

# Elektrokemijsko ponašanje MnO<sub>2</sub> modificirane elektrode od ugljikove paste u svrhu određivanja vodikovog peroksida

---

Gabela, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:051067>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-26**

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE  $\text{MnO}_2$  MODIFICIRANE  
ELEKTRODE OD UGLJIKOVE PASTE U SVRHU ODREĐIVANJA  
VODIKOVOG PEROKSIDA**

**ZAVRŠNI RAD**

**IVANA GABELA**

**Matični broj: 313**

**Split, rujan 2018**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE  $MnO_2$  MODIFICIRANE  
ELEKTRODE OD UGLJIKOVE PASTE U SVRHU ODREĐIVANJA  
VODIKOVOG PEROKSIDA**  
**ZAVRŠNI RAD**

**IVANA GABELA**

**Matični broj: 313**

**Split, rujan 2018**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY IN CHEMISTRY**

**ELECTROCHEMICAL BEHAVIOUR OF  $MnO_2$  MODIFIED  
CARBON PASTE ELECTRODE FOR DETERMINATION OF  
HYDROGEN PEROXIDE**

**BACHELOR THESIS**

**IVANA GABELA**

**Parent number: 313**

**Split, September 2018**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet

Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

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

Mentor: doc. dr. sc. Marijo Buzuk

Pomoć pri izradi: /

### ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE $MnO_2$ MODIFICIRANE ELEKTRODE OD UGLJIKOVE PASTE U SVRHU ODREĐIVANJA VODIKOVOG PEROKSIDA

Ivana Gabela, 313

#### Sažetak:

U ovom završnom radu ispitivana je uporaba  $MnO_2$  kao modifikatora za biosenzorsko određivanje glukoze s elektrodama od ugljikove paste. S obzirom na mogućnost redukcije  $MnO_2$  s  $H_2O_2$  (kao produktom enzimske reakcije oksidacije glukoze s glukoza oksidazom) ovaj vid modifikacije ima potencijal za određivanje onih bioloških vrsta, koji u svom enzimskom ciklusu kao produkt reakcije imaju vodikov peroksid. Elektroda pripravljena od ugljikove paste s 5% modifikatora je testirana na tri pH vrijednosti (4, 7, 9) na redoks reakcije  $H_2O_2$ . Kao optimalna pH vrijednost pokazala se pH 9 u boratnom puferu, gdje se indirektno uočila oksidacija vodikovog peroksida. Ova reakcija može se iskoristiti u analitičkom određivanju vrsta koje u svojoj enzimskoj reakciji imaju kao produkt vodikov peroksid.

**Ključne riječi:** elektrode od ugljikove paste, modifikatori, biosenzori, glukoza

**Rad sadrži:** 36 stranica, 24 slike, 2 tablice, 30 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

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

**Datum obrane:**

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## BACHELOR THESIS

**University of Split**

**Faculty of chemistry and technology**

**Undergraduate Study in Chemistry**

**Scientific area:** Natural Sciences

**Scientific field:** Chemistry

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

**Mentor:** Marijo Buzuk – PhD, assistant prof.

**Technical assistance:** /

### **ELECTROCHEMICAL BEHAVIOUR OF MnO<sub>2</sub> MODIFIED CARBON PASTE ELECTRODE FOR DETERMINATION OF HYDROGEN PEROXIDE**

**Ivana Gabela, 313**

#### **Abstract:**

This final work present using of MnO<sub>2</sub> as a modifier for biosensor glucose determination in carbon paste electrodes. Possibility of reducing MnO<sub>2</sub> with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (as a product of the enzymatic reaction of glucose with glucose oxidase) offer possibility of using this kind of biological species which in their enzymatic cycle have a hydrogen peroxide as reaction product. Electrodes made of carbon paste with 5% modifier were tested at three pH values (4, 7, 9) on redox of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaction. As an optimal pH value, pH 9 was found in borate buffer, where oxidation of hydrogen peroxide was observed. This reaction can be utilized in analytical determination of species that in its enzyme reaction have the product as hydrogen peroxide.

**Keywords:** carbon paste electrode, modifiers, biosensors, glucose

**Thesis contains:** 36 pages, 24 figures, 2 tables, 300 references

**Original in:** Croatian

#### **Defence committee:**

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

#### **Defence date:**

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





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

*Prije svega zahvaljujem svojim roditeljima koji su uvijek bili tu uz mene i gurali me prema naprijed, nedavši mi odustati. Njihova potpora bila mi je vjetar u leđa te zbog njih sam tu gdje jesam.*

*Zahvaljujem se svim svojim profesorima i kolegama koji su me pratili u ove tri godine školovanja i koji su sa mnom dijelili mnoge trenutke kako dobre, tako i loše.*

*I posljednjem, ali ne i manje važnom, zahvaljujem se svom mentoru, doc.dr.sc. Mariju Buzuku, koji je uvijek imao strpljenja i volje za mene. Uvijek je bio spreman priskočiti mi u pomoć. Zahvaljujem mu se na prenesenom znanju i na trudu kojeg je uložio da me nauči način na koji treba razmišljati i pristupati problemu. Hvala za sve!*

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

1. Ispitati elektrokemijsko ponašanje elektrode od ugljikove paste pri različitim pH vrijednostima.
2. Ispitati utjecaj  $\text{MnO}_2$  modifikatora na elektrokemijski odziv prema vodikovom peroksidu pri različitim pH vrijednostima.
3. Objašnjenje pojava koje se mogu uočiti cikličkom voltametrijom.
4. Potvrda uporabe  $\text{MnO}_2$  kao modifikatora u izradi biosenzora.

## SAŽETAK

U ovom završnom radu ispitivana je uporaba  $\text{MnO}_2$  kao modifikatora za biosenzorsko određivanje glukoze s elektrodama od ugljikove paste. S obzirom na mogućnost redukcije  $\text{MnO}_2$  s  $\text{H}_2\text{O}_2$  (kao produktom enzimske reakcije oksidacije glukoze s glukozom oksidazom) ovaj vid modifikacije ima potencijal za određivanje onih bioloških vrsta, koji u svom enzimskom ciklusu kao produkt reakcije imaju vodikov peroksid. Elektroda pripravljena od ugljikove paste s 5% modifikatora je testirana na tri pH vrijednosti (4, 7, 9) na redoks reakcije  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Kao optimalna pH vrijednost pokazala se pH 9 u boratnom puferu, gdje se indirektno uočila oksidacija vodikovog peroksida. Ova reakcija može se iskoristiti u analitičkom određivanju vrsta koje u svojoj enzimskoj reakciji imaju kao produkt vodikov peroksid.

**Ključne riječi:** elektrode od ugljikove paste, modifikatori, biosenzori, glukoza

## **SUMMARY**

This final work present using of  $\text{MnO}_2$  as a modifier for biosensor glucose determination in carbon paste electrodes. Possibility of reducing  $\text{MnO}_2$  with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (as a product of the enzymatic reaction of glucose with glucose oxidase) offer possibility of using this kind of biological species which in their enzymatic cycle have a hydrogen peroxide as reaction product. Electrodes made of carbon paste with 5% modifier were tested at three pH values (4, 7, 9) on redox of  $\text{H}_2\text{O}_2$  reaction. As an optimal pH value, pH 9 was found in borate buffer, where oxidation of hydrogen peroxide was observed. This reaction can be utilized in analytical determination of species that in its enzyme reaction have the product as hydrogen peroxide.

