline. U tom slučaju "pastozno" vezivo igra ulogu posrednog elektrolita u masi elektrode. Registrirana struja je sada mnogo veća nego kod primjene uobičajenih CPE.

Voltametrija čvrstog stanja predstavlja danas jedno vrlo zanimljivo područje i može se očekivati veliki broj novih studija koje će posebno uključivati upotrebu superprovodnih materijala [26].

Tablica 2. Određivanje anorganskih supstanci upotrebom CPE-da modificiranih sa katalizatorom [26]

Analit	**Modifikator** ***[a]***	**Proces** ***[b]***	**Otopina**	**Metoda** ***[c]***	**Potenc.** ***[V]***	**Referent. elektroda**	**Granicu određ.** ***[c]***
$[B_2(O_2)_2(OH)_4]^{2-}$	Berlinsko modrilo	Red.	HCl 0,05M+ KCl ,025 M	DCV	E_m-0,4	SCE	1mg O_2^{2-}/L
H_2O_2	Ru	Oksid.	Fosfat. pufer 0,05M (pH7,4)	CV	E_{pa}+0,8	Ag/AgCl	
H_2O_2	Pt	Oksid.	Fosfat. pufer 0,05M (pH7,4)	CV, FIA	E_{pa}+0,62 E_{op}+0,7	Ag/AgCl	$5x10^{-6}$ M (A, +0,8V)
H_2O_2	Pd	Oksid.	Fosfat. pufer 0,05M (pH7,4)	CV	E_{pa}+0,9	Ag/AgCl	
H_2O_2	Berlinsko modrilo	Red.	HCl 0,05M + KCl 0,025M	DCV	E_m-0,4	SCE	1 mg/L
H_2O_2	$Co^{II,III}$ oksid	Oksid. Red.	NaOH 0,1 M	FIA	E_{op}+0,4 E_{op}-0,3	Ag/AgCl	
H_2O_2	Mahovina/ $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$	Red.	Fosfat. pufer 0,05M (p H6)	CV	E_{pc}-0,28	Ag/AgCl	
H_2O_2	HRP	Akum. (oc.), red.	Fosfat. pufer 0,05M (pH 7,4)	CA	E_{op}-0,2	Ag/AgCl	$6x10^{-7}$ M
H_2O_2	Kor. konjske rotkvice (HRP)	Reaktor, Red.	Fosfat. pufer 0,05M (pH 7,4)	FIA	E_{op}-0,2	Ag/AgCl	$4x10^{-5}$ M
H_2O_2	Ananas	Red.	Fosfat. pufer 0,05M+*o*-fenilendiamin (pH 7,4)	FIA	E_{op}-0,2	Ag/AgCl	
H_2O_2	Koraba/ferocen	Red.	PH 5,0-7,4	A	E_{op}-0,2	Ag/AgCl	$8,4x10^{-6}$ M
Mn^{2+}	HRP/1,2-naftokinon dializ. membr.	Stimul. Red. O_2	Na-fosfat 0,1 M (pH 7,0)	A	E_{op}-0,1	Ag/AgCl	
N_2H_4	Pd	Oksid.	Fosfat. pufer 0,05M (pH 7,4)	CV	E_{pa}+0,16	Ag/AgCl	
N_2H_4	Pt	Oksid.	Fosfat. pufer 0,05M (pH 7,4)	FIA, A	E_{op}+0,4 E_{op}+0,3	Ag/AgCl	$2x10^{-6}$ M
NO_2^-	$[Ru(bpy)_2(PVP)_{10}Cl]Cl$	Oksid.	$NaNO_3$ 0,1 M	FIA	E_{op}+0,8	Ag/AgCl	$3x10^{-8}$ M
SO_3^{2-}	Fe (II)/5-amino-1,10-fenantrolin+glioksal	Oksid.	H_2SO_4 0,1 M	CV, FIA	E_{pa}+0,54 E_{op}+0,95	Ag/AgCl	$3x10^{-6}$ M
SO_2, SO_3^{2-}	Sulfidna oksidaza/ $[Fe(CN)_6]^{3-}$ (imobil. Ili u nosećem fluidu)	Oksid.	KCl 0,05 M +Fosf.puf. 0,01M (pH 7.5)	FIA	E_{op}+0,6	Ag/AgCl	10^{-7} M
$S_2O_8^{2-}$	Rutenij purpur	Red.	HCl 0,01 M	DCV	E_m-0,35	SCE	1mgO_2^{2-} /L
$S_2O_8^{2-}$	Rutenij purpur /Amberlit LA2	Akum. (oc.), red.	HCl 0,01 M	DCV	E_m-0,4	SCE	50 μg O_2^{2-} L^{-1}

1.6 Elektrokemijske metode

Elektrokemija je dio znanosti posvećen razumijevanju posebnih vrsta fizikalnih i kemijskih pojava te procesa pretvorbe tvari vezanih za postojanje i djelovanje osnovne čestice elektriciteta „slobodnih" (pokretnih) elektrona koji u koordiniranom gibanju predstavljaju električnu struju. Prema jednoj od vodećih ličnosti u elektrokemiji druge polovine 20. st. J. O'M. Bockrisu, elektrokemija je područje znanosti koja opisuje stvaranje tvari pomoću elektriciteta i stvaranje elektriciteta trošenjem tvari [27].

On je s tog stajališta, kao i s energetskog stajališta, obzirom da tom prilikom elektrokemijske reakcije mijenjaju energetsko stanje sustava, sve elektrokemijske sustave podijelio u tri grupe: ćelije koje se pokreću izvana – proizvođače tvari, gorive ćelije – proizvođače električne struje i elektrokemijske neuređaje – elektrode koje se spontano troše rasipajući energiju. U prvoj grupi procesi zahtijevaju unošenje energije izvana; u drugoj grupi električna energija se dobiva na račun energije kemijskog procesa, dok treća grupa obuhvaća spontanu razgradnju tvari uz gubitak energije u čijem mehanizmu postoji i izmjena elektrona, a odnose se na procese elektrokemijske korozije. Posebnu ulogu elektrokemija ima u kemijskoj analizi. Elektroanalitička kemija danas dominira u ovom području zbog toga što se njene metode mogu automatizirati, i izgraditi elektronski instrument pomoću kojih se lako dobivaju kompjuterski zapisi rezultata. Ovo je danas široko zastupljeno naročito u kliničkoj medicinskoj praksi, i u ekološkim istraživanjima onečišćenosti zraka, vode i tla pomoću elektrokemijskih senzora.

Elektroanalitička mjerenja provodimo u elektrokemijskoj ćeliji. Tu ćeliju čini posudica s otopinom u koju su uronjene elektrode. Elektrode su elementi ćelije na kojima nastaje analogna električna veličina, odnosno one služe za dovođenje električne veličine iz vanjskog izvora.

Na elektrodama se odvijaju elektrokemijske reakcije. Te se kemijske reakcije odvijaju uz prijenos nosioca električnih naboja (elektroni, ioni) kroz dodirnu površinu elektroda-otopina.

Elektroanalitičke metode čine skupinu analitičkih postupaka kod kojih informaciju odnosno podatak o koncentraciji, aktivitetu ili nekom drugom, npr. termodinamičkom, podatku određivane molekulske vrste dobivamo posredstvom međusobno razmjernih odnosno analognih električnih veličina, tj. s pomoću električnog napona, električne struje ili električnog naboja [27].

Elektroanalitičke metode dijelimo u dvije osnovne kategorije:

1) metode kod kojih, kroz elektrokemijsku ćeliju, ne teče električna struja, te

2) metode kod kojih, kroz elektrokemijsku ćeliju, teče električna struja kao posljedica djelovanja vanjskog izvora električne struje.

Kod metoda kod kojih nema protoka električne struje električni napon, što nastaje između elektroda, uspostavlja se spontano, odvijanjem elektrokemijskih reakcija na elektrodama. Budući da između elektroda, odnosno vanjskim električnim krugom, ne teče električna struja, elektrokemijske reakcije na elektrodama mogu postići stanje dinamičke ravnoteže. Tako se na elektrodama uspostavlja određeni, ravnotežni, elektrodni potencijal. Razlika potencijala, odnosno napona, između elektroda pokazuje samo nakanu tijeka reakcije koja bi se odvijala u elektrokemijskoj ćeliji kada bi vanjskim električnim krugom omogućili tok (zatvorili strujni krug) električne struje s jedne elektrode na drugu. Ova metoda se naziva potenciometrija. Zbog tendencije odvijanja reakcije na elektrodama, u graničnom sloju otopine uz elektrode, mijenja se koncentracija tzv. elektroaktivnih čestica koje sudjeluju u elektrodnim reakcijama.

Druga, mnogobrojnija skupina elektroanalitičkih metoda, je ona kod kojih kroz elektrokemijski članak teče električna struja kao posljedica djelovanja vanjskog izvora struje. Elektrokemijsku ćeliju u kojoj se odvijaju ovi procesi nazivamo elektrolitička ćelija, a sam proces elektrolizom. Tok električne struje kroz elektrolitičku ćeliju, a time i kroz vanjski električni krug koji povezuje elektrode, uzrokuju elektrokemijske reakcije na elektrodama, tj. odvijanje reakcija redukcije i oksidacije. Mjerena fizikalna veličina jest odziv sustava u ćeliji na vanjski signal pobude. Dakle, ako je signal pobude električni napon, kroz radnu će elektrodu teći električna struja, čija jakost ovisi o obliku naponskog signala pobude, vrsti primjenjene elektrode i koncentraciji elektroaktivnih čestica. Prema tome, rezultirajuća fizikalna veličina, tj. signal odziva je električna struja. Možemo je mjeriti kao funkciju narinutog napona te tada govorimo o voltametrijskim metodama.

Kod većine elektroanalitičkih metoda mjereni podatak o svojstvima elektrolitne otopine dobivamo pomoću jedne od elektroda elektrolitičke ćelije. Tu elektrodu nazivamo radnom kada kroz ćeliju teče električna struja, a indikatorskom pri potenciometrijskim mjerenjima. Stoga, temelj elektroanalitičkih mjerenja jest elektrokemijska reakcija na radnoj ili indikatorskoj elektrodi [27].

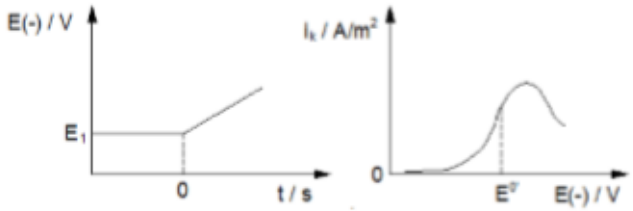
1.6.1 Voltametrija

Voltamerija s linearnom promjenom potencijala i ciklička voltametrija pripadaju u skupinu eletroanalitičkih posupaka u kojima je signal pobude električni napon. Signal odziva je struja ćelije, koja se mjeri kao funkcija narinutog napona. Oblik i vremenska ovisnost amplitude signala pobude može biti različit [20].

1.6.1.1 Voltametrija s linearnim signalom pobude

Grafički prikaz signala odziva kod voltametrije nazivamo voltamogramom. Elektrokemijska ćelija koja se koristi pri ovoj metodi se sastoji od posude koja sadrži smjesu otopine analita i nereaktivnog elektrolita u koju su uronjene tri elektrode. Prva od elektroda je radna i njen potencijal se mijenja linearno s vremenom, a njena površina je mala kako bi se poboljšala njena polarizacija. Druga elektroda je referentna, najčešće zasićena kalomel elektroda čiji je potencijal konstantan (E = +0.241 V). Treća elektroda je protuelektroda koja je uglavnom oblika namotane platinske žice i ona služi za provođenje struje od izvora signala, kroz otopinu, do radne elektrode [20].

Radne elektrode se javljaju u različitim oblicima. Najčešće su oblika ravnog diska koji je utisnut u štap inertnog materijala poput teflona. Ove elektrode se mogu koristiti pri širokom rasponu potencijala, a to ovisi ne samo o elektrodi već i otopini u koju je elektroda uronjena. Kod visokih vrijednosti pozitivnog potencijala dolazi do pojave velikih struja kao posljedica oksidacije vode, pri kojoj nastaje elementarni kisik. S druge strane, pri jako negativnim potencijalima zbog redukcije vode dolazi do pojave visokih katodnih struja uzrokovano razvijanjem elementarnog vodika [21].

