

Razvoj DNA-biosenzora temeljenih na ugljikovim materijalima u svrhu elektrokemijske karakterizacije bisfenola A

Krivić, Denis

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:587228>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET U SPLITU

**RAZVOJ DNA-BIOSENZORA TEMELJENIH NA UGLJIKOVIM
MATERIJALIMA U SVRHU ELEKTROKEMIJSKE KARAKTERIZACIJE
BISFENOLA A**

DIPLOMSKI RAD

DENIS KRIVIĆ

Matični broj: 85

Split, listopad 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET U SPLITU
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
SMJER: ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

RAZVOJ DNA-BIOSENZORA TEMELJENIH NA UGLJIKOVIM
MATERIJALIMA U SVRHU ELEKTROKEMIJSKE KARAKTERIZACIJE
BISFENOLA A

DIPLOMSKI RAD

DENIS KRIVIĆ

Matični broj: 85

Split, listopad 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDIES IN CHEMISTRY
ORIENTATION: ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

**DEVELOPMENT OF CARBON-BASED DNA-BIOSENSORS FOR THE
PURPOSE OF ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF
BISPHENOL-A**

MASTER THESIS

DENIS KRIVIĆ

Parent number: 85

Split, October 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet

Studij: Kemija; smjer: Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: prirodne znanosti

Znanstveno polje: kemija

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

Mentor: doc. dr. sc. Marijo Buzuk

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Kurt Kalcher

RAZVOJ DNA-BIOSENZORA TEMELJENIH NA UGLJIKOVIM MATERIJALIMA U SVRHU ELEKTROKEMIJSKE KARAKTERIZACIJE BISFENOLA A

Denis Krivić, 85

Sažetak:

U ovom radu ispitivano je elektrokemijsko ponašanje elektrode od ugljikove paste te dijamantne elektrode dopirane borom u svrhu elektrokemijskog određivanja bisfenola A. Ove elektrode su zbog svoje pristupačnosti i osjetljivosti vrlo pogodni kandidati za (bio)senzore.

Mjerenja su vršena u otopini fosfatnog pufera (0,1 M) pri pH 7. Elektroanalitičko određivanje bisfenola A vršeno je uporabom diferencijalne pulsne voltometrije, DPV (engl. differential pulse voltammetry). Elektroda od ugljikove paste pokazala je bolji odziv.

Iako obje elektrode literaturno posjeduju veliki potencijal za uporabu kao DNA-biosenzori, pokazano je da dobiveni rezultati znatno ovise o tretmanu kojem je površina elektrode podlegla prije uporabe. Isto tako, ističe se važnost modifikacije aktivne površine elektrode, odnosno same imobilizacije DNA u kontekstu utjecaja na dobivene rezultate.

Ključne riječi: ugljikovi materijali, ugljikova pasta, dijamantna elektroda, dopiranje, bisfenol A, DNA, voltometrija, modifikacija, imobilizacija

Rad sadrži: 89 stranica, 24 slike, 3 tablice, 114 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|---------------------------------------|---------------|
| 1. Doc. dr. sc. Maša Buljac | - predsjednik |
| 2. Doc. dr. sc. Ivana Škugor Rončević | - član |
| 3. Doc. dr. sc. Marijo Buzuk | - član-mentor |

Datum obrane: 31. listopada 2018.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

MASTER THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology

Studies: Chemistry; **Orientation:** Organic chemistry and biochemistry

Scientific area: natural sciences

Scientific field: chemistry

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

Supervisor: Marijo Buzuk, PhD – assistant prof.

Technical assistance: Kurt Kalcher, PhD – associate prof.

DEVELOPMENT OF CARBON-BASED DNA-BIOSENSORS FOR THE PURPOSE OF ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF BISPHENOL-A

Denis Krivić, 85

Abstract:

In the present paper the electrochemical behavior of carbon paste and boron doped diamond electrode was tested for purpose of bisphenol A electrochemical determination. Since electrodes like these are very affordable and since they possess great sensitivity, they are very suitable (bio)sensor candidates.

The measurements were carried out in the phosphate buffer solution (0,1M) at pH 7. The electroanalytical determination of bisphenol A was done using differential pulse voltammetry. The carbon paste electrode exhibited better response.

Even though both electrodes possess a great potential for being used as DNA-biosensors, it was shown that obtained results depend on the treatment the electrode underwent before the utilization. Also, the importance of the surface area modification, as well as the immobilization of DNA was accentuated in the context of the influence they have on the obtained results.

Keywords: carbon-based materials, carbon paste, diamond electrode, doping, bisphenol A, DNA, voltammetry, modification, immobilization

Thesis contains: 89 pages, 24 figures, 3 tables, 114 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|---|----------------|
| 1. Maša Buljac, PhD – assistant prof. | - chair person |
| 2. Ivana Škušor Rončević, PhD – assistant prof. | - member |
| 3. Marijo Buzuk, PhD – assistant prof. | - supervisor |

Defence date: October 31, 2018.

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

Diplomski rad je izrađen u laboratoriju za senzore Odjela za analitičku kemiju Instituta za kemiju Karl Franzens sveučilišta u Grazu, Austrija pod neposrednim voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Kurta Kalchera i u Zavodu za opću i anorgansku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Marija Buzuka, u razdoblju od ožujka do listopada 2018. godine.

*Zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Mariju Buzuku na pomoći i savjetima pruženim tijekom izrade ovog rada, ali i uopće tijekom studija. Međutim, najviše mu hvala za strpljenje.....njega mu je sa mnom vjerojatno najviše trebalo. Kažu „lijepa riječ željezna vrata otvara“ako je tako, onda ih njegova slama... A najljepše je kada znaš da je ista ta riječ, tako gromoglasna, ipak na tvojoj strani....i kada ne čuješ. E, za **to** ti hvala, prijatelju!*

Zahvaljujem doc. dr. sc. Maši Buljac na praktičnoj, a posebno moralnoj podršci tijekom svih muka koje su se javljale na putu do kraja, ne samo sada, nego nekako uopćeno tijekom druge polovice mog „studijskog života“. Ipak je sve lakše prebroditi zajedno, uz smijeh..... „ludi“ su se prepoznali.....

Zahvaljujem doc. dr. sc. Ivani Škugor Rončević, jer u samim počecima, kada se činilo da nema druge nego odustati, nitko nije imao više strpljenja. Doista, bez njene pomoći ne bih bio tu gdje jesam, ali mi se čini da nikada neću biti sposoban opisati koliko sam zahvalan na dobroti koja me spasila.

Na kraju, zahvaljujem obitelji i prijateljima koji su bili uz mene te učinili da mi vrijeme studija „proleti dok si rekao keks“!

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Utvrđivanje elektrokemijskog ponašanja čiste elektrode od ugljikove paste i dijamantne elektrode dopirane borom te ponašanje istih kada je na njihovu površinu imobilizirana DNA
2. Utvrđivanje elektrokemijskog ponašanja bisfenola A na elektrodama (modificiranim i nemodificiranim – imobilizacija DNA)
3. Odabir i optimiziranje metode koja je korištena u svrhu pred-tretmana aktivne površine elektrode, kao i tretmana kasnije imobilizacije u svrhu razvoja optimalnog DNA-biosenzora za elektroanalitičko određivanje bisfenola A u realnim uzorcima

SAŽETAK

U ovom radu ispitivano je elektrokemijsko ponašanje elektrode od ugljikove paste te dijamantne elektrode dopirane borom u svrhu elektrokemijskog određivanja bisfenola A. Ove elektrode su zbog svoje pristupačnosti i osjetljivosti vrlo pogodni kandidati za (bio)senzore.

Mjerenja su vršena u otopini fosfatnog pufera (0,1 M) pri pH 7. Elektroanalitičko određivanje bisfenola A vršeno je uporabom diferencijalne pulsne voltametrije, DPV (engl. *differential pulse voltammetry*). Elektroda od ugljikove paste pokazala je bolji odziv.

Iako obje elektrode literaturno posjeduju veliki potencijal za uporabu kao DNA-biosenzori, pokazano je da dobiveni rezultati znatno ovise o tretmanu kojem je površina elektrode podlegla prije uporabe. Isto tako, ističe se važnost modifikacije aktivne površine elektrode, odnosno same imobilizacije DNA u kontekstu utjecaja na dobivene rezultate.

Ključne riječi: ugljikovi materijali, ugljikova pasta, dijamantna elektroda, dopiranje, bisfenol A, DNA, voltametrija, modifikacija, imobilizacija

ABSTRACT

In the present paper the electrochemical behavior of both carbon paste and boron doped diamond electrode was tested for purpose of bisphenol A electrochemical determination. Since electrodes like these are very affordable and since they possess great sensitivity, they are very suitable (bio)sensor candidates.

The measurements were carried out in the phosphate buffer solution (0,1M) at pH 7. The electroanalytical determination of bisphenol A was done using differential pulse voltammetry. The carbon paste electrode exhibited better response.

Even though both electrodes possess a great potential for being used as DNA-biosensors, it was shown that obtained results depend on the treatment the electrode underwent before the utilization. Also, the importance of the surface area modification, as well as the immobilization of DNA was accentuated in the context of the influence they have on the obtained results.

Keywords: carbon-based materials, carbon paste, diamond electrode, doping, bisphenol A, DNA, voltammetry, modification, immobilization

Sadržaj

1. OPĆI DIO	1
1.1. Uvod u teoriju senzora	2
1.1.1. Uvod u elektroanalitičke metode	5
1.1.2. Voltometrija	6
1.1.2.1. Ciklička voltometrija	6
1.1.2.2. Diferencijalna pulsna voltometrija	7
1.2. Dijamant kao materijal za izradu elektroda	8
1.2.1. Dijamantne elektrode dopirane borom	10
1.2.1.1. Razvoj dijamanta dopiranog borom	12
1.2.1.2. Značaj gustoće dopanta	15
1.2.1.3. Terminacija površine	16
1.2.1.4. Prisustvo NDC	20
1.2.1.5. Završna obrada površine.....	20
1.2.2. Pred-tretman i njegov utjecaj na svojstva BDDE	21
1.2.3. Površinska modifikacija i funkcionalizacija BDDE	25
1.2.3.1. Kemijske modifikacije površine.....	26
1.2.3.2. Fotokemijske modifikacije površine	27
1.2.3.3. Elektrokemijske modifikacije površine	27
1.2.3.4. Kombinirane metode (elektrokemijska/kemijska).....	29
1.2.4. Metali i metalni oksidi na površini dijamanta	29
1.3. Ugljikova pasta kao materijal za izradu elektroda	32
1.4. Endokrina ometala u analitičkim istraživanjima.....	35
1.4.1. Bisfenol-A kao endokrino ometalo.....	37
1.4.1.1. Djelovanje i posljedice	38
1.4.1.2. Zabrinjavajuća sveprisutnost.....	39

1.4.2.	Kemijski aspekti Bisfenola A	40
1.4.2.1.	Fizička i kemijska svojstva BPA	41
1.4.2.2.	Metode određivanja	42
1.4.2.3.	Elektrokemijski aspekti BPA	43
1.5.	Deoksiribonukleinska kiselina (DNA)	45
1.5.1.	Elektrokemija DNA	47
1.6.	Interakcijska mini-studija DNA i bisfenola A	48
1.6.1.	Utjecaj interakcije DNA i BPA na elektrokemijska mjerenja	50
2.	EKSPERIMENTALNI DIO	51
2.1.	Priprava otopina	52
2.1.1.	Priprava otopine DNA	52
2.1.2.	Priprava otopine BPA	53
2.1.3.	Priprava otopine KH_2PO_4	53
2.1.4.	Priprava otopine K_2HPO_4	53
2.1.5.	Priprava otopine CH_3COONa	53
2.1.6.	Priprava otopine NaH_2PO_4	54
2.1.7.	Priprava otopine Na_2HPO_4	54
2.1.8.	Priprave otopine fosfatnog pufera (0,1 M); pH 7	54
2.1.9.	Priprava otopine fosfatnog pufera (0,05 M); pH 7,4	54
2.1.10.	Priprava otopine acetatnog pufera (0,5 M); pH 4,8	55
2.2.	Aparatura	55
2.3.	Priprava radnih elektroda	55
2.3.1.	Imobilizacija DNA	56
3.	REZULTATI I RASPRAVA	57
4.	ZAKLJUČAK	82
5.	LITERATURA	84

UVOD

Bisfenol je spoj koji se široko koristi u kemijskoj industriji. Danas je skoro nemoguće zamisliti svijet bez plastike. U dobrom dijelu plastičnih proizvoda koje svaki dan koristimo nalaze se opasni spojevi – endokrina ometala. Jedan od takvih spojeva je i bisfenol A. Pored toga što smo njegovom utjecaju direktno izloženi, veliki dio plastične ambalaže završi na odlagalištima otpada, odnosno u morima. Tako dolazi do neposrednog zagađivanja okoliša i ekosustava.

Kako bi se ovakav problem riješio, znanost neprestano pokušava naći nove metode analize i uklanjanja štetnih spojeva iz okoliša, ali i u samim živim organizmima. Kao vrlo zgodne pokazale su se elektrokemijske metode, radi svoje niske cijene, odnosno pristupačnosti, a opet velike osjetljivosti. Ono što je vrlo zanimljivo je to da one omogućuju kako analizu, tako i uklanjanje (oksidacijom) ovakvih štetnih tvari iz medija u kojem se nalaze.

Senzori su glavni alati koji se koriste u elektrokemijskim istraživanjima. Oni su osjetila sustava koji ih kontrolira. Kada je senzor (elektroda) modificiran biološkim materijalom, tada se naziva biosenzorom.

Istraživanja su pokazala da su DNA-biosenzori vrlo učinkoviti u analizi prisutnosti bisfenola u određenom mediju, pa tako i u određivanju njegove potencijalne biotoksičnosti (genotoksičnosti) – potencijalni uzročnik raka. Stoga su potrebna mnoga detaljna istraživanja u svrhu optimizacije novih, jeftinih, prenosivih i osjetljivih senzora/biosenzora, odnosno potencijalnih senzora za rak.

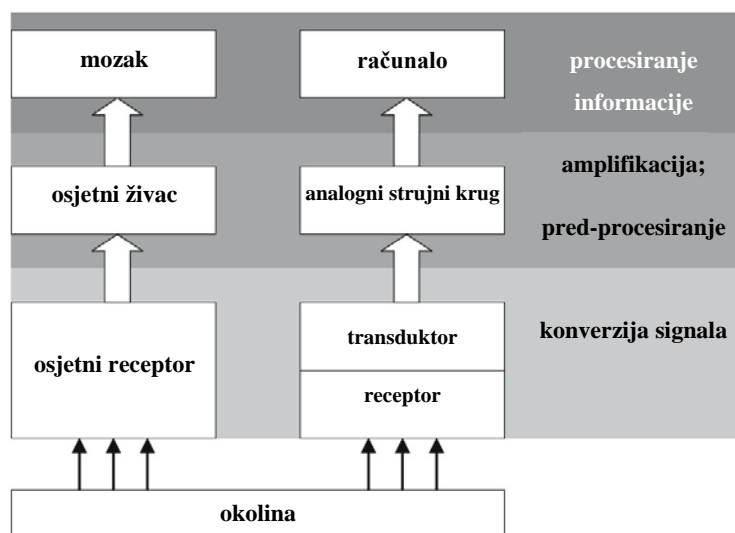
1. OPĆI DIO

1.1. Uvod u teoriju senzora

Pojam „senzor“ pojavio se već 70-ih godina prošlog stoljeća. Kako se razvijala industrija, neizbježan je bio i razvoj tehnologije koja će omogućiti ekonomičnije metode analize, što je uvjetovalo i razvoj senzora kao takvih. To je bilo vrijeme brzog napretka u mikroelektronici, kada je zasnovana tehnička inteligencija. Strojevi su postali „inteligentniji“ i autonomniji. Razvila se i potreba za umjetnim osjetilnim organima koji bi omogućili strojevima da se samostalno orijentiraju u prostoru. Vjerovalo se da, tada već poznati kao, roboti ne bi smjeli izvršavati zadatke na slijepo. Trebali bi moći detektirati prepreke i prilagoditi se danoj situaciji. U ovom kontekstu, senzori su prvobitno predstavljali tehničke osjetne organe, poput očiju, ušiju, ticala i sl. Kao što i čovjek, pored toga što vidi, čuje i osjeća druge fizičke podražaje, može na neki način kemijski osjetiti okolinu kroz okus i miris, tako se i za kemijske senzore može figurativno reći da predstavljaju umjetne jezike i nosove [1].

Ako prihvatimo pretpostavku da su senzori tehnički osjetni organi, onda možemo i povući paralelu između bioloških i tehnički sustava. U živom organizmu, receptor osjetilnog organa je u direktnom kontaktu s okolinom. Okolni podražaji se transformiraju u električne signale koji putuju živčanim stanicama (neuronima) pulsirajući pri određenom potencijalu. Jaki podražaji generiraju visoku pulsnu frekvenciju. Međutim, vodljivost nije samo funkcija neurona. Nadalje, amplifikacija signala i kondicioniranje se događaju uglavnom u vidu smanjenja signala. U mozgu se informacija obrađuje i konačno dolazi do izazivanja reakcije.

Postoji dosta sličnosti između živih organizama i strojeva, odnosno načina na koji primaju i procesiraju signal. Kao i kod živih organizama, receptori su i dio tehničkog senzorskog sustava. Receptor reagira na okolne parametre mijenjajući neke njegove svojstvene karakteristike. Kod susjednog transduktora, primarna informacija se transformira u električni signal. Često moderni senzori imaju i dodatne dijelove za amplifikaciju i kondicioniranje signala. Na rubu lanca nalazi se mikroracunalo, koje radi poput centralnog živčanog sustava u živih organizama.



Slika 1 - Procesiranje signala kod živih organizama i kod inteligentnih strojeva

Iz navedenog se može vidjeti da je procesiranje signala pomoću digitalnih računala neophodno za funkcioniranje senzora, kao što je organizmu neophodno posjedovati neurone i mozak za fiziološke procese. Stoga, treba prihvatiti činjenicu da senzor ne predstavlja, takoreći, zamjenu za uređaje poput mikrofona ili jon-selektivne elektrode. Dapače, korištenje ovih sprava daje novo značenje rastućoj eri senzora.

Još uvijek ne postoji opće prihvaćena definicija pojma senzor iako se čini prilično jasno što mislimo kad upotrijebimo pojam senzor. Ipak, postoje i nedoumice oko toga je li senzor sam receptor ili je to cijeli sklop koji uključuje i transduktor.

Neovisno o tome, sporazumno je zaključeno da svaki senzor mora imati navedene karakteristike:

- u direktnom kontaktu s predmetom ispitivanja
- transformiranje ne-električnog signala u električni
- brz odziv
- kontinuirani rad (ili bar u ponovljenim ciklusima)
- mali
- jeftin

Kemičari su ranije oklijevali upustiti se u rad sa sensorima, ali je s vremenom rastao i njihov interes. Danas se kemijski senzori smatraju pod-disciplinom analitičke kemije iako

uglavnom u Europi. U početku nije bilo potrebe za korištenjem senzora, budući da se većina analiza obavljala u, takoreći, centraliziranim velikim laboratorijima. Međutim, razvojem industrije i znanosti, došlo je i do razvoja znanosti o okolišu, pa tako i same analize okoliša. Mnogi uzorci nisu mogli biti nošeni na duge relacije u potrebe analize, jer bi putem došlo do dekompozicije. Odatle i potreba za novim, malim i zgodnim prijenosnim uređajima – analitičkim sondama, koje bi se s lakoćom mogle staviti u uzorak. Tako je kao prvi kemijski senzor napravljena jon-selektivna elektroda – staklena elektroda za određivanje pH vrijednosti [2].

IUPAC je 1991. godine dao jednu općenitu definiciju kemijskih senzora koja glasi: Kemijski senzor je uređaj koji transformira kemijsku informaciju, polazeći od koncentracije određene komponente uzorka sve do cjelokupne analize sastava, u jedan analitički koristan signal [3].

Kasnije su se pojavile i neke druge, specifičnije definicije, koje su bile više pragmatičnog karaktera. Ono što je mnogima bilo zajedničko je karakteristika reverzibilnosti. To znači da se signal ne bi smio zamrznuti, nego davati odziv na promjene u koncentraciji uzorka dinamično tijekom mjerenja. Tako su opće prihvaćene karakteristike koje kemijski senzor mora posjedovati:

- transformiranje kemijskih vrijednosti u električni signal
- brzi odziv
- očuvanje aktivnosti tijekom dužeg vremenskog perioda
- mali
- jeftin
- specifičan, npr. mora davati odziv na samo jedan analit ili bar biti selektivan za grupu analita

IUPAC 1991. godine navodi podjelu kemijskih senzora prema transdukciji signala¹, tako da postoje:

- Optički senzori – transformiraju promjene optičkih fenomena, koje su rezultat interakcije analita s receptorom

¹ fizička i kemijska svojstva osjetilnog elementa variraju kao funkcija koncentracije analita, kako bismo iskoristili tu informaciju, senzor pretvara navedenu promjenu u mjerljivu fizičku vrijednost

- Elektrokemijski senzori – transformiraju efekt elektrokemijske interakcije analit-elektroda u signal koji se može iskoristiti (ovakvi efekti mogu biti električki stimulirani li mogu nastati kao rezultat spontane reakcije pri „nultoju struji“)
- Električni senzori – signal proizlazi iz promjene električnih svojstava uzrokovanih interakcijom analita, kada ne dolazi do elektrokemijskog procesa
- Senzori osjetljivi na masu – transformiraju promjenu mase na posebno modificiranoj površini u promjenu svojstva pomoćnog materijala (promjena mase je uzrokovana nakupljanjem analita)
- Magnetski senzori (uglavnom za praćenje kisika) – zasnivaju se na paramagnetskim svojstvima plina koji se analizira
- Termometrijski senzori – zasnivaju se na mjerenju toplinskog efekta određene kemijske reakcije ili adsorpcije koje uključuju analit
- Drugi senzori – zasnivaju se na adsorpciji ili emisiji zračenja

Biosenzori se ne navode kao posebna grupa budući da imaju svojstva kemijskih senzora. Oni se zasnivaju na biokemijskim i biološkim mehanizmima.

U literaturi se navode još dvije vrste senzora, koje nisu kemijski senzori u pravom smislu riječi, jer im nedostaje transduktor, pa se mogu čak smatrati naprednim analitičkim reagensima [2]:

- Molekulski senzori – posjeduju dvije jedinice od kojih jedna selektivno veže analit, a druga mijenja fiziko-kemijsko svojstvo kao odgovor na vezanje analita – prepoznavanje i transdukciju vrši ista molekula
- Nanosenzori – sub-mikroskopski hibridni sastav koji uključuje nanočestice i molekulske spojeve koji posjeduju funkciju prepoznavanja i transdukcije

1.1.1. Uvod u elektroanalitičke metode

Elektroanalitičke metode predstavljaju skupinu analitičkih postupaka kod kojih informaciju, odnosno podatak o koncentraciji, aktivitetu ili nekom drugom podatku određivane molekulske vrste (atoma, iona ili molekule) dobivamo posredstvom

međusobno razmjernih, odnosno analognih električnih veličina, tj. pomoću električnog napona električne struje ili električnog naboja [4].

Elektrokemijska ćelija je ključni instrument u kojem se provode elektroanalitička mjerenja, a koja se sastoji od posude koja sadrži otopinu (najčešće je to otopina elektrolita – ionski vodič) u koju su uronjene elektrode – elektronski vodiči. One imaju dvojak karakter, jer na njima može nastati dana električna veličina, dok mogu služiti i za dovođenje iste iz vanjskog izvora [5].

Elektroda ima ulogu senzora (osjetila) kada biva uronjena u otopinu, jer se tada dolazi do elektrokemijske reakcije prilikom koje se promjena koncentracije molekulske vrste manifestira kao promjena razlike potencijala uspostavljene na dodirnoj površini elektroda-otopina. Pored toga, elektroda može biti sredstvo za dovođenje električne veličine koja uzrokuje promjene na dodirnoj površini elektroda-otopina. Kao produkt navedene promjene nastaje neka druga veličina koju mjerimo [6].

1.1.2. Voltometrija

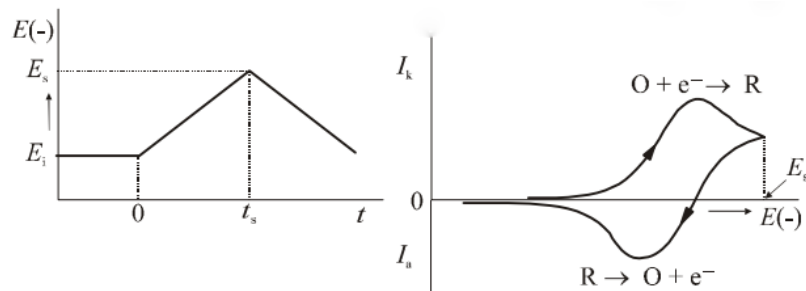
Voltometrija je zajednički naziv za niz elektrokemijskih metoda koje se zasnivaju na mjerenjima odnosa struje i potencijala kod elektrokemijskog procesa na radnoj elektrodi. Signal pobude je električni napon, a signal odziva je struja ćelije, a mjeri se kao funkcija narinutog napona [7].

1.1.2.1. Ciklička voltometrija

Kod cikličke voltometrije, CV (engl. *cyclic voltammetry*) kao radnu elektrodu koristimo mikroelektrodu. Potencijal se povećava linearno s vremenom i mjeri se struja. Struja se povećava kako se približavamo potencijalu elektroaktivnog materijala. Struja je ograničena površinom radne elektrode te stopi pri kojoj analit može difundirati na elektrodu. Ova metoda se temelji na principu da se porastom napona dolazi do reakcije elektroaktivne vrste te kada vrsta izreagira dolazi do obrata smjera potencijala. Dakle,

povratni posmik je sposoban odrediti bilo koji elektroaktivni produkt nastao polaznim posmikom [5].

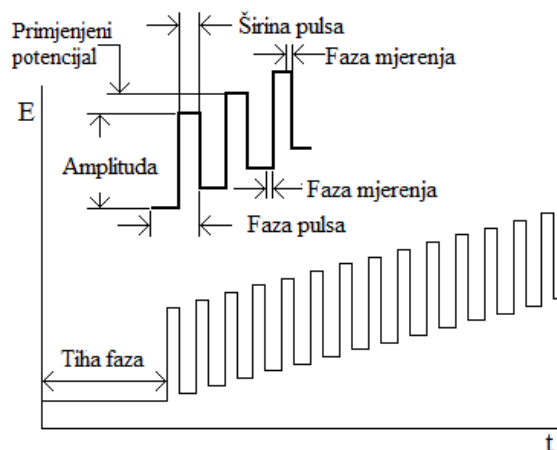
Grafički prikaz odziva cikličke voltametrije nazivamo cikličkim voltamogramom.



Slika 2 - Signal pobude i signal odziva za cikličku voltametriju [4]

1.1.2.2. Diferencijalna pulsna voltametrija

Kod diferencijalne pulsne voltametrije, DPV (engl. *differential pulse voltammetry*) potencijal se određuje pomoću serije pulsova. Razlika Svaki od potencijala namješta se na malu amplitudu (10-100 mV) i dodaje na bazni (osnovni) potencijal. Trenutni potencijal se mjeri na dva mjesta za svaki puls - prvi prije primjene pulsa, a drugi na kraju pulsa. Potom se mjeri razlika između izmjerenih vrijednosti kao funkcija potencijala.

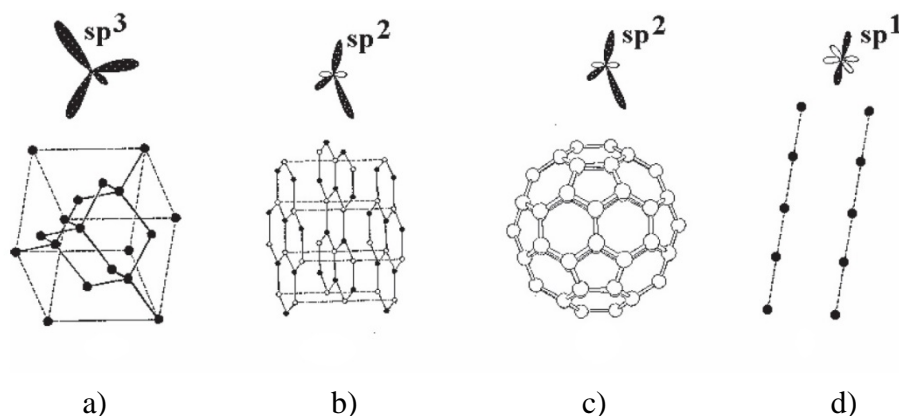


Slika 3 - Oblik potencijalnog vala za diferencijalnu pulsnu voltametriju (DPV) [8]

1.2. Dijamant kao materijal za izradu elektroda

Ugljik je šesti po redu u Periodnom sustavu elemenata (PSE) s $1s^2 2s^2 2p^2$ konfiguracijom u osnovnom stanju. Ono što ga čini jedinstvenim u odnosu na druge elemente je njegova sposobnost kreiranja različitih tipova vrsta veza, što je posljedica mogućnosti njegovih elektrona da „šetaju“ između s i p stanja – hibridizacija orbitala. Kao rezultat, ugljik može tvoriti jednostruke, dvostruke ili trostruke kovalentne veze s drugim atomima ugljika te s drugim elementima. Budući da se nalazi u drugoj periodi PSE, nije ni elektropozitivan ni elektronegativan, pa je vjerojatnije da će dijeliti elektron, nego li ga dati ili primiti.

