

# Elektrokemijska analiza polisaharida kitozana i proteina BSA u morskoj vodi

---

Pereža, Lora

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:287186>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Lora Pereža

**ELEKTROKEMIJSKA ANALIZA  
POLISAHARIDA KITOZANA I PROTEINA  
BSA U MORSKOJ VODI**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistre kemije

Zagreb, 2018. godina.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biogeokemiju mora i atmosfere, Zavoda za istraživanje mora i okoliša pod mentorstvom dr. sc. Slađane Strmečki Kos. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Nives Galić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Utjecaj okolišnog stresa na pojavnost i međudjelovanje biološki važnih organskih molekula i mikronutrijenata u morskom ekosustavu“ (AMBIOMERES) ([HRZZ-IP-2013-11-8607](#)).



## **Zahvale**

Zahvaljujem se Prof. dr. sc. Nives Galić te posebno mentorici dr. sc. Slađani Strmečki Kos na predloženoj temi, strpljenju, pomoći te vodstvu pri izradi ovog rada. Također velika hvala za mnoge savjete tijekom eksperimentalnog dijela i na potpori i motivaciji tokom pisanja.

Zahvaljujem se i svojim roditeljima na velikoj podršci kroz cijelo moje školovanje te kolegama i prijateljima koji su mi olakšali i uljepšali studentske dane.



# Sadržaj

|                                                                                                 |             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>SAŽETAK.....</b>                                                                             | <b>XI</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                           | <b>XIII</b> |
| <b>§ 1. UVOD.....</b>                                                                           | <b>1</b>    |
| <b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>                                                           | <b>4</b>    |
| 2.1. Otopljeni organski dušik (DON) u moru .....                                                | 4           |
| 2.2. Elektrokemijska analiza polisaharida.....                                                  | 5           |
| 2.3. Elektrokemijska analiza proteina.....                                                      | 6           |
| 2.4. Katalitički val vodika.....                                                                | 7           |
| 2.5. Kronopotenciometrija .....                                                                 | 9           |
| 2.6. Voltametrija .....                                                                         | 10          |
| 2.6.1. Pravokutnovalna voltametrija.....                                                        | 11          |
| 2.6.2. Voltametrija izmjenične struje .....                                                     | 13          |
| 2.7. Tehnika adsorptivnog prijenosa .....                                                       | 13          |
| 2.8. Dobivanje, svojstva i upotreba kitozana .....                                              | 14          |
| <b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>                                                           | <b>16</b>   |
| 3.1. Kemikalije i otopine .....                                                                 | 16          |
| 3.2. Instrumentacija i pribor .....                                                             | 17          |
| 3.3. Uvjeti mjerenja.....                                                                       | 20          |
| 3.4. Obrada podataka .....                                                                      | 21          |
| <b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>                                                          | <b>22</b>   |
| 4.1. Elektrokemijska svojstva kitozana u morskoj vodi .....                                     | 22          |
| 4.1.1. Adsorpcija kitozana na živinu elektrodu.....                                             | 22          |
| 4.1.2. CPS i AdT CPS detekcija kitozana u morskoj vodi.....                                     | 22          |
| 4.1.3. Katalitički val vodika kitozana na živinoj elektrodi.....                                | 23          |
| 4.1.3.1. SWV eksperimenti.....                                                                  | 23          |
| 4.1.3.2. AdT CPS eksperimenti.....                                                              | 25          |
| 4.1.4. Utjecaj potencijala akumulacije, $E_a$ na AdT CPS kitozana.....                          | 26          |
| 4.1.5. Utjecaj pobudne struje, $I_{str}$ na AdT CPS kitozana.....                               | 27          |
| 4.1.6. Utjecaj vremena akumulacije ( $t_a$ ) i koncentracije kitozana na AdT CPS kitozana ..... | 29          |
| 4.1.7. Utjecaj ionske jakosti na AdT CPS kitozana.....                                          | 30          |
| 4.1.8. Stabilnost adsorbiranog sloja kitozana i ponovljivost AdT CPS mjerenja .....             | 31          |
| 4.2. Elektrokemijska svojstva BSA u morskoj vodi .....                                          | 34          |



|                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.1. Adsorpcija BSA na živinu elektrodu.....                                                 | 34        |
| 4.2.2. CPS i AdT CPS detekcija BSA u morskoj vodi.....                                         | 35        |
| 4.2.2.1. Katalitički val vodika BSA.....                                                       | 35        |
| 4.2.4. AdT CPS detekcija BSA u puferima .....                                                  | 39        |
| 4.2.4.1. Utjecaj potencijala akumulacije, $E_a$ na AdT CPS BSA.....                            | 40        |
| 4.2.4.2. Utjecaj pobudne struje, $I_{str}$ na AdT CPS BSA.....                                 | 40        |
| 4.2.4.3. Utjecaj vremena akumulacije, $t_a$ i koncentracije BSA na AdT CPS BSA .....           | 42        |
| 4.2.4.4. Stabilnost adsorbiranog sloja BSA nakon AdT i ponovljivost AdT CPS mjerenja .....     | 43        |
| <b>4.3. CPS detekcija smjese kitozan-BSA u morskoj vodi.....</b>                               | <b>46</b> |
| 4.3.1. Utjecaj kitozana na CPS detekciju BSA u morskoj vodi .....                              | 46        |
| 4.3.2. Utjecaj BSA na AdT CPS detekciju kitozana .....                                         | 47        |
| 4.3.3. Ispitivanje uvjeta za selektivnu detekciju kitozana i BSA u smjesi u morskoj vodi ..... | 48        |
| 4.3.3.1. Utjecaj $I_{str}$ na AdT CPS smjese.....                                              | 48        |
| 4.3.3.2. Utjecaj ionske jakosti puferirane otopine na AdT CPS smjese .....                     | 50        |
| 4.3.3.3. Utjecaj $E_b$ na AdT CPS smjese .....                                                 | 52        |
| 4.3.3.4. Ispiranje modificirane elektrode tijekom prijenosa.....                               | 53        |
| <b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>                                                                    | <b>55</b> |
| <b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>                                               | <b>57</b> |
| <b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>                                                            | <b>58</b> |
| <b>§ 8. ŽIVOTOPIS .....</b>                                                                    | <b>XV</b> |





Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### ELEKTROKEMIJSKA ANALIZA POLISAHARIDA KITOZANA I PROTEINA BSA U MORSKOJ VODI

Lora Pereža

U radu su prvi put istraženi detalji elektrokemijske analize modelnog aminopolisaharida kitozana, proteina goveđeg serum albumina (BSA), te njihove smjese u morskoj vodi. Mjerenja su izvedena na višećoj živinoj kapi koristeći adsorptivnu kronopotenciometriju s pobudnom strujom (CPS). Oba analita dala su karakterističan pik H ( $E_p = \sim -1.8$  V) kao posljedicu katalitičke redukcije vodikovih iona. Iako je samo BSA bilo moguće detektirati *in situ* u morskoj vodi, za oba analita je najosjetljivija detekcija bila nakon adsorptivnog prijenosa (AdT) iz morske vode u fosfatni pufer pH  $\sim 7,0$ . Stoga su definirani optimalni eksperimentalni uvjeti za njihovu AdT CPS analizu: potencijal akumulacije,  $E_a = -0,1$  V, vrijeme akumulacije,  $t_a = 60$  s, te pobudna struja,  $I_{str} = -20$   $\mu$ A za kitozan te  $I_{str} = -40$   $\mu$ A za BSA. AdT CPS detekcijom smjese dobiven je samo jedan pik H čime selektivna detekcija kitozana, a ni BSA u njihovoj smjesi nije bila moguća.

(60 stranica, 36 slika, 2 tablice, 59 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: BSA, kitozan, kronopotenciometrija, morska voda, pik H, živina elektroda

Mentor: dr. sc. Slađana Strmečki Kos, zn. sur., Institut Ruđer Bošković

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): Prof. dr. sc. Nives Galić

Ocjenitelji:

1. Prof. dr. sc. Nives Galić
  2. izv. prof. dr. sc. Željka Soldin
  3. doc. dr. sc. Morana Dulić
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Datum diplomskog ispita: 28.09.2018.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF POLYSACCHARIDE CHITOSAN AND BSA PROTEIN IN SEAWATER

Lora Pereža

The thesis explored for the first time the details of electrochemical analysis of chitosan aminopolysaccharide, BSA protein, and their seawater mixture. Measurements were performed on a hanging mercury drop electrode by using constant current chronopotentiometric stripping (CPS). Both analytes gave a characteristic peak H ( $E_p = \sim -1.8$  V) due to catalytic hydrogen evolution reaction. Although only BSA can be detected *in situ* in seawater, the most sensitive detection for both analytes was after an adsorptive transfer (AdT) from seawater to phosphate buffer pH  $\sim 7.0$ . Therefore, optimal experimental conditions for their AdT CPS analysis were defined: accumulation potential,  $E_a = -0.1$  V, accumulation time,  $t_a = 60$  s, and stripping current,  $I_{str} = -20$   $\mu$ A for chitosan and  $I_{str} = -40$   $\mu$ A for BSA. Only one AdT CPS peak H was observed in mixture, so selective detection of neither chitosan nor BSA in their mixture was possible.

(60 pages, 36 figures, 2 tables, 59 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: BSA, chitosan, chronopotentiometry, mercury electrode, peak H, seawater

Mentor: Dr. Slađana Strmečki Kos, Research Associate, Institute Ruđer Bošković

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Nives Galić, Full Professor

Reviewers:

1. Dr. Nives Galić, Full Professor
  2. Dr. Željka Soldin, Associate Professor
  3. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor

Date of exam: 28 September 2018



## § 1. UVOD

Otopljena organska tvar (engl. *dissolved organic matter*, DOM) u moru sadrži najveću koncentraciju reduciranog i potencijalno reaktivnog ugljika na Zemlji.<sup>1</sup> Unutar DOM-a, otopljena organska komponenta koja sadrži i dušik (engl. *dissolved organic nitrogen*, DON) predstavlja glavni oblik fiksiranog dušika. DON izravno sudjeluje u biogeokemiji dušika, najzastupljenijeg biogenog elementa nakon ugljika i kisika. U strukturnom pogledu, 70–90% morskog DON-a nalazi se u obliku amida, od čega glavni dio pripada aminokiselinama i aminošećerima.<sup>2</sup> Kada govorimo o polimerima, proteini i polisaharidi su glavni morski biopolimeri koji sadrže dušik i time sudjeluju u njegovom kruženju u prirodi. Istražujući i unapređujući analitičke metode za selektivnu detekciju specifičnih molekula koje čine DON doprinosi se boljem razumijevanju biogeokemije DON-a u morskom okolišu.

Analitičke metode koje se koriste za određivanje organskih spojeva koji sadrže dušik u morskoj vodi temelje se na specifičnim kemijskim reakcijama amino skupina s dodanim reagensom, a opsežno su istraživane uglavnom u 1970-tim i 1980-tim godinama. Spektrofotometrijska (ninhidrinska reakcija) i spektrofluorimetrijska detekcija (reakcija s o-ftalaldehidom ili fluorescaminom) najčešće su metode korištene u analizi amina.<sup>3</sup> Od nedavno se u određivanju aminošećera (glukozamina, galaktozamina, manozamina, muramične kiseline) u morskoj vodi koristi tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti s pulsним amperometrijskim detektorom (HPLC-PAD) koja ne zahtijeva prethodnu derivatizaciju, a čija je granica detekcije  $(2-10) \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$ .<sup>4,5</sup>

Što se tiče primjene elektrokemijskih metoda u analizi spojeva s dušikom u morskoj vodi, 2010. godine je kvantitativno karakteriziran polimerni organski materijal koji sadrži dušik (engl. *N-containing polymeric organic material*, N-POM) direktno u uzorcima morske vode iz sjevernog Jadrana.<sup>6,7</sup> Analiza se temeljila na detekciji karakterističnog elektrokemijskog katalitičkog "pika H" koristeći metodu adsorptivne kronopotenciometrije s pobudnom strujom (engl. *chronopotentiometric stripping*, CPS). Pritom je kao modelni spoj za kalibraciju korišten protein ljudski serum albumin (engl. *human serum albumin*, HSA) za kojeg je u nizu rastućih koncentracija pri istim eksperimentalnim uvjetima također detektiran pik H. Međutim, u to vrijeme nije bilo poznato da osim proteina također i aminopolisaharidi poput kitozana (polisaharid glukozamina i *N*-acetil-glukozamina) te aminooligosaharidi daju sličan

katalitički CPS pik  $H_{PS}$ , ali u acetatnom i McIlvaine-ovom puferu pri niskim pH vrijednostima.<sup>8,9</sup> Imajući na umu ove činjenice, te činjenicu da katalitički pik drastično ovisi o uvjetima detekcije, a posebno o pH i koncentraciji pufera,<sup>10</sup> od analitičke je važnosti istražiti da li je moguće, te u kojim eksperimentalnim uvjetima elektrokemijski detektirati modelni aminopolisaharid kao što je kitozan u morskoj vodi. Za razliku od navedenih pufera, pH morske vode je blago lužnat (pH  $\sim 8,20$ ) i sadrži prirodni karbonatni ( $2,3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i boratni ( $4,1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) puferski sistem.<sup>11</sup>

Cilj rada je istražiti CPS svojstva tri modelna sustava: samog aminopolisaharida kitozana, samog proteina goveđeg seruma albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA), te smjese kitozana i BSA. Mjerenja će se provesti *in situ* tj. direktno u morskoj vodi, te *ex situ* koristeći tehniku adsorptivnog prijenosa (engl. *adsorptive transfer*, AdT) iz morske vode u fosfatni (pH oko 6,00, 7,00, 8,00) i acetatni pufer (pH oko 5,30) jer su to najčešće korišteni puferi u dosadašnjim *in situ* CPS biofizičkim istraživanjima BSA<sup>12</sup> i kitozana,<sup>9</sup> a koja nisu bila povezana s DON niti morskom vodom. Nadalje, istražiti će se mogućnosti selektivne detekcije kitozana u morskoj vodi u prisustvu BSA. BSA je protein koji se najčešće koristi kao standardni protein u različitim analitičkim i biokemijskim istraživanjima, pa tako npr. i u fluorimetrijskoj analizi proteina<sup>13</sup> i čestica bogatih proteinima (engl. *Coomassie stainable particles*, CSP)<sup>14,15</sup> u moru.

Svrha rada je za svaki navedeni sustav definirati sljedeće optimalne CPS eksperimentalne uvjete: potencijal ( $E_a$ ) i vrijeme ( $t_a$ ) akumulacije te pobudnu struju ( $I_{str}$ ), dok je za *ex situ* tehniku AdT u fosfatni i acetatni pufer važno definirati optimalan pH, koncentraciju pufera, stabilnost prenesenog sloja, ponovljivost mjerenja, te utjecaj ionske jakosti na *ex situ* dobiveni pik. Specifičnim voltammetrijskim i CPS mjerenjima<sup>16</sup> potvrdit će se katalitička faradajska priroda elektrodnog procesa koji se odvija na radnoj elektrodi prilikom detekcije kitozana i BSA u morskoj vodi.

Protein HSA u morskoj vodi sudjeluje u katalitičkoj redukciji vodikovih iona što za posljedicu ima pojavu katalitičkog pika H na vrlo negativnom potencijalu u kronopotenciogramu.<sup>6</sup> Pretpostavka je da će i BSA zbog vrlo slične strukture i fizikalnih svojstava kao i HSA dati vrlo sličan pik H. Također je polazna hipoteza ovog rada da će i kitozan sudjelovati u katalitičkoj reakciji u morskoj vodi dajući pik  $H_{PS}$ , ali da će osjetljivost njegove detekcije u morskoj vodi biti manja u odnosu na detekciju u blago kiselom acetatnom puferu jer je poznato da se pik H smanjuje povišenjem pH vrijednosti.<sup>17</sup> Što se tiče njihove

selektivne detekcije u smjesi u morskoj vodi, hipoteza je da se ni BSA ni kitozan neće moći selektivno detektirati direktno u smjesi, ali da će ispiranje tijekom prijenosa iz morske vode u pufer omogućiti selektivno uklanjanje kitozana ili BSA s elektrode, a time i selektivnu detekciju.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Otopljeni organski dušik (DON) u moru

DON je u moru definiran kao frakcija organskog dušika koja prolazi kroz filter s veličinom pora 0,7  $\mu\text{m}$  ili 0,2  $\mu\text{m}$ .<sup>18</sup> Spojevi koji su dio DON-a sadrže i velike količine ugljika pa se DON smatra podskupinom rezervoara otopljenog organskog ugljika (engl. *dissolved organic carbon*, DOC). Ukupna koncentracija DON-a se dobije oduzimanjem koncentracija nitrata, nitrita i amonijaka (koje čine ukupni anorganski dušik) od koncentracije ukupnog otopljenog dušika (engl. *total dissolved N*, TDN).<sup>18</sup> Sastav kemijskih komponenti DON-a varira u veličini, kompleksnosti i otpornosti na degradaciju.<sup>19</sup> Najveći dio DON-a se nalazi u obliku amidnih funkcionalnih skupina koje pripadaju aminokiselinama i acetiliranim aminošećerima.<sup>2</sup> Aminokiseline se kao dio DON-a kvantificiraju kao ukupne hidrolizirane aminokiseline (engl. *total hydrolysable amino acids*, THAA) i kao dio DON-a velike molekulske mase (engl. *high molecular weight dissolved organic nitrogen*, HMWDON). Tako je u DON-u određeno 7–11 % THAA, dok u HMWDON aminokiseline predstavljaju 16–30 %. U takvom obliku one su važan izvor dušika i ugljika za bakterije. Najčešće aminokiseline koje se nalaze u moru su asparaginska i glutaminska kiselina, serin, histidin, glicin, treonin, arginin, tirozin, valin, izoleucin, fenilalanin, leucin i triptofan.<sup>18</sup> U vezanom obliku aminokiseline su monomerne jedinice peptida i proteina. Određivanja ukupnih proteina u DON-u su moguća raznim fluorimetrijskim i kolorimetrijskim metodama koje su prikladne za njihove semikvantitativne procjene u moru. Ukupna proteinska tvar u moru čini oko 12 % ukupnog DON-a,<sup>20</sup> među koje spadaju i glikoproteini.<sup>21</sup> Većina proteina u oceanu ima molekulsku masu u rasponu od 14 do 66 kDa.<sup>20</sup> Ugljikohidrati u morskoj vodi uključuju neutralne monosaharide, aminošećere, te kisele polisaharide poput fosfo- i sulfopolisaharida.<sup>4,22,23</sup> Aminošećeri se nalaze u velikim količinama u planktonu i bakterijama, važne su strukturne komponente prokariotske stanične stijenke, a javljaju se i kao dio peptidoglikana, lipopolisaharida i pseudopeptidoglikana. 2000. godine Kaiser i Benner su razvili HPAEC-PAD metodu koja je omogućila kvantitativno određivanje aminošećera u morskim uzorcima pa su zatim određene koncentracije najzastupljenijih aminošećera u Pacifičkom oceanu.<sup>4</sup> Koncentracije glukozamina i galaktozamina u

HMWDOM frakciji površinskih voda su bile otprilike  $(17-56) \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$  i  $(10-36) \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$ , odnosno  $(2,3-5,8) \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$  i  $(3,8-5,8) \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$  na većim dubinama. Kvantificirana je i muraminska kiselina, aminošećer koji je dio peptidoglikana u staničnoj stijenci bakterija i njena koncentracija je bila u rasponu od  $(0,12-0,78) \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$ . Koncentracija manozamina je bila ispod granice detekcije. Oni čine (2–5)% HMWDOM, odnosno u prosjeku (0,7–1,5)% ukupnog DON-a.

Aminošećeri se mogu naći i kao dio drugih polisaharida, glikoproteina i glikolipida koji su česti za mnoge organizme.<sup>5</sup> Hitin je jedan od važnih strukturnih polimera aminošećera *N*-acetil-glukozamina, a uvelike se proizvodi od raznih morskih organizama. Procijenjeno je da je oko 10 % morske bakterijske proizvodnje podržano hitinom.

Sastav organske tvari (polisaharidi, monosaharidi, proteini i aminokiseline) te varijabilnost između različitih oceanskih regija može biti važna u razumijevanju uloge bakterija i otopljene organske materije u kruženju ugljika i regeneraciji dušika u oceanu. Kako je DON sastavljen od mnogo različitih organskih supstrata, iskorištenje i metabolizam DON-a uključuje višestruki transport proteina te izvanstanične i unutarstanične enzime. Proučavanje DON metabolizma bi moglo koristiti za poboljšanja u genomičkim istraživanjima zbog informacija dobivenih o raznolikosti i kataboličkim putevima u kultiviranim i nekultiviranim mikroorganizmima.<sup>19</sup>

## 2.2. Elektrokemijska analiza polisaharida

Polisaharidi imaju amfipatsku strukturu, odnosno sastoje se od hidrofilnog i hidrofobnog dijela, što ih čini površinski aktivnim tvarima. Takva svojstva omogućavaju njihovu adsorpciju na različitim prirodnim i modelnim granicama faza. Kod elektrokemijske analize polisaharida važna su njihova adsorpcijska svojstva na granici faza radna živina elektroda/elektrolit, gdje polisaharidi favoriziraju adsorpciju na hidrofobnu površinu te elektrode.<sup>24</sup> Iako se adsorbiraju na elektrodu, polisaharidi su elektroinaktivni i ne daju analitički upotrebljiv redukcijski ili oksidacijski signal. Zato je dugi niz godina njihova analiza bila ograničena samo na istraživanja adsorpcijskih svojstava. 2009. godine je dokazano da elektroinaktivni polisaharidi sa sulfatnim skupinama daju pik u acetatnom puferu pri pH 5,30, koristeći CPS metodu, koji nalikuje na tzv. pik H koji se inače dobije analizom peptida i proteina, pa je pik polisaharida nazvan „pik H<sub>PS</sub>“. Dobivanje dobro definiranog pika H<sub>PS</sub> ovisi omjernim faktorima kao što su pH i koncentracija pufera.<sup>25</sup> Njihova direktna detekcija u morskoj vodi nije moguća, već je potrebno primijeniti tehniku AdT iz morske

vode u acetatni pufer pH 5,30.<sup>26</sup> Ovom metodom su analizirani i modelni spojevi karagenani, sulfatirani polimeri galaktoze koji se prirodno nalaze u staničnim stijenkama crvenih morskih makroalgi (*Rodophyta*). Analizirana su tri konformacijski različita karagenana,  $\kappa$ -,  $\iota$ -,  $\lambda$ -karagenan te su dobiveni katalitički pikovi mjerenjem u specifičnim elektrokemijskim parametrima za svaki spoj (potencijal i vrijeme akumulacije, te pobudna struja). Zatim su se počeli elektrokemijski istraživati i testirati polisaharidi s drugim funkcionalnim skupinama. Otkriveno je da aminopolisaharid kitozan (polisaharid glukozamina i *N*-acetil-glukozamina) katalizira nastajanje vodika na živinoj elektrodi što je detektirano CPS metodom u acetatnom i McIlvaine-ovom puferu pri slabo kiselim pH vrijednostima.<sup>8,9</sup>

### 2.3. Elektrokemijska analiza proteina

Povijest elektrokemijske analize proteina u odgovarajućim puferima je započela 1930. kada su Heyrovsky i Babička otkrili tzv. prednatrijev polarografski val.<sup>27</sup> Dugi niz godina su se radile polarografske analize proteina u otopinama koje sadrže Co ili Ni (Brdičkina reakcija) dok je prednatrijev val bilo teže detektirati zbog njegove blizine osnovnoj struji. U 90-tima je primijenjena CPS analiza s konstantnom strujom u analizi peptida vazopresina u amonijakalnom puferu, pH 7,80 te je dobiven dobro definiran prednatrijev katalitički pik vodika nazvan pik H.<sup>28</sup> Pritom se pokazalo da je CPS metoda znatno osjetljivija i brža u odnosu na voltametrijske pulsne metode u detekciji pika H.