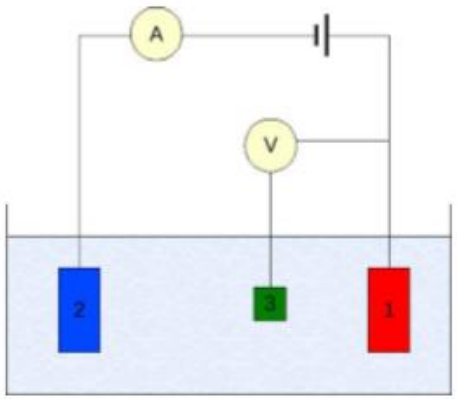


Slika 22- *Signal pobude i signal odziva voltametrije*

1.6.1.2 Ciklička voltametrija

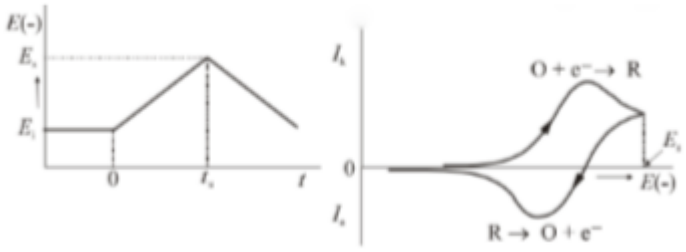
Kod cikličke voltametrije signal pobude (narinuti potencijal) određeno vrijeme linearno raste, te nakon što dosegne krajnju vrijednost promijeni se smjer potencijala. U oba smjera promjena potencijala je linearna. U ovim ciklusima moguće je elektrokemijski oksidirati ili reducirati produkte zbog čega je ciklička voltametrija naročito pogodna za istraživanja mehanizama elektrokemijskih reakcija.

Grafički prikaz odziva cikličke voltametrije nazivamo cikličkim voltamogramom.



Slika 23- *Troelektrodna elektrolitička ćelija*

(2 - protu elektroda, 3 – referentna elektroda, 1– radna elektroda).



Slika 24- *Signal pobude i signal odziva za cikličku voltametriju*

Visina strujnog odziva ovisi o koncentraciji elektroreduktanda (O) u otopini (c_o), o broju izmijenjenih elektrona po čestici (z), o površini radne elektrode (A) i o čimbenicima što određuju brzinu difuzije odnosno koncentracijski gradijent [21].

Na Slici 24 pokazan je oblik signala pobude cikličke voltametrije, zajedno s rezultirajućom strujom odziva za elektrodni proces redukcije. Signal pobude najprije, kroz određeno vrijeme, linearno raste. Pošto signal pobude dosegne izabranu vrijednost (E_s), promijeni se smjer posmika potencijala. U povratnom posmiku, potencijal elektrode (E) u bilo kojem trenutku (t), nakon vremena promjene smjera posmika (t_s), ima vrijednost:

$$E = E_i - 2\,v\,t_s + v\,t \qquad (17)$$

gdje je t vrijeme proteklo od početka posmika potencijala, t_s vrijeme promjene smjera posmika i E_i početni potencijal.

1.6.2 Amperometrija

Amperometrija je elektrokemijska tehnika pri kojoj se mjeri struja koja prolazi kroz elektrolitsku ćeliju pri konstantnom potencijalu. Može se između ostalog koristiti za određivanje koncentracije određenih vrsta u otopini. Amperometrija u kemiji je detekcija iona u otopini koja se temelji na električnoj struji ili promjenama električne struje [21].

1.6.2.1 Amperometrijski biosenzori

Temelje se na imobilizaciji biološki osjetljivog sloja npr. enzima, antitijela, DNA, na površinu radne elektrode. Mehanizmom prepoznavanja aktivna tvar stupa u interakciju s ciljanim analitom i omogućuje nastajanje elektrokemijskog analitičkog odzivnoga signala. Srodne elektrode imaju na površini suspenziju bakterija ili biološkog biljnog ili životinjskog tkiva. U mnogim slučajevima enzim odnosno suspenzija drže se uz površinu elektrode s pomoću permeabilne polimerne membrane, npr. membrane za dijalizu. Imobilizacija aktivne tvari na površinu elektrode može se učiniti uklapanjem u gel, adsorpcijom, kovalentnim (unakrsnim) vezanjem i stvaranjem ovojnice (kapsule). Mnogi biosenzori jesu amperometrijski senzori zasnovani na selektivnim biokemijskim reakcijama kojima se ostvaruje visoka selektivnost

senzora. Priroda je razvila spektar biomolekula i biostruktura koje karakterizira molekularni specifično prepoznavanje koje stoji iza mnogih životnih procesa.

Svaka biološka vrsta ima tri cilja da bi preživjela: metabolizirati, reproducirati se i procesuirati informacije. Ovo posljednje znači prikupiti informaciju i prenijeti molekulske mase, tzv. prostetičke skupine.

Imunosustavi prepoznavaju tkiva kao kompatibilna i nekompatibilna. Raspoznavanje mirisa i okusa i ostali osjeti ovise o selektivnoj interakciji molekula s kemoreceptorima uz neuralno kodiranje informacije. Mjeri se elektrokemijski odziv produkta enzimski katalizirane biokemijske reakcije ili molekulske vrste koja se troši pri enzimskoj reakciji ili struja neizravne oksidacije supstrata (analita) na elektrodi posredovanjem medijatora. Enzimi su proteini, točnije globulaste bjelančevine relativne molekulske mase od 12000 do više stotina tisuća (12-500 kDa). Relativne molekulske mase biokemičari često izražavaju u daltonima (Da, kDa i dr.). Pri tom je Da jedinica relativne atomske mase. To je uvriježeno u biokemiji, ali ne pripada u jedinice SI-sustava. Jednom tipu enzima katalitičko djelovanje ovisi samo o strukturi bjelančevina od kojih su izgrađeni. To su tzv. čisti enzimi.

No postoje i složeni enzimi, koji osim molekula bjelančevina sadrže i niskomolekularne neproteinske sastojke, tzv. koenzime. Jednim se složenim enzimima može neproteinski sastojak (koenzim ili prostetska skupina) lako odvojiti od proteinske komponente (apoenzim) (npr. dijalizom), no tada tako razdvojeni dijelovi više nemaju katalitičko djelovanje. Ponovnim spajanjem apoenzima s koenzimom dobije se ponovno aktivni cjeloviti složeni enzim (holoenzim). Drugi složeni enzimi jesu konjugirane (složene) bjelančevine (proteini) koji razgradnjom daju sastojke koji potječu od velikog proteinskog dijela i sastojke male relativne molekulske mase [21].

2 EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Priprava otopina

Za pripravu otopina korištene su sljedeće kemikalije:

Tablica 3. Kemikalije za pripravu otopina

kemikalija	molekulska formula	dobavljač
kalijev nitrat	KNO_3	p.a. "Kemika", Zagreb
fosforna kiselina	H_3PO_4	p.a. "Kemika", Zagreb
natrijev acetat	CH_3COONa	p.a. "Kemika", Zagreb
octena kiselina	CH_3COOH	p.a. "Kemika", Zagreb
natrijev hidrogen fosfat	Na_2HPO_4	p.a. "Kemika", Zagreb
amonijev klorid	NH_4Cl	p.a. "Kemika", Zagreb
boraks	$Na_2B_4O_7$ x $10H_2O$	p.a. "Kemika", Zagreb
amonijak	NH_3	p.a. "Kemika", Zagreb
vodikov peroksid	H_2O_2	p.a. "Kemika", Zagreb
cistein	$C_3H_7NO_2S$	p.a. Merck, SAD

2.1.1. Priprava osnovnog elektrolita

Osnovna elektrolitna otopina se sastojala od 0,09 dm^3 KNO_3, koncentracije 0,1 mol dm^{-3} i 0,1 dm^3 odgovarajućeg pufera.

2.1.2. Priprava otopine kalijevog nitrata, KNO_3

U destiliranoj vodi je otopljeno 101,075 g kalijevog nitrata te zatim razrjeđeno na konačni volumen od 2 dm^3. Koncentracija ove otopine je bila 0,5 mol dm^{-3}. Zatim je od ove otopine pripravljena 0,1 mol dm^{-3} otopina kalijevog nitrata, korištenjem 0,018 dm^3 otopine KNO_3 koncetracije 0,5 mol dm^{-3} koja je razrijeđena do konačnog volumena od 0,09 dm^3.

2.1.3. Priprava otopine CH_3COONa

U destiliranoj vodi je otopljeno 2,05 g CH_3COONa te zatim razrjeđeno na konačni volumen od 0,25 dm^3. Koncentracija ove otopine je 0,1 mol dm^{-3}.

2.1.4. Priprava otopine octene kiseline, CH_3COOH

U destiliranoj vodi je otopljeno 1,5 g CH_3COOH te zatim razrjeđeno na konačni volumen od 0,25 dm^3. Koncentracija ove otopine je 0,1 mol dm^{-3}.

2.1.5. Priprava otopine acetatnog pufera pH 4

Dodavanjem 0,1 mol dm^{-3} otopine CH_3COOH u otopinu CH_3COONa, koncentracije 0,1 mol dm^{-3}, prilagođava se pH do željene vrijednosti (pH = 4). Ovo dodavanje se vrši uz stalno praćenje pH vrijednosti pH - metrom.

2.1.6. Priprava otopine natrijevog hidrogenfosfata, Na_2HPO_4

Za pripravu 0,1 mol dm-^{3} otopine Na_2HPO_4 odvagano je 3,548 g Na_2HPO_4 te otopljeno u 100 cm^3 destilirane vode.

2.1.7. Priprava otopine amonijevog klorida, NH_4Cl

U destiliranoj vodi je otopljeno 1,56 g amonijevog klorida te zatim razrjeđeno na konačni volumen od 0,25 dm^3. Koncentracija ove otopine je 0,1 mol dm^{-3}.

2.1.8. Priprava otopine fosfatnog pufera; pH 7

Dodavanjem koncentrirane otopine H_3PO_4 u otopinu Na_2HPO_4 (c = 0,1 $moldm^{-3}$) prilagođava se pH do željene vrijednosti (pH = 7). Ovo dodavanje se vrši uz stalno praćenje pH vrijednosti pH-metrom.

2.1.9. Priprava otopine amonijačnog pufera, pH 9

Dodavanjem koncentrirane otopine NH_3 u otopinu NH_4Cl koncentracije 0,1 $moldm^{-3}$, prilagođava se pH do željene vrijednosti (pH = 9). Ovo dodavanje se vrši uz stalno praćenje pH vrijednosti pH - metrom.

2.1.10. Priprava otopine boratnog pufera, pH=9

Boratni pufer je pripravljen otapanjem 9,5 g boraksa $Na_2B_4O_7$ x H_2O u 0,25 dm^{-3} destiliranoj vodi. Pripravljeni pufer je jakosti 0,1 mol dm^{-3} s pH 9

2.1.11. Priprava otopine vodikovog peroksida

Otopina vodikovog peroksida, koncentracije 0,1 mol dm^{-3}, pripravljena je otapanjem 0,373 g tj. 335 µL vodikovog peroksida (H_2O_2), u deioniziranoj vodi razrjeđenjem na konačni volumen od 30 cm^3. Za pripravu 0,01 $moldm^{-3}$ uzeto je 3 cm^3 prethodno napravljene (0,1 mol dm^{-3}) otopine

vodikovog peroksida te razrijeđeno na volumen od 30 cm^3, a zatim je 3 cm^3 te otopine iskorišteno za pripravu 0,001 mol dm^{-3}. Ovako priređene otopine korištene su u elektrokemijskim mjerenjima i to na način da se od svake dodavao određeni volumen u ćeliju s 100 cm^3 osnovnog elektrolita.

Prilikom svakog novog mjerenja pripremljena je uvijek nova otopina H_2O_2.

Tablica 4. Koncentracije vodikovog peroksida korištene pri mjerenju konačne koncentracije

c **(H_2O_2) za pripravu mol dm^{-3}**	***V*** **(H_2O_2)$_{30\%}$ µL**	***c*** **(H_2O_2) dodana u ćeliju mol dm^{-3}**
0,001	50	5 x 10-^{7}
0,01	50	5 x 10^{-6}
0,1	50	5 x 10^{-5}
0,1	500	5 x 10^{-4}
0,1	5000	5 x 10^{-3}

2.1. Aparatura i elektrodni materijal

2.2.1. Aparatura

Korištena je elektrokemijska ćelija sa srebro/srebrov klorid (zasićena KCl) kao referentnom elektrodom, platinskom pločicom kao protuelektrodom te elektrodom od ugljikove paste kao radnom elektrodom. Sva elektrokemijska mjerenja su izvršena s potenciostatom (Autolab PGSTAT 302N) spojenim na osobno računalo (PC), a kojim se upravlja pomoću GPES 4,9 Softwarea (Eco Chemie).

