Elektrokemijsko ponašanje L-cisteina na elektrodama od ugljikove paste modificiranim srebro-bakrovim sulfidima

Vuko, Meri

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:167:736733

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

ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE L-CISTEINA NA ELEKTRODAMA OD UGLJIKOVE PASTE MODIFICIRANIM SREBRO-BAKROVIM SULFIDIMA

DIPLOMSKI RAD

MERI VUKO

Matični broj: 55

Split, listopad 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE L-CISTEINA NA ELEKTRODAMA OD UGLJIKOVE PASTE MODIFICIRANIM SREBRO-BAKROVIM SULFIDIMA

DIPLOMSKI RAD

MERI VUKO

Matični broj: 55

Split, listopad 2017.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

ELECTROCHEMICAL BEHAVIOUR OF L-CYSTEINE ON CARBON PASTE ELECTRODE MODIFIED WITH SILVER-COPPER SULFIDES

DIPLOMA THESIS

MERI VUKO

Parent number: 55

Split, October 2017

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilipte u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: doc. dr. sc. Marijo Buzuk
Pomoć pri izradi: /

ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE L-CISTEINA NA ELEKTRODAMA OD UGLJIKOVE PASTE MODIFICIRANIM SREBRO-BAKROVIM SULFIDIMA

Meri Vuko, 55

Sažetak:

U ovom radu je ispitivano elektrokemijsko ponašanje elektroda od ugljikove paste modificiranih različitom količinom ternarnih sulfida (tri različita ternarna sulfida) u svrhu elektrokemijskog određivanja L-cisteina. Elektrokemijski procesi uočeni na ovako modificiranim elektrodama ukazuju na mogućnost indirektnog određivanja L-cisteina. Ova metoda se zasniva na formiranju stabilnih kompleksa L-cisteina s metalnim ionima ternarnih sulfida. Mjerenja su vršena pri dvije pH vrijednosti (pH=5 i 7) te je kao optimalna pH vrijednost odabrana pH=5. Elektroanalitičko određivanje L-cisteina je vršeno voltametrijom s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV). Za elektrodu modificiranu s 5% materijala, koji je u sebi sadržavao različite ternarne sulfide opće formule $Cu_XAg_yS_z$ te elementarno srebro, dobiveni su najbolji elektroanalitički rezultati. U radu su prikazani utjecaji različitih parametara (količina elektroaktivnog materijala, brzina posmika, različiti električni kontakti, frekvencija, anodna i katodna voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV)) na elektroanalitički signal. Ova metoda je pokazala da su procesi koji se događaju na elektrodi kontrolirani difuzijom i adsorpcijom. Navedena elektroda je pokazala zadovoljavajuću osjetljivost anodnog signala pri 10 Hz od -20 μA μmol^{-1} dm^3 uz linearno područje od 0,1 do 1 μmol dm^{-3}. Granica detekcije, određena 3σ metodom, iznosi 0,0025 μmol dm^{-3}. Ostale pojave koje se mogu uočiti promjenom parametara su objašnjene u ovom radu.

Ključne riječi: cistein, elektrokemijsko određivanje, ciklička voltametrija, voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV), elektroda od ugljikove paste, ternarni sulfidi, modifikacije

Rad sadrži: 60 stranica, 31 slika, 6 tablica, 24 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Marija Bralić - predsjednik
2. prof. dr. sc. Senka Gudić - član
3. doc. dr. sc. Marijo Buzuk - član-mentor

Datum obrane: 20.10.2017.

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 Split
Study

Scientific area: Natural Sciences
Scientific field: Chemisty
Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21
Mentor: Marijo Buzuk – PhD, assistant prof.
Technical assistance: /

ELECTROCHEMICAL BEHAVIOUR OF L-CYSTEINE ON CARBON PASTE ELECTRODE MODIFIED WITH SILVER-COPPER SULFIDES

Meri Vuko, 55

Abstract:

In this paper the electrochemical behaviour of carbon paste electrodes, which were previously modified with different amounts of ternary sulphides (three different sulphides), has been tested for the purpose of L-cysteine electrochemical determination. Electrochemical processes spotted on the electrodes that have been modified this way indicate the possibility of indirect L-cysteine determination. This method is based on the formation of the stable complexes of L-cysteine and ternary sulphides' metal ions. The measurements have been conducted at two pH values (pH 5 and 7) and subsequently the pH 5 has been chosen as the optimum. The electrochemical determination of L-cysteine has been carried out through the usage of squarewave voltammetry method (SWV). The best results were acquired by using the electrode that had been modified with 5% of the material which consisted of various ternary sulphides with a general formula $Cu_XAg_yS_z$ as well as of elementary silver. In the paper, the effect of various parameters on the electroanalytical signal has been shown, such as the amount of electroactive material, sweep speed, different electrical contacts, frequency, anode and cathode squarewave voltammetry (SWV). This method has indicated that the determination processes are controlled by diffusion and adsorption. The electrode mentioned above has shown the satisfactory sensibility of the anode signal at 10 Hz of -20 μA μmol^{-1} dm^3 with the linear range from 0,1 to 1 μmol dm^{-3}. The detection limit, which has been determined with 3σ method, is 0,0025 μmol dm^{-3}. Also, in this paper the other occurrences, which could be perceived after changing the parameters, have been studied.

Keywoeds: cysteine, electrochemical determination, cyclic voltammetry, squarewave voltammetry, carbon paste electrodes, ternary sulphides, modification

Thesis contains: 60 pages, 31 figures, 6 tables, 24 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Marija Bralić - PhD, associate prof.	chair person
2. Senka Gudić - PhD, full prof.	member
3. Marijo Buzuk - PhD, assistant prof.	supervisor

Defence date: October 20, 2017

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library od 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 svibnja do rujna 2017. godine.

Iskreno se zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Mariju Buzuku na stručnoj pomoći te uputama i savjetima koji su mi pomogli tijekom izrade diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na podršci i razumijevanju tijekom obrazovanja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Utvrđivanje elektrokemijskog ponašanja nemodificirane i modificiranih (različitim ternarnim sulfidima) elektrode/a pri pH=5 i 7

2. Utvrđivanje elektrokemijskog ponašanja cisteina na elektrodama (modificiranim i nemodificiranim) od ugljikove paste

3. Elektroanalitičko određivanje cisteina na osnovu rezultata dobivenih iz predhodno dvije točke

4. Odabir i optimiranje elektrokemijske metode za određivanje cisteina elektrodama modificiranim sa različitim ternarnim sulfidima

SAŽETAK

U ovom radu je ispitivano elektrokemijsko ponašanje elektroda od ugljikove paste modificiranih različitom količinom ternarnih sulfida (tri različita ternarna sulfida) u svrhu elektrokemijskog određivanja L-cisteina. Elektrokemijski procesi uočeni na ovako modificiranim elektrodama ukazuju na mogućnost indirektnog određivanja L-cisteina. Ova metoda se zasniva na formiranju stabilnih kompleksa L-cisteina s metalnim ionima ternarnih sulfida.

Mjerenja su vršena pri dvije pH vrijednosti (pH=5 i 7) te je kao optimalna pH vrijednost odabrana pH=5. Elektroanalitičko određivanje L-cisteina je vršeno voltametrijom s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV). Za elektrodu modificiranu s 5% materijala, koji je u sebi sadržavao različite ternarne sulfide opće formule $Cu_xAg_yS_z$ te elementarno srebro, dobiveni su najbolji elektranalitički rezultati.

U radu su prikazani utjecaji različitih parametara (količina elektroaktivnog materijala, brzina posmika, različiti električni kontakti, frekvencija, anodna i katodna voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude) na elektroanalitički signal. Ova metoda je pokazala da su procesi određivanja kontrolirani difuzijom i adsorpcijom. Navedena elektroda je pokazala zadovoljavajuću osjetljivost anodnog signala pri 10 Hz od -20 μA μmol^{-1} dm^3 uz linearno područje od 0,1 do 1 μmol dm^{-3}. Granica detekcije, određena 3σ metodom, iznosi 0,0025 μmol dm^{-3}.

Ključne riječi: cistein, elektrokemijsko određivanje, ciklička voltametrija, voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude, elektroda od ugljikove paste, ternarni sulfidi, modifikacije

SUMMARY

In this paper the electrochemical behaviour of carbon paste electrodes, which were previously modified with different amounts of ternary sulphides (three different sulphides), has been tested for the purpose of L-cysteine electrochemical determination. Electrochemical processes spotted on the electrodes that have been modified this way indicate the possibility of indirect L-cysteine determination. This method is based on the formation of the stable complexes of L-cysteine and ternary sulphides' metal ions.

The measurements have been conducted at two pH values (pH 5 and 7) and subsequently the pH 5 has been chosen as the optimum. The electrochemical determination of L-cysteine has been carried out through the usage of squarewave voltammetry method (SWV). The best results were acquired by using the electrode that had been modified with 5% of the material which consisted of various ternary sulphides with a general formula $Cu_xAg_yS_z$ as well as of elementary silver.

In the paper, the effect of various parameters on the electroanalytical signal has been shown, such as the amount of electroactive material, sweep speed, different electrical contacts, frequency, anode and cathode squarewave voltammetry (SWV). This method has indicated that the determination processes are controlled by diffusion and adsorption. The electrode mentioned above has shown the satisfactory sensibility of the anode signal at 10 Hz of -20 μA μmol^{-1} dm^3 with the linear range from 0,1 to 1 μmol dm^{-3}. The detection limit, which has been determined with 3σ method, is 0,0025 μmol dm^{-3}.

Keywords: cysteine, electrochemical determination, cyclic voltammetry, squarewave voltammetry, carbon paste electrodes, ternary sulphides, modification

UVOD 1

1. OPĆI DIO 3

1.1. Elektrokemijske metode 4

1.1.1. Voltametrija 6

1.1.2. Voltametrija s linearnim signalom pobude 6

1.1.3. Ciklička voltametrija 7

1.1.4. Voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV) 9

1.2. Biološki aktivni tioli 11

1.2.1. Fizikalna svojstva 11

1.2.2. Uloge i važnost kod čovjeka 11

1.2.3. Izoelektrična točka 12

1.2.4. Stabilnost tiola u prisutnosti kisika 13

1.2.5. Tehnike određivanja bioloških tiola (cistein) 13

1.3. Uporaba elektrokemijskih metoda za određivanje tiola 15

1.3.1. Problemi vezani za elektrokemijske metode 15

1.4. Uporaba elektroda od ugljikove paste (CPE) 16

1.5. Određivanje tiola s elektroda ugljikove paste 20

2. EKSPERIMENTALNI DIO 22

2.1. Priprava elektrodnog materijala 23

2.1.1. Sastav ugljikove paste 23

2.2. Priprava otopina 24

2.2.1. Priprava otopine $Cu(NO_3)_2$ 24

2.2.2. Priprava otopine KNO_3 24

2.2.3. Priprava otopine Na_2HPO_4 24

2.2.4. Priprava otopine CH_3COONa 25

2.2.5. Priprava otopine cisteina 25

2.2.6. Priprava otopine acetatnog pufera; pH 5 i koncentracije 0,1 mol dm^{-3} 25

2.2.7. Priprava otopine fosfatnog pufera; pH 7 i koncentracije 0,1 mol dm^{-3} 25

2.2.8. Priprava zasićene otopine natrijevog sulfida Na_2S 25

2.2.9. Priprava otopine Pb^{2+} 25

2.2.10. Priprava osnovnog elektrolita 25

2.3. Aparatura i elektrodni materijal 25

2.3.1. Aparatura 26

2.3.2. Priprava radnih elektroda 26

3. REZULTATI I RASPRAVA 27
3.1. Standardizacija zasićene otopine Na_2S s $Pb(NO_3)_2$ 28
3.2. Elektrokemijsko ponašanje nCPE (nemodificirane CPE) pri pH=5 29
3.2.1. Utjecaj pomaka anodne i katodne granice na nCPE pri pH=5 29
3.2.2. Utjecaj mješanja na CV 30
3.2.3. Utjecaj dodatka pufera na CV nCPE 31
3.2.4. Utjecaj dodatka cisteina na CV nCPE 32
3.3. Elektrokemijsko ponašanje mCPE (modificirane CPE) pri pH=5 33
3.3.1. Ponašanje mCPE-A5 u prisutnosti cisteina pri pH=5 35
3.3.2. Utvrđivanje mehanizama oksidacije i redukcije mCPE-A5 pri pH=5 37
3.4. Elektrokemijsko ponašanje CPE pri pH=7 40
3.4.1. Utjecaj pomaka anodne i katodne granice na nCPE pri pH=7 40
3.4.2. Utjecaj dodatka pufera na CV nCPE pri pH=7 42
3.4.3. Utjecaj dodatka cisteina na CV nCPE pri pH=7 42
3.5. Elektrokemijsko ponašanje mCPE (modificirane CPE) pri pH=7 44
3.5.1. Ponašanje mCPE u prisutnosti cisteina pri pH=7 45
3.5.2. Utvrđivanje mehanizama oksidacije i redukcije mCPE-A5 pri pH=7 46
3.6. Voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV) 47
4. ZAKLJUČAK 56
5. LITERATURA 58

UVOD

Elektroanalitičke metode su skupina analitičkih postupaka i tehnika kojima informaciju o koncentraciji, aktivitetu ili nekom drugom podatku određivane kemijske dobivamo pomoću električnog napona, električne struje ili električnog naboja.

Cistein (Cys) je neesencijalna aminokiselina i jedna od 20 aminokiselina koje ulaze u sastav proteina te jedna od dviju koje sadrže sumpor u bočnom ogranku (pored metionina). Cistein tvori kolagen koji koži daje elastičnost i teksturu, a tvori i alfakeratin noktiju i kose. Kosa i koža su sastavljeni od 10-14% cisteina što ga čini važnim kod oporavka od operacija i opekotina, a preporuča se i za liječenje reuamtskog artritisa.

Svojstvo kompleksiranja cisteina s metalima se može iskoristiti u svrhu analitičkog određivanja cisteina raznim metodama. Elektrokemijske metode nude velik potencijal za elektroanalitičko određivanje. Cistein kao elektroaktivna vrsta podložan je oksidacijskim i redukcijskim procesima na čvrstofaznim elektrodama.

U radu su prikazani utjecaji različitih parametara (količina elektroaktivnog materijala, brzina posmika, različiti električni kontakti, frekvencija, anodna i katodna voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude) na elektroanalitički signal.

Cikličkom voltametrijom će se pratiti redoks potencijali različitih funkcionalnih skupina aminokiseline cisteina pri različitim pH vrijednostima i različitim koncentracijama cisteina u otopini.

1. OPĆI DIO

1.1. Elektrokemijske metode

Elektrokemija je dio znanosti posvećen razumijevanju posebnih vrsta fizikalnih i kemijskih pojava i 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 XX. st., J. O'M. Bockrisa, elektrokemija je područje znanosti koja opisuje stvaranje tvari pomoću elektriciteta i stvaranje elektriciteta trošenjem tvari. 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.[1]

Elektrokemijska ćelija je ključni instrument u kojem se provode elektroanalitička mjerenja, a sastoji se od posude koja sadrži otopinu (najčešće je to otopina elektrolita - ionski vodič) u koju su uronjene elektrode - elektronski vodiči. One imaju dvojaki karakter, jer na njima može nastati dana električna veličina, dok mogu služiti i za dovođenje iste iz vanjskog izvora.

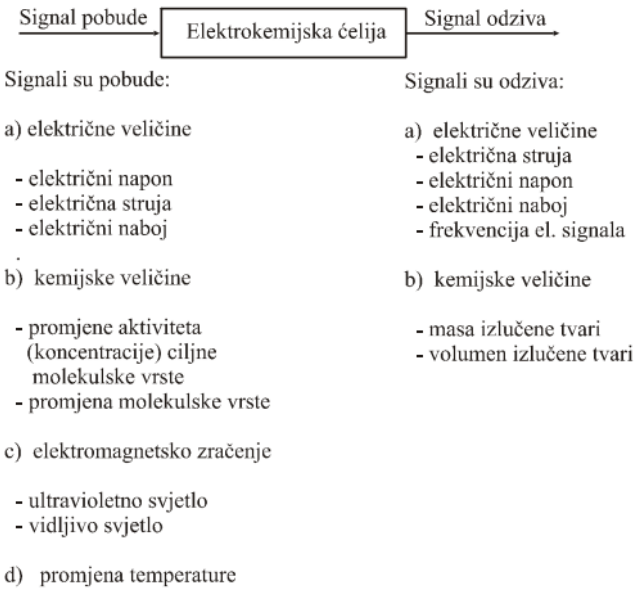
Elektroda ima ulogu senzora (osjetila) kada biva uronjena u otopinu, jer tada dolazi do elektrokemijske reakcije prilikom koje se promjena koncentracije kemijske vrste manifestira kao promjena razlike potencijala uspostavljene na dodirnoj površini elektroda-otopina. Pored toga, elektroda može biti sredstvo za dovođenje električne veličine koja uzrokuje promjene na dodirnoj površini elektroda-otopina. Kao produkt navedene promjene nastaje neka druga veličina koju mjerimo.[2]

Elektroanalitičke metode su skupina analitičkih postupaka i tehnika kojima informaciju, odnosno podatak o koncentraciji, aktivitetu ili nekom drugom podatku određivane kemijske vrste (atoma, iona ili molekule) dobivamo posredstvom međusobno razmjernih odnosno analognih električnih veličina, tj. s pomoću električnog napona, električne struje ili električnog naboja.[3]

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.



Slika 1. Načelo provedbe elektroanalitičke metode.[4]

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 kronoamperometrije, rezultirajuću električnu struju mjerimo kao funkciju vremena elektrolize, dok kod elektrogravimetrije mjerimo masu izlučene tvari na radnoj elektrodi. Mjerimo li količinu električnog naboja potrebnog za provođenje elektrolize, govorimo o kulometriji. I u ovoj metodi signal pobude može biti električna struja ili električni napon.

U većine elektroanalitičkih metoda mjereni podatak o svojstvima elektrolitne otopine dobivamo s 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.[3]

1.1.1. Voltametrija

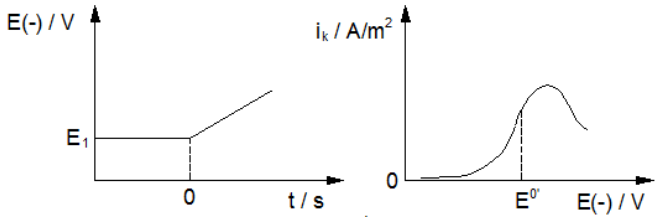
Voltametrija je zajednički naziv za niz elektrokemijskih metoda koje se zasnivaju na mjerenjima odnosa struje i potencijala kod elektrokemijskog procesa na radnoj elektrodi. Signal pobude je električni napon, a signal odziva je struja ćelije, a mjeri se kao funkcija narinutog napona.