Elektrokemijska analiza spojeva s dušikom u morskoj vodi je prvi put napravljena 2010. godine kada je kvantitativno karakteriziran polimerni organski materijal koji sadrži dušik (N-POM) direktno u uzorcima morske vode iz sjevernog Jadrana.<sup>6</sup> Elektrokemijska metoda koja je korištena u analizi je bila CPS, a detekcija se temeljila upravo na karakterističnom piku H. Kao modelni spoj je korišten protein HSA pomoću kojeg je napravljen kalibracijski pravac očekivanih koncentracija N-POM u moru. Analiza je napravljena u morskoj vodi bez dodatka pufera jer je more prirodna puferirana otopina (pH ~ 8,20) koja sadrži karbonatni i boratni puferski sustav.<sup>11</sup> CPS pik H koji je dobiven u otopini HSA je bio rezultat prednatrijeve katalize elektroredukcije vodikovih iona gdje je katalizator bio HSA. Također je napravljena i voltametrijska (pravokutnovalna, SWV i ciklička, CV) detekcija u istim eksperimentalnim uvjetima te su rezultati pokazali da je CPS metoda osjetljivija za detekciju katalitičkog pika H te time i prikladnija kvalitativno i kvantitativno određivanje proteinskog materijala koji je dio organske tvari u morskoj vodi.

## 2.4. Katalitički val vodika

Katalitičko razvijanje vodika je jedna od najčešćih elektrokemijskih reakcija jer se elektoredukcija vodikovih iona na elektrodi odvija uz određeni prenapon koji se može smanjiti upotrebom katalizatora. Katalizator je posrednik u prijenosu protona iz otopine do elektrode gdje se spaja s drugim vodikovim atomom te nastaje plinovita molekula vodika. Postoje tri grupe katalizatora na živinoj elektrodi: „prednatrijevi“ katalizatori, metalni katalizatori i Brdičkin katalizator.<sup>10,29</sup> Prednatrijev katalizator je sama organska molekula poput proteina, peptida, polisaharida, metalni katalizatori su ioni metala iz platinske skupine (Pt, Ru, Rh, Pd, Ir, Os), a Brdičkin katalizator je kompleks atoma sumpora iz proteina ili peptida i kobaltovog (II) iona iz heksaaminkobaltovog(III)-klorida,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_3]\text{Cl}_3$ , u amonijakalnom puferu,  $(\text{RS}_2\text{Co})$ . Prvi otkriveni prednatrijev katalizator nastajanja vodika na živinoj elektrodi je bio HSA. Katalitičko nastajanje vodika se odvijalo na pozitivnijem potencijalu nego što je elektoredukcija natrijevih iona i stoga se takva kataliza naziva prednatrijevom katalizom. Osim proteina, polisaharidi sa određenim skupinama u strukturi kao što su sulfatne skupine<sup>25</sup> i amino skupine<sup>9</sup> su također prednatrijevi katalizatori.

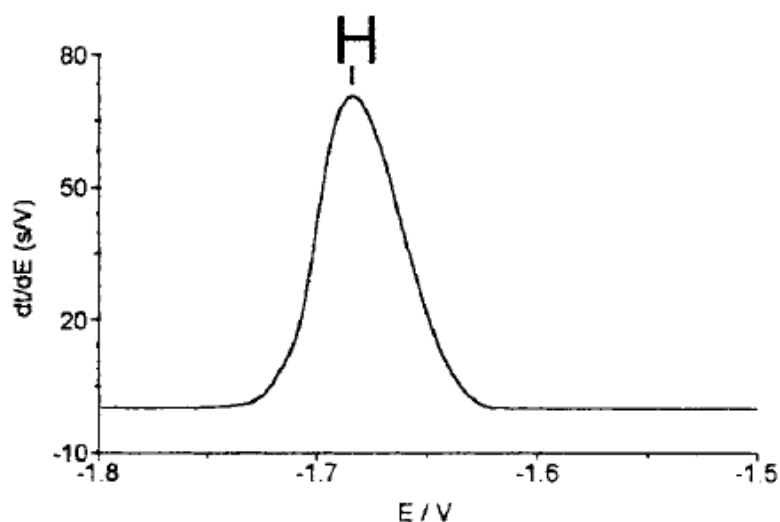
Katalitička redukcija vodika može se opisati sljedećim reakcijama:<sup>12</sup>



gdje su PH i  $\text{P}^-$  protonirani i deprotonirani aminokiselinski ostatak u proteinu, BH je kiselinska komponenta pufera, a  $\text{B}^-$  je njezina konjugirana baza. Simboli u zagradama predstavljaju stanje molekula ((aq) znači vodeni, (pov) površinski, (g) plinoviti). Ove reakcije impliciraju da je katalizator protein adsorbiran na površinu elektrode. Druga reakcija označava regeneraciju katalizatora pomoću pufera.

Katalitički aktivna vrsta najčešće nije redoks aktivna, što uvelike povećava broj spojeva koji mogu biti analizirani elektrokemijskim metodama. Ključni atom u molekuli koji nosi slobodni elektronski par je dušik, kisik, fosfor ili sumpor prigodno smješten u molekulskoj strukturi katalizatora. Ključni korak katalitičkog procesa je kontakt molekule i protoniranog atoma s površinom živine elektrode, do kojeg najčešće dolazi prilikom procesa adsorpcije katalizatora na elektrodu.<sup>10</sup> Kako je prenapon elektoredukcije vodika na živinoj elektrodi najviši u odnosu na druge metalne elektrode, elektroda viseće živine kapi (engl. *hanging mercury drop electrode*, HMDE) je postala idealni alat za istraživanja i primjenu u katalizi nastajanja vodika. Kod HMDE brzina snimanja potencijala može biti različita te je moguća

akumulacija analita na površini elektrode da se poveća osjetljivost.<sup>30</sup> CPS metoda je prvi put primijenjena u analizi peptida i proteina mikromolarnih i submikromolarnih koncentracijana živinoj elektrodi 1998. godine te su dobiveni katodni signali koji ovise o prisutnosti cistinskih i/ili cisteinskih grupa, odnosno o prisutnosti sumpora.<sup>28</sup> Takav CPS prednatrijev katalitički pik vodika je tada nazvan „pik H“ prema *catalytic hydrogen evolution, high sensitivity* i Jaroslav Heyrovsky (slika 1.).

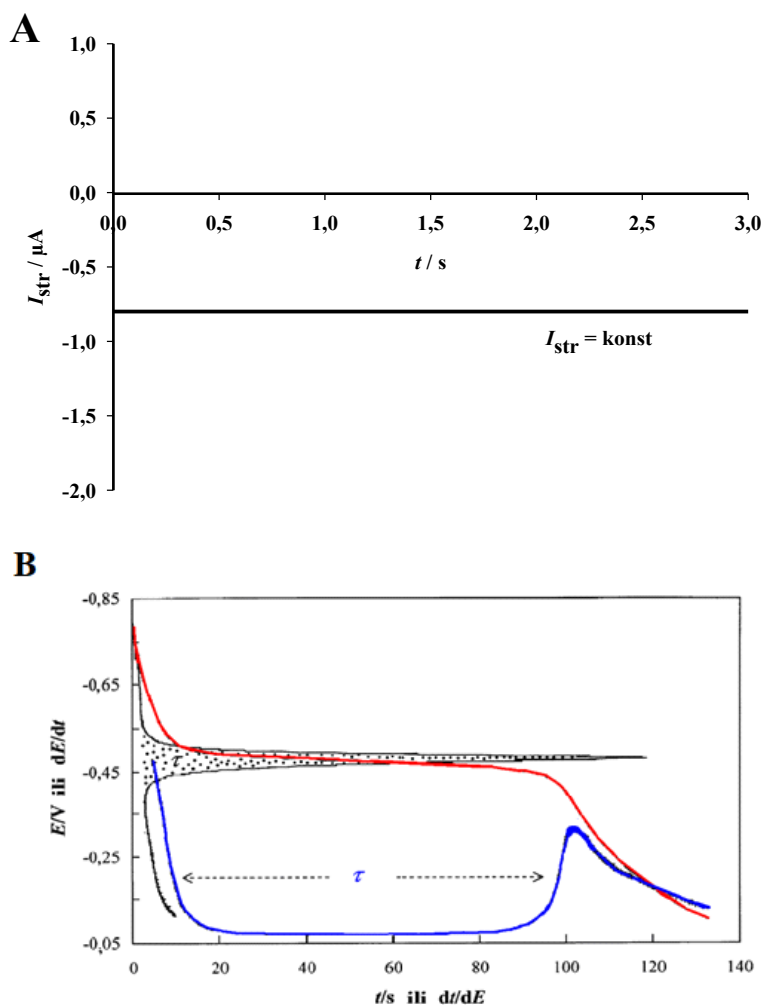


Slika 1. Pik H dobiven CPS analizom proteina vazopresina ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na HMDE u amonijakalnom puferu bez dodatka kobalta, pH 7,80,  $E_a$  0,0 V,  $t_a$  60 s,  $I_{\text{str}}$  20  $\mu\text{A}$ . Slika je preuzeta iz literaturnog izvora<sup>28</sup>

Pik H je postao važan alat u elektrokemijskoj strukturnoj analizi peptida i proteina te se može upotrijebiti za detekciju promjena u njihovoj strukturi kao što je denaturacija,<sup>31</sup> redoks stanje,<sup>32</sup> agregacija,<sup>33</sup> mutacija,<sup>34</sup> kemijska modifikacija,<sup>35</sup> i oštećenje.<sup>36</sup>

## 2.5. Kronopotenciometrija

Kronopotenciometrija je elektroanalitička metoda koja detektira promjenu potencijala radne elektrode kao funkciju vremena,  $E = f(t)$ . U mjerenjima s predkoncentracijskim korakom analit se akumulira iz otopine na površinu radne elektrode određeno vrijeme te na određenom potencijalu akumulacije, a zatim slijedi “*stripping*” proces. S obzirom na vrstu analita razlikujemo kronopotenciometriju s otapanjem kada su analit tragovi metala, a radna elektroda je živina elektroda, gdje se akumulirani metal reoksidira iz amalgama. Ako je analit organska molekula adsorbirana u predkoncentracijskom koraku na površinu elektrode onda se ona reducira ili oksidira i ta metoda se naziva adsorptivna kronopotenciometrija. Pobuda se provodi na dva načina: primjenom konstantne vanjske struje (galvanostatska pobuda)<sup>37</sup> ili kemijskom reakcijom (kemijska pobuda).<sup>38</sup> Konstantnu struju proizvodi galvanostat i ona može biti pozitivna (anodna) ili negativna (katodna), ovisno da li analit treba oksidirati ili reducirati. Kemijska reakcija se provodi uz suvišak iona Hg(II), otopljeni kisik, ione Au(III) ili KMnO<sub>4</sub>, ovisno o analitu i vrsti radne elektrode. Rezultati mjerenja se osim u obliku  $E = f(t)$  mogu prikazati i kao  $(dE/dt) = f(t)$  i  $(dE/dt)^{-1} = f(E)$  (slika 2).<sup>39</sup> Signal  $(dE/dt)^{-1} = f(E)$  ima oblik pika kojeg karakterizira vrh pika u odnosu na baznu liniju,  $(dE/dt)^{-1}_{\max}$ , površina ispod pika,  $\tau$ , (kvantitativna analiza) te potencijal koji odgovara vrhu pika,  $E_p$  karakterističan za pojedini analit (kvalitativna analiza) (slika 2).



Slika 2. A: CPS signal pobude, B: CPS signal odziva:  $E = f(t)$  (crveno), odgovarajući derivirani oblici  $(dE/dt) = f(t)$  (plavo), te  $(dE/dt)^{-1} = f(E)$  (crno). Slika B je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru<sup>39</sup>

CPS se primjenjuje u specijaciji tragova metala,<sup>39,40</sup> anorganskih aniona,<sup>41</sup> te organskih molekula kao što su nukleinske kiseline, peptidi i proteini<sup>27</sup> koji daju CPS signale zbog faradajskih procesa na živinoj elektrodi. Promjenom eksperimentalnih uvjeta je moguće postići povećanje osjetljivosti metode, i to duljim vremenom akumulacije ( $t_a$ ) i/ili smanjenjem pobudne struje ( $I_{str}$ ).

## 2.6. Voltametrija

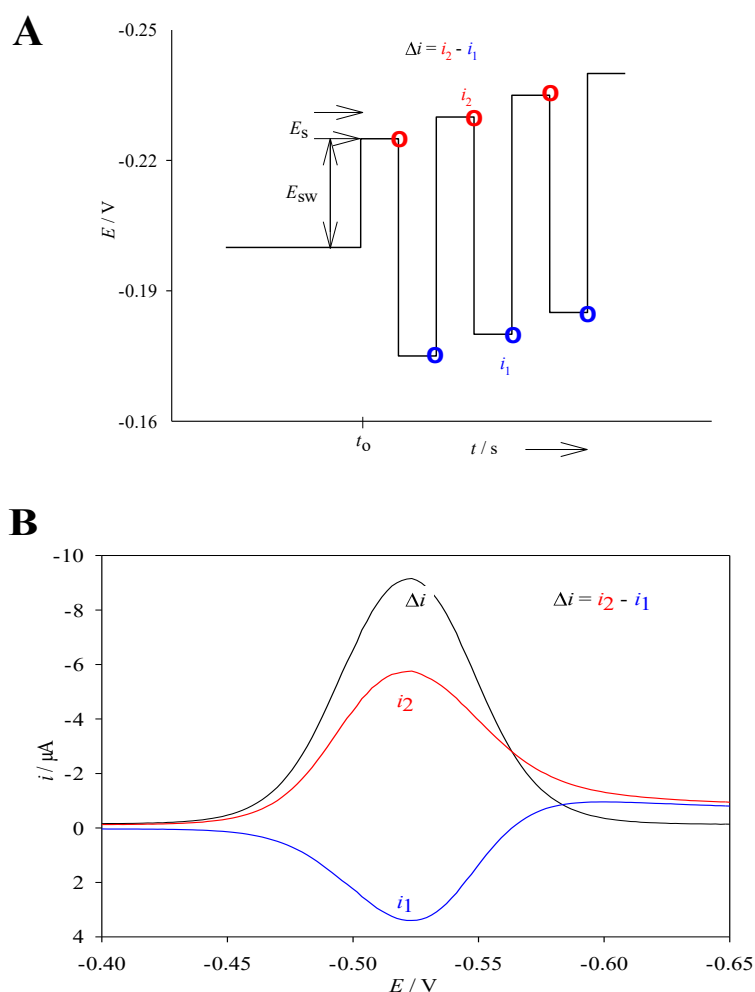
Voltametrija je naziv za skupinu elektroanalitičkih postupaka u kojima je signal pobude električni napon, a signal odziva je struja elektrolitne ćelije. Naziv voltametrija je skraćenica za volt-amper-metriju. Oblik i vremenska ovisnost signala pobude mogu biti

različiti pa zato postoje različite voltammetrijske tehnike.<sup>42</sup> Razvile su se iz klasične polarografije koju je 1922. godine izumio i primijenio češki kemičar Jaroslav Heyrovsky za što je i 1959. godine dobio Nobelovu nagradu za kemiju.

U elektrolitnoj ćeliji se nalazi troelektrodni sustav s radnom, pomoćnom i referentnom elektrodom. Potencijal referentne elektrode je konstantan i prema njemu se izražava potencijal radne elektrode. Redoks reakcija se odvija na površini radne elektrode.<sup>42</sup>

### 2.6.1. Pravokutnovalna voltametrija

Jedna od najosjetljivijih pulsnih metoda je pravokutno valna voltametrija (engl. *square-wave voltammetry*, SWV) koju su prvi opisali Osteryoung i Osteryoung.<sup>43</sup> Kod ove metode signal pobude je simetričan pravokutnovalni puls određene amplitude,  $E_{sw}$  i frekvencije  $f$ , a svaki sljedeći puls je uvećan za korak potencijal,  $E_s$ . Polazni (forward) puls proizvodi katodnu struju ( $i_2$ ), a povratni (backward) puls proizvodi anodnu struju ( $i_1$ ) (slika 3A). Razlika ove dvije struje daje ukupnu struju,  $\Delta i = i_2 - i_1$  kao funkciju potencijala te voltamogramima oblik zvonolike simetrične krivulje (slika 3B).



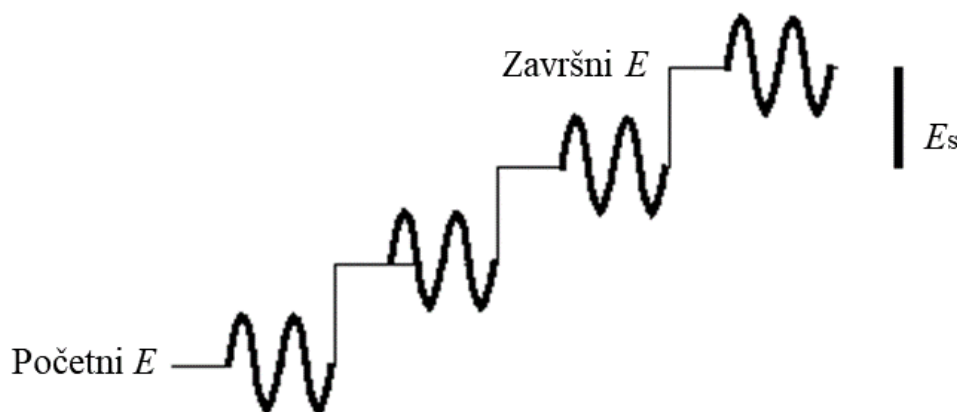
Slika 3. A: pravokutnovalna promjena potencijala u vremenu (pobuda), B: pravokutnovalni voltamogram reverzibilne redukcije (odziv)

U reverzibilnim sustavima potencijal maksimuma odgovara polarografskom poluvalnom potencijalu. Taj potencijal je kod ireverzibilnih procesa manji nego kod reverzibilnih jer  $i_2$  i  $i_1$  imaju isti predznak dok je kod reverzibilnih predznak struja različit.

Prednosti ove metode su to što može mjeriti na frekvencijama i do  $2000\text{ s}^{-1}$  pa mjerenja traju jako kratko te je zbog smanjenog omjera signal-šum vrlo osjetljiva metoda. Kod SWV pik nastaje zbog faradajskih procesa te je visina pika direktno proporcionalna koncentraciji elektroaktivne vrste. Zbog ovih prednosti SWV se koristi u mjerenjima kataliziranih homogenih kemijskih reakcija, određivanju kemijskih vrsta u tragovima, te se može koristiti kao elektrokemijski detektor kod HPLC sustava.

### 2.6.2. Voltametrijaz izmjenične struje

Voltametrijaz izmjenične struje (engl. *alternating current voltammetry*, ACV) je elektrokemijska metoda koja je ovisna o frekvenciji te je karakterizirana amplitudama malih potencijala u vremenu kao signal pobude (slika 4).<sup>44</sup>



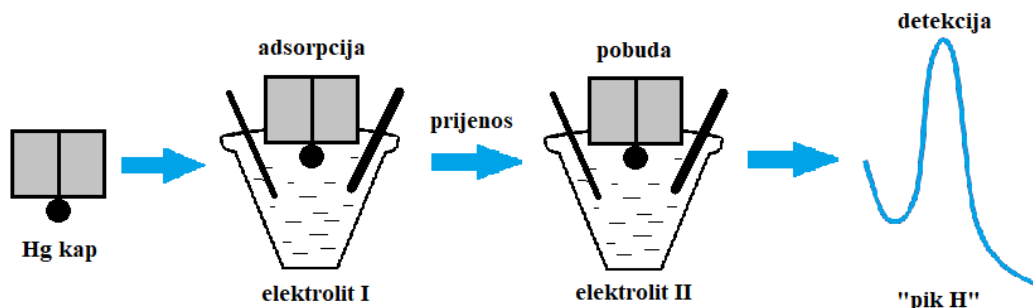
Slika 4. Signal pobude u ACV

Ova metoda omogućava nezavisno mjerenje kapacitivne struje ( $I_c$ ) ili faradajske struje ( $I_f$ ) kao funkcije elektrodnog potencijala. Kapacitivna struja je ona struja koja nastaje kao posljedica nabijanja električnog dvosloja na površini elektrode, a faradajska struja nastaje zbog prijenosa elektrona između depolarizatora i elektrode, odnosno zbog procesa redukcije ili oksidacije analita. U mjerenjima ove dvije struje možemo razlikovati primjenom sinusoidalnog pobudnog potencijala *izvan* ili *u fazi* u odnosu na struju. Ako se primijeni potencijal *izvan faze* (fazni kut,  $\Phi = 90^\circ$ ) mjerit ćemo kapacitivnu struju, a ako se primijeni potencijal *u fazi* ( $\Phi = 0^\circ$ ) dobije se faradajska struja.<sup>45</sup> Mjerenja kapacitivne struje na živinoj i drugim metalnim elektrodama se nazivaju tenzometrijska mjerenja, te se koriste u analizama tvari koje se adsorbiraju na površinu elektrode, ali ne podliježu reakcijama oksidacije ili redukcije. Odziv signala nastaje zbog procesa adsorpcije odnosno desorpcije električki neutralne ili nabijene molekule na elektrodu odnosno s elektrode. Takvi procesi su karakteristični za mnoge biološki važne molekule te se ACV široko primjenjuje za analizu adsorpcije nukleinskih kiselina, proteina, polisaharida, kao i za analizu površinski aktivnih tvari prisutnih u prirodnim vodama.