**Keywords:** carbon paste electrode, modifiers, biosensor, glucose

# SADRŽAJ

UVOD.....	3
1. OPĆI DIO.....	4
1.1. U središtu radnje – Vodikov peroksid.....	4
1.2. Biosenzori .....	5
1.2.1. Generacije biosenzora.....	9
1.2.2. Amperometrijski biosenzori.....	11
1.3. Određivanje peroksida elektrokemijskim biosenzorima.....	13
1.3.1. Potenciometrijski H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> biosenzori .....	13
1.3.2. Amperometrijski H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> biosenzori .....	13
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
2.1. Priprava elektrodnog materijala .....	17
2.2. Priprava otopina .....	17
2.2.1. Priprava otopine vodikovog peroksida različitih koncentracija.....	17
2.2.2. Priprava otopine kalijevog nitrata - KNO <sub>3</sub> .....	18
2.2.3. Priprava otopine natrijevog acetata - CH <sub>3</sub> COONa .....	19
2.2.4. Priprava otopine acetatnog pufera; pH 4 .....	19
2.2.5. Priprava otopine natrijevog hidrogenfosfata - Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	19
2.2.6. Priprava otopine fosfatnog pufera; pH 7.....	19
2.2.7. Priprava otopine amonijevog klorida - NH <sub>4</sub> Cl.....	19
2.2.8. Priprava otopine amonijačnog pufera; pH 9 .....	20
2.2.9. Priprava otopine boratnog pufera; pH 9.....	20
2.2.10. Priprava elektrolitne otopine.....	20
2.3. Aparatura.....	20
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
3.1. Elektrokemijsko ponašanje nCPE.....	21
3.2. Elektrokemijsko ponašanje mCPE.....	27

4. ZAKLJUČAK.....	33
5. LITERATURA .....	34

## UVOD

Vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) jedan je od najvažnijih regulatora u biološkim reakcijama koje su katalizirane oksidazama. Određivanje vodikovog peroksida postavlja temelje mnogim analitičkim tehnikama i komercijalnim testovima poput kalorimetrije, fluorometrije, spektrofotometrije, kemiluminescencije i elektrokemijske metode. Među tim tehnikama, elektrokemijske metode analize pružaju prikladan način određivanja  $H_2O_2$  zbog svoje jednostavnosti, jeftinije instrumentacije, visoke selektivnosti i prikladnosti za otkrivanje i kvantificiranje analita u realnom vremenu. U elektrokemiji, vodikov peroksid može biti izravno reduciran/oksidiran na površini čvrstih elektroda. Određivanje  $H_2O_2$  na konvencionalnim, plemenitim, metalnim elektrodama je ograničeno visokim prenaponom koji usporava kinetiku reakcije. U istraživanjima prethodno navedenih tehnika, otkriveno je kako je određivanje  $H_2O_2$  uglavnom usmjereno prema modificiranim elektrodama kako zbog rješavanja problema niske osjetljivosti tako i zbog visokog radnog potencijala. Elektrokemijski procesi vodikovog peroksida na površinama elektroda mogu se pratiti cikličkom voltametrijom. U ovom radu predstavljen je potencijal elektrode od ugljikove paste modificirane s 5% manganovog (IV) oksida, kao materijala za razvoj senzora osjetljivog na peroksid, kao i primjer elektrokatalitičkog određivanja vodikovog peroksida.

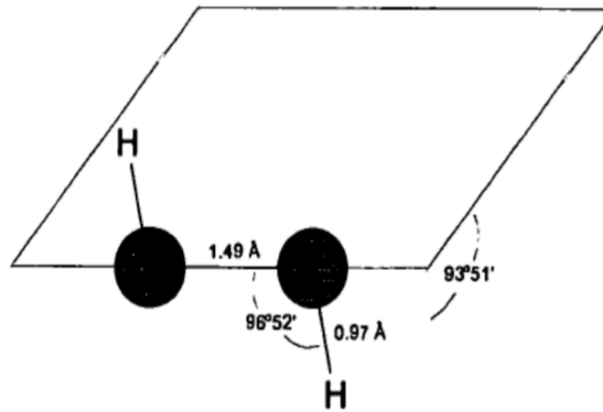


# 1. OPĆI DIO

## 1.1. U središtu radnje – Vodikov peroksid

Vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) jedan je od najvažnijih regulatora u biološkim reakcijama koje su katalizirane oksidazama [1].  $H_2O_2$  ( $M_r = 34,014 \text{ g mol}^{-1}$ ) je molekula s lančanom, neplanarnom strukturom (Slika 1). Ovisno o koncentraciji ( $> 10\%$ ), djeluje iritirajuće na kožu, oči, gastrointestinalni trakt i sluznicu.  $H_2O_2$  vrlo je važan u biološkim, farmakološkim, medicinskim i ekološkim znanostima, proizvodnji hrane i tekstila [2]. U industrijskim i medicinskim područjima, koristi se za pročišćavanje otpadnih voda, kao sredstvo za izbjeljivanje i za sterilizaciju.  $H_2O_2$  igra ključnu ulogu u reguliranju vitalnih i složenih bioloških puteva, pri rastu i diferencijaciji stanica, apoptozi i imunološkoj aktivaciji [3]. Povišena koncentracija  $H_2O_2$ , uz ostale uzročnike, izaziva pojavu bolesti poput: raka, artritisa, dijabetesa, neurodegenerativnih poremećaja, kardiovaskularnih bolesti, astme i oksidativnog stresa [4,5]. Određivanje vodikovog peroksida postavlja temelje mnogim analitičkim tehnikama i komercijalnim testovima poput kalorimetrije, fluorometrije, spektrofotometrije, kemiluminescencije i elektrokemijske metode [6]. Prve četiri tehnike imaju nedostatke, dugotrajnije su i skupe, zahtijevaju dugotrajne pripreme uzorka, korištenje skupih reagensa i pate od interferencija [7]. Među tim tehnikama, elektrokemijske metode analize pružaju prikladan način određivanja  $H_2O_2$  zbog svoje jednostavnosti, jeftinije instrumentacije, visoke selektivnosti i prikladnosti za otkrivanje i kvantificiranje analita u realnom vremenu [8]. Voltometrija je skup elektroanalitičkih tehnika za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzorka kod kojih je signal pobude električni napon, a signal odziva električna struja. Voltometrijska mjerenja provode se u elektrokemijskoj ćeliji, u kojoj se signal pobude nameće između referentne i radne elektrode, a mjeri se struja koja teče između radne elektrode i protuelektrode. Struja, kao signal pobude je funkcija vremena i narinutog napona. Osjetljivost voltometrije omogućuje mjerenje koncentracija od  $10^{-9}$  do  $10^{-12} \text{ mol dm}^{-3}$ . U elektrokemiji, vodikov peroksid može biti izravno reduciran/oksidiran na površini čvrstih elektroda. Određivanje  $H_2O_2$  na konvencionalnim, plemenitim, metalnim elektrodama je ograničeno visokim prenapom koji usporava kinetiku reakcije. Nadalje, ovaj prenapon kao posljedicu ima pojavu interferencija u uzorku od strane elektroaktivnih vrsta [9]. U istraživanjima prethodno navedenih tehnika, otkriveno je kako je određivanje  $H_2O_2$  uglavnom usmjereno prema modificiranim elektrodama kako zbog rješavanja problema niske osjetljivosti tako i zbog visokog radnog potencijala. U izradi selektivnog  $H_2O_2$  biosenzora

kao modifikatori korištene su nanočestice platine, redoks polimeri, metalni oksidi, nanovlakna, veliki broj naprednih nanomaterijala (grafitne kapsule, tetraetil ortosilikati) [10]. Ove tehnike, u odnosu na konvekcionalne analitičke metode za određivanje  $H_2O_2$ , pokazale su se kao mnogo naprednije i učinkovitije [11].



*Slika 1* – Struktura vodikovog peroksida

## 1.2. Biosenzori

Biosenzori su specijalna vrsta senzora koji sadrže biološki prepoznajući element (biokemijski receptor). Npr. biosenzor za glukozu je “*bio*” ukoliko sadrži neki od enzima koji kontroliraju specifičnu reakciju glukoze. C-vitamin, poput glukoze, može se određivati sa odgovarajućim biosenzorom. Kako bi se razjasnila razlika između biosenzora i senzora, poslužit će primjer mokraćne kiseline. Dakle, ukoliko mokraćnu kiselinu određujemo amperometrijski s elektrodom modificiranom s  $MnO_2$ , onda imamo senzor. S druge strane, ako mokraćnu kiselinu određujemo elektrodom koja sadrži komponentu (urat oksidazu) tada imamo biosenzor.