1.1.2. 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.[5, 6]

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.

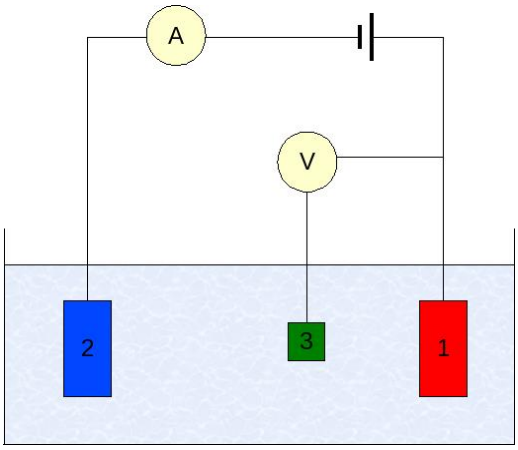


Slika 2. Signal pobude i signal odziva voltametrije.[3]

1.1.3. Ciklička voltametrija

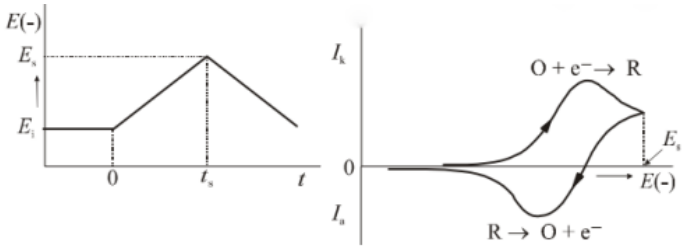
Kod cikličke voltametrije signal pobude (narinuti potencijal) određeno vrijeme linearno raste, te nakon što dosegne krajnju vrijednost promijeni se smjer potencijala. U oba smjera promjena potencijala je linearna. U ovim ciklusima moguće je elektrokemijski oksidirati ili reducirati produkte zbog čega je ciklička voltametrija naročito pogodna za istraživanja mehanizama elektrokemijskih reakcija.[5,6]

Grafički prikaz odziva cikličke voltametrije nazivamo cikličkim voltamogramom.[3]



Slika 3. Troelektrodna elektrolitička ćelija.

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



Slika 4. Signal pobude i signal odziva za cikličku voltametriju.[3]

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

Na Slici 4 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:

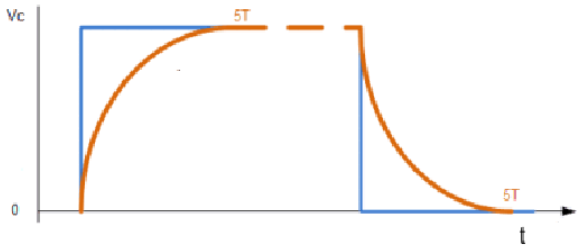
$$E = E_i - 2\,v\,t_s + v\,t \qquad (1)$$

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

1.1.4. Voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV)

Prema načinu mjerenja struje odziva slična je diferencijalnoj impulsnoj voltametriji, u kojoj se struja odziva mjeri kao razlika struje odziva prije i za vrijeme trajanja naponskog impulsa. U voltametriji s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude struja se mjeri pri kraju trajanja pozitivne i negativne poluperiode izmjeničnog pravokutnog impulsa. U metodi se zapisuje struja odziva kao razlika struja pri jednoj negativnoj odnosno drugoj pozitivnoj poluperiodi izmjeničnoga pravokutnog signala pobude za svaki pojedini ciklus pobude. Računalom vođene mjerne naprave omogućuju zapis struje odziva neovisno o tijeku pozitivnih odnosno negativnih poluperioda i njihove razlike (zbroja). Tako kao rezultat mjerenja imamo tri voltamograma na kojima je prikaz struje ćelije pri pozitivnoj poluperiodi pobude, negativnoj poluperiodi i njihova razlika.

Budući da se u voltametriji s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude struja odziva mjeri pri kraju trajanja pravokutnog impulsa jedne odnosno druge poluperiode izmjeničnog signala, odzivni signal sadrži samo komponentu faradajske struje, tj. struju koja se odnosi na redukciju i oksidaciju elektroaktivne vrste. Sadrži mali postotak kapacitivne komponente, odnosno struje koja se odnosi na nabijanja kondezatora dvostrukog sloja.

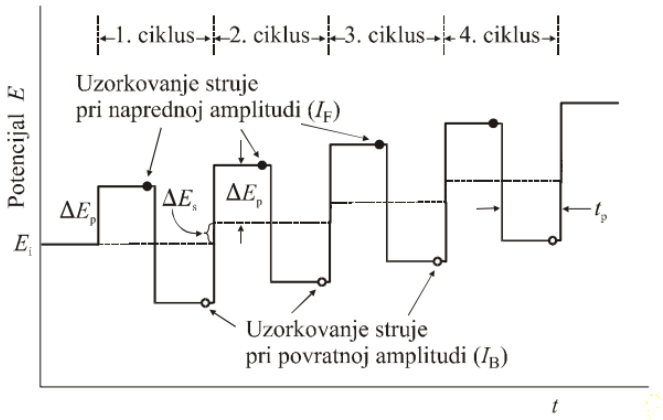


Slika 5. Ovisnost napona na kondezatoru o vremenu punjenja kondezatora.

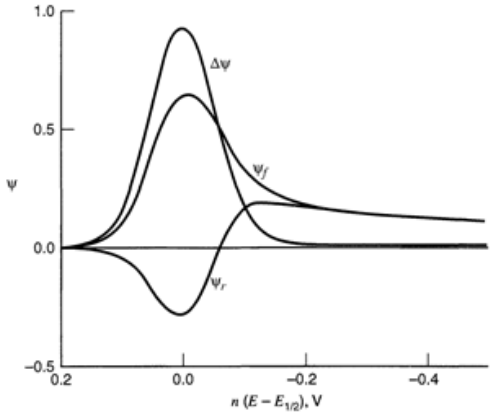
Pobudni signal u SWV, kako je prikazano na Slici 6, karakteriziran je amplitudom pravokutnog naponskog impulsa (ΔE_p) u odnosu na potencijal stube u stubastoj komponenti signala pobude te širinom odnosno trajanjem naponskog impulsa (t_p). Trajanje impulsa može se iskazati frekvencijom pravokutnog impulsnog signala $f = 1/2t_p$. Uobičajeno se rabe frekvencije pobude od 1 do 500 Hz.

Posmik pobudnog signala započinje pri izabranom početnom potencijalu (E_i) i stubasto raste brzinom posmika $v = \Delta E_s / 2t_p = f \Delta E_s$. Preporučene vrijednosti visina stube u signalu pobude $\Delta E_s = 10/z$ mV i amplitude pravokutnog impulsa $\Delta E_p = 10/z$ mV.

Činimo li mjerenje voltamograma u naponskom okviru od 1 V, onda, uz $\Delta E_s = 10$ mV i frekvenciju pravokutne impulsne komponente u signalu pobude od 1 do 500 Hz, trajanje mjerenja cijelog voltamograma jest u granicama od 100 do 0,5 sekunda, što je usporedivo s vremenom mjerenja u brzoj cikličkoj voltametriji.



Slika 6. Oblik naponskog signala pobude u voltametriji s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude. Možemo ga predočiti kao stubasto rastući napon (u svakom ciklusu za ΔE_s) na koji je superponiran izmjenični naponski pravokutni izmjenični naponski pravokutni izmjenični naponski impuls amplitude ΔE_p.[4]



Slika 7. Profil parcijalne redukcijske i oksidacijske struje te rezultantna struja za pravokutni izmjenični signal pobude.

1.2. Biološki aktivni tioli

Tioli su organosumporni spojevi koji u svojoj strukturi sadrže sulfhidrilnu (-SH) skupinu. Dakle, riječ je o sumporovim analozima alkohola (sumpor zauzima mjesto atoma kisika u hidroksilnoj skupini alkohola). Pri imenovanju spojeva po IUPAC-ovoj nomenklaturi kao sufiks se koristi oznaka tiol, a kao prefiks merkapto.[7]

1.2.1. Fizikalna svojstva

Mnogi tiolni spojevi imaju izražen i odbojan miris koji podsjeća na miris češnjaka ili pokvarenih jaja. Tioli i alkoholi imaju sličnu molekulsku strukturu. Duljina C-S veze je 180 pm, a C-S-H kut je oko 90°. Uslijed male razlike u elektronegativnosti između sumpora i vodika, S-H veza je manje polarna nego hidroksilna grupa te tioli imaju manje dipolne momente od odgovarajućih alkohola. Kao rezultat toga, tiolni spojevi imaju niža vrelišta i manju topljivost u vodi i drugim polarnim otapalima od alkohola slične molekulske mase.

1.2.2. Uloge i važnost kod čovjeka

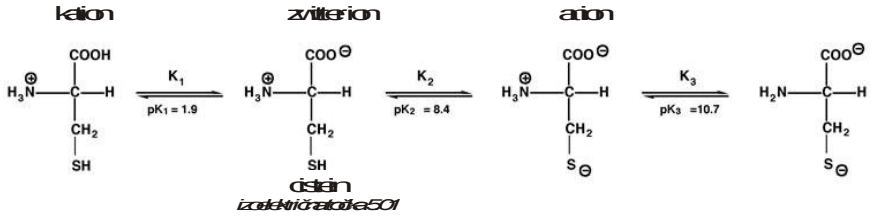
Sulfhidrilna skupina tiolima daje postojan i izrazito neugodan miris koji podsjeća na miris pokvarenih jaja. U prirodi pronalazimo mnoštvo primjera koji ukazuju na snažna mirisna svojstva tiola. Oni su odgovorni za miris koji tvor ispušta u samobrani. Tvorov sekret, žućkasto ulje stvoreno u specijalnim žlijezdama koje se nalazi podno repa, sadržava (E)-2-buten-1-tiol i 3-metil-1-butantiol, kao i tiol-acetatne derivate.

Miris je toliko intezivan da koncentracija od tek 10 ppb uzrokuje neugodne kontrakcije u ljudskom nosu. Također, tioli su odgovorni za miris povezan s nadutošću i lošim zadahom kod ljudi. No, aromatska svojstva tiola nisu nužno neugodna. Primjerice, grejpfrut sadržava tioterpineol koji mu daje prepoznatljiv miris, a pronalazimo ih u luku i češnjaku. Spremnost tiola da se vezuju s proteinima koji se nalaze u ljudskoj koži je razlog zadržavanja mirisa luka i češnjaka na rukama nakon njihove obrade.[8] Aromatska svojstva tiola su omogućila njihovu prijemjenjivost i u industriji. U prirodni plin, koji koristimo u kućanstvu, se dodaje kao sigurnosni agens. Naime, smjesa plinova propan/butan je bez boje, mirisa i okusa stoga bi njegovo istjecanje moglo proći neopaženo i imati fatalne posljedice. Dodatak tiola neugodna mirisa osigurava opažanje istjecanja plina.

Najvažniji tioli u ljudskom organizmu su aminokiseline cistein i njen oksidirani oblik cistin, zatim homocistein, te tripeptid glutation. To su antioksidansi sposobni inaktivirati slobodne radikale koji su uzročnici mnogih staničnih oštećenja. Cistein i cistin tvore kolagen koji koži daje elastičnost i teksturu, a tvore i alfakeratin noktiju i kose. Kosa i koža su sastavljeni od 10-14 % cisteina što ga čini važnim kod oporavka od operacija i opekotina, a preporuča se i za liječenje reuamtskog artritisa. Tioli pomažu detoksikaciji i zaštiti tijela od zračenja te se, uz kemoterapije i zračenja, koriste u liječenju raka.

1.2.3. Izoelektrična točka

α-COOH, α-NH_2 i α-SH u tiolima imaju mogućnost ioniziranja (protoniranje ili deprotoniranje). Kao rezultat ionizacije proizlaze sljedeće reakcije u različitim pH područjima:



Slika 8. Ionizacija funkcionalnih skupina u molekuli cisteina u ovisnosti o pH.

Izoelektrična točka je pH na kojoj je naboj molekule jednak nuli stoga aminokiseline ne putuju prema elektrodama pod utjecajem električnog polja.

Pri neutralnom pH (oko 7,4) aminokiseline su u otopini pretežno dvopolni ioni (Zwitter-ioni), neutralne molekule s jednim pozitivnim i jednim negativnim električnim nabojem, gdje je α-amino skupina protonirana (-NH_3^+), a karboksilna skupina je disocirana (-COO^-). pH na kojoj se uočava ovakav oblik aminokiseline nazivamo izoelektrična točka, pI.[9]

Kao tipična organska kiselina, amino, karboksilna i tiolna skupina u aminokiselini mogu se definirati preko svojih konstanti disocijacije kiseline K_a ili češće negativnim logaritmom K_a, pK_a. Naboj bilo koje aminokiseline, peptida ili proteina, ovisit će o pH okoline.

1.2.4. Stabilnost tiola u prisutnosti kisika

Reakcija kisika s tiolnim spojevima u vodenim otopinama može se prikazati sljedećim reakcijama:

$$2RSH + O_2 \rightarrow RSSR + H_2O_2$$
$$4RSH + O_2 \rightarrow 2RSSR + H_2O$$

Uočavamo da reakcijama nastaje disulfid (dvije molekule tiola povezane disulfidnim mostom) te vodikov peroksid ili voda. No, poznato je da oksidacija tiolnih spojeva može dati produkte koji, ovisno o uvjetima reakcije, sadrže atom sumpora u različitm oksidacijskim stanjima.

U blagom pH području (pH od 7 do 9) tiolni spojevi se oksidiraju uz pomoć kisika do disulfida, dok u izrazito bazičnom području (pH=12) tiolni spojevi oksidiraju do sulfinske (RSO_2H) i sulfonske (RSO_3H) kiseline.

Samooksidacija tiola je bitna zbog problema određivanja njegove koncentracije jer se, u prisutstvu kisika, koncentracija tiola mijenja s vremenom. Stoga je bitno istjerati kisik (propuhivanjem s dušikom ili nekim drugim inertnim plinom) iz otopina u kojima se žele određivati tiolni spojevi odmah nakon uzorkovanja.[10]

1.2.5. Tehnike određivanja bioloških tiola (cistein)

- Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)
- Fluorescencija
- Kapilarna elektroforeza (CE)
- UV/Vis
- Elektrokemijsko određivanje [11]

HPLC je oblik kromatografije na stupcu, a koristi se za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. Princip rada je forsiranje prolaska analizirane tvari ili smjese kroz stupac pumpanjem mobilne faze pod visokim tlakom kroz stupac. Uglavnom se koristi kromatografija na obrnutim fazama, odnosno nepolarna stacionarna faza (silikatna) i polarna mobilna faza.[12]

FLUORESCENCIJA ili luminiscencija je zračenje svjetlosti iz tvari za vrijeme ozračivanja elektronskim, rendgenskim ili ultraljubičastim zračenjem. Fluorescenciju pokazuju samo određeni materijali. Najčešća fluorescentna tvar je kalcijev fluorofosfat jer pobuđen ultraljubičastim zračenjem zrači u vidljivome području. Fluorescencija traje reda veličine nanosekunde.[13]

KAPILARNA ELEKTROFOREZA omogućava separaciju mnogih vrsta analita baziranih na njihovoj pokretljivošću u elektromagnetskom polju. Promatrani uzorak se može razdvajati na bazi različite polarnosti i različitog odnosa mase i naboja, a može se razdvajati i zbog razlike u izoelektričnim točkama analita te elektroforeze preko gela gdje molekule prolaze kroz gel i tako se razdvajaju zbog različite veličine.[14]

UV/Vis spektar (190 nm do 800 nm) daje informaciju o konjugaciji u spoju, prisutnosti kromofora ili pojedinim strukturnim fragmentima. Vidljiva svjetlost je dio elektromagnetskog zračenja koje je vidljivo ljudskom oku. Da bi ljudskom oku neka tvar izgledala obojeno, mora se apsorbirati u vidljivom području elektromagnetskog spektra. Ljudsko oko od one boje koja se apsorbira vidi komplementarnu. UV zračenje se dijeli na UVA, B i C. UVC zrake ne prodiru do površine Zemlje dok UVA i B prodiru kroz vanjski sloj kože i izazivaju oštečenja.[15]

1.3. Uporaba elektrokemijskih metoda za određivanje tiola

1.3.1. Problemi vezani za elektrokemijske metode

Glavni problem vezan za direktnu elektrokemijsku detekciju tiola je visoki prenapon potreban za oksidaciju tiolne (-SH) skupine na većini elektroda. U ovom kontekstu treba naglasiti velika ograničenja vezana za ove elektrode koja se tiču selektivnosti, reproducibilnosti i nepotpunosti reakcije na površini elektrode, što za posljedicu ima nestabilnost i slabu osjetljivost odziva prema tiolima. Kao rješenje nude se kemijski modificirane elektrode. Kao modifikatori koriste se ciklički ligandi, ftalocijanini, organski medijatori ili enzimi. Modifikatori se mogu imobilizirati na elektrodnu površinu ili se jednostavno dodaju ispitanoj otopini. Za površinsku modifikaciju koriste se različiti spojevi koji ubrzavaju prijenos elektrona između elektroda i elektroaktivnih vrsta u otopini.[16]

Elektrode korištene za elektrokemijsko određivanje tiola su uglavnom temeljene na modifikaciji različitih ugljikovih materijala, primjerice elektrode od staklastog ugljika (GCE), ugljikove paste (CPE), s pirolitičkim ugljikovim filmom (PCFE), keramičke ugljikove elektrode i sl. No, u širokoj upotrebi su i kapajuća živina elektroda (HMDE), kositrov (IV) oksid elektrode, Pt i Au elektrode, bakrena disk elektroda i sl.