2.2.2.Priprava radnih elektroda

Tijekom mjerenja je korištena nemodificirana elektroda od ugljikove paste (nCPE) i elektroda modificirana sa 5% AgCuS i Ag_2S. Za pripravu nemodificirane elektrode, odnosno za nCPE je korišten 1 g grafita i 400 µL parafinskog ulja, dok je za pripravu modificirane elektrode AgCuS korišteno 0,95 g grafita i 0,05 g AgCuS uz 400 µL parafinskog ulja te 0,95 g grafita i 0,05 g Ag_2S. Kao držač za radnu elektrodu je poslužila medicinska šprica od 1 cm^3 kojoj smo izrezali

dno. Radna elektroda je pripravljena odvagom 1 g ugljika i određene količine parafinskog ulja (u tom se slučaju radi o nemodificiranoj elektrodi od ugljikove paste (CPE). Kada se u takvu smjesu dodaje određena količina elektroaktivnih materijala (ternarnih sulfida) u tom se slučaju radi o modificiranim elektrodama od ugljikove paste -mCPE.

Pasta je pripravljena miješanjem ugljika i elektroaktivnog materijala u tarioniku. Nakon što se smjesa homogenizirala u nju je dodavano parafinsko ulje do postizanja zadovoljavajuće konzistencije. Dobivena smjesa ne smije biti ni previše tvrda, ni tekuća, ni ljepljiva, odnosno s tučka se treba lagano skidati, bez kidanja.

Tako pripravljenom pastom se napuni šprica te se u nju zabode bakrena žica koja će poslužiti kao vodič struje. Priprava nove površine elektrode od ugljikove paste se vrši laganim struganjem preko masnog papira ili filter papira. Promjer šprice iznosi 0,2 cm^3, a time i površina radne elektrode. Prije svakog mjerenja se iznova skidao površinski sloj radi reproducibilnosti.

3 REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Elektrokemijsko ponašanje nCPE

3.1.1. Utjecaj pomaka anodne i katodne granice na nCPE

Za elektrokemijska istraživanja koja su bila usmjerena na određivanje ponašanja nemodificirane radne elektrode od ugljikove paste korištena je ciklička voltametrija. Snimani su ciklički voltamogrami (CV) od otvorenog strujnog kruga prema anodnim i katodnim potencijalima. Na Slici 25 prikazani su ciklički voltamogrami koji su snimljeni pri različitim katodnim i anodnim granicama. Pri potencijalima većima od +0,8 V dolazi do anodnog izlučivanja kisika, što je vidljivo i na slici 25a prema jednadžbi (19).

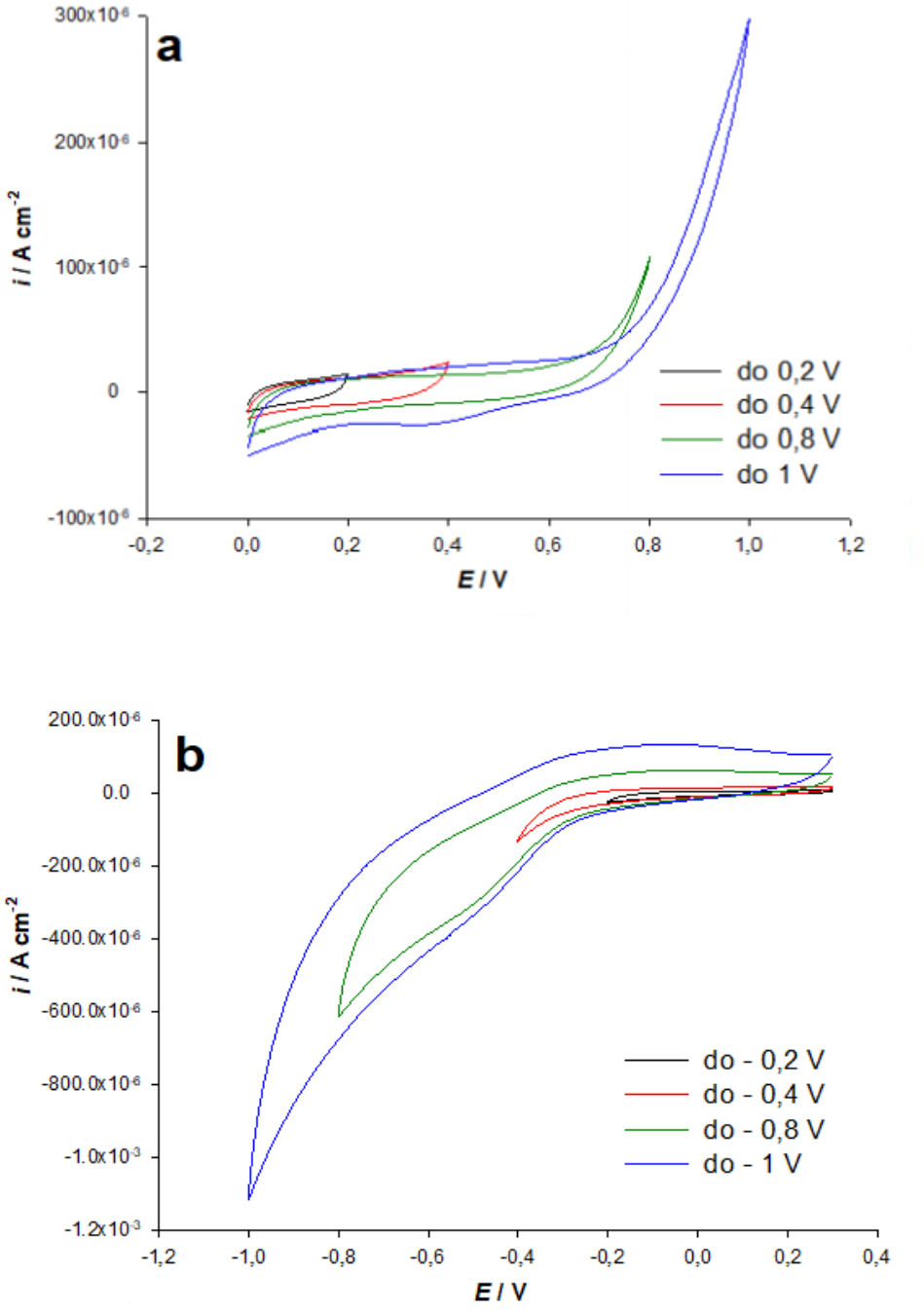
$$2H_2O \rightarrow O_2 + 4e^- + 4H^+ \qquad (18)$$

Pri potencijalima od -0,4 V dolazi do katodnog izlučivanja vodika, prema jednadžbi (19).

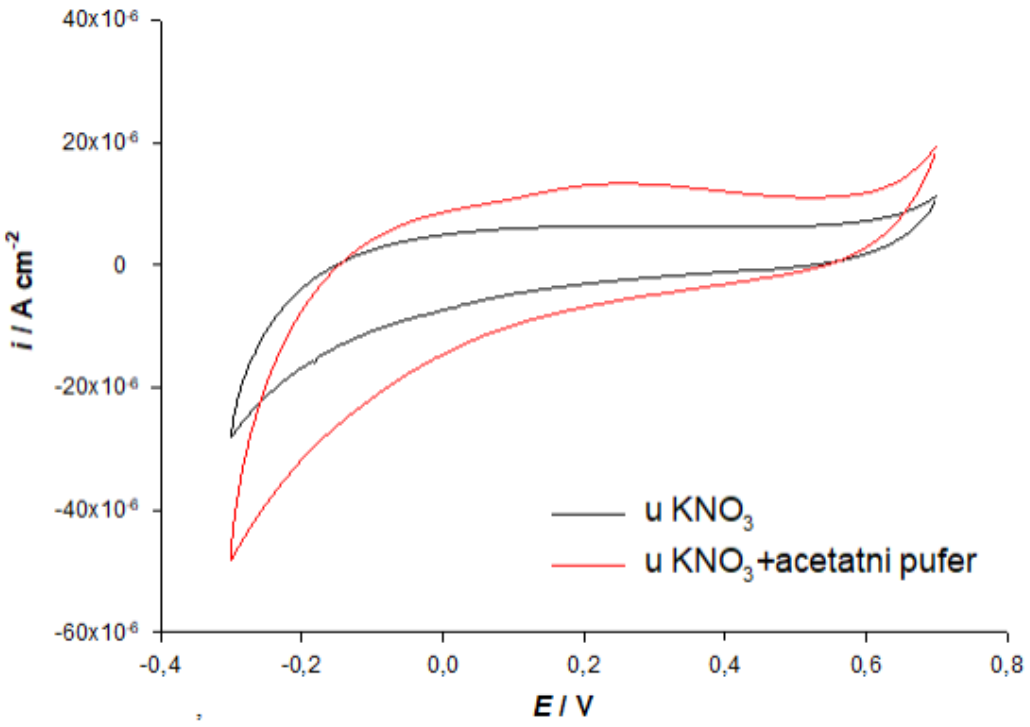
Prikazano na slici 25b.

$$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2 \qquad (19)$$

Za ispitivanje elektrokemijskog ponašanja cisteina na elektrodama od ugljikove paste je uzeto područje u rasponu od -0,3 V do +0,7 V. Sva mjerenja koja su izvršena u ovome radu su rađena u ovim granicama potencijala.

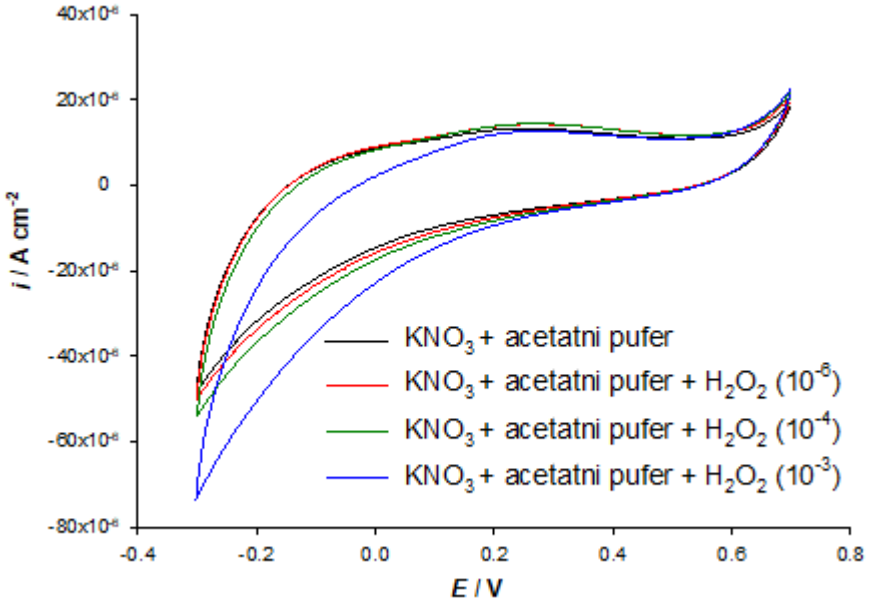


Slika 25- *Utjecaj pomaka anodne (a) i katodne (b) granice na cikličkle voltamograme nCPE u osnovnom elektrolitu, 0,1 mol dm^{-3} KNO_3*



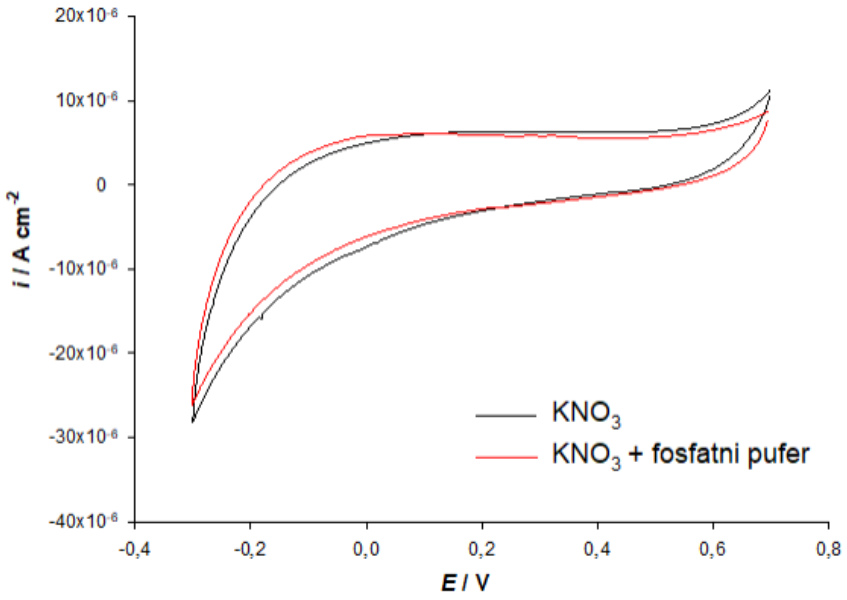
Slika 26- *Utjecaj dodatka acetatnog pufera (pH 4) na CV nCPE*

Slika 26 prikazuje utjecaj acetatnog pufera na ciklički voltamogram nemodificirane elektrode od ugljikove paste u odabranom području potencijala, u određenim granicama. CV otkriva povećanje osnovne struje u odnosu na CV koji je snimljen bez dodatka pufera u čistom kalijevom nitratu, što odgovara promijeni ionske jakosti. Olakšana je katodna reakcija izlučivanja vodika što odgovara i sniženoj pH vrijednosti otopine.