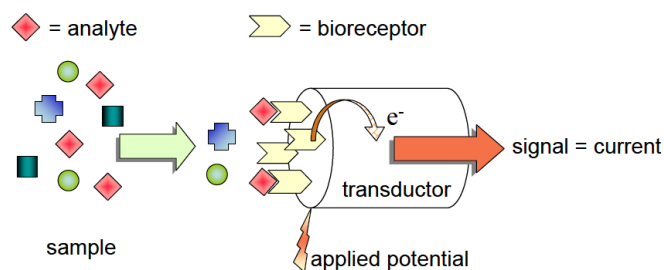
Prema IUPAC-u biosenzori su:

“Uređaji koji koriste specifične biokemijske reakcije djelovanjem izoliranih enzima, imuno sustava, tkiva, organela ili cijelih stanica za detekciju kemijskih spojeva putem električnih, toplinskih i optičkih signala” [12].

Thevenot [13] predložio je jednu od mnogih definicija biosenzora:

„Biosenzori su samostalni integrirani uređaji koji su sposobni dati određene kvantitativne ili semi-kvantitativne informacije na bazi biološkog prepoznavajućeg elementa (biokemijskog receptora), u direktnom kontaktu sa pretvaračem (transduktor)“.

Za razliku od uobičajenih analitičkih metoda koje koriste glomazne uređaje, mjerenja biosenzorima provode se na netretiranim uzorcima na jednostavan i jeftin način. Neiscrpan model za razvoj biosenzora je priroda sa selektivnim molekulama koje se mogu upotrijebiti za dizajniranje senzora kao tehničkog mjernog uređaja. Kombiniranje prirodnih molekula s metodama koje pruža mikroelektronika, rezultira vrlo često masovnom proizvodnjom biosenzora u obliku čipova. Za sada je neupitno da je postignuta visoka osjetljivost i selektivnost određivanja na kontaktu analit-senzor koja nerijetko višestruko premašuje klasične sofisticirane analitičke tehnike. Slične sustave lako prepoznajemo u prirodi. Svi biološki sustavi po svojoj prirodi su termodinamički neuravnoteženi i kao takvi trebaju različite osjetljive komponente za održavanje kontrole stabilnosti životnih funkcija u interakciji s okolinom. Ovo je ujedno i model razvoja biosenzora za industrijsku primjenu, posebice u području biotehnologije. Jedna od najzastupljenijih vrsta biosenzora su elektrokemijski biosenzori. Elektrokemijski biosenzori se razlikuju od ostalih bioanalitičkih sustava koji zahtijevaju dodatnu pripremu analita, kao što je dodavanje reagensa. Biosenzori se sastoje od dviju glavnih komponenti tj. elementa za biološko prepoznavanje, koji reagiraju s ciljanim analitom, i (pretvarača) transduktora koji transformira interakciju u električni signal [14].



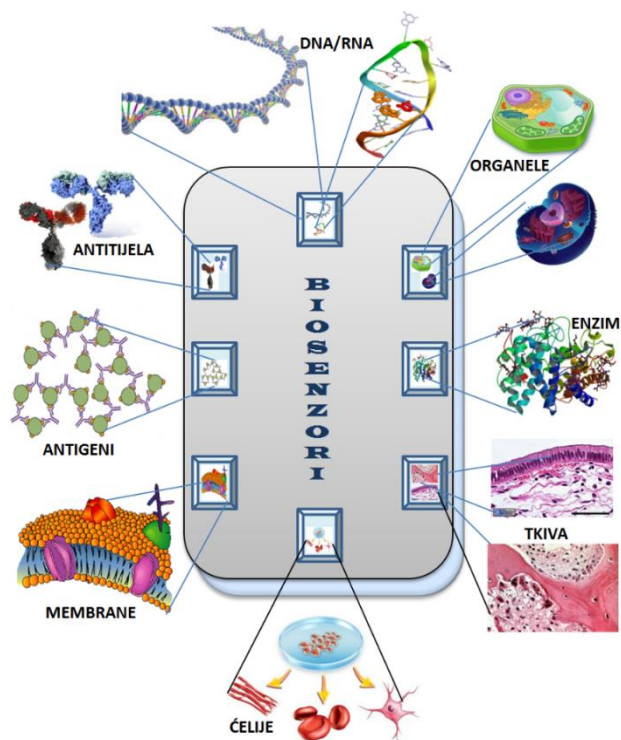
**Slika 2** - Princip funkcioniranja amperometrijskog biosenzora.

Jedna od elektrokemijskih tehnika koja se upotrebljava pri izradi biosenzora je kronoamperometrija. Tom tehnikom se mjeri struja u funkciji vremena pri čemu se elektroda drži na odgovarajućem konstantnom potencijalu. Signal ovih biosenzora generira se izmjenom elektrona između biološkog sustava (bioreceptora senzora) i elektrode. Za ovu izmjenu bitan faktor je medijator. Kod amperometrijskih biosenzora (Slika 2), analit se

podvrgava redoks reakciji koja se prati mjerenjem struje u elektrokemijskoj ćeliji. Analit na taj način mijenja svoje oksidacijsko stanje na elektrodi i mjeri se struja koja je proporcionalna količini analita koji je reagirao na elektrodi.

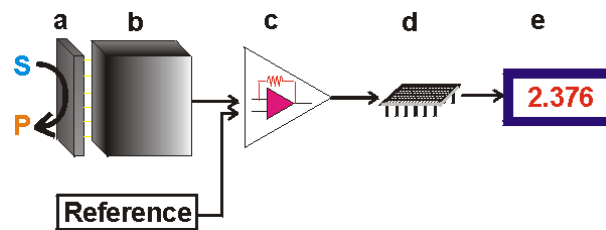
Teoretski, biosenzori se mogu klasificirati prema vrsti elementa za biološko prepoznavanje. Oni mogu biti enzimi, antitijela, DNK, žive ćelije i drugi biološki receptori. Neki od njih mogu se upotrijebiti za određivanje dioksina i polikloriranih bifenila (PCB), poliaromatskih ugljikovodika [PAHs] [15].

Na Slici 3 prikazani su bioreceptori koji se koriste za modifikaciju elektroda u svrhu dizajniranja odgovarajućih biosenzora. Ovako pripremljen bioreceptorski sloj odgovoran je za selektivnost odnosno specifičnost biosenzora prema određenom analitu. Mogu se koristiti brojni biološki ili biološki izvedeni sastojci kao modifikatori elektrode. Ovim se postiže osnovno svojstvo biosenzora, funkcioniranje bez prethodnog tretmana uzorka. Prvi korak u dizajniranju biosenzora je izbor odgovarajućeg bioreceptora tako da prepoznavajuća strana elektrode specifično reagira s ciljanim analitom. Izbor je određen svojstvima analita i njegovom strukturom te prisutnim interferirajućim tvarima u uzorku. U kliničkoj analizi radi se sa biološkim uzorcima s kompleksnom matricom koji sadrže interferencirajuće vrste.



*Slika 3* - Bioreceptori za modifikaciju elektrode u izradi biosenzora.