Od korištenih modifikatora izrazito su zastupljene ugljikove nanocijevi, bilo jednozidne ili višezidne (SWCNT i MWCNT). One, zahvaljući svojoj građi, povećavaju reaktivnu površinu elektrode. U upotrebi su i metalni ftalocijanini (CoPc, FePc, NiPc, CuPc), nanočestice TiO_2, Pt, Ni, nanokompoziti, koenzim PQQ, organometalni spojevi (2,7 bis(ferocenil-etil)fluoren-9-on), salofenski kompleksi (kobaltov (III) perklorat), nitroprusidi (Fe(II) NP) i sl.[17]

1.4. Uporaba elektroda od ugljikove paste (CPE)[18]

Ugljikova pasta je smjesa ugljikova praha (grafita) i prikladnog veziva (″ljepljenje tekućine″) koji tvori poseban tip ugljikovih elektroda. Funkcija čestica grafita je osigurati električki vodljivu površinu. Ipak, zbog prisutnosti tekućeg veziva i zbog njegove interakcije s grafitnim česticama, ugljikove paste se obično javljaju kao specifični elektrodni materijal s brojnim jedinstvenim svojstvima. Novije definicije klacificiraju ugljikove elektrode među heterogenim elektrodama. Takva definicija obuhvaća gotovo sve vrste elektroda na osnovi ugljika.

Ugljikov atom predstavlja odgovarajući materijal za elektrodu dok se izolacijsko vezivo smatra pomoćnim medijem koji fiksira pojedinačne grafitne čestice u veću ili manju kompaktnu smjesu. Grafitne čestice ne bi trebale imati adsorptivna svojstva (većina grafitnih prašaka proizvedenih suvremenom tehnologijom pokazuju zadovoljavajuće nisku razinu adsorpcijske sposobnosti). Veliki problem pri primjeni CPE je prisutnost kisika u porama grafita koji se dodatno apsorbira za vrijeme miješanja paste.

Osnovni zahtjevi za vezivne tekućine su:

- netopljivost u mjernoj otopini (obično vodena) kako bi se spriječilo raspadanje elektrodnog materijala
- niski tlak pare kako bi se osigurala mehanička stabilnost elektrodnog sustava tijekom duljeg vremenskog razdoblja
- elektrokemijska neaktivnost radi spriječavanja visokih pozadinskih struja i mijenjanja sastava materijala

Uobičajene tekućine koje se upotrebljavaju pri izadi CPE:

- parafinsko ulje
- silicijsko ulje
- brom – naftalen

Za optimalna svojstva CPE najvažniji je omjer između ugljika i veziva. Čestice ugljika su odgovorne za električnu vodljivost, izravno su izložene otopini te u nekim slučajevima predstavljaju centre na kojima se odvija elektrokemijska aktivnost.

Ugljikove elektrode se mogu podijeliti prema:

a) fizikalno - kemijskom svojstvu veziva:

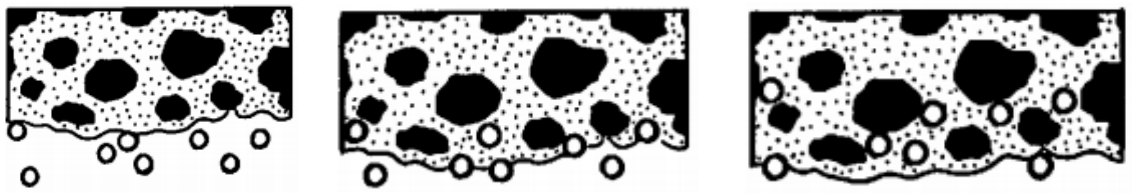
1) klasična CPE: napravljena od grafitnog praha i inertnih tekućih veziva. Ova vrsta CPE je najčešće korištena što predstavlja 70 - 80% svih elektroda utemeljenih na ugljikovim pastama.

2) vezivna CPE s elektroaktivnim vezivom: smjesa u kojima je anorganski elektrolit vezujuća tekućina nao npr. koncentrirana otopina mineralnih kiselina ili alkalnih hidroksida.

b) s obzirom na prirodu (viskoznost) veziva, mogu se razlikovati:

1) ″Dry″ili ″Wet″ CPE: takve vezivne mješavine ugljikovih pasta se značajno razlikuju po sadržaju veziva i odnosu omjera ljepljenja tekućine.

2) čvrste CPE: se sastoje od ugljika te vezujuće smjese u kojoj je vezivo tvar koja se lako može rastopiti kao npr. fenantren ili parafinsko ulje. Miješanjem na određenoj temperaturi vezivo se rastopi i smjesa mora zadržati svoj oblik. Nakon hlađenja, dobije se gusta masa koja se može upotrijebiti slično kao klasična pasta veće konzistencije. Pasta može biti napravljena i kombinacijom ugljika sa silikonskom gumom viskoznih silikonskih masti ili propilena.



Slika 9. Interakcija elektroaktivnih čestica na elektrodama od ugljikove paste.[18]

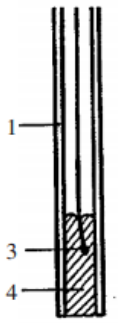
c) klasifikacija elektroda i senzora koja se oslanja na činjenicu da su modificirane ili ne
1) neizmjenjeni CPE: ove elektrode se sastoje od binarne paste ugljika tj. od mješavine grafitnog praha i veziva

2) modificirani CPE: binarni ugljik – vezujuća mješavina u kojima je dodano jedan ili više modifikatora.

Vijek trajanja ugljikovih pasta pripremljenih od hlapljivih vezivnih tekućina je prilično ograničen. Zbog sporog isparavanja veziva, odgovarajuće mješavine ugljikovih pasta postaju osušene što je popraćeno, osim vidljivim promjenama u konzistenciji, i nepovratnim fizikalno - kemijskim i elektrokemijskim svojstvima. CPE na bazi organskih fosfata, mineralnih i silokonskih ulja mogu ispariti iz paste, unatoč njihovoj relativno visokoj viskoznosti, tijekom jednog ili dva tjedna osim ako se ne pohrane na hladno i mračno mjesto. Dugoročno skladištenje ugljikovih pasta nije praktično jer je životni vijek prilično ograničen čak i ako su pakirane u čvrsto zatvorene posude. Često dolazi do starenja s nepedvidivim promjenama ponašanja. Stoga je bolje pripremiti upravo onoliku količinu paste koja se odmah može koristiti za eksperiment. Ako je smjesa ispravno napravljena može se upotrebljavati tjedan dana intezivnog mjerenja.

Optimalan omjer za pripravu smjese varira u intervalima od 1 g praha do 0,4 - 1 cm^3 tekućine. Neke mješavine mogu sadržavati čak veću količinu vezivne tekućine jer rezultirajući omjer dviju glavnih komponenti ovisi i o njihovom međusobnom prianjanju. Potrebno je dobiti i određenu kompaktnost. Rezultirajuća smjesa ne smije biti ni previše tvrda, ni previše mekana ni ljepljiva. Pasta se priprema ručnim miješanjem grafitnog praha i tekućeg veziva korištenjem običnog laboratorijskog posuđa kao što su tarionik i tučak.

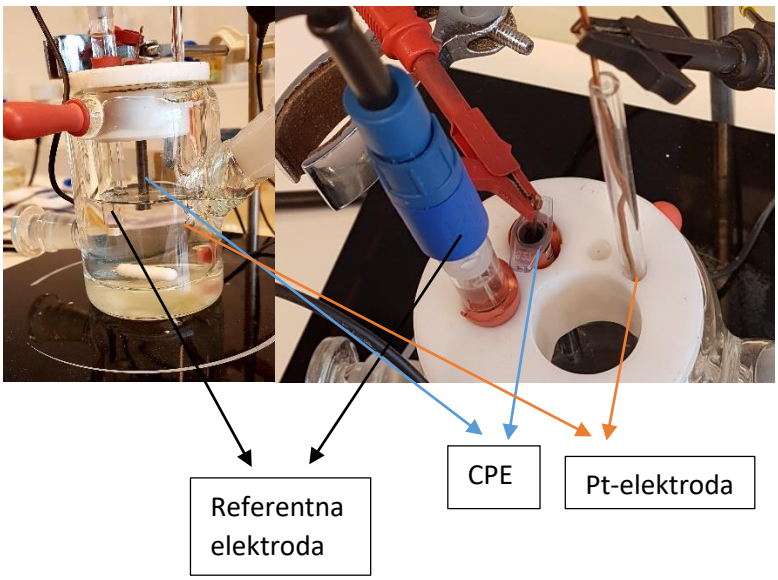
Cijevi i štapići sa šupljinama vrlo jednostavne konstrukcije mogu se napraviti u svakom laboratoriju i često oni predstavljaju najjednostavnije rješenje za dobivanje elektroda za povremena mjerenja.[18]



Slika 10. Osnovna konstrukcija elektrode.

1 - cijev, 3 - kontakt, 4 - pasta

Na Slici 10 vidimo da se elektroda sastoji od staklene cijevi određenog promjera djelomično ispunjena ugljikovom pastom u koju je uronjen kontakt. Umjesto stakla mogu se koristiti plastični materijali kao što su male šprice, pipete ili mikropipete.



Slika 11. Izgled elektrokemijske čelije.

1.5. Određivanje tiola s elektroda ugljikove paste[17]

Tablica 1. Metode korištene za određivanje homocisteina (HCys)

Metoda	**Modifikacija**	**pH**	**Potencijal određivanja (E/V)**	**Područje određivanja (mol/dm^3)**	**Granica određivanja (mol/dm^3)**	**Određivano u prisustvu**
CV	kositrov(IV) oksid elektrode modificirane fluorom (FTO)	3,4	0,280 vs. Ag/AgCl	$1{,}0 \times 10^{-4}$ - $1{,}0\times 10^{-3}$	-	Cys, NCys
CV	GC elektroda modificirana s SWCNT i PQQ	7,5	0,270 vs. Ag/AgCl	$1{,}0 \times 10^{-6}$ – $1{,}0 \times 10^{-3}$	$1{,}0 \times 10^{-7}$	GSH, Cys
voltametrija	Au elektroda s mono-slojevima Co	7,0	0,059 vs. Ag/AgCl	$1{,}0 \times 10^{-7}$ – $1{,}0 \times 10^{-1}$	-	Cys, NCys, GSH
separacija elektroforezom / amperometrijska detekcija	grafitna elektroda modificirana koenzimom PQQ u polipirolnoj (PPy) matrici	-	-	$1{,}0 \times 10^{-6}$ - $1{,}0 \times 10^{-4}$	$1{,}0 \times 10^{-7}$	Cys, NCys, GSH

CV *– ciklička voltametrija*

Tablica 2. Metode korištene za određivanje *N*-acetilcisteina (NAC)

Metoda	**pH**	**Potencijal određivanja (E/V)**	**Područje određivanja (mol/dm^3)**	**Granica određivanja (mol/dm^3)**	**Određivano u prisustvu**
SWV	7,0	-	$5,0 \times 10^{-8}$ – $3,35 \times 10^{-4}$	$3,5 \times 10^{-8}$	folna kiselina
CV	7,0	0,950 vs. Ag/AgCl	$4,0 \times 10^{-7}$ – $9,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-7}$	izoproterenol, acetamonifen
CV	7,0	0,760 vs. ZKE	$1,0 \times 10^{-5}$ – $7,0 \times 10^{-4}$	$6,96 \times 10^{-5}$	-

TiPhCuHCF – *titanijev (IV) fosfat – bakar heksacijanoferat kompozit;* ***CV–*** *ciklička voltametrija;* ***SWV*** *– pravokutnovalna voltametrija ;* ***ZKE –*** *zasićena kalomel elektroda*

Tablica 3. Metoda korištena za određivanje glutationa (GSH)

Metoda	**Modifikacija**	**pH**	**Potencijal određivanja (E/V)**	**Područje određivanja (mol/dm^3)**	**Granica određivanja (mol/dm^3)**	**Određivano u prisustvu**
kronopo-tenciome-trija	bakrena disk elektroda modificirana CuQc-polipirol kompozitom	-	0,800 vs. Ag/AgCl	$1,0 \times 10^{-6}$ – $1,0 \times 10^{-4}$	$2,6 \times 10^{-7}$	-
CV	BPPG elektroda modificirana željezovim(III) tetra-(N-metil-4-piridil)-porhirinom (FeT4MPyP) adsorbiranim na MWCNTs	7,4	0,000 vs. Ag/AgCl	$5,0 \times 10^{-6}$ – $5,0 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-7}$	-
HPLC/vol-tametrija	LC 18-DB stupac / CPE	-	0,450	-	0,60 ng	GSSG

HPLC *– visokotlačna plinska kromatografija;* ***CV*** *– ciklička voltametrija*

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Priprava elektrodnog materijala

Za pripravu elektroaktivnih materijala simultanim taloženjem bakrova(II) sulfida i srebrova(II) sulfida korištena su tri reagensa: bakrov(II) nitrat ($Cu(NO)_3$ x $3H_2O$), srebrov nitrat ($AgNO_3$) te natrijev sulfid (Na_2S x $9H_2O$). Molni omjeri metalne sol/sulfid korišteni pri pripravi ovih elektroaktivnih materijala prikazani su u tablici:

Tablica 4. Molni omjer metalnih soli i S^{2-}

elektroda	**molni omjer** $(Cu^{2+};Ag^{+}):S^{2-}$	**mol** $Cu^{2+};Ag^{+}$	S^{2-}
A	1:0,5	0,02;0,04	0,02
B	1:1	0,02;0,04	0,04
C	1:1,8	0,02;0,04	0,072

2.1.1. Sastav ugljikove paste

Tablica 5. Priprava paste

elektroaktivni materijal	**w(%)**	**mg**	**ugljik (g)**	**parafinsko ulje (µL)**
A B C	0	0	1	400
A B C	5	50		300
A B C	10	100		400 300 300
A B C	20	200		400 400 300

2.2. Priprava otopina

Za pripravu otopina koje su bile potrebne za eksperiment korištene su sljedeće kemikalije:

Tablica 6. Kemikalije korištene za pripravu eksperimentalnih otopina

kemikalija	molekulska formula	dobavljač
bakrov(II) nitrat trihidrat	$Cu(NO_3)_2$ x $3H_2O$	p.a. "Kemika", Zagreb
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
natrijev hidrogenfosfat	Na_2HPO_4	p.a. "Kemika", Zagreb
cistein	$C_3H_7NO_2S$	p.a. Merck, SAD
octena kiselina	CH_3COOH	p.a. "Kemika", Zagreb
natrijev sulfid hidrat	Na_2S x $9H_2O$	p.a. "Kemika", Zagreb
olovljev nitrat	$Pb(NO_3)_2$	p.a. "Kemika", Zagreb

2.2.1. Priprava otopine $Cu(NO_3)_2$

Otopina bakrovog(II) nitrata, koncentracije 0,1 mol dm^{-3}, pripravljena je otapanjem 1,208 g bakrovog(II) nitrata trihidrata ($Cu(NO)_3$ x $3H_2O$), u destiliranoj vodi razrjeđenjem na konačni volumen od 50 cm^3.

2.2.2. Priprava otopine KNO_3

20,22 g kalijevog nitrata otopljeno je u destiliranoj vodi razrijeđenjem na konačni volumen od 1 dm^3. Koncentracija ove otopine je bila 0,1 mol dm^{-3}.

2.2.3. Priprava otopine Na_2HPO_4

Za pripravu 0,1 mol dm^{-3} otopine Na_2HPO_4 odvaže se 1,42 g Na_2HPO_4 te otopi u 100 cm^3 destilirane vode.

2.2.4. Priprava otopine CH_3COONa

0,82 g CH_3COONa se odvaže i prenese u odmjernu tikvicu od 100 cm^3 te se otopi destiliranom vodom do oznake. Ovako pripravljena otopina ima koncentraciju $c(CH_3COONa) = 0,1$ mol dm^{-3}.

2.2.5. Priprava otopine cisteina

Otopina cisteina, koncentracije c(cistein) = 0,1 mol dm^{-3}, pripravljena je otapanjem 0,121 g cisteina u odmjernoj tikvici od 10 cm^3 s destiliranom vodom te nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Voda je prethodno propuhivana dušikom u svrhu istjerivanja kisika.

2.2.6. Priprava otopine acetatnog pufera; pH 5 i koncentracije 0,1 mol dm^{-3}

Dodavanjem 0,1 mol dm^{-3} otopine CH_3COONa u otopinu CH_3COOH (c = 0,1 mol dm^{-3}, pH = 2) prilagođava se pH do željene vrijednosti (pH = 5). Ovo dodavanje se vrši uz stalno praćenje pH vrijednosti pH-metrom.

2.2.7. Priprava otopine fosfatnog pufera; pH 7 i koncentracije 0,1 mol dm^{-3}

Dodavanjem koncentrirane otopine H_3PO_4 u otopinu Na_2HPO_4 (c = 0,1 mol dm^{-3}, pH = 9) prilagođava se pH do željene vrijednosti (pH = 7). Ovo dodavanje se vrši uz stalno praćenje pH vrijednosti pH-metrom.

2.2.8. Priprava zasićene otopine natrijevog sulfida (Na_2S)

Natrijev sulfid hidrat ($Na_2S \times 9H_2O$) smo otopili u 150 cm^3 vode do zasićenja.

2.2.9. Priprava otopine $Pb(NO_3)_2$

6,04 g $Pb(NO_3)_2$ se odvaže i prenese u odmjernu tikvicu od 250 cm^3 te se otopi destiliranom vodom do oznake. Ovako pripravljena otopina ima koncentraciju $c(Pb^{2+})$ = 0,1 mol dm^{-3}.

2.2.10. Priprava osnovnog elektrolita

Osnovni elektrolit je pripravljen miješanjem 90 cm^3 0,1 mol dm^{-3} KNO_3 i 10 cm^3 0,1 mol dm^{-3} odgovarajućeg pufera.

2.3. Aparatura i elektrodni materijal

2.3.1. 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).

2.3.2. Priprava radnih elektroda

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-nCPE). Kada se u takvu smjesu dodaje određena količina elektroaktivnih materijala (ternarnih sulfida) u tom se slučaju radi o modificiranim elektrodama od ugljikove paste -mCPE.