Uzimajući u obzir tip veze između atoma ugljika, postoje alotropske modifikacije ugljika, različite kristalne strukture, a istog kemijskog sastava. Drugačija struktura predodređuje drugačija svojstva. Četiri valentna elektrona mogu tvoriti sp , sp^2 i sp^3 konfiguraciju, što vodi do nastanka različitih linearnih, planarnih i zatvorenih (engl. *bulk*) struktura s koordinacijom 2, 3, 4 i interveznim kutovima od 180, 120 i 109,47 stupnjeva. Dijamant je potpuno sp^3 hibridiziran, s vezama koje su duge 1,54 Å. Visoka čvrstoća dijamanta i vrlo niska elektrovodljivost rezultat su jakih veznih energija C-C veza, koje su tetraedarski raspoređene u kristalnoj rešeci.



Slika 4 - Strukture glavnih alotropskih modifikacija ugljika. a) 3D kubični dijamant i šestokutni lonsdelit sa sp^3 vezama; b) 2D slojeviti šestokutni grafit sa sp^2 vezama; c) 1D nanocjevčice i 0D fulereni poput C_{60} sa sp^2 vezama i d) amorfni ugljik (čađ, karbeni) sa sp vezama. Iznad su prikazane odgovarajuće kemijske orbitale [114].

Budući da je dijamant na sobnoj temperaturi izvrstan električni izolator s otpornošću koja je veća od $10^{15} \Omega\text{cm}$. Jedna, vrlo zgodna, metoda koja omogućuje materijalu da postane

poluvodič je **dopiranje**, što podrazumijeva stvaranje električnog naboja (elektrona i šupljina). To se ostvaruje uvođenjem nečistoća kako bi se modificirao broj i tip prisutnih slobodnih nositelja naboja – ekstrinzični poluvodič, za razliku od intrinzičnih poluvodiča koji su toliko čisti da nečistoće neznatno utječu na električna svojstva. Sukladno, nečistoće se nazivaju **dopanti**.

Postoje dvije skupine dopanta – atomi donori (fosfor, arsen i antimon) i atomi akceptori (bor, aluminij, galij, indij i dr.).

U prvom slučaju, atom akceptor je dopiran atomom donorom koji ima viši valentni broj. Primjerice, ugljikov atom ima četiri valentna elektrona. Svaki od njih je kovalentno vezan za jedan od četiri elektrona susjednih atoma ugljika. Teoretski, ako se u kristalnu rešetku umjesto ugljika ugradi atom s pet elektrona u valentnoj ljusci (npr. arsen), tada će atom imati četiri kovalentne veze i jedan slobodni elektron. Taj slobodni elektron slabo je vezan za atom i može se lako pobuditi i prijeći iz valentne ljuske u vodljivu. Pobuđivanje takvih slobodnih elektrona ne rezultira stvaranjem šupljina i u takvom materijalu broj elektrona daleko nadmašuje broj šupljina te koristi elektrone kao glavne nositelje naboja. Ovaj tip vodljivosti naziva se n-tip [9].

U drugom slučaju, koristi se atom akceptor koji ima niži valentni broj nego materijal koji se dopira. Primjerice, u kristalnu rešetku ugljika se umjesto njegova atoma može ugraditi trovalentni atom (npr. bor). Rezultat su tri kovalentne veze uobičajene u kristalnoj rešetki ugljika i jedan slobodni elektron. Na taj način atom dopanta može prihvatiti elektron iz atoma vezanog u susjednu kovalentnu vezu za popunjavanje četvrte veze. Praznina koja nastaje stvara šupljinu za svaki elektron koji nedostaje iz veznog para. Glavni nositelji naboja u ovom slučaju su šupljine koje nastaju kada elektroni napuste valentnu ljusku. Trovalentni dopant je okarakteriziran kao akceptor, jer injektira mnoge šupljine koje su glavni nositelji naboja. Ova vrsta materijala - poluvodiča naziva se p-tip [9].

Ipak, uspješno dopiranje dijamanta ostvaruje se uvođenjem nečistoća p-tipa (bora) na supstitucijska mjesta u kristalnoj rešetki. Zanimljivo je da za velike koncentracije dopiranja (preko 10^{21} atoma bora po centimetru kubičnom) otpornost pri sobnoj temperaturi pada na $10^{-3} \Omega\text{cm}$.

Do problema kod dopiranja n-tipom nečistoća dolazi zbog visoke energije aktivacije akceptora koja npr. iznosi 1,7 eV za dušik te zbog poprilično smanjene mobilnosti nosioca u slučaju dopiranja fosforom. Za razliku od ovoga, kod dopiranja p-tipom nečistoća,

atomi bora u dijamantu imaju funkciju akceptora s aktivacijskom energijom od 0,37 eV. Zbog toga, uspješno dopiranje n-tipom, koje bi bilo od ikakve koristi za korištenje materijala u mjerenjima, nije ostvareno [10].

Dijamantni kristali koji se danas koriste za izradu detektora odlikuju se iznimnom čistoćom te ih možemo smatrati gotovo intrinzičnim (mala koncentracija uvijek prisutnih nečistoća uglavnom rezultira vrijednostima koncentracije slobodnih nositelja naboja manjim od 10^3 cm^{-3}), a odlikuju ih vrlo male struje curenja, reda nA ili čak pA.

1.2.1. Dijamantne elektrode dopirane borom

Ugljikove elektrode se naširoko koriste u različite svrhe, posebice u elektrokemiji, npr. senzori ili katalitičke potpore gorivim ćelijama, uz sp^2 ugljik koji se pokazao vrlo popularnim, naročito kod izrade staklastog ugljika, GC (engl. *glassy carbon*), visoko uređenog pirolitičkog grafita, ugljikovih nanocjevčica, CN (engl. *carbon nanotubes*) i sl. [11].

Međutim, u novije vrijeme na scenu stupa sp^3 ugljik (npr. u slučaju dijamanta) sa svojom praktičnošću i jedinstvenošću, koje će mu vrlo brzo izgraditi put za široku uporabu u elektrokemijskim istraživanjima.

Ono što dijamant čini posebnim je upravo njegova sp^3 hibridizacija koja mu daje sposobnost tetraedarskog vezivanja duž rešetke tako dovodeći do ekstremnih svojstava. Svojstva po kojima je definitivno prepoznatljiv su čvrstoća, visoka toplinska vodljivost te električna otpornost, što ga zapravo i čini vrlo dobrim poluvodičem. Ovo ga, na prvi pogled, čini beskorisnim jednom elektrokemičaru za razliku od sp^2 materijala u njihovom intrinzičnom stanju. Međutim, kao što je ranije i spomenuto, njegova električna svojstva moguće je znatno poboljšati uvođenjem nečistoća (dopanta) u sustav. Treba zamijetiti da s obje strane ugljika u periodnom sustavu leže bor slijeva, kao p-tip te dušik zdesna kao n-tip dopanta. Bitno je imati na umu da će bor, za razliku od dušika, efektivno zauzeti isto mjesto na kojem su bili izmješteni atomi ugljika uz vrlo nisku energiju aktivacije (0,37 eV) te je tako moguće dopiranje visokog stupnja. Iz toga proizlazi zaključak da je to razlog zašto znanstvenici preferiraju korištenje bora kao dopanta u elektrokemijskim studijama.

Doba dijamantnih elektroda počelo je u osamdesetim godinama kada su znanstvenici po prvi put predložili jon-implantirane dijamantne elektrode, odnosno poluvodički dijamant za uporabu u fotoelektrokemiji. Od tada je zabilježen ogroman rat uporabe istih u razne svrhe poput Li-jon baterija, gorivih ćelija, dijamantnih biosenzora i sl. Najveću popularnost stekao je upravo polikristalični dijamant dopiran borom, BDD (engl. *boron doped diamond*). Prve provedene studije su pokazale da je on iznimno pogodan za elektrosintezu, elektroanalizu te elektrokemijski tretman otpada. Tek kasnije, bazična istraživanja dovela su do zaključka da se radi o potencijalnom poluvodiču široke zabranjene zone s dobrim električkim, mehaničkim i kemijskim svojstvima. Početkom ovog stoljeća počela su i intenzivna istraživanja koja su se ticala uporabe BDD kao elektroničkog uređaja u biosenzorici baziranog na dijamantu, optoelektronici, akustici, kvantnom računalstvu te drugim naprednim tehnologijama. Ono što je za kemiju od velikog značaja je sveprisutna potreba uporabom BDD u elektroanalitičkim istraživanjima kako organskih, tako i anorganskih analita, što se i vidi iz neprestanog porasta publiciranih radova iz godine u godinu.

Prema literaturi, redovito citirana svojstva dijamantnih elektroda dopiranih borom, BDDE (engl. *boron doped diamond electrodes*) su:

- široko radno područje (potencijala), tzv. *solvent window*²
- niske pozadinske struje
- smanjeno nakupljanje naslaga (tzv. *fouling effect*)
- otpornost prema koroziji pri visokim temperaturama i tlakovima te u izazovnom okruženju
- biokompatibilnost

Ne treba zaboraviti da sva svojstva variraju o načinu proizvodnje odnosno razvoju kristala pri sintezi elektrode.

Tanki BDD filmovi posjeduju određena izvrsna elektrokemijska svojstva: niske i stabilne pozadinske struje u širokom rasponu potencijala, otpornost prema koroziji, visoka termička vodljivost i visoke gustoće struja. Pored toga, pružaju mikrostrukturnu stabilnost pri ekstremnim katodnim i anodnim potencijalima i otpornost prema stvaranju naslaga

² područje potencijala u elektrokemijskom mjerenju u kojem supstanca nije ni oksidirana, ni reducirana

zbog slabe adsorpcije polarnih vrsta na H- i O- terminiranu površinu, što omogućuje dobar odziv za mnoge redoks analite, čak i bez pred-tretmana.

Pored ostalih, velika pažnja posvećuje se upotrebi BDD tankih filmova u elektroanalizi, kao jednostavnih elektrokemijskih senzora, korištenjem kod voltametrijskih metoda ili čak sparivanjem s protočnim metodama (HPLC, FIA, CZE). Tako korišteni, pogodni su za analize organskih i anorganskih analita te za specijaliziranu primjenu kao bioelektrokemijski senzori temeljeni na BDD.

1.2.1.1. Razvoj dijamanta dopiranog borom

Nije nova spoznaja da se dijamant može sintetizirati. Iako se prije mislilo da je dijamant moguće pronaći samo u prirodi, još davnih 1950-ih sinteza dijamanta postala je moguća korištenjem visokotlačne visokotemperaturne, HPHT (engl. *high pressure high temperature*) metodologije [12].

Kasnije, krajem 1980-tih, izumljena je sinteza dijamanta iz ugljikovih vrsta u plinovitoj fazi, tzv. taloženje kemijskom parom, CVD (engl. *chemical vapour deposition*) pri niskim tlakovima. CVD razvoj dijamanta oslanja se na stvaranje ugljikovih radikala i relativno visokih koncentracija disociranog vodika. Kako bi se omogućila i prikladna površinska kinetika, površine za razvoj je potrebno zagrijati na visoke temperature, uglavnom više od 700°C [13, 14].

Za komercijalnu i laboratorijsku proizvodnju CVD je najpopularnija metoda, jer omogućuje kontrolu procesa inkorporacije dopanta i razvoja na velikim površinama, kao i na strukturiranim supstratima. Prilikom CVD stvara se plazma korištenjem bilo vrućih filamenata, HF (engl. *hot filaments*), bilo mikrovalova, MW (engl. *microwaves*). Ono što mikrovalovima daje prednost je to što kod njih ne postoji temperaturno ograničenje, odnosno temperature plazme nisu ograničene točkom taljenja filamenata. Rezultirajuće više temperature MW-CVD dovode do viših koncentracija H atoma. Međutim, većina proizvođača je prihvatila HF-CVD kao komercijalnu budući da ona omogućuje razvoj na velikim površinama iako treba imati na umu da se uporabom MW-CVD postiže veća fazna čistoća i brži rast. Tipični uvjeti rasta uključuju C/H omjere od 0,5-2%, tlakove od

10-150 Torr, temperature supstrata od 700-1000°C, snagu mikrovalova od 1000-1300 W, odnosno temperature filamenata i do približno 2800°C [15].

Obično se koristi Si-podloga za razvoj BDD koji će biti rabljen u elektroanalizi. U CVD reakcijsku komoru stavi se izvor ugljika, npr. u obliku metana, te bor kao dopant u plinskom stanju, npr. B₂H₆ ili B(OCH₃)₃, uz obvezno prisustvo vodika. H₂ je neophodan budući da plazma-generirani H atomi terminiraju viseće površinske veze, sprječavaju rekonstrukciju površine i reagiraju s sp i sp² ugljikovim mjestima kako bi ih potencijalno izrezali iz sloja u kojem se odvija rast. Navedeni parametri rasta budući da će oni kontrolirati svojstva poput omjera ne-dijamantni-dijamantni ugljik (kvalitativno smatranim sp²-sp³ omjerom), debljine filma, teksture i veličine zrna [16].

Uporaba polikristalinih supstrata rasta rezultira polikristalnim dijamantnim filmovima, koji sadrže dijamantne kristale različitih faseta³ ili zrna. Supstrat rasta mora biti stabilan pri CVD uvjetima rasta te mora imati niski ekspanzijski koeficijent. Pogodni supstrati uključuju Si, Nb, Mb, Ti, Ta te W prikladno tretirane (npr. abrazija), sijane s dijamantnim nanočesticama ili električki pristrane, kako bi se osigurala povećana gustoća nukleacijskih mjesta za poboljšanje sinteze dijamanta. Veličina dobivenog zrna ovisi o uvjetima rasta poput vremena, temperature, tlaka, sastava plina (npr. vodik-ugljik i vodik-bor omjer) te dodatka plemenitih plinova poput argona i dr. Ovo dovodi do podjele dijamanta dopiranog borom u sljedeće kategorije [16, 17, 18, 19]:

- ultra-nanokristalini (UNC, engl. *ultra-nanocrystalline*) – veličina zrna manja od 10 nm
- nanokristalini (NC, engl. *nanocrystalline*) – veličina zrna između 10 nm i 1 μm
- mikrokristalini (MC, engl. *microcrystalline*) – veličina zrna veća od μm

Kako kristalografska orijentacija⁴ utječe na unos bora, treba imati u vidu i činjenicu da će polikristalčna površina biti dopirana heterogeno.

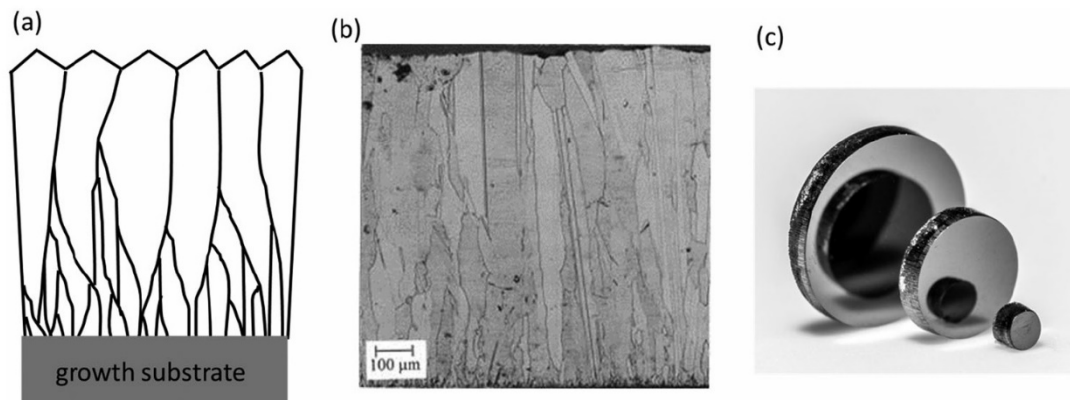
Smatra se da se ugradnja ne-dijamantnog ugljika (NDC, engl. *non-diamond carbon*) pretežno odvija na granicama zrna iako je ugradnja u pojedinačne fasete također moguća. Stoga NDC može biti elektrokemijski značajan kod UNC i NC dijamanta dopiranog

³ ploha kristala

⁴ orijentacija kristalne rešetke u odnosu na neki referentni okvir, obično okvir definiran geometrijom uzorka

borom s obzirom na činjenicu da je kod njih gustoća granica zrna značajno veća. Virtualno je nemoguće sintetizirati UNC koji ne sadrži NDC. Kako se povećavaju koncentracije dopanta (bora), također je teže spriječiti formiranje NDC čak i kod MC dijamanta dopiranog borom. Usprkos tome, tehnike razvoja su usavršene do te razine da je moguće razviti visokodopirani MC dijamant dopiran borom sa zanemarivim udjelom NDC.

Pri stalnim uvjetima rasta, kako se vrijeme rasta povećava, veličina kristalnih faseta raste s debljinom filma kako je i prikazano na slici 5. NC dijamant dopiran borom nižeg NDC sastava može se dobiti korištenjem uvjeta za rast za visokokvalitetni MC dijamant dopiran borom (veliki omjer H atoma prema metil-radikalima), ali uz zaustavljanje prije no što zrna postanu prevelika. UNC i NC filmovi su tanki (širine u μm i manje) te se radi lakšeg rukovanja ostavljaju vezanim na supstrat rasta. MC filmovi su deblji i kada su jako debeli (širine u stotinama μm) mogu biti uklonjeni sa supstrata rasta, kada se i nazivaju samostojećim [13].



Slika 5 – Shematska (a) i pretražno-elektronsko mikroskopska (b) slika poprečnog presjeka rasta MC BDD. Obje vrlo čisto prikazuju se veličina zrna povećava povećanjem debljine filma. Optička slika (c) samostojećeg MC BDD koji je uklonjen s podloge rasta, lepan s obje strane te laserom izrezan na diskove [13].

Za CVD jednog kristala dijamanta dopiranog borom, jednokristalični dijamant je korišten kao supstrat rasta kako bi se potakao homo-epitaksijalni⁵ rast. Ovakvi supstrati se uglavnom razvijaju korištenjem HPHT tehnologija, kod kojih je kapsula za sintezu koja sadrži grafit i „sjemene“ kristale komprimirana pod tlakom od desetine tisuća atmosfera

⁵ Epitaksija podrazumijeva adsorpciju kristalnog nad-sloja na kristalni supstrat. Prema navedenom homo-epitaksija je epitaksija vršena samo jednim materijalom, kod koje se kristalni film razvija na supstratu istog materijala.

i zagrijavana pri 1800 K uz prisustvo metalnog otapala. Kristali dobiveni na ovaj način često su mali i dopirani dušikom. Međutim, istraživačke spoznaje koje se tiču jednokristaličnog dijamanta dopiranog borom nisu ni blizu onima o polikristaličnom. Prema tome ne postoji ni elektrode temeljene na jednokristaličnom dijamantu dopiranom borom [20].

1.2.1.2. Značaj gustoće dopanta

Poznato je da BDD nije konvencionalni elektroodni materijal te da je pod definiciji poluvodič koji sadrži približno 2×10^{23} C atoma po cm^3 u kristalnoj rešetki. Dopiranje borom uvodi akceptore p-tipa (rupe) u rešetku. Ukoliko se dopira s dovoljno bora tako da je gustoća akceptora dovoljno visoka, tada ga možemo opisati kao „semi-metalnog“ ili „nalik metalu“ uz smanjen broj nositelja naboja u odnosu na klasične metale.

Obično približno 1 C atom u 1000 mora biti zamijenjen B atomima kako bi došlo do degeneriranog dopiranja i semi-metalnih svojstava, što je otprilike 10^{20} B atoma po cm^3 . Problem se javlja kod gustoća dopanta koje su manje od ove budući da će tada materijal karakterizirati „skakutavi“ prijenos te poluvodička svojstva p-tipa s gustoćom dopanta od 10^{19} B atoma po cm^3 ili manjom. Dostupnost nositelja naboja za elektrokemiju se smanjuje smanjenjem gustoće dopanta [21, 22].

Kvalitativno je vrlo značajna boja dijamanta. Dopiranjem se dijamant postiže prozorno plavu boju što ukazuje na poluvodička svojstva, dok se povećanjem koncentracije dopanta dolazi do crne boje, što govori da se radi o dijamantu nalik metalu. Međutim, treba imati na umu da kada se dijamant razvija s visokim udjelom NDC te kada izrasta brzo i iz malih zrna također može biti crn [23].

Koncentracija bora se obično izražava na tri načina:

1. u ppm-ovima – koncentracija bora u plinovitoj fazi u odnosu na izvor ugljika
2. kao % bora u odnosu na ugljik u plinovitoj fazi
3. kao broj atoma bora po cm^3 u krutoj fazi

1. i 2. pružaju kvalitativne informacije o tome sadrži li dijamant dovoljno bora da se smatra nalik metalu ili ne. Međutim, kako bi se dobila kvantitativna vrijednost (3.), neophodno je koristiti napredne tehnike poput sekundarne jonske masene spektrometrije (SIMS, engl. *secondary ion mass spectrometry*) ili borove nuklearne reakcijske analize.

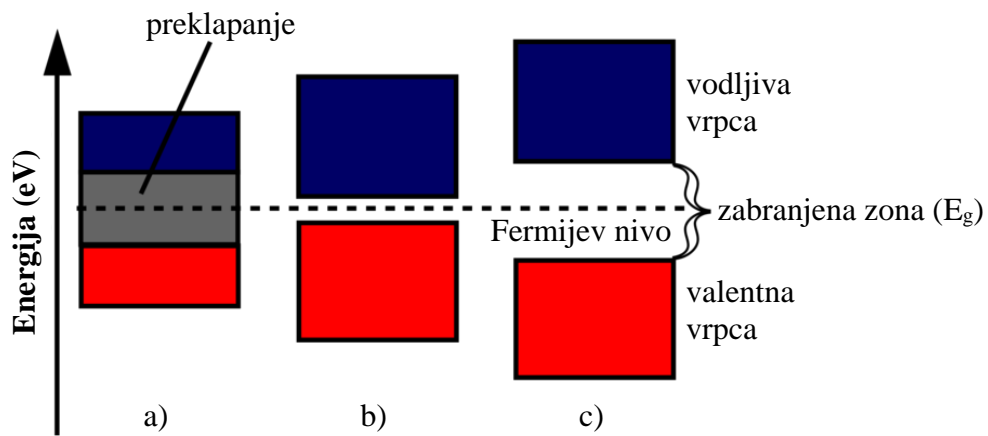
1.2.1.3. Terminacija površine

Prvo ćemo se kratko osvrnuti na dostignuća kvantne mehanike. Prema kvantnoj teoriji atom se isključivo može pojaviti u točno definiranim energetske stanja, s tim da su kod izoliranih atoma ta stanja prilično oštra. Treba imati na umu da se u krutinama atomi ne mogu gledati kao odvojene jedinice budući da se neposredno blizu jedan drugome te su kemijski vezani za najbližeg susjeda.

Energetska vrpca koja je rezultat veznih orbitala molekule se naziva valentna vrpca (VB, engl. *valence band*), dok vodljiva vrpca (CB, engl. *conduction band*) nastaje spajanjem protuveznih molekulskih orbitala. Elektronsko stanje najviše energije unutar valentne vrpce predstavlja najvišu popunjenu molekulsku orbitalu (HOMO, engl. *highest occupied molecular orbital*), a elektronsko stanje najniže energije unutar vodljive vrpce predstavlja najnižu nepopunjenu molekulsku orbitalu (LUMO, engl. *lowest unoccupied molecular orbital*). Područje između te dvije vrpce se naziva zabranjena zona ili energijski procjep (E_g). Elektroni se ne mogu nalaziti unutar raspona energija zabranjene zone. Najviši popunjeni energetske nivo u čvrstim tvarima pri temperaturi apsolutne nule naziva se Fermijev nivo [9].

Veličina zabranjene zone govori o tome je li materijal metal, poluvodič ili izolator. Kod metala ne postoji raspon energija zabranjene zone, što znači da je $E_g=0$. Tu se vodljiva i valentna vrpca preklapaju, što elektronu omogućuje neometan prelazak u vodljivu vrpca. Kod poluvodiča postoji zabranjena zona koja ne može biti veća od 3 eV, što i dalje osigurava mogućnost skoka elektrona u vodljivu vrpca. Međutim, kada govorimo o izolatorima treba imati u vidu da se govori o zabranjenoj zoni većoj od 3 eV. To znači da je zabranjena zona toliko velika da je elektronu u potpunosti onemogućen prelazak iz valentne u vodljivu vrpca (pri sobnoj temperaturi). Budući da se tu radi o materijalima čija je valentna vrpca potpuno popunjena elektronima te da elektroni ne mogu prevazići energetske barijeru između valentne i vodljive vrpce, za izolatore kažemo da su iznimno

slabi vodiči pri sobnoj temperaturi. Na slici 6 ilustrirana je razlika u visini zabranjene zone za vodiče (metale), poluvodiče i izolatore.



Slika 6 - Energetski dijagram vrpca za vodiče, poluvodiče i izolatore

Razumijevanje terminacije površine je važno iz nekoliko razloga [24]:

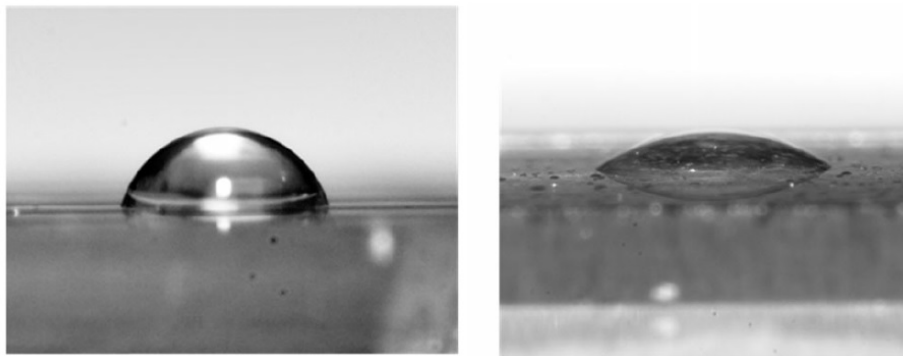
- funkcionalizacija elektrodne površine može značajno utjecati na kinetiku prijenosa elektrona unutarnje sfere redoks procesa
- terminacija BDD površine utječe na svojstva vlaženja elektrode
- polarnost površinske veze rezultira elektrostatskim interakcijama koje mogu povisiti ili sniziti energetske nivoe valentnih i vodljivih vrpca

Dijamant koji je razvijan u CVD plazma-reaktoru ostavlja komoru za rast vodik-terminiranom (H-terminiranom) pod uvjetom da je izvršeno hlađenje u atmosferi vodika. Ovo rezultira hidrofobnim površinama kod kojih kontakti kutovi vode iznose približno 90° (izolirajući dijamant). Zanimljivo je da postoje dokazi da se povećanjem udjela BDD smanjuje hidrofobni kontakti kut. H-terminirana površina je uglavnom stabilna na zraku i nekoliko mjeseci iako lagano oksidira tijekom vremena, tako postajući hidrofilnija. Pored toga, H-terminiranje ($-C^{\delta-}-H^{\delta+}$) dovodi do povećanje energija valentne i vodljive vrpce te negativnog elektronskog afiniteta. S druge strane, površinska oksidacija je također moguća. To u elektrokemijskom smislu znači da je potrebno izvršiti anodnu polarizaciju. Tako dobivene kisik-terminirane (O-terminirane) površine ($-C^{\delta+}-O^{\delta-}$

) odlikuje suprotna vezna polarnost, što uglavnom rezultira smanjenjem energetske nivoa i pozitivnim elektronskim afinitetom – hidrofilnost [25, 26, 27, 28, 29, 30, 31].