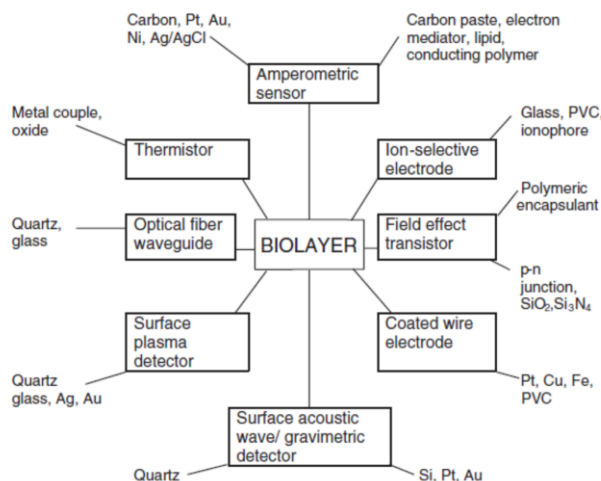
Važno je da se pri dizajniranju biosenzora na bazi enzima omogući vraćanje u početno oksidacijsko stanje redoks aktivnog centra enzima kako bi on zadržao svoju aktivnost za ponovnu reakciju sa analitom.



**Slika 4** - Shema glavnih komponenti biosenzora. Biokatalizator (a) konvertira supstrat u produkt. Ova reakcija se prati putem transduktora/pretvornika (b) koji stvara električni signal. Električni signal se pojačava (c), obrađuje i transformira iz analognog u digitalni oblik (d) i prikazuje na računalu.

Ključni dio biosenzora je transduktor-pretvornik, označen na slici 4 sa (b), koji omogućava praćenje promjena fizikalnih veličina tijekom reakcije. To su najčešće:

1. Oslobađanje ili absorpcija topline reakcije kod kalorimetrijskih biosenzora,
2. Promjene u raspodjeli naboja koje uzrokuju električni potencijal (potenciometrijski biosenzori),
3. Tok elektrona (el. struja) nastao kao rezultat redoks reakcije (amperometrijski biosenzori),
4. Svjetlosni tok (elektromagnetno zračenje) ili absorpcija svjetlosti pri reakciji (optički biosenzori),
5. Efekti promjene mase reaktanata ili produkata (piezo-električni biosenzori).



**Slika 5** - Različite konfiguracije biosenzora

Najpoznatiji biosenzor za glukozu je razvijen na enzimu glukoza oksidazi ( $GOx$ ), a koji katalizira oksidaciju glukoze sa kisikom u glukonolakton (ili u glukonsku kiselinu) i  $H_2O_2$ . Razvijeni  $H_2O_2$  naknadno se određuje elektrokemijski.

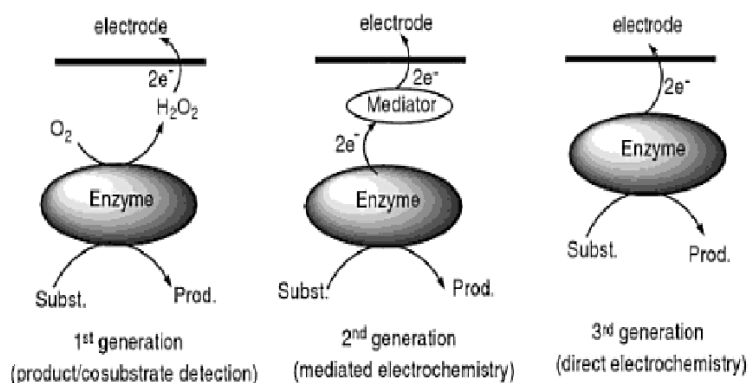


Mnogi drugi enzimi koji su danas komercijalno dostupni služe za razvoj raznih biosenzora. Pored najbolje elektrokemijski ispitanih, mogu se upotrijebiti i drugi principi za konvertiranje signala kao što su akustični efekti, kalorimetrijski i optički.

### 1.2.1. Generacije biosenzora

Postoje tri generacije biosenzora. Kod prve generacije biosenzora, produkt reakcije difundira do elektrode gdje se oksidira ili reducira. Kod druge generacije biosenzora uključeni su specifični posrednici (medijatori) između osnovnog biološkog dijela i medijatora. Kod treće generacije biosenzora reakcija sama prouzrokuje odziv na elektrodi u što nije uključen niti produkt niti medijator kemijske reakcije. U novije vrijeme postignut je znatan napredak u razvoju treće generacije biosenzora baziran na direktnom prijenosu elektrona između elektrode i biološkog elementa. Istraživanja su posebno fokusirana na voltometriji koja nudi efikasan način direktnog prijenosa elektrona između proteina i elektrode.

Kod specifičnih biosenzora baziranih na upotrebi enzima, tri generacije biosenzora su shematski prikazane na Slici 6.



*Slika 6* - Tri generacije enzimskih elektrokemijskih biosenzora

### 1.2.1.1. Prva generacija biosenzora

Razvoj biosenzora na bazi enzima znatno je uznapredovao u posljednje vrijeme jer se došlo do novih spoznaja u razumijevanju mehanizama vezanih za funkcioniranje aktivnih centara enzima. U početku se enzimska elektrokemija oslanjala na voltametrijsku detekciju proizvoda odnosno kosupstrata (poput  $H_2O_2$ ) i to je bila takozvana prva generacija biosenzora, Slika 6. Uobičajeni analit koji je detektiran na ovaj način je vodikov peroksid, uobičajan proizvod reakcije enzima iz grupe oksidaza, pri čemu se kisik reducira. Sam proizvod može biti elektroaktivan, ali ne nužno.

### 1.2.1.2. Druga generacija biosenzora

Druga generacija biosenzora izbjegava oksidaciju/redukciju produkata ili reaktanata iz sustava zamjenjujući prijenos signala s redoks aktivnim koordinacijskim spojem ili redoks organskom molekulom. U elektrokemiji medijator ima dvojaku ulogu. Prvo, homogeni prijenos elektrona vraća enzim u prethodni aktivni oblik za slijedeći redoks ciklus, a zatim heterogeni prijenos elektrona s radnom elektrodom osigurava struju koja kvantificira enzim-supstrat reakciju. Ovaj pristup danas je osnova rada većine komercijalnih biosenzora, uključujući i biosenzor temeljen na enzimu glukoza oksidaza koji koristi ferocen medijator. Ovoj klasifikaciji pripada i korištenje redoks aktivnih polimera adsorbiranih na površini elektrode. U svim slučajevima nastale struje su generirane na formalnom redoks potencijalu

medijatora, a ne enzima. U idealnom slučaju redoks potencijal medijatora je blizak onom koji pripada aktivnom redoks centru enzima. Cilj je izbjegnuti veliki prenapon koji može dovesti do nespecifičnih redoks reakcija.

### **1.2.1.3. Treća generacija biosenzora**

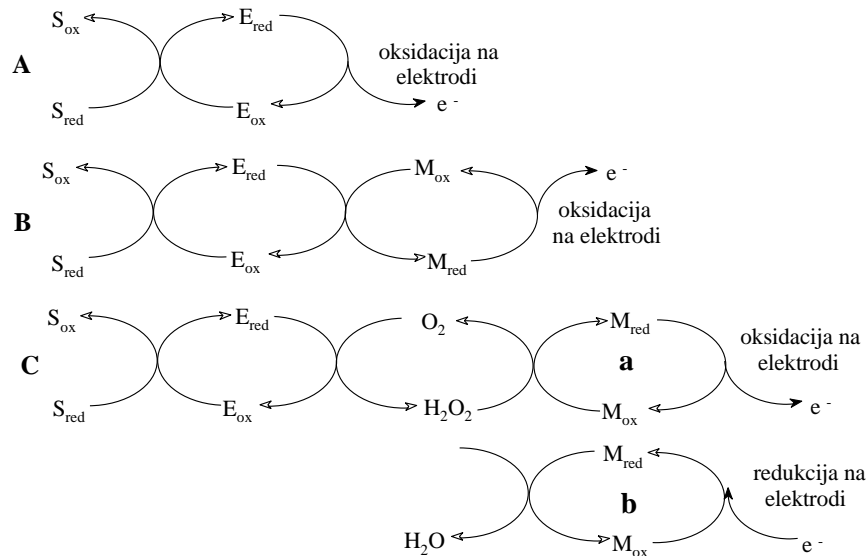
Osnova principa treće generacije biosenzora je uklanjanje svih kosupstrata iz sustava kako prirodnih tako i umjetnih s ciljem postizanja direktne razmjene elektrona između enzima i elektrode. Iako ovoj vrsti biosenzora tek predstoji komercijalna primjena, ona nudi značajne prednosti u odnosu na sustave s medijacijom (druga generacija biosenzora). Postoje mnogi zasada neriješeni problemi kod direktne enzimске elektrokemije. Oni uključuju izbjegavanje denaturacije enzima zbog njegove adsorpcije na elektrodnoj površini uz istovremeno osiguranje efikasne elektronske komunikacije između aktivnog centra enzima ili nekog drugog redoks kofaktora unutar enzima i elektrode.