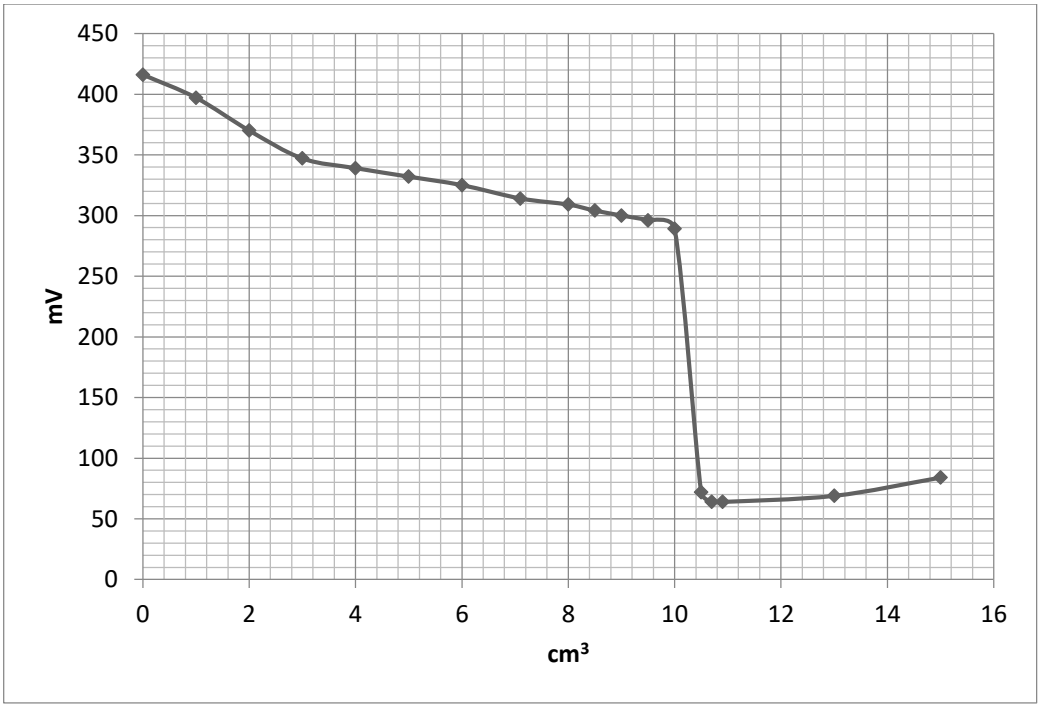
Pasta je pripravljena miješanjem ugljika i elektroaktivnog materijala u tarioniku. Nakon što se smjesa homogenizirala u nju je dodavano parafinsko ulje do postizanja zadovoljavajuće konzistencije. Dobivena smjesa ne smije biti ni previše tvrda, ni tekuća, ni ljepljiva, odnosno s tučka se treba lagano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

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Standardizacija zasićene otopine Na_2S s $Pb(NO_3)_2$

Za određivanje koncentracije S^{2-} korištena je standardna otopina $Pb(NO_3)_2$. Na Slici 1 je prikazana krivulja titracije Na_2S s $Pb(NO_3)_2$ koncentracije $c(Pb(NO_3)_2)$ = 0,1 mol dm^{-3}.



Slika 1. Standardizacija 1 cm^3 zasićene otopine Na_2S s 0,1 mol dm^{-3} otopinom $Pb(NO_3)_2$.

$$Pb^{2+} + S^{2-} \rightarrow PbS \qquad K_{pt} = 1 \times 10^{-28}$$

$n(Pb^{2+}) = c \times V = 0{,}1 \text{ mol dm}^{-3} \times 0{,}015 \text{ L} = 1{,}5 \times 10^{-3} \text{ mol}$

$n(Pb^{2+}) = n(S^{2-})$

$n(S^{2-}) = 1{,}5 \times 10^{-3} \text{ mol}$

$V = 1 \text{ dm}^3$

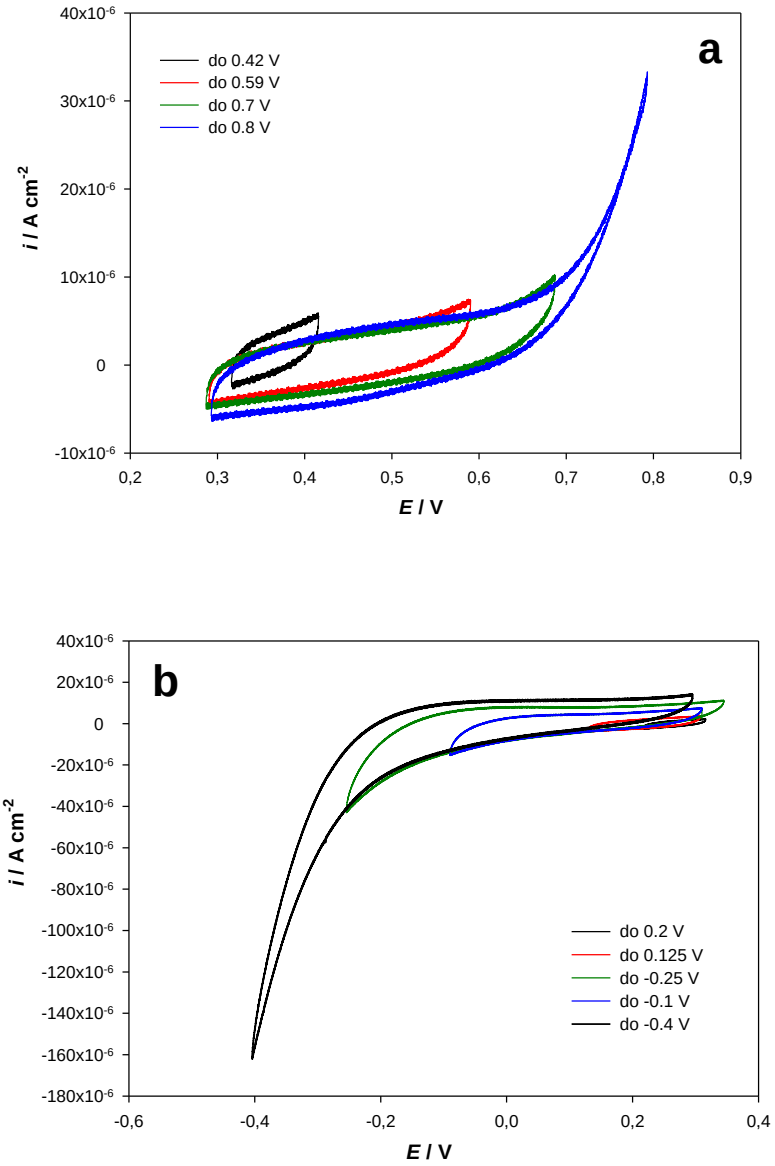
$c(S^{2-}) = n / V = 1{,}5 \times 10^{-3} \text{ mol} / 1 \times 10^{-3} \text{ dm}^3 = 1{,}5 \text{ mol dm}^{-3}$

Koncentracija pripravljene otopine natrijevog sulfida iznosi 1,5 mol dm^{-3}

3.2. Elektrokemijsko ponašanje nCPE (nemodificirane CPE) pri pH=5

Preliminarna elektrokemijska istraživanja su usmjerena na utvrđivanje ponašanja same matrice tj. nemodificirane elektrode od ugljikove paste (nCPE). U ovu svrhu rađena su voltamogramska mjerenja u različitom području potencijala te je ispitivan utjecaj različitih komponenti u otopini na cikličke voltamograme (CV) nCPE. U ovom radu, snimanje cikličkih voltamograma je rađeno s brzinom posmika od 25 mV s^{-1}, ukoliko to nije drugačije naglašeno.

3.2.1. Utjecaj pomaka anodne i katodne granice na nCPE pri pH=5



Slika 2. Utjecaj pomaka anodne (a) i katodne (b) granice na cikličke voltamograme nCPE u osnovnom elektrolitu (pri pH=5).

Na Slici 2, prikazani su CV snimljeni pri različitim katodnim i anodnim granicama počevši od potencijala otvorenog strujnog kruga. Snimljeni CV otkrivaju značajnije katodno izlučivanje vodika (Slika 2b) (HER-hydrogen evolution reaction) prema jednadžbi (1) već od -0,2 V prema Ag/AgCl.

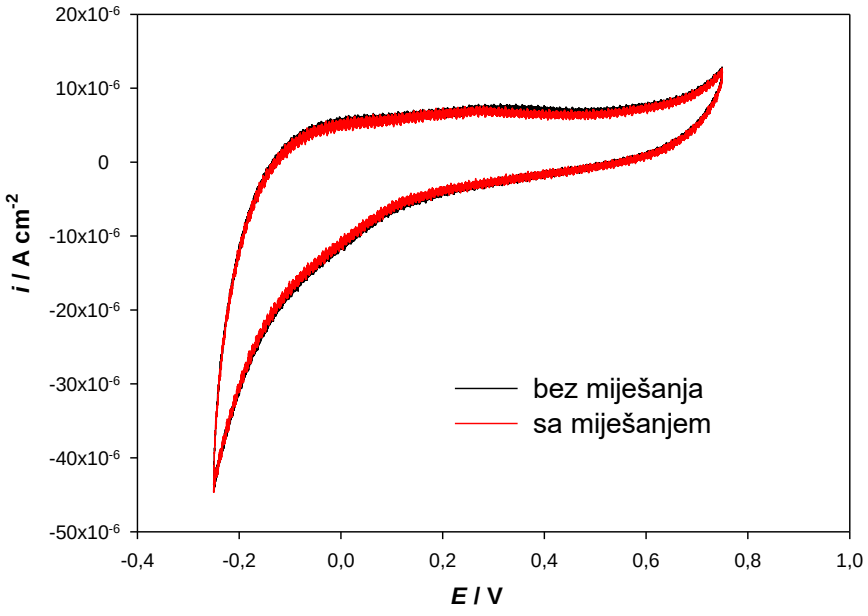
$$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2 \qquad (1)$$

Anodno izlučivanje kisika (OER-oxygen evolution reaction) prema jednadžbi (2) se može uočiti na potencijalima višim od +0,7 V, što je i vidljivo iz Slike 2a.

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

Na osnovu dobivenih CV, za maksimalno područje ispitivanja elektrokemijskog ponašanja cisteina na elektrodama od ugljikove paste, bez značajnijih interferencija HER i OER, odabrano je područje od -0,25 V do +0,75 V (u acetatnom puferu pri pH 5). Sva mjerenja u ovom radu, a koja su vršena pri ovom pH, vršena su u ovim granicama potencijala.

3.2.2. Utjecaj miješanja na CV

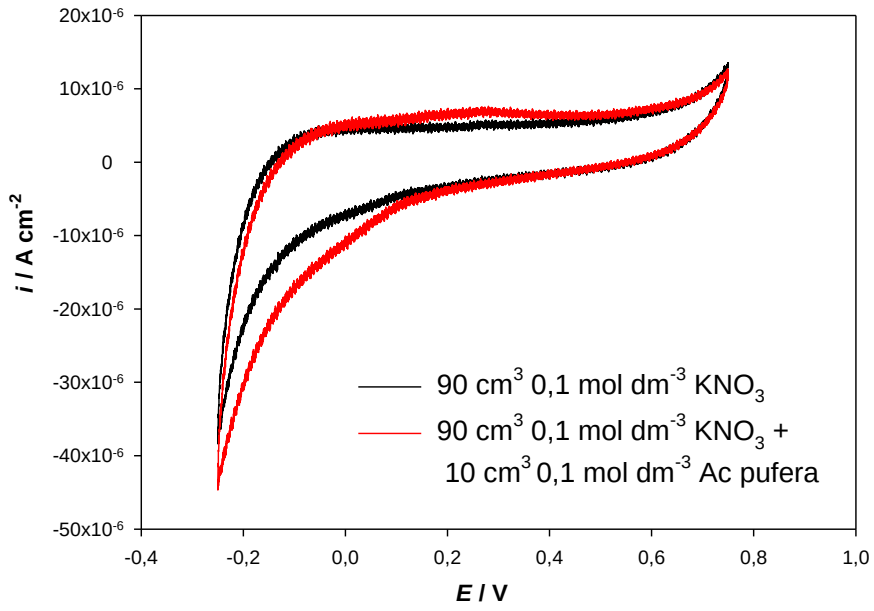


Slika 3. Utjecaj miješanja na CV nCPE u osnovnom elektrolitu (pri pH=5).

Nadalje, poznato je da i miješanje može značajnije utjecati na izgled CV zbog poboljšanog transporta elektroaktivnih vrsta na površinu elektrode (difuzija). Utjecaj miješanja na CV nCPE je prikazan na Slici 3. Kao što se može primijetiti, nema značajnijeg utjecaja kada su mjerenja obavljena s miješanjem otopine (200 rpm), osim blago nestabilnijeg signala. Budući da su mjerenja usmjerena na elektrokatalitičke reakcije otopljenih vrsta, sva mjerenja će se vršiti u miješanim otopinama pri 200 okretaja u sekundi s magnetnim miješalom.

3.2.3. Utjecaj dodatka pufera na CV nCPE

Utjecaj pufera na CV nemodificirane elektrode od ugljikove paste (nCPE) je prikazan na Slici 4.



Slika 4. Utjecaj dodatka acetatnog pufera (pH=5) na ciklički voltamogram nCPE.

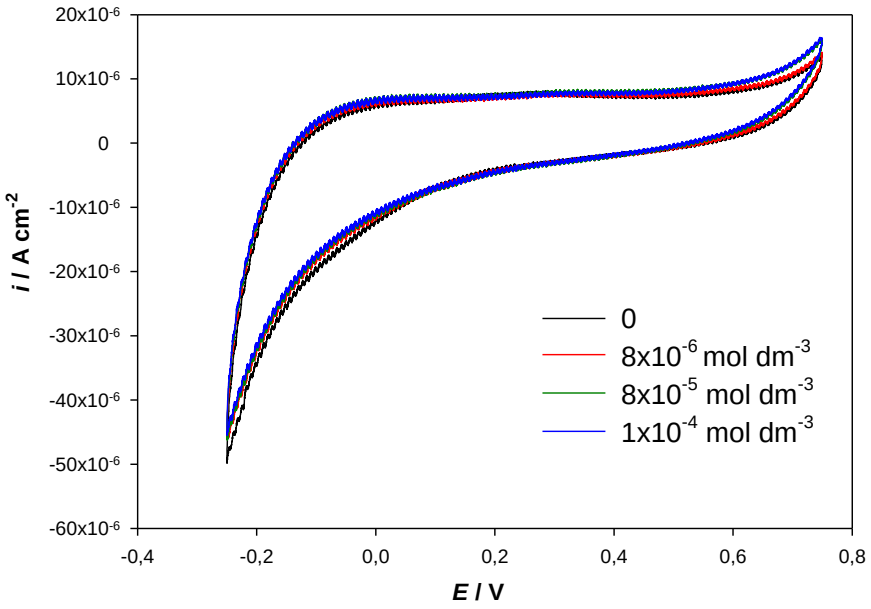
CV ne otkrivaju značajnije promijene u slučaju prisutnosti acetatnog pufera. Ono što se može zamijetiti je manji prenapon i veće struje za reakciju (1), kao i pojava blagog oksidacijskog pika na oko +0,3 V. Olakšano izlučivanje vodika je i očekivano u slučaju prisutnosti acetatnog pufera pri pH 5, nego li pri pH 7 (u čistom kalijevom nitratu). Oksidacijski pik (primjetan na oko +0,25 V) se može pripisati oksidaciji produkata

nastalih kod katodnog izlučivanja vodika. Naime, izlučivanje vodika može biti praćeno i slijednom kemijskom redukcijom acetata (npr. do aldehida) prema reakciji (3).

$$-COO^- + H_2 + H^+ \rightarrow -CHO + H_2O \qquad (3)$$

3.2.4. Utjecaj dodatka cisteina na CV nCPE

Budući da je u određenim granicama utvrđeno i izlučivanje vodika i kisika, a koji mogu utjecati na kemijsku stabilnost cisteina, snimljeni su CV, za nCPE, uz sukcesivni dodatak cisteina.

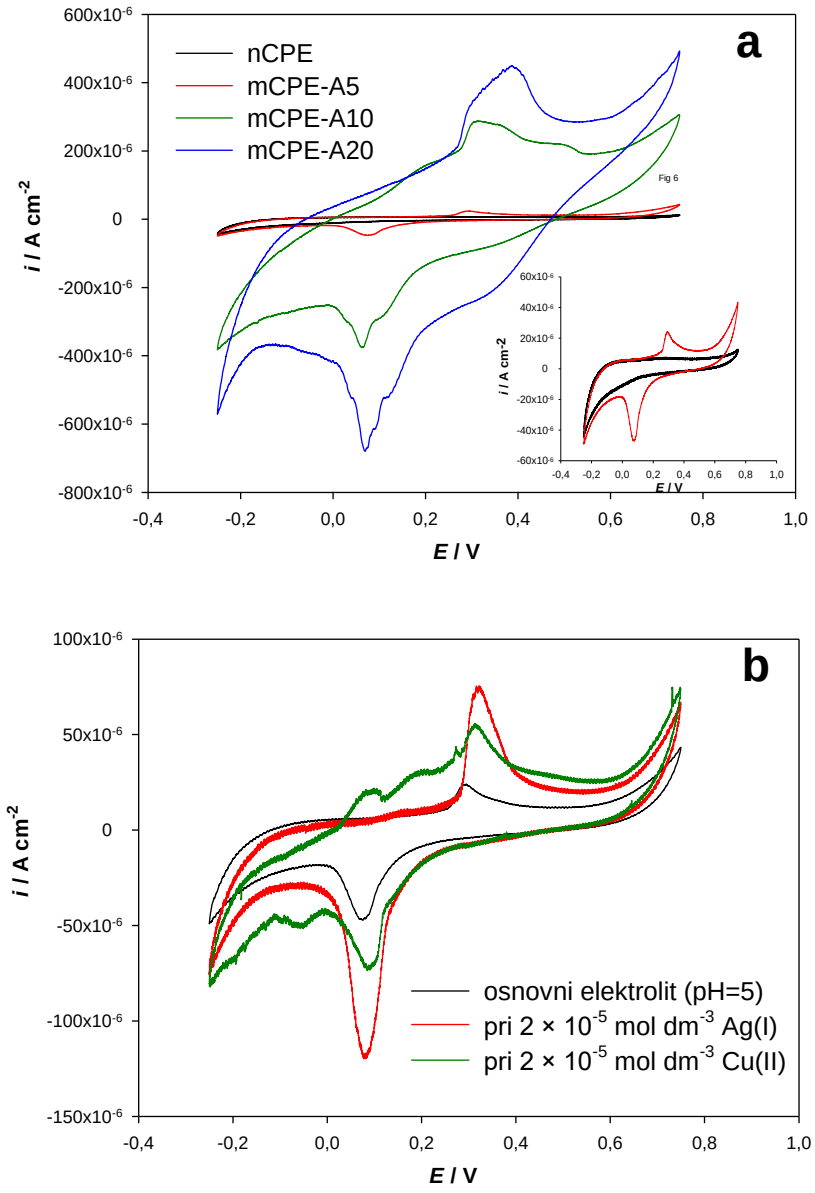


Slika 5. Ciklički voltamogrami snimljeni za elektrodu nCPE pri različitim koncentracijama cisteina. Mjerenja su rađena u osnovnom elektrolitu (pri pH=5).