Iako je dijamant sastavljen isključivo od C atoma, njegova površina prije biva stabilizirana vezanjem ugljika s drugim elementima. Važno je naglasiti da se kod razvijanog dijamanta uvijek radi o H-terminaciji. Nedopirani H-terminirani dijamant ponaša se kao izolator u vakuumu, ali pokazuje osobine vodiča p-tipa kada je izložen zraku. Ovo je u kontrastu s O-terminiranim dijamantom, koji, iako u prirodnom stanju električan, pokazuje izolatorska svojstva u vakuumu i na zraku. Ono što je sigurno je to da je vodljivost povezana sa sadržajem vodika. Pored navedenog postoji i fluorirani dijamant (F-terminirani), koji zasad ima najšire područje potencijala (5 V radno područje), koji je ograničen samo formiranjem slobodnih vodikov (pri -2,3 V) te hidroksiradikala (pri 2,74 V). Elektrode ovog tipa dobivaju se radio-frekvencijskim plazmafluoriranjem. Pored toga, literatura navodi da treba imati u vidu da je područje rada uže kod H-terminiranih površina u odnosu na O-terminirane [32, 33].

Nužno je povremeno provjeriti površinsku terminaciju kako bi se utvrdilo stanje površine, posebno ako je H-terminirana elektroda korištena dulje u anodnom području prilikom cikličke voltometrije (CV) te kronoamperometrijskih analiza. Ovo se najlakše radi tako da se provjere kontaktni kutovi. Oksidirane površine karakteriziraju kontaktni kutovi vode između $0,6^\circ$ i 65° u ovisnosti o metodi O-terminacije, hrapavosti površine i sl. Kako bi se H-terminacije preobratile u O-terminaciju moguće je izvršiti određene radnje poput kuhanja u kiselini, poliranja aluminom, izlaganja kisikovoj plazmi, fotokemijske oksidacije, reakcije s kisikom pri visokim temperaturama te anodne polarizacije, kako je gore i naznačeno [25, 31, 34, 35, 36, 37, 38].



Slika 7 - Kontaktni kut kod H-terminacije (lijevo) te O-terminacije (desno) BDD površine

Kako bi se dobile detaljnije informacije o funkcionalizaciji površine neophodna je uporaba metoda poput Ramanove, Augerove te rendgenske fotoelektronske spektroskopija (XPS, engl. *X-ray photoelectron spectroscopy*), pretražne elektronske mikrofografije i dr. Različite procedure oksidacije će rezultirati različitim kemijskim funkcijama, što je pod kontrolom udjelom zrna različite orijentacije na polikristalnoj elektrodnoj površini. S druge strane, površinska kemija će jako utjecati na karakteristike transfera elektrona vrsta u unutarnjoj sferi. Stoga je za interpretaciju kinetike transfera elektrona bitno znati koje kemijske grupe se nalaze na površini te koliko su one stabilne u određenoj području potencijala koje je od interesa za elektrokemijsku reakciju.

Čak i kod komercijalnih elektroda je terminacija problematična, jer na primjer elektroda može postati nepotpuno H-terminirana samo radi dugog stajanja na polici. Ne zna se još sa sigurnošću može li katodna polarizacija re-hidrogenirati površinu elektrode. Primjena negativnog napona od približno -3 V u 0,5 M otopini H_2SO_4 predlaže se kao metoda za H-terminiranje, ali nisu napravljene usporedbe ovog (elektrokemijskog) tretmana s metodom s vodikovom plazmom. Ono što je zanimljivo je to što literatura navodi mnoge katodne tretmana BDD površine kao načine H-terminacije, ali bez XPS dokaza. Jedan od radikalnih prijedloga je žestoki tretman pri katodnom potencijalu od -35 V, 5 min u 2 M HCl otopini, kojim se postiže vrlo visoka sličnost H-terminaciji postignutoj vodikovom plazmom. Iako se do danas tretman vodikovom plazmom i dalje smatra najpouzdanijim [30, 39, 40, 41].

1.2.1.4. Prisustvo NDC

Elektroda je elektrokatalitički inertnija ako je više NDC prisutno u matriksu. Elektrokemijski gledano, ovo znači smanjeno područje rada, povećane pozadinske i kapacitivne struje (i smanjene granice detekcije) te površine podložnije nakupljanju naslaga. NDC također može utjecati i na način kako se elektroda ponaša prema različitim redoks sustavima, posebno onima koji su površinski osjetljivi. Stoga je bitno znati sadrži li elektroda NDC te ako da, kako to utječe na mjerenje od interesa. Najlakši način za kvalitativnu provjeru udjela NDC je Ramanova spektroskopija, a isto tako tehnika je u mogućnosti i dati kvalitativnu procjenu o sadržaju bora [13].

1.2.1.5. Završna obrada površine

BDD elektrode možemo pronaći u 2 stanja – neobrađene i polirane. Pored toga, površina elektrode može biti i kemijski obrađena. Što se tiče neobrađenih površina, MC BDD je prirodno hrapaviji u odnosu na NC ili UNC BDD, što se mora uzeti u obzir kada se govori o vrijednostima električnog kapaciteta elektrode. Isto tako, mikroskopska vizualizacija modificiranih BDDE je također mnogo jednostavnija kod ravnijih površina. Elektrode tankog filma (tanje od 50 μm) ostavljaju se neobrađene na supstratu rasta budući da je poliranje teško, a za NC i UNC je skroz nepotrebno, jer se tu radi o hrapavosti znatno manjoj od 1 μm . Deblji filmovi su pogodniji za poliranje. Razvoj debelog BDD rezultira nastankom velikih zrna, što uz to znači i da je materijal dovoljno mehanički robustan da može biti uklonjen s donjeg potpornog materijala. Korištenjem samostojećih elektroda osigurava se da nikad ne dođe do delaminacije⁶ s potpornog supstrata rasta tijekom rada pri određenim kemijskim uvjetima [42].

Kako bi poliranje bilo obavljeno valjano potrebno je imati specijalizirane koture impregnirane dijamantom kako bi se proizvela hrapavost nanometarskog reda veličine. Kod polikristalinih materijala ovaj postupak naziva se lepanjem⁷. Budući da postupak zahtijeva visoku vještinu, jer u suprotnom može doći do oštećenja pod-površine što će stvoriti defekte koji će zarobiti nositelje naboja. U drugu ruku, poliranje visokodopiranog

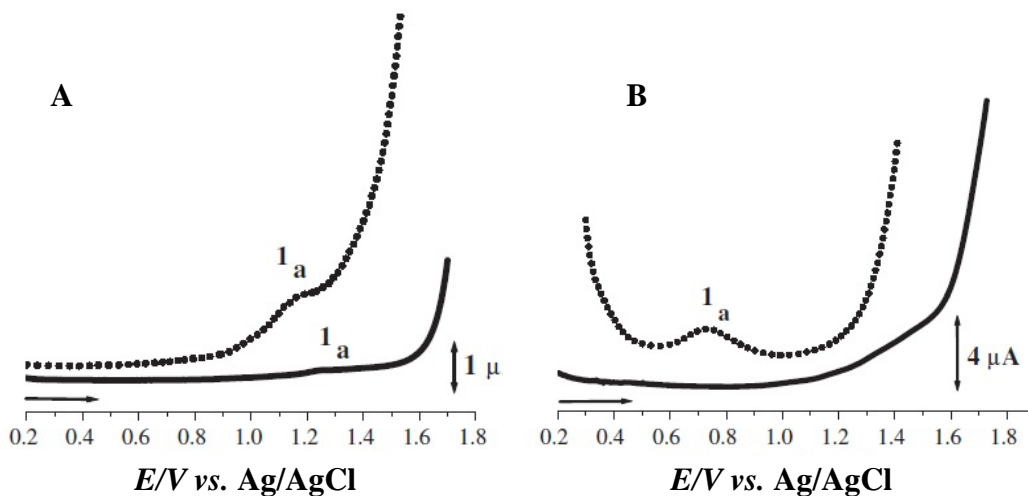
⁶ gubitak adhezije prevlake na površini ili između slojeva prevlake

⁷ vrlo fini abrazivni postupak obrade materijala koji se provodi upotrebom abrazivnih zrna

MC BDD pažljivo kontroliranim procesom ima zanemariv utjecaj na elektrokemijska svojstva elektrode.

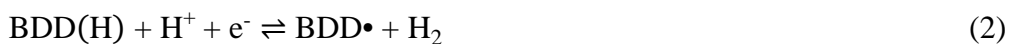
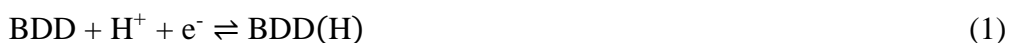
1.2.2. Pred-tretman i njegov utjecaj na svojstva BDDE

Elektrokemijsko ponašanje (odziv) BDDE je pod snažnim utjecajem njenih dviju površinskih terminacija (vodika i kisika). Stoga je i ponašanje prijenosa elektrona između dijamantne elektrode i elektrolitne otopine značajno ovisno o njima. Komercijalne BDDE dolaze kao H-terminirane, odnosno hidrofobne površine. Neovisno o tome, prije mjerenja potrebno je provesti pred-tretman kako bi se površina istih aktivirala. Pred-tretman može biti anodni ili katodni te se može provoditi u različitim medijima. Iako postoji određena sloboda kod odabira medija, izbor elektrolita je vrlo bitan budući da utječe na konačnu površinsku terminaciju, vodljivost, elektrokemijski odziv (oksidacijski potencijal i struje pikova) te ponovljivost eksperimentalnih rezultata. Poznato je da tretman vršen u kiselini regenerira BDDE na kojoj su se nakupile naslage te mijenja odziv BDD. Elektrokemijski odziv BDD površine varira kao funkcija površinskog pred-tretmana te također i korištenog elektrolita, a razlika se najbolje može uočiti korištenjem diferencijalne pulsne voltametrije. Zanimljivo je i da npr. kada se koriste fosfatni i acetatni pufer, nema značajne razlike u odzivu. Razlika se, međutim, uočava pri korištenju kiseline kao pomoćnog elektrolita. Ono što je pomalo začuđujuće je da je površinska aktivnost, kod anodnog pred-tretmana, ista za oba medija, dok se očekuje da oksidacijski pik (I_a) bude prilično mali (ilustrirano na slici 8). Uočljivo je i da do razvoja kisika kod obje oksidirane BDD površine dolazi pri oko 1,6 V. Pored toga, najveća površinska aktivnost i veliki oksidacijski pik prisutni su kod reducirane površine BDD pred-tretirane u kiselini, pri oko 0,7 V. Struje I_a pika pred-tretiranog u puferu su veće i pomaknute pozitivnije (oko 1,2 V). Razvoj vodika javlja se kod obje reducirane BDD površine pri oko 1,4 V. Oksidacijski potencijal I_a pika takav je zbog sp^2 ugljika koji je inkorporiran u strukturu dijamanta, što osigurava površinska mjesta potrebna za adsorpciju reakcijskih intermedijera, uključujući reakcijske mehanizme razvoja vodika i kisika i/ili reakcijske mehanizme aromatskih spojeva, koji mogu biti odgovorni za povećanu površinsku aktivnost [43].



Slika 8 - Shematski prikaz DP voltamograma na oksidiranoj (–) BDD površini i na reduciranoj (•••) BDD površini. Pred-tretman BDD površine vršen u puferu (A) i u kiselini (B)

Katodni pred-tretman uzrokuje povećanje debljine adsorpcijskog sloja koji formira H-terminacija na reduciranoj BDD površini, opisano reakcijama (1), (2) i (3). U usporedbi s netretiranom površinom BDD, katodni pred-tretman samo pojačava, ali ne mijenja prvobitna fizička i kemijska svojstva BDD. Brzina reakcije (2) ovisi o brzini reakcije (1), s tim da su konstanta ravnoteže i brzina reakcije direktno ovisne o koncentraciji protona. Ukoliko je npr. sumporna kiselina korištena za pred-tretman, povećava se brzina obiju reakcija tako favorizirajući nastanak H_2 . S druge strane, kada se koristi npr. acetatni pufer, brzina obiju reakcija se smanjuje te, budući da uz to dolazi i do smanjenja proizvodnje H_2 , dolazi do nastanka većih količina bor-vodik kompleksa [44].



Potpuno suprotno, anodni pred-tretman čini da BDD H-terminacije postanu O-terminacije (4) zbog unutarnjih transformacija i/ili najvjerojatnije prisustva adsorbiranog sloja koji je nastao oksidacijom molekula vode, tako tvoreći vrlo reaktivne hidroksi-radikale na oksidiranoj BDD površini te mijenjajući prvobitna fizička i kemijska svojstva BDD [45].



Kinetika $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}\bullet$ redoks para (4) na oksidiranom BDD je ovisna o pH. Oksidacija BDD površine anodnim pred-tretmanom jača je u sumpornoj kiselini te se stvara deblji adsorpcijski sloj zbog viših koncentracija $\text{OH}\bullet$ proizvedenih i adsorbiranih na BDD površinu, tako smanjujući površinsku vodljivost oksidiranog BDD. Istraživanja su pokazala da površinska otpornost povezana s ovim slojem iznosi preko $300 \Omega\text{cm}^2$ nakon anodnog pred-tretmana, a smanjuje se na oko $4 \Omega\text{cm}^2$ pri katodnom pred-tretmanu. Pokazano je i da nema bitnih strukturnih razlika u BDD koje su nastale katodnim pred-tretmanom, što govori da H-terminirana mjesta imaju važnu ulogu u elektrokemijskom odzivu reduciranih BDD elektroda (više pozadinske struje i uže područje potencijala) [44].

Važno svojstvo hidroksi-radikala adsorbiranih na oksidiranu BDD površinu tijekom anodnog pred-tretmana je njihova visoka reaktivnost te stoga i njihova uključenost u paralelne reakcije na BDD površini, poput oksidacije pomoćnog elektrolita, formiranja vodikova peroksida te korozija BDD. Prema ovome, da se zaključiti da oksidirana BDD površina nije potpuno inertna [45].

Neovisno o vrsti pred-tretmana, on treba biti izvršen prije svakog seta mjerenja. Uz to treba imati na umu da tretiranu elektrodu treba isprati vodom (min. 2 puta) te odmah krenuti s mjerenjem kako se elektroda ne bi osušila, odnosno bila značajno izložena zraku [46].

U tablici 1 dan je pregled nekih spojeva koji su elektrokemijski određivani korištenjem BDDE te vrsta pred-tretmana koji je korišten prije mjerenja [15, 45, 46, 47].

Tablica 1 - Pregled pred-tretmana za izabrane analite

Analit	BDDE pred-tretman
DA (dopamin)	AT pri +2,6 V 75 min u 0,1 M KOH
2,3-; 2,4-; 2,5-; 2,6-; 3,4-; 3,5-DCP (di-klor-fenol), 2,3,4-; 2,3,5-; 2,3,6-; 2,4,5-; 2,4,6-TCP (tri-klor-fenol)	AT pri +2,64 V 4 min u BR puferu (pH 2)
4-CP (klor-fenol); 4-CP u prisustvu 2,4-DCP+2,4,6-TCP	AT pri +3 V popraćen KT pri -3 V, oba 30 min u BR puferu
4-CP	AT pri +5 V popraćen KT pri -5 V, oba 10 s u 0,1 M HNO ₃
Metil-paraben; etil-paraben; propil-paraben	Oksidacija kruženjem između visokih vrijednosti potencijala u neutralnom mediju
4-NP (nitrofenol)	AT pri +3 V 5 s popraćen KT pri -3 V 30 s u 0,5 M H ₂ SO ₄
4-NP; 2-NP; 2,3-DNP (di-nitrofenol)	Kruženjem između -2,5 V i +2,5 V u 1M HNO ₃
N-nitrozamini	KT pri -3 V popraćen AT pri +3 V, oba 30 s u 0,1 M HClO ₄
2-; 3-; 4-AB (aminobifenil)	AT pri +2,4 V 60 min u 0,1 M H ₂ SO ₄
(policiklički)aromatski ugljikohidrati	AT pri +2,5 V 20 min u smjesi fosforna kis./acetonitril u omjeru 1:1 povećanjem omjera do 1:9 kroz 10 min
AA (askorbinska kis.); acetaminofen	Oksidacija kruženjem između +1,8 V i -1 V vs. ZKE u Na ₂ SO ₄
fluvastatin, pefloksacin	Prije svakog mjerenja polirano vodenom suspenzijom alumine ($\Phi=0,01 \mu\text{m}$)
lidokain	AT pri 3,2 V popraćen KT pri -2,8 V, oba 30 s u 0,1 M HClO ₄
tetraciklin; klor-tetraciklin, oksitetraciklin	Kruženjem između 0 V i +2,2 V vs. Ag/AgCl 30 min u 0,1 M KOH
cistein; cistin; homocistein; homocistin; metionin; GSH (glutation), GSSG	AT pri +2,4 V vs. Ag/AgCl 30 min u 0,1 M KOH
DA	AT pri +3 V i KT pri -3 V, oba 5 min u 0,5 M H ₂ SO ₄
nukleinske kis.	AT pri 2,4 V vs. Ag/AgCl 1 h u 0,1 M KH ₂ PO ₄
nespecificirano	Anodna polarizacija s 10 mAcm ⁻² 30 min u 1 M H ₂ SO ₄
nespecificirano	AT pri +3 V vs. ZKE u 1 M HClO ₄
nespecificirano	Anodna polarizacija s 50 mAcm ⁻² 30 min u 1 M H ₂ SO ₄
nespecificirano	Anodna polarizacija s 10 mAcm ⁻² 30 min u 1 M HClO ₄
nespecificirano	Anodna polarizacija s 50 mAcm ⁻² 30 min u 1 M Na ₂ SO ₄ ili H ₃ PO ₄
nukleinske kis.	AT pri +3 V i KT pri -3 V, oba 30 min u 0,1 M acetatnom/fosfatnom puferu ili 0,5 M H ₂ SO ₄

1.2.3. Površinska modifikacija i funkcionalizacija BDDE

I H- i O-terminiran BDD nadmašuju klasične ugljikove i metalne elektrodne materijale u kemijskoj inertnosti i otporu prema nakupljanju naslaga. Stoga, mora postojati opravdan razlog za modifikaciju što npr. uključuje povećanje selektivnosti ili biofunkcionalizacija u svrhu razvoja biosenzora. U vrlo uskoj vezi s ovim je i želja za odgonetavanjem elektrokatalitičke aktivnosti specifičnih elektrokemijskih reakcija, što bi zapravo omogućilo uporabu dijamanta kao vrlo robusnog materijala. Jedna od najzanimljivijih primjena modificiranog dijamanta danas je proizvodnja DNA čipova.

Trenutno je osnovna podjela modifikacija kako slijedi:

- kemijske modifikacije
- fotokemijske modifikacije
- elektrokemijske modifikacije
- jonsko-implantacijske tehnike
- kombinirane metode (elektrokemijska modifikacija popraćena kemijskom)

Međutim, modifikacije se mogu podijeliti i u odnosu na kovalentni karakter modifikacije kako i slijedi:

- konverzija H-terminacije u kisikovu, klorovu ili fluorovu
- reakcije cikloadicije alkena na goloj površini dijamanta, bilo nakon visokotemperaturnog vakuumskeg prekaljivanja, bilo tijekom UV iluminacije, što rezultira C-C vezama
- reakcije sa specifičnim reagensima za funkcijske skupine, poput onih koje reagiraju ili s hidroksilnim ili s karbonilnim skupinama
- reakcije radikala s reagensima, direktno bez aktivacije ili nakon elektrokemijske, odnosno fotokemijske reakcije

1.2.3.1. Kemijske modifikacije površine

Najjednostavniji primjer tehnike kemijske površinske modifikacije je tretman s otopinom oksidirajuće kiseline poput dušične ili kromne kiseline. Ovaj tip tretmana može pretvoriti H-terminaciju u O-terminaciju. Dobra strana tehnike je to što se na ovaj način mogu ukloniti NDC, kao i metalne nečistoće. Kemijska oksidacija dijamanta je blisko povezana s elektrokemijskom oksidacijom dijamanta. Funkcijske skupine na C-O površini koje nastaju reakcijom, neovisno o detaljima reakcije, uključuju karbonilne i eterske skupine te hidroksilne skupine. Kemijska oksidacija može pospješiti metalnu vodljivost, jer uklanja vodik s površine i pod-površine elektrode. Ukratko, funkcijske skupine na C-O-površini koje nastaju posjeduju snažan dipolni karakter čije se polje manifestira i izvan površine.. U ovisnosti o detaljima površine kristala i pokrivenosti različitim funkcijskim skupinama, ovaj dipol može doseći i vrijednost čak do približno 3,6 V (karbonilna skupina) ili 2,6 V (eterska skupina), što je dovoljno da utječe na položaj granica zabranjene zone u odnosu na energetski nivo vakuuma. Ovaj dipol može utjecati i na elektrokemijsko ponašanje na način da dovede do popriličnog odbijanja aniona, uz smanjenje transfera elektrona.

Reakcije halogeniranja su također dugogodišnje proučavane. Ustanovljeno je da molekularni fluor i klor ne reagiraju s površinom dijamanta bez aktivacije, dok atomski fluor i klor reagiraju. Fluoriranje i kloriranje vrše se uglavnom uz termičku aktivaciju kako bi se dobile značajne količine atoma halogena. Slaba reaktivnost površine dijamanta zahtjeva da reakcije halogeniranja budu inicirane radikalima. Stoga je efikasniji način fluoriranja plazma budući da tu dolazi do efektivnog stvaranja radikala. Ono što je još zanimljivo je da halogenirane dijamantne površine mogu biti dalje kemijski modificirane kako bi se proizvele npr. površine pokrivene amino ili tiolnim skupinama.

Zadnje, reakcije cikloadicije alkena se tretiraju golom površinom dijamanta nakon visoko-temperaturnog vakuumskeg prekaljivanja, što rezultira nastankom C-C veza. Tako mogu nastati C-C dimeri koji posjeduju karakter dvostruku vezu te mogu reagirati s alkenima pod uvjetima pogodnim za Diels-Alderove cikloadicijske reakcije.

1.2.3.2. Fotokemijske modifikacije površine

Dva su osnovna tipa fotokemijskih modifikacija:

- reakcije cikloadicije alkena na goloj površini dijamanta pod UV iluminacijom, što rezultira nastankom C-C veza
- reakcije radikala s reagensima koji su fotokemijski aktivirani

Kao što je i ranije spomenuto, alkeni reagiraju s C-C dimerima, što može biti izazvano i fotokemijski. Ovaj pristup može se koristiti kako bi se vezali alkilni lanci koji su terminirani karboksilnim ili primarnim amino skupinama, koje mogu biti korisne za dalju funkcionalizaciju. Ove skupine moraju biti zaštićene tijekom UV iluminacije, a potom i oslobođene zaštite. Ovakav način je vrlo pogodan za vezanje DNA uzvojnica na površinu dijamanta, jer ga karakterizira izvrsna stabilnost veza. UV iluminacija se može koristiti radi aktivacije reakcija koje uključuju radikale, kao što je npr. kloriranje. Kasnije ta klorirana površina može biti dalje aminirana ili tiolirana.

1.2.3.3. Elektrokemijske modifikacije površine

Elektrokemijske metode modifikacije su:

- anodna polarizacija u vodenoj otopini kiseline ili baze
- reakcije radikala s reagensima koji su elektrokemijski aktivirani

Obje metode proizvode površine koje se mogu dalje funkcionalizirati. Pored toga, elektrokemijski pristup daje mogućnost strukturiranja površine na nanometarsku razinu korištenjem pretražne elektrokemijske mikroskopije, SECM (engl. *scanning electrochemical microscopy*) ili mikroskopije provođenjem atomske sile, CAFM (engl. *conductive atomic force microscopy*). Jedan od razloga zašto koristiti elektrokemijsku oksidaciju umjesto kemijske je to što se oksidacijska moć može kontrolirati momentalno kroz široki raspon potencijala. Drugi razlozi su jednostavnost procesa s obzirom na činjenicu da ne zahtijeva veliku kinetičku energiju, što znači zanemariva oštećenja

površine. Nadalje, količina naboja koji je prošao se također može mjeriti. Kao i kemijska oksidacija, elektrokemijska oksidacija polikristalinih površina proizvodi smjesu određenih tipova C-O funkcijskih skupina, koje uključuju karbonilnu i hidroksilnu. Kao i kod fluoriranja, oksidiranje površine vodi mnoštvu efekata na različitim redoks parovima. Prijenos elektrona na anione, kao i kod fero/fericijanid redoks para, često je usporen u odnosu na H-terminiranu površinu, dok je ili ubrzan ili jedva da ima efekta na katione. Za negativne spojeve efekt je suptilniji, što vjerojatno uključuje dipol-dipol interakcije kao i druge tipove interakcija. Selektivna inhibicija prijenosa elektrona, koja nastaje radi elektrokemijske pred-oksidacije, može dovesti do poboljšane selektivnosti u analitičkom određivanju komponenti smjesa.

Površinski efekti vezani za dipol mogu biti naglašeni ukoliko nema dovoljno nositelja naboja blizu površine dijamanta, bilo da je to zbog niske razine dopiranja borom (manje od 10^{19} po cm^3) ili radi pasivizacije postojećeg dopanta (bora). Do drugog može doći budući da donori vodika kompenziraju akceptore bora. Sve u svemu, u oba slučaja relativno mali broj nositelja naboja ne može držati normalnu razinu prijenosa elektrona do vrsta koje su na nekoj razdaljini od površine elektrode, posebno onih koje su osjetljive na broj nositelja naboja pri Fermijevom nivou, poput ferocijanida.

Elektrokemijski oksidiranom površinom znatno su unaprijeđena analitička određivanja klor-fenola te organskih spojeva koji sadrže sumpor. Što se tiče spojeva koji sadrže sumpor, negativno nabijena površina privlači kationski nabijen disulfidni spoj. Sukladno tome, u oba slučaja korištenje oksidirane površine je pogodno, jer se elektrokemijska oksidacija zapravo koristi za povremeno čišćenje površine, na kojoj se s vremenom mogu stvoriti naslage produkata (koji nastaju iz analita) polimerne oksidacije. Proces stvaranja naslaga je znatno sporiji kod BDD u odnosu na GC, ali svejedno dolazi do njega.

Druga velika elektrokemijska modifikacija je ona u kojoj se aromatske diazonijeve soli u elektrolitnoj otopini reducirane na dijamantnoj elektrodi. Ovo dovodi do funkcionalizacije aril-radikala, koji se tada može vezati na površinu dijamanta. Ovaj pristup bi mogao biti plodonosan i za kovalentno modificiranje površine dijamanta.

1.2.3.4. Kombinirane metode (elektrokemijska/kemijska)

Kombinirani pristup prvi put ne tako davno kako bi se protein vezao na površinu dijamanta, na način da je prvo izvršene elektrokemijska oksidacija kako bi se proizvele hidroksilne skupine, što je popraćeno esterifikacijom kako bi se vezao biotin uz vezanje streptavidina odmah nakon.

Silani ne pokazuju reaktivnost prema karbonilnim i eterskim skupinama te se mogu koristiti za naglašavanje prisustva hidroksilnih grupa na oksidiranom dijamantu. Prema ovome, postoji mogućnost modifikacije hidroksilnih skupina (silanizacija) na polikristaličnim dijamantnim elektrodama uz reagens poput 3-aminopropiltrietoksilana (APTES) [32, 34, 42].

1.2.4. Metali i metalni oksidi na površini dijamanta

Metali na površini dijamanta su bili centralna mnogih radova godinama iz poluvodičke točke gledišta. Ovdje su od velikog interesa materijali koji se mogu koristiti kao baterijske elektrode, kapacitorske elektrode ili elektrokatalizatori. Čak postoje i slučajevi u kojima dijamant ima ulogu potpornog materijala.

Započet ćemo s elektrokatalizatorima. Adsorpcija platine na polikristalični dijamant elektrodu vrlo stabilnom tijekom kruženja potencijala. Ovo je najvjerojatnije zbog same stabilnosti dijamanta kao supstrata te njegove izdržljivosti pri visokim potencijalima.

Pored platine, bakar i nikal su također zanimljivi. Bakar se adsorbira na površinu BDDE elektrokemijski, dok se nikal adsorbira jonskom implantacijom. Efekt ovih metala u obliku nanočestica u svrhu određivanja glukoze je vrlo primamljiv, jer se struja koja označava oksidaciju glukoze drastično povećava bez bitnog povećanja pozadinskih struja [48].

Javio se i interes za mogućnošću interkalacije ili insercije litija u dijamantne elektrode, jer i dalje postoje problemi kod drugih ugljikovih materijala. Međutim, interkalacija litija u nanočestice dijamanta je skoro pa zanemariva. Unatoč tome, neki radovi svjedoče o značajnoj inserciji litija u dijamantne filmove koji su razvijani na ugljiku [48].

Elektrode (anode) presvučene plemenitim metalima su prvenstveno razvijene kako bi se poboljšale anodne performanse elektroda. Međutim, nedostatak stabilnosti pri visokoj anodnoj polarizaciji te visoka cijena vodile su razvoju tzv. dimenzijski stabilnim anodama (DSA), koje su se sastojale od tankog aktivnog metalno-oksidnog ili miješanog metalno-oksidnog sloja koji je adsorbiran na supstrat [49].