### **1.2.2. Amperometrijski biosenzori**

Novija istraživanja, u području elektrokemijskih senzora, temeljena na modificiranim ugljikovim materijalima, dovela su do razvoja biosenzora. Od svih analitičkih elektrokemijskih tehnika, amperometrija je najviše korištena tehnika. Ova tehnika omogućava kronoamperometrijska mjerenja u protočnim sustavima (Protočno injekcijska analiza; PIA) i mjerenja u elektrokemijskoj ćeliji bez protoka (Hidrodinamička amperometrija; HA) [16]. Elektrokemijski biosenzori kombiniraju prednosti elektrokemijskih analitičkih tehnika sa specifičnošću procesa biološkog “prepoznavanja”. Cilj je biološki proizvesti električni signal koji je proporcionalan koncentraciji. U tu svrhu se biospecifični reagens imobilizira na odgovarajuću elektrodu koja transformira proces biološkog prepoznavanja u kvantitativni amperometrijski ili potenciometrijski odziv. Takva kombinacija elektroda-biokomponenta nudi novo snažno analitičko sredstvo. Primjena moderne tehnologije dovela je do proizvodnje lako upotrebljivih, kompaktnih i jeftinih biosenzora [16]. Znanja potrebna za razvoj biosenzora moraju se ujediniti kroz suradnju mnogih područja (multidisciplinarni pristup). Rezultati te suradnje u mnogim slučajevima će napraviti samo male pomake, ali sigurno je to da je to jedini put ka daljnjem razvoju [17].

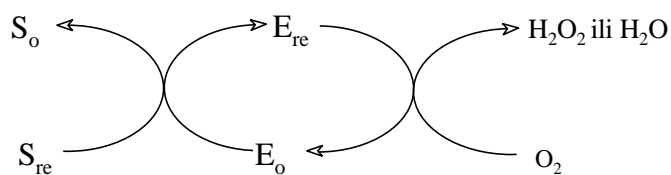


Razvoj elektrokemijskih biosenzora se odvija u različitim pravcima. Općenito se mogu razlikovati dvije vrste elektrokemijskih biosenzora ovisno o prirodi relacije bioloških procesa - biokatalitički sustav (enzimi, ćelije ili tkiva kao imobilizirane biokomponente) te senzori na bazi afiniteta (antitijela, membranski receptori ili nukleinske kiseline). Biosenzori kao biokatalitički sustavi najčešće se temelje na oksidoreduktazama s obzirom da kataliziraju konverziju intermedijera u produkte. Najčešće upotrebljavani enzimi su oksidaze i dehidrogenaze.



**Slika 7** - Mogućnosti uporabe redoks enzimskih reakcija za kemijske biosenzore (oksidacija supstrata) u amperometrijskom određivanju. (S - supstrat, M - medijator, E - enzim; indeks *ox* označava oksidiranu formu, a indeks *red* reduciranu formu). A - sustav direktne elektrokemijske oksidacije reduciranog enzima bez posrednika; B - direktno posredovanje sa M u ulozi elektron akceptora; C - određivanje vodikovog peroksida koji može biti reducirajući (a) i oksidirajući (b) spoj, posredovanjem M.

Sve oksidaze ovise o kofaktoru koji je snažno vezan unutar enzimske strukture. Struktura redoks kofaktora je tipa FAD [18]. Strukture kofaktora za sve enzime još nisu potpuno objašnjene. Ovi enzimi također mogu sadržavati ione metala čija je funkcija još uvijek nejasna (npr. Fe ili Mo). Sve oksidaze troše molekularni kisik kao oksidirajuću molekulu u katalitičkom ciklusu. Ovisno o moći enzima da katalizira prijenos dva ili četiri elektrona molekularnom kisiku, nastaje ili vodikov peroksid ili voda (Slika 8) [19]. Zbog velike oksidacijske moći molekularnog kisika, sve reakcije katalizirane oksidazama smatraju se ireverzibilnima ukoliko se odvijaju uz djelovanje ovog prirodnog elektron akceptora.



**Slika 8** - Reakcijske sekvence za oksidacijsku reakciju kataliziranu oksidazom uz potrošnju molekularnog kisika kao elektron-proton akceptora.

Na bazi reakcijske sheme na Slici 7 može se izvršiti klasifikacija u tri grupe za slučaj oksidacije supstrata na površini biosenzora.

### 1.3. Određivanje peroksida elektrokemijskim biosenzorima

Biosenzor je analitički uređaj koji kombinira biološke elemente/molekule s pretvornicima za mjerenje koncentracije analita. On pretvara biološki signal u električne signale. Biosenzor mora biti selektivan, precizan i neovisan o interferirajućim vrstama. Biosenzori se mogu razvrstati u enzimске i neenzimске biosenzore prema sastavu elementa bio-prepoznavanja [20].

#### 1.3.1. Potenciometrijski $H_2O_2$ biosenzori

Potenciometrijski biosenzori mjere električni potencijal elektrode pri otvorenom strujnom krugu, što čini razliku u potencijalu između radne i standardne elektrode. Ovi biosenzori temelje se na ionsko-selektivnim elektrodama za otkrivanje ciljanih iona tijekom bioloških reakcija. U potenciometrijskim biosenzorima, enzim je imobiliziran na površini elektrode, a promjena koncentracije kosupstrata predstavlja analitički signal [21].

#### 1.3.2. Amperometrijski $H_2O_2$ biosenzori

Amperometrijski biosenzori temelje se na generiranju struje pri stalnom potencijalu između dvije elektrode. Poput potenciometrijskih biosenzora, amperometrijski biosenzori također su pokazali analitičke parametre kao što su vrijeme odziva, linearni rasponi, selektivnost i

osjetljivost. Konvencionalni amperometrijski biosenzori temelje se na Clarkovoj kisikovoj elektrodi. Čelija sadrži Pt katodu i Ag/AgCl protu/referentu elektrodu. Redukcija O<sub>2</sub> se odvija na Pt katodi. Struja redukcije kisika na Pt katodi je obrnuto proporcionalna koncentraciji glukoze u uzorku. Kao elektrolit koristi se otopina KCl, a platinska katoda je odvojena od otopine KCl polupropusnom membranom za kisik (azbestni polimerni keramički matrijal). Stupanj elektrokemijske redukcije kisika ovisi o njegovom difuzijskom kapacitetu ka radnoj elektrodi (Pt elektrodi) [22].

#### **1.3.2.1. Prva generacija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosenzora**

Ova generacija biosenzora zasnivala se na određivanju koncentracije kisika na Clarkovoj elektrodi. Amperometrijski senzor za određivanje kisika je prilagođen na način da mu je površina modificirana s enzimskim slojem (koji sadrži GOD). Koncentracija određivanog kisika je obrnuta proporcionalna koncentraciji glukoze u uzorku.

#### **1.3.2.2. Druga generacija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosenzora**

Osjetljivi amperometrijski biosenzor na bazi hren preoksidaze (HRP), razvijen je pomoću taloženja nanočestica zlata (AuNP-a) na trodimenzionalnu (3D) poroznu karboniziranu membranu (CESM). Zbog sinergijskih učinaka jedinstvenog poroznog sastava ugljika i dobro raspoređenih AuNPs, enzimom modificirana elektroda pokazala je izvrsno elektrokemijsko redukcijско ponašanje. HRP-AuNPs-CESM-GC elektroda pokazala je dobru točnost i visoku osjetljivost s linearnim rasponom od 10-2700  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i granicom određivanja (LOD) od 3  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [23].