Iz Slike 5. je vidljivo da se u ispitivanim granicama i pri danom pH ne uočavaju značajniji elektrokemijski procesi pri dodatku cisteina čak i do koncentracija od 1×10^{-4} mol dm^{-3}.

3.3. Elektrokemijsko ponašanje mCPE (modificirane CPE) pri pH=5

Iako su istraživanja vršena s tri različita materijala s različitim masenim udjelima u elektrodi od ugljikove paste, te pri dvije pH vrijednosti, u ovom radu će biti prikazani samo rezultati dobiveni s elektrodama modificiranim s prahom A zbog najboljeg elektrokemijskog ponašanja u usporedbi s ostala dva praha.



Slika 6. Ciklički voltamogrami snimljeni, u osnovnom elektrolitu, za mCPE s različitom količinom modifikatora (a); te utjecaj dodatka srebrovih(I) i bakrovih(II) kationa na CV mCPE-A5 u osnovnom elektrolitu (pri pH=5) (b).

Ciklički voltamogrami snimljeni za modificirane elektrode od ugljikove paste mCPE, s različitim postotkom praha A su prikazani na Slici 6a. Kao što je vidljivo iz CV snimljenog za elektrodu s 5 % praha A, jasno su profilirana dva pika: jedan redukcijski na +0,07 V i jedan oksidacijski na +0,3 V. Mora se naglasiti da su pri ovom snimanju rađena tri ciklusa cikličke voltametrije, te da se snimanje vršilo pomicanjem potencijala u katodnu stranu. Tako se pri prvom ciklusu nije primijetio katodni pik, no došlo je do pojave anodnog pika. Ovo sugerira da je katodni pik direktna posljedica anodnog procesa. Budući da je sastav praha A poznat, mogu se pretpostaviti i moguće anodne i katodne reakcije.

Kako se radi o materijalu čiji sastav uglavnom čine tercijalni sulfidi bakra i srebra, ali i elementarno srebro, moguće reakcije oksidacije se odnose na otapanje navedenog materijala prema reakcijama

pojednostavljeno: $CuAgS + H^+ \rightarrow Cu^{2+} + Ag^+ + HS^- + e^-$ (4)

ili

$2Ag_3CuS_2 + 4H_2O \rightarrow 3Ag_2S + CuSO_4 + Cu^{2+} + 10e^- + 8H^+$ (5)

te

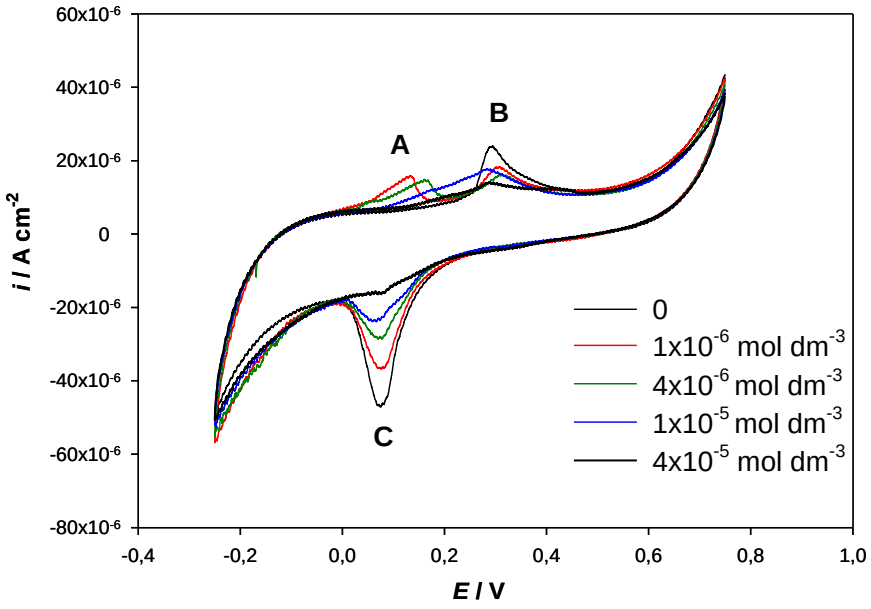
$Ag \rightarrow Ag^+ + e^-$ (6)

Za utvrđivanje porijekla pikova, a za potvrdu za neke od gore navedenih jednadžbi, u osnovnu otopinu je dodavana određena količina bakrovih(II), te u novom mjerenju srebrovih(II) kationa. Rezultati ovih mjerenja su prikazani u na Slici 6b. Kao što se može vidjeti, oba pika najvjerojatnije pripadaju reakciji (6), iako se ne može zanemariti utjecaj reakcija (4) i (5), pogotovo kod elektroda modificiranim s većom količinom modifikatora. Naime, problem leži u činjenici da su potencijali oksidacije, ali i redukcije ova dva kationa na elektrodama od ugljikove paste dosta blizu, što u praksi i onemogućava njihovo simultano određivanje. [19,20,21] Iz CV je vidljivo da kod elektroda sa 10 % i 20 % praha A[22], signal postaje nepravilniji i pikovi manje razlučivi, ukazuju na pojačano otapanje ternarnih sulfida, ali i prisutnog elementarnog srebra. Naravno, mora se imati na umu i moguća sukcesivna redukcija bakrovog(II) kationa prvo do bakrovog(I) kationa, a koji se zatim reducira do elementarnog bakra (vidi pojavu dvaju katodnih pikova u području od 0,1 V do -0,14 V). No, u istom području potencijala

dodatkom srebrovog kationa redukcijski pik raste. Prema tome, možemo pretpostaviti da se u navedenom katodnom području potencijala izlučuju elementarni metali.

U ovom radu će biti prikazani samo rezultati ispitivanja vršenih s elektrodom mCPE-A5 zbog stabilnosti struja, malih pozadinskih struja i definiranijih pikova. Mora se napomenuti da su istovrsna mjerenja urađena i s elektrodama mCPE-A10 i mCPE-A20.

3.3.1. Ponašanje mCPE-A5 u prisutnosti cisteina pri pH=5



Slika 7. Ciklički voltamogrami snimljeni za mCPE-A5 pri različitoj koncentraciji cisteina u osnovnom elektrolitu pri pH=5.

Ciklički voltamogrami snimljeni pri različitim koncentracijama cisteina (sukcesivni dodatak), otkrivaju pojavu novog anodnog pika od 0 V do 0,24 V, koji je istaknutiji pri nižim koncentracijama cisteina i koji se pomjera ka anodnijim potencijalima povećanjem koncentracije cisteina. Nadalje, pri koncentraciji od 4×10^{-5} mol dm^{-3} može se uočiti "nestanak" ovog pika. Usporedbom ovih CV s onim dobivenim u prisutnosti bakrovih(II) kationa može se uočiti da se ovaj pik pojavljuje u istom području potencijala kao i oksidacijski pik (A) u prisutnosti bakrovih(II) kationa (Slika 6b), što može pomoći pri objašnjavanju pojave ovog pika.

Ukoliko se promatra anodna oksidacija materijala prema predloženim jednadžbama (4) i (5), te uzimajući u obzir niz reakcija između bakrovih(II) kationa i cisteina,[23] gdje bakrovi(II) kationi djeluju kao katalizatori pri oksidaciji cisteina:

$$2RS^- + 2Cu^{2+} \leftrightarrows 2RS^* + 2Cu^+ \quad (7)$$

$$2RS^- + 2Cu^+ \leftrightarrows 2RSCu \quad (8)$$

$$2RSCu + 2Cu^{2+} \leftrightarrows RSSR + 4Cu^+ \quad (9)$$

$$4Cu^+ + O_2 + 4H^+ \leftrightarrows 4Cu^{2+} + 2H_2O \quad (10)$$

$$RSCu + O_2 + 2H^+ \leftrightarrows 1/2RSSR + H_2O_2 + Cu^{2+} \quad (11)$$

pojava ovih pikova pri nižim koncentracijama cisteina može se objasniti u svjetlu gore navedenih reakcija. Naime, ako pretpostavimo da se oksidacija elektroaktivnog materijala odvija prema reakciji (5), dodatkom cisteina u otopinu imamo kombinaciju jednadžbi (5) i (7):

$$4Ag_3CuS_2 + 8H_2O + 2RS^- \rightarrow 6Ag_2S + 2CuSO_4 + 2Cu^+ + 20e^- + 16^+ + 2RS^* \quad (12)$$

Iz izvedene jednadžbe se vidi da dodatkom cisteina dolazi do nastanka bakrovog(I) kationa. Iako nastanak ovog kationa ne objašnjava pojavu pika (budući da je stupanj oksidacije bakra u materijalu kako je predstavljen u jednažbi (12) +1), mora se imati u vidu da se materijal sastoji i od drugih, nestehiometrijskih, ternarnih sulfida poput $Ag_{1,2}Cu_{0,8}S$ gdje stupanj oksidacije bakra može biti i niži od +1. Nadalje, kako su prikazani CV trećeg ciklusa, mCPE zasigurno sadrži i elementarnog bakra izlučenog tijekom redukcijskog ciklusa (pik C - Slika 7). Prema tome, mora se uzeti u obzir i jednadžba oksidacije elementarnog bakra:

$$Cu \rightarrow Cu^{2+} + 2e^- \quad (13)$$

te izvedena jednadžba iz (7) i (13)

$$2Cu + 2RS^- \leftrightarrows 2RS^* + 2Cu^+ + 4e^- \quad (14)$$

Ovdje se jasno vidi da dodatak cisteina (do određenih koncentracija-vidi kasnije!) usmjerava reakciju oksidacije bakra do stupnja oksidacije +1. Otuda i pojava prvog oksidacijskog pika (A) pri nižim koncentracijama cisteina.

Daljnjim dodatkom cisteina pikovi postaju razvučeniji ukazujući da je proces kontroliran difuzijom. Iznenađujuće, primjetno je i "kretanje" anodnog pika (A) ka

pozitivnijim potencijalima s istim vršnim vrijednostima gustoće struje, što upućuje na proces adsorpcije. Ovo će biti naknadno elaborirano kod cikličkih voltamograma snimljenih pri različitim vrijednostima posmika (Slika 8).

Kao što je navedeno, razvučenost strujnog pika može biti pripisana difuziji, no prema jednadžbi (14) povećanje koncentracije cisteina pomjera ravnotežu reakcije (14) u desno. Ova reakcija, sudeći prema obliku pika je kinetički ograničena. Nadalje, produkt reakcije (8) – RSCu biva adsorbiran na površini elektrode i oksidiran (prema reakciji (15)), što objašnjava pomak anodnog pika (A) u anodnu stranu bliže oksidacijskom piku (B) koji se pripisuje oksidaciji do bakrovog(II) kationa.

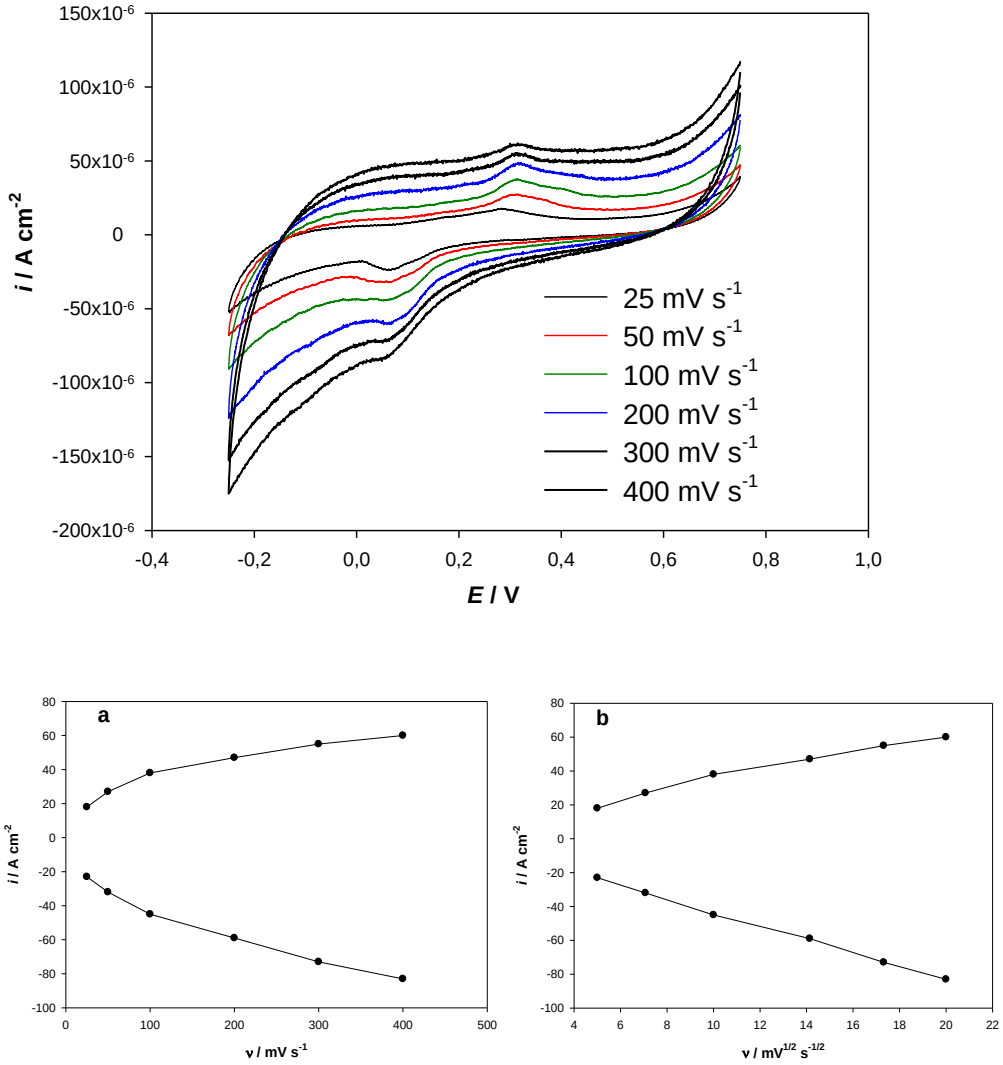
$$RSCu \rightarrow RS^{-} + Cu^{2+} + e^{-} \qquad (15)$$

Pri određenoj koncentraciji cisteina (4×10^{-5} mol dm^{-3}), anodni pik (A) potpuno iščezava, dok se anodni pik (B) smanjuje. Pri ovoj koncentraciji, cisteina ima dovoljno da se reakcija (8) odvija jako brzo, te se sav bakar nalazi u obliku kompleksa. Nadalje, višak cisteina uz površinu elektrode, ne omogućava njegovu laku oksidaciju prema jednadžbi (15) te dolazi do značajnog smanjenja pika (B).

Zanimljivo, katodni pik (C) ne pokazuje ovakvo ponašanje. Dodatkom cisteina on linearno opada, što je i očekivano, s obzirom na gore navedene jednadžbe. Naime, povećanjem koncentracije cisteina, sve je manje slobodnog bakrovog(II) kationa (i srebrovog(I) kationa), te se katodni pik (C) smanjuje. Ova ovisnost je pravilna i sugerira mogućnost određivanja cisteina kompetitivnim mehanizmom.

3.3.2. Utvrđivanje mehanizama oksidacije i redukcije mCPE-A5 pri pH=5

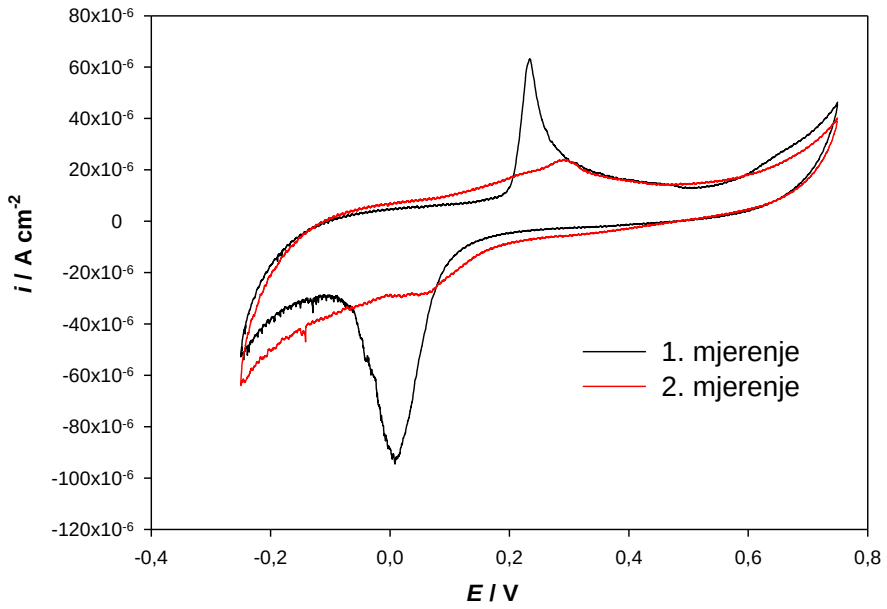
Za daljnje utvrđivanje mehanizama oksidacije i redukcije snimani su voltamogrami pri različitim brzinama posmika, a pri konstantnoj koncentraciji cisteina.



Slika 8. Ciklički voltamogrami snimljeni za mCPE-A5 u osnovnom elektrolitu (pH=5), pri koncentraciji cisteina od 1 x 10^{-5} mol dm^{-3}, pri različitim brzinama posmika. Ovisnost vršnih vrijednosti struje katodnog i anodnog pika o brzini posmika (a) i korjenu brzine posmika (b).

Može se primijetiti da se položaj pikova, u odnosu na potencijal, ne mijenja s posmikom, indicirajući brzu izmjenu elektrona na mCPE. Snimljeni voltamogrami prikazani su na Slici 8, a ovisnost gustoće struje katodnih i anodnih pikova o posmiku i vrijednosti njegovog korijena na slici 8a i 8b.

Iznenađujuće, obje ovisnosti su linearne, s tim da se manja odstupanja (veća razlika vrijednosti struja pika) mogu primijetiti u slučaju ovisnosti o brzini posmika pri njegovim nižim vrijednostima. Ovo sugerira da se pri tim brzinama posmika reakcija (15) odvija potpunije. Prema tome, može se utvrditi da je u pitanju miješani mehanizam reakcija, kontroliran i difuzijom i adsorpcijom.



Slika 9. Ciklički voltamogrami snimljeni, u osnovnom elektrolitu (pri pH=5), za mCPE-A5 bez obnove površine.