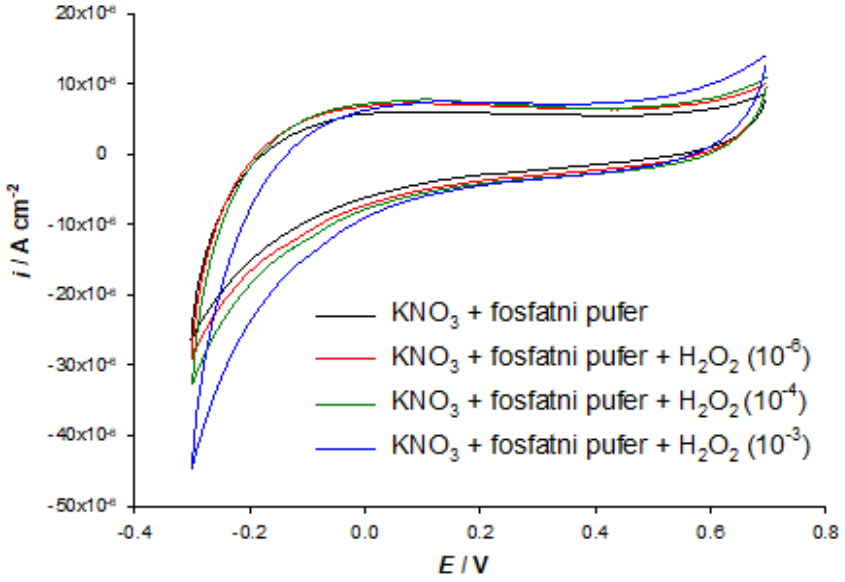
Slika 27- *Utjecaj dodatka vodikovog peroksida na CV nCPE pri pH 4*

Iz CV prikazanog na Slici 27 može se uočiti da su katodene struje izraženije pri koncentraciji peroksida 10^{-3} mol dm^{-3}, pretpostavlja se kao posljedica katodne redukcije peroksida. Neke značajnije promjene dodatkom vodikovog peroksida nisu uočene.



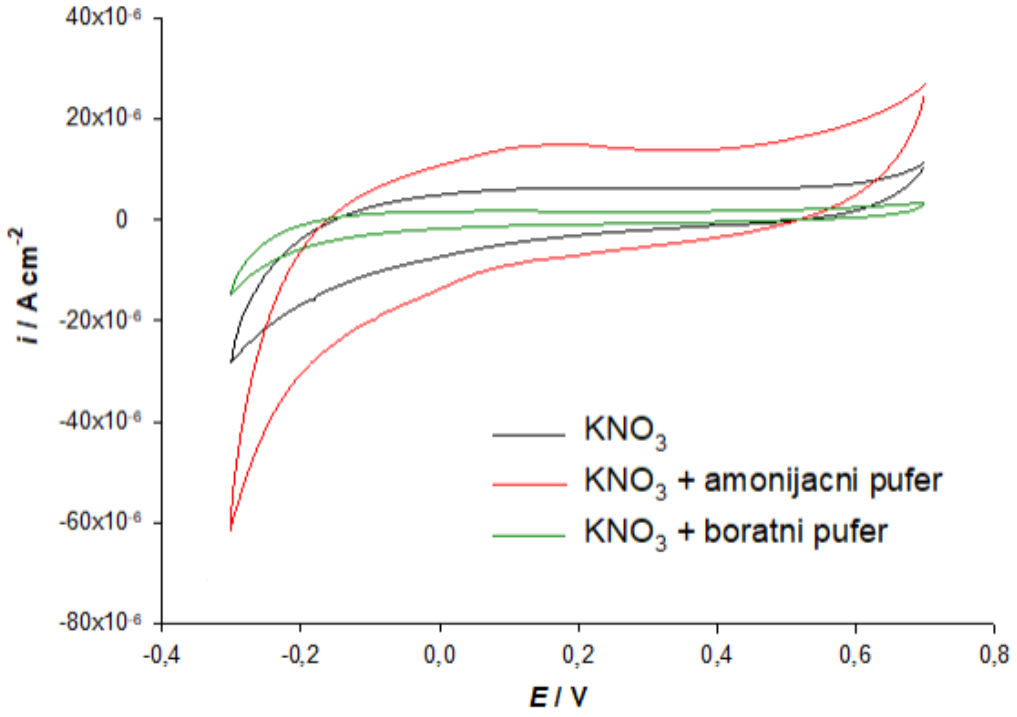
***Slika 28**- Utjecaj dodatka fosfatnog pufera (pH 7) na CV nCPE*

Slika 28 prikazuje utjecaj fosfatnog pufera na ciklički voltamogram nemodificirane elektrode od ugljikove paste u odabranom području potencijala, u prethodno određenim granicama. Može se zaključiti da dodatak fosfatnog pufera nema značajniji utjecaj.



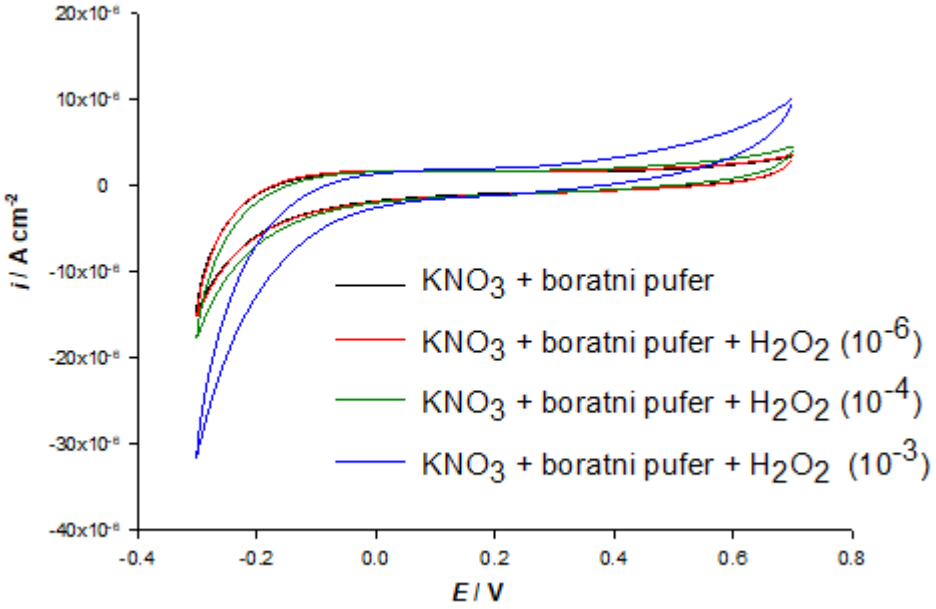
***Slika 29**- Utjecaj dodatka vodikovog peroksida na CV nCPE pri pH 7*

Snimljeni CV prikazani su na Slici 29. Iz CV uočene su veće katodne struje pri koncentraciji vodikovog peroksida 10^{-3} mol dm^{-3}, vjerojatno zbog katodne redukcije peroksida. Također, značajnije promjene dodatkom vodikovog peroksida nisu uočene.



Slika 30- *Utjecaj dodatka amonijačnog (pH 9) i boratnog (pH 9) pufera na CV nCPE*

Iz Slike 30 može se uočiti da su veće osnovne struje dobivene za amonijačni pufer pa se za sva mjerenja pri ovom pH koristio boratni pufer.



Slika 31*- Utjecaj dodatka vodikovog peroksida na CV nCPE pri pH 9*

Iz Slike 31 može se vidjeti da su veće katodne struje pri koncentraciji vodikovog peroksida 10^{-3} mol dm^{-3}, vjerojatno zbog katodne redukcije peroksida. U odnosu na CV pri istim koncentracijama vodikovog peroksida pri pH vrijednostima 5 i 7, katodne struje imaju manje vrijednosti, tako da značajnije promjene nisu uočene.

3.2 Elektrokemijsko ponašanje vodikovog peroksida na modificiranim elektrodama

Elektrokemijsko ponašanje vodikovog peroksida na modificiranim elektrodama ispitivano je pri tri pH vrijednosti. Na slici 33 prikazano je ponašanje vodikovog peroksida na elektrodi modificiranoj s AgCuS s 5% masenog udjela AgCuS u granicama potencijala od -0,3 do +0,7. V. Iz cikličkog voltamograma dobivenog u čistom kalijevom nitratu vidljiva su dva strujna pika. Oksidacijski pik na +0,3 V može se pripisati oksidaciji elektroaktivnog materijala prema reakciji :

$$2AgCuS + 4H_2O \leftrightarrow Ag_2S + CuSO_4 + Cu^{2+} + 10e^- + 8H^+ \qquad (20)$$

Pojavom ovog strujnog pika pojavljuje se i katodni strujni pik na 0,05 V. Budući da se ovaj strujni pik nije pojavio tijekom prvog ciklusa mjerenja, prvi povratni potencijal je bio katodni

potencijal. Ovaj katodni strujni pik je posljedica katodne redukcije produkata anodne oksidacije. Kao moguće reakcije koje se odvijaju na ovom potencijalu predložene su sljedeće reakcije:

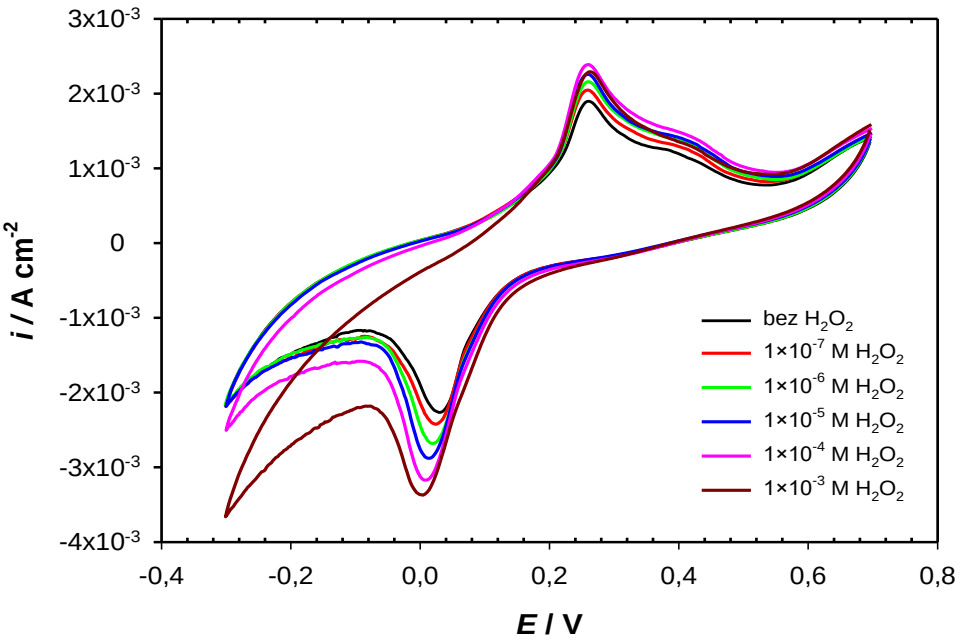
$$Ag_2S + CuSO_4 + Cu^{2+} + 10e- + 8H^+ \leftrightarrow 2AgCuS + 4H_2O \qquad (21)$$

$$Cu^{2+} + 2e^- \leftrightarrow Cu \qquad (22)$$

Sukcesivnim dodatkom vodikovog peroksida u puferiranu otopinu katodni i anodni pikovi rastu s povećanjem koncentracije vodikovog peroksida.