Jedan od prvih metalnih oksida koji je elektrokemijski ispitivan na dijamantnom supstratu bio je rutenijev oksid. Ovaj materijal je važan kako za elektrokemijske kondenzatore, tako i za primjenu u elektroanalitici (razvoj klora).

Drugi primjer je hidrirani kobaltov oksid, koji pokazuje katalitičku aktivnost za razvoj kisika.

Vanadijev(III) oksid na dijamantu se pokazao kao dobar katalizator za jednu organsku reakciju u plinovitoj fazi.

Ono što je zanimljivo je to da su BBDE zgodno rješenje za izbjegavanje pojedinih problema na koje nailazimo kod drugih supstrata. Stoga se BBDE smatraju zgodnim supstratima za nanočestice poput olova, titanijeva dioksida, rutenija te hidrirana željezova oksida. Kako se elektrokemijske reakcije uglavnom odvijaju na dodirnom mjestu između elektrolitnih otopina i elektrodnih površina, površinske modifikacije elektroda su ključni faktori za prilagodbu elektrodnih performansi.

Iskustvo je pokazalo da npr. nanočestice IrO_2 termički adsorbirane na BDD supstrat jako utječu na elektrokemijski odziv dijamantne elektrode. Stoga se ponašanje kompozitne elektrode može u potpunosti pripisati elektrokemijskim svojstvima čestica, čak i pri malim količinama adsorbiranih čestica. Ovakva BDD- IrO_2 elektroda se može smatrati dijamantnim matriksom na koji su adsorbirane čestice, manje ili više homogeno. Zanimljivo je i to da se reakcija koja se proučava (razvoj kisika ili organska oksidacija) odvija na dijamantu, kao i na adsorbiranom IrO_2 . Iako, brzina reakcije na IrO_2 je značajno brže od one koja se odvija na dijamantu [50].

Isto tako, elektrodepozicijom Cu_2O mikrokristala mogu se postići pogodna površinska svojstva za primjenu u biosenzorici ili biokatalizi. Cu_2O vrlo je zanimljiv, jer predstavlja dobru zamjenu za plemenite metale, što duguje svojoj iznimnoj katalitičkoj aktivnosti. Ovakav tip elektrode moguće je dodatno modificirati „premaznom“ metodom na način

da se već modificirana elektroda uroni u alkoholnu otopinu niklova acetata uz prekaljivanje na temperaturi od 200°C 3 sata [51, 52, 53].

Još jedan zanimljiv primjer predstavljaju kobaltovi oksidni filmovi budući da pokazuju neuobičajenu raznovrsnost redoks prijelaza. Podjednako je i važno to što se pripremom ovakvih filmova zadržavaju visoka vodljivost te elektrokatalitička aktivnost. Nije zanemarivo ni to što su ovakvi filmovi uglavnom bez defekata te se uporabom istih izbjegavaju komplikacije oko supstratnog materijala. Nema puno izvora koji opisuju adsorpciju kobaltovih oksida na različite supstrate. Iz toga je proizašao zaključak da je kod supstrata temeljenih na grafitu i plemenitim metalima potrebno stvoriti komplekse kobalta kao preduvjet za elektrodepoziciju. Međutim, kod BDD to nije slučaj budući da on omogućuje pripremu Co_xO_y -elektroda jednostavnom oksidacijom Co(II) vrsta pri potencijalima koji su viši od 1,4 V uz zasićenu kalomel elektrodu (ZKE). Korištenje BDD podloge za kobaltove okside omogućuje zanemarivanje kapacitivnih i pseudo-kapacitivnih utjecaja supstrata, a sve zahvaljujući izvanrednim svojstvima ovog materijala. Elektrodepozicija omogućuje pripremu kompozitnih materijala, tipa kobaltov oksid-Pt kompozita, koji pored poboljšane površinske aktivnosti imaju i poboljšanu katalitičku aktivnost prema anodnoj oksidaciji metanola [54, 55].

Rutenijev oksid je isto tako pokazao primamljiva svojstva. Ovakav kompozitni elektrodni materijal također se dobiva elektrodepozicijom čestica hidriranog rutenijeva oksida. Istraživanja su pokazala da ovakav materijal ima veliku aktivnu površinu te da posjeduje visoku stabilnost, odnosno da je pogodan za oksidaciju fenola i kiselom mediju. BDD- RuO_x nije jako osjetljiv na nakupljanje naslaga te pri potencijalu od 3,5 V omogućuje oksidaciju fenola [56].

Što se tiče adsorpcije metala na površinu BDDE, zlato i platina su privukle posebnu pažnju radi svoje primjenjivosti u elektrokatalizi redukcije kisika, odnosno elektrooksidacije metanola. Ovaj tip elektroda moguće je pripremiti različitim metodama, ali ono što im je zajedničko je da, bilo da su modificirane zlatom (BDD-Au) ili platinom (BDD-Pt), uvijek pokazuju visoku elektrokatalitičku aktivnost prema redukciji kisika te oksidaciji metanola. Poznato je da visoko-reaktivni hidroksi-radikali, nastali elektrogeneracijom na BDD iz elektronskim pražnjenjem vode pri visokim prepotencijalima, mogu i očistiti mikroemulzijom-sintetizirane Pt nanočestice s ostatnog surfaktanta i sudjelovati u procesu oksidacije metanola. Pt čestice također mogu biti

zarobljene u dijamantni matriks na način da se odradi dodatni korak koji uključuje adsorpciju sloja dijamanta na supstrat na koji su već adsorbirane čestice Pt. Usprkos velikoj otpornosti i izdržljivosti ove kompozitne elektrode, može se očekivati značajan gubitak elektrokatalitičke aktivnosti budući da dolazi do smanjenja dostupne katalitičke površine [50, 57].

Elektrodepozicija je jedna od najraširenijih korištenih metoda za pripremu i adsorpciju čestica na BDD kao materijala koji je tu vrlo pogodan radi svog širokog katodnog područja potencijala. Međutim termička dekompozicija, mikroemulzijska sinteza te sol-gel modifikacija su također uspješno korištene metode za adsorpciju metalnih čestica na dijamantne supstrate u laboratoriju [58, 59].

1.3. Ugljikova pasta kao materijal za izradu elektroda

Ugljikova pasta (engl. *carbon paste*) je smjesa ugljikova praha (grafita) i prikladnog veziva („lijepjenje tekućine“) koji tvori poseban tip ugljikovih elektroda. Funkcija čestica grafita je osiguravanje električki vodljive površine. Ipak, zbog prisutnosti tekućeg veziva i zbog njegove interakcije s grafitnim česticama, ugljikove paste se obično javljaju kao specifični elektrodni materijal s brojnim jedinstvenim svojstvima.

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

Vezivne tekućine karakteriziraju:

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

Uobičajene tekućine koje se upotrebljavaju pri izradi CPE:

- parafinsko ulje
- silicijsko ulje
- brom – naftalen

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

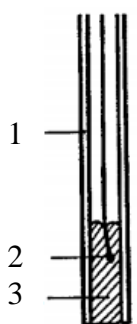
CPE se mogu podijeliti prema:

- 1) fizikalno - kemijskom svojstvu veziva
 - a) klasična CPE - napravljena od grafitnog praha i inertnih tekućih veziva. Ova vrsta CPE je najčešće korištena, što predstavlja 70-80% svih elektroda utemeljenih na ugljikovim pastama.
 - b) vezivna CPE s elektroaktivnim vezivom - smjesa u kojima je anorganski elektrolit vezujuća tekućina kao što je npr. koncentrirana otopina mineralnih kiselina ili alkalnih hidroksida.
- 2) prirodi veziva (viskoznost)
 - a) „Dry“ ili „Wet“ CPE - značajno se razlikuju po sadržaju veziva i sposobnosti lijepljenja tekućine.
 - b) čvrste CPE – sastoje se od ugljika i vezujuće smjese u kojoj je vezivo tvar koja se lako može rastopiti kao npr. fenantren ili parafinsko ulje. Miješanjem na određenoj temperaturi vezivo se rastopi, a smjesa mora zadržati svoj oblik. Nakon hlađenja, dobije se gusta masa koja se može upotrijebiti kao klasična pasta veće konzistencije.
- 3) prisutnosti modifikacije
 - a) nemodificirane CPE - sastoje se od binarne paste ugljika, tj. od mješavine grafitnog praha i veziva
 - b) modificirane CPE - sastoje se od binarne paste ugljika, tj. od mješavine grafitnog praha i veziva, kojima je dodan jedan ili više modifikatora

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

Optimalan omjer za pripravu smjese varira u intervalima od 1 g praha do 0,3 - 1 cm³ tekućine. Neke mješavine mogu sadržavati čak i veću količinu vezivne tekućine, jer rezultirajući omjer dviju glavnih komponenti ovisi i o njihovom međusobnom prijanjanju. Potrebno je dobiti i određenu kompaktnost. Rezultirajuća smjesa ne smije biti ni previše tvrda, ni previše meka i ljepljiva. Pasta se priprema ručnim miješanjem grafitnog praha i tekućeg veziva korištenjem običnog laboratorijskog posuđa poput tarionika i tučka [7].

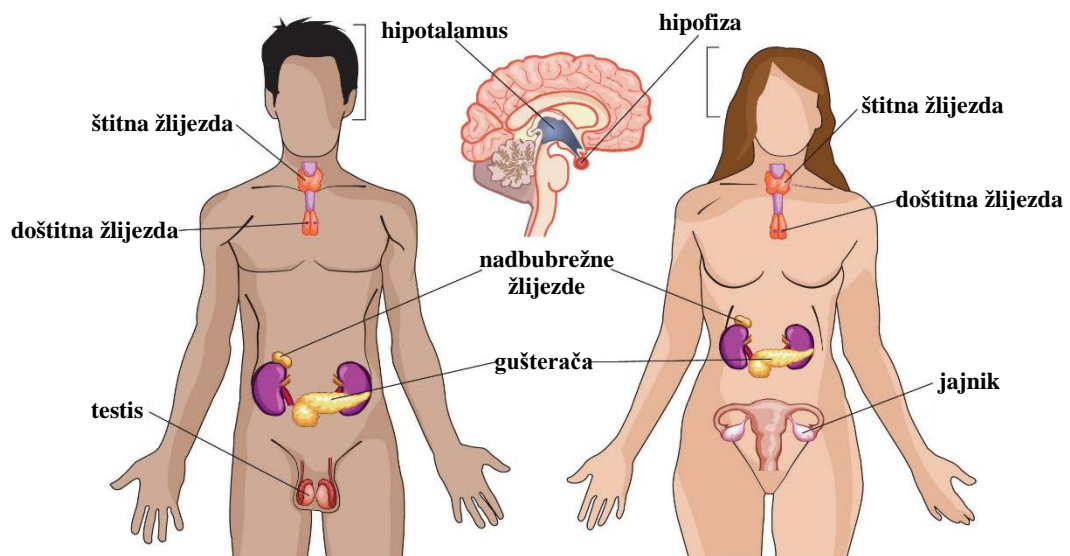
Cijevi i štapići (slika 9) sa šupljinama vrlo jednostavne konstrukcije mogu se napraviti u svakom laboratoriju i često predstavljaju najjednostavnije rješenje za dobivanje nosača elektroda koje će se povremeno koristiti prilikom mjerenja.



Slika 9 - Osnovna konstrukcija elektrode; (1) cijev, (2) kontakt i (3) pasta

1.4. Endokrina ometala u analitičkim istraživanjima

Prvo ćemo se osvrnuti na endokrini sustav i značenje pojma endokrino ometalo. Endokrini sistem se sastoji od niza žlijezda koje su raspoređene po tijelu (slika 7). Svaka žlijezda proizvodi jedan ili više hormona. Hormoni su prirodni spojevi koji se proizvode u stanicama žlijezda te koji se luče u krvožilni sustav, gdje krvotokom putuju sve dok ne dođu do ciljanog tkiva ili organa. Tamo se vežu za specifične receptore, izazivajući odgovor poput proizvodnje drugog hormona, promjene u metabolizmu, bihevioralni odgovor ili neki drugi, u ovisnosti o specifičnom hormonu te njegovoj meti [60, 61].



Slika 10 - Shematski prikaz glavnih žlijezda ljudskog tijela

Neke endokrine žlijezde proizvode jedan, a neke više endokrinih hormona. Npr. doštitna žlijezda proizvodi jedan jedini poznati hormon (paratiroidni hormon), dok hipofiza proizvodi osam ili više hormona, kao što su npr. prolaktin i hormon rasta. Međutim, neke endokrine žlijezde imaju i druge ne-endokrine uloge. Npr. gušterača proizvodi hormon inzulin, koji cirkulira krvlju i neophodan je za normalnu regulaciju razine šećera u krvi, ali isto tako proizvodi i probavne enzime koji idu direktno u probavni trakt i nisu dio endokrinog sustava budući da se ne luče u krv. Prema navedenom da se zaključiti da su funkcije endokrinog sustava kompleksne i različite, sa svakom žlijezdom i hormonom koji imaju jedinstvene uloge u zdravlju i dobrobiti.

Endokrine žlijezde i hormoni koje proizvode jako su važni za ljudsko zdravlje, budući da pomažu tijelu da se prilagodi promjenama u okolišu, omogućuju metaboličke prilagodbe na nutritivne zahtjeve (glad, gladovanje, pretilost, ...), od neizmjerne važnosti su za reproduktivnu funkciju te su neophodne za normalni razvoj tijela i mozga. Budući da imaju tako važnu ulogu u organizmu, nije čudno da se poremećaji u bilo kojem dijelu endokrinog sustava vrlo lako mogu imati fatalne posljedice. Čak i kada se ne radi o tako kritičnom poremećaju, tipične posljedice su također teške, poput neplodnosti, poremećaja rasta, poremećaja spavanja i mnogo drugih akutnih i kroničnih bolesti. Ovdje su ključni endokrini hormoni, koji moraju biti lučeni u odgovarajućim količinama te ih endokrine žlijezde moraju prilagođavati promjenjivom okolišu, kako bi se osigurao zdrav život.

Endokrini ometala, EDC (engl. *endocrine disrupting compounds*) predstavljaju egzogenu (ne-prirodnu) kemikaliju ili smjesu kemikalija koje se upliću u, odnosno ometaju bilo koji aspekt rada hormona. Neke od ovih kemikalija koje čine našu svakidašnjicu su atrazin, DDT (pesticidi); olovo, ftalati, kadmij (dječji proizvodi), BPA, ftalati, fenol (materijali koji su u kontaktu s hranom); triklozan (antibakterijska sredstva); perfluoro-kemikalije (tekstil i odjeća) te mnoge druge. Ljudi i životinje dolaze u kontakt s endokrinim ometalima kroz konzumiranje hrane i vode, preko kože, udisanjem te prijenosom s majke na fetus kroz posteljicu, odnosno dojenjem s majke na dijete, naravno ukoliko žena ima EDC u svom tijelu [60, 62].

Svaki hormon posjeduje 3D strukturu koje se visoko razlikuju i vrlo su jedinstvene te svaki od njih ima komplementarni receptor ili receptore, koji se nalaze na ciljnim stanicama (princip ključ-brava). Sposobnost hormona da aktivira receptor ovisi o nekoliko faktora: koliko se hormona sintetizira i oslobađa u žlijezdi, kako se prenosi cirkulacijom, koliko ga dođe do odgovarajućeg organa te koliko snažno, odnosno koliko dugo će hormon aktivirati receptor. Sva ova svojstva su osnova normalne hormonske signalizacije, a EDC ometaju neka ili svako od njih.

EDC su prepoznatljiv zbog svoje mogućnosti mimike hormona na način da imaju 3D strukturu sličnu originalnom hormonu te tako mogu „prevariti“ receptor da misli da se radi o pravom hormonu. 2 su načina mimičkog djelovanja EDC:

- hormonska aktivacija – EDC se može vezati na receptor te ga nepropisno aktivirati i pokrenuti procese koje normalno pokreće samo prirodni hormon

- hormonska blokada – EDC se može vezati na receptor te ga blokirati, odnosno skriti ga od originalnog hormona neovisno o njegovom prisustvu, i na taj način receptor ne može biti aktiviran, kao ni funkcije pokrenute njegovom aktivacijom

Najbolji primjer rada EDC je ometanje estrogenih hormona, koji se vežu na estrogene receptore (ER) u tijelu. Kod muškaraca i žena, ER su prisutni u mnogim stanicama mozga, kostiju, krvnih žila te reproduktivnih organa. Iako su najbolje izučeni u kontekstu reprodukcije u žena, kod muškaraca također imaju vrlo značajnu ulogu reprodukciji te su uključeni u neurobiološke funkcije, razvoj kostiju i održavanje, kardiovaskularne funkcije i mnoge druge. Prirodni hormoni vrše sve ove funkcije nakon što su izlučeni iz gonada (testisa ili jajnika) te vezani na ER receptore [60].

Estrogeni nisu jedini receptori zahvaćeni utjecajem EDC, ali su najbolje proučavani. To mogu biti i receptori za androgene, progesteron, tiroidne hormone i mnoge druge. Kako EDC nisu prirodni hormoni, jedan EDC može imati sposobnost uplesti se u više različitih puteva hormonske signalizacije te tako ometajući više endokrinih funkcija može dovesti do masovnih posljedica po biološke procese koji su pod kontrolom odgovarajućih žlijezda.

1.4.1. Bisfenol-A kao endokrino ometalo

Bisfenol-A, BPA (engl. *bisphenol-A*) je najviše proučavano endokrino ometalo. Prvi put je sintetiziran 1891., a oko 40 nakon toga britanski znanstvenik Charles Dodds ga je prepoznao kao spoj koji imitira estrogene, što znači da su njegove EDC-karakteristike poznate desetljećima. Tada je razvio „lijek“ za žene, koji će kasnije biti zabranjen zbog mogućnosti uzrokovanja raka. BPA može ometati signalizaciju estrogena na više načina. Može se vezati za receptor i stimulirati ih iako slabije od prirodnog hormona. Izloženost BPA, čak i u malim količinama, može izmijeniti gustoću receptora estrogena u tkivima poput moždanog, što je zapravo efekt koji posljedično smanjuje osjetljivost tog tkiva na prirodne estrogene. Kako estrogen ima važnu ulogu u razvoju brojnih tkiva, uključujući mozak, mliječne žlijezde, pa čak i testise, ometanje estrogene aktivnosti tijekom razvoja

može dovesti do trajnih promjena koje mogu utjecati na reproduktivnu funkciju kasnije tijekom života [60, 63, 64, 65].

1.4.1.1. Djelovanje i posljedice

Molekularno-biološki mehanizam djelovanja BPA je kroz DNA metilaciju. Svaki čovjek (izuzev jednojajčanih blizanaca) ima jedinstveni set gena. U našem tijelu ekspresija (aktiviranje) tih gena, što dovodi do ekspresije proteina u stanici, znatno se razlikuje. Npr. DNA je ista i u stanici kože i u živčanoj stanici, ali su proteini koji su prisutni u ovim tkivima jedinstveni za svaki tip stanice. Ekspresija gena je ta koja određuje ove razlike. DNA metilacija predstavlja proces adicije male kemijske skupine (metilne skupine) na DNA. Količina i mjesto ovih metilnih skupina određuju hoće li se gen ekspimirati te razinu ekspresije. BPA uzrokuje ovakvu promjenu. On izaziva DNA metilaciju neuro-endokrinih puteva koji su osnova reproduktivnog zdravlja, energijske ravnoteže te ponašanja, uključujući puteve osjetljive na estrogene. Budući da su izmijenjeni obrasci DNA metilacije u genima ključnim za stanični rast posljedica djelovanja BPA, izloženost malim količinama istog povećava rizik nastanka raka maternice ili prostate. Slične efekte ima i na jetru, mozak te jajnike. BPA 8 puta jače djeluje na receptor povezan s estrogenom gama, $ERR\gamma$ (engl. *estrogen related receptor gamma*) u odnosu na klasične estrogene receptore, što dovodi do zaključka da su fetusi posebno osjetljivi na njega budući da je taj receptor visoko ekspimiran u fetalnom mozgu te posteljici [66, 67, 68, 69, 70, 71].

Neki od simptoma koje BPA izaziva su smanjena kvaliteta oocita žena koje podliježu postupku potpomognute oplodnje, aneuploidiju⁸ u oocitima, ometanje razvoja jajnika, degeneracija strukture maternice, poremećena implantacija embrija, sindrom policističnih jajnika te povišenih razina androgena u žena. S druge strane, u muškaraca dolazi do smanjene kvalitete sperme (smanjen broj i pokretljivost spermatozoida, kao i povećana oštećena u spermatozoidnoj DNA) te smanjene seksualne funkcije iako nije dokazano vrijedi li to i za doze kojima je izložena opća populacija. Eksperimentom je potvrđeno da, pored uzrokovanja aneuploidija, BPA ima potencijal uzrokovati točkaste mutacije te dvostruke lomove DNA. Što se tiče genotoksičnih i mutagenih efekata, većina istraživanja je provedena *in-vitro*, što se ne mora odnositi na *in-vivo* situaciju. Kod djece

⁸ nenormalan broj kromosoma u stanici

dovodi uzrokuje preuranjeni pubertet, odnosno dovodi do kongenitalnih poremećaja poput hipospadije⁹ i kriptorhizma¹⁰. Veliki problem predstavlja utjecaj na razvoj fetalnog mozga i ponašanje. Istraživanja su pokazala da izloženost BPA prilikom razvoja dovodi do povišene anksioznosti, agresije, spektra autističnih poremećaja, poremećaja hiperaktivnosti i deficita pažnje te utječe na moždanu seksualnu diferencijaciju, odnosno sinaptičku plastičnost¹¹. Neka istraživanja su pokazala da čak i u prilično malim koncentracijama (oko 100 pM) može dovesti reproduktivnih poremećaja, kroničnih bolesti, dijabetesa i raznih oblika raka, dok se maksimalnom prihvatljivom dnevnom dozom smatra 50 µg/kg tjelesne mase (odnosno ppb) [60, 62, 63, 71, 72].

1.4.1.2. Zabrinjavajuća sveprisutnost

Preko 95% ljudi ima BPA u svome tijelu. On je pronađen u urinu, krvi, pupkovini te plodnoj vodi. Iako je zanimljivo to da su veće koncentracije BPA pronađene u djece. Razlog tome je to što djeca dobar dio vremena provedu na podu, stavljaju svakakve stvari u usta te češće piju iz plastičnih boca. Odrasli, koji ne koriste previše plastike, proizvoda za njegu, imaju niže koncentracije BPA u organizmu.

Pored navedenog, treba naglasiti da se koristi kao monomer za proizvodnju polikarbonata, epoksi-smole te polifenilenske smole kao dodatak drugim plastičnim materijalima. Većina ljudi je izložena djelovanju BPA, jer konzumira hranu i piće koji u kontaktu s pakiranjem ili stvarju koji ga ispušta (uključujući plastične vrećice i pakiranja, boce za piće, boce za bebe, sportska oprema medicinski i dentalni aparati, zubne plombe, vodovodne cijevi i dr.) na račun razgradnje polimera. Ispuštanje je pojačano faktorima poput topline, sunčeve svjetlosti, kiselosti i sl. Drugi vidovi izloženosti su udisanje ili unošenje (ingestija) kontaminirane kućne prašine u organizam, kao i npr. izloženost kože zbog diranja računa od termalnog papira, koji sadrži BPA [61, 63, 72, 73].

Dobra strana je to što se za razliku od drugih EDC BPA ne akumulira u tijelu se brzo metabolizira. To znači da se teret koje tijelo podnosi može brzo smanjiti smanjenjem izloženosti, na način da se npr. smanji uporaba konzervirane hrane i plastičnih vrećica te

⁹ poremećaj kojeg karakterizira urinarni otvor koji nije na uobičajenom mjestu na penisu

¹⁰ poremećaj kojeg karakterizira testis(i) koji nije spušten u skrotum

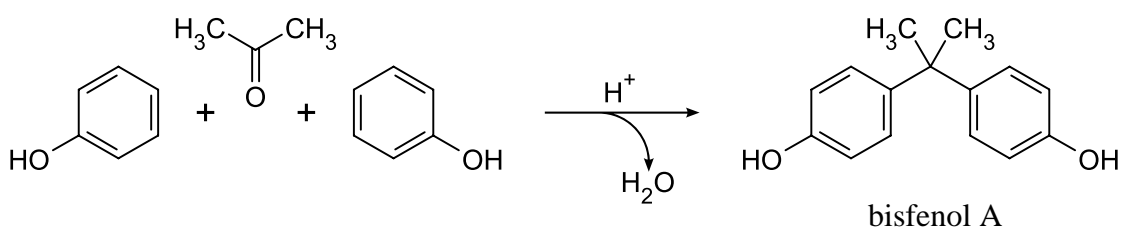
¹¹ pojam u neuroznanosti koji podrazumijeva sposobnost sinapsi da oslabe ili ojačaju tijekom vremena, kao odgovor na povećanje ili smanjenje njihove aktivnosti

drugih proizvoda. Novija rješenja uključivala proizvodnju plastičnih vrećica koje ne sadrže BPA, ali su zamjenski spojevi također nesigurni te potencijalno EDC.

Problem nije samo humano-biološke prirode, vrlo je važno i zagađenje okoliša. Vrlo mali udio plastičnih boca se reciklira, što znači da veliki broj njih završi na odlagalištima otpada, odnosno u vodenim sustavima. Tome ide u prilog i činjenica da 90% oceanskog otpada čini plastika, koja tamo može plutati desetljećima i dulje. Dio BPA curi iz ovog otpada i akumulira se u morskoj vodi te morskim vrstama, što znači da će ostati zagađivalo okoliša još dugo te da će biti potrebna stoljeća kako bi se plastični otpad razgradio [60, 62, 73].

1.4.2. Kemijski aspekti Bisfenola A

Bisfenol A se prirodno ne nalazi u okolišu, stoga se smatra tvarju koju je proizveo čovjek. BPA je prvi put sintetizirao A. P. Dianin 1981. Primarno je korišten u proizvodnji polikarbonata (71%) i epoksi smola (27%), koji imaju široku primjenu (polikarbonati kod leća za naočale, medicinske opreme, mobitela, računala i sl., a epoksi smole kod industrijskih podova, adheziva, industrijskih zaštitnih premaza, premaza za konzerve i sl.). Proizvodi se kondenzacijom dvije molekule fenola s jednom molekulom acetona (slika 8), odakle i dolazi oznaka „A“. Ova reakcija je katalizirana jakim kiselinom, poput klorovodične kiseline ili polistiren-sulfonatne smole. Reakcija je vrlo efikasna budući da je jedini nusprodukt voda. Komercijalna proizvodnja BPA zahtijeva destilaciju – bilo da se radi o ekstrakciji BPA iz mnogo nusprodukata smole pod visokim vakuumom ili o ekstrakciji otapalima, uz dodatni fenol, koja je popraćena destilacijom [65, 74, 75, 76].



Slika 11 - Shematski prikaz sinteze bisfenola A

Naziv bisfenola A prema IUPAC-u glasi 4,4'-(propan-2,2-diil)di-fenol, a drugi kemijski nazivi uključuju 2,2-bis-(4hidroksifenil)propan, odnosno 4,4,-izopropilidendifenol. Molekulska formula BPA je $C_{15}H_{16}O_2$, a sažeta strukturna $(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2$ [75, 77].

Thomas Zincke je prva objavio postupak sinteze BPA iako je naglasio da se njegova sinteza bazirala na ranije objavljenim i neobjavljenim radovima (diplomski radovi i sl.) Sveučilišta u Marburgu. Rad u kojem opisuje sintezu BPA i brojnih sličnih spojeva objavljuje 1905. godine. U tom radu izložio je ključna fizička svojstva BPA (među ostalim molekulska sastav, točka taljenja te topljivost u raznim otapalima), ali ne i primjenu [65, 78].

1953. Hermann Schnell iz Bayera (Njemačka) te Dan Fox iz General Electrica (SAD) neovisno jedan o drugome razvijaju procese proizvodnje za novi plastični materijal (polikarbonat), čije je osnovna komponenta bio BPA. Polikarbonatna plastika je imala vrlo korisna svojstva, poput optičke čistoće, otpornost prema pucanju te otpornost na visoke temperature, što je učinilo polikarbonat važnim dijelom svakidašnjice. Komercijalna proizvodnja započela je 1957. u SAD te 1957. u Europi. U tom periodu, epoksi smole su razvijene s mogućnošću da zadovolje mnoge industrijske i potrošačke potrebe. Do današnjeg dana potreba za korištenjem ovih materijala raste, kao što se povećava i broj načina na koji su isti korišteni [65, 78].