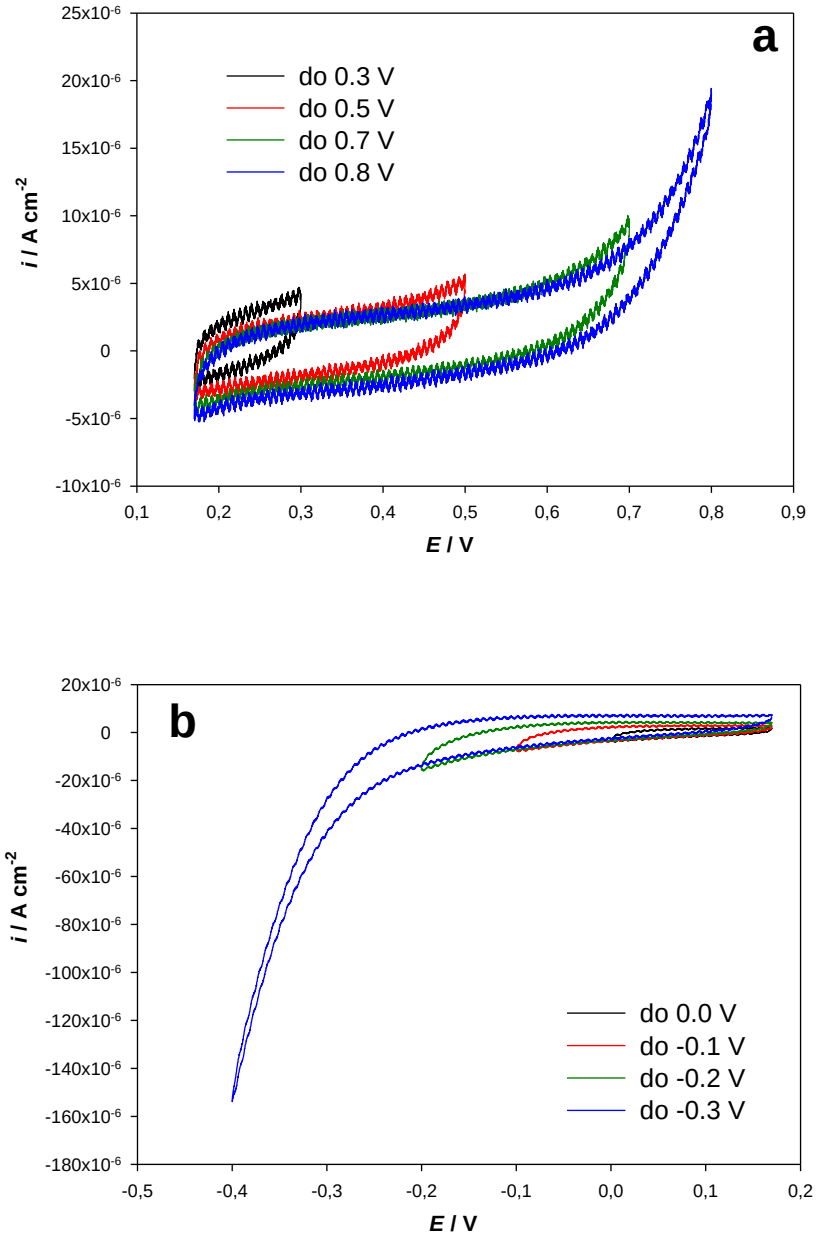
Utjecaj histereze na CV je ispitivan ponovnim snimanjem mCPE bez obnove površine. Dobiveni ciklički voltamogrami (Slika 9) su pokazivali znatan utjecaj prethodnih mjerenja, te je utvrđeno da se površina mora obnavljati laganim struganjem preko masnog papira ili filter papira.

3.4. Elektrokemijsko ponašanje CPE pri pH=7

Budući da je za određivanje cisteina vrlo važna forma u kojoj se on nalazi, mjerenja su vršena i pri pH 7. Daljnje povećavanje pH (više od pH=7), dovodi do intezivnog otapanja ternarnih sulfida, što dovodi do gubitka elektroaktivnog materijala, čime metalni ioni prelaze u otopinu, te se pri ovom pH njihova ukupna koncentracija znatno povećava uzrokujući tako vrlo brzu kemijsku oksidaciju cisteina u cistin. Ova reakcija se događa čak i bez prisutnosti metalnih kationa, a pri još lužnatijim pH (pH 12) oksidacija može ići sve do derivata sulfinske (RSO_2H) i sulfonske (RSO_3H) kiseline kako je navedeno u literaturi.[23]

3.4.1. Utjecaj pomaka anodne i katodne granice na nCPE pri pH=7

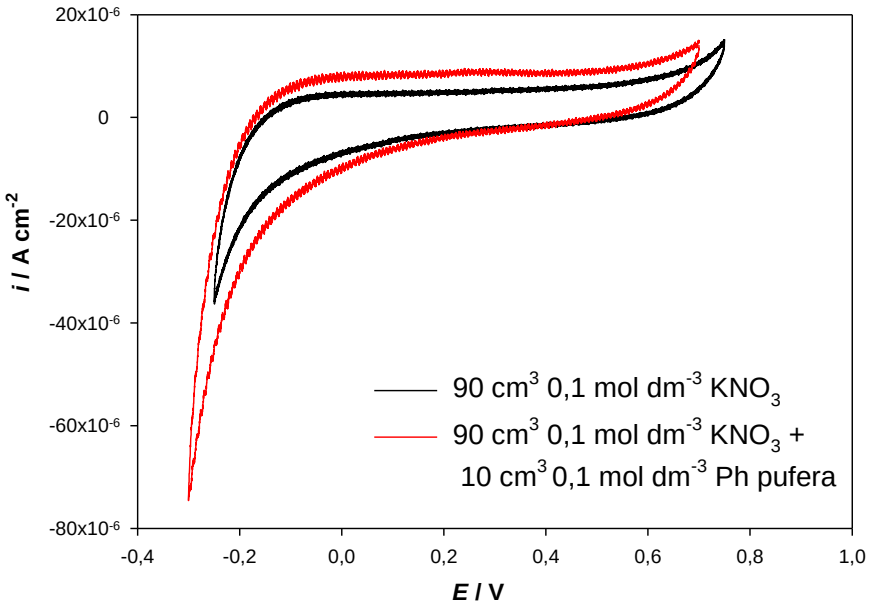
Istraživanja pri pH 7 su provedena istovjetno kao i ona pri pH 5. Na Slici 10b, prikazan je pomak katodne granice za nCPE elektrodu. Značajnije struje se pojavljuju od -0,2 V pa katodnije i mogu se pripisati HER. Pri pomaku anodne granice (Slika 10a) značajniji porast struje može se primijetiti na potencijalima pozitivnijim od 0,65 V. Stoga je kao područje potencijala (s obzirom na samu matricu) pri ovoj pH vrijednosti odabrano područje -0,3 V do +0,7 V.



Slika 10. Utjecaj pomaka anodne (a) i katodne (b) granice na nCPE u osnovnom elektrolitu (pri pH=7).

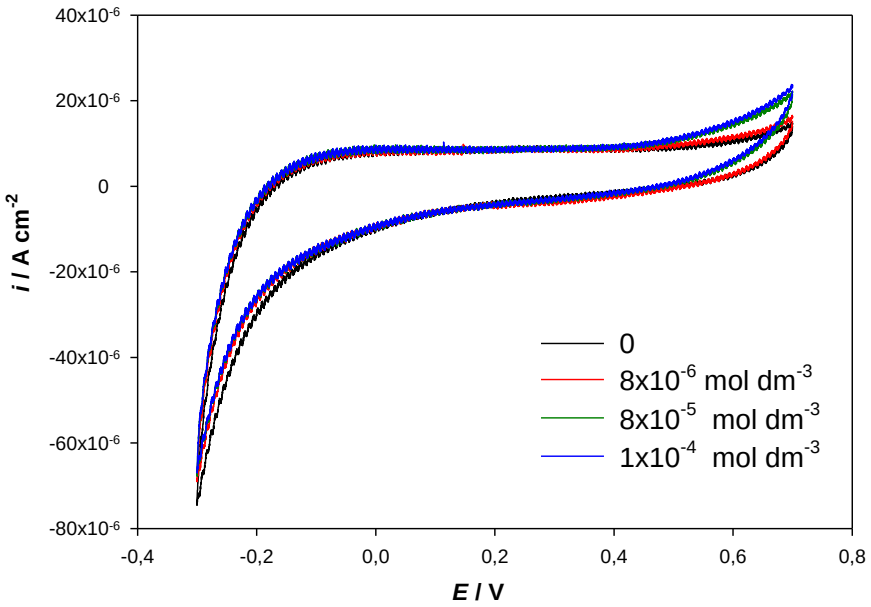
3.4.2. Utjecaj dodatka pufera na CV nCPE pri pH=7

Utjecaj pufera je prikazan na Slici 11 i kao što se može primijetiti nema značajnijeg utjecaja na ciklički voltamogram.



Slika 11. Utjecaj dodatka fosfatnog pufera (pH=7) na ciklički voltamogram nCPE.

3.4.3. Utjecaj dodatka cisteina na CV nCPE pri pH=7

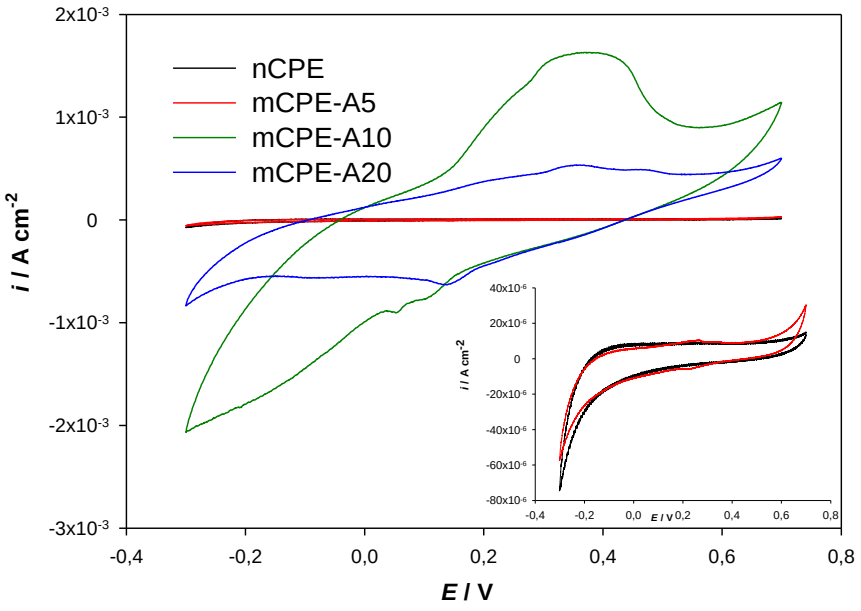


Slika 12. Ciklički voltamogrami snimljeni za elektrodu nCPE pri različitim koncentracijama cisteina. Mjerenja su rađena u osnovnom elektrolitu (pri pH=7).

Iz Slike 12 je vidljivo da se u ispitivanim granicama i pri danom pH ne uočavaju značajniji elektrokemijski procesi pri dodatku cisteina čak i do koncentracija od 1×10^{-4} mol dm^{-3}.

3.5. Elektrokemijsko ponašanje mCPE (modificiranih CPE) pri pH=7

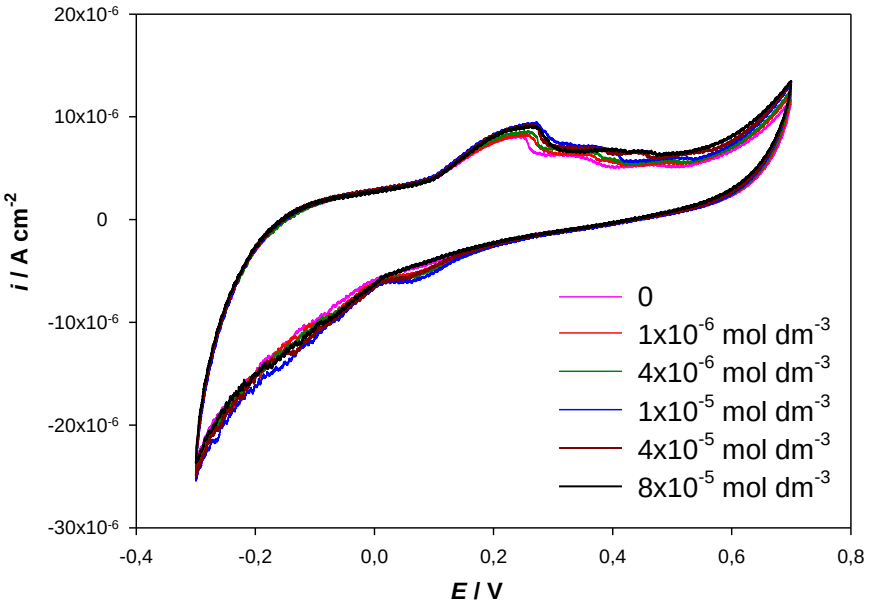
Ciklički voltamogrami snimljeni u fosfatnom puferu za elektrodu mCPE-A5, za razliku od onih snimljenih u acetatnom puferu, ne pokazuju jasno definirane pikove, te se može uočiti izostanak katodnog pika. Anodni pik se u odnosu na onaj dobiven u acetatnom puferu pojavljuje katodnije i biva razvučeniji. Također struje su mnogo veće, što se očekivalo, imajući na umu povećanu topljivost ternarnih sulfida u lužnatom mediju. Razvučenost pika može se pripisati slijednim kemijskim reakcijama kompleksacije (nastajanje raznih hidrokso kompleksa kako bakrovog(I), tako i bakrovog(II) kationa). Izostanak katodnog pika je u direktnoj vezi s kompleksacijom, indicirajući teže ili potpuni prestanak izlučivanja bakrovih kationa iz njegovih hidrokso kompleksa.



Slika 13. Ciklički voltamogrami snimljeni, u osnovnom elektrolitu, za mCPE s različitom količinom modifikatora.

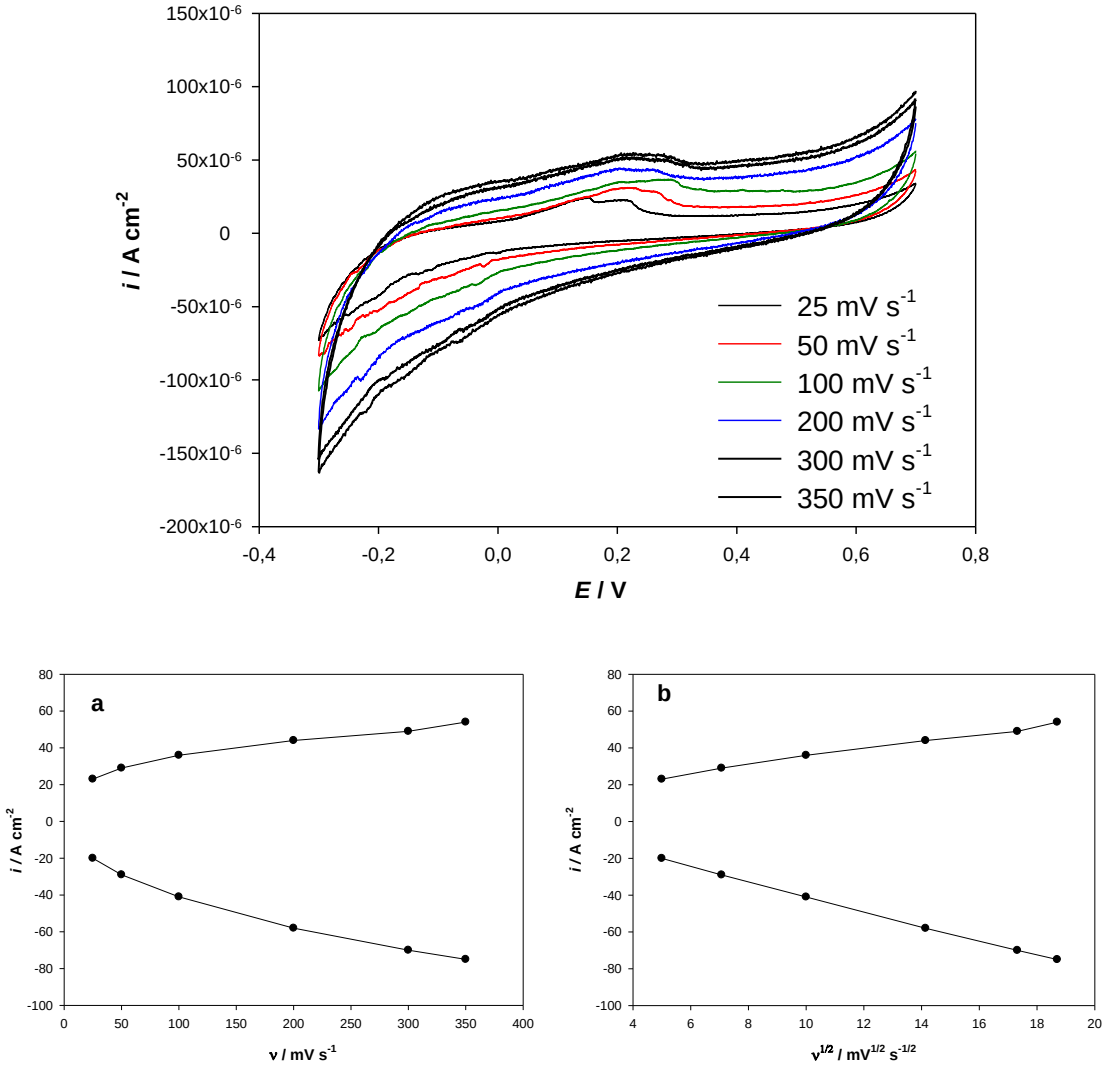
3.5.1. Ponašanje mCPE u prisutnosti cisteina pri pH=7

Dodatkom cisteina, anodni pik neznatno raste do koncentracije 1×10^{-5} mol dm^{-3} cisteina, dok više koncentracije ne utječu značajno na pik. Blagi porast ovog pika dodatkom cisteina se može objasniti kompetitivnim mehanizmom za bakrove katione između prisutnih hidroksidnih aniona i cisteina. Budući da egzistiraju oba liganda, za očekivati je uspostavljanje ravnoteže i profila kompleksa bakara s cisteinom i s hidroksidom. Ono što je zanimljivo je da porastom koncentracije cisteina, katodni pik na +0,064 V biva transparentniji sve do koncentracije cisteina 1×10^{-5} mol dm^{-3}. Ovo ukazuje na redukciju slobodnih bakrovih kationa u reakciji s cisteanatom, te se može zaključiti da je ovaj kompleks manje stabilniji od hidroksidnih kompleksa bakrovih kationa. Također, nakon ove koncentracije katodni pik iščezava sugerirajući potpunu kompleksaciju bakrovih kationa pri suvišku cisteina.