## 2.7. Tehnika adsorptivnog prijenosa

Adsorptivni prijenos (engl. *adsorptive transfer*, AdT) je *ex situ* tehnika koja se može primijeniti na bilo koju radnu elektrodu i sa bilo kojom adsorptivnom elektrokemijskom

metodom. Kod ove tehnike se prvo odvija akumulacija analita na površinu elektrode u jednom mediju, a zatim se takva modificirana elektroda prenosi u drugi elektrolit gdje se provodi elektrokemijska detekcija (slika 5).



Slika 5. Tehnika adsorptivnog prijenosa s kronopotenciometrijskom detekcijom (AdT CPS)

Ova tehnika omogućuje elektroanalizu u nekoliko slučajeva: kada analiza nije moguća u otopini gdje je analit prisutan, kada je volumen uzorka analita vrlo mali (npr. jedna kap od oko 5  $\mu\text{L}$ ), ako je potrebno odvajanje analita na temelju različitih adsorptivnih svojstava te ako na mjerenje utječu interakcije u otopini.<sup>46</sup> Najčešće se primjenjuje u analizi biomolekula kao što su nukleinske kiseline, oligonukleotidi, peptidi, proteini, polisaharidi.

## 2.8. Dobivanje, svojstva i upotreba kitozana

Hitin se gotovo isključivo koristi kao sirovina za industrijsku proizvodnju kitozana. Hitin je drugi najzastupljeniji biopolimer u prirodi. Kao glavna strukturna komponenta nalazi se u skeletu člankonožaca te u staničnim stjenkama gljiva i lišajeva. Ova dva polimera imaju sličnu kemijsku strukturu. Hitin se sastoji od linearnog lanca *N*-acetil-glukozamina dok kitozan nastaje uklanjanjem dovoljnog broja acetilnih skupina sa hitina. Ovaj proces se naziva deacetilacija i provodi se djelovanjem jake lužine (KOH) nakon čega nastaje kitozan s određenim udjelom kemijski reaktivnih amino skupina ( $-\text{NH}_2$ ).<sup>47,48</sup> Stoga je kitozan kopolimer glukozamina i *N*-acetil-glukozamina. Stupanj deacetilacije je bitno svojstvo u proizvodnji kitozana jer utječe na njegova fizikalna i kemijska svojstva, odnosno određuje vrstu njegove primjene. Hitin sa stupnjem deacetilacije  $> 50\%$  se najčešće karakterizira kao kitozan.<sup>49,50</sup>

Kitozan je netoksični biorazgradivi polimer glukoze velike molekulske mase, sličan celulozi. Jedina razlika kitozana i celuloze je amino skupina ( $-\text{NH}_2$ ) na C-2 atomu kitozana gdje se nalazi hidroksilna skupina ( $-\text{OH}$ ) kod celuloze. Za razliku od celuloze, kitozan posjeduje pozitivan ionski naboj koji mu daje sposobnost interakcije i kemijskog vezivanja s

negativno nabijenim mastima, lipidima, kolesterolom, metalnim ionima, i proteinima. Karakterističan je po tome što stvara gelove te uz to posjeduje svojstva vezana uz viskoznost, potpunu biorazgradivost, pa čak i antitumorska djelovanja. Njegova bakteriostatska i fungistatska svojstva su korisna za tretmane rana. Mnogi derivati kitozana su biokompatibilni i netoksični u živim tkivima. Kitozan ima široku primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i tekstilnoj industriji, biomedicini, biotehnologiji, te u tretiranju otpadnih voda.<sup>51</sup> Slaba topljivost u vodi je glavni limitirajući faktor u njegovoj primjeni. Ključni dio za pomak u iskorištenju je kemijska modifikacija kitozana da bi se uključile razne funkcionalne skupine koje ne bi promijenile temeljni kostur polimera ni originalna fizikalna, kemijska i biokemijska svojstva, a dale bi mu i neka poboljšana svojstva. Topljivost kitozana u razrijeđenim kiselinama ovisi o stupnju deacetilacije, ionskoj jakosti, pH, prirodi kiseline u kojoj se otapa, molekulskoj masi, distribuciji acetilnih grupa duž polimera,<sup>49</sup> ali i o kristalnoj strukturi zbog koje ga je u određenom slučaju moguće otopiti i u vodi.<sup>47</sup> Njegova topljivost najbolja je u slabim kiselinama poput mravlje i octene kod  $\text{pH} < 6$  jer tada dolazi do protonacije svih njegovih amino skupina ( $\text{pK} = 6,3$ ).<sup>49</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Kemikalije i otopine

U radu su korištena dva analita: kitozan (MW = 5 000 Da, stupanj deacetilacije > 90%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) i protein BSA (MW = 66 463 Da, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka). Koncentrirana otopina kitozana,  $\gamma = 2 \times 10^{-3} \text{ g cm}^{-3}$  te BSA,  $\gamma = 5 \times 10^{-3} \text{ g cm}^{-3}$  priređene su otapanjem određene odvage praha kitozana i liofiliziranog BSA u Milli-Q vodi. Otopine ovih koncentracija su se po potrebi dodatno razrjeđivale.

Kao osnovni elektrolit koristila se „čista“ morska voda. Ona se pripremila uklanjanjem organske tvari iz morske vode prethodno uzorkovane u sjevernom Jadranu. Voda je najprije bila profiltrirana preko filtera veličina pora  $0,7 \mu\text{m}$  (GF/F, Whatman) da bi se uklonila čestična organska tvar, zatim je 24 sata bila izložena UV zračenju (150 W UV lampa) da bi se razorila otopljen organska tvar, a nakon toga je sljedeća 24 sata bila ostavljena u posudi s aktivnim ugljenom koji adsorbira organsku tvar, a koji je nakon toga profiltriran preko Buchnerovog lijevka.

Korišteni fosfatni puferi (pH oko 6,00–8,00, koncentracija 0,01–0,1 mol dm<sup>-3</sup>) su priređeni miješanjem određenog omjera volumena otopina pripremljenih otapanjem NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (ACS reagens, 98,0–100,0 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) i Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Merck-Millipore, Darmstadt, Njemačka) u Milli-Q vodi. Acetatni pufer (pH 5,28, koncentracije 0,05 mol dm<sup>-3</sup>) je priređen miješanjem određenog omjera volumena CH<sub>3</sub>COOH i otopine priređene otapanjem CH<sub>3</sub>COONa(s) (oboje kupljeno od Kemike, Zagreb, Hrvatska) u Milli-Q vodi.

Ostale korištene kemikalije bile su:

- Milli-Q voda, 18,2 MΩ cm, dobivena iz Milli-Q filter sustava (Millipore, USA), koristila se za priređivanje i razrjeđivanje otopina te za pranje elektroda i ćelija
- vodena otopina natrijeva klorida,  $c = 5,5 \text{ mol dm}^{-3}$ , pripremljena otapanjem NaCl(s) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka),
- dušična kiselina (Kemika, Zagreb, p.a.) priređena 10 % otopina, za pranje elektroda i ćelija
- metanol (Kemika, Zagreb), za pranje radne elektrode po potrebi

- etanol (Kemika, Zagreb), za ispiranje modificirane elektrode
- vodena otopina kalijeva hidroksida,  $c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pripremljena otapanjem KOH(s) (Kemika, Zagreb)
- 2-propanol (99,9 %, Riedel-de Haen, Njemačka), za ispiranje modificirane elektrode
- vodena otopina kalijeva klorida,  $c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pripremljena otapanjem KCl(s) (Riedel-de Haen, Njemačka)
- vodena otopina amonijeva acetata,  $c = 0,25 \text{ mol dm}^{-3}$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka), za ispiranje modificirane elektrode
- aceton (Kemika, Zagreb), za ispiranje modificirane elektrode
- urea,  $c = 4 \text{ mol dm}^{-3}$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka), za ispiranje modificirane elektrode
- olovjev nitrat,  $c = 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka), za ispiranje modificirane elektrode
- Tris-HCl,  $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ , za ispiranje modificirane elektrode
- SDS deterdžent,  $c = 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ , za ispiranje modificirane elektrode
- Triton-X-100 deterdžent,  $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ , (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka), za ispiranje modificirane elektrode

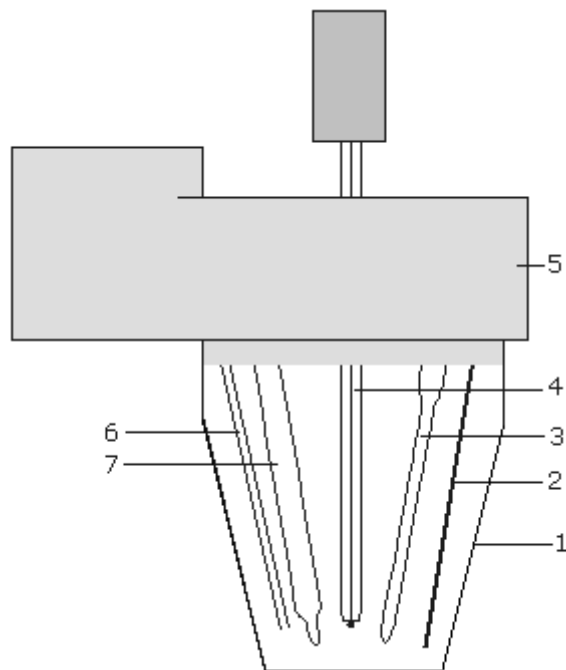
### 3.2. Instrumentacija i pribor

Sva mjerenja su izvedena koristeći  $\mu$ AUTOLAB tip III potenciostat/galvanostat (Metrohm-Autolab, Utrecht, Nizozemska) spojen s 663VA Stand troelektrodnim sustavom i IME (Interface for Mercury Electrode) jedinicom te upravljan programom GPES 4.9 (General Purpose Electrochemical System) s osobnog računala (slika 6).



Slika 6. 663VA Stand troelektroдни sustav povezan s  $\mu$ AUTOLAB potencijostat/galvanostat i IME jedinicom

Shematski prikaz troelektrodnog sustava prikazan je na slici 7. Elektrokemijska ćelija je bila od stakla, mogućeg volumena otopine od  $10\text{ cm}^3$  do  $90\text{ cm}^3$  u koju su uronjene tri elektrode, miješalo i cjevčica za dovod inertnog plina dušika (99,999%) iz čelične boce. Živina kap (engl. *hanging mercury drop electrode*, HMDE) površine  $0,40\text{ mm}^2$  je bila radna elektroda. Referentna elektroda je bila Ag/AgCl elektroda s  $3\text{ mol dm}^{-3}$  KCl u elektrolitnom mostu, a kao pomoćna elektroda se koristio štapić od staklastog grafitu veličine  $2 \times 65\text{ mm}$ . Poklopac ćelije ima otvor s čepom kroz koji se otopina može titrirati.



Slika 7. Shematski prikaz korištenog troelektrodnog sustava: 1-elektrokemijska ćelija, 2-pomoćna elektroda, 3-referentna elektroda, 4-staklena kapilara, 5-držač od teflona, 6-cjevčica za dovod dušika, 7-rotirajuće teflonsko miješalo

Živina kap je preko staklene kapilare povezana s rezervoarom žive volumena  $6\text{ cm}^3$  što je dovoljno za oko 200000 kapi žive. Teflonsko miješalo ima 6 brzina, a u mjerenjima je otopina miješana brzinom  $1500\text{ min}^{-1}$ . Sva mjerenja su provedena pri sobnoj temperaturi ( $25\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ ).

Za kontroliranje pH vrijednosti pripremljenih pufera i mjerenih otopina korišten je stolni pH metar sa staklenom Ag/AgCl elektrodom (Hanna Instruments, Hrvatska) kalibriran s Hanna puferskim standardima (pH 4,01 i pH 9,01).

Od staklenog posuda su korištene menzure od  $100\text{ cm}^3$ , čaše od 10 do  $50\text{ cm}^3$ , te odmjerne tikvice od 25 i  $50\text{ cm}^3$ . Otopine su pipetirane mikropipetama (Eppendorf) s izmjenjivim plastičnim nastavcima volumena od 2 do  $5000\text{ }\mu\text{L}$ . Sav naveden laboratorijski pribor kao i elektrodni sustav i ćelija su prije upotrebe oprani 10 %-tnom dušičnom kiselinom te nakon toga više puta isprani Milli-Q vodom.

### 3.3. Uvjeti mjerenja

U mjerenjima je korištena adsorptivna kronopotenciometrija s konstantnom pobudnom strujom (engl. *constant current chronopotentiometric stripping*, CPS), pravokutnovalna voltametrija (engl. *square-wave voltammetry*, SWV), i voltametrija izmjenične struje (engl. *alternating current voltammetry*, ACV). Za CPS metodu se rezultati u GPES4.9 programu automatski prikazuju kao  $(dE/dt)^{-1} = f(E)$  što je najprikladnije za njihovu kvalitativnu i kvantitativnu interpretaciju. Za svako mjerenje provedeno u ovom radu bili su definirani sljedeći CPS parametri u GPES:

- potencijal akumulacije,  $E_a = -0,1$  V do  $-1,2$  V
- vrijeme akumulacije,  $t_a = 60$  s
- vrijeme uravnoteženja otopine,  $t_{eq} = 1$  s
- pobudna struja,  $I_{str} = -3$   $\mu$ A do  $-100$   $\mu$ A
- granični (limit) potencijal,  $E_{lim} = -2$  V
- maksimalno vrijeme mjerenja,  $t_{max} = 3$  s.

U ovom radu SWV je korištena u istraživanju prirode elektrodnog procesa kitozana u  $0,05$  mol dm<sup>-3</sup> fosfatnom puferu nakon uklanjanja kisika, u sljedećim mjernim uvjetima:

- vrijeme uvođenja dušika u otopinu,  $t(N_2) = 300$  s
- potencijal akumulacije,  $E_a = -0,1$  V
- vrijeme akumulacije,  $t_a = 60$  s
- korak potencijal,  $E_s = 4$  mV
- amplituda,  $E_{sw} = 25$  mV.

U mjerenjima je korištena samo ACV *izvan faze* da bi saznali koja koncentracija korištenih analita kitozana i BSA pokriva cijelu površinu HMDE radne elektrode, a zatim su sva CPS i SWV mjerenja napravljena s takvim odabranim koncentracijama. ACV mjerenja su provedena u morskoj vodi bez prethodnog uklanjanja kisika, u sljedećim mjernim uvjetima:

- potencijal akumulacije,  $E_a = -0,1$  V
- vrijeme akumulacije,  $t_a = 60$  s
- frekvencija,  $f = 77,35$  Hz
- fazni kut,  $\Phi = 90^\circ$
- korak potencijala,  $E_s = 10$  mV
- amplituda,  $a = 10$  mV.

*Ex situ* mjerenja su provedena adsorptivnim prijenosom iz morske vode u odgovarajući pufer.

### **3.4. Obrada podataka**

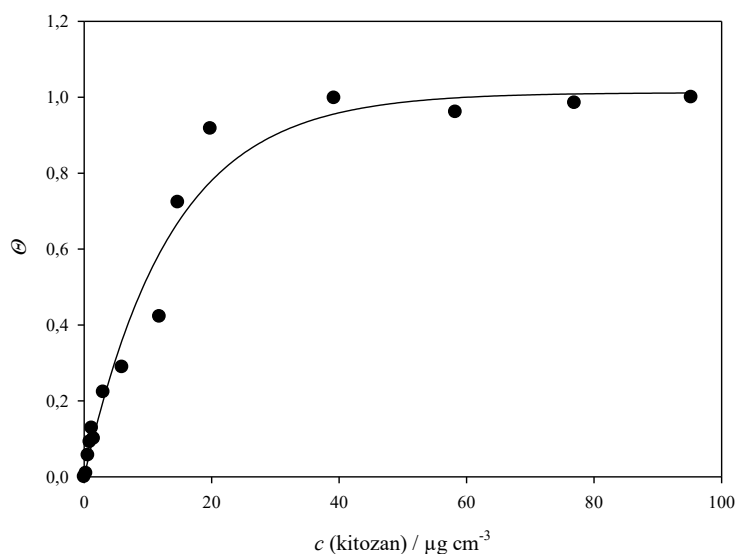
Svako mjerenje ponovljeno je dva puta te je za daljnu obradu uzeta srednja vrijednost. Snimljeni kronopotenciogrami te SWV i ACV voltamogrami analizirani su u GPES programu tako da su očitani visina pika i položaj pika. Sve ovisnosti napravljene su u programu Origin 9.0 te u programima razvijenim u Zavodu za istraživanje mora i okoliša.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Elektrokemijska svojstva kitozana u morskoj vodi

#### 4.1.1. Adsorpcija kitozana na živinu elektrodu

Napravljena su ACV mjerenja *izvan faze* da bi odredili pri kojim koncentracijama kitozana dolazi do maksimalne prekrivenosti površine radne elektrode. Mjerenja su rađena pri  $E_a = -0,6$  V u rasponu koncentracija kitozana od  $0,2 \text{ g cm}^{-3}$  do  $100 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ . Ovisnost prekrivenosti površine elektrode ( $\theta$ ) o koncentraciji kitozana je prikazana na slici 8. Adsorpcijski plato nastaje pri koncentracijama višim od  $20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$  kada dolazi do potpune prekrivenosti površine elektrode. Za daljnja mjerenja kitozana odabrana je koncentracija  $50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$  gdje je potpuna pokrivenost površine.

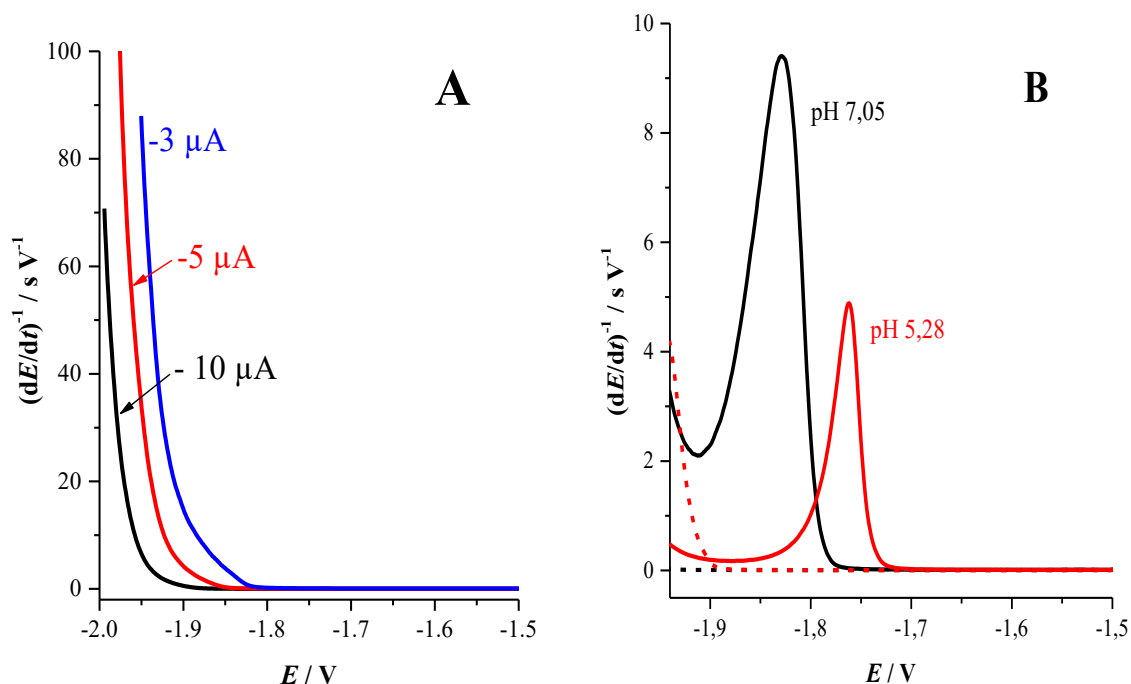


Slika 8. Adsorpcijska izoterma kitozana u morskoj vodi (pH 8,20) mjerena ACV *izvan faze* ( $\phi = 90^\circ$ ), uvjeti mjerenja:  $E_a = -0,6$  V,  $t_a = 60$  s

#### 4.1.2. CPS i AdT CPS detekcija kitozana u morskoj vodi

*In situ* CPS mjerenjem kitozana u morskoj vodi (pH 8,20) nije dobiven analitički upotrebljiv signal ni pri visokim vremenima akumulacije ( $t_a = 300$  s) niti pri niskim pobudnim strujama kao što je  $-3 \text{ }\mu\text{A}$  što je prikazano na slici 9A. Zato je primijenjena AdT tehnika prijenosa iz elektrolita I (morska voda) u elektrolit II (fosfatni ili acetatni pufer) koja je omogućila CPS

detekciju pika kitozana u elektrolitu II (slika 9B). Pik kitozana je smješten na vrlo negativnom potencijalu ( $E_p = -1,8$  V) te je dobro definirane visine u odnosu na osnovni kronopotenciogram. Ispitana je priroda elektrodnog procesa kitozana na živinoj elektrodi te su definirani optimalni parametri za AdT CPS detekciju pika kitozana: potencijal akumulacije ( $E_a$ ), vrijeme akumulacije ( $t_a$ ) i pobudna struja ( $I_{str}$ ), te utjecaj pH, ionske jakosti i koncentracije pufera (elektrolita II) na nastajanje pika.