Jednostavan i jeftin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosenzor razvijen je korištenjem *Yucca filamentosa* u kombinaciji s O<sub>2</sub> senzorom. Biosenzor je pokazao linearno područje od 85  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  do 3750  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s granicom određivanja od 15,1  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  i ponovljivošću (1,024%, n = 10). Uspješno je primijenjen za određivanje koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u nekim komercijalnim uzorcima [24].

### 1.3.2.3. Treća generacija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosenzora

Biosenzori na bazi elektroda načinjenih od nanomaterijala dalje su klasificirani kao biosenzori na osnovi membrane i elektroda. Biosenzori na osnovi elektrodnog sastava mogu se razvrstati temeljem nanomaterijala koji se koriste u njihovoj sintezi:

- Elektronski reducirani grafenski oksid (ERGO) / GCE jednostavan je neenzimski H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> senzor. Razvijen je pomoću elektrokemijski reduciranog grafenskog oksida (ERGO) - modificirane GC elektrode. Modificirana GC elektroda karakterizirana je FTIR-om, UV-vidljivim spektrom, skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) i mikroskopom atomske sile (AFM). Ciklička voltametrijska analiza (CV) otkrila je da ERGO / GCE imaju naglašena katalitička svojstva za prijenos naboja za standardne redoks sustave i pokazuju izvrsnu učinkovitost prema elektro redukciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Amperometrijsko istraživanje pomoću ERGO / GCE pokazalo je visoku osjetljivost (0,3 μA/μmol<sup>-3</sup>) i brži odziv nakon dodavanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri primijenjenom potencijalu od -0,25 V vs Ag/AgCl. LOD je bio 0,7 μmol<sup>-3</sup>, a vrijeme postizanja stabilne struje stacionarnog stanja bilo je <3 s za linearni raspon koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1-16 μmol<sup>-3</sup>). Osim toga, modificirana GC elektroda ima dugotrajnu stabilnost [25].

- Dijamantna elektroda dopirana borom (BDDE), modificirana s kobaltovim ftalacijanimom (CoPc-BDD) koristi se za osjetljivo određivanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Istraženo je elektrokemijsko određivanje vodikovog peroksida kod modificirane elektrode. Ciklička voltimetrija otkrila je da CoPc-BDD elektroda ima katalitičku aktivnost za elektrokemijsku oksidaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Koristeći analizu s injektiranjem u protok-protočna injekcijska analiza (FIA-EC), CoPc-BDD elektroda pokazuje slijedeće analitičke parametre: linearno područje: 10 nmol<sup>-3</sup>-10 μmol<sup>-3</sup>, LOD: 10 nmol<sup>-3</sup>, radni potencijal: - 0,6 V [26].

- Hb [pluron P123-nanografen trombocit (NGP)] elektroda je amperometrijski H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosenzor, proizveden imobilizacijom Hb na pluronskom P123 nanografenskom trombocitu (NGP). Biosenzor je pokazao linearni odgovor na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u rasponu od 10-150 μmol<sup>-3</sup> i LOD od 8,24 μmol<sup>-3</sup> pri 0,20 V, pH 7,0 i 25 °C.

- Hemoglobin (Hb) – kolagen modificirana elektroda s trodimenzionalnom konfiguracijom proizvedena je elektrorotirajućom metodom. Izravni prijenos elektrona imobiliziranog Hb u kolagen bio je uvelike olakšan. Amperometrijski odgovor biosenzora varirao je linearno s koncentracijom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u rasponu od 5 x 10<sup>-6</sup> mol<sup>-3</sup> do 30 x 10<sup>-6</sup> mol<sup>-3</sup>, s LOD od 0,37 x 10<sup>-6</sup> mol<sup>-3</sup> [27].

- DNA / Hb / Au biosenzor  $\text{H}_2\text{O}_2$  konstruiran je imobilizacijom DNA i Hb na površinu Au elektrode, sloj po sloj. Senzor koji se temelji na reakciji željezovih kationa u prijenosu Hb pokazao je dobar elektrokatalitički odgovor na redukciju  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ovaj senzor ima izvrstan elektrokemijski odgovor za niske koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  s visokom osjetljivošću, selektivnošću te kratkim vremenom odziva. U idealnim uvjetima (potencijal 0,75 i pH 5,0), linearnost za određivanje  $\text{H}_2\text{O}_2$  bila je 10-120  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  s LOD od 0,4  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  [28].

- Grafen s nanočesticama platine (GPtNPs) jednostavna je i vrlo osjetljiva platforma, razvijena za sintezu razgranatih Pt nanostruktura na grafenu. Ovakav grafen korišten je za povećanje performansi platinastih nanostruktura (PtN) u elektrokemijskim senzorima / biosenzorima. Modulirana elektroda PtNs (GPtNs), podržana na grafenu, učinkovito oksidira  $\text{H}_2\text{O}_2$  pri nižem potencijalu u neutralnom fosfatnom puferu bez upotrebe enzima ili redoks posrednika. GPtNs elektroda pokazala je visoku osjetljivost 811,26  $\mu\text{A/mol dm}^{-3}$  i linearni raspon, 0-0,32  $\text{mmol dm}^{-3}$ , s vrlo niskim LOD (1  $\text{nmol dm}^{-3}$ ) za  $\text{H}_2\text{O}_2$  na potencijalu 0,45 V i pH 7,0. Senzor je pokazao dugotrajnu stabilnost i reproducibilnost [29].

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Priprava elektrodnog materijala

Tijekom mjerenja korištena je nemodificirana elektroda od ugljikove paste (nCPE) i modificirana elektroda s 5% MnO<sub>2</sub> (mCPE). Za pripravu elektrodnog materijala za nCPE korišteno je 1 g grafita i 400 µL parafinskog ulja, dok je za pripravu mCPE korišteno 0,95 g grafita i 0,05 g MnO<sub>2</sub> uz dodatak 400 µL parafinskog ulja. Smjesa prahova je prethodno homogenizirana i u nju se dodavalo parafinsko ulje do zadovoljavajuće konzistencije. Pasta je homogenizirana u tarioniku. Ovako pripremljenu pastu smo prenijeli u odgovarajuće tijelo od injekcije

Površina elektrode iznosila je 0,2 cm<sup>2</sup>, a prije svakog mjerenja nanovo se skidao površinski sloj radi reproducibilnosti.

### 2.2. Priprava otopina

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

**Tablica 1** - Kemikalije korištene za pripravu eksperimentalnih otopina

kemikalija	molekulska formula	dobavljač
natrijev hidrogenfosfat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	p.a. "Kemika", Zagreb
kalijev nitrat	KNO <sub>3</sub>	p.a. "Kemika", Zagreb
natrijev acetat	CH <sub>3</sub> COONa	p.a. "Kemika", Zagreb
amonijev klorid	NH <sub>4</sub> Cl	p.a. "Kemika", Zagreb
boraks	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> x 10H <sub>2</sub> O	p.a. "Kemika", Zagreb
amonijak	NH <sub>3</sub>	p.a. "Kemika", Zagreb
fosforna kiselina	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	p.a. "Kemika", Zagreb
octena kiselina	CH <sub>3</sub> COOH	p.a. "Kemika", Zagreb
vodikov peroksid	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	p.a. "Kemika", Zagreb

#### 2.2.1. Priprava otopine vodikovog peroksida različitih koncentracija

Otopina vodikovog peroksida, koncentracije 0,1 mol dm<sup>-3</sup>, pripravljena je otapanjem 0,373 g tj. 335 µL vodikovog peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), u deioniziranoj vodi razrjeđenjem na konačni

volumen od 30 cm<sup>3</sup>. Za pripremu 0,01 moldm<sup>-3</sup> uzeto je 3 cm<sup>3</sup> prethodno napravljene (0,1 moldm<sup>-3</sup>) otopine vodikovog peroksida te razrijeđeno na volumen od 30 cm<sup>3</sup>, a zatim je 3 cm<sup>3</sup> te otopine iskorišteno za pripremu 0,001 mol dm<sup>-3</sup>.