Slika 14. Ciklički voltamogrami snimljeni za mCPE-A5 pri različitoj koncentraciji cisteina u osnovnom elektrolitu pri pH=7.

3.5.2. Utvrđivanje mehanizama oksidacije i redukcije mCPE-A5 pri pH=7



Slika 15 . Ciklički voltamogrami snimljeni za mCPE-A5 u osnovnom elektrolitu (pH=7), pri koncentraciji cisteina od 1 x 10^{-5} mol dm^{-3}, pri različitim brzinama posmika. Ovisnost vršnih vrijednosti struje katodnog i anodnog pika o brzini posmika (a) i korjenu brzine posmika (b).

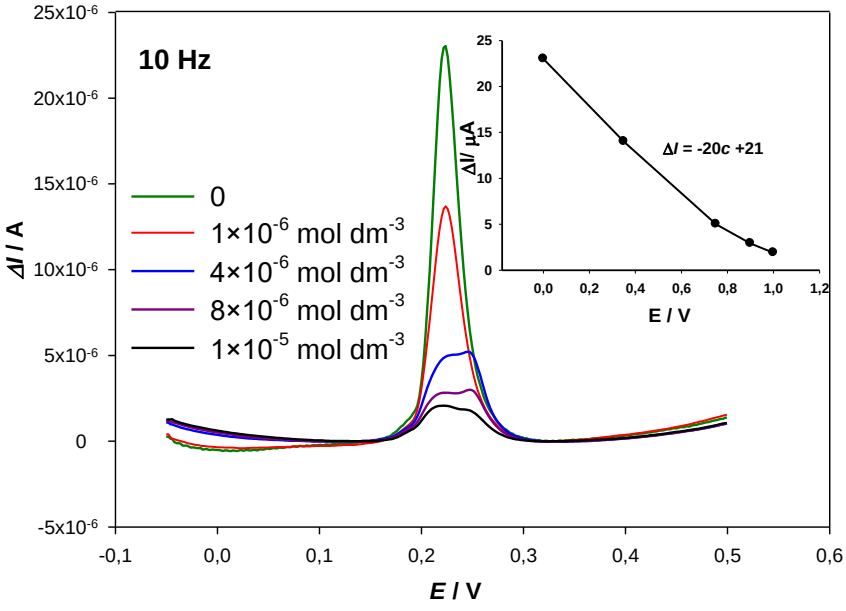
Utjecaj brzine posmika na mCPE u fosfatnom puferu je prikazan na Slici 15. Kao i u slučaju mjerenja u acetatnom puferu, linearna ovisnost o korijenu brzine posmika i linearna ovisnost o brzini posmika ukazuje na miješani mehanizam elektrokemijskih reakcija (difuzija i adsorpcija).

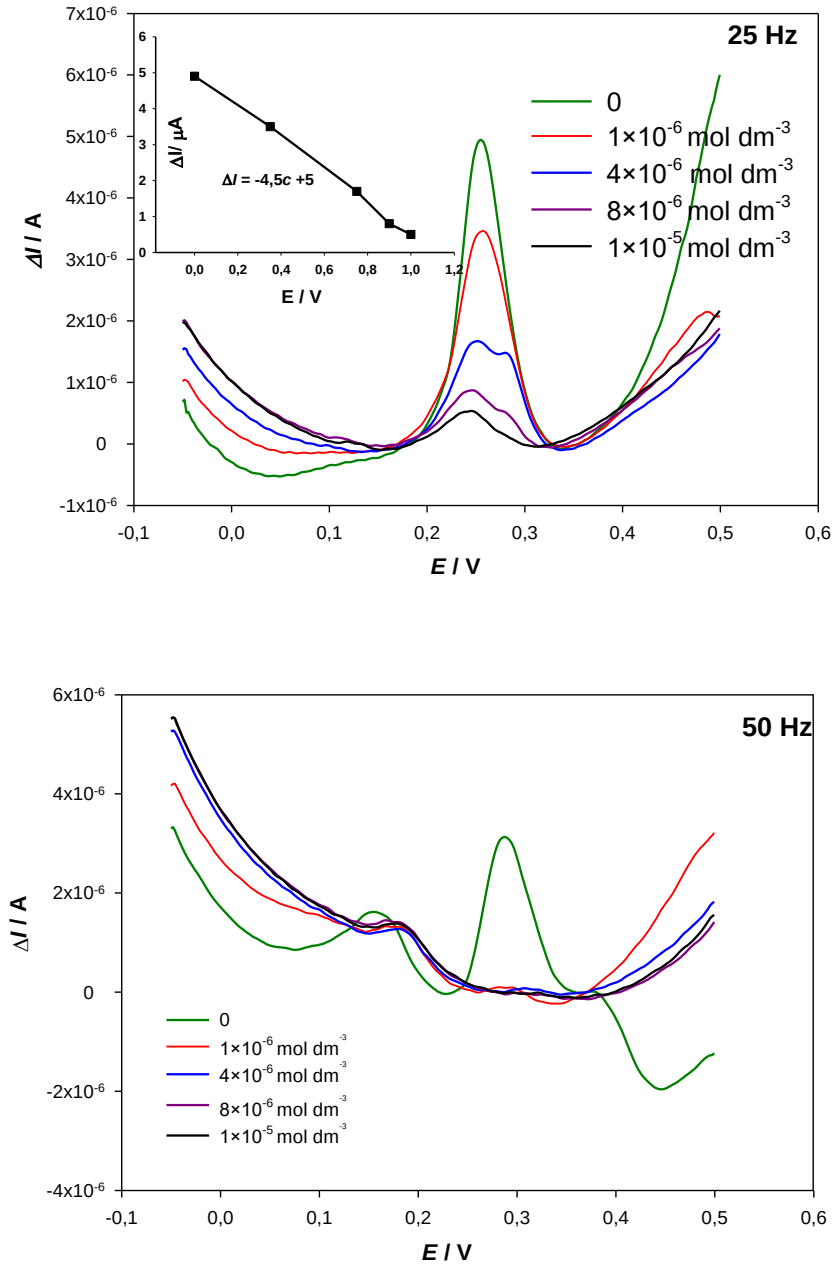
Mora se naglasiti da je dio preliminarnih mjerenja urađen i s različitim tipom elektronskih vodiča (uz bakrenu žicu koristila se i inox i srebrna žica), no nije bilo nikakvih promjena u elektrokemijskom signalu kao i u potencijalu otvorenog strujnog kruga.

3.6. Voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV)

Na osnovu obrađenih rezultata rađena je voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom (SWV), u svrhu elektrokemijskog određivanja cisteina. Ovom metodom su ispitivana i katodna i anodna područja na kojoj se javljala ovisnost pikova o koncentraciji cisteina. Odabrani pH pri kojoj su se provodila mjerenja je 5, a odabran je na osnovu rezultata dobivenih cikličkom voltametrijom.

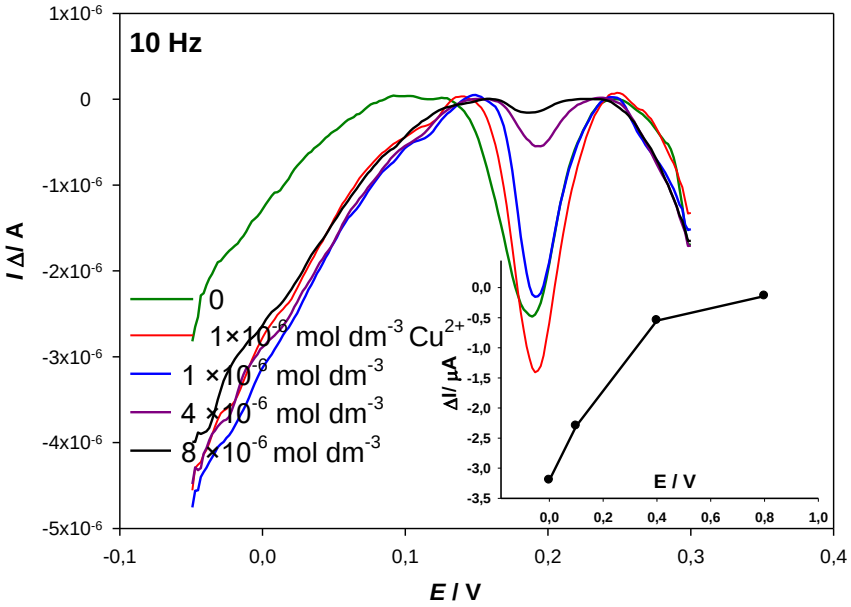
Na Slici 16. prikazan je utjecaj frekvencije na SWV signal elektrode mCPE-A5, pri različitim koncentracijama cisteina. Iz voltamograma može se vidjeti da se povećanjem frekvencije struja (koja se pripisuje piku B – Slika 7 u cikličkom voltamogramu pri (pH 5) snižava što upućuje na kontrolu pika kinetikom nastanka kompleksa RSCu ili kinetikom elektrokemijske reakcije (15).

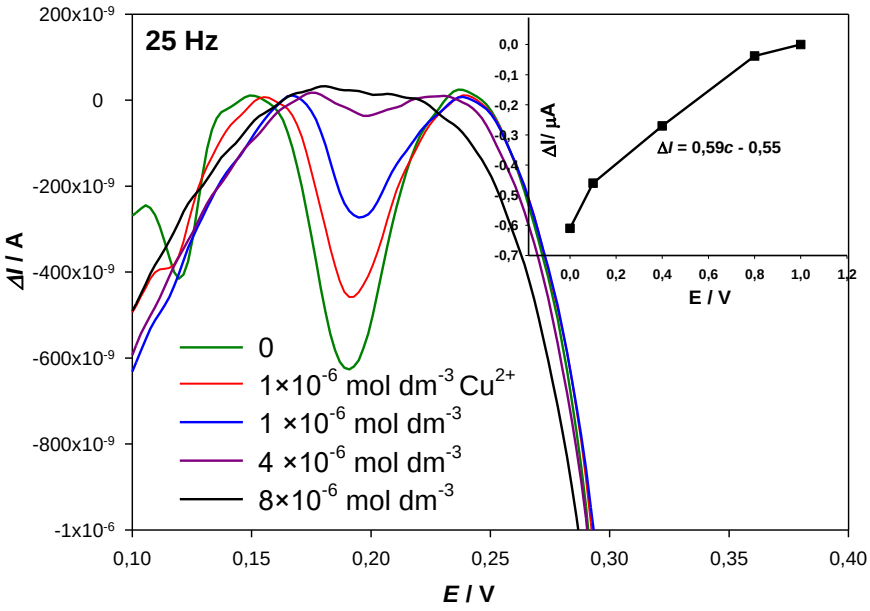


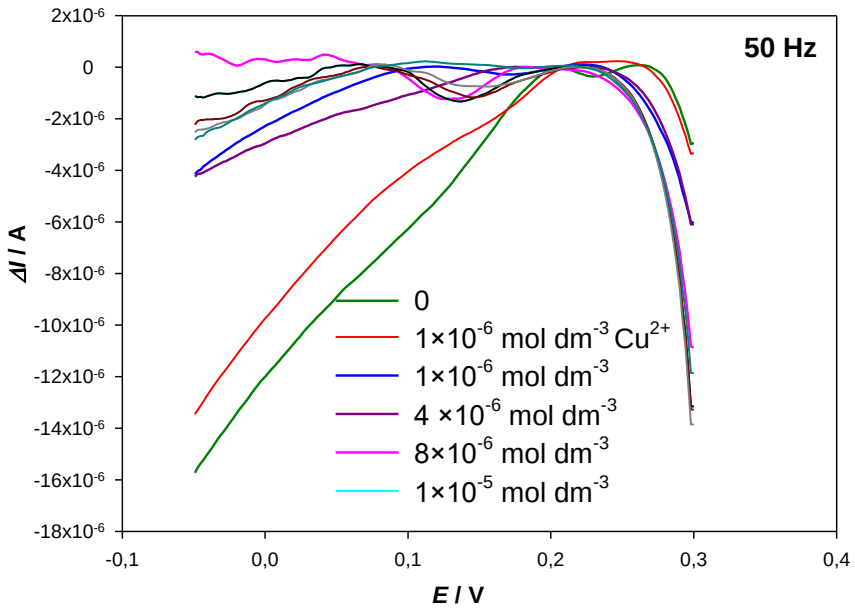


Slika 16. Utjecaj frekvencije na anodni SWV signal elektrode mCPE-A5, pri različitim koncentracijama cisteina.

Kod svih SW voltamograma (pri 10 Hz i 25 Hz) može se primijetiti da pri koncentracijama cisteina od 4×10^{-6} mol dm^{-3} dolazi do razvučenosti pika. On je razvučeniji pri višoj frekvenciji. Ovo je dodatni dokaz za kontrolu reakcije navedenim procesima, jer povećanjem koncentracije cisteina povećava se količina kompleksa. Pri frekvenciji od 50 Hz ovi procesi nisu uočljivi. Pripravljena elektroda pokazuje zadovoljavajuću osjetljivost pri 10 Hz od -20 μA μmol^{-1} dm^3 uz linearno područje od 0,1 do 1 μmol dm^{-3}. Granica detekcije, određena 3σ metodom, iznosi 0,0025 μmol dm^{-3}.


10 Hz
I ΔI / A
E / V
0
1×10-6 mol dm-3 Cu2+
1 ×10-6 mol dm-3
4 ×10-6 mol dm-3
8×10-6 mol dm-3
ΔI / µA
E / V


25 Hz
ΔI / A
E / V
0
1×10-6 mol dm-3 Cu2+
1 ×10-6 mol dm-3
4 ×10-6 mol dm-3
8×10-6 mol dm-3
ΔI / µA
ΔI = 0,59c - 0,55
E / V

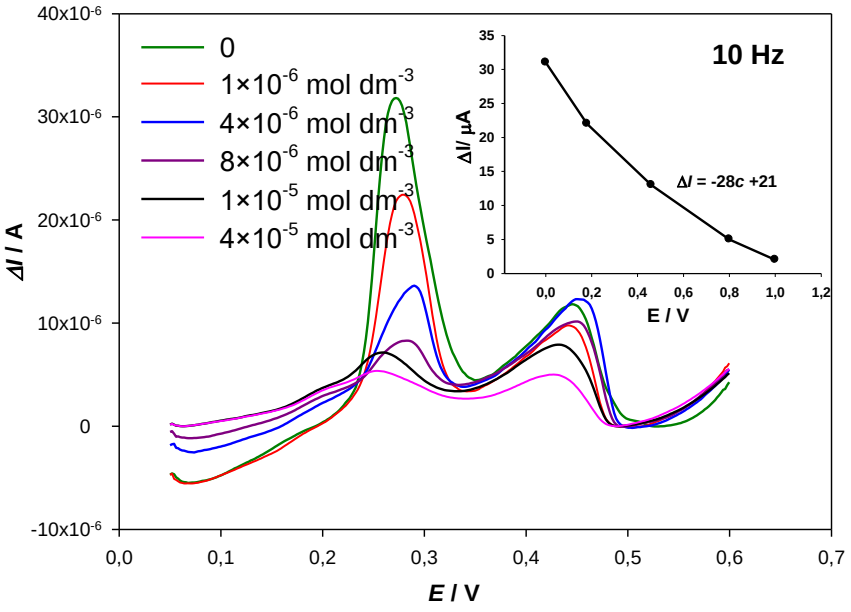


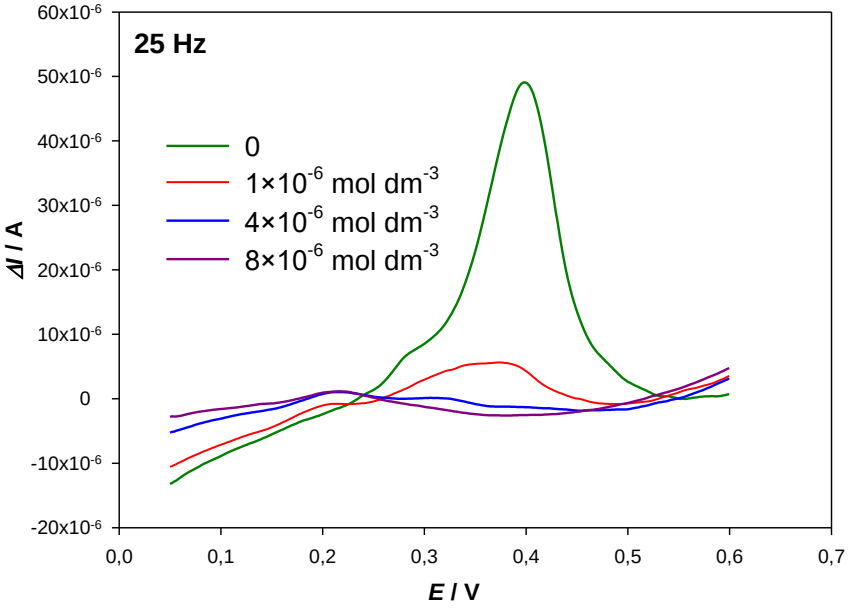
Slika 17. Utjecaj frekvencije na katodni SWV signal elektrode mCPE-A5, pri različitim koncentracijama cisteina uz dodanu koncentraciju Cu^{2+} od 1×10^{-6} mol dm^{-3}.