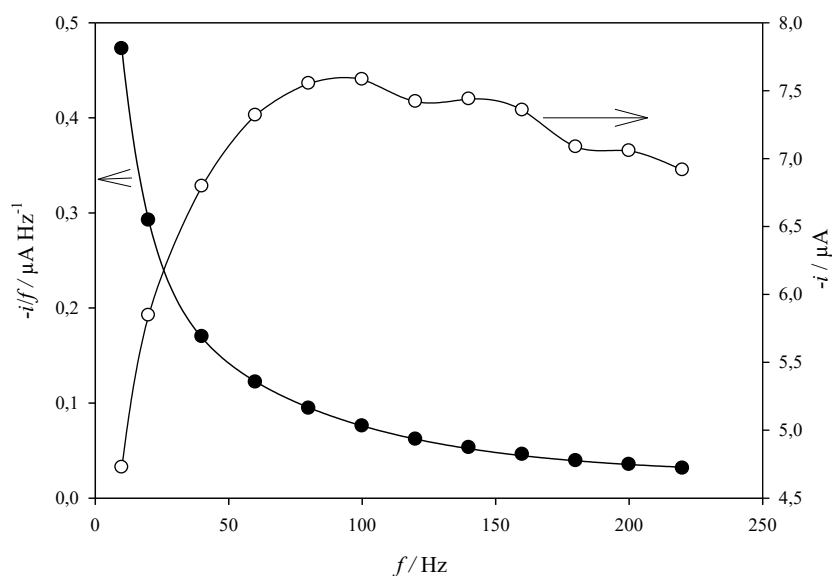
Slika 9. A) Kronopotenciogrami *in situ* mjerenja kitozana u morskoj vodi,  $E_a = -0,1$  V,  $t_a = 60$  s, B) AdT CPS pik kitozana u  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu, pH 7,05 i acetatnom puferu, pH 5,28,  $E_a = -0,1$  V,  $t_a = 60$  s,  $I_{str} = -20 \mu A$

#### 4.1.3. Katalitički val vodika kitozana na živinoj elektrodi

Provedeni su sljedeći specifični SWV i CPS eksperimenti da se ispita priroda elektrodnog procesa kitozana na živinoj elektrodi u  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu, pH 7,05: ovisnost  $i/f$  o  $f$  i reverzibilnost reakcije u SWV, te ovisnost o pH i koncentraciji pufera u AdT CPS.

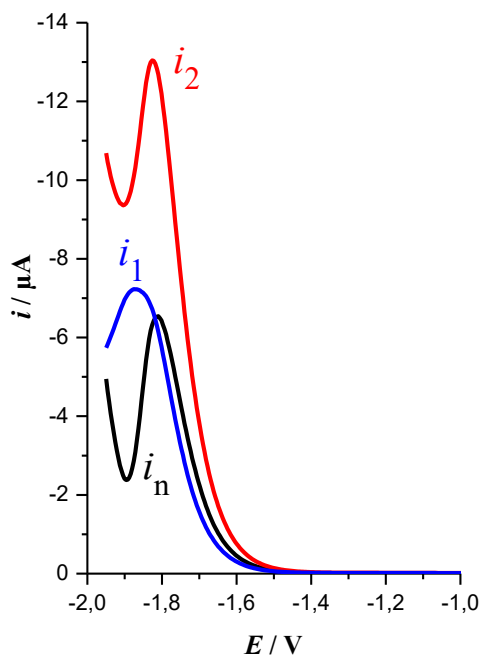
##### 4.1.3.1. SWV eksperimenti

Ovisnosti visine pika kitozana o frekvenciji,  $f = 10$  Hz do 220 Hz prikazana je na slici 10. Povećanjem frekvencije,  $f$  dolazi do eksponencijalnog pada vrijednosti  $i/f$  što je karakteristično za katalitičko ponašanje organskih molekula.<sup>52</sup>



Slika 10. Utjecaj SWV frekvencije,  $f$  na ukupnu struju pika kitozana  $i$  (bijelo) te na  $i/f$  (crno) *in situ* u  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu pH 7,05

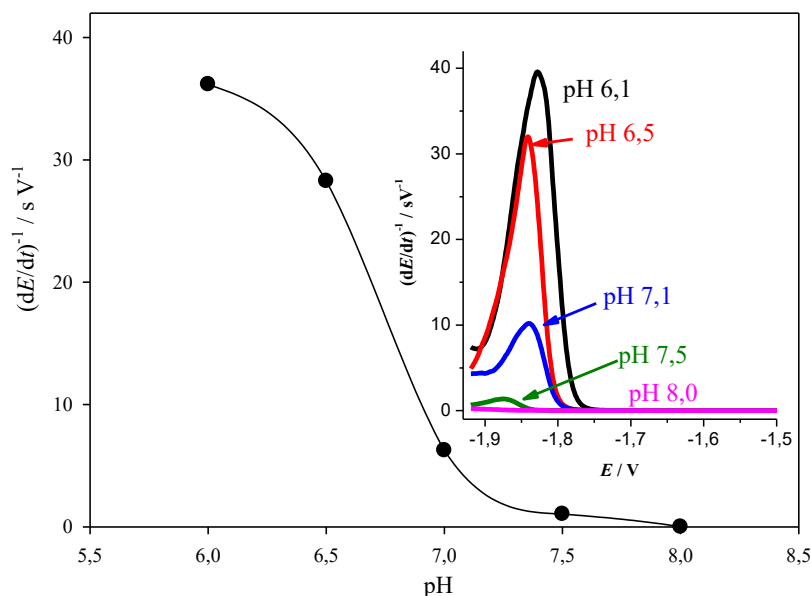
Obje struje, polaznog ( $i_2$ ) i povratnog ( $i_1$ ) pulsa su u negativnom (redukcijskom) strujnom rasponu pa je ukupna struja ( $i_n = i_2 - i_1$ ) negativna (slika 11) što upućuje na ireverzibilan proces kakav je katalitička redukcija vodika na živinoj elektrodi.<sup>53</sup>



Slika 11. Pravokutnovalni voltamogram ireverzibilnog procesa redukcije kitozana pri frekvenciji,  $f = 10 \text{ Hz}$

## 4.1.3.2. AdT CPS eksperimenti

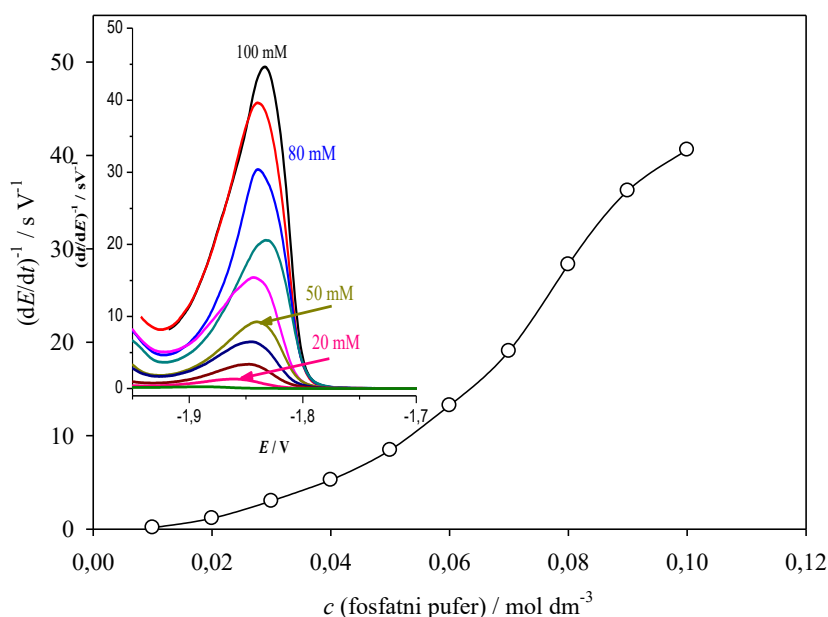
Na slici 12 je prikazana ovisnost visine pika kitozana o pH fosfatnog pufera u rasponu od pH 6,00 do pH 8,00. Smanjenjem pH vrijednosti pufera visina pika se povećava što ukazuje da kitozan sudjeluje u katalitičkom elektrodnom procesu redukcije vodikovih iona na živinoj elektrodi.



Slika 12. AdT CPS ovisnost visine pika kitozana ( $c = 50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) o pH 0,05 mol  $\text{dm}^{-3}$  fosfatnog pufera. Uvjeti mjerenja:  $I_{\text{str}} = -20 \mu\text{A}$ ,  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $t_a = 60\text{s}$ . Umetak: kronopotenciogrami kitozana sa promjenom pH fosfatnog pufera

Ovakvo ponašanje kitozana je rezultat sudjelovanja primarnih aminoskupina u katalitičkoj redukciji nastajanja vodika na živinoj elektrodi kao i u prijašnjim CPS rezultatima.<sup>9</sup> Pri nižim pH vrijednostima pufera je koncentracija vodikovih iona viša pa nastaju i viši katalitički pikovi.

Ispitivanjem ovisnosti visine pika kitozana o koncentraciji fosfatnog pufera (pH 7,05) je također potvrđeno da se radi o katalitičkoj reakciji nastajanja vodika na živinoj elektrodi. U rasponu koncentracija fosfatnog pufera od 0,01 do 0,1 mol  $\text{dm}^{-3}$  visina pika kitozana se postepeno povećavala (slika 13). Ovakve ovisnosti o koncentraciji pufera također su u skladu s ponašanjima signala ostalih biomolekula, najčešće proteina i peptida koje kataliziraju elektrodni proces redukcije vodikovih iona na živinoj elektrodi.<sup>10,17,29</sup>



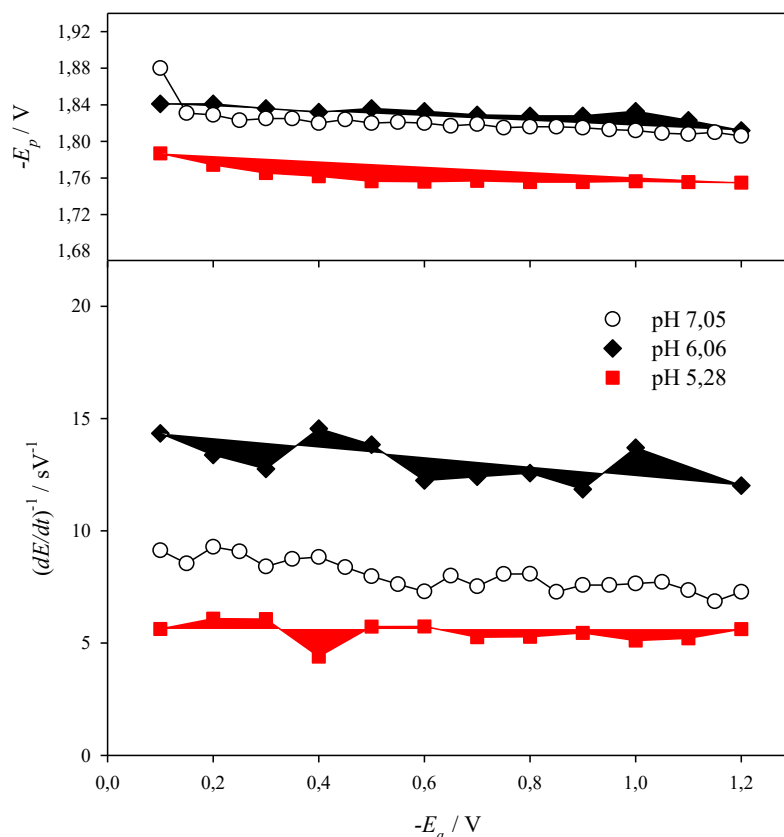
Slika 13. AdT CPS ovisnost visine pika kitozana ( $c = 50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) u fosfatnom puferu, pH 7,05 koncentracija od  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  do  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$ ,  $I_{\text{str}} = -20 \mu\text{A}$ .

Umetak: kronopotenciogrami kitozana sa povećanjem koncentracije fosfatnog pufera

Dobiven eksponencijalni pad u ovisnost  $i/f$  o  $f$ , ireverzibilnost reakcije redukcije, povećanje visine pika smanjenjem pH vrijednosti te povećanjem koncentracije fosfatnog pufera potvrđuju da je pik kitozana katalitičke (ubrzane faradajske) prirode. To je u skladu s rezultatima mjerenja kitozana u  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  acetatnom puferu, pH 5,2 i u McIlvainovom puferu, pH 5,6 gdje je također utvrđeno da je pik ( $E_p$  oko  $-2 \text{ V}$ ) posljedica katalitičke redukcije vodikovih iona na deacetiliranim aminoskupinama.<sup>8</sup> Pošto je katalitička molekula kitozana polisaharid (PS), taj pik ćemo nazivati „pik  $H_{\text{PS}}$ “.

#### 4.1.4. Utjecaj potencijala akumulacije, $E_a$ na AdT CPS kitozana

Ovisnost o potencijalu akumulacije ( $E_a$ ) je ispitana na potencijalima  $E_a = -0,1 \text{ V}$  do  $-1,2 \text{ V}$ . Mjerenja su napravljena u fosfatnom puferu pH 7,05 i pH 6,06 te u acetatnom puferu pH 5,28. Mjerenja u fosfatnom puferu pH 8,06 nisu napravljena jer je visina pika vrlo mala i pri vrlo niskim pobudnim strujama ( $-5 \mu\text{A}$ ). Promjena potencijala akumulacije nije znatno utjecala na visinu pika  $H_{\text{PS}}$  u svim puferima (slika 14A).  $E_p$  se također nije značajno mijenjao sa promjenom  $E_a$  (slika 14B).



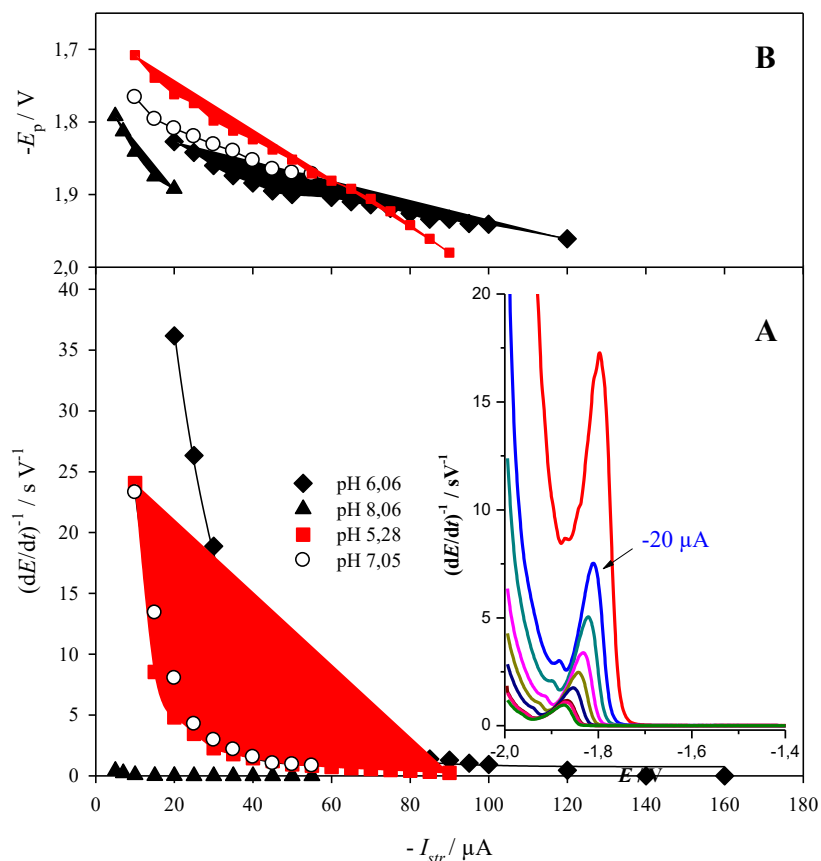
Slika 14. AdT CPS ovisnost visine (A) i položaja (B) pika  $H_{PS}$  kitozana ( $c = 50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) o potencijalu akumulacije,  $E_a$ , detektiranomu fosfatnom puferu pH 7,05, pH 6,06 te acetatnom puferu pH 5,28. Uvjeti mjerenja:  $I_{str} = -20 \text{ } \mu\text{A}$  (pH 7,05),  $-30 \text{ } \mu\text{A}$  (pH 6,06) i  $-20 \text{ } \mu\text{A}$  (pH 5,28),  $t_a = 60 \text{ s}$

Kako  $E_a$  nije značajno utjecao na promjenu visine niti položaja pika  $H_{PS}$  kitozana, za sve pufere je odabran potencijal akumulacije od  $-0,1 \text{ V}$  koji je korišten u svim daljnjim mjerenjima.

#### 4.1.5. Utjecaj pobudne struje, $I_{str}$ na AdT CPS kitozana

Visina pika  $H_{PS}$  se eksponencijalno smanjila primjenom negativnijih pobudnih struja ( $I_{str}$   $-10$  do  $-160 \text{ } \mu\text{A}$ ) u fosfatnim puferima pH 7,05 i pH 6,06 i u acetatnom puferu pH 5,28. U fosfatnom puferu pH 8,06 su snimljeni vrlo mali pikovi i pri struji od  $-5 \text{ } \mu\text{A}$  gdje je visina pika bila  $0,417 \text{ s V}^{-1}$ , dok pri struji negativnijoj od  $-30 \text{ } \mu\text{A}$  pik  $H_{PS}$  više nije detektiran (slika 15A). U puferu pH 6,06 dobiveni su pikovi i pri vrlo negativnim strujama ( $-160 \text{ } \mu\text{A}$ ) dok su u puferu pH 7,05 na strujama negativnijim od  $-55 \text{ } \mu\text{A}$  te u acetatnom puferu pH 5,28 od  $-90 \text{ } \mu\text{A}$

detektirani pikovi negativnije od  $E_p -2,0$  V pa se ne mogu očitati zbog ograničenja mjerenja instrumenta na potencijalima negativnijim od  $-2,0$  V. Položaj pika  $H_{PS}$  se sa negativnijim  $I_{str}$  pomicao prema negativnijim vrijednostima potencijala u sva četiri pufera što nam govori da katalitička reakcija favorizira manje negativne pobudne struje (slika 15B).



Slika 15. AdT CPS ovisnost visine (A) i položaja (B) pika  $H_{PS}$  kitozana ( $c = 50 \times 10^{-6} g cm^{-3}$ ) o pobudnoj struji,  $I_{str}$  u fosfatnim puferima pH 8,06, pH 7,05 i pH 6,06 te acetatnom pH 5,28;

uvjeti mjerenja:  $E_a = -0,1$  V,  $t_a = 60$  s. Umetak u A: kronopotenciogrami kitozana sa povećanjem pobudne struje u fosfatnom puferu pH 7,05 s istaknutom optimalnom strujom od  $-20 \mu A$

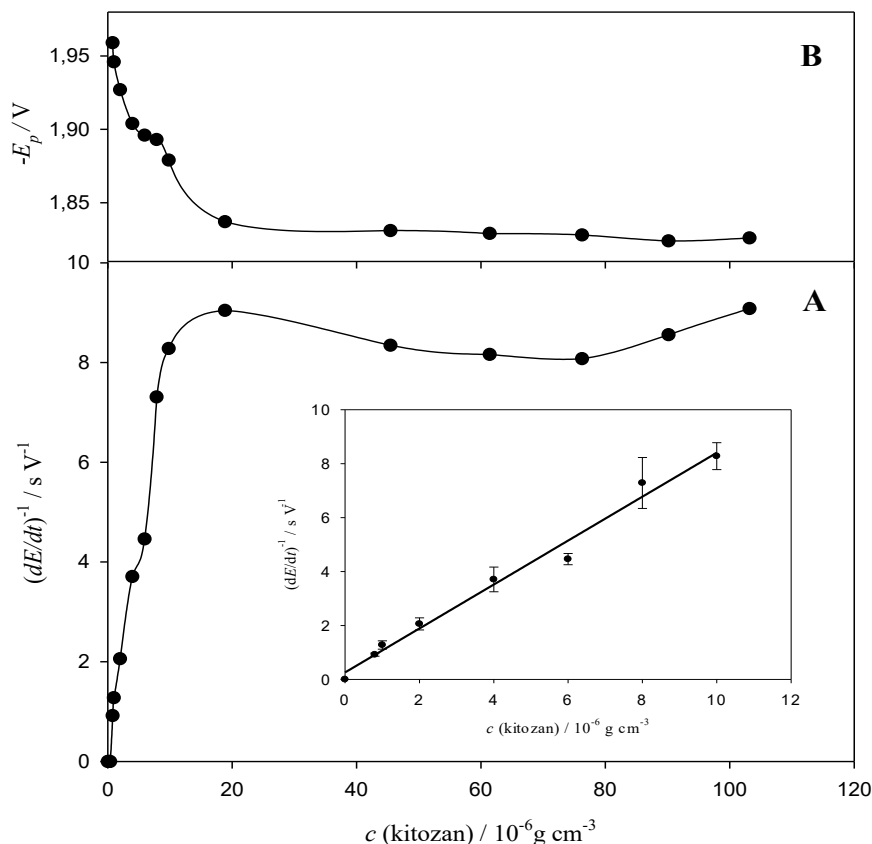
Promjena pobudne struje u CPS mjerenjima uzrokuje različite dinamičke interakcije adsorbiranih molekula s površinom živine elektrode.<sup>54</sup> Što je struja negativnija, promjene elektrokatalitičkih uvjeta su brže pa su time i katalitički aktivne molekule kraće vrijeme izložene djelovanju električnog polja uz samu površinu elektrode te nastaje manji pik  $H_{PS}$ . Kod manje negativnih pobudnih struja je obrnuta situacija. Za svaki pH je uzeta druga

optimalna struja koja je najprikladnija za daljnja mjerenja: za pH 7,05 je odabrano  $-20 \mu\text{A}$ , za pH 6,06 je odabrana struja  $-30 \mu\text{A}$ , a za pH 5,28 struja  $-20 \mu\text{A}$ . Sa fosfatnim puferom pH 8,06 nisu provedena daljnja mjerenja.

#### 4.1.6. Utjecaj vremena akumulacije, $t_a$ i koncentracije kitozana na AdT CPS kitozana

Napravljena su AdT CPS mjerenja  $50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$  kitozana kod različitih vremena akumulacije,  $t_a$  od 1 s do 300 s. Povećanjem  $t_a$  visina pika  $H_{PS}$  nije se puno mijenjala. Razlog je taj što je ovo visoka koncentracija kitozana te je i pri kratkim  $t_a$  površina elektrode zasićena. Za razliku od ove visoke koncentracije, kada se mjeri ovisnost  $5 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$  kitozana o  $t_a$ , pik se postepeno povećava do  $t_a$  300 s (nije prikazano).