Iako je moguća i elektrokemijska oksidacija vodikovog peroksida imajući u vidu nepromijenjeni potencijal anodnog strujnog pika očigledno je da dodani vodikov peroksid olakšava elektrokemijsku oksidaciju modifikatora. Ovo se može predstaviti kombinacijom elektrokemijske oksidacije modifikatora i kemijske oksidacije modifikatora vodikovim peroksidom.

$$4AgCuS + 5H_2O_2 \leftrightarrow 2Ag_2S + 2CuSO_4 + 2Cu^{2+}\ 10e^- + 6H^+ + 2H_2O \qquad (23)$$



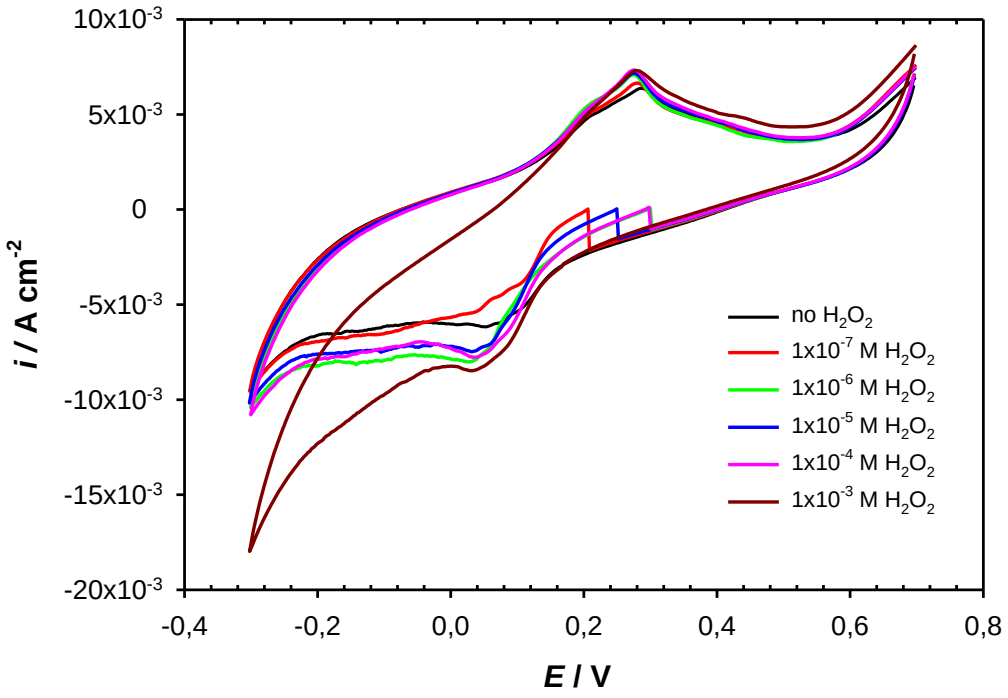
Slika 32 - *Snimljeni ciklički voltamogram modificirane elektrode s 5% AgCuS pri pH 5*

Konačna reakcija kojom se opisuje porast anodnog pika modificirane elektrode s dodatkom vodikovog peroksida je reakcija 23.

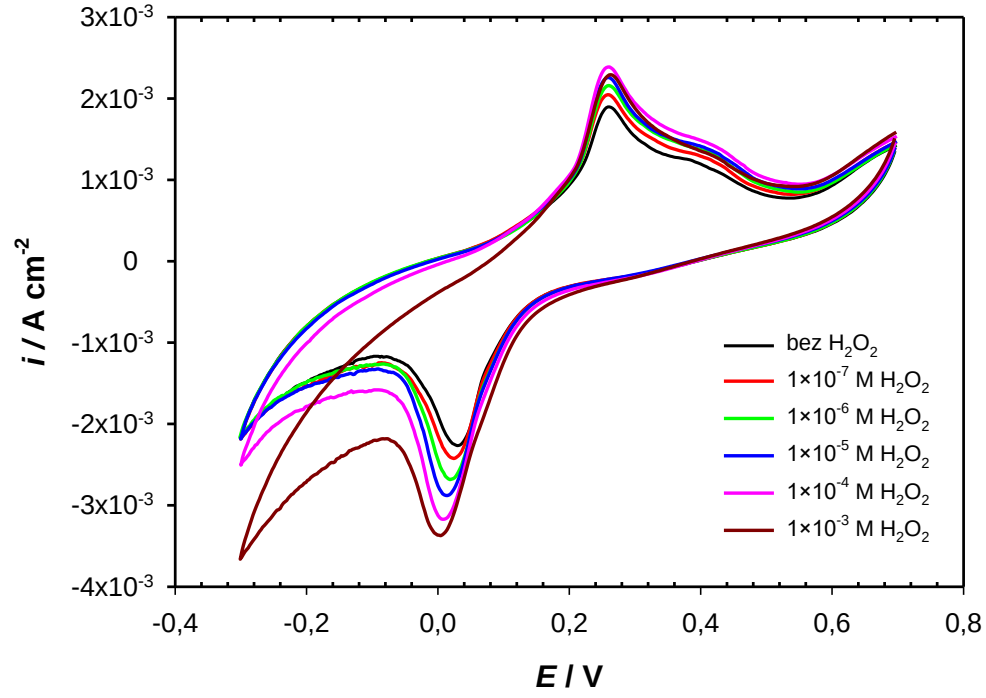
Porast katodnog strujnog pika dodatkom vodikovog peroksida je pomalo iznenađujući. Budući da se katodni strujni pik povećava dodatkom vodikovog peroksida na potencijalu istom na kojem se odvijaju predložene katodne redukcije (reakcije 21 i 22) proizlazi da vodikov peroksid na neki način katalizira katodnu redukciju. Ovaj utjecaj vodikovog peroksida može se pripisati njegovom oksidacijskom djelovanju, prema reakciji 24, koji kao posljedicu ima povećanu koncentraciju bakrovih (II) kationa koji se reduciraju prema reakcijama 21 i 22. Nadalje, iz Slike 32 vidljivo je da omjer visine anodnog strujnog pika i katodnog strujnog pika nije 1. Ovo upućuje na kvazireverzibilnost procesa (zajedno s razlikom potencijala vrha strujnih pikova), no ne smije se ni zaboraviti sam predloženi mehanizam reakcije ni uloga vodikovog peroksida u njemu.

Elektrokemijsko ponašanje modificirane elektrode ispitivano je i pri pH vrijednostima 7 i 9.

Ova mjerenja otkrivaju znatno slabija elektrokemijska svojstva pripravljenih elektroda u neutralnom i lužnatom mediju. Ovo nije iznenađujuće imajući u vidu predložene reakcije. S obzirom da se anodni i katodni strujni pikovi pojavljuju pri istim potencijalima kao i pri pH 5 očigledno se radi o istovjetnim reakcijama. Ove reakcije se događaju u manjem obimu (strujni pikovi manji, manje vrijednosti struje) zbog povećanog kapaciteta za kompleksiranje produkata anodne oksidacije konkretno bakrovim (II) kationima u neutralnom i lužnatom mediju. Dodatak vodikovog peroksida ne utječe na visinu anodnih strujnih pikova najvjerojatnije zbog smanjene oksidacijske moći vodikovog peroksida u lužnatom mediju. Zanimljivo katodni strujni pikovi se smanjuju dodatkom vodikovog peroksida (ovo ponašanje zahtijeva dodatne studije).

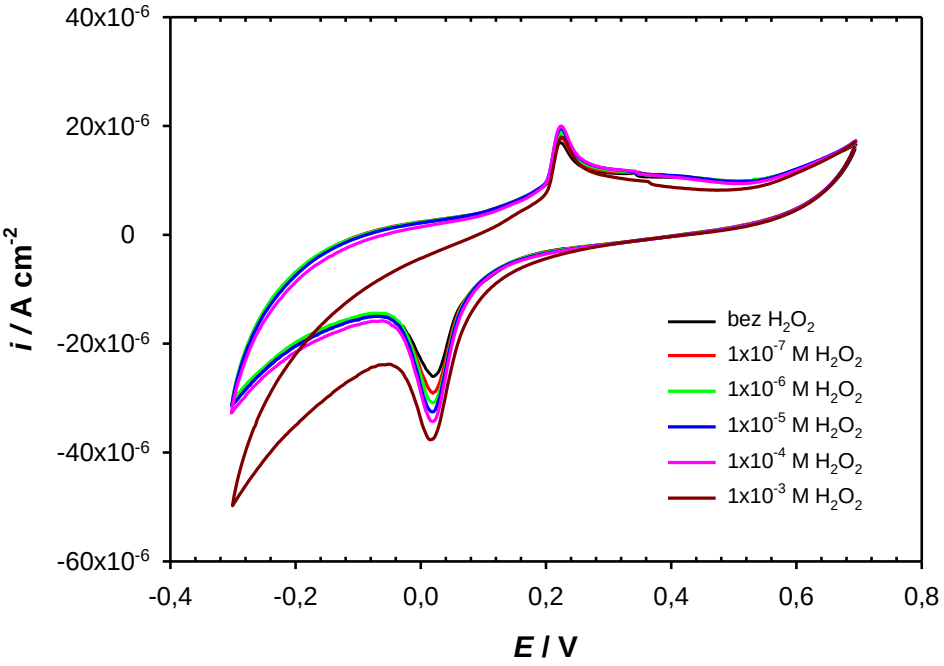


Slika 33- *Snimljeni ciklički voltamogram modificirane elektrode s 5% AgCuS pri pH 7*



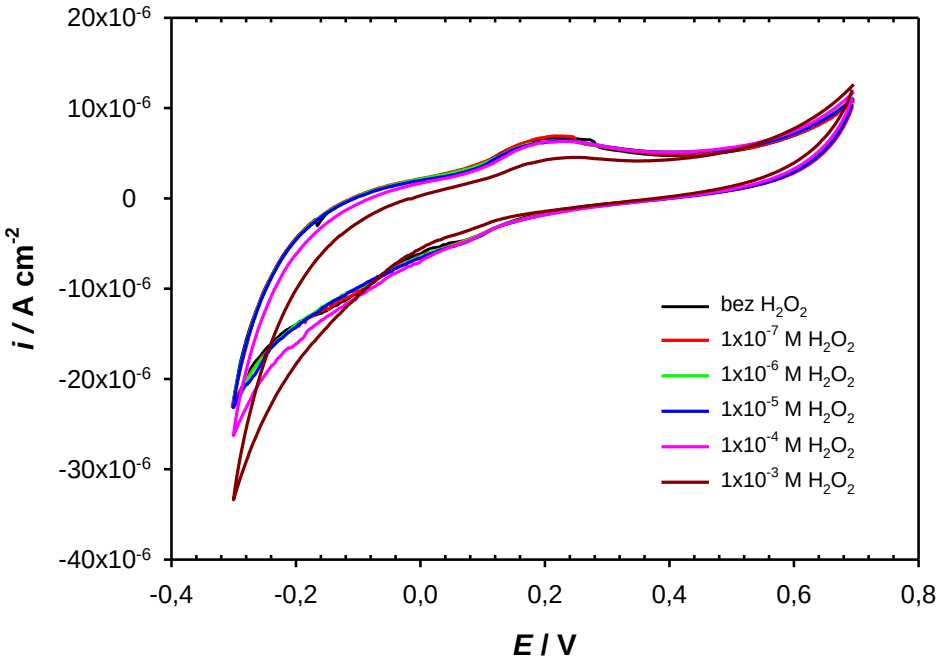
Slika 34- *Snimljeni ciklički voltamogram modificirane elektrode s 5% AgCuS pri pH 9*

Za razjašnjenje mogućih reakcija ispitivan je utjecaj vodikovog peroksida na elektrodi modificiranoj sa srebrovim sulfidom sa 5% modifikatora pri tri pH vrijednosti.