1.4.2.1. Fizička i kemijska svojstva BPA

BPA dolazi u obliku krutih bijelih do svijetlo smeđih pahuljica ili praha sa slabim fenolnim mirisom. Neki izvori navode topljivost u vodi kao vrlo slabu, a vrijednosti koje se tiču topljivosti u vodi variraju od 120 mgL^{-1} do 300 mgL^{-1} pri 25°C . Prema literaturi, topljivost BPA je dobra u octenoj kiselini, vodenim otopinama baza, alkoholu, acetonu te se slabije otapa u tetra-klorugljiku. Gustoća BPA iznosi $1,195 \text{ gcm}^{-3}$. Konstanta disocijacije je $pK_a=9,6-11,3$, što znači da disocira u lužnatoj sredini [75, 79, 80].

U tablici 2 sažeto su prikazana kemijska svojstva bisfenola A [76].

Tablica 2 - Pregled kemijskih svojstava BPA

Kemijska svojstva	Vrijednost
CAS broj	80-05-7
Molekulska formula	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Molekulska masa	228,29
Točka taljenja	158-159°C
Točka ključanja	220°C pri 4 mmHg/360,5°C pri 760 mmHg
Topljivost (pri 20-25°C)	1000 mgL ⁻¹
Tlak pare (pri 20-25°C)	7,25x10 ⁻⁷ mmHg
Difuzijski koeficijent za zrak	0,05 cm ² s ⁻¹
Difuzijski koeficijent za vodu	5,89 cm ² s ⁻¹
Oralna referentna doza	0,05 mg/kg/dan
Inhalacijska referentna koncentracija	0,08 mgm ⁻³

1.4.2.2. Metode određivanja

Mnoge tehnike su razvijene u svrhu praćenja razina bisfenola A u okolišu, njegova ponašanja te konačne sudbine. Neke od navije korištenih su kapilarna elektroforeza, plinska kromatografija s masenom spektrometrijom, GC-MS (engl. *gas chromatography - mass spectrometry*), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s masenom spektrometrijom, HPLC-MS (engl. *high performance liquid chromatography - mass spectrometry*), ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*), fluorescencijsko određivanje, elektrokemijske metode i dr. Ove metode, kombinirane s pred-tretmanima poput ekstrakcije na krutoj fazi, ekstrakcije tekuće-tekuće te imuno-afinitetne kromatografije, GC-MS, HPLC-MS i ELISA mogu biti korištene za selektivno i osjetljivo određivanje BPA u kompleksnim sredinama. Pored toga što su visoko-osjetljive te ih odlikuju vrlo niske granice dokazivanja. Međutim, budući da zahtijevaju dodatne pred-tretmane, iskusnog operatera te s obzirom na to da iziskuju puno vremena te preskupu opremu, uporaba ovih metoda (svih osim elektrokemijskih) je ograničena. Isto tako, jedno od velikih ograničenja je i što uređaji nisu kompaktni te nisu pogodni za rad na terenu. Stoga je poželjno razviti jednostavnu i osjetljivu analitičku metodu za određivanje BPA [81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90].

Posljednjih godina, elektrokemijske metode su se pokazale obećavajućim budući da su jednostavne, brze te ne iziskuju velike troškove. Elektrokemijski senzori privlače više pažnje zbog pouzdanosti, brzog odziva, niske cijene, jednostavnosti, uštede na vremenu, jednostavnih instrumenata te visoke osjetljivosti (niske granice dokazivanja i određivanja). Do danas je proizvedeno mnogo elektrokemijskih (bio)senzora temeljenih na enzimima, aptamerima¹², antitijelima, peptidima, ugljikovim materijalima, metalnim oksidima i sl. [62, 63, 91, 92].

1.4.2.3. Elektrokemijski aspekti BPA

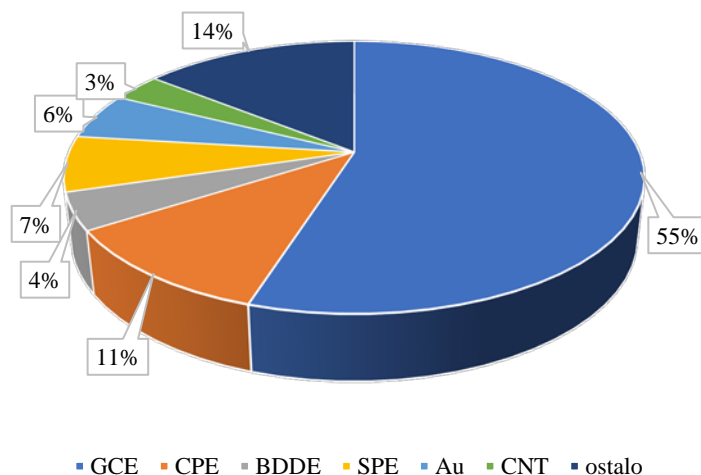
Kao što se može i vidjeti iz molekulske strukture (slika 8), BPA ima dvije hidroksifenilne skupine, koje su elektroaktivne. Stoga se može zaključiti da se radi o elektrokemijski aktivnom spoju, odnosno da se isti može oksidirati na površini elektrode [93, 94, 95].

Elektrokemijske metode koje se najčešće koriste u svrhu elektrokemijske karakterizacije bisfenola A temeljene su na votametriji i podrazumijevaju cikličku voltametriju (CV), diferencijalnu pulsnu voltametriju (DPV), voltametriju s linearnom promjenom potencijala, LSV (engl. *linear sweep voltammetry*), voltametriju s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude, SWV (engl. *Squarewave voltammetry*) i kronoamperometriju te spektroskopiji – EIS (engl. *electrochemical impedance spectroscopy*) [61, 63, 90, 96, 97].

S druge strane, kada se bisfenol analizira tradicionalnim elektrokemijskim sensorima dolazi do slabog odziva (slaba osjetljivost i selektivnost), zbog toga što dolazi do nakupljanja naslaga na golim elektrodama. Vrlo efikasan način da se ovakav problem prevaziđe je da se elektroda modificira. Modifikacije se, u pravilu, baziraju na cilju da se poveća aktivna površina elektrode kako bi se poboljšali oksidacijski signali [61, 95].

Veliki je broj modifikacija koje su razvijene za različite vrste iako treba naglasiti da je oskudan broj onih koje se odnose na dijamantnu elektrodu dopiranu borom. Pregled modifikacija na različitim elektrodama u svrhu elektrokemijske karakterizacije bisfenola A prikazan je na slici 9 [98].

¹² oligonukleotidne ili peptidne molekule koje se specifično vežu na ciljanu molekulu



Slika 12 - Shematski prikaz pregleda elektroda modificiranih u svrhu elektrokemijske karakterizacije bisfenola A

Postotna procjena izvršena je na način da su pobrojane sve navedene modificirane elektrode (ukupno 91) te je elektroda za koju je postojalo tri ili više vrsta modifikacija svrstana u zasebnu kategoriju, dok su sve elektrode za koje su navedene manje od tri modifikacije svrstane u istu kategoriju (ostalo). Iz prikazanog se može vidjeti da čak 57% modificiranih elektroda čine elektrode od staklastog ugljika (GCE, engl. *glassy carbon electrodes*), 11% elektrode od ugljikove paste (CPE, engl. *carbon paste electrodes*), 7% zaslonski štampane ugljikove elektrode (SCPE, *screen-printed carbon electrodes*), 6% zlatne elektrode, 4% BDDE, 3% elektrode od ugljikovih nanocjevčica te 14% otpada na kategoriju ostalo. Ono što se moglo zapaziti je to da za GCE postoji najviše različitih modifikacija, ali isto tako i najviše sličnih modifikacija (one koje uključuju jedan bar jedan element isti i bar jedan različit). Za GCE uočava se da dolazi do čestih modifikacija enzimom tirozinazom (samim ili uz dodatak ugljikovog materijala ili još nekog elementa), ugljikovim materijalima (samim ili uz dodatak dodatnog elementa), metalnim oksidima te kitozanom. Što se tiče CPE, većina modifikacija temelji se na tirozinazi (samoj ili uz dodatni element). Kada se pod povećalo stavi npr. BDDE, uočljivo je da od spomenuta 4% (što je igrom slučaja i ukupno 4 modifikacije) jedna modifikacija „nulta“, jedna samo pred-tretirana, dok druge dvije također uključuju tirozinazu. Rad usporedbe, u tablici 3, dan je pregled granica dokazivanja, LOD (engl. *limit of detection*) i linearnog područja nekih od njih.

Tablica 3 - Pregled svojstava nekih modificiranih elektroda [98]

Senzor/modifikacija	LOD	Linearno područje
GCE/CNT	0,098 μM	0,3-100 μM
GCE/MW-CNT/tirozinaza	0,2 μM	0,4-10 μM
GCE/MW-CNT/NiO	29 nM	2,4-46 μM
GCE/kitozan/G-MN202	1,02 nM	5 nM-20 μM
CPE/tirozinaza	0,15 μM	1-20 μM
CPE/tirozinaza/SW-CNT	0,02 μM	0,1-12 μM
CPE/CoPc	0,01 μM	0,088-12,5 μM
CPE/Bi ₂ WO ₆	20 nM	70-1300 nM
BDDE	1 μM	1-100 μM
BDDE (KT)	0,21 μM	0,44-5,2 μM
BDDE/tirozinaza	1 μM	1-100 μM
BDDE/tirozinaza/MW-CNT/diazonijeva sol	10 pM	0,01-100 nM

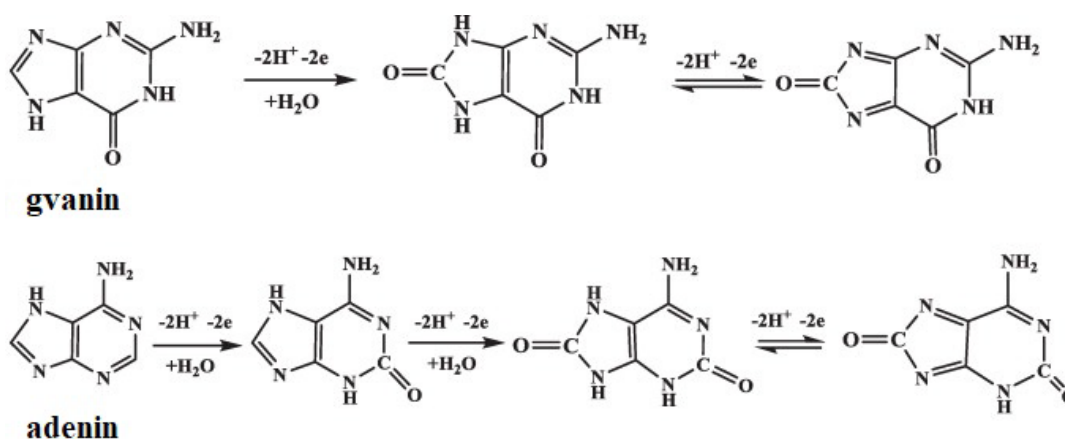
1.5. Deoksiribonukleinska kiselina (DNA)

Deoksiribonukleinska kiselina, DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*) koja nosi genetičke upute koje su neophodne za rast, razvoj, funkcioniranje te reprodukciju svih poznatih živih organizama i mnogih virusa. Pretežito je lokalizirana u kromosomima unutar jezgre stanica kod eukariota te u manjim količinama u mitohondrijima i kloroplastima. S druge strane, prokariotske stanice imaju DNA u citoplazmi.

Ona zapravo predstavlja oblik biopolimera, čiji se monomeri nazivaju nukleotidima. Svaki nukleotid se sastoji od tri jedinice: deoksiriboza (šećer), dušična baza (purinska ili pirimidinska) i fosfatna skupina, što se može vidjeti iz slike 10\3.

1.5.1. Elektrokemija DNA

S obzirom na to da mnogi lijekovi i drugi spojevi reagiraju s DNA te uzimajući u obzir sva oštećenja DNA koja proizlaze iz te interakcije što vodi do nastanka bolesti, veliki broj znanstvenika pokušava pronaći pogodan DNA-biosenzor (genosenzor) za otkrivanje genetičkih bolesti te identifikaciju opasnih spojeva koji potencijalno mogu reagirati s DNA. Ovakav tip senzora čini elektroda na čijoj površini se nalazi DNA kao biološki element prepoznavanja. Voltametrijski i amperometrijski uređaji oslanjaju se na oksidaciju DNA baza, uglavnom na adenin i gvanin. Zanimljiva je činjenica da su šećerna jedinica i fosfatna skupina elektrokemijski neaktivne. Ono što je važno naglasiti je to da je oksidacija purina i pirimidina elektrokemijski ireverzibilan proces. Elektrokemijske metode se koriste u detekciji DNA oštećenja, jer su vrlo jednostavne, visoko osjetljive, lake za pripremu, vrlo brze te nisu tako skupe. Elektroda modificirana s DNA može se koristiti kao biosenzor za DNA oštećenja, DNA hibridizaciju te u svrhu studije interakcije DNA s drugim spojevima. Elektrooksidacija gvanina i adenina prikazana je na slici 14 [99, 100, 101, 102, 103, 104].



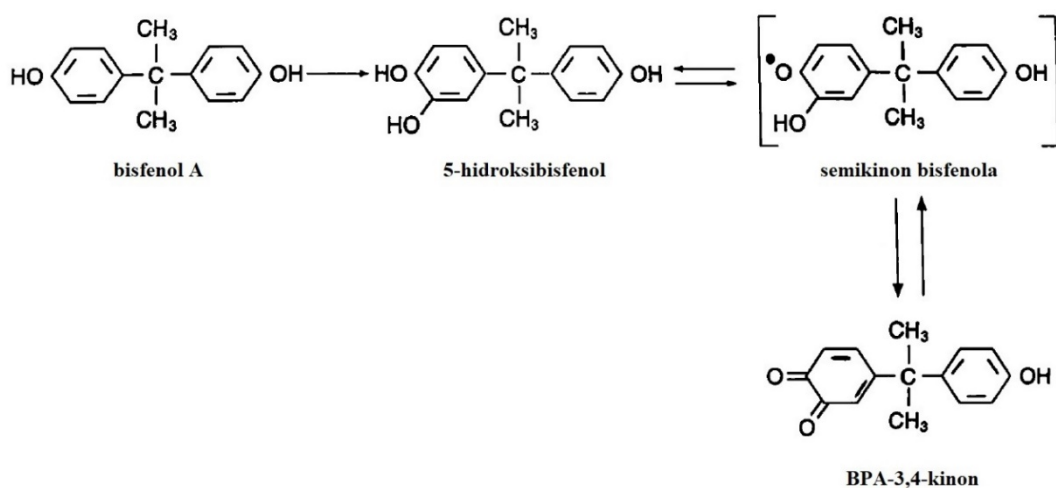
Slika 14 - Shematski prikaz elektrooksidacije gvanina i adenina

Površina elektrode se može modificirati deoksiribonukleinskom kiselinom na više načina. Najčešći i najjednostavniji je adsorpcija na površinu elektrode, dok druga dva vrlo česta uključuju imobilizaciju kovalentnim vezanjem ili upotrebu nanomaterijala. Adsorpcija se sastoji iz dvaju koraka. Prvi podrazumijeva pred-anodizaciju i sorpciju DNA na površinu. Tako se u prvom koraku želi postići O-terminirana površina elektrode, kako bi se olakšalo

nakupljanje DNA. U drugom se DNA sorbira pri konstantnom potencijalu. Adsorpcija uključuje interakciju negativno nabijene šećerne, odnosno fosfatne skupine s površinom elektrode, koja pozitivno nabijena. Oksidacijski pik se očekuje na potencijalu od oko 1 V za gvanin te na nešto pozitivnijem potencijalu za adenin [1, 99, 105, 106, 107].

1.6. Interakcijska mini-studija DNA i bisfenola A

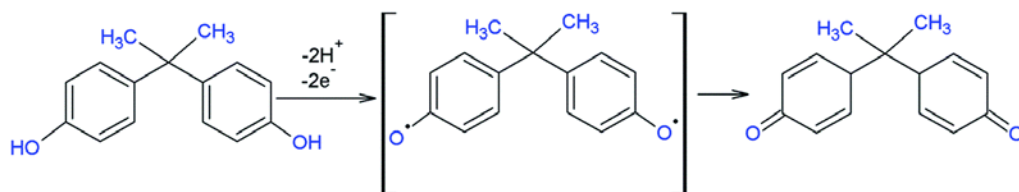
DNA-BPA adukt¹³ je bio tema mnogih istraživanja *in vivo*. U literaturi se navodi da BPA prilikom ulaska u organizam biva metaboliziran do svojih hidroksiliranih derivata, koji se nakon toga oksidiraju do orto-kinona (o-kinona), kao što je npr. BPA-3,4-kinon, BPAQ (engl. *BPA-3,4-quinone*). Pretpostavlja se da BPAQ reagira s DNA kako bi tvorio adukt na način da se veže na N7-atom gvanina. Elektrooksidacija se odvija na način da se prvo stvori hidroksibisfenol, koji dalje ulazi u sustav redoks jednadžbi. Tijekom ovog redoks „kruženja“ dalje se enzimski oksidira do semi-kinonskog oblika, čije postojanje zasad nije demonstrirano, te konačno oksidira do o-kinonskog oblika, koji dalje može tvoriti DNA adukte (slika 15) [73, 108, 109].



Slika 15 - shematski prikaz mehanizma oksidacije BPA

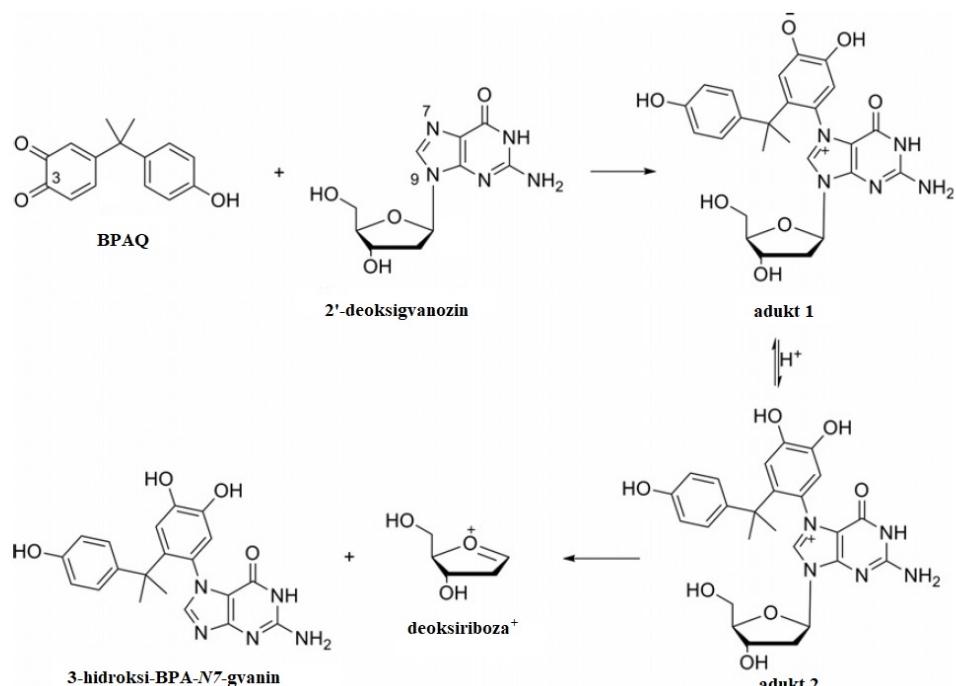
¹³ produkt direktne adicije dva ili više različitih spojeva, koji nastaje kao reakcijski produkt koji sadrži sve atome svih komponenti koje su sudjelovale u reakciji

Međutim, postoje i alternativni načini oksidacije bisfenola A. Ono što im je zajedničko je nastanak radikalskog oblika, koji je vrlo nestabilan u prisustvu nukleofila te odmah reagira s vodom iz otopine dajući konačni produkt (slika 16).



Slika 16 - shematski prikaz oksidacije BPA

o-kinoni su vrlo reaktivne kemijske vrste. Zbog njihovog visokog elektronskog afiniteta, sposobni su sudjelovati u redoks reakcijama te generirati reaktivne kisikove vrste, ROS (engl. *reactive oxygen species*). Isto tako, sposobni su reagirati s nukleofilima kao što su proteini i nukleotidi (Michaelove 1,4-adicije). Uočeno je da BPAQ može reagirati i s deoksigvanozinom i s DNA u puferu ili vodi te da je rezultat ovakve reakcije nastanak depuriniranog produkta 3-hidroksi-BPA-N7-gvanin te kationska deoksiriboza (slika 17). Ovo rezultira nastankom apurinskih mjesta, koja mogu dovesti do mutacija ukoliko zakaže neki od mehanizama popravka oštećenja DNA [110, 111].



Slika 17 - shematski prikaz mehanizma interakcije BPAQ i deoksigvanozina

1.6.1. Utjecaj interakcije DNA i BPA na elektrokemijska mjerenja

Kao što se iz prethodnog može i zaključiti, gvanin je nukleotid koji je najpodložniji utjecaju štetnih kemikalija, odnosno štetnom učinku BPA. Stoga je očigledno i da će se navedeno očitovati u elektrokemijskim mjerenjima najviše kod izgleda pika za gvanin. Prema literaturi, pik može biti pomaknut ka negativnijim vrijednostima potencijala u slučaju elektrostatskih interakcija ili pozitivnijim u slučaju interkalacijskog vezivanja. Prema prethodnim priopćenjima, DPV voltamogrami su pokazali da se gvaninski pik smanjuje popratnim povećanjem koncentracije BPA. Pokazano je da više BPA radikala reagira s DNA pri višim koncentracijama BPA, što govori da je oštećenje DNA direktno ovisno o koncentraciji BPA. Iako treba naglasiti da pik raste do određene vrijednosti, a onda naglo pada, što se može pripisati akumulaciji BPA, koji je reagirao s DNA, na površini elektrode. U prisustvu DNA, oksidacijski pik BPA se povećava i pomiče ka pozitivnijim potencijalima, što govori da se radi o interkalaciji. U povratnom posmiku nema redukcijskog pika, što znači da je oksidacija BPA ireverzibilan proces [73, 95, 98].

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Priprava otopina

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

Tablica 4 - Kemikalije korištene za pripravu eksperimentalnih otopina

kemikalija	molekulska formula	dobavljač
dsDNA ¹⁴ iz riblje sperme	-	p.a. Sigma-Aldrich, SAD
bisfenol A	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	p.a. Sigma-Aldrich, SAD
grafitni prah	C	p.a. Sigma-Aldrich, SAD
parafinsko ulje	-	p.a. Sigma-Aldrich, SAD
kalijev di-hidrogen fosfat	KH ₂ PO ₄	p.a. Sigma-Aldrich, SAD
di-kalijev hidrogen fosfat	K ₂ HPO ₄	p.a. Sigma-Aldrich, SAD
natrijev acetat trihidrat	CH ₃ COONa×3H ₂ O	p.a. Merck, SAD
natrijev di-hidrogen fosfat dihidrat	NaH ₂ PO ₄ ×2H ₂ O	p.a. „Kemika“, Zagreb
di-natrijev hidrogen fosfat dodekahidrat	Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O	p.a. Merck, SAD

2.1.1. Priprava otopine DNA

Za pripravu „stock“ otopine odvaži se 0,1 g DNA, prenese se u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni otopinom (fosfatnog) pufera do oznake. Ne preporučuje se da se otopina koristi duže od jednog radnog dana te i prilikom uporabe treba paziti da se nalazi na relativno hladnom mjestu, zaštićenom od sunčeve svjetlosti.

¹⁴ dsDNA – dvolančana DNA, za razliku od jednolančane DNA (ssDNA)

2.1.2. Priprava otopine BPA

Za pripravu „stock“ otopine (200 ppm) odvaži se 0,02 g BPA, prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni otopinom (fosfatnog) pufera do oznake. Tako pripravljena otopina ostavi se 24 sata na 40°C uz konstantno miješanje. Gotovu otopinu treba držati na relativno hladnom mjestu, zaštićenom od sunčeve svjetlosti.

2.1.3. Priprava otopine KH_2PO_4

27,218 g KH_2PO_4 se odvaži i prenese u odmjernu tikvicu od 2 L te se otopi i nadopuni dejoniziranom vodom do oznake. Ovako pripravljena otopina ima koncentraciju od 0,1 M.

2.1.4. Priprava otopine K_2HPO_4

34,836 g KH_2PO_4 se odvaži i prenese u odmjernu tikvicu od 2 L te se otopi i nadopuni dejoniziranom vodom do oznake. Ovako pripravljena otopina ima koncentraciju od 0,1 M.

2.1.5. Priprava otopine CH_3COONa

34,02 g CH_3COONa se odvaži i prenese u odmjernu tikvicu od 0,5 L te se otopi i nadopuni dejoniziranom vodom do oznake. Ovako pripravljena otopina ima koncentraciju od 0,5 M.

2.1.6. Priprava otopine NaH₂PO₄

3,9 g NaH₂PO₄ se odvaži i prenese u odmjernu tikvicu od 0,5 L te se otopi i nadopuni dejoniziranom vodom do oznake. Ovako pripravljena otopina ima koncentraciju od 0,05 M.

2.1.7. Priprava otopine Na₂HPO₄

8,954 g Na₂HPO₄ se odvaži i prenese u odmjernu tikvicu od 0,5 L te se otopi i nadopuni dejoniziranom vodom do oznake. Ovako pripravljena otopina ima koncentraciju od 0,05 M.

2.1.8. Priprave otopine fosfatnog pufera (0,1 M); pH 7

Dodavanjem 0,1 M otopine K₂HPO₄ u otopinu 0,1 M otopinu KH₂PO₄ prilagođava se pH do željene vrijednosti (pH = 7). Ovo dodavanje se vrši uz stalno praćenje pH vrijednosti pH-metrom.

2.1.9. Priprava otopine fosfatnog pufera (0,05 M); pH 7,4

Dodavanjem 0,05 M otopine Na₂HPO₄ u otopinu 0,05 M otopinu NaH₂PO₄ prilagođava se pH do željene vrijednosti (pH = 7,4). Ovo dodavanje se vrši uz stalno praćenje pH vrijednosti pH-metrom.

2.1.10. Priprava otopine acetatnog pufera (0,5 M); pH 4,8

Dodavanjem koncentrirane otopine CH_3COOH u 0,5 M otopinu CH_3COONa prilagođava se pH do željene vrijednosti (pH = 4,8). Ovo dodavanje se vrši uz stalno praćenje pH vrijednosti pH-metrom.

2.2. Aparatura

Korištena je elektrokemijska ćelija sa srebro/srebro-kloridnom elektrodom (Radiometar XR 300 (3 M Ag/AgCl)) kao referentnom, platinskom pločicom kao protuelektrodom te elektrodom od ugljikove paste i dijamantnom elektrodom dopiranom borom kao radnim elektrodama.

Sva elektrokemijska mjerenja su izvršena s potenciostatom (Autolab PGSTAT 302N) spojenim na osobno računalo (PC), a kojim se upravlja pomoću NOVA 2.1 softwarea.

Za mjerenja je korišteno magnetno miješalo kako bi se osigurala homogenost otopine.

2.3. Priprava radnih elektroda

Ugljikova pasta pripravljena je iz grafitnog praha dodavanjem 360 μL parafinskog ulja po gramu praha. Miješana je ručno u tarioniku oko pola sata, odnosno dok se smjesa nije homogenizirala. Nakon postignute odgovarajuće konzistencije, pasta je stavljena na teflonski nosač s fiksiranim kontaktom od bakarne žice te je tako pripravljena elektroda polirana čistim bijelim papirom, kako bi se dobila glatka površina. Promjer površine elektrode iznosi 7 mm.

Dijamantna elektroda dopirana borom (BDDE) je kupljena od dobavljača Windsor Scientific, Berkshire, UK. Elektroda je prije uporabe nježno polirana tkaninom. Promjer površine elektrode iznosi 3 mm.

2.3.1. Imobilizacija DNA

Imobilizacija dsDNA na površinu elektrode izvršena je prema literaturi u 2 koraka [112, 113]:

- 1) pred-anodizacija elektrode pri +1,7 V u fosfatnom puferu (0,05 M, pH 7,4) 60 s bez miješanja
- 2) imobilizacija DNA u acetatnom puferu (0,5 M, pH 4,8) pri potencijalu od +0,5 V 300 s uz miješanje. Koncentracije DNA iznosile su 10, 100 i 500 mgL⁻¹.