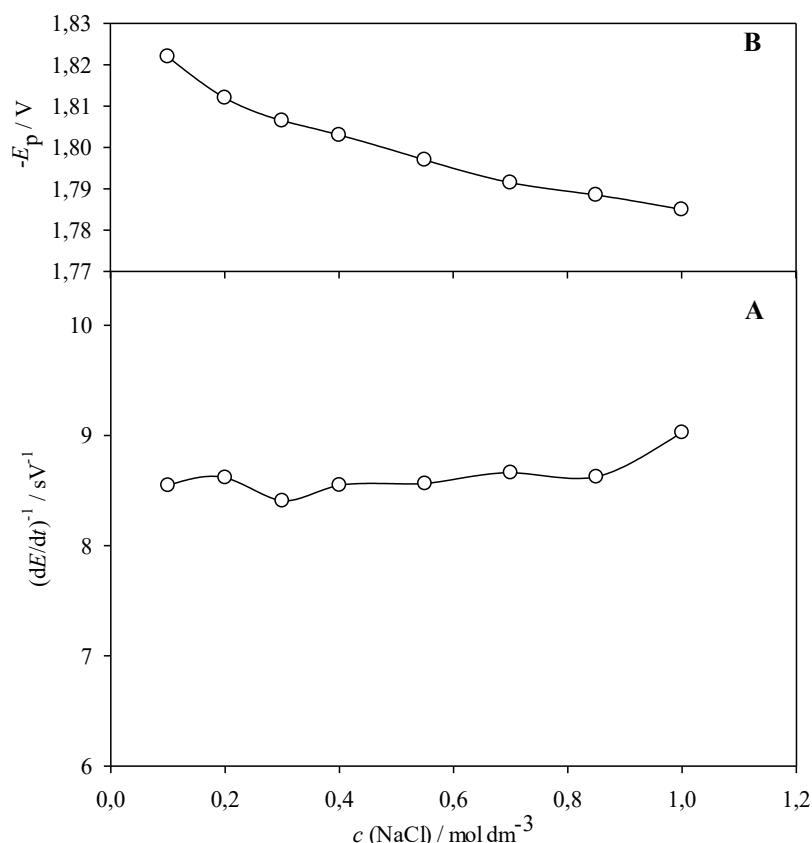
Povećanjem koncentracije kitozana ( $c = 0,2 - 100 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) pik  $H_{PS}$  se povećavao linearno do  $10 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$  ( $y = 0,814 \pm 0,0981 \text{ x}$ ), dok je pri višim koncentracijama dosegno limit koji je popraćen adsorpcijskom izotermom (slika 16A).  $E_p$  pika  $H_{PS}$  kitozana se s povećanjem koncentracije pomiče prema pozitivnijim strujama što nam govori da je katalitička reakcija favorizirana kod većeg broja adsorbiranih katalitičkih skupina na površini elektrode pa je i katalitički pik viši (slika 16B). Za linearni dio povećanja, prije zasićenja elektrode, izračunata je granica detekcije koja iznosi  $1,44 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ .



Slika 16. Ovisnost visine (A) i položaja (B) pika  $H_{PS}$  kitozana s povećanjem koncentracije kitozana u fosfatnom puferu pH 7,05. Uvjeti mjerenja:  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $I_{str} = -20 \mu\text{A}$ ,  $t_a = 60\text{s}$

#### 4.1.7. Utjecaj ionske jakosti na AdT CPS kitozana

Promjenom ionske jakosti puferirane otopine dodatkom  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  do  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl nije došlo do značajne promjene visine pika  $H_{PS}$  kitozana, dok je pomak položaja pika bio značajan, i to prema pozitivnijim vrijednostima (od  $-1,82 \text{ V}$  do  $-1,78 \text{ V}$ ) (slika 17). Visina katalitičkih pikova ne ovisi o ionskoj jakosti, ali položaj katalitičkih pikova ovisi.<sup>55</sup> Naime, povećanjem ionske jakosti smanjuje se debljina dvosloja uz samu površinu elektrode i povećava se kapacitet dvosloja čime je katalitička redukcija energetski olakšana, a to se uočava kao pomak katalitičkog pika prema manje negativnim potencijalima.<sup>17</sup>

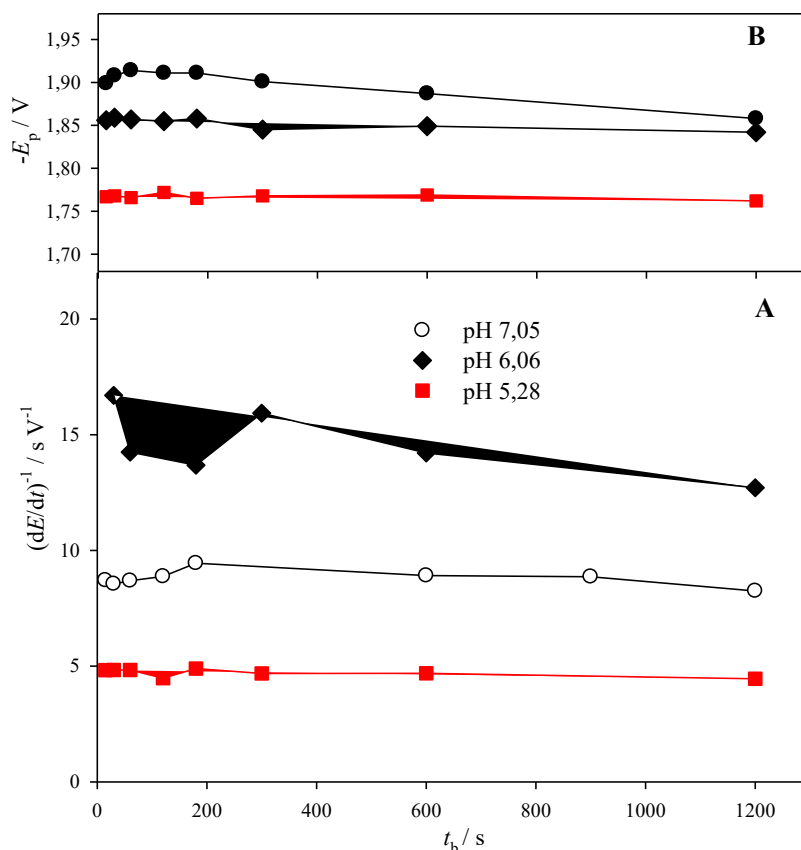


Slika 17. AdT CPS mjerenja kitozana ( $c = 50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) iz morske vode (pH 8,20) u  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatni pufer, pH 7,05 s dodatkom NaCl koncentracija ( $0,1\text{--}1$ )  $\text{mol dm}^{-3}$ , uvjeti mjerenja:  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $I_{\text{str}} = -20 \text{ }\mu\text{A}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$

#### 4.1.8. Stabilnost adsorbiranog sloja kitozana i ponovljivost AdT CPS mjerenja

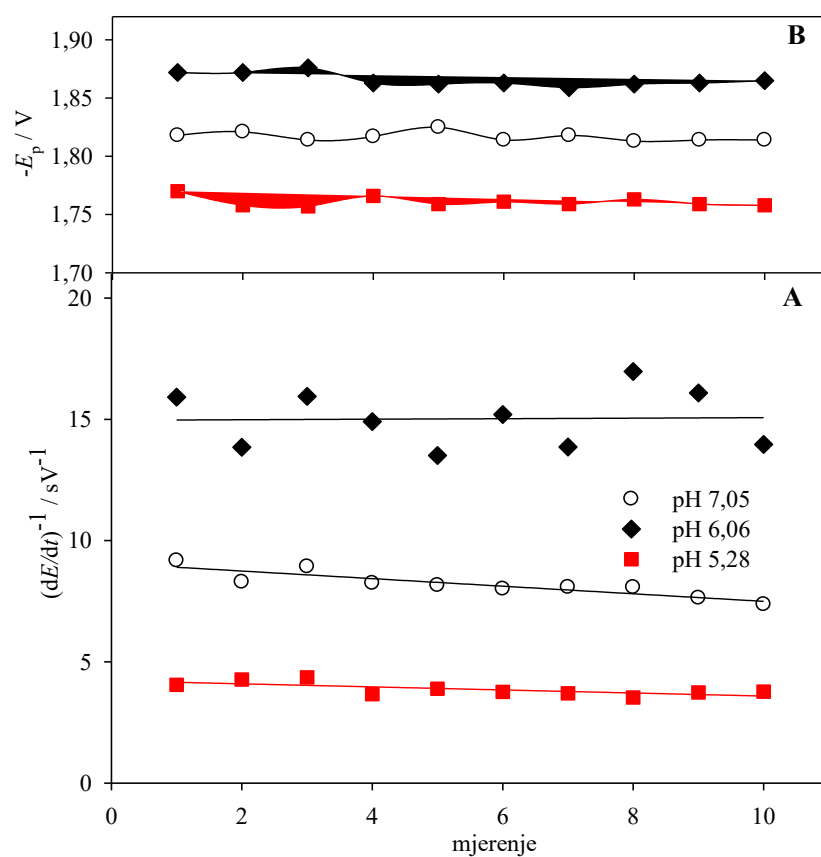
Da bi odredili stabilnost adsorbiranog sloja kitozana na površini živine elektrode napravljena su mjerenja u kojima se nakon akumulacije kitozana u elektrolitu I modificirana elektroda prenijela u elektrolit II te se detekcija signala vršila tek nakon određenog vremenskog perioda  $t_b$  uz miješanje elektrolita ( $1500 \text{ min}^{-1}$ ) bez primijenjenog potencijala. Rezultati su pokazali da je kitozan jako stabilan i čvrsto vezan na elektrodu jer se pik  $H_{\text{PS}}$  nije značajno promijenio ni 20 minuta nakon prijenosa u korištene elektrolite II (slika 18). Ovakva jaka adsorpcija te velika stabilnost adsorbiranog sloja kitozana na površini živine elektrode je u skladu s nedavnim AdT CPS eksperimentom kitozana u kojem se kitozan nije isprao s elektrode pranjem elektrode u vodi, a dokazano je i da se na sloj kitozana mogu adsorbirati DNA i polianionski polimeri poput hijaluronske i poliglutamanske kiseline čime se mijenja pik  $H_{\text{PS}}$  kitozana.<sup>8</sup> Slična stabilnost adsorbiranog sloja je zapažena i kod sloja DNA kao i kod proteina

koji su bili stabilni i do 50 min nakon AdT,<sup>46</sup> te kod polisaharida koji su bili stabilni i do 30 min nakon AdT<sup>26</sup>.



Slika 18. Stabilnost sloja kitozana ( $c = 50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) na živinoj elektrodi u fosfatnom puferu pH 7,05, pH 6,06 i pH 5,28; uvjeti mjerenja:  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $I_{\text{str}} = -20 \mu\text{A}$  (pH 7,05, pH 5,28) i  $-30 \mu\text{A}$  (pH 6,06),  $t_a = 60 \text{ s}$

Preciznost AdT CPS metode u određivanju pika  $H_{\text{ps}}$  kitozana je određena nakon 10 uzastopnih AdT CPS mjerenja  $50 \mu\text{g cm}^{-3}$  kitozana te je izračunato relativno standardno odstupanje, RSD. U fosfatnom puferu pH 7,05 dobiven je RSD  $\pm 6,5\%$ , za pH 6,06 je  $\pm 7,9\%$  dok je za acetatni pufer pH 5,28 RSD  $\pm 7,0\%$  (slika 19).



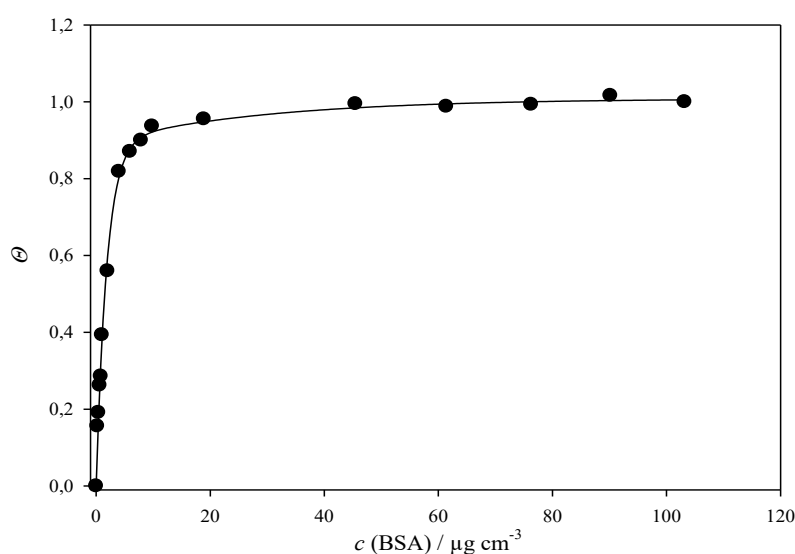
Slika 19. Ponovljivost AdT CPS detekcije pika  $H_{PS}$  kitozana ( $c = 50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) u uvjetima:

$E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$ ,  $I_{str} = -20 \text{ } \mu\text{A}$  (pH 7,05, pH 5,28) i  $-30 \text{ } \mu\text{A}$  (pH 6,06)

## 4.2. Elektrokemijska svojstva BSA u morskoj vodi

### 4.2.1. Adsorpcija BSA na živinu elektrodu

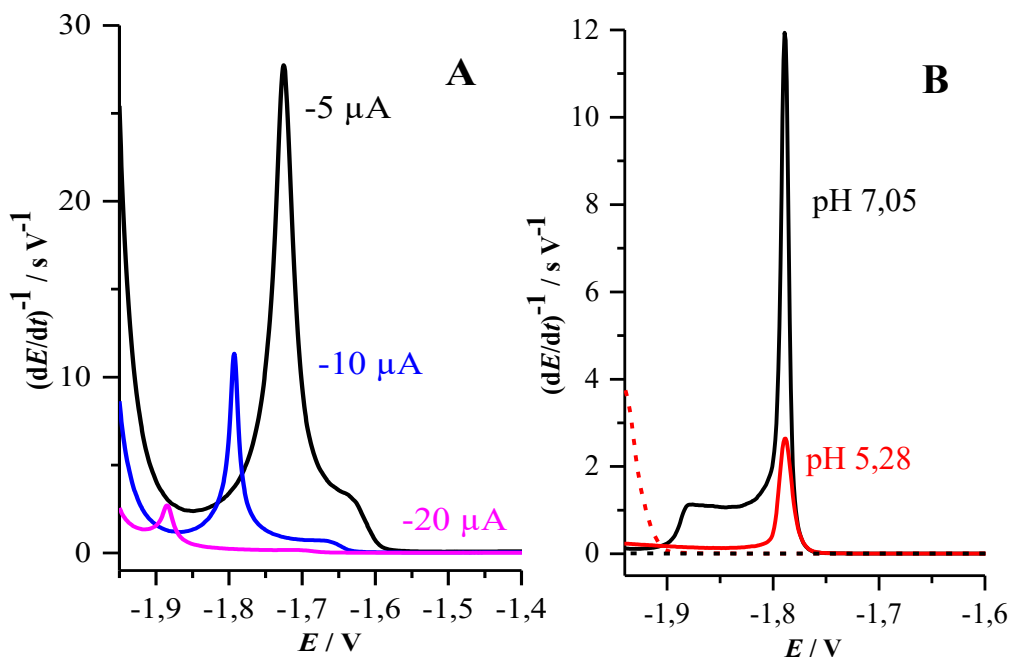
Kao i za kitozan, i za BSA su napravljena ACV mjerenja *izvan faze* pri  $E_a = -0,6$  V u rasponu koncentracija BSA od  $0,2 \mu\text{g cm}^{-3}$  do  $100 \mu\text{g cm}^{-3}$  da bi odredili pri kojim koncentracijama dolazi do maksimalne prekrivenosti površine radne elektrode. Adsorpcijski plato nastaje pri koncentracijama višim od  $15 \mu\text{g cm}^{-3}$  BSA kad dolazi do potpune prekrivenosti površine elektrode (slika 20). Za daljnja mjerenja BSA odabrana je koncentracija  $20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ .



Slika 20. Adsorpcijska izoterma za BSA u morskoj vodi (pH 8,20) mjerena AC voltametrijom *izvan faze* ( $\phi = 90^\circ$ ),  $E_a = -0,6$  V,  $t_a = 60$  s

#### 4.2.2. CPS i AdT CPS detekcija BSA u morskoj vodi

BSA je za razliku od kitozana moguće detektirati *in situ* u morskoj vodi, ali i *ex situ* u korištenim puferima (slika 21), pa su stoga prvo napravljena *in situ* CPS mjerenja, a zatim AdT CPS mjerenja.

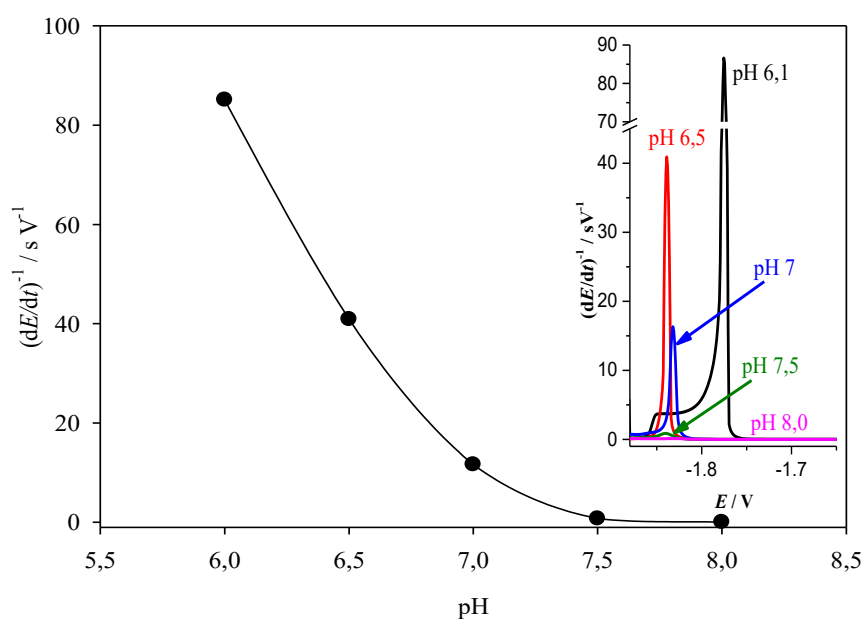


Slika 21. A) Kronopotenciogram *in situ* CPS mjerenja BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) u morskoj vodi,  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$ , B) AdT CPS pik BSA u  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu, pH 7,05 i acetatnom puferu, pH 5,28,  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$ ,  $I_{\text{str}} = -40 \mu\text{A}$

##### 4.2.2.1. Katalitički val vodika BSA

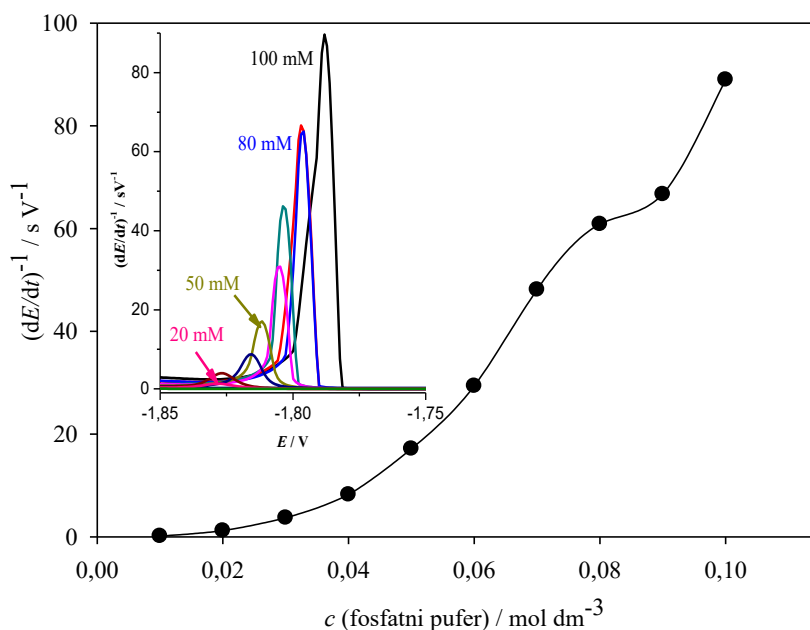
Priroda elektrodnog procesa BSA na živinoj elektrodi je ispitana AdT CPS eksperimentima (ovisnost o pH i koncentraciji pufera) u fosfatnom puferu pH 7,05. SWV eksperimente nije bilo moguće provesti *in situ* u morskoj vodi jer je prije njih potrebno dušiciranje otopine, a dušiciranje otopine s BSA kao analitom uzrokuje stvaranje pjene iznad otopine.

Na slici 22 je prikazana ovisnost visine pika BSA o pH fosfatnog pufera (pH 6–pH 8). Visina pika povećava sa smanjenjem pH pufera što nam ukazuje da BSA sudjeluje u katalitičkom elektrodnom procesu redukcije vodikovih iona na živinoj elektrodi.



Slika 22. AdT CPS ovisnost visine pika BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) o pH fosfatnog pufera. Uvjeti mjerenja:  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$ ,  $I_{\text{str}} = -40 \text{ } \mu\text{A}$ ,  $c$  (fosfatni pufer) =  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , umetak: kronopotenciogrami BSA pri različitom pH fosfatnog pufera

Ovisnost visine pika BSA o koncentraciji fosfatnog pufera (pH 7,05) je ispitana na isti način kao i kod kitozana te je također potvrđeno da se radi o katalitičkoj redukciji nastajanja vodika na živinoj elektrodi (slika 23).



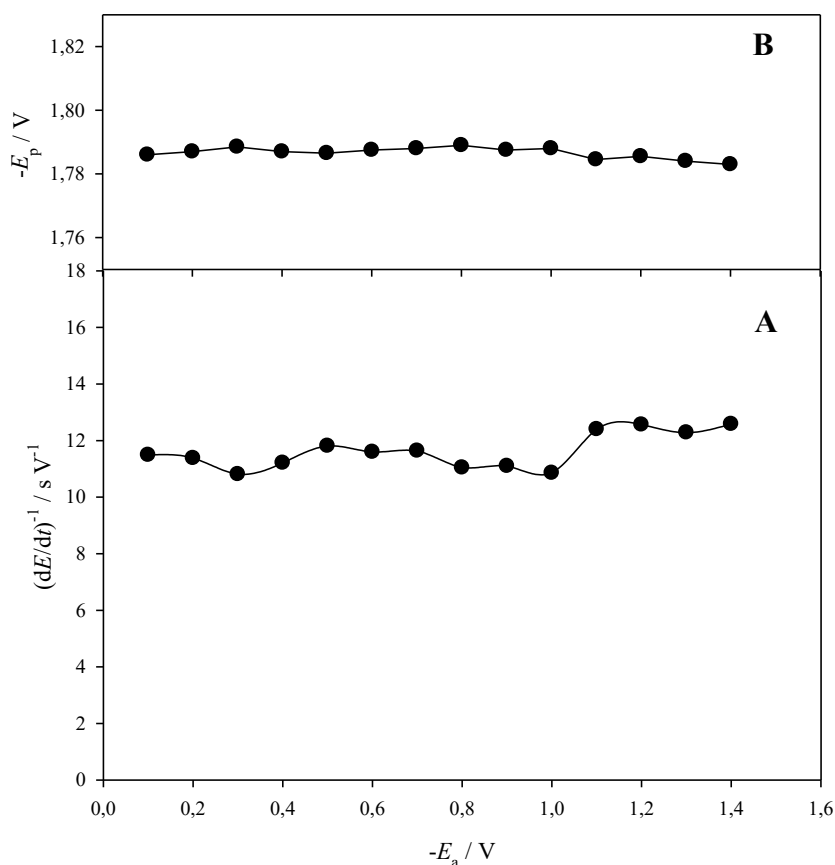
Slika 23. CPS ovisnost visine pika BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) o koncentraciji fosfatnog pufera, pH 7,05; uvjeti mjerenja:  $I_{\text{str}} = -40 \text{ } \mu\text{A}$ ,  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$ .