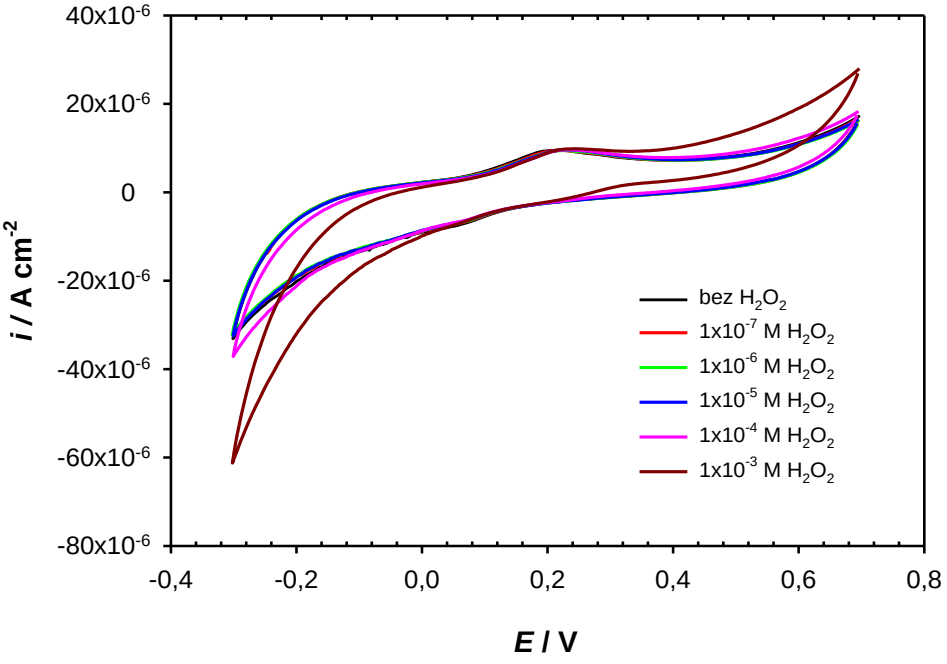


Slika 35 - *Snimljeni ciklički voltamogram modificirane elektrode s 5% Ag_2S pri pH 5*

Značajnija elektrokatalitička svojstva ove modificirane elektrode prema vodikovom preoksidu nisu primjećena pri pH 7 i 9.



***Slika 36**- Snimljeni ciklički voltamogram modificirane elektrode s 5% Ag2S pri pH 7*



***Slika 37**- Snimljeni ciklički voltamogram modificirane elektrode s 5% Ag2S pr*

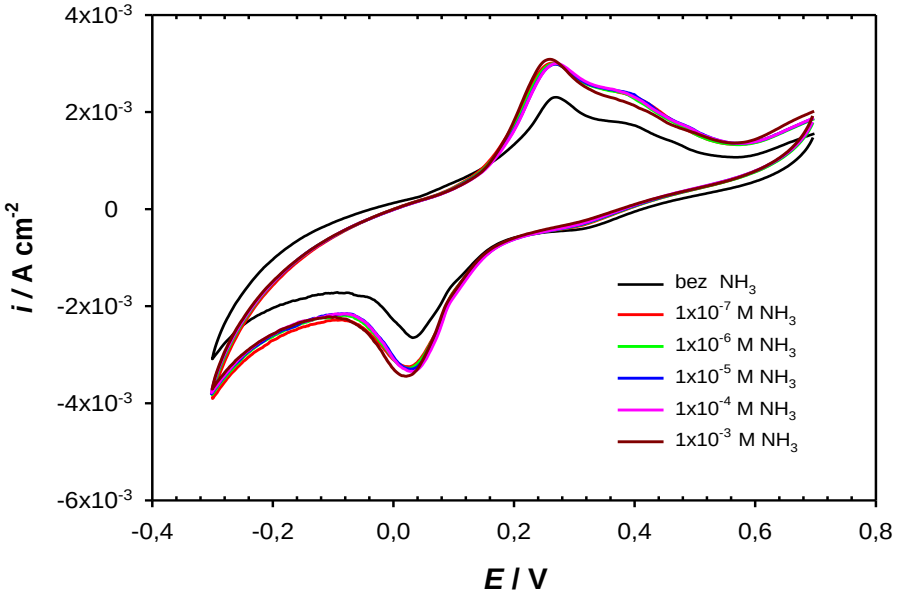
Snimljeni ciklički voltamogrami su slični onima dobivenim u slučaju elektrode modificirane sa AgCuS.

Može se primjetiti slabiji porast anodnih strujnih pikova s dodatkom vodikovog peroksida. Ovo je i očekivano s obzirom na mogućnost oksidacije ovog modifikatora. Budući da je kod ovog modifikatora moguća oksidacija sulfidnog aniona u sumpor ili čak sulfat ne čudi slab utjecaj vodikovog peroksida na ovaj pik. Iz slike 37 je vidljiv i porast katodnog strujnog pika s dodatkom vodikovog peroksida. Ovaj porast može se pripisati oksidaciji srebrovog sulfida. Dakako, ova reakcija je kemijska reakcija oksidacije srebrovog sulfida s vodikovim peroksidom, kao posljedica toga srebrov (I) kation je podložan elektrokemijskoj redukciji.

$$Ag_2S + H_2O_2 \leftrightarrow 2Ag^+ + HSO_4^- \qquad (25)$$

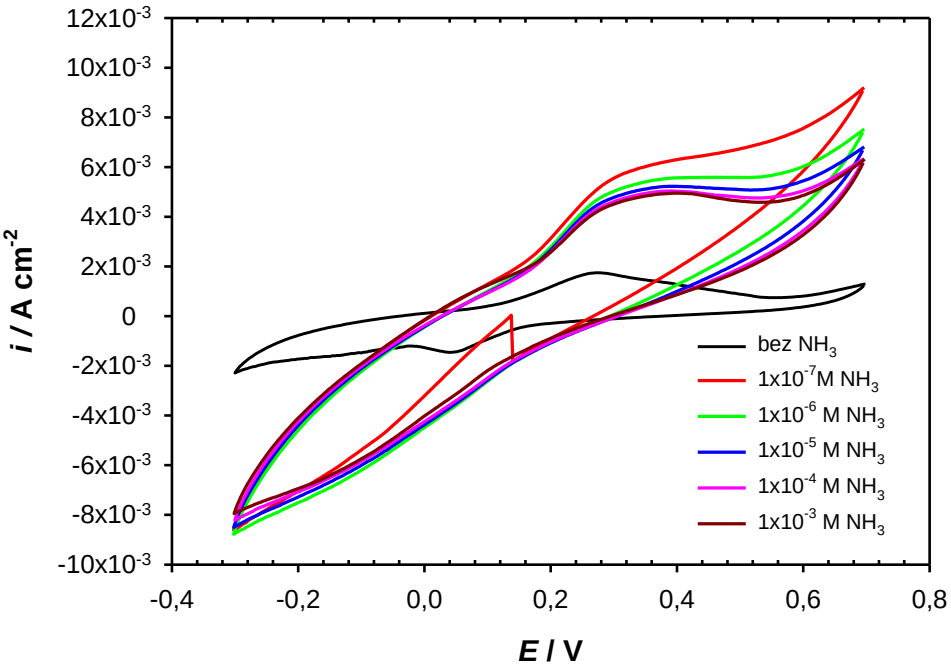
3.3 Elektrokemijsko ponašanje amonijaka na modificiranim elektrodama

Elektrokemijsko ponašanje amonijaka na modificiranim elektrodama ispitivano je pri tri pH vrijednosti. Za elektrodu modificiranu s AgCuS nisu uočene značajnije promjene dodatkom amonijaka kod sve tri pH vrijednosti. Pri pH 5 mogu se primjetiti dva strujna pika pri istim potencijalima kao i u slučaju vodikovog peroksida, no ciklički voltamogrami ne pokazuju značajniju promjenu dodatkom amonijaka.

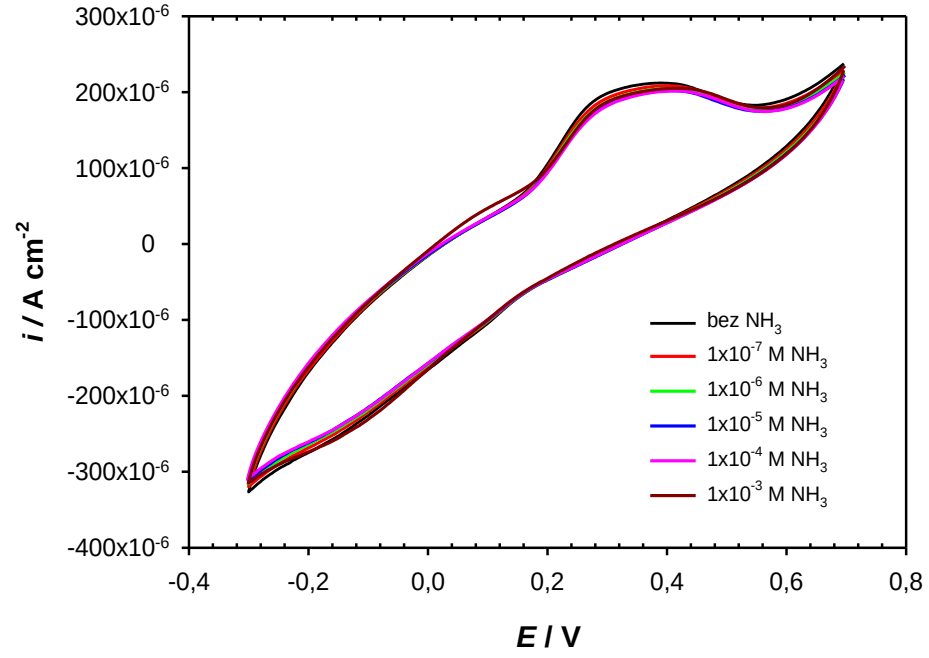


***Slika 38**- Snimljeni ciklički voltamogram modificirane elektrode s 5% AgCuS pri pH 5*

Pri pH 7 i 9 osim pojave povećanja osnovnih struja ne mogu se zapaziti značajnije promjene dodatkom amonijaka.



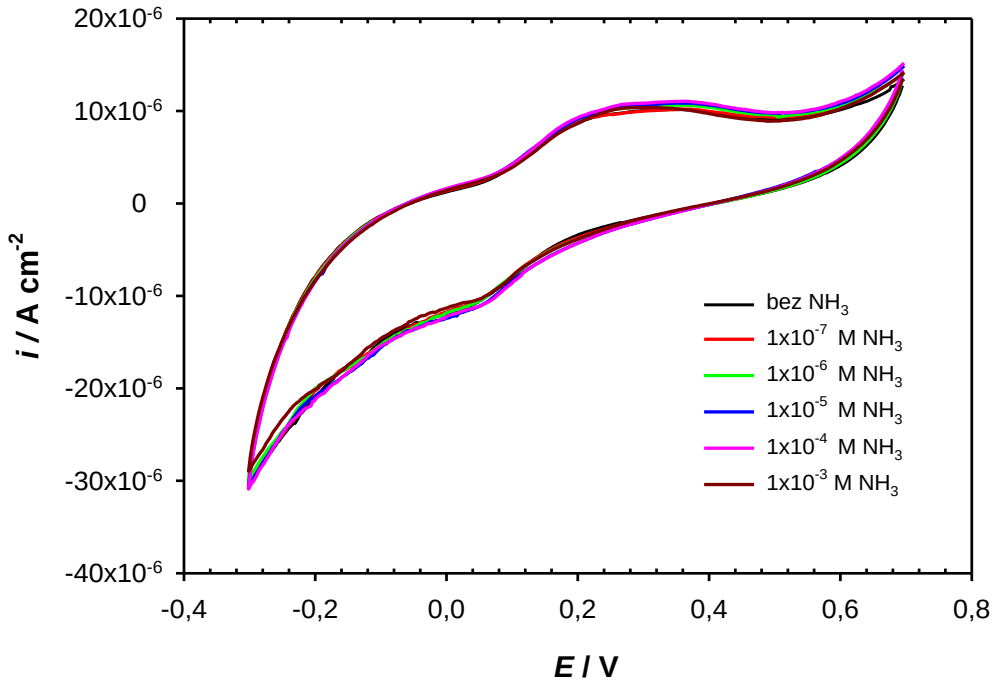
***Slika 39**- Snimljeni ciklički voltamogram modificirane elektrode s 5% AgCuS pri pH 7*