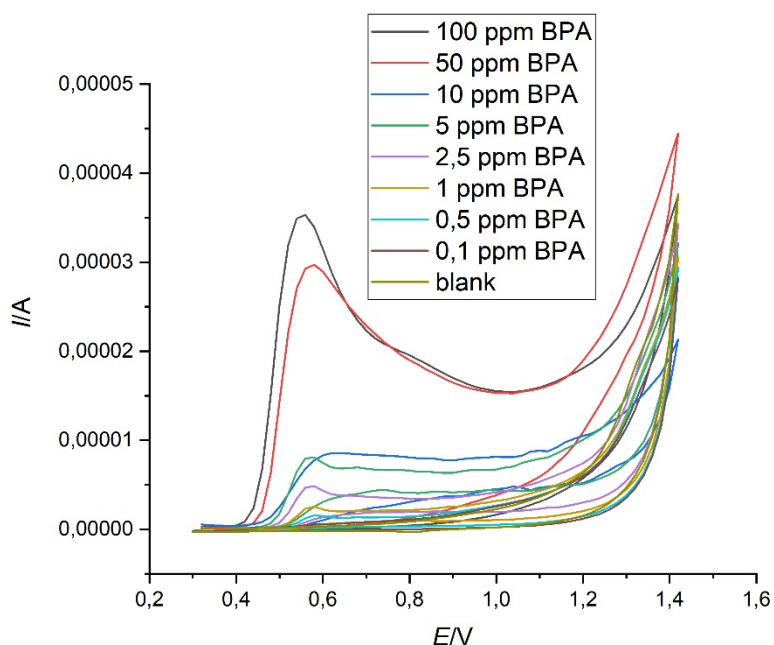
Nakon imobilizacije DNA, elektroda je prana u acetatnom puferu 10 s te premještena u ćeliju za mjerenje, koja je sadržavala 25 mL fosfatnog pufera (0,1 M, pH 7).

3. REZULTATI I RASPRAVA

Svi voltamogrami snimljeni su na obnovljenoj površini (u slučaju CPE). Snimljeni ciklički voltamogrami su voltamogrami jednog ciklusa. Sva mjerenja su vršena u otopini fosfatnog pufera (0,1 M) pri pH 7 u području potencijala od 0,3 do 1,4 V (obje elektrode) za cikličku voltametriju te u području potencijala od 0,3 do 1,4 V (CPE) i 0,3 do 2,0 V (BDDE) za diferencijalnu pulsnu voltametriju. Broj ciklusa je iznosi 1, „scan rate“ je je iznosio $0,1 \text{ Vs}^{-1}$ te „step potencijal“ 0,02 V.

Na osnovu pregledanih literaturnih podataka, kao i na osnovu uvida u mehanizam anodne oksidacije BPA na krutim elektrodama, kao pogodna pH odabrana je pH 7. Nadalje, u prilog odabiru ove pH vrijednosti ide i fiziološka pH vrijednost. Prema tome, svi ovdje prikazani rezultati su oni dobiveni pri pH 7.

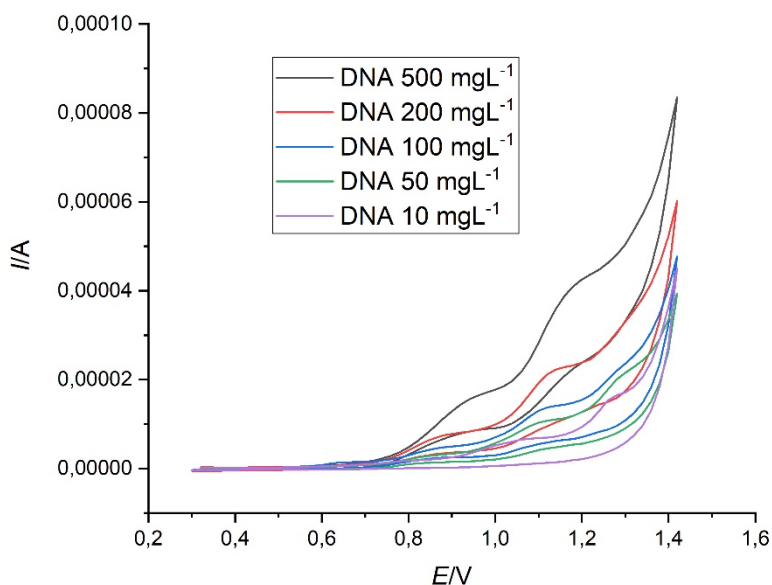
Na slici 18a₁ prikazani su ciklički voltamogrami CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA. Dobiveni voltamogrami pokazuju oksidacijski pik pri anodnim potencijalima između 0,4 i 0,6 V. Zanimljivo je da potencijal vršne struje „klizi“ ka katodnim područjima s povećanjem koncentracije BPA. Nije primijećena linearna ovisnost visine pika o koncentraciji BPA. Također, ciklički voltamogrami otkrivaju ireverzibilnost anodne oksidacije.



Slika 18a₁ – ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA u fosfatnom puferu

Imajući u vidu kemijsku interakciju BPA s DNA, kao i gore navedene rezultate, ideja ovog rada je koristeći ovu interakciju elektrokemijski odrediti koncentraciju BPA. Preliminarna istraživanja su usmjerena na elektrokemijsko ponašanje BPA u prisutnosti DNA.

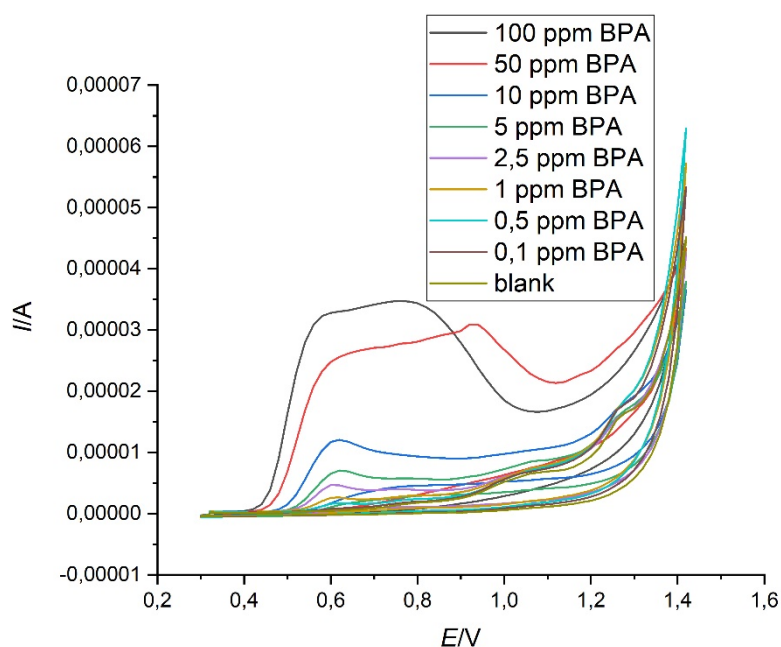
Za utvrđivanje elektrokemijskog ponašanja DNA na CPE snimani su ciklički voltamogrami CPE u ovisnosti o koncentraciji DNA. Dobiveni ciklički voltamogrami pokazuju pojavu dva anodna oksidacijska pika pri anodnim potencijalima oko 1 i 1,15 V. Ovi anodni pikovi mogu se pripisati oksidaciji gvanina te adenina slijedno. Kao i u slučaju BPA, elektrokemijsko ponašanje DNA je ireverzibilnog karaktera (slika 18a2). Uočeno ponašanje je u skladu s prethodnim izvješćima.



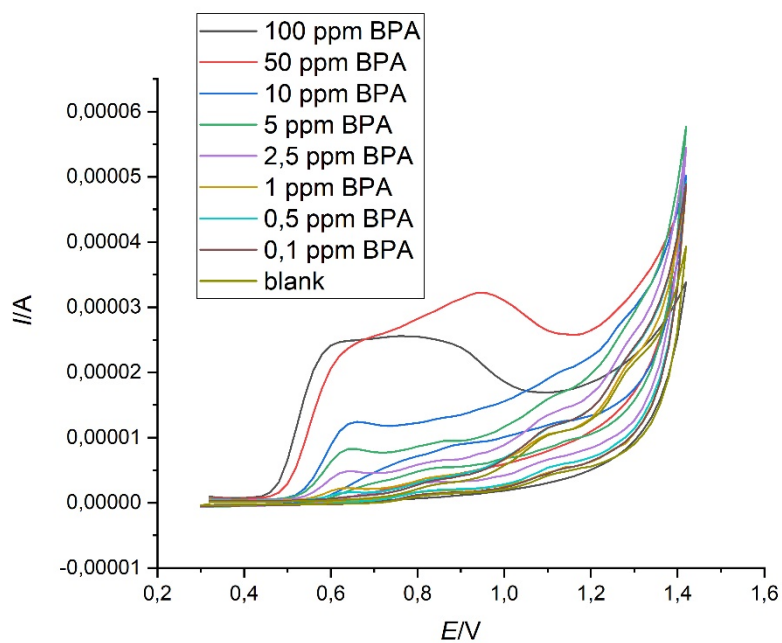
Slika 18a2 - ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji DNA u fosfatnom puferu

U ovu svrhu snimljeni su ciklički voltamogrami u ovisnosti o koncentraciji BPA pri stalnoj koncentraciji DNA. Snimljeni ciklički voltamogrami prikazani su slikama 18b-f. Zanimljivo je da pri najvećim koncentracijama BPA (50 ili 100 ppm) dolazi do širenja anodnog pika kroz cijelo područje potencijala od 0,5 do 0,8 V pri stalnoj koncentraciji DNA (10 mgL⁻¹). Ovo proširenje je veće s povećanjem koncentracije DNA u otopini. Moguće je nekoliko objašnjenja ovakvog ponašanja. Budući da se radi o jednoj vrsti kompleksnijih spojeva, razvučenost ovog pika može proizlaziti iz razloga difuzije BPA

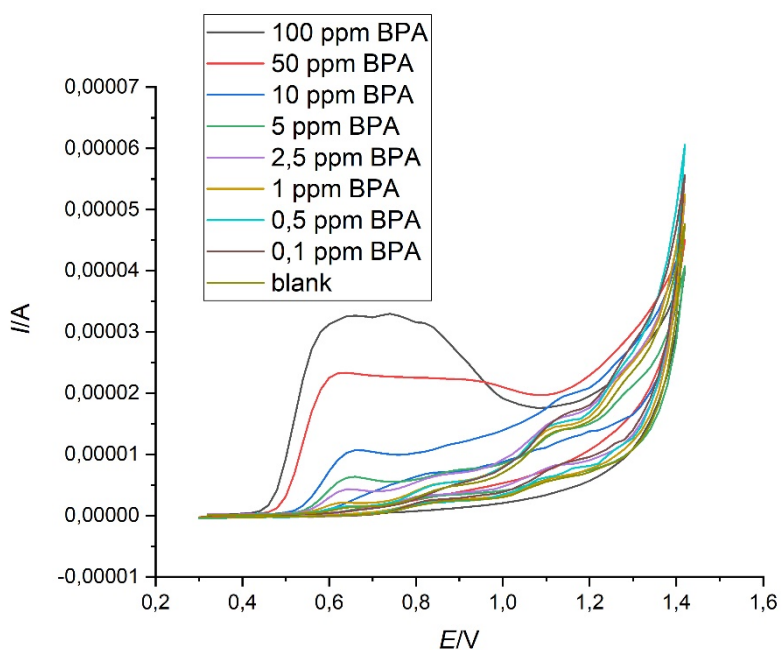
ka površini elektrode iz formiranog BPA-DNA kompleksa. U prilog ovome ide i činjenica da je pik razvučeniji s povećanjem koncentracije DNA. Ova anodna oksidacija je kontrolirana kinetikom raspada ovog kompleksa. Pri većim koncentracijama DNA (100, 200 i 500 mgL^{-1}) u cikličkim voltamogramima vidljivi su i dodatni pikovi na potencijalima veći od 1,3 V. Kao i u slučaju cikličkih voltamograma DNA na CPE ovi pikovi odgovaraju anodnoj oksidaciji purinskih baza. Nadalje, pri koncentraciji DNA od 10 mgL^{-1} vidljiva je mnogo veća raširenost pika pri nižim koncentracijama BPA (0,1-10 ppm). Ovo sugerira „formiranje kompleksa sa stehiometrijom 1:1“, što je u skladu s dobivenim rezultatima za koncentraciju BPA od 100 ppm pri različitim koncentracijama DNA (slike 18b-f).



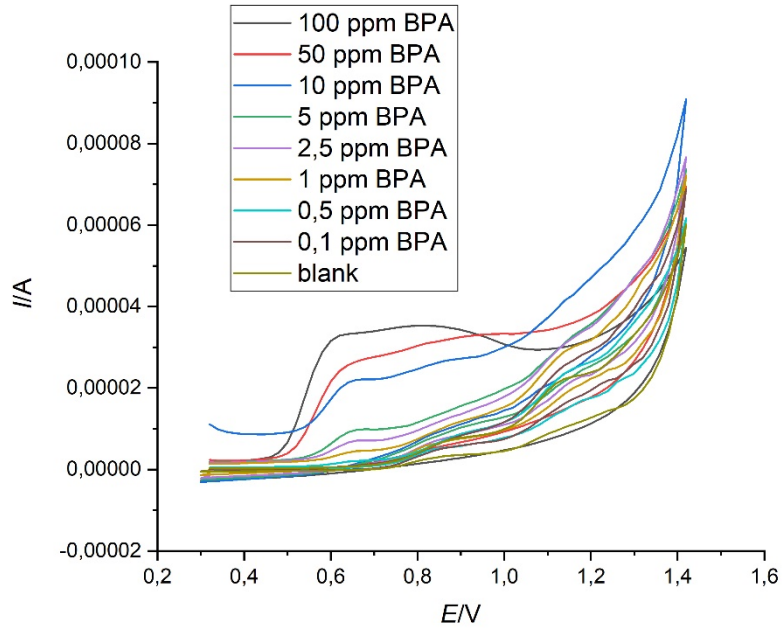
Slika 18b - ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 10 mgL^{-1}



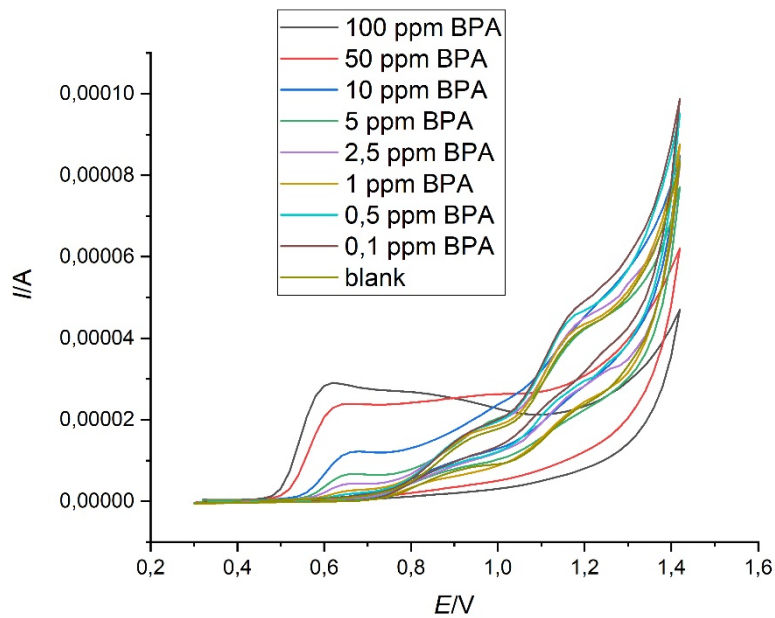
Slika 18c - ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 50 mgL^{-1}



Slika 18d - ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 100 mgL^{-1}

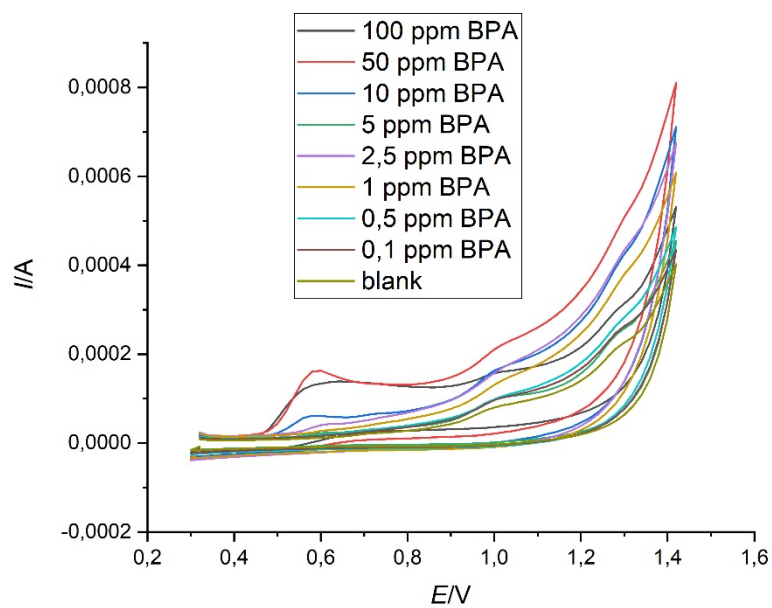


Slika 18e - ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 200 mgL⁻¹

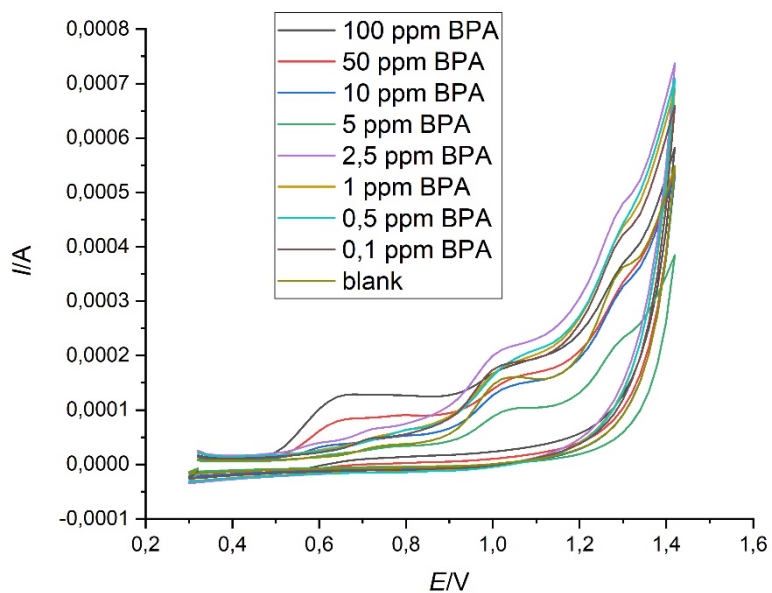


Slika 18f - ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 500 mgL⁻¹

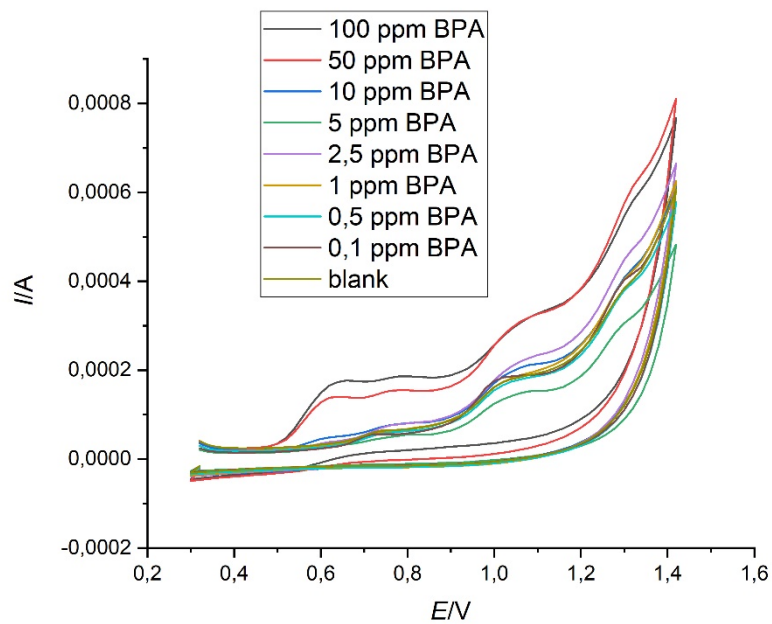
Na osnovu prethodnih razmatranja istraživanje je usmjereno ka mogućnosti formiranja kompleksa DNA-BPA na elektroaktivnoj površini. U ovu svrhu, na površinu CPE imobilizirana je DNA (kako je navedeno u poglavlju 2.3.1.). Ciklički voltamogrami dobiveni s ovako modificiranim elektrodama prikazani su na slikama 19a-e. Kao što je i očekivano, pikovi karakteristični za oksidaciju purinskih baza su vidljiviji s porastom koncentracije DNA na površini CPE (iza 1 V). Može su uočiti slično ponašanje kao i u slučaju kada su ciklički voltamogrami snimljeni u otopini koja je sadržavala DNA i BPA, glede anodnog oksidacijskog pika pri oko 0,5 V. Ove struje su, za razliku od slučaja kada se radilo o anodnoj oksidaciji DNA i BPA iz otopine, za red veličine veće vrijednosti. Ovo sugerira veću koncentraciju BPA na/pri površini CPE, što govori u prilog povećanoj koncentraciji BPA-DNA kompleksa. Nadalje, pri višim koncentracijama imobilizirane DNA (100, 200 i 500 mgL⁻¹) vidljiva je pojava trostrukog pika na potencijalima 0,8; 1,1 i 1,3 V. Pojava ovih pikova nije znatno utjecala na anodni pik oksidacije BPA pri oko 0,6 V. Sve ovo upućuje na oksidaciju BPA iz kompleksa formiranog na površini CPE nakon čega slijedi oksidacija imobiliziranog DNA. Sve ove reakcije su dakle vezane za reakcije s površine elektrode. Prema tome, ovakav pristup ima za posljedicu veću osjetljivost spram BPA, ali i veće osnovne struje koje su ponajviše posljedica oksidacijskog procesa adsorbiranog DNA. Kao posljedica adsorpcije DNA na površinu CPE, veće su i pseudokapacitivne struje, koje su posljedica anodnih procesa tijekom cijele anodne grane cikličkog voltamograma.



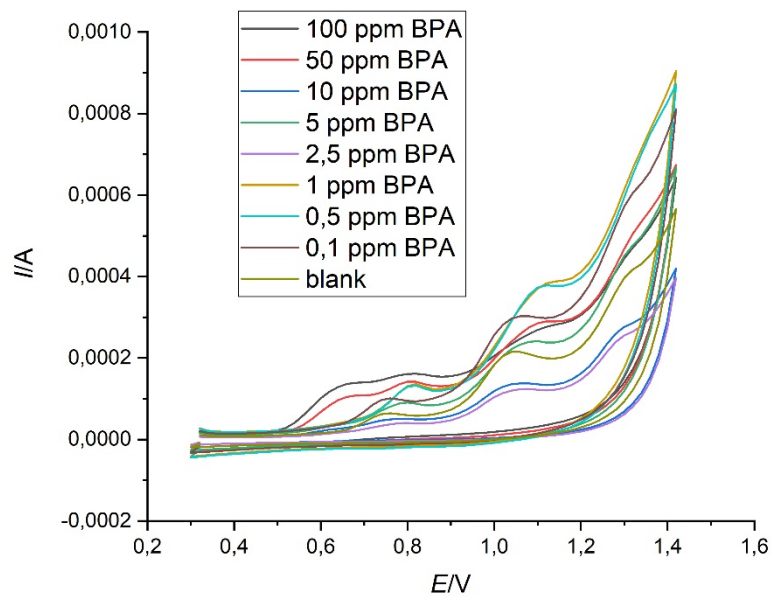
Slika 19a - ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji imobilizirane DNA 10 mgL^{-1}



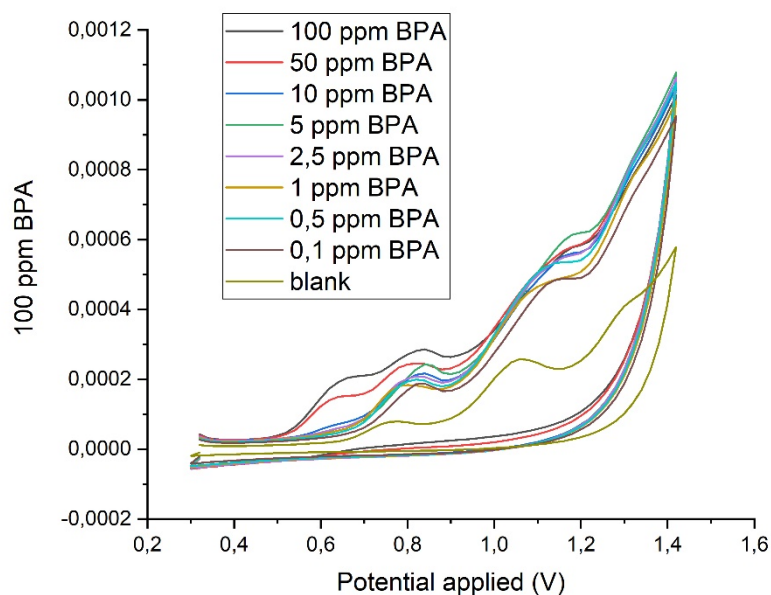
Slika 19b - ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji imobilizirane DNA 50 mgL^{-1}



Slika 19c - ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji imobilizirane DNA 100 mgL⁻¹



Slika 19d - ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji imobilizirane DNA 200 mgL⁻¹

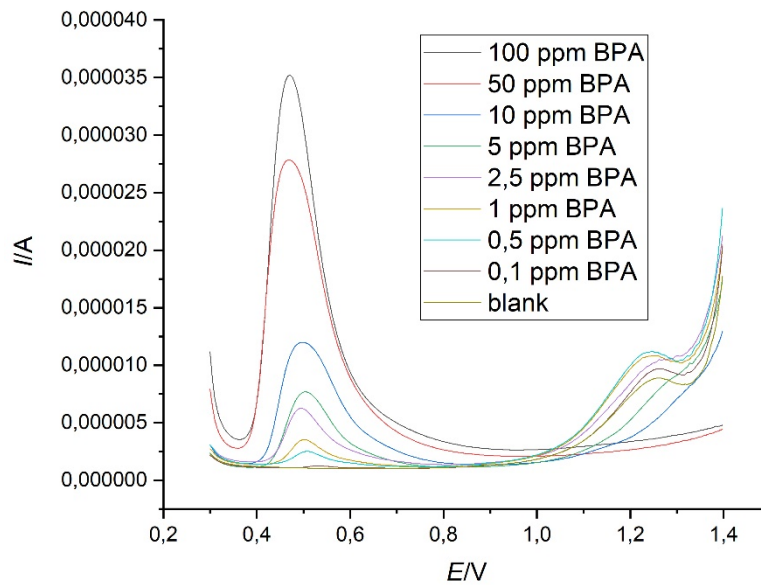


Slika 19e - ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji imobilizirane DNA 200 mgL^{-1}

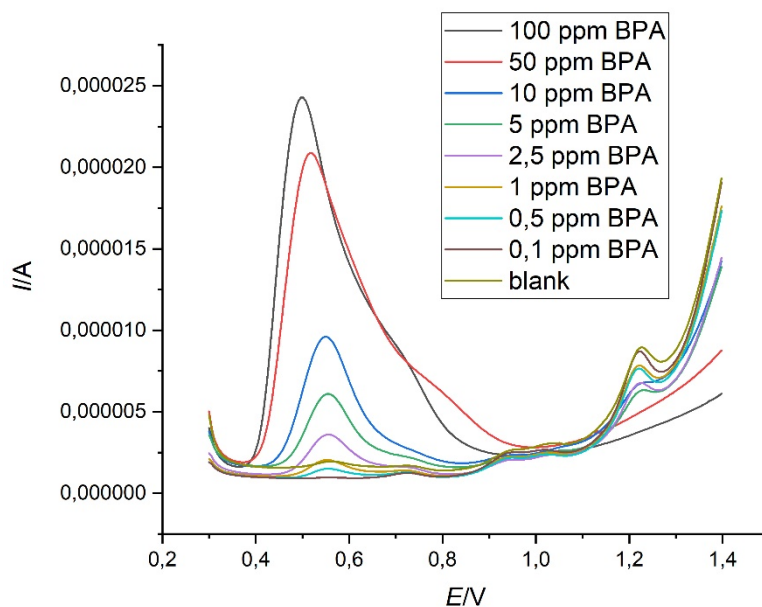
S obzirom na gore izložene rezultate, radi razjašnjenja elektrokemijskog odziva i dobivanja što jasnijeg uvida u anodne procese koji se događaju, a da se pri tom smanji utjecaj pozadinskih struja (osnovnih i pseudokapacitivnih) snimani su voltamogrami tehnikom diferencijalne pulsne voltometrije (DPV). Snimljeni voltamogrami pri različitim koncentracijama BPA, a konstantnim koncentracijama DNA prikazani su na slikama 20b-f.