Umetak: kronopotenciogrami BSA pri rastućoj koncentraciji fosfatnog pufera pH 7,0

U strukturi BSA se nalaze aminokiseline (Cys, Lys, Arg i His) čiji aminokiselinski ostaci sudjeluju u katalitičkoj redukciji stvaranja vodika na živinoj elektrodi.<sup>27</sup> Pri nižim pH vrijednostima pufera je veća koncentracija vodikovih iona pa su i viši katalitički pikovi. Također se pik povećava s povećanjem koncentracije pufera jer on služi za regeneraciju samog katalizatora.<sup>12</sup> Za razliku od kitozana, pikovi BSA su puno viši zbog veće molekulske mase BSA koja uvjetuje veći broj katalitičkih skupina. Zbog ovih karakterističnih ovisnosti o pH i koncentraciji pufera ovaj pik BSA je katalitičke (ubrzane faradajske) prirode.

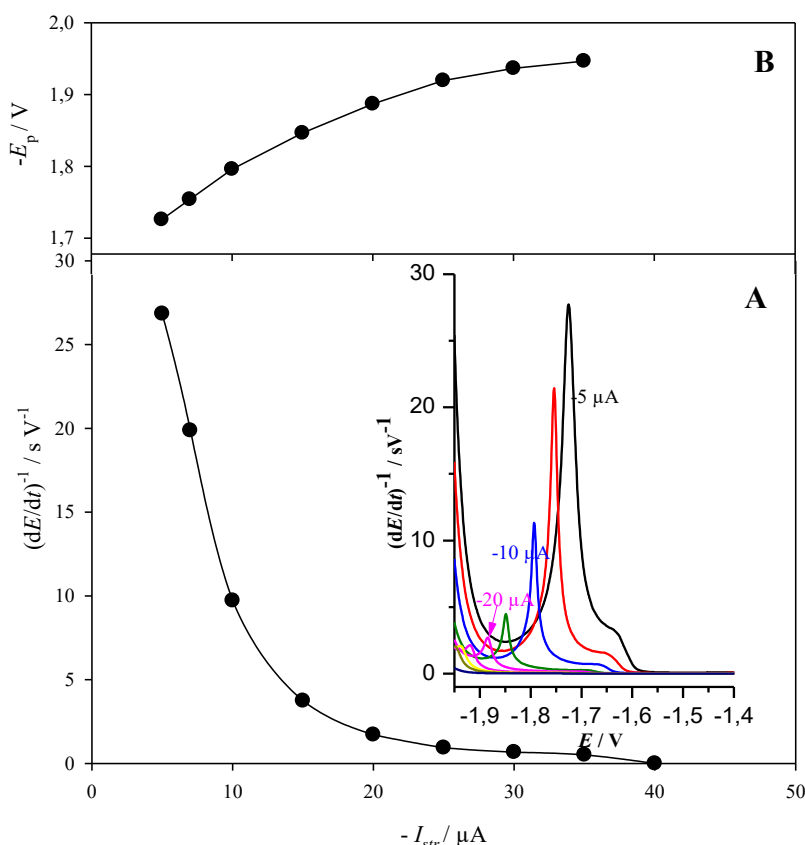
#### 4.2.3. Utjecaj potencijala akumulacije i pobudne struje na CPS detekciju BSA u morskoj vodi

CPS ovisnost o potencijalu akumulacije *in situ* u morskoj vodi (pH 8,20) je mjerena u rasponu od  $-0,1 \text{ V}$  do  $-1,4 \text{ V}$ . Visina pika H za  $20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$  BSA se nije značajno mijenjala promjenom  $E_a$ , a položaj pika je ostao isti (slika 24).



Slika 24. CPS ovisnost visine (A) i položaja (B) pika H BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) o potencijalu akumulacije,  $E_a$  *in situ* u morskoj vodi (pH 8,20),  $I_{\text{str}} = -10 \text{ } \mu\text{A}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$

Promjenom pobudnih struja (od  $-5 \text{ } \mu\text{A}$  do  $-40 \text{ } \mu\text{A}$ ) visina pika H se eksponencijalno smanjivala sa negativnijim strujama te je pik nestao pri struji od  $-40 \text{ } \mu\text{A}$ . Pritom se položaj pika mijenjao prema negativnijim vrijednostima, od  $-1,72$  do  $-1,95 \text{ V}$  (slika 25), označujući energetski manje zahtjevnu elektrokemijsku reakciju.



Slika 25. CPS ovisnost visine (A) i položaja (B) pika H BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) o struji,  $I_{str}$  *in situ* u morskoj vodi, uvjeti mjerenja:  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$ .

Umetak u A: kronopotenciogrami *in situ* mjerenja BSA pri različitim  $I_{str}$

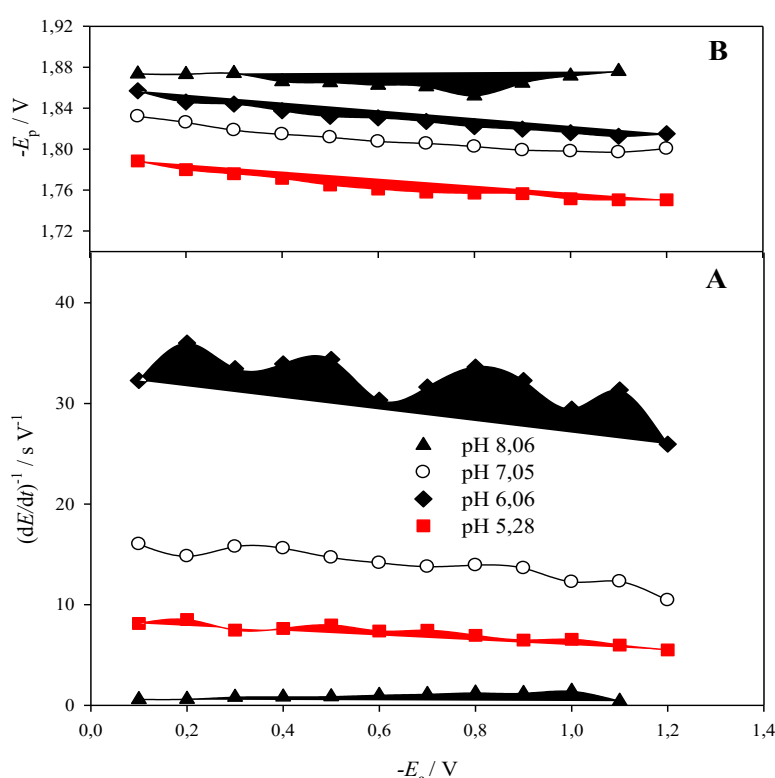
Promjenom pobudne struje je moguće dobiti karakterističan pik H i pri nanomolarnim koncentracijama bilo kojeg proteina, bez njegovog prethodnog obilježavanja. Pri različitim gustoćama struje pik H je vrlo osjetljiv na strukturne promjene u proteinu<sup>56</sup> koje inače nisu primijećene kod polisaharida poput karagenana,<sup>16</sup> niti u ovom radu kod kitozana.

#### 4.2.4. AdT CPS detekcija BSA u puferima

Pošto je kitozan moguće detektirati samo AdT CPS metodom, potrebno je istom metodom ispitati i svojstva BSA da bi na temelju toga definirali uvjete u kojima će se ispitati sustav kitozan–BSA te mogućnosti selektivne detekcije kitozana i BSA u istom sustavu.

#### 4.2.4.1. Utjecaj potencijala akumulacije, $E_a$ na AdT CPS BSA

AdT CPS ovisnost visine i položaja pika BSA o potencijalu akumulacije je mjerena od  $E_a = -0,1$  V do  $-1,2$  V (slika 26). Visina pika BSA se smanjuje sa negativnijim potencijalima u fosfatnim puferima pH 7,05 i pH 8,06 te u acetatnom puferu pH 5,28 te se položaj pika pomiče prema pozitivnijim vrijednostima potencijala. Kod fosfatnog pufera pH 8,06 pik je vrlo mali.  $E_a$  kao i kod kitozana nije značajno utjecao na promjenu visine i položaja pika pa je za sve puferne odabran optimalan potencijal akumulacije  $-0,1$  V koji je korišten u svim daljnjim mjerenjima.



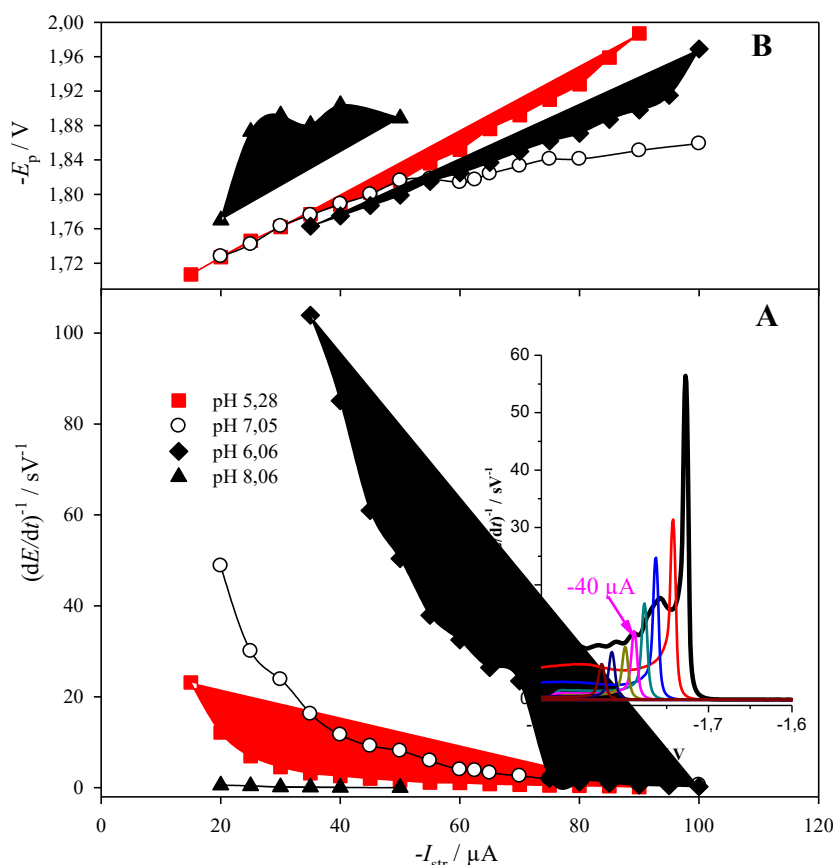
Slika 26. AdT CPS ovisnost visine (A) i položaja (B) pika BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) o potencijalu akumulacije,  $E_a$  u  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatnim puferima pH 6,06, pH 7,05, pH 8,06 te  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  acetatnom puferu pH 5,28.  $I_{str} = -20 \text{ } \mu\text{A}$  (pH 8,06),  $-40 \text{ } \mu\text{A}$  (pH 7,05),  $-55 \text{ } \mu\text{A}$  (pH 6,06) i  $-30 \text{ } \mu\text{A}$  (pH 5,28),  $t_a = 60 \text{ s}$

#### 4.2.4.2. Utjecaj pobudne struje, $I_{str}$ na AdT CPS BSA

Na slici 27A je prikazana ovisnost visine pika BSA o pobudnoj struji ( $-100 \text{ } \mu\text{A}$  do  $-20 \text{ } \mu\text{A}$ ) u fosfatnim puferima pH 6,06, pH 7,05 i pH 8,06 te u acetatom puferu pH 5,28 ( $-15 \text{ } \mu\text{A}$  do  $-90 \text{ } \mu\text{A}$ ). Položaj pika se na negativnijim strujama u svim puferima pomaknuo prema negativnijim

potencijalima (slika 27B), označujući energetski manje favoriziran proces koji za posljedicu ima manje visine pikova. U puferu pH 6,06 se primjećuje naglo povećanje pika između  $-75 \mu\text{A}$  i  $-70 \mu\text{A}$  zbog promjene u strukturi proteina. Naime, baš pri tim strujama dolazi do prijelaza iz nativnog u denaturirani oblik proteina koji daje puno više pikove. Naime, prilikom denaturacije dolazi do razaranja kvaterne, tercijarne i sekundarne strukture proteina te tako određeni broj katalitičkih aminokiselina postaje dostupan za sudjelovanje u katalitičkoj redukciji vodikovih iona.<sup>57</sup> Ova pojava je karakteristična za proteine u blago kiselim i neutralnim medijima. Ista strukturna promjena u BSA se primjećuje i kod ostalih pH vrijednosti: npr. kod pH 7,05 prijelaz je između  $-60$  i  $-50 \mu\text{A}$  (slika 27). Poznato je da se kombinacijom mjernih uvjeta poput koncentracije pufera, temperature,  $E_a$ , te pobudne struje utječe na vrijeme u kojem je protein izložen efektu električnog polja uz samu elektrodu, a time i na strukturnu promjenu u proteinu.<sup>56</sup> Smanjenjem pH vrijednosti fosfatnog pufera povećala se koncentracija vodikovih iona u otopini pa se BSA već u kratkom vremenu u kojem je izložen električnom polju uz elektrodu (pri višim pobudnim redukcijskim strujama) denaturira. Kod višeg pH se BSA denaturira tek kod niže pobudne struje tj. On duže vrijeme može biti izložen utjecaju električnog polja prije strukturne promjene.

Izabrane su optimalne pobudne struje za svaki pH: za pH 8,06 i pH 7,05 je odabrana struja  $-40 \mu\text{A}$ , za pH 6,06 struja  $-55 \mu\text{A}$  te za pH 5,28 je odabrana struja  $-30 \mu\text{A}$ . Kod ovih struja će se detektirati denaturirani BSA.



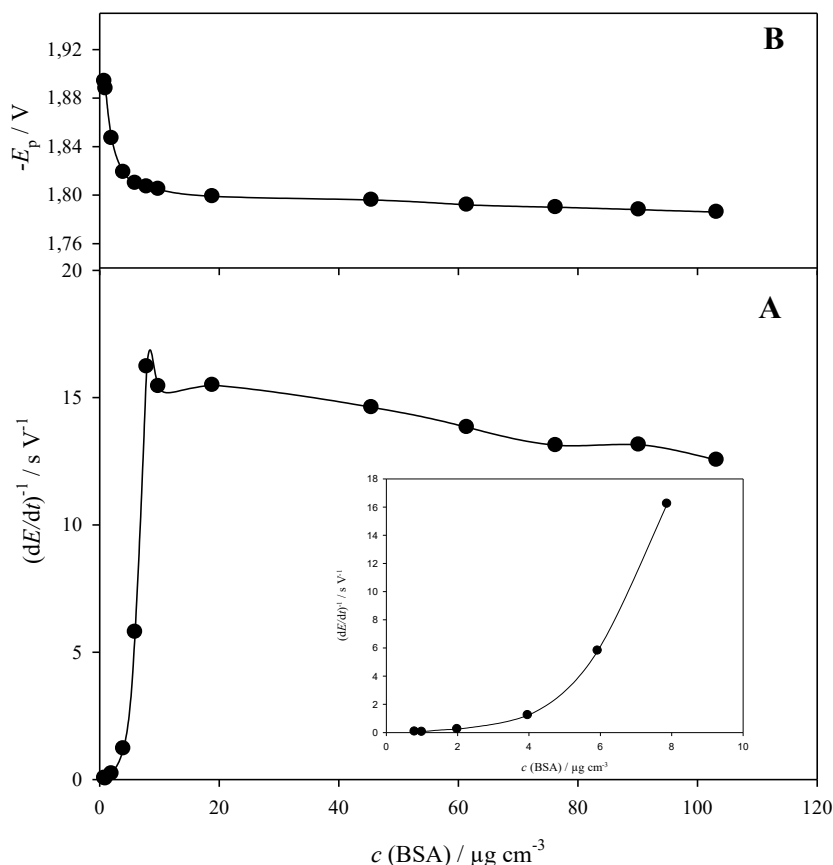
Slika 27. AdT CPS ovisnost visine (A) i položaja (B) pika HBSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) o pobudnoj struji,  $I_{str}$  u fosfatnim puferima pH 8,06, pH 7,05 i pH 6,06 te acetatnom puferu pH 5,28; uvjeti mjerenja:  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$ . Umetak u A: kronopotenciogrami BSA pri povećanju pobudne struje od  $-20 \text{ μA}$  do  $-55 \text{ μA}$  u  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu pH 7,05 s istaknutom optimalnom strujom od  $-40 \text{ μA}$

#### 4.2.4.3. Utjecaj vremena akumulacije, $t_a$ i koncentracije BSA na AdT CPS BSA

Povećanjem  $t_a$  (1 – 300s) visina pika H BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) se nije značajno mijenjala zbog visoke koncentracije BSA za koju je i pri kratkim  $t_a$  površina elektrode zasićena.

AdT CPS mjerenja visine pika H u ovisnosti o koncentraciji BSA u rasponu  $(0,2\text{--}100) \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$  su napravljena s detekcijom u fosfatnom puferu pH 7,05 (slika 28). Povećanjem koncentracije BSA visina pika H se povećavala dok nije došlo do potpune prekrivenosti elektrode što je blokiralo katalitički efekt novih adsorbiranih aktivnih skupina. Do potpune prekrivenosti je došlo pri koncentraciji  $8 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$  BSA. Iako se povećanjem koncentracije BSA povećavao broj katalitički aktivnih skupina na ili blizu elektrode, one nisu mogle sudjelovati u katalizi jer nisu mogle doprijeti do same površine elektrode što je osnova

za katalitičku redukciju vodika.<sup>17</sup> Ovisnost visine pika o koncentraciji je do  $8 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$  BSA raste eksponencijalno (slika 28). Položaj pika H BSA se pomaknuo prema manje negativnim potencijalima sve do zasićenja površine elektrode, a onda je na višim koncentracijama bio na  $E_p = -1,80 \text{ V}$  (slika 28B).



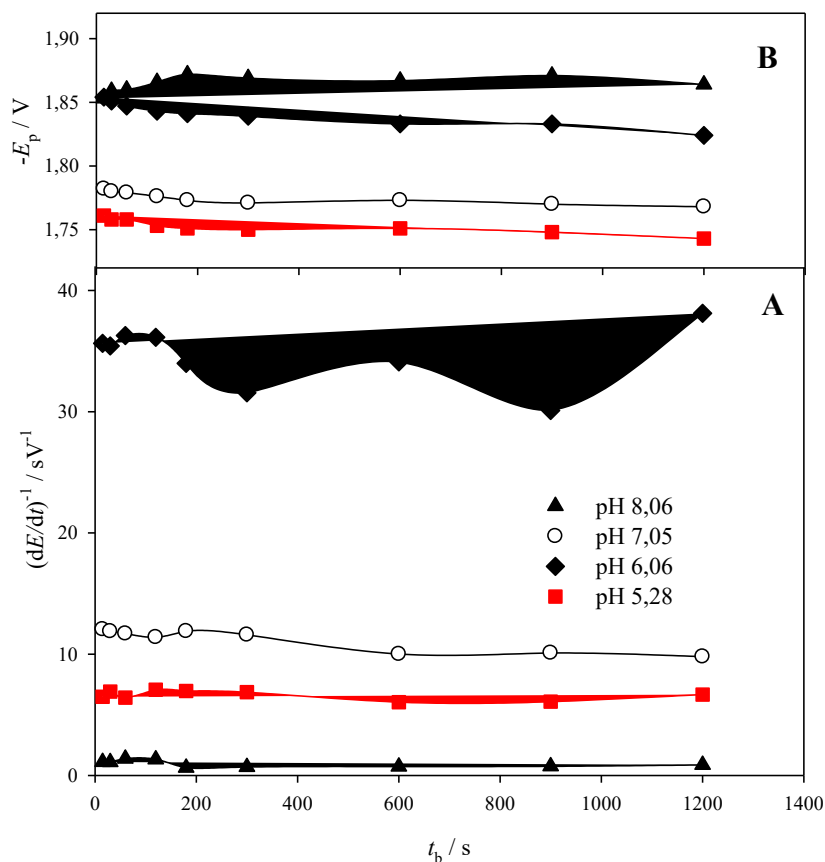
Slika 28. AdT CPS ovisnost visine (A) i položaja (B) pika H BSA okoncentraciji BSA u  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu pH 7,05. Uvjeti mjerenja:  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $I_{\text{str}} = -40 \mu\text{A}$ ,  $t_a = 60\text{s}$ .

Umetak: ovisnost visine pika o nižim koncentracijama.