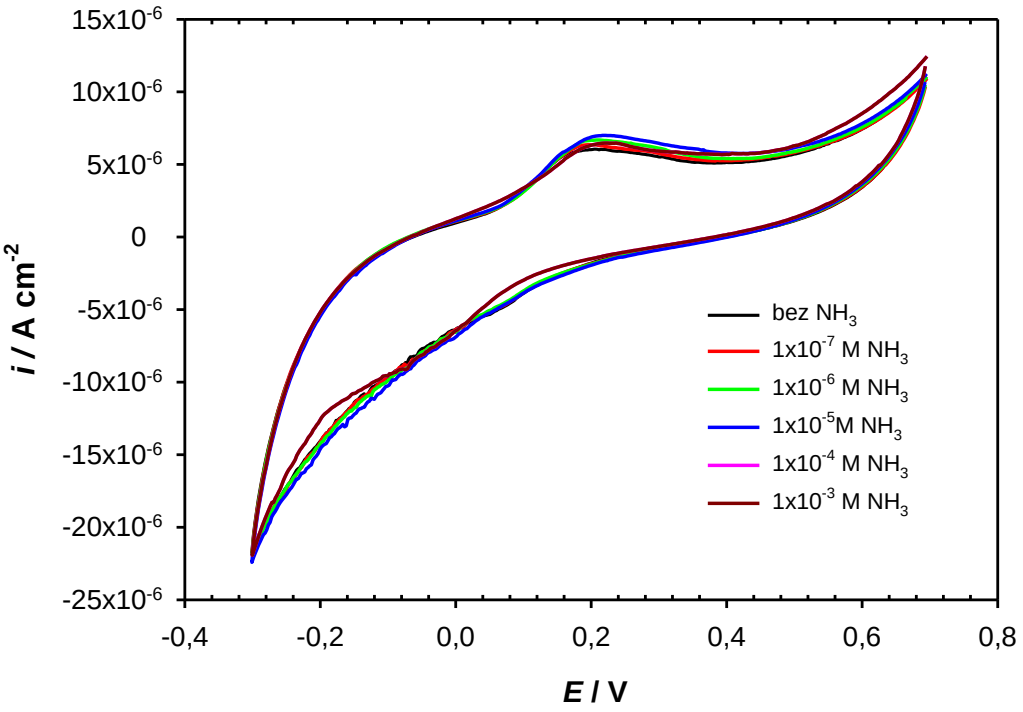
***Slika 40**- Snimljeni ciklički voltamogram modificirane elektrode s 5% AgCuS pri pH 9*

Elektroda modificirana sa srebrovim sulfidom

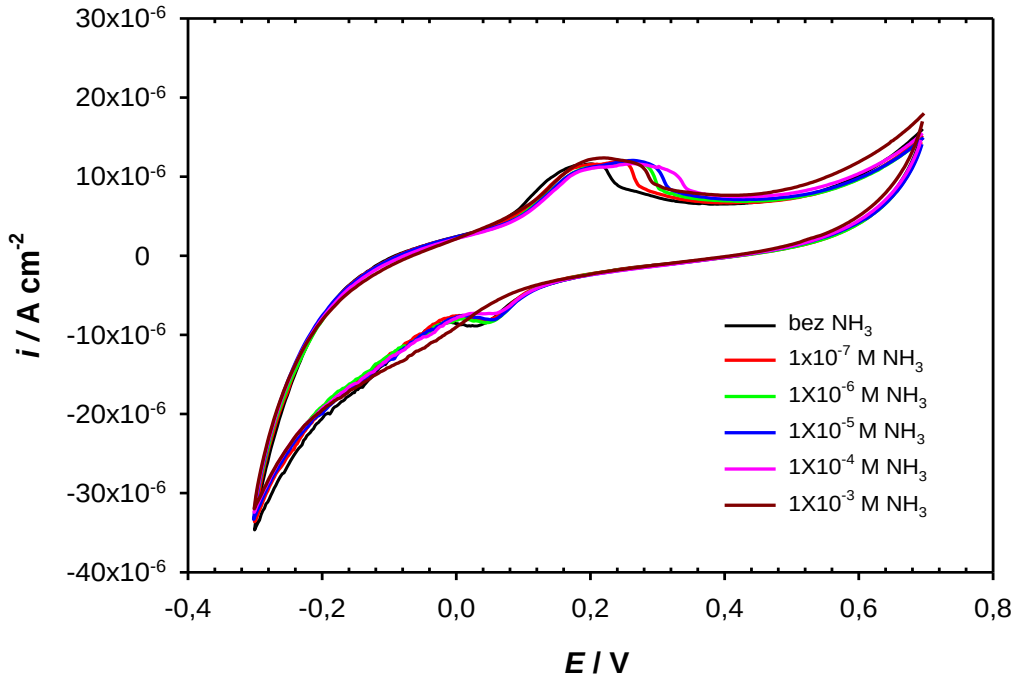
Analogno mjerenjima obavljenima s elektrodom modificiranom srebrovim sulfidom u slučaju vodikovog peroksida izvršena su ispitivanja ponašanja amonijaka na elektrodama modificiranim srebrovim sulfidom. Ne može se primjetiti nikakva elektrokatalitička aktivnost dodatkom amonijaka pri svim pH vrijednostima.



***Slika 41**- Snimljeni ciklički voltamogram modificirane elektrode s 5% Ag2S pri pH 5*

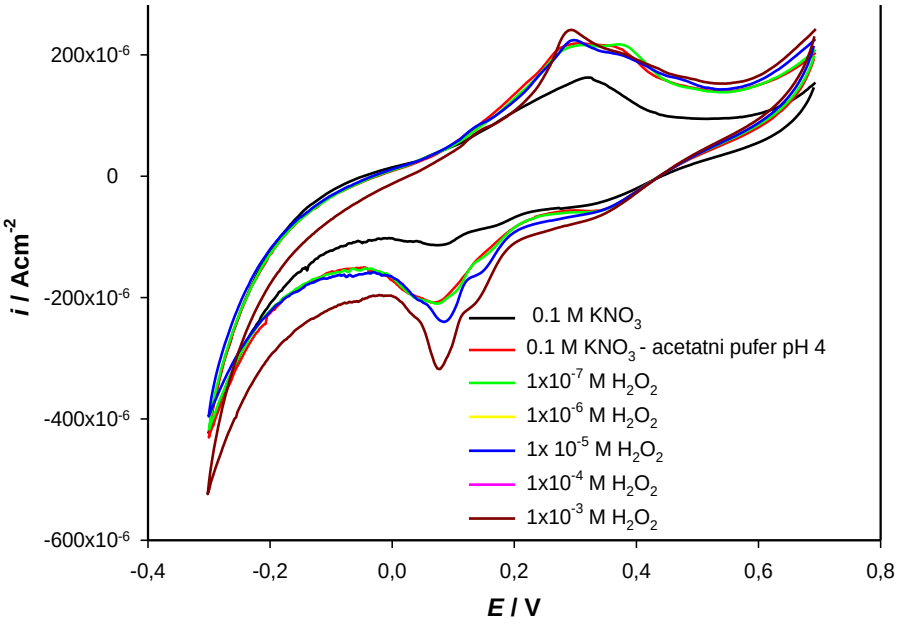


Slika 42- *Snimljeni ciklički voltamogram modificirane elektrode s 5% Ag2S pri pH 7*

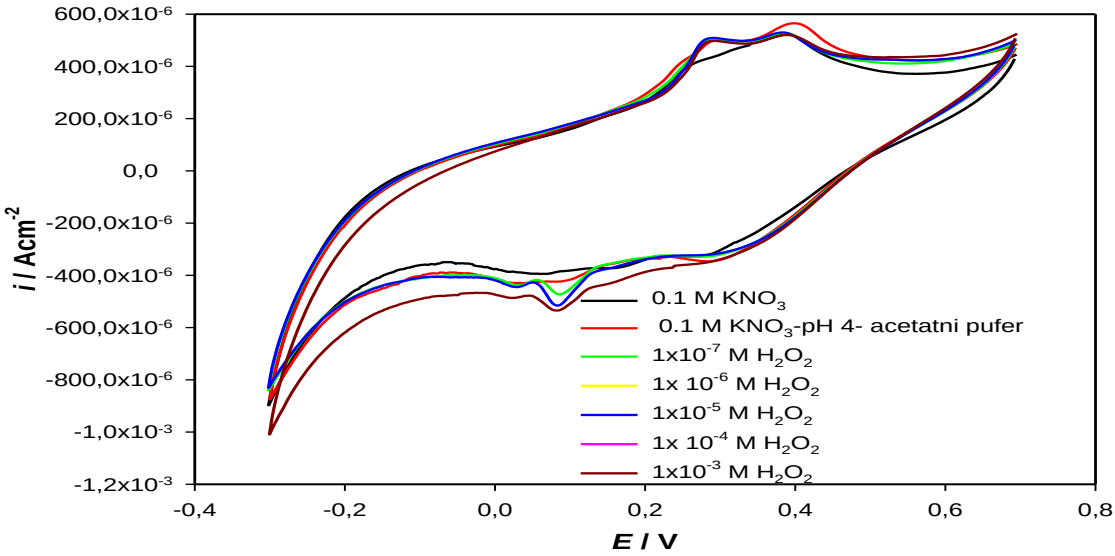


Slika 43- *Snimljeni ciklički voltamogram modificirane elektrode s 5% Ag2S pri pH 9*

Na osnovu dobivenih rezultata zaključeno je da najbolja elektrokemijska svojstva ima elektroda modificirana sa srebro bakrovim sulfidom pri pH 5. Na osnovu toga istraživan je utjecaj količine modifikatora u elektrodi od ugljikove paste. Utjecaj količine modifikatora od 10 i 20% je prikazan na slikama kako slijedi.



Slika 44- *Elektroda s 10 % modifikatora AgCuS pri pH 4*



Slika 45- *Elektroda s 20% modifikatora AgCuS pri pH 5*

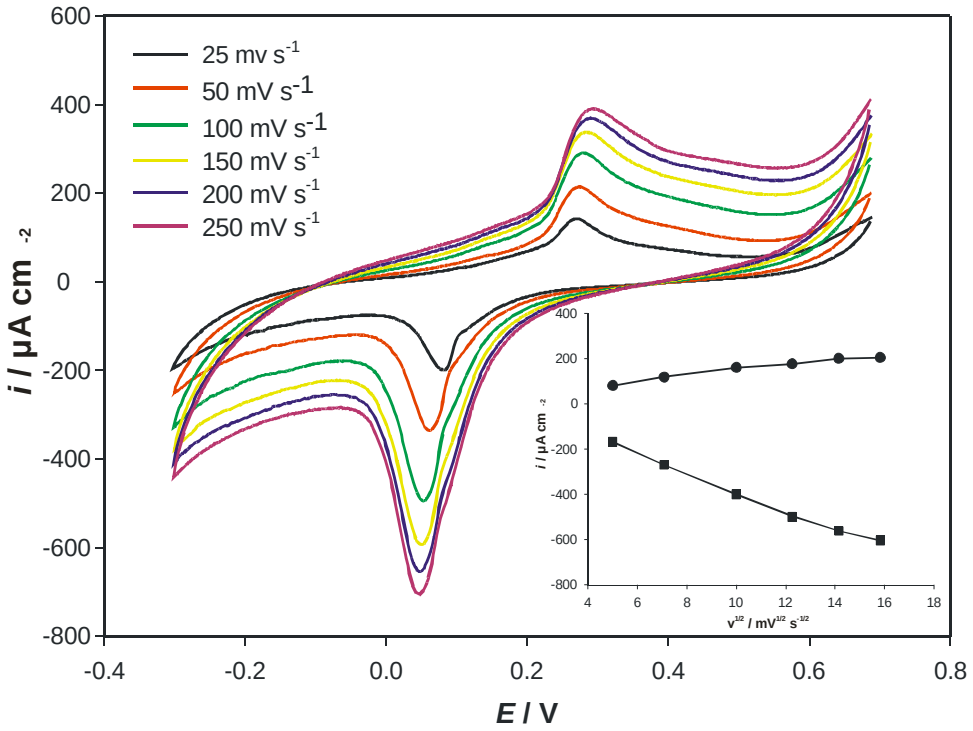
Snimljeni ciklički voltamogrami pokazuju znatno veće osnovne struje nego u slučaju modifikacije s 5% modifikatora. Ovo ponašanje je izraženije s povećanjem postotka modifikatora, tako da u slučaju elektrode modificirane s 20% modifikatora dominiraju pseudokapacitivne struje. Za dodatni uvid u mehanizam elektrokemijskih reakcija ispitivan je utjecaj posmika na cikličke voltamograme. Ovaj utjecaj je rađen u prisustvu i bez prisustva vodikovog peroksida. Dobiveni rezultati su prikazani na slikama 46 i 47. Ovisnost visine katodnog i anodnog strujnog pika o posmiku (odnosno korjenu njegove vrijednosti- za umetak u slikama) sugeriraju difuzijski kontroliran mehanizam.