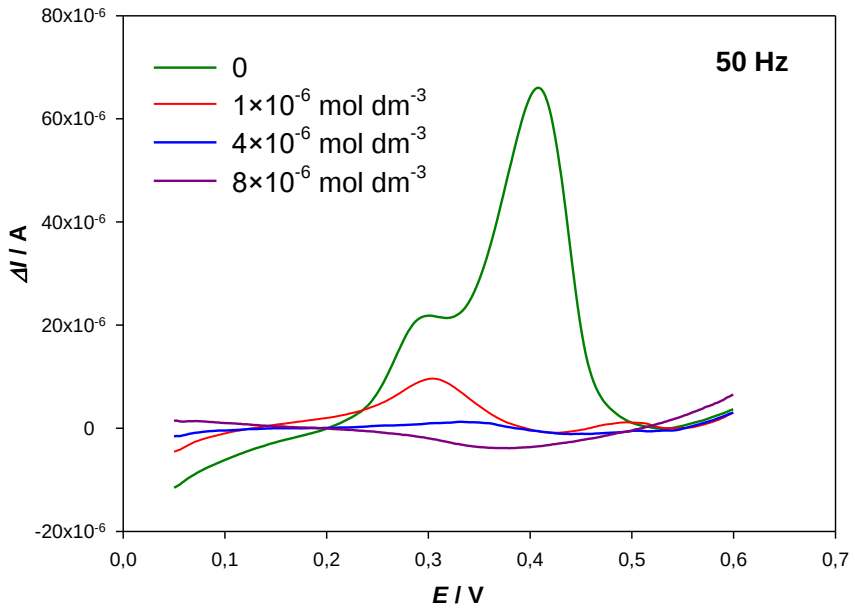
Rezultati katodne SWV za elektrodu mCPE-A5, pri različitim frekvencijama, su prikazani na Slici 17. Dodatkom čak i najniže koncentracije cisteina u otopinu (1×10^{-7} mol dm^{-3}), dolazi do naglog smanjenja katodnog pika. Budući da je ovaj pik pripisan katodnoj redukciji bakrovih kationa, vanjskim dodatkom Cu(II) za postizanje ukupne koncentracije bakrovih kationa reda veličine 1×10^{-6} mol dm^{-3} održavana je dovoljna količina kationa za postizanje katodnog signala. Slaba linearnost (a time i osjetljivost) je postignuta pri frekvenciji od 25 Hz, dok pri frekvenciji od 10 Hz pri višim koncentracijama cisteina dolazi do odstupanja, najvjerojatnije zbog zasićenosti površine kompleksom čime se usporava kinetika redukcije. Pri 50 Hz, zbog kinetike reakcije nije utvrđena nikakva ovisnost struje o koncentraciji cisteina u otopini.

Voltamogrami anodne SWV, pri različitim frekvencijama, za elektrodu mCPE-A10 su prikazani na Slici 18. Kao što se može uočiti, pri frekvenciji od 10 Hz se uočavaju dva definirana pika, koja se smanjuju dodatkom cisteina u otopinu. Ovo upućuje, ne kako se na prvi mah može zaključiti, kombinirani elektrokemijski/kemijski mehanizam (u tom slučaju bi s dodatkom cisteina pik na 0,25 V rastao, dok bi drugi ostao približno iste visine), već sasvim dva odvojena procesa. Budući da je dodatkom metalnih kationa utvrđeno da su anodni pikovi posljedica oksidacije srebra i bakra, ovi pikovi se mogu

pripisati takvim reakcijama, te njihovo smanjenje s dodatkom cisteina je direktna posljedica kompleksiranja kationa tih metala s cisteinom. Daljnja istraživanja o porijeklu ovih pikova će biti predmet budućih istraživanja.







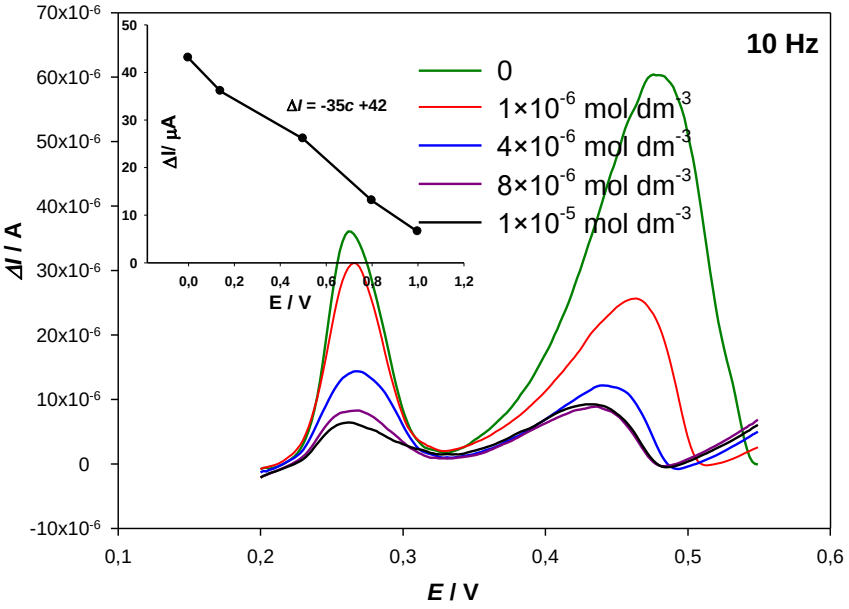
Slika 18. Utjecaj frekvencije na anodni SWV signal elektrode mCPE-A10, pri različitim koncentracijama cisteina

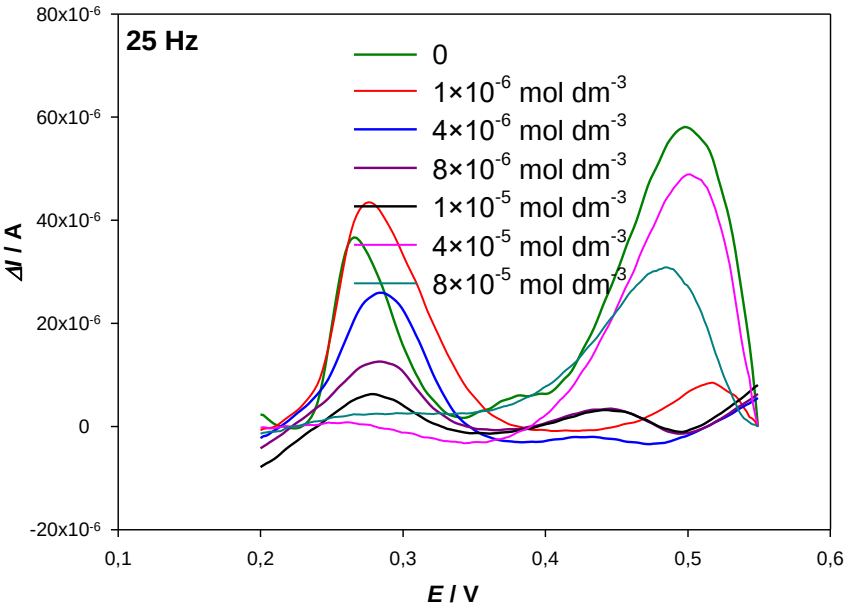
Povećanjem frekvencije dolazi do iščezavanja pika na +0,25 V, indicirajući da je ovaj proces sporiji od onog koji se događa oko +0,4 V. Imajući u vidu sastav materijala, nameće se zaključak da bi pik na +0,4 V odgovarao oksidaciji elementarnog srebra, čije bi izlučivanje trebalo biti manje kinetički ograničeno od kompleksnog procesa otapanja ternarnih soli.

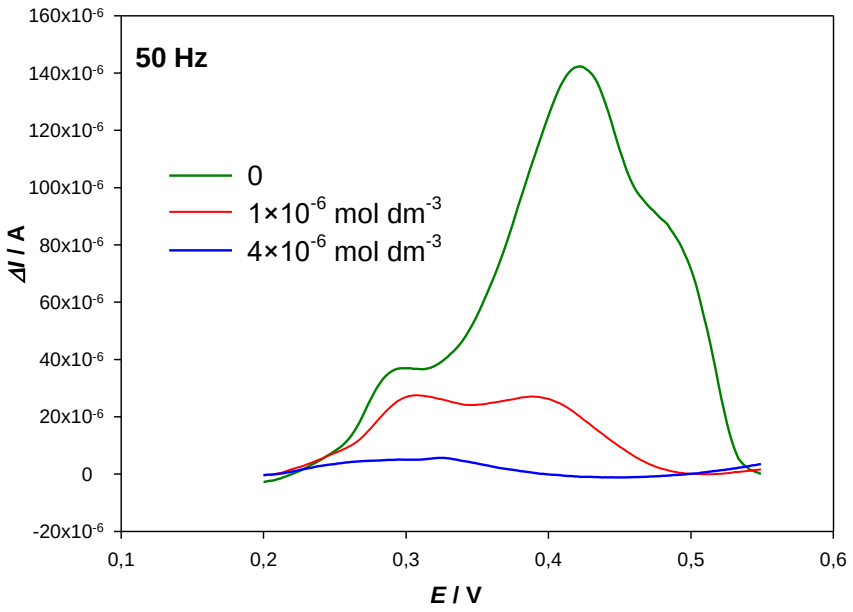
Ova elektroda pokazuje nešto veću osjetljivost od mCPE-A5 pri 10 Hz od -28 μA μmol^{-1} dm^3 uz linearno područje od 0,1 do 1 μmol dm^{-3} (određen za pik pri +0,25 V). Granica detekcije, određena 3σ metodom, iznosi 0,0018 μmol dm^{-3}.

Rezultati katodne SW voltametrije nisu dali nikakvu ovisnost o koncentraciji cisteina te stoga nisu ovdje ni prikazani.

Elektroda mCPE-A20 ima slično ponašanje poput elektrode mCPE-A10, karakterizirano s pojavom dva pika. Kao i u slučaju elektrode s 10 % praha, ovi pikovi iščezavaju dodatkom cisteina i povećanjem frekvencije. Za pik na oko +0,25 V, dodatak cisteina uzrokuje linearan pad struje s nagibom (osjetljivošću) od -35 μA μmol^{-1} dm^3, te izračunatom granicom detekcije od 0,0012 μmol dm^{-3}. Zanimljivo, analitička svojstva pri 25 Hz su slična kao i onima pri 10 Hz.

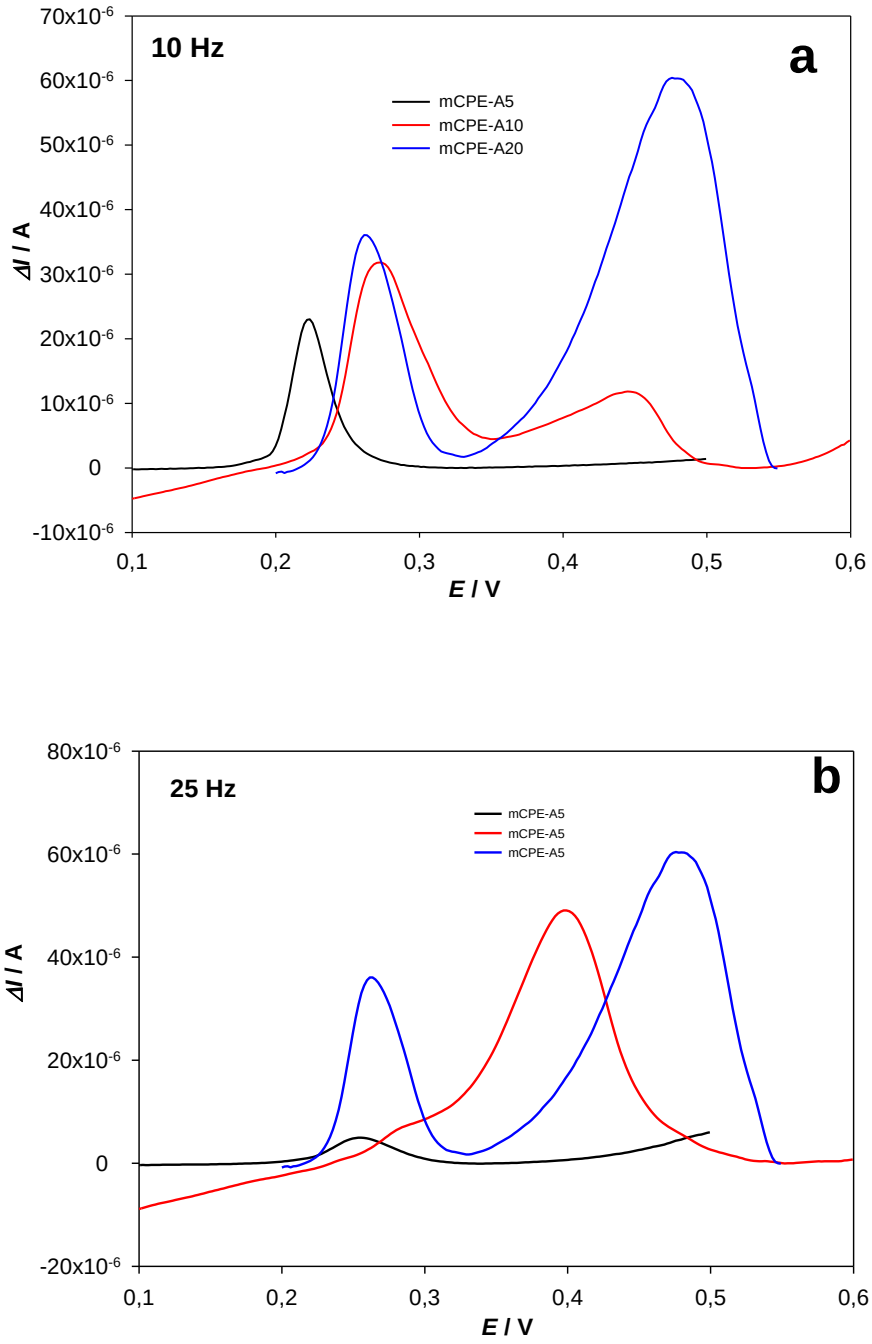

10 Hz
0
1×10-6 mol dm-3
4×10-6 mol dm-3
8×10-6 mol dm-3
1×10-5 mol dm-3
ΔI = -35c +42
ΔI/ μA
E / V
ΔI / A
E / V


25 Hz
0
1×10-6 mol dm-3
4×10-6 mol dm-3
8×10-6 mol dm-3
1×10-5 mol dm-3
4×10-5 mol dm-3
8×10-5 mol dm-3
ΔI / A
E / V



Slika 19. Utjecaj frekvencije na anodni SWV signal elektrode mCPE-A20, pri različitim koncentracijama cisteina

Usporedbom SW voltamograma s različitom količinom praha A, pri istoj frekvenciji uočava se da povećanjem količine modifikatora dva pika postaju razlučivija (Slika 20a), razlozi ovakvog ponašanja su u činjenici da veća količina praha može dati i veću količinu oba kationa, što je vidljivo i iz trenda struja, koje se povećavaju povećanjem masenog udjela modifikatora u CPE. Nadalje, potvrda se može naći u rezultatima eksperimenata kada su procesi otapanja kontrolirani brzinom promjene potencijala (vidi Sliku 20b). Tako pri višim frekvencijama, samo elektroda s 20 % modifikatora može dati dva pika. Nadalje, dodatak cisteina u otopinu ne može kompleksirati sve katione otopljene iz modifikatora, te su dva pika i dalje vidljiva pri 50 Hz (vidi Sliku 19) za elektrodu mCPE-A20, što nije slučaj za elektrodu mCPE-A10 pri istoj frekvenciji.



Slika 20. Usporedba SW voltamograma s različitom količinom praha A, pri istoj frekvenciji.

4. ZAKLJUČAK

1. Nemodificirane elektrode od ugljikove paste ne pokazuju nikakvo elektrokatalitičko ponašanje prema cisteinu u navedenim granicama potencijala i u uvjetima izvođenja eksperimenta. Modificirane elektrode pokazuju katodne i anodne procese koji su vezani za oksidaciju i redukciju elektroaktivnog materijala. Ovi procesi oksidacije i redukcije su posebno naglašeni pri višim pH (pH=7). Kao najbolji materijal se pokazao materijal (A) s 5% masenog udjela u pripravljenoj elektrodi.

2. Dodatak cisteina uzrokuje promjene u elektrokemijskom ponašanju modificiranih elektroda od ugljikove paste. Ovi procesi su razlučiviji pri pH=5.

3. Procesi iz prve točke mogu biti korišteni za elektrokemijsko određivanje cisteina indirektnom metodom.

4. Kao pogodna metoda odabrana je voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude SWV (u anodnom području) koja je pokazala zadovoljavajuću osjetljivost, široko područje linearnosti te izvrsnu granicu detekcije.

5. LITERATURA

[1] J. O. M. Bockris, A. K. N. Reddy, M. Gamboa-Aldeco, *Modern Electrochemist 2A*, Fundamentals of Electrodics, 2nd Edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **2000**.

[2] H. H. Girault, *Analytical and Physical Electrochemistry*. Lausanne: EPFL Press. **2004**.

[3] I. Piljac, *Elektroanalitičke metode*, RMC Zagreb, **1995**.

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

[5] J. W. Robinson, E. M. Skelly Frame, G. M. Frame II, *Undergraduate Instrumental Analysis*, Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, **2014**.

[6] F. Scholz, *Electroanalytical Methods*, Berlin: Springer-Verlag, **2010**.

[7] http://en.wikipedia.org/wiki/Thiol (12.07.2017.)

[8] www.wisegeek.com/what-are-thiols.htm (14.07.2017.)

[9] S.H.Pine, *Organska kemija*, Školska knjiga Zagreb, **1994**.

[10] D. Cavallini, C. De Marko, S. Dupre, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1968**, 124, 18.

[11] O. Nekrassova, N. S. Lawrence, R. G. Compton, ,*Talanta,* **2003,** 60, 10.

[12] https://hr.wikipedia.org/wiki/Teku%C4%87inska_kromatografija_visoke_djelotvornosti (15.9.2017.)

[13] https://hr.wikipedia.org/wiki/Fluorescencija (15.9.2017.)

[14] https://bs.wikipedia.org/wiki/Kapilarna_elektroforeza (15.9.2017.)

[15] https://hr.wikipedia.org/wiki/Spektroskopija (15.9.2017.)

[16] B. Ballarin, M. Gazzano, J.L.H. Cisneros, D. Tonelli, R. Seeber, *Analytical Bioanaytical Chemistry* **2002**, 374, 891.

[17] J. Barbarić, *Određivanje tiola u vodenim otopinama elektrokemijskim metodama,* Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2012.

[18] K. Kalcher, I. Svancara, M. Buzuk, K. Vytras, A. Walcarius, *Monatsh Chem,* 1, **2009**.

[19] A. Mohadesi, M. A. Taher, *Talanta,* **2007**, 71, 615.

[20] E. Shahnazari-Shahrezaie, A. Nezamzadeh-Ejhieh, RSC Adv., **2017**, 7, 14247.

[21] A. Walcarius, J. Bessiere, *Electroanalysis* **1997**, 9, 9.

[22] M. Buzuk, S. Brinić, N. Vladislavić, M. Bralić, M. Buljac, I. Škugor Rončević, *Monatshefte fur Chemie – Chemical Monthly* **2016**, 2, 147 .

[23] S. Brinić *et al. Int. J. Electrochem Sci.* **2012**, **7**, 5217.

[24] G. A. Bagiyan, *Russian Chemical Bulletin*, International Edition **2003,** 52, 1135.