#### 4.2.4.4. Stabilnost adsorbiranog sloja BSA nakon AdT i ponovljivost AdT CPS mjerenja

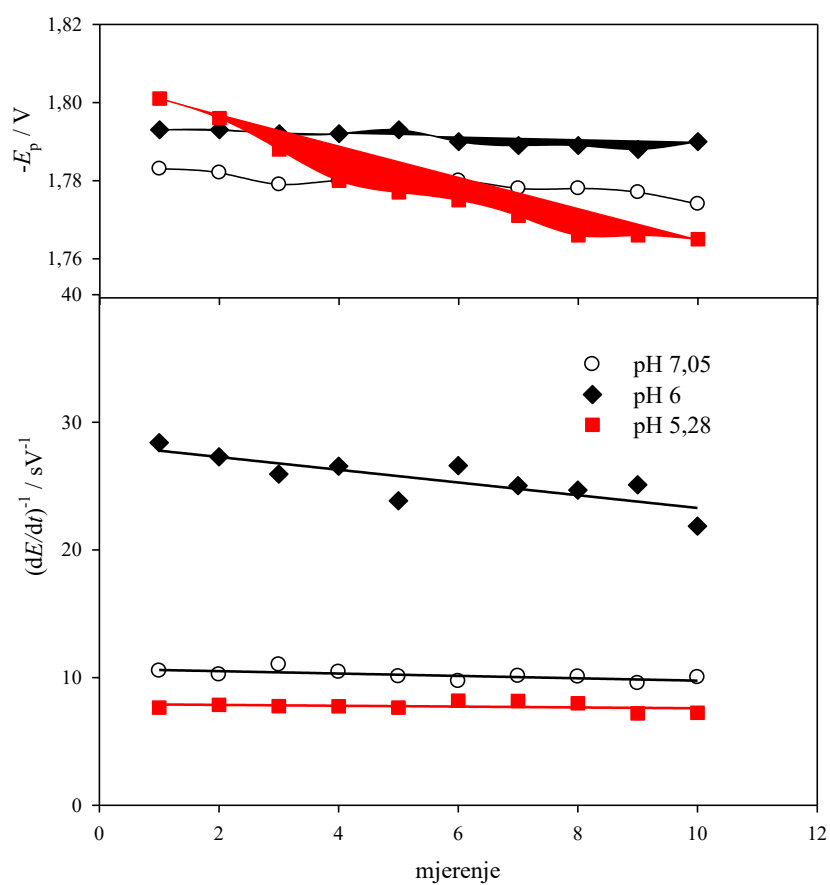
Stabilnost sloja BSA je ispitivana na jednaki način kao i kod kitozana koji je prethodno opisan. BSA je dobro imobiliziran na površini elektrode te je takav sloj stabilan i 20 minuta nakon prijenosa iz morske vode u odabrane detekcijske pufere (slika 29). To je u skladu s rezultatima prvih AdT mjerenja proteina 1986. godine od kada je poznato da je stabilnost vezanja proteina i peptida na živinu elektrodu jako velika.<sup>46</sup> Tako stabilan sloj BSA, ali i

drugih proteina od onda omogućuje njihovu AdT detekciju iz vrlo malog volumena otopine poput jedne kapi od 5  $\mu\text{L}$ .



Slika 29. AdT CPS stabilnost sloja BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) na živinoj elektrodi u fosfatnom puferu pH 7,05, pH 6,06 i pH 5,28, uz miješanje s 1500 rpm; uvjeti mjerenja:  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $I_{\text{str}} = -40 \text{ }\mu\text{A}$  (pH 7,05),  $-55 \text{ }\mu\text{A}$  (pH 6,06) i  $-30 \text{ }\mu\text{A}$  (pH 5,28),  $-20 \text{ }\mu\text{A}$  (pH 8,06),  $t_a = 60 \text{ s}$

Preciznost AdT CPS metode u određivanju pika H BSA je također određena mjerenjem ponovljivosti svakog mjerenja. Napravljeno je 10 uzastopnih mjerenja te je izračunato relativno standardno odstupanje. Za fosfatni pufer pH 7,05 RSD iznosi  $\pm 4,1\%$ , za pH 6,06 je  $\pm 7,3\%$  dok je za acetatni pufer pH 5,28 RSD  $\pm 4,4\%$  za  $20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$  BSA (slika 30).



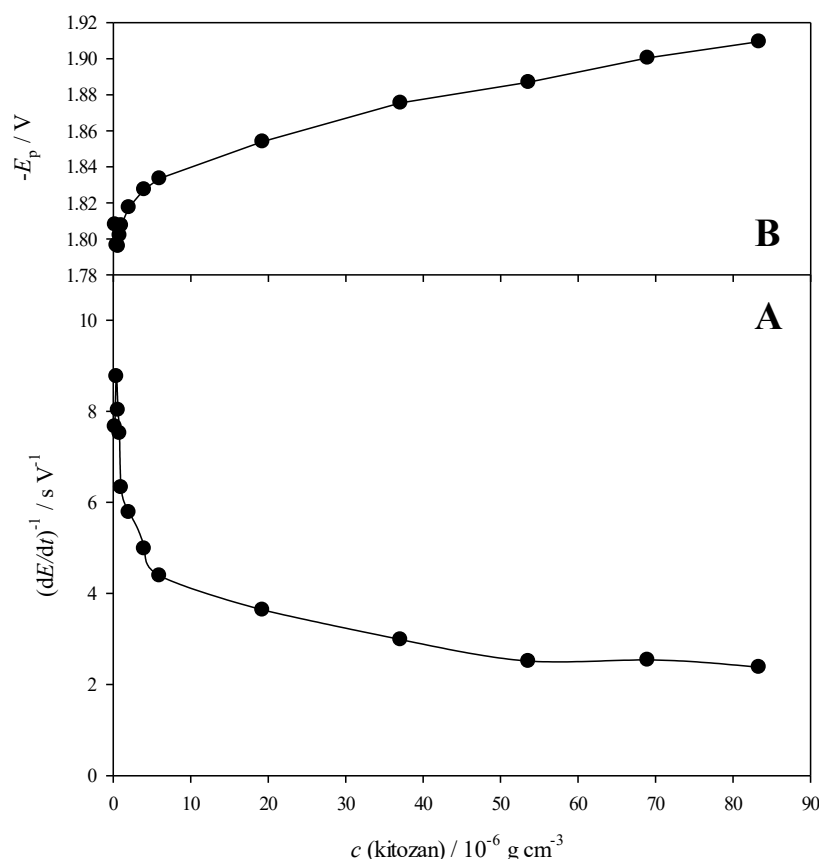
Slika 30. Ponovljivost AdT CPS detekcije pika H BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) u uvjetima:  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ;  $I_{\text{str}} = -40 \text{ } \mu\text{A}$  (pH 7,05),  $-55 \text{ } \mu\text{A}$  (pH 6,06) i  $-30 \text{ } \mu\text{A}$  (pH 5,28),  $t_a = 60 \text{ s}$

### 4.3. CPS detekcija smjese kitozan-BSA u morskoj vodi

BSA je moguće detektirati *in situ* u morskoj vodi pa je ispitan utjecaj kitozana na visinu i položaj pik H BSA, a pošto se kitozan može mjeriti samo *ex situ* u puferu istraženo je kako dodatak BSA u morsku vodu utječe na AdT CPS pik H kitozana.

#### 4.3.1. Utjecaj kitozana na CPS detekciju BSA u morskoj vodi

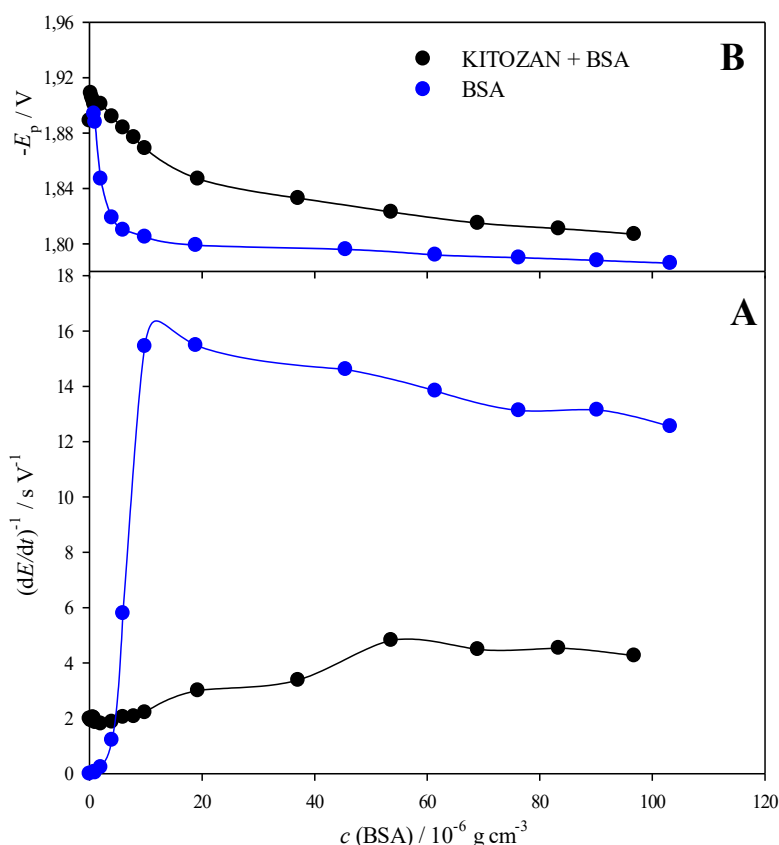
Utjecaj kitozana na *in situ* CPS detekciju BSA u morskoj vodi je ispitan tako da se postepeno povećavala koncentracija dodanog kitozana ( $c = (0,2-100) \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) u otopinu BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) (slika 31). Povećanjem koncentracije kitozana u morskoj vodi visina pika BSA se postepeno smanjivala. Razlog tome je kompeticija za vezanje na površinu elektrode između molekula BSA i kitozana. Što je bila viša koncentracija kitozana u otopini, više kitozana, a manje BSA molekula se adsorbiralo na elektrodu. Također se položaj pika pomicao prema negativnijim strujama, od  $-1,8 \text{ V}$  do  $-1,9 \text{ V}$ , označujući otežanu katalitičku redukciju vodikovih iona na molekulama BSA pri višoj koncentraciji kitozana, što je rezultiralo smanjenjem pika H.



Slika 31. CPS ovisnost visine (A) i položaja (B) pika H BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) o dodanoj koncentraciji kitozana ( $c = (0,2-100) \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) *in situ* u morskoj vodi (pH 8,20);  $I_{\text{str}} = -10 \mu\text{A}$ ,  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$

#### 4.3.2. Utjecaj BSA na AdT CPS detekciju kitozana

Utjecaj BSA na AdT CPS detekciju  $50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$  kitozana u fosfatnom puferu pH 7,05 je ispitan dodatkom  $(0,2-100) \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$  BSA u morsku vodu s kitozonom (slika 32). Visina pika  $H_{\text{PS}}$  kitozana se nije značajno mijenjala do dodatka  $10 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$  BSA, nakon koje se pik  $H_{\text{PS}}$  počeo povećavati da bi nakon dodatka  $>50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$  BSA njegova visina bila udvostručena. Položaj pika se pomicao prema manje negativnim  $E_p$  vrijednostima sa višim koncentracijama BSA, ali su sve vrijednosti  $E_p$  bile na negativnijim potencijalima, sličnim kao i  $E_p$  pika samog kitozana. Ni nakon zasićenja površine elektrode visina pika smjese nije dosegla visinu pika H samog BSA istih koncentracija. Može se zaključiti da se oba analita iz smjese, kitozan i BSA adsorbiraju na elektrodu i prenesu u pufer, ali detektirani katalitički pik oblikom više sliči piku  $H_{\text{PS}}$  kitozana nego piku H BSA što znači da na elektrodi dominira kitozan. Moguće je da BSA utječe na orijentaciju molekula kitozana na elektrodi.

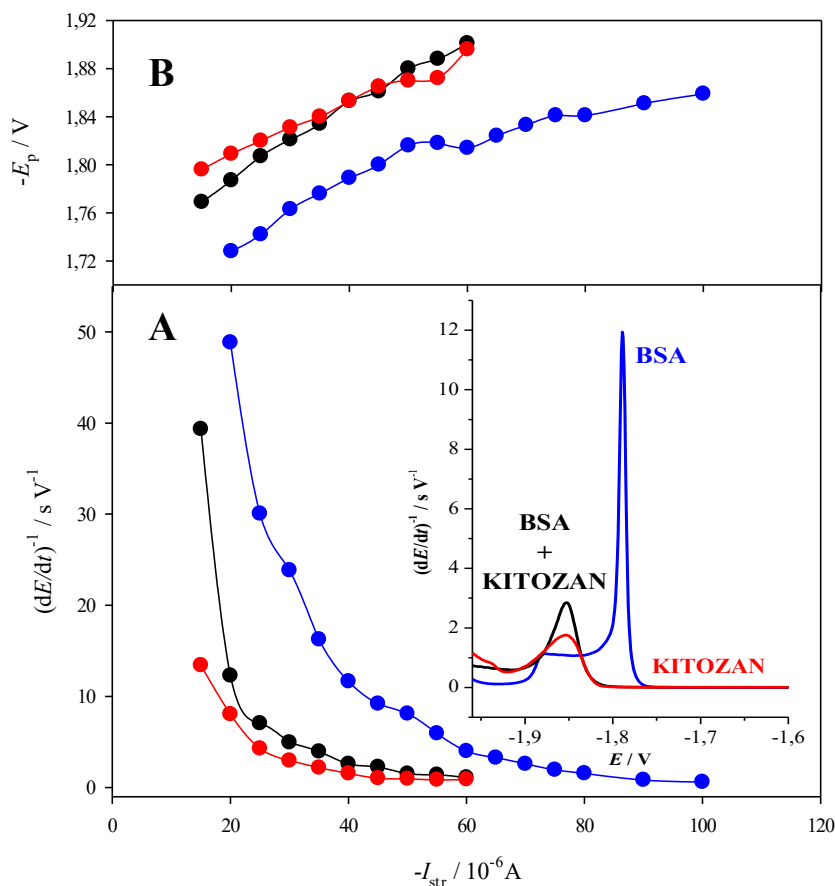


Slika 32. AdT CPS ovisnost visine (A) i položaja (B) pika  $H_{PS}$  kitozana ( $c = 50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) o dodanoj koncentraciji BSA u fosfatnom puferu pH 7,05; uvjeti mjerenja:  $I_{str} = -40 \mu\text{A}$ ,  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$

#### 4.3.3. Ispitivanje uvjeta za selektivnu detekciju kitozana i BSA u smjesi u morskoj vodi

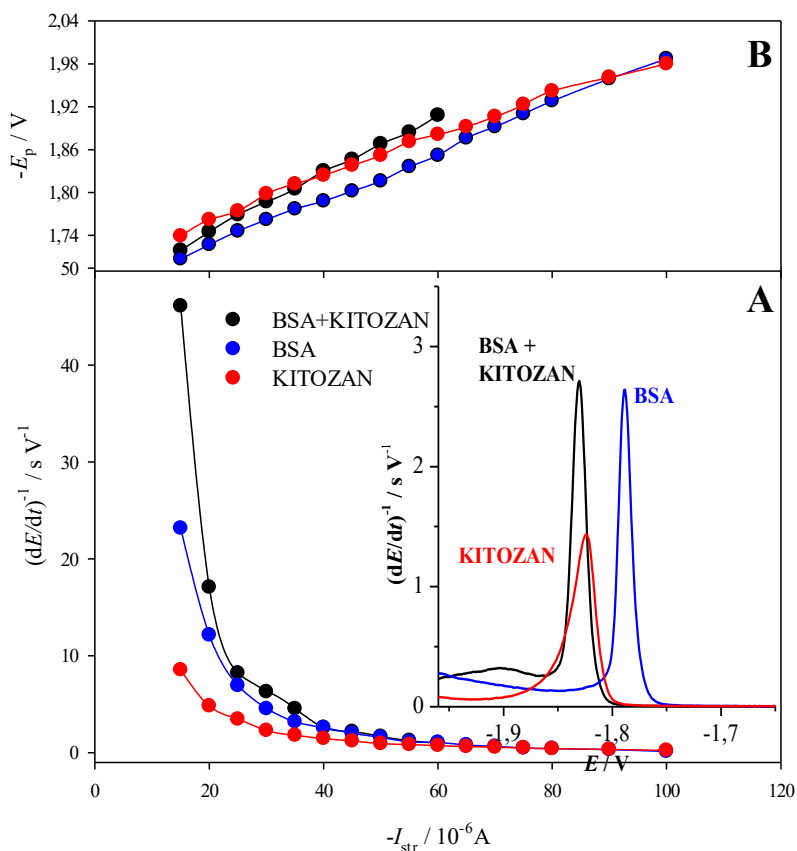
##### 4.3.3.1. Utjecaj $I_{str}$ na AdT CPS smjese

Promatran je utjecaj promjene pobudne struje na visinu i položaj pika smjese  $50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$  kitozana i  $20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$  BSA u fosfatnom puferu pH 7,05. Dobiven je samo jedan pik koji u ovim uvjetima više sliči piku  $H_{PS}$  samog kitozana, a čija visina je manja od visine samog pika H BSA te viša od visine samog pika  $H_{PS}$  kitozana. Visina pika smjese se kao i kod zasebnih komponenata smanjuje sa negativnijim strujama te se položaj pika pomiče prema negativnijim vrijednostima potencijala (slika 33). Ni jedna od primijenjenih pobudnih struja ne omogućuje selektivnu detekciju kitozana ni BSA u njihovoj smjesi.



Slika 33. Ovisnost visine (A) i položaja (B) pika smjese kitozana ( $c = 50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) i BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) (crno), samog BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) (plavo), samog kitozana ( $c = 50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) (crveno) o pobudnoj struji,  $I_{str}$  u  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu pH 7,05,  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$ . Umetak u A: kronopotenciogram AdT CPS mjerenja smjese kitozana i BSA (crno), samog BSA (plavo), i samog kitozana (crveno) u fosfatnom puferu pH 7,05 pri  $I_{str} = -40 \mu A$ ,  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$

Također je mjerena ovisnost pika smjese o pobudnoj struji u acetatnom puferu pH 5,28 (slika 34). I u ovim uvjetima je dobiven samo jedan pik smjese čija se visina sa negativnijim strujama smanjuje, a položaj pika pomiče prema negativnijim vrijednostima potencijala. Razlika između ovih pikova smjese i pikova dobivenih u fosfatnom puferu pH 7,05 je to što su u acetatnom puferu vrijednosti visine pika i sam oblik pika sličniji piku H samog BSA. Ni ovdje niti jedna od primijenjenih pobudnih struja ne omogućuje selektivnu detekciju kitozana ni BSA u njihovoj smjesi.

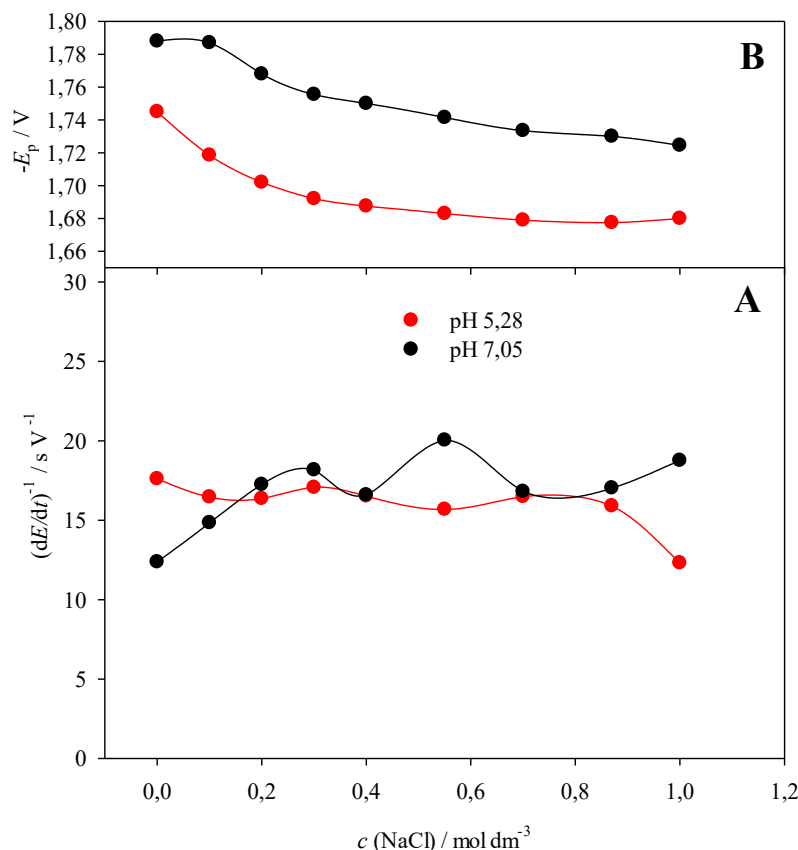


Slika 34. Ovisnost visine (A) i položaja (B) pika smjese kitozana ( $c = 50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) i BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) (crno), samog BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) (plavo), te samog kitozana ( $c = 50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) o pobunjoj struji,  $I_{\text{str}}$  u  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  acetatnom puferu pH 5,28; uvjeti mjerenja:  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$ . Umetak u A: kronopotenciogram AdT CPS mjerenja smjese kitozana i BSA (crno), samog BSA (plavo), i samog kitozana (crveno) pri  $I_{\text{str}} = -40 \mu\text{A}$

#### 4.3.3.2. Utjecaj ionske jakosti puferirane otopine na AdT CPS smjese

Poznato je da viša ionska jakost pogoduje smanjenju intermolekulskih interakcija, pa je uz pretpostavku moguće detekcije odvojenih pikova analita u smjesi povećana ionska jakost detekcijskog elektrolita. Na slici 35 je prikazan utjecaj ionske jakosti na detekciju pika smjese kitozana ( $c = 50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) i BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) u dvije različite puferirane otopine. Povećanjem ionske jakosti, odnosno povećanjem koncentracije dodanog NaCl-a u fosfatni pufer pH 7,05, kao i u acetatni pufer pH 5,28 se visina pika smjese nije značajno mijenjala. Položaj pika smjese se mijenjao prema manje negativnim vrijednostima potencijala sa

povećanjem ionske jakosti, u fosfatnom puferu od  $-1,79$  V do  $-1,72$  V, a u acetatnom od  $-1,75$  V do  $-1,68$  V.

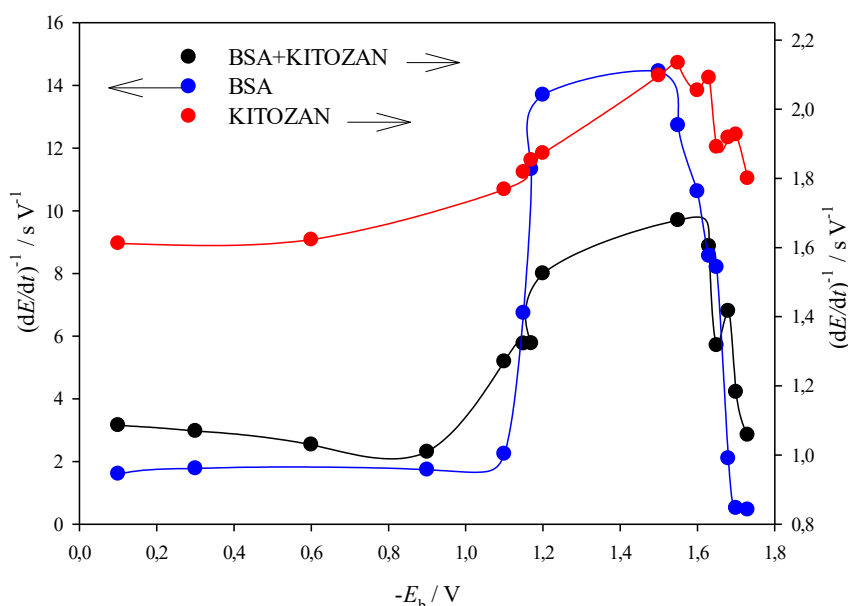


Slika 35. AdT CPS mjerenja smjese BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) i kitozana ( $c = 50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) iz morske vode (pH 8,20) u  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatni pufer pH 7,05 (crno) i u  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  acetatni pufer pH 5,23 (crveno), s dodatkom NaCl koncentracija  $0,1\text{--}1 \text{ mol dm}^{-3}$ , uvjeti mjerenja:  $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $I_{\text{str}} = -20 \mu\text{A}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$ .