Na osnovu svih objašnjenih rezultata kao pogodna metoda za elektrokemijsko određivanje vodikovog peroksida odabrana je amperometrija. Amperometrijska mjerenja su odrađena pri pH 4 u području potencijala kako anodnih tako i katodnih strujnih vrhova.

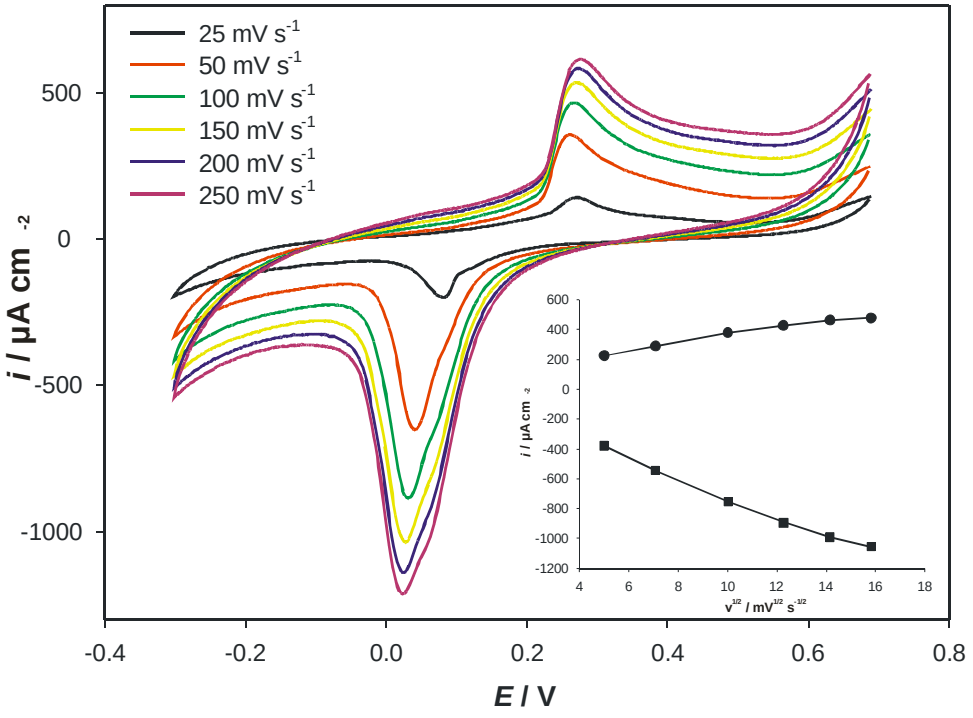
Kada je potencijal bio +0,282 V, nije dobivena nikakva promjena struje dodatkom vodikovog peroksida.

Ovaj potencijal +0,282 V je ciljan za reakciju karakteriziranu anodnim strujnim pikom. Nadalje vodikov peroksid je određivan i pri tri konstantna potencijala koja se odnose na reakciju katodne redukcije. Rezultati ovih mjerenja su prikazani na slici 48.

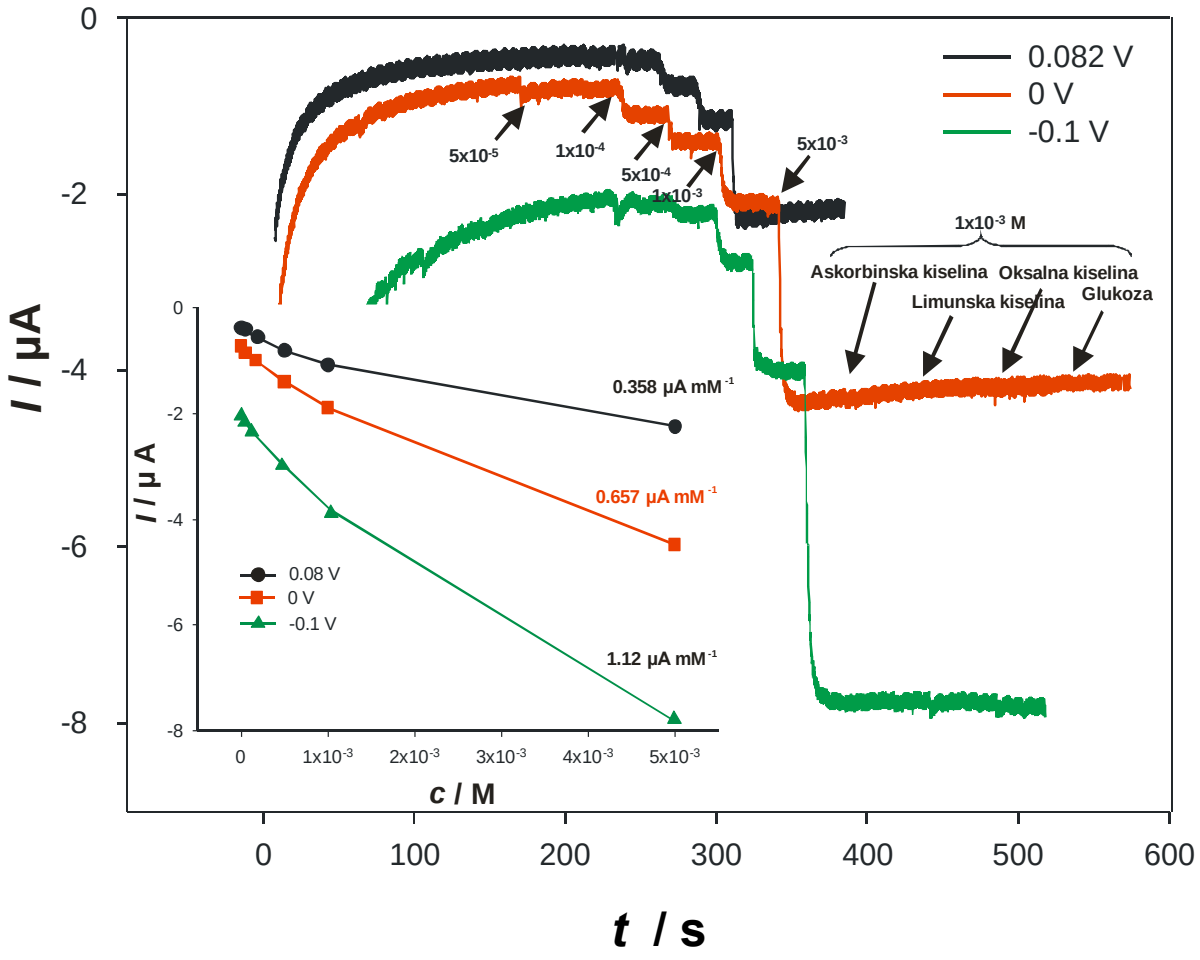
Kao optimalni potencijal odabran je 0 V. Dobiveno linearno područje određivanja peroksida je između $1x10^{-6}$ mol/dm^3 i $1x10^{-3}$ mol/dm^3. Određena granica detekcije tri-σ metodom iznosi $0,14x10^{-6}$ mol/dm^3 sa osjetljivošću od $675x10^{-6}$ A dm^{3}mol^{-1}. Nadalje, dodatak askorbinske kiseline, limunske kiseline, oksalne kiseline i glukoze nisu značajno utjecali na strujni signal.



Slika 46- *Utjecaj posmika na CV-modifikacija s 5% AgCuS pri pH 4*



Slika 47 - *Utjecaj posmika na CV- modifikacija s 5% AgCuS pri pH 4 koncentracije 10^{-4} uz dodatak H_2O_2*



***Slika 48**- Amperometrijska mjerenja pri pH 4*

4 ZAKLJUČAK

1. Nikakve značajnije elektrokemijske promjene se nisu uočile za nemodificiranu elektrodu pri različitim pH vrijednostima dodatkom vodikovog peroksida.

2. Kao pogodna metoda za elektrokemijsko određivanje vodikovog peroksida odabrana je amperometrija.

3. Na osnovu dobivenih rezultata zaključeno je da najbolja elektrokemijska svojstva ima elektroda modificirana srebro bakrovim sulfidom pri pH 5.

4. Za razliku od mjerenja obavljenim s vodikovim peroksidom ciklički voltamogrami ne pokazuju značajniju promjenu dodatkom amonijaka.

5 LITERATURA

[1] E. Braidot, E. Petrussa, A. Vianello, F. Macri, Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates, *FEBS Letters*, **1999,** *451,* 347.

[2] W. Sun, M. Van Montagu, N. Verbruggen, Small heat shock proteins and stress tolerance in plants, *Biochim Biophys Acta*, **2002,** *1577*, 1.

[3] A. Kornberg, *For the love of enzymes,* Harvard University Press, London, **1989**.

[4] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry,* University of Wisconsin-Madison, USA**, 2013.**

[5] S. Međedović, E. Maslić, R. Hadžiselimović, *Biologija 2,* Svjetlost, Sarajevo, **2000**.

[6] F. G. Banica, *Chemical sensors and biosensors,* Wiley, 1 edition, London, **2012.** p. 569

[7] FW. Janssen, HW. Ruelius, Alcohol oxidase, a flavoprotein from several Basidiomycetes species. Crystallization by fractional precipitation with polyethylene glycol, *Biochim Biophys Acta,* **1968.** *151*, 330

[8] O. Hayaishi, W. B. Sutton, Enzymatic oxigen fixation into acetate concuitant with the enzymatic decarboxylation of L-lactate, *J. Am. Chem. Soc.,* **1957,** *79*, 4809

[9] the medical biochemistry page. org

[10] R. Coulombe, KQ Yue, S. Ghisla, A. Vrielink, Oxygen access to the active site of cholesterol oxidase through a narrow channel is gated by an Arg-Glu pair*, J Biol Chem.,* **2001,** *276*, 41

[11] MC. McKenna, GC. Ferreira, Enzyme Complexes Important for the Glutamate-Glutamine Cycle, *Adv Neurobiol.,* **2016,** *13,* 59

[12] EV. Lukasheva, TT. Berezov, L-Lysine alpha-oxidase: physicochemical and biological properties, *Biochemistry (Mosc).,* **2002,** 67, 1152

[13] VP. Kotsira, YD Clonis, Oxalate oxidase from barley roots: purification to homogeneity and study of some molecular, catalytic, and binding properties, *Arch Biochem Biophys.,* **1997,** *340*, 239

[14] L. Pollegioni, L. Piubelli, S. Sacchi, MS Pilone, G. Molla, Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans, *Cell Mol Life Sci.,* **2007,** *64*, 1373

[15] FL. Muller, MS. Lustgarten, Y. Jang, A. Richardson, H. Van Remenen, Trend sin oxidative aging theories, *Free Radial Biology and Medicine,* **2007,** *43*, 477

[16] J. Postgate, *Nitrogen fixation,* 3rd Cambridge Universitx Press, London**, 1998,** p. 112

[17] V. Kornbrust, *Asparaginaze-an enzyme for acrylamide reduction in food products, Enzymes in Food Technology,* 2nd Edition, **2010.**

[18] A. Pandikumar, GT. How, HN Ming, LH. Ngee, Highly exposed {001} facets of titanium dioxide modified with reduced graphene oxide for dopamine sensing, *Sci Rep.,* **2014,** *4*, 5044

[19] J. W. Robinson, E. M. Skelly Frame, G. M. Frame II, *Undergraduate Instrumental*

Analysis, Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, **2014,** p. 1264

[20] I. Piljac, *Elektroanalitičke metode*, RMC Zagreb, **1995.** p. 409

[21] I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode,* Media print, Zagreb, **2010,** p. 712

[22] K. Kalcher, *Electroanalysis,* Fresenius Z. Anal. Chemie, **1995,** *7*, 5

[23] K. Kalcher, J. M . Kauuffman, J. Wang, I. Svancera, K. Vytras, C. Neuhold, Z. Yang, *Electroanalysis,* **1995,** *7,* 5

[24] I. Svancera, K. Vytras, F. Renger, M. R. Smith, *Applications of Carbon Paste Electrodes in Electroanalysis,* Sbornik Vedeckych, **1993,** 56

[25] K. Schachl, *Development of Electrochemical Sensors based on Carbon Electrodes Modified with Manganese Dioxide,* Inaugural Dissertation, Karl-Franzes University, Graz, **1998.**

[26] K. Kalcher, M. Stadlober, G. Raber, A new method for the voltammetric determination of molybdenium (IV) using carbon paste electrodes modified in situ with cetyltrimethylamonium bromide, *Anal Chim. Acta,* **1997,** *350*, 319

[27] J. O. M. Bockris, *Modern electrochemist 2A*, Kluwer Academic/Plenum Publishers,

2nd Edition, New York, **2000,** p. 763