Ovako priređene otopine korištene su u elektrokemijskim mjerenjima i to na način da se od svake dodavao određeni volumen u ćeliju s 100 cm<sup>3</sup> osnovnog elektrolita, za postizanje konačne koncentracije (Tablica 2).

**Tablica 2** –Koncentracije vodikovog peroksida koje su korištene pri mjerenju

<b><math>c(\text{H}_2\text{O}_2)</math> – korištena za pripremu / moldm<sup>-3</sup></b>	<b><math>V(\text{H}_2\text{O}_2)_{30\%}</math></b>	<b><math>c(\text{H}_2\text{O}_2)</math> – dodavana u ćeliju / moldm<sup>-3</sup></b>
0,001	50 μL	$5 \times 10^{-7}$
0,01	50 μL	$5 \times 10^{-6}$
0,1	50 μL	$5 \times 10^{-5}$
0,1	500 μL	$5 \times 10^{-4}$
0,1	5000 μL	$5 \times 10^{-3}$

Prilikom svakog novog mjerenja pripremljena je uvijek nova otopina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 2.2.2. Priprema otopine kalijevog nitrata - KNO<sub>3</sub>

101,075 g kalijevog nitrata otopljeno je u deioniziranoj vodi razrjeđenjem na konačni volumen od 2 dm<sup>3</sup>. Koncentracija ove otopine je bila 0,5 moldm<sup>-3</sup>. Iz ove otopine pripravljena je 0,1 moldm<sup>-3</sup> otopina kalijevog nitrata, korištenjem 18 cm<sup>3</sup> otopine KNO<sub>3</sub> koncentracije 0,5 moldm<sup>-3</sup> koja je razrijeđena do konačnog volumena od 90 cm<sup>3</sup>.

### 2.2.3. Priprava otopine natrijevog acetata - CH<sub>3</sub>COONa

Otopina natrijevog acetata pripravljena je otapanjem 2,05 g CH<sub>3</sub>COONa u deioniziranoj vodi razrjeđenjem na konačni volumen od 0,25 dm<sup>3</sup>. Koncentracija ove otopine je 0,1 moldm<sup>-3</sup> {c(CH<sub>3</sub>COONa) = 0,1 moldm<sup>-3</sup>}.

### 2.2.4. Priprava otopine acetatnog pufera; pH 4

Dodavanjem koncentrirane otopine CH<sub>3</sub>COOH u otopinu CH<sub>3</sub>COONa ( $c = 0,1 \text{ moldm}^{-3}$ ) prilagođava se pH do željene vrijednosti (pH = 4). Ovo dodavanje se vrši uz stalno praćenje pH vrijednosti pH-metrom.

### 2.2.5. Priprava otopine natrijevog hidrogenfosfata - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

3,548 g natrijevog hidrogenfosfata otopljeno je u deioniziranoj vodi razrjeđenjem na konačni volume od 0,25 dm<sup>3</sup>. Koncentracija ove otopine bila je 0,1 moldm<sup>-3</sup> {c(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) = 0,1 moldm<sup>-3</sup>}.

### 2.2.6. Priprava otopine fosfatnog pufera; pH 7

Dodavanjem koncentrirane otopine H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> u otopinu Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( $c = 0,1 \text{ moldm}^{-3}$ ) prilagođava se pH do željene vrijednosti (pH = 7). Ovo dodavanje se vrši uz stalno praćenje pH vrijednosti pH-metrom.

### 2.2.7. Priprava otopine amonijevog klorida - NH<sub>4</sub>Cl

Otopina amonijevog klorida pripravljena je otapanje 1,56 g NH<sub>4</sub>Cl u deioniziranoj vodi razrjeđenjem na konačni volumen od 0,25 dm<sup>3</sup>. Koncentracija ove otopine bila je 0,1 moldm<sup>-3</sup> {c(NH<sub>4</sub>Cl) = 0,1 moldm<sup>-3</sup>}.



### **2.2.8. Priprava otopine amonijačnog pufera; pH 9**

Dodavanjem koncentrirane otopine  $\text{NH}_3$  u otopinu  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) prilagođava se pH do željene vrijednosti ( $\text{pH} = 9$ ). Ovo dodavanje se vrši uz stalno praćenje pH vrijednosti pH-metrom.

### **2.2.9. Priprava otopine boratnog pufera; pH 9**

Boratni pufer je pripravljen otapanjem 9,5 g boraksa ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ ) u  $0,25 \text{ dm}^3$  deionizirane vode. Pripravljeni pufer je bio koncentracije  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  s pH 9.

### **2.2.10. Priprava elektrolitne otopine**

Elektrolitna otopina se sastojala od  $90 \text{ cm}^3$   $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$   $\text{KNO}_3$  i  $10 \text{ cm}^3$  odgovarajućeg pufera.

## **2.3. Aparatura**

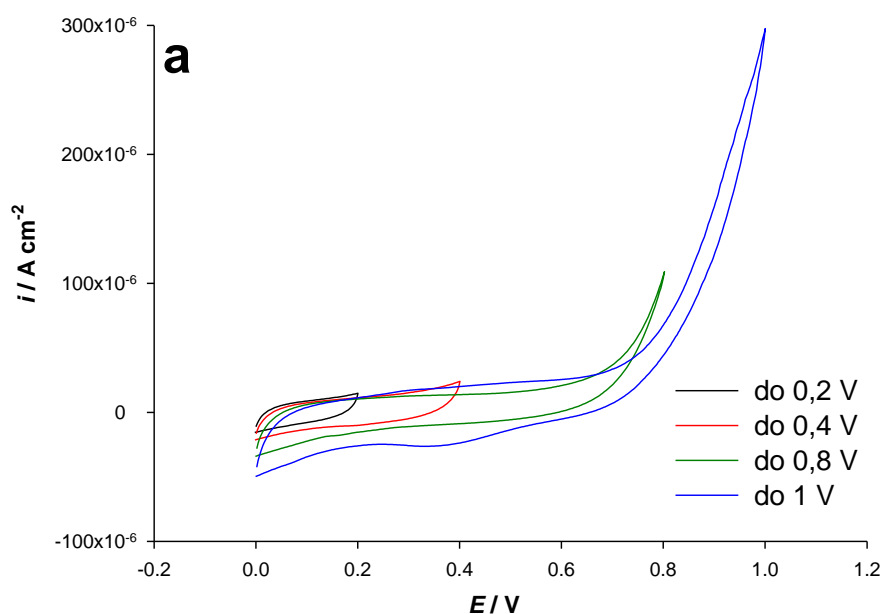
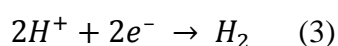
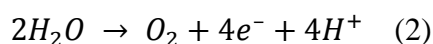
Korištena je elektrokemijska ćelija sa Ag/AgCl kao referentnom, platinskom pločicom kao protuelektrodom te elektrode građene od ugljikove paste kao radne elektrode.