Kada usporedimo utjecaj ionske jakosti u acetatnom i fosfatnom puferu na pik smjese i na same pikove odvojenih komponenti možemo zaključiti da je pik smjese sličniji piku samog kitozana u fosfatnom puferu te piku samog BSA u acetatnom puferu. Također je u fosfatnom puferu pik smjese pri dodatku  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl-a smješten na negativnijim potencijalima ( $E_p = -1,79 \text{ V}$ ) što je karakteristično za kitozan dok je u acetatnom puferu na manje negativnim potencijalima ( $E_p = -1,72 \text{ V}$ ) kao što je bio pik samog BSA. Ovim eksperimentima dobiven je samo jedan pik u smjesi što znači da viša ionska jakost nije omogućila selektivnu detekciju komponenata smjese.

4.3.3.3. Utjecaj  $E_b$  na AdT CPS smjese

Ispitan je utjecaj  $E_b$  na pik smjese, te samog BSA i kitozana zbog moguće desorpcije jednog od analita nakon prijenosa u pufer. Nakon adsorpcije oba analita iz morske vode na elektrodu i prijenosa modificirane elektrode u  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatni pufer pH 7,05 ( $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$ ) primjenjen je različiti potencijal,  $E_b$  u rasponu od  $-0,1 \text{ V}$  do  $-1,7 \text{ V}$  u vremenskom periodu  $t_b = 1 \text{ s}$  prije same primjene pobudne struje i CPS detekcije. Na slici 36 je prikazana ovisnost visine pika  $H_{PS}$  kitozana i pika H BSA te pika smjese kitozana i BSA o  $E_b$ . Vidi se da visina pika samog BSA ima više vrijednosti nego visina pika  $H_{PS}$  kitozana i pika smjese što je u skladu s prijašnjim ispitivanjima. Primjenom negativnijeg  $E_b = -0,1 \text{ V}$  do oko  $-1,1 \text{ V}$  visina pika se u sva tri slučaja ne mijenja značajno, između  $E_b = -1,1 \text{ V}$  i  $-1,6 \text{ V}$  dolazi do strmog povećanja visine pikova, nakon čega se visina naglo smanjuje vjerojatno zbog desorpcije analita s površine elektrode. Povećanja pikova BSA i smjese nakon primjene  $E_b = -1,1 \text{ V}$  i  $-1,6 \text{ V}$  može biti povezano s denaturacijom proteina koja je favorizirana na ovako negativnim potencijalima.<sup>58</sup> Primjena različitog  $E_b$  nije omogućila selektivnu desorpciju jednog od analita s površine elektrode nakon AdT u detekcijski pufer jer dobiveni pik smjese koji visinom nije sličan piku samog BSA niti piku samog kitozana, već je na svim  $E_b$  manji od njih vjerojatno zbog djelomične desorpcije oba analita s elektrode.



Slika 36. Ovisnost visine pika  $H_{PS}$  kitozana ( $c = 50 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) (crveno), pika H BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) (plavo) i smjese kitozana i BSA (crno) o  $E_b$ . Uvjeti mjerenja:  $I_{\text{str}} = -40 \text{ }\mu\text{A}$ ,

$$E_a = -0,1 \text{ V}, t_a = 60 \text{ s}, t_b = 1 \text{ s}$$

4.3.3.4. *Ispiranje modificirane elektrode tijekom prijenosa*

Selektivna detekcija analita se pokušala dobiti i ispiranjem adsorbiranog BSA s površine elektrode poslije akumulacije tj. tijekom prijenosa, a prije CPS detekcije u puferiranoj otopini. Cilj je bio pronaći otapalo koje bi moglo isprati BSA s elektrode tako da se nakon AdT CPS detekcije smjese selektivno dobije samo pik  $H_{PS}$  kitozana. BSA ( $c = 20 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ ) je akumuliran iz morske vode na elektrodu ( $E_a = -0,1 \text{ V}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$ ), zatim je modificirana elektroda isprana s izabranim otapalom pa s MQ vodom (da se ne onečisti puferirana otopina), te je onda prenesena u fosfatni pufer pH 7,05 gdje je napravljena CPS detekcija. Ispiranje BSA je napravljeno i nakon primjene uvjeta  $E_a = -0,9 \text{ V}$ ,  $t_a = 60 \text{ s}$ , ali nije bilo velike razlike u odnosu na pikove dobivene pri potencijalu  $E_a = -0,1 \text{ V}$ . Ispiranja su napravljena sa otapalima na dva načina prije prijenosa u puferiranu otopinu:

- 1) uranjanjem elektrode u otapalo na 60 s, bez miješanja otopine
- 2) ispiranjem elektrode uzastopnim uranjanjem u otapalo tri puta

Tablica 1. Otapala i otopine korištene za ispiranje samog BSA s elektrode te postotak smanjenja odnosno povećanja visine pika H BSA

| OTAPALO / OTOPINA                                           | Promjena visine pika H/% |                  |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------|
|                                                             | Ispiranje 60 s           | Ispiranje 3 puta |
| Milli-Q voda                                                | 0,55                     | -0,47            |
| Etanol                                                      | 3,05                     | 3,57             |
| 2-propanol                                                  | 2,53                     | -11,6            |
| Aceton                                                      | -9,48                    | -9,30            |
| Amonijev acetat ( $0,25 \text{ mol dm}^{-3}$ )              | -17,47                   | -6,26            |
| 10 % $\text{HNO}_3$                                         | -1,39                    | 8,52             |
| Metanol                                                     | -8,61                    | -2,79            |
| Triton-X-100 ( $25 \times 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$ )      | -12,3                    | -9,67            |
| KCl/KOH ( $2 \text{ mol dm}^{-3}$ )                         | -5,63                    | -4,50            |
| Urea ( $4 \text{ mol dm}^{-3}$ )                            | -7,26                    | -6,48            |
| $\text{Pb}^{2+}$ ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) | -3,54                    | -2,03            |
| Tris-HCl ( $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ )                      | -2,43                    | -7,83            |
| SDS ( $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ )              | -1,57                    | 4,40             |

U tablici 1 su navedena korištena otapala i otopine te postotak smanjenja (negativne vrijednosti) odnosno povećanja (pozitivne vrijednosti) visine pika H BSA nakon ispiranja s njima. Neka od otapala poput vode, 2-propanola, acetona i SDS-a odabrana su jer je poznato da oni efikasno odstranjuju proteinski film s biomaterijala.<sup>59</sup> Maksimalno sniženje pika H

(17,47 %) je dobiveno nakon 60 s ispiranja modificirane elektrode otopinom amonijeva acetata. Ova otopina se vrlo često koristi prilikom završnog ispiranja kolone nakon HPLC mjerenja različitih proteina, pa je i u ovom eksperimentu vjerojatno poslužila za djelomično ispiranje BSA. Međutim, ovaj postotak smanjenja pika H nije dovoljan za selektivnu detekciju kitozana, već bi bilo poželjno da se sav BSA isprao s elektrode. S druge strane, BSA je vrlo čvrsto vezan za površinu živine elektrode jer sumpor iz Cys stvara vrlo stabilan kompleks sa živom.<sup>29</sup> Ispiranje ostalim otapalima i otopinama rezultiralo je smanjenjem pika H samo do 11 %.

Također je napravljeno i ispiranje kitozana uranjanjem elektrode u otapala/otopine na 60 s (tablica 2).

Tablica 2. Otapala i otopine korištene za ispiranje samog kitozana te postotak smanjenja odnosno povećanja visine pika  $H_{PS}$  kitozana.

| OTAPALO / OTOPINA                              | Promjena visine pika $H_{PS}$ /<br>% |
|------------------------------------------------|--------------------------------------|
|                                                | Ispiranje 60 s                       |
| Etanol                                         | 18,37                                |
| 2-propanol                                     | -14,7                                |
| Aceton                                         | 7,22                                 |
| Amonijev acetat ( $0,25 \text{ mol dm}^{-3}$ ) | 3,47                                 |
| Metanol                                        | 12,35                                |
| KCl ( $2 \text{ mol dm}^{-3}$ )                | -3,15                                |
| KOH ( $2 \text{ mol dm}^{-3}$ )                | -19,25                               |
| Tris-HCl ( $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ )         | -9,82                                |
| SDS ( $1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ) | -1,71                                |

Zaključak je da se ispiranjem elektrode s navedenim otapalima ne može selektivno detektirati kitozan u smjesi s BSA, odnosno da se BSA, a ni kitozan ne može ukloniti s elektrode ispiranjem odabranim otapalima bi otopinama.

## § 5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih iz eksperimentalnih istraživanja može se zaključiti:

- upotrebom CPS metode aminopolisaharid kitozan se ne može detektirati *in situ* u morskoj vodi, već samo primjenom *ex situ* tehnike AdT iz morske vode u puferiranu otopinu, dok se protein BSA može detektirati *in situ* CPS i *ex situ* AdT CPS metodama
- dobiveni AdT CPS pik kitozana (pik  $H_{PS}$ ) i BSA (pik H) je katalitički pik koji nastaje zbog katalitičke redukcije vodikovih iona na molekulama analita adsorbiranim na živinoj elektrodi. Katalitički pikovi se povećavaju smanjenjem pH i povećanjem koncentracije detekcijskog pufera. Dobiveni AdT CPS pik  $H_{PS}$  kitozana i pik H BSA su dobro definirane visine u odnosu na osnovni kronopotenciogram te su smješteni na vrlo negativnom potencijalu ( $E_p = \sim -1,8$  V), a prije samog vala vodika
- optimalni parametri za AdT CPS detekciju kitozana u morskoj vodi su: prijenos u fosfatni pufer pH 7,05, potencijal akumulacije,  $E_a = -0,1$  V, vrijeme akumulacije,  $t_a = 60$  s, te pobudna struja,  $I_{str} = -20$   $\mu$ A
- optimalni uvjeti za AdT CPS detekciju BSA u morskoj vodi su: AdT u fosfatni pufer pH 7,05, potencijal akumulacije,  $E_a = -0,1$  V, vrijeme akumulacije,  $t_a = 60$  s, te pobudna struja,  $I_{str} = -40$   $\mu$ A
- visina AdT CPS pika  $H_{PS}$  kitozana se povećava linearno ( $y = (0,814 \pm 0,0981) x$ ) povećanjem koncentracije kitozana do  $10 \times 10^{-6}$  g  $cm^{-3}$  dok je pri višim koncentracijama visina dosegla limit. Granica detekcije u optimalnim uvjetima iznosi  $1,44 \times 10^{-6}$  g  $cm^{-3}$ .
- povećanje ionske jakosti puferske detekcijske otopine nema vidljiv značajan utjecaj na AdT CPS detekciju pika  $H_{PS}$  kitozana te pika H BSA, jedino se pikovi pomiču prema manje negativnim potencijalima označujući energetski manje zahtjevnu reakciju
- kitozan i BSA su jako adsorbirani na površinu živine elektrode stvarajući vrlo stabilan sloj koji se niti nakon ispiranja modificirane elektrode raznim otapalima i otopinama ne desorbira u potpunosti
- AdT CPS smjese kitozana i BSA dobiva se jedan pik. U  $0,05$  mol  $dm^{-3}$  fosfatnom puferu pH 7,05 pri  $E_a = -0,1$  V,  $I_{str} = -40$   $\mu$ A,  $t_a = 60$  s pik više nalikuje piku  $H_{PS}$  kitozana dok u  $0,05$  mol  $dm^{-3}$  acetatnom puferu pH 5,28 te s istim ostalim parametrima pik smjese više nalikuje na pik H BSA

- primjena različitog  $E_b$  nije omogućila selektivnu desorpciju jednog od analita s površine elektrode nakon AdT u detekcijski pufer ispiranjem adsorbiranog BSA sa površine elektrode pomoću raznih otapala i otopina je rezultiralo minimalnim sniženjem pika H BSA (17,47 %) koje je dobiveno nakon 60 s ispiranja modificirane elektrode otopinom amonij acetata, dok je ispiranje ostalim otapalima i otopinama rezultiralo smanjenjem pika H samo do 11,00 %. Ovaj postotak smanjenja pika H nije dovoljan za selektivnu detekciju kitozana, već bi bilo poželjno da se sav BSA isprao s elektrode
- kako se AdT CPS detekcijom smjese u svim ispitivanim uvjetima dobiva samo jedan pik, zaključak je da nisu pronađeni uvjeti za selektivnu detekciju kitozana niti BSA u njihovoj smjesi.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

|          |                                                                                      |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| ACV      | voltametrija izmjenične struje                                                       |
| AdT      | adsorptivni prijenos                                                                 |
| AdT CPS  | adsorptivni prijenos s kronopotenciometrijskom detekcijom                            |
| BSA      | goveđi serum albumin                                                                 |
| CPS      | kronopotenciometrija                                                                 |
| CSP      | čestice bogate proteinima                                                            |
| DOC      | otopljeni organski ugljik                                                            |
| DOM      | otopljena organska tvar                                                              |
| DON      | otopljeni organski dušik                                                             |
| HMDE     | elektroda viseće živine kapi                                                         |
| HMWDON   | otopljeni organskidušik velike molekulske mase                                       |
| HPLC-PAD | tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti s pulsnim amperometrijskim detektorom |
| HSA      | ljudski serum albumin                                                                |
| N-POM    | polimerni organski materijal koji sadrži dušik                                       |
| SWV      | pravokutnovala voltametrija                                                          |
| THAA     | hidrolizirane aminokiseline                                                          |

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. H. W. Ducklow, D. L. Kirchman, T. R. Anderson, *Limnol. Oceanogr.* **47** (2002) 1684-1693.
2. M. McCarthy, T. Pratum, J. Hedges, R. Benner, *Nature* **390** (1997) 150-154.
3. E. K. Duursma, R. Dawson, *Marine Organic Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 1981, 534.
4. K. Kaiser, R. Benner, *Anal. Chem.* **72** (2000) 2566-2572.
5. R. Benner, K. Kaiser, *Limnol. Oceanogr.* **48** (2003) 118-128.
6. S. Strmečki, M. Plavšić, B. Čosović, *Electroanalysis* **22** (2010) 91-98.
7. S. Strmečki, J. Dautović, M. Plavšić, *Environ. Chem.* **11** (2014) 158-166.
8. E. Paleček, L. Rimankova, *Electrochem. Commun.* **44** (2014) 59-62.
9. E. Paleček, *Electrochim. Acta* **187** (2016) 375-380.
10. M. Heyrovsky, *Croat. Chem. Acta* **79** (2006) 1-4.
11. W. Stumm, J. J. Morgan, *Aquatic Chemistry*, John Wiley and Sons, New York, 1981, 767.
12. E. Paleček, J. Tkac, M. Bartošik, T. Bertok, V. Ostatna, J. Paleček, *Chem. Rev.* **115** (2015) 2045-2108.
13. K. Nagel, F. Liemann, *Oceanol. Acta* **10** (1987) 181-185.
14. C. Cisternas-Novoa, C. Lee, A. Engel, *Mar. Chem.* **175** (2015) 56-71.
15. C. Cisternas-Novoa, C. Lee, A. Engel, *Limnol. Oceanogr. Methods* **12** (2014) 604-616.
16. S. Strmečki, M. Plavšić, *J. Electroanal. Chem.* **712** (2014) 1-7.
17. S. G. Mairanovskii, *Catalytic and Kinetic Waves in Polarography*, Plenum Press, New York, 1968, 241-285.
18. M. D. McCarthy, D. A. Bronk, u D. G. Capone, D. A. Bronk, M. R. Mulholland, E. J. Carpenter (ur), *Nitrogen in the marine environment*, Academic Press, Burlington, SAD, 2008, str. 1219.
19. J. P. Zehr, B. B. Ward, *Appl. Environ. Microb.* **68** (2002) 1015-1024.
20. E. Tanoue, *Mar. Chem.* **51** (1995) 239-252.
21. N. Yamada, E. Tanoue, *Limnol. Oceanogr.* **48** (2003) 1037-1048.

22. K. Mopper, *Mar. Chem.* **5** (1977) 585-603.
23. G. G. Leppard, *Sci. Total Environ.* **165** (1995) 103-131.
24. M. Plavšić, B. Čosović, *Electroanalysis* **12** (2000) 895-900.
25. S. Strmečki, M. Plavšić, B. Čosović, V. Ostatna, E. Paleček, *Electrochem. Commun.* **11** (2009) 2032-2035.
26. S. Strmečki, M. Plavšić, *Electrochem. Commun.* **18** (2012) 100-103.
27. E. Paleček, M. Bartošik, V. Ostatna, M. Trefulka, **12** (2012) 27-45.
28. M. Tomschik, L. Havran, M. Fojta, E. Paleček, *Electroanalysis* **10** (1998) 403-409.
29. M. Heyrovsky, u E. Paleček, F. Scheller, J. Wang (ur), *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics*, 1, Elsevier, Amsterdam, 2005, str. 657-680.
30. M. Heyrovsky, *Electroanalysis* **16** (2004) 1067-1073.
31. V. Ostatna, B. Uslu, B. Dogan, S. Ozkan, E. Paleček, *J. Electroanal. Chem.* **593** (2006) 172-178.
32. V. Dorčák, E. Paleček, *Electroanalysis* **19** (2007) 2405.
33. E. Paleček, V. Ostatna, M. Masarik, C. W. Bertoncini, T. M. Jovin, *Analyst* **133** (2008) 76-84.
34. E. Paleček, V. Ostatna, H. Černocka, A. C. Joerger, A. R. Fersht, *J. Am. Chem. Soc.* **133** (2011) 7190-7196.
35. V. Ostatna, V. Kasalova, K. Kmetova, O. Sedo, *J. Electroanal. Chem.* **821** (2018) 97-103.
36. V. Vargova, R. E. Gimenez, H. Černocka, D. C. Trujillo, F. Tulli, V. I. P. Zanini, E. Paleček, C. D. Borsarelli, V. Ostatna, *Electrochim. Acta* **187** (2016) 662-669.
37. Y. Q. Zie, C. O. Huber, *Anal. Chim. Acta* **263** (1992) 63-70.
38. D. Jagner, A. Graneli, *Anal. Chim. Acta* **83** (1976) 19-26.
39. R. M. Town, H. P. van Leeuwen, *J. Electroanal. Chem.* **509** (2001) 58-65.
40. R. D. Riso, P. LeCorre, C. J. Chaumery, *Anal. Chim. Acta* **351** (1997) 83-89.
41. M. L. Gozzo, L. Colacicco, C. Calla, G. Barbaresi, R. Parroni, B. Giardina, S. Lippa, *Clin. Chim. Acta* **285** (1999) 53-68.
42. I. Piljac, *Elektroanalitičke metode*, RMC, Zagreb, 1995, 409
43. J. G. Osteryoung, R. A. Osteryoung, *Anal. Chem.* **57** (1985) A101-&.

44. B. Breyer, H. H. Bauer, *Alternating current polarography and tensammetry*, John Wiley&Sons, New York/London, 1963, 283.
45. J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, John Wiley & Sons, New York, 2000, 209.
46. E. Paleček, I. Postbieglova, *J. Electroanal. Chem.* **214** (1986) 359-371.
47. Y. W. Cho, J. Jang, C. R. Park, S. W. Ko, *Biomacromolecules* **1** (2000) 609-614.
48. S. V. Nemtsev, A. I. Gamzazade, S. V. Rogozhin, V. M. Bykova, V. P. Bykov, *Appl. Biochem. Micro.* **38** (2002) 521-526.
49. M. Rinaudo, *Prog. in Polym. Sci.* **31** (2006) 603-632.
50. C. K. S. Pillai, W. Paul, C. P. Sharma, *Prog. Polym. Sci.* **34** (2009) 641-678.
51. M. N. V. R. Kumar, *React. Funct. Polym.* **46** (2000) 1-27
52. V. Mirčeski, S. Skrzypek, W. Ciesielski, A. Sokolowski, *J. Electroanal. Chem.* **585** (2005) 97-104.
53. V. Mirčeski, Š. Komorsky-Lovrić, M. Lovrić, *Square-Wave Voltammetry: Theory and Application*, Springer-Verlag, Berlin, 2007,
54. V. Dorčak, M. Bartošik, V. Ostatna, E. Paleček, M. Heyrovsky, *Electroanalysis* **21** (2009) 662-665.
55. S. Strmečki, E. Paleček, *Bioelectrochemistry* **120** (2018) 87-93.
56. H. Černocka, V. Ostatna, E. Paleček, *Electrochim. Acta* **174** (2015) 356-360.
57. V. Ostatna, F. Kuralay, L. Trnkova, E. Paleček, *Electroanalysis* **20** (2008) 1406-1413.
58. E. Paleček, V. Ostatna, *Analyst* **134** (2009) 2076-2080.
59. F. Kratz, S. Grass, N. Umanskaya, C. Scheibe, C. Muller-Renno, N. Davoudi, M. Hannig, C. Ziegler, *Colloid. Surface B* **128** (2015) 28-35.

## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Lora Pereža

Datum rođenja: 20. travnja 1994.

Mjesto rođenja: Split

### Obrazovanje

2000–2008 Osnovna škola „Skalice“, Split

2008–2012 V. gimnazija „Vladimir Nazor“, Split

2012–2015 Prirodoslovno-matematički fakultet, Biologija i kemija, Sveučilište u Splitu, Split (Baccalaurea biol. et chem)

2015-2018 Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Usmeno priopćenje: L. Pereža; S. Strmečki Kos, ELEKTROKEMIJSKA DETEKCIJA AMINOŠEĆERA I PROTEINA U MORSKOJ VODI, *Knjiga sažetaka "5. Dan elektrokemije i 8th ISE-SSRSE"*, Zagreb: HDKI, 2018. str. 19-19
2. S. Strmečki; M. Plavšić; L. Pereža, THE POTENTIAL OF ELECTROCHEMICAL METHODS IN ANALYSIS OF NATURAL POLYSACCHARIDES, *Book of Abstracts of the 3rd International EPNOE Junior Scientists Meeting*, Maribor: EPNOE Association and LCPP, 2018. str. 57-57