Na slici 20a prikazani su voltamogrami nemoificirane CPE u ovisnosti o dodanom BPA. Vidljiv je porast anodnog pika na $0,4 \text{ V}$, koji raste s dodatkom BPA. Ovo upućuje na anodnu oksidaciju BPA (prema reakciji gore navedenoj). Primjećuje se i pojava dodatnog anodnog pika na $+1,2 \text{ V}$ pri nižim koncentracijama BPA i čak kada on nije prisutan. Ovaj anodni proces može se pripisati anodnoj oksidaciji CPE i stvaranju aktivnih C-O skupina. Ovaj proces nije bio vidljiv u cikličkim voltamogramima, npr. slike 17a-f, zbog primijenjene metode. U prilog ovom procesu ide i činjenica smanjivanja te konačno nestanka ovog pika s dodatkom BPA. Ovo sugerira akumulaciju produkata anodne oksidacije na površini elektrode, što blokira kontakt elektrolitne otopine s površinom CPE te je na takav način aktivira. Ovo posebno dobiva na težini s obzirom na činjenicu da se površina prije svakog mjerenja obnovila. Ovakvo ponašanje je vidljivo i za mjerenja urađena uz stalnu koncentraciju DNA (slike 20b-f), s tim da se pri višim koncentracijama

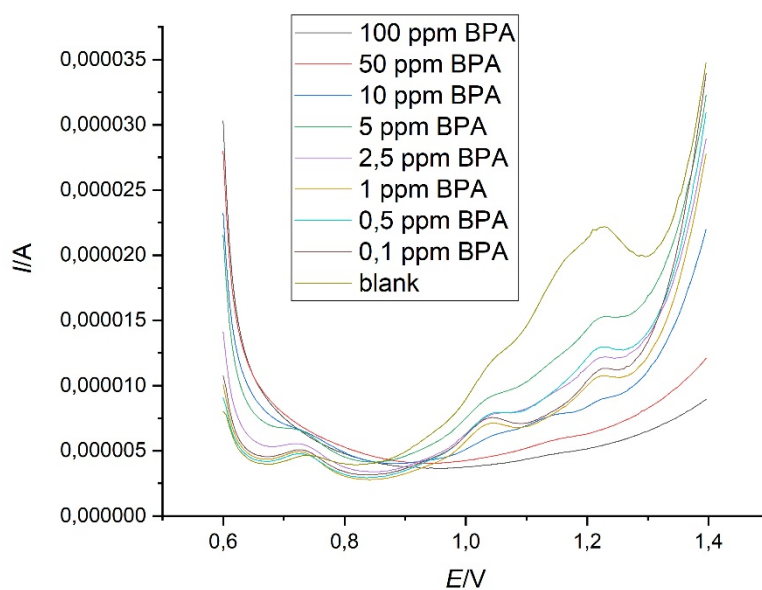
DNA ovaj anodni pik nastavlja na oksidacijski pik karakterističan za oksidaciju purinskih baza. No, bez obzira na prisutan DNA, oba anodna pika (onaj na 1,1 V te onaj na 1,2 V) nestaju pri višim koncentracijama BPA. Nadalje, uz nekoliko iznimaka (za 100 i 500 mgL⁻¹ DNA) porastom koncentracije DNA anodni pika na 0,5 V postaje sve manji, što upućuje na manju osjetljivost elektrode prema BPA kao posljedica kompleksiranja BPA-DNA.



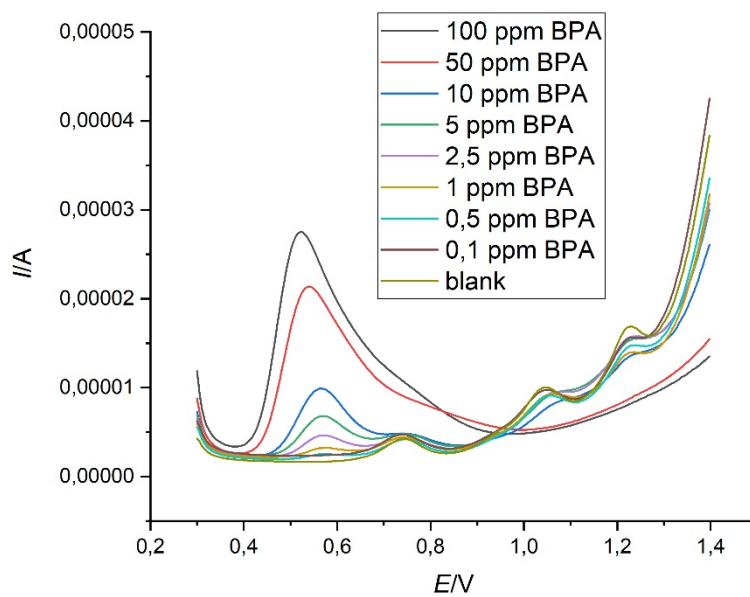
Slika 20a - DP voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA u puferu



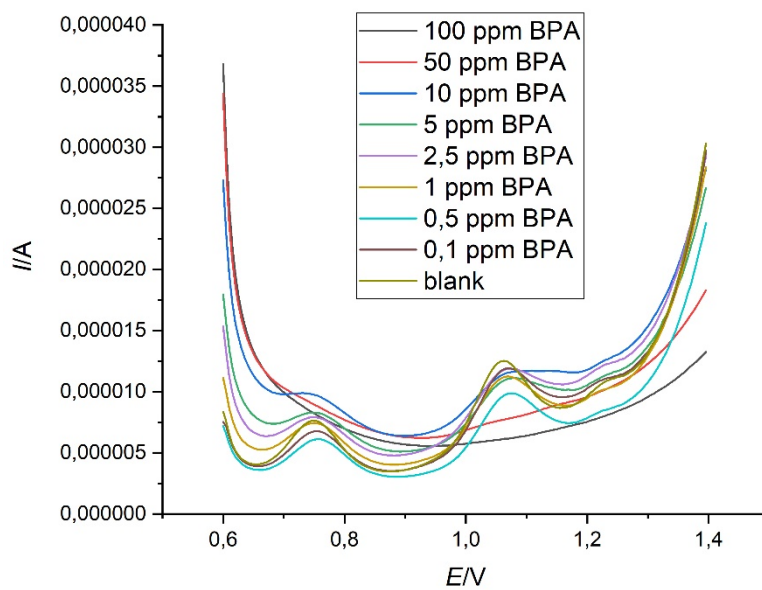
Slika 20b - ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 10 mgL^{-1}



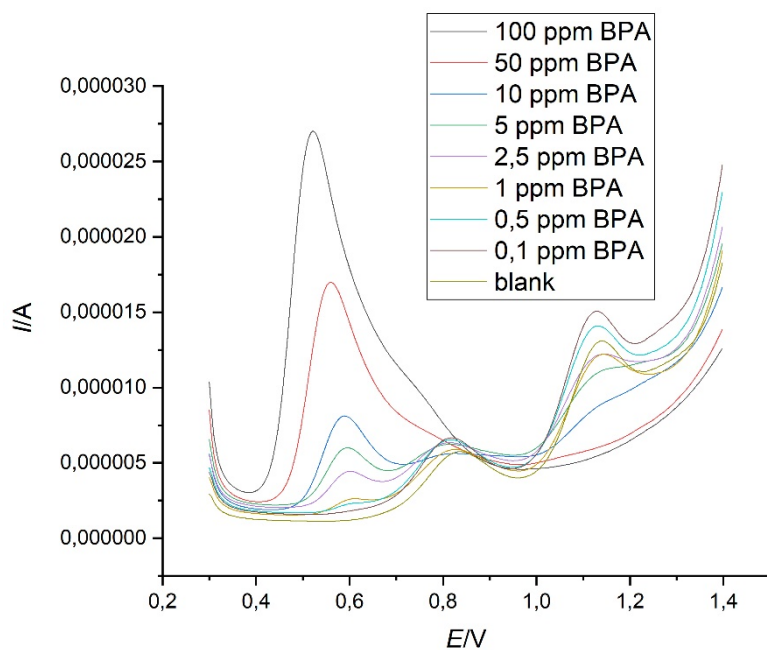
Slika 20c - ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 50 mgL^{-1}



Slika 20d - ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 100 mgL⁻¹

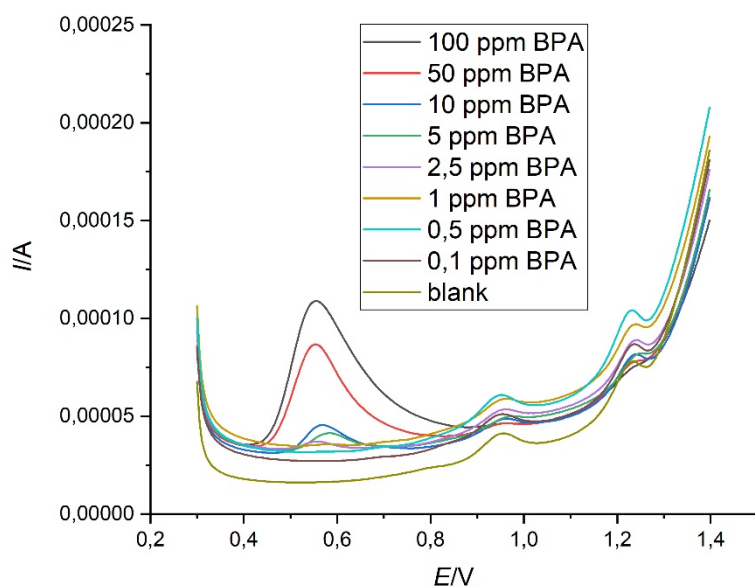


Slika 20e - ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 200 mgL⁻¹

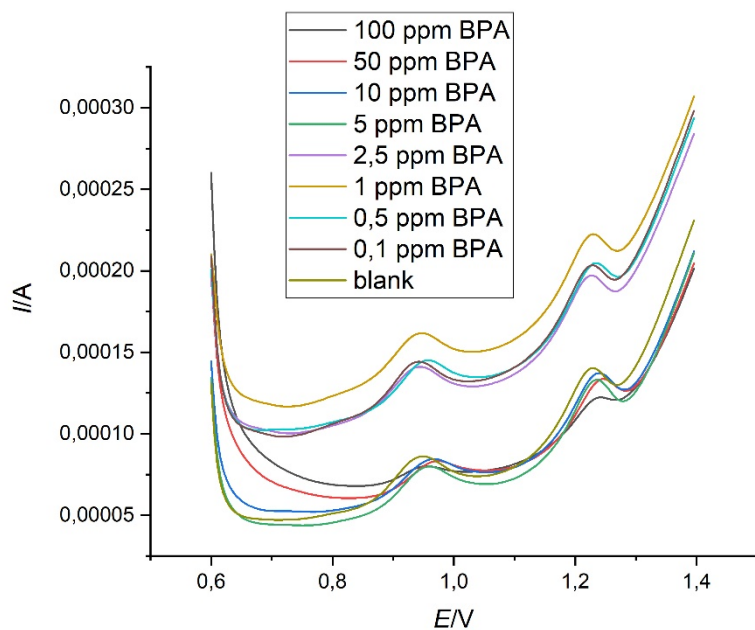


Slika 20f - ciklički voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 500 mgL^{-1}

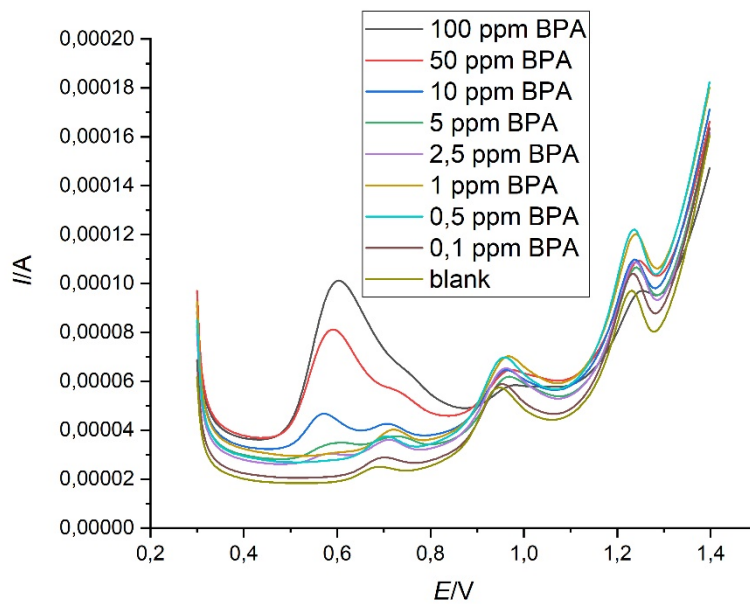
Kao i u slučaju cikličke voltometrije DP voltamogrami (slike 21a-e) u slučaju kada je DNA imobilizirana na površinu CPE pokazuju znatno veću osjetljivost (red veličine) prema BPA. No, vidljivo je da povećanjem količine imobilizirane DNA na površini elektrode ili rastu osnovne struje ili pada osjetljivost prema BPA. Kao i u prethodnim slučajevima vidljivi su pikovi karakteristični za oksidaciju DNA, koji postaju istaknutiji kako raste njegova koncentracija na površini.



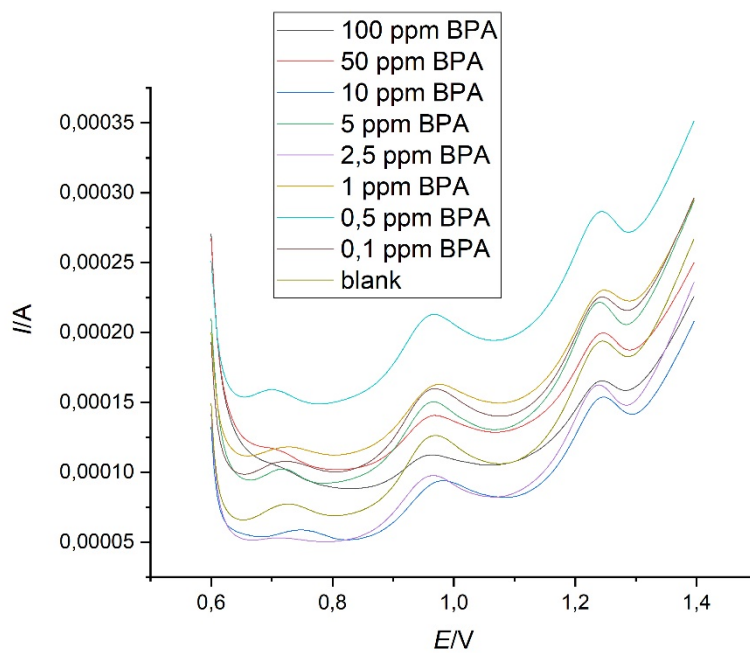
Slika 21a – DP voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji imobilizirane DNA 10 mgL⁻¹



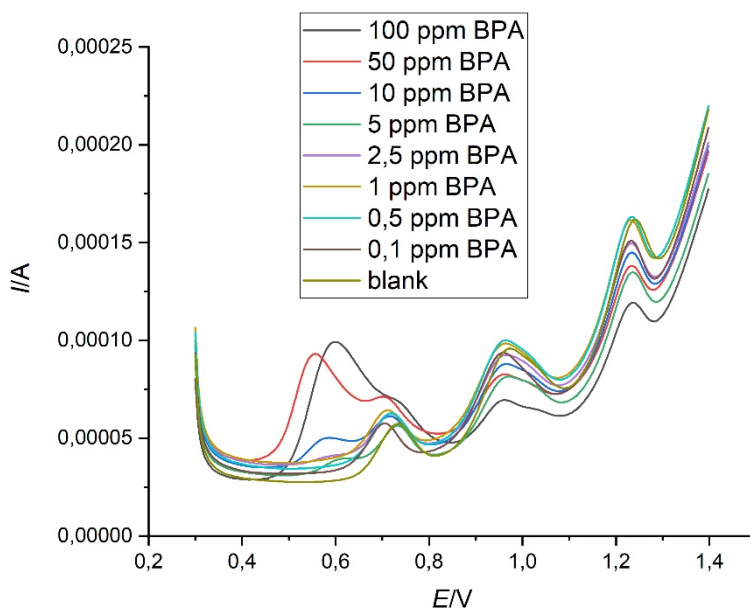
Slika 21b - DP voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji imobilizirane DNA 50 mgL⁻¹



Slika 21c - DP voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji imobilizirane DNA 100 mgL⁻¹

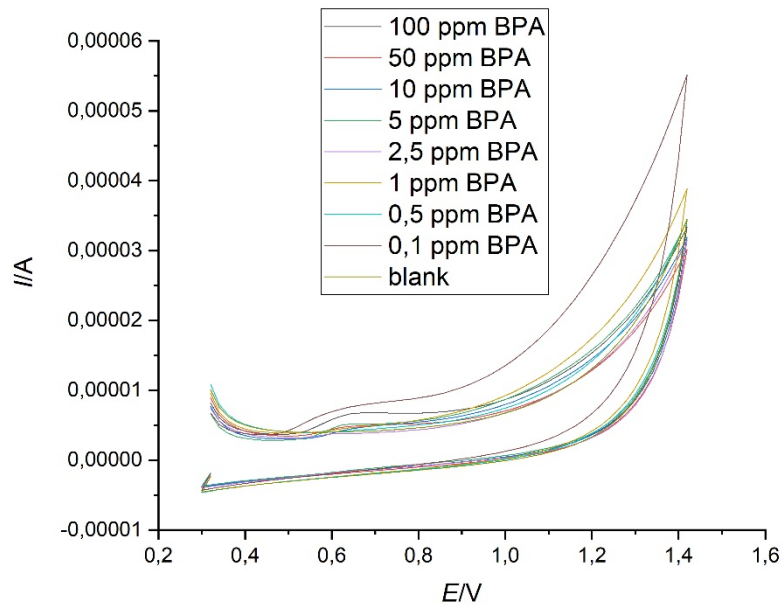


Slika 21d - DP voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji imobilizirane DNA 200 mgL⁻¹

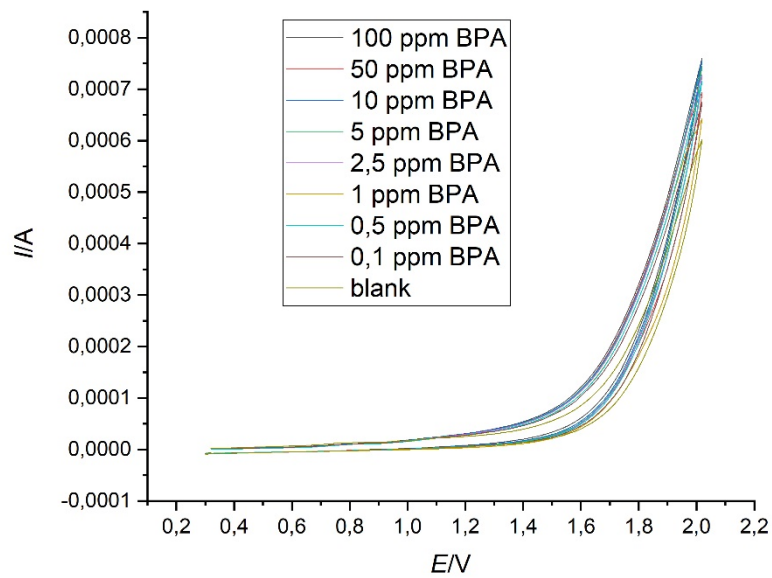


Slika 21e - DP voltamogrami na CPE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji imobilizirane DNA 500 mgL^{-1}

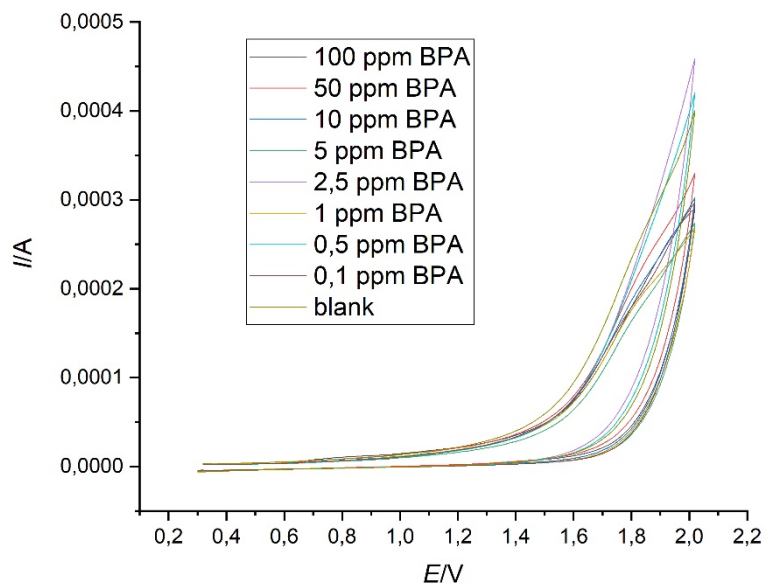
Kao što je i spomenuto u općem dijelu, BDDE imaju prednost nad ostalim materijalima temeljenim na ugljiku u pogledu širokog područja potencijala. S obzirom na primijećene anodne procese na CPE, kao potencijalna elektroda za ispitivanje elektrokemijskog ponašanja BPA u prisutnosti DNA, odabrana je BDDE. Preliminarna istraživanja rađena su snimanjem cikličkih voltamograma pri identičnim uvjetima kao i u slučaju CPE (slika 22a-c). Dobiveni ciklički voltamogrami nisu pokazivali nikakve promjene dodatkom BPA, bilo uz konstantnu koncentraciju DNA, bilo uz imobiliziranu DNA na površinu BDDE. Ovo je vrlo iznenađujuće imajući u vidu prethodna izvješća. Mogući razlog ovakve inertnosti leži u tome da je BDDE upotrijebljena bez prethodnog adekvatnog elektrokemijskog pred-tretmana.



Slika 22a - ciklički voltamogrami na BDDE u ovisnosti o koncentraciji BPA u puferu

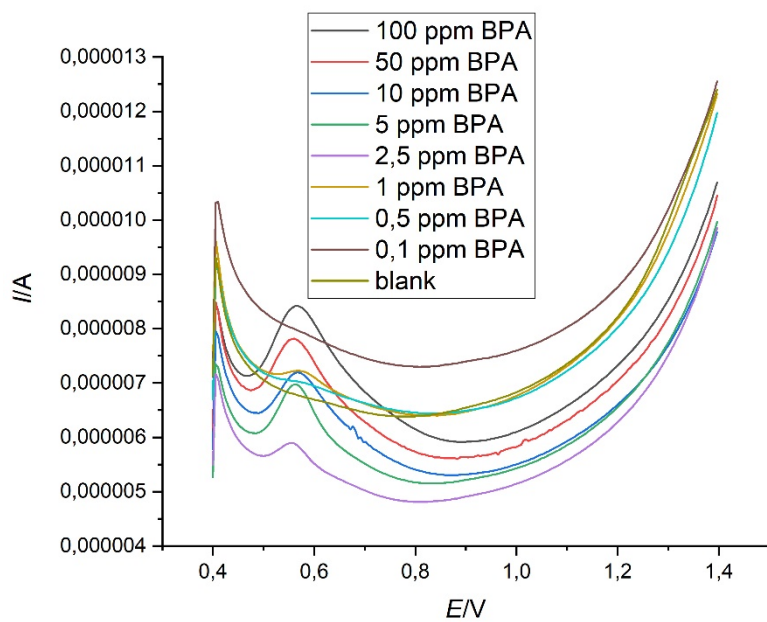


Slika 22b – ciklički voltamogrami na BDDE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 500 mgL^{-1}

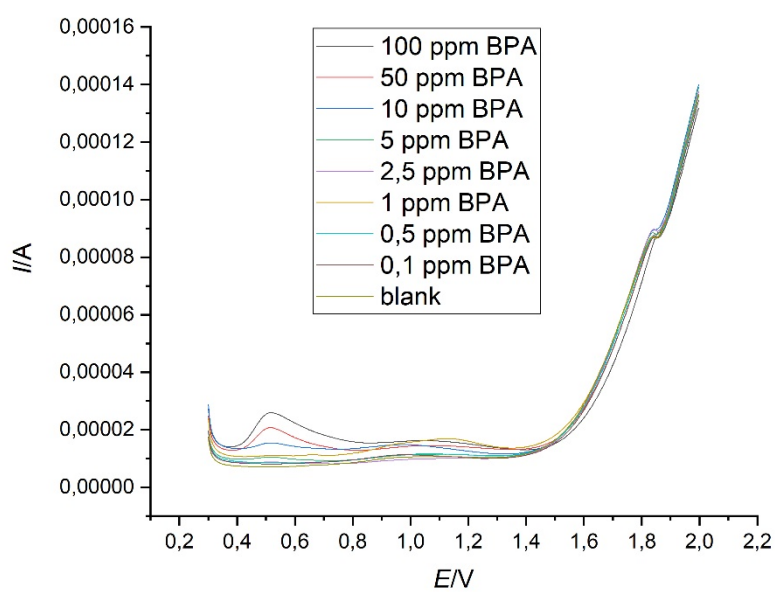


Slika 22c - ciklički voltamogrami na BDDE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji imobilizirane DNA 500 mgL^{-1}

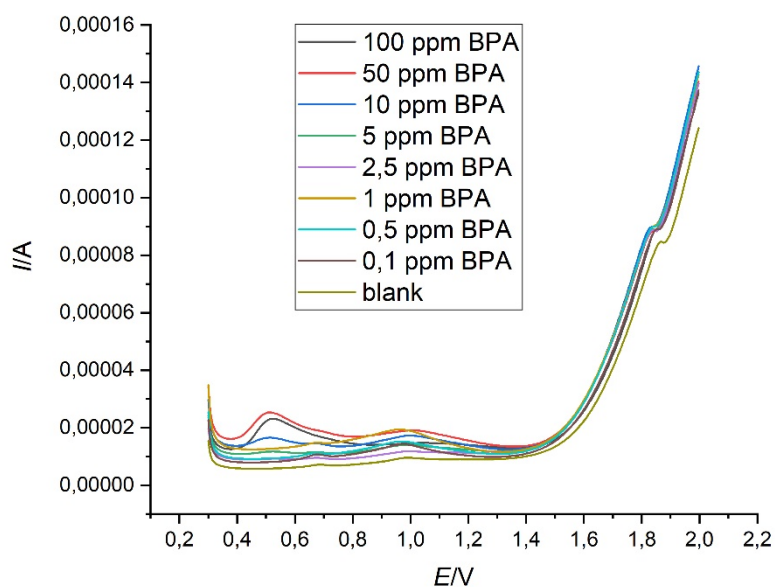
Ipak se mogu vidjeti naznake nekih elektrokemijskih procesa kada je umjesto cikličke voltametrije upotrijebljena DPV. DP voltamogrami za BDDE u prisutnosti različitih koncentracija BPA uz stalnu koncentraciju DNA prikazani su na slici (23a-f). Iz voltamograma se mogu razlučiti anodni procesi karakteristični za anodnu oksidaciju BPA pri 0,5 V. Ovi odzivi nisu bili linearni s koncentracijom BPA i pokazivali su velike razlike u osnovnim strujama.



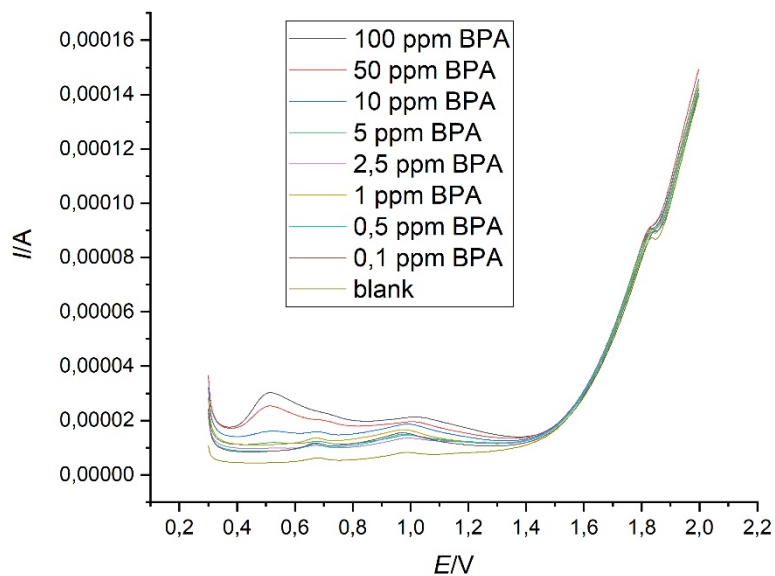
Slika 23a – DP voltamogrami na BDDE u ovisnosti o koncentraciji BPA u puferu



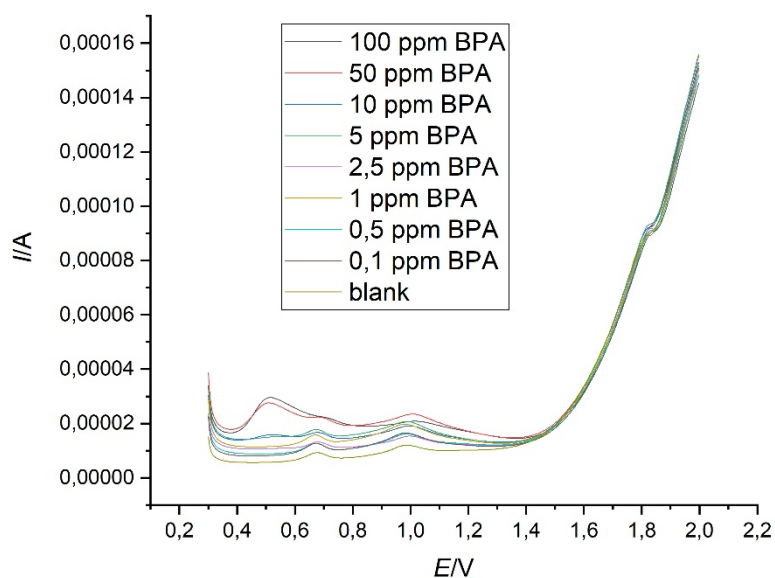
Slika 23b - DP voltamogrami na BDDE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 10 mgL^{-1}



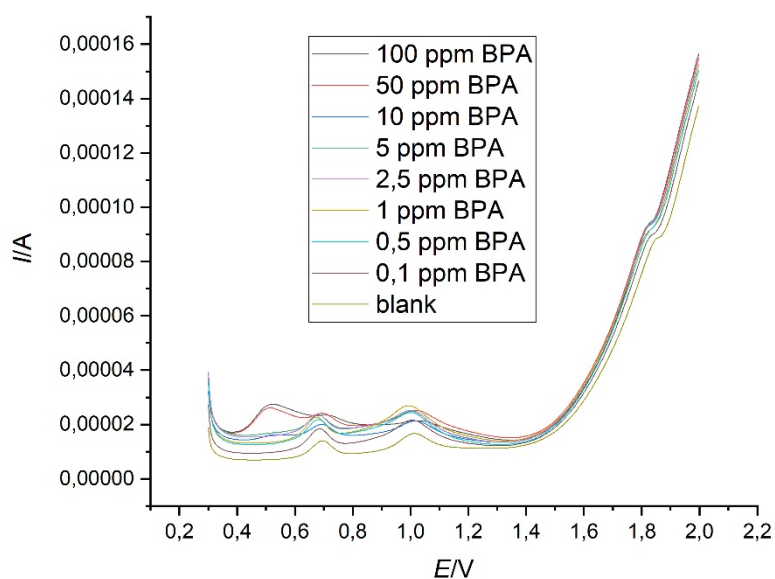
Slika 23c - DP voltamogrami na BDDE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 50 mgL^{-1}



Slika 23d - DP voltamogrami na BDDE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 100 mgL^{-1}



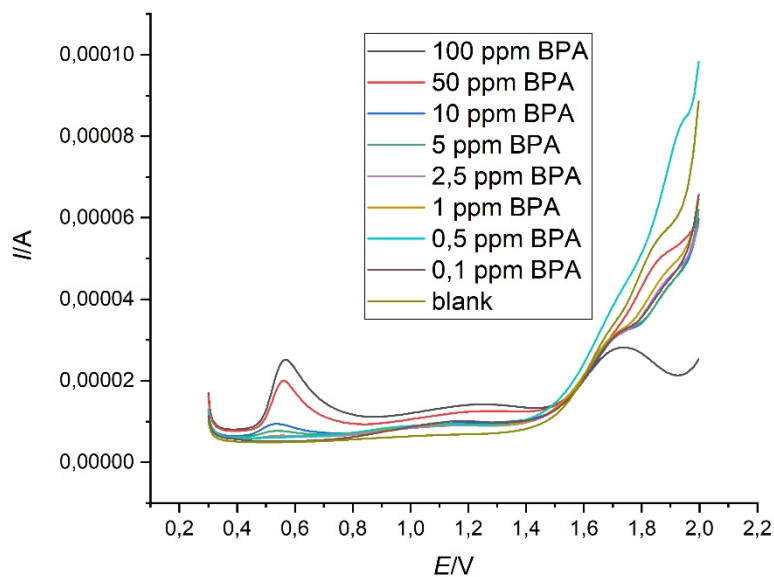
Slika 23e - DP voltamogrami na BDDE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 200 mgL⁻¹



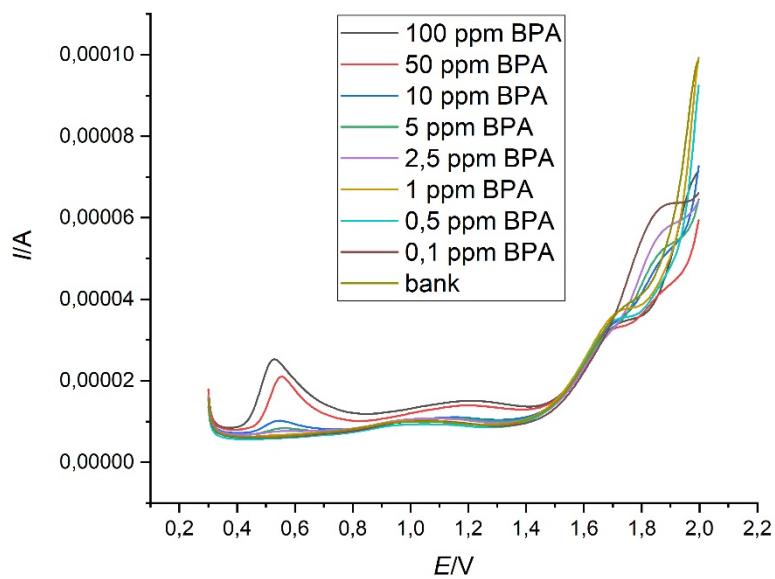
Slika 23f - DP voltamogrami na BDDE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 500 mgL⁻¹

Analogno prethodnim mjerenjima, također su snimljeni DP voltamogrami s prethodno imobiliziranom DNA na BDDE u ovisnosti o koncentraciji BPA (slika 24a-e). U ovom

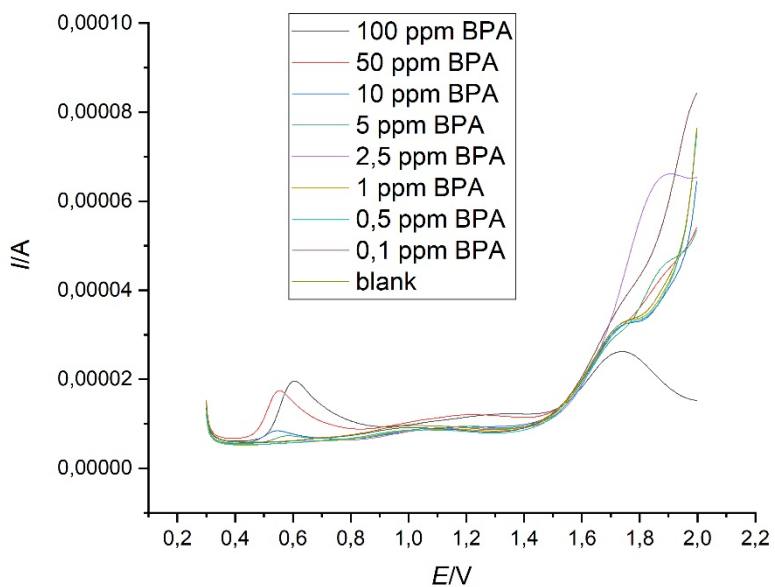
slučaju osjetljivost ovako pripravljene elektrode javlja se tek pri višim koncentracijama BPA (50 i 100 ppm). Također nisu uočeni karakteristični oksidacijski pikovi za DNA kao na CPE. Na osnovu svega goreg iznesenog za BDDE može se zaključiti da je jedan od važnijih faktora elektrokemijskog ponašanja BDDE u prisutnosti DNA i BPA, njena elektrokemijska priprema.



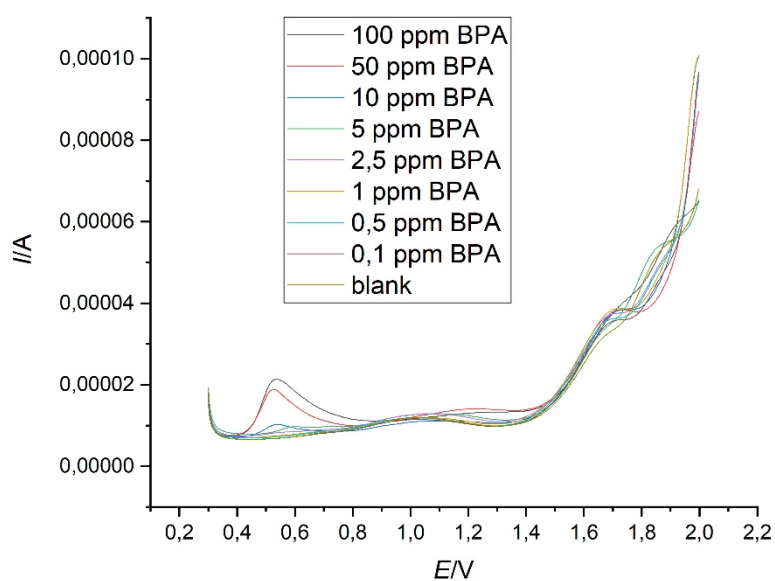
Slika 24a - DP voltamogrami na BDDE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji imobilizirane DNA 10 mgL^{-1}



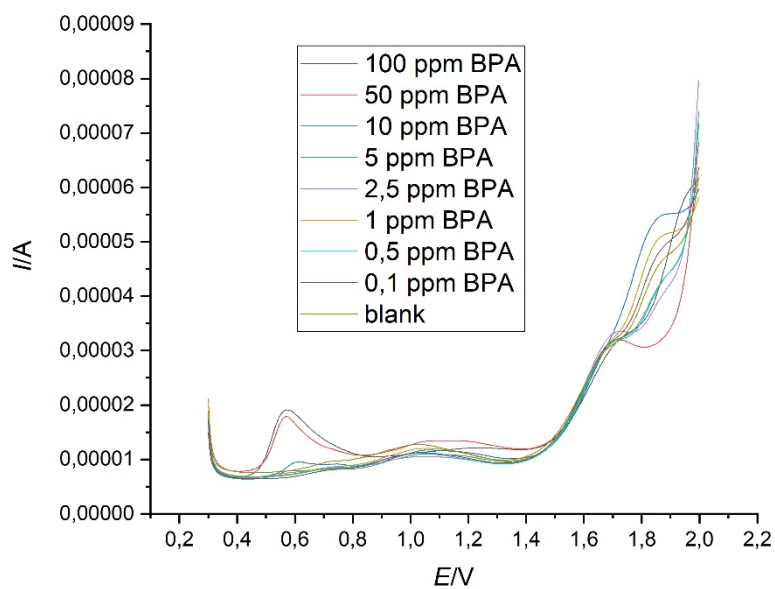
Slika 24b - DP voltamogrami na BDDE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji imobilizirane DNA 50 mgL^{-1}



Slika 24c - DP voltamogrami na BDDE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji imobilizirane DNA 100 mgL^{-1}



Slika 24d - DP voltamogrami na BDDE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji imobilizirane DNA 200 mgL^{-1}



Slika 24e - DP voltamogrami na BDDE u ovisnosti o koncentraciji BPA pri koncentraciji DNA 500 mgL^{-1}

4. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je razvoj pogodnog DNA-biosenzora, koji bi stupao u interakciju s bisfenolom A te utvrđivanje može li se ovakva vrsta interakcije određivati voltametrijskim metodama.

Rezultati mjerenja za elektrodu od ugljikove paste pokazali su da postoji neki odziv na vrste prisutne u otopini prilikom mjerenje. Međutim, budući da isti ne karakterizira skoro pa nikakva linearnost te postoje signali koji se ne poklapaju s literaturom iako se čini da do neke interakcije ipak dolazi. Prema navedenom, može se zaključiti da je potrebno istraživanje usmjeriti u smjeru optimiziranja aktivne površine elektrode te uporabe drugog načina modificiranja iste.

Slično je i kod dijamantne elektrode dopirane borom. Ciklički voltamogrami nisu pokazali nikakav značajan odziv. S druge strane diferencijalni pulsni voltamogrami pokazali su neke vidljive pikove, ali ne i one koji su karakteristični za vrste prisutne u otopini (DNA). Stoga je zaključak da treba pomno proučiti metode pred-tretmana elektrodne površine, a s time i razmotriti uporabu drugačijih načina modifikacije elektrodne površine, odnosno imobilizacije DNA.

5. LITERATURA

- [1] P. Gründler, *Chemical Sensors, An Introduction for Scientists and Engineers*, Springer, Berlin, **2007**, p. 273.
- [2] F. G. Bânică, *Chemical Sensors and Biosensors, Fundamentals and Applications*, (Eds.: A. G. Fogg), Wiley, United Kingdom, **2012**, p. 569.
- [3] A. Hulanicki, S. Geab, F. Ingman, IUPAC, *Pure & Appl. Chem.*, **1991**, 63, 1247.
- [4] I. Piljac, *Elektroanalitičke metode - Teorijske osnove, mjerne naprave i primjena*, RMC, Zagreb, **1995**, p. 409.
- [5] D. Krivić, *Elektrokemijsko ponašanje L-cisteina na miješanim srebro-bakrovim sulfidima u svrhu analitičke primjene*, završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, **2016**, p 44.
- [6] H. H. Girault, *Analytical and Physical Electrochemistry*, EPFL Press, Lausanne, **2004**, p. 431.
- [7] M. Vuko, *Elektrokemijsko ponašanje L-cisteina na elektrodama od ugljikove paste modificiranim srebro-bakrovim sulfidima*, diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, **2017**, p 60.
- [8] J. Barbarić, *Određivanje tiola u vodenim otopinama elektrokemijskim metodama*, završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, **2012**, p 54.
- [9] A. Glibo, *Priprava grafenov oksid/o-fenilendiamin kompozitnih elektroda*, diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, **2016**, p. 91.
- [10] V. Grilj, *Ispitivanje i razvoj tankih dijamanitnih detektora*, doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, **2015**, p.101.
- [11] R. L. McCreery, *Chem. Rev.*, **2008**, 108, 2646.
- [12] F. P. Bundy, H. T. Hall, H. M. Strong, R. H. Wentorf, *Nature*, **1955**, 176, 51.
- [13] J. Macpherson, *Phys.Chem.Chem.Phys.*, **2015**,17, 2935.
- [14] A. Medel, E. Bustos, L. M. Apátiga, Y. Meas, *Electrocatalysis*, **2013**, 4, 189.
- [15] K. Peckova, J. Musilová, J. Barek, *Anal. Chem.*, **2009**, 39, 148.
- [16] J. E. Butler, Y. A. Mankelevich, A. Cheesman, J. Ma, M. N. R. Ashfold, *J.Phys.:Condens. Matter*, **2009**, 21, 364201.
- [17] O. A. Williams, *Diamond Relat. Mater.*, **2011**, 20, 621.
- [18] P. W. May, Y. A. Mankelevich, *J. Phys. Chem. C*, **2008**,112, 12432.
- [19] N. R. Wilson, S. L. Clewes, M. E. Newton, P. R. Unwin, J. V. Macpherson, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 5639.
- [20] F. P. Bundy, *J. Chem. Phys.*, **1963**, 38, 631.
- [21] J. P. Lagrange, A. Deneuve, E. Gheeraert, *Diamond Relat. Mater.*, **1998**, 7, 1390.
- [22] K. Gelderman, L. Lee, S. W. Donne, *J. Chem. Educ.*, **2007**, 84, 685.

- [23] <https://www.sensorsmag.com/components/practical-electrochemical-sensors-using-boron-doped-diamond-bdd-diamond-electrodes> (preuzeto: 21.9.2018.)
- [24] A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 7559.
- [25] L. A. Hutton, J. G. Iacobini, E. Bitziou, R. B. Channon, M. E. Newton, J. V. Macpherson, *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 7230.
- [26] A. F. Azevedo, M. R. Baldan, N. G. Ferreira, *J. Phys. Chem. Solids*, **2013**, 74, 599.
- [27] F. Maier, M. Riedel, B. Mantel, J. Ristein, L. Ley, *Phys. Rev. Lett.*, **2000**, 85, 3472.
- [28] J. Ristein, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2006**, 39, R71.
- [29] J. Ristein, *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.*, **2006**, 82, 377.
- [30] H. Kawarada, *Surf. Sci. Rep.*, **1996**, 26, 205.
- [31] R. Boukherroub, X. Wallart, S. Szunerits, B. Marcus, P. Bouvier, M. Mermoux, *Electrochem. Commun.*, **2005**, 7, 937.
- [32] S. Szunerits & R. Boukherroub, *J Solid State Electrochem.*, **2008**, 12, 1205.
- [33] D. A. Tryk, Y. Einaga, K. Tsunozaki, T. N. Rao, A. Fujishima, *Diamond Relat. Mater.*, **2001**, 10, 1804.
- [34] Y. E. A. Fujishima, T. R. Rao, D. A. Tryk, *Diamond Electrochemistry*, Elsevier, **2005**. p. 595.
- [35] I. Duo, C. Levy-Clement, A. Fujishima, C. Comninellis, *J. Appl. Electrochem.*, **2004**, 34, 935.
- [36] H. Notsu, I. Yagi, T. Tatsuma, D. A. Tryk, A. Fujishima, *J. Electroanal. Chem.*, **2000**, 492, 31.
- [37] H. A. Girard, N. Simon, D. Ballutaud, E. de La Rochefoucauld, A. Etcheberry, *Diamond Relat. Mater.*, **2007**, 16, 888.
- [38] C. H. Goeting, F. Marken, A. Gutierrez-Sosa, R. G. Compton, J. S. Foord, *Diamond Relat. Mater.*, **2000**, 9, 390.
- [39] M. C. Granger, G. M. Swain, *J. Electrochem. Soc.*, **1999**, 146, 4551.
- [40] H. B. Suffredini, V. A. Pedrosa, L. Codognoto, S. A. S. Machado, R. C. Rocha-Filho, L. A. Avaca, *Electrochim. Acta*, **2004**, 49, 4021.
- [41] R. Hoffmann, A. Kriele, H. Obloh, J. Hees, M. Wolfer, W. Smirnov, N. Yang, C. E. Nebel, *Appl. Phys. Lett.*, **2010**, 97, 073117.
- [42] S. R. Waldvogel, A. Kirste and S. Mentizi, *Synthetic Diamond Films*, John Wiley & Sons, Inc., **2011**, ch. 19, pp. 483–510.
- [43] https://www.sbpmat.org.br//9encontro/especific_files/papers/A558.pdf (preuzeto: 23.9.2018.)
- [44] S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, *Electrochim. Acta*, **2010**, 55, 4599.
- [45] S.C.B. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, *J. Electroanal. Chem.*, 2010, 648, 60.
- [46] R. Trouillon, Y. Einaga, M. A.M. Gijs, *Electrochem. Commun.*, **2014**, 47, 92.

- [47] E. Fortin, J. Chane-Tune, D. Delabouglise, P. Bouvier, T. Livache, P. Mailley, B. Marcus, M. Mermoux, J.P. Petit, S. Szunerits, E. Vieil, *Electroanalysis*, **2005**, 17, 517.
- [48] Group of authors, *Diamond Electrochemistry*, Elsevier Science, **2005**, p. 586.
- [49] P.A. Michaud, M. Panizza, L. Ouattara, T. Diaco, G. Foti, Ch. Comninellis, *J Appl. Electrochem.*, **2003**, 33, 151.
- [50] G. Sineć, I. Duo, B. EL Roustom, G. Foti, Ch. Comninellis, *J Appl. Electrochem.*, **2006**, 36, 847.
- [51] M. Behul, M. Vojs, M. Marton, P. Michniak, M. Kurniawan, R. Peipmann, C. A. Vlaic, A. Bund, R. Redhammer, *Optics and Optoelectronics*, **2018**, 16, 239.
- [52] J. Eskhult, *Electrochemical Deposition of Nanostructured Metal/Metal-Oxide Coatings*, Uppsala Universitet, Sweden, **2007**, p. 56.
- [53] C. K. Mavrokefalos, M. Hasan, J. F. Rohan, R. G. Compton, J. S. Foord, *Appl Surf Sci.*, 2017, **408**, 125.
- [54] T. Spătaru, P. Osiceanu, C. Munteanu, N. Spătaru, A. Fujishima, *J Solid State Electrochem.*, **2012**, 16, 3897.
- [55] N. Spataru, C. Terashima, K. Tokuhiko, I. Sutanto, D. A. Tryk, S. M. Park, A. Fujishima, *J. Electrochem. Soc.*, **2003**, 150, E337.
- [56] T. Spătaru, *Rev Roum Chim.*, **2009**, 54, 733.
- [57] M. C. Ribeiro, L. G. da Silva, P. T. A. Sumodjo, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2006**, 17, 667.
- [58] T. L. Read, J. V. Macpherson, *J Vis Exp.*, **2016**, 107, 1.
- [59] N. Yang, *Novel Aspects of Diamond, From Growth to Applications*, (Eds.: C. E. Ascheron, A. H. Duhm), Springer, Switzerland, **2015**, p.336.
- [60] A. C. Gore, D. Crews, L. L. Doan, M. La Merrill, H. Patisaul, A. Zota, *Introduction to endocrine disrupting chemicals (edcs), a guide for public interest organizations and policy-makers*, Endocrine Society, **2014**, p. 76.
- [61] X. Jiang, W. Ding, C. Luan, Q. Ma, Z. Guo, *Microchim Acta*, **2013**, 180, 1021.
- [62] G. F. Pereira, L. S. Andrade, R. C. Rocha-Filho, N. Bocchi, S. R. Biaggio, *Electrochim. Acta*, **2012**, 82, 3.
- [63] Y. Liu, Y. Liu, B. Liu, *J. Electroanal. Chem.*, 2016, **781**, 265.
- [64] N. Zehani, P. Fortgang, M. Saddek Lachgar, A. Baraket, M. Arab, S. V. Dzyadevych, R. Kherrat, N. Jaffrezic-Renault, *Biosensors and Bioelectronics*, **2015**, 74, 830.
- [65] <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/bisphenolA/Bisphenol%20A.pdf> (preuzeto 31.7.2018.)
- [66] T. Barkhem, B. Carlsson, Y. Nilsson, E. Enmark, J. Gustafsson, S. Nilsson, *Mol Pharmacol*, **1998**; 54, 105.
- [67] G. G. Kuiper, J. G. Lemmen, B. Carlsson, J. C. Corton, S. H. Safe, P. T. van der Saag, B. van der Burg, J.A. Gustafsson, *Endocrinology*, **1998**, 139, 4252.
- [68] M. Uzumcu, A.M. Zama, E. Oruc, *Reprod Domest Anim*, **2012**, 47, 338.

- [69] D.C. Dolinoy, D. Huang, R.L. Jirtle, *Proc Natl Acad Sci*, **2007**, 104, 13056.
- [70] M. Kundakovic, K. Gudsnuk, B. Franks, J. Madrid, R.L. Miller, F.P. Perera, F.A. Champagne, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2013**, 110, 9956.
- [71] D. Tiwari, J. Kamble, S. Chilgunde, P. Patil, G. Maru, D. Kawle, U. Bhartiya, L. Joseph, G. Vanage, *Mutation Research*, **2012**, 743, 83.
- [72] D. J. Browne, L. Zhou, J. H. T. Luong, J. D. Glennon, *Electrophoresis*, **2013**, 00, 1.
- [73] Y. Qiu, H. Fan, X. Liu, S. Ai, T. Tang, R. Han, *Microchim Acta*, **2010**, 171, 363.
- [74] <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/b/bisphenol-a.html> (preuzeto: 31.7.2018.)
- [75] https://en.wikipedia.org/wiki/Bisphenol_A (preuzeto: 29.9.2018.)
- [76] T. Özdal, N. Ş. Yeşilcubuk, *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, **2014**, 8, 553
- [77] <https://repository.publisso.de/resource/fri:5166122-1/data> (preuzeto: 1.10.2018.)
- [78] <http://www.bisphenol-a.org/pdf/DiscoveryandUseOctober2002.pdf> (preuzeto: 1.10.2018.)
- [79] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol_A#section=Decomposition (preuzeto: 7.10.2018.)
- [80] I. Rykowska, W. Wasiak, *Acta Chromatographica*, **2006**, 16, 7.
- [81] Zhang, X.; Zhu, D.; Huang, C.; Sun, Y.; Lee, Y.-I., *Microchem. J.*, **2015**, 121, 1.
- [82] D. Li, J. Park, J.R. Oh, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 3089.
- [83] D.K. Alexiadou, N.C. Maragou, N.S. Thomaidis, , G.A. Theodoridis, M.A. Koupparis, *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 2272.
- [84] C.H. Huang, D.L. Sedlak, *Environ. Toxicol. Chem.*, **2001**, 20, 133.
- [85] A. García-prieto, et al., *Analytica chimica acta*, **2008**, 630(1), 19.
- [86] R. Wannapob, P. Thavarungkul, S. Dawan, A. Numnuam, W. Limbut, P., *Electroanalysis*, **2017**, 29, 472.
- [87] X. Li, S. Chu, S. Fu, L. Ma, X. Liu, X. Xu, *Chromatographia*, **2005**, 61, 161.
- [88] J. L. Vilchez, A. Zafra, A. Gonzalez-Casado, E. Hontorio, M. del Olmo, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 431, 31.
- [89] S. Sungur, M. Koroglu, A. Ozkan, *Food Chem.*, **2014**, 142, 87.
- [90] R. Shi, J. Liang, Z. Zhao, Y. Liu, Aifeng Liu, *Sensors*, **2018**, 18(1660), 1.
- [91] J. Jang, D.-H. Kim, W.-Y. Lee, *Analytical Letters*, **2016**, 49, 13.
- [92] S. Wang, X. Wei, L. Du, H. Zhuang., *Luminescence*, **2005**, 20, 46.
- [93] K. V. Ragavan, N. K. Rastogi, M. S. Thakur, *Trends in analytical chemistry*, **2013**, 52, 248.

- [94] W. Huang, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2005**, 26 (10), 1560.
- [95] H. Ezoji, M. Rahimnejad, *International Journal of Scientific & Engineering Research*, **2016**, 7(6), 242.
- [96] N. Achargui, W. Chkairi, W. Chafiki, M. Elbasri, S. Alami Younssi, M. El Rhazi, *Int. Journal of Engineering Research and Application*, **2016**, 6(12), 23.
- [97] V. Arabali et al., *Food Anal. Methods*, **2015**.
- [98] K. Varmira, M. Saed-Mocheshi, A. R. Jalalvand, *Sensing and Bio-Sensing Research*, **2017**, 15, 17.
- [99] M. Ozsoz, *Electrochemical DNA biosensors*, Pan Stanford Publishing, İzmir, **2012**, p. 566.
- [100] S. Girousi, Z. Stanić, *American Chemical Society*, **2011**, 7, 80.
- [101] S. N. Azizi, S. Ranjbar, J.B. Raoof, E. Hamidi – Asl, *Sensors and Actuators B*, **2013**, 181, 319.
- [102] W.-W. Zhao, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, *Chem. Rev.*, **2014**, 114(15), 7421.
- [103] M. Arvand, R. M. Mazhabi, A. Niazi, *Electrochimica Acta*, **2013**; 89, 669.
- [104] M. Du, T. Yang, K. Jiao, *J. Solid State Electrochem.*, **2010**, 14, 2261.
- [105] I. Švancara, K. Kalcher, A. Walcarius, K. Vytras, *Electroanalysis with Carbon Paste Electrodes*, Crc Press Inc, Boca Raton, 2012, p. 648.
- [106] H. Gao, X. Qi, Y. Chen, W. Sun, *Analytica Chimica Acta*, **2011**, 704, 133.
- [107] L. Svorc, Kurt Kalcher, *Sensors and Actuators B*, **2014**, 194, 332.
- [108] A. Atkinson, D. Roy, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **1995**, 26, 60.
- [109] A. Atkinson, D. Roy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1995**, 210(2), 424.
- [110] K. Kolšek, J. Mavri, M. Sollner Dolenc, *Toxicology in Vitro*, **2012**, 26, 102.
- [111] H. Zhao, J. Wei, L. Xiang, Z. Cai, *Talanta*, **2018**, 182, 583.
- [112] M. Mohamadi, A. Mostafavi, M. Torkzadeh-Mahani, *Biosensors & Bioelectronics*, **2014**, 54, 211.
- [113] C. Serpi, Z. Stanić, S. Girousi, *Talanta*, **2010**, 81(4-5), 1731.
- [114] V. Pokropivny, *Introduction to nanomaterials and nanotechnology*, Tartu University Press, Tartu, **2007**, p. 191.