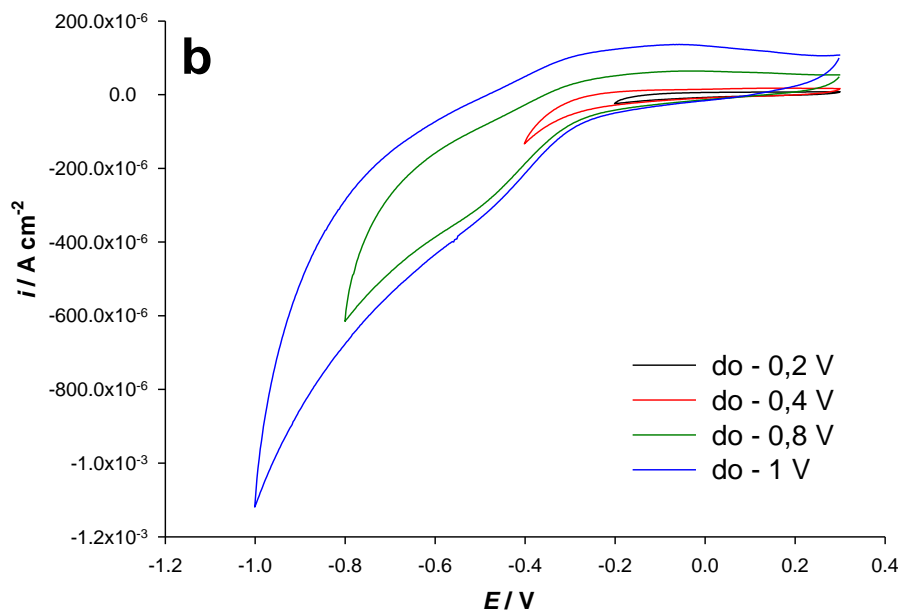
Sva elektrokemijska mjerenja su izvršena s potencijostatom (Autolab PGSTAT 302N) spojenim na osobno računalo (PC), a kojim se upravlja pomoću GPES 4.9 Softwarea (Eco Chemie).

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

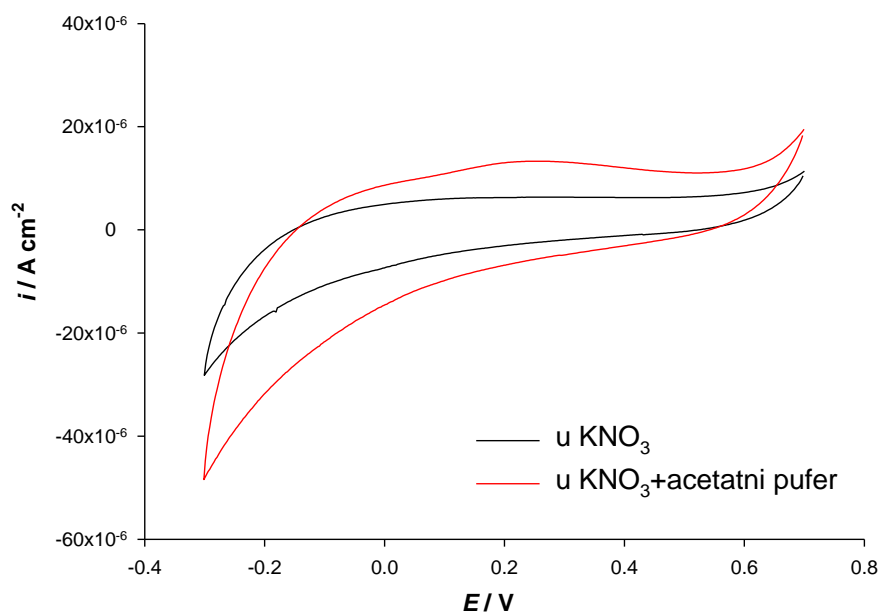
#### 3.1. Elektrokemijsko ponašanje nCPE

Sva mjerenja su rađena na sobnoj temperaturi. Prva ispitivanja bila su usmjerena na određivanje radnog područja nemodificirane elektrode od ugljikove paste (nCPE). U tu svrhu snimani su ciklički voltamogrami (CV) od potencijala otvorenog strujnog kruga (OCP) ka katodnim i anodnim potencijalima. Snimljeni CV su prikazani na Slici 9. Vidljivo je da pri potencijalima većim od +0,8 V dolazi do anodnog izlučivanja kisika (reakcija 2), odnosno pri katodnim potencijalima od -0,4 V do katodnog izlučivanja vodika (reakcija 3). U skladu s dobivenim rezultatima za radno područje elektroda temeljenih na ugljikovoj pasti odabrano je područje od -0,3 do +0,7 V.



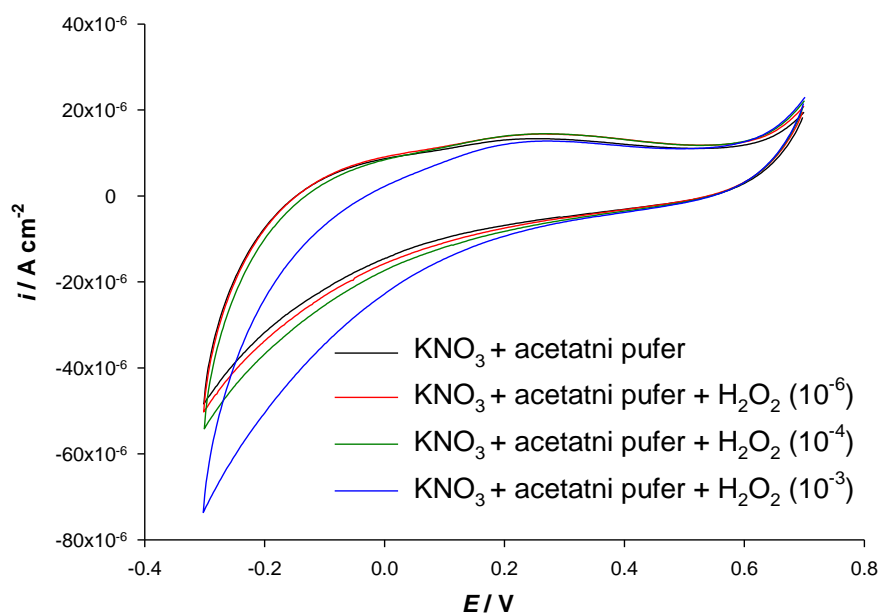


**Slika 9** – Utjecaj anodne (a) i katodne (b) granice na CV nCPE u  $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$ .



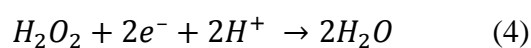
**Slika 10** – Utjecaj acetatnog pufera (pH 4) na CV nCPE.

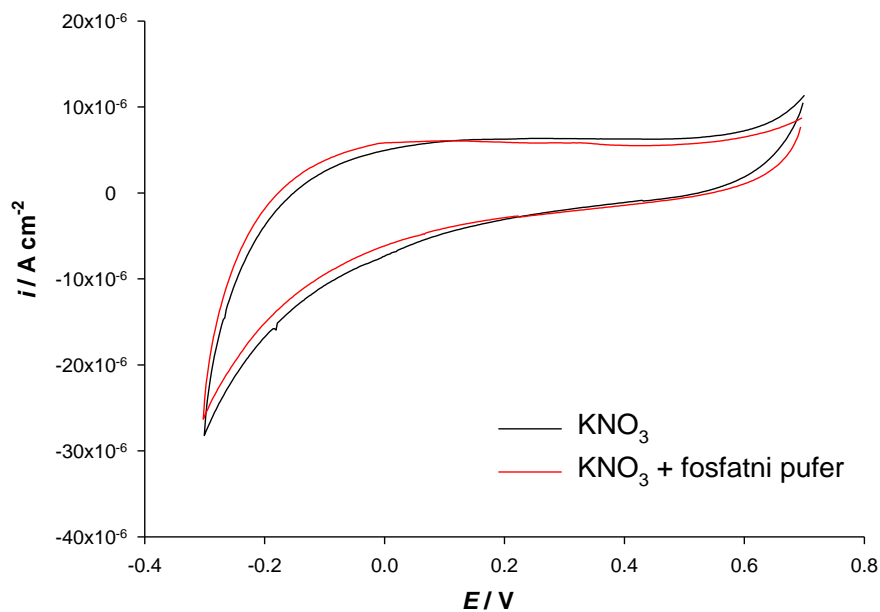
Na Slici 10 prikazan je CV nCPE u odabranom području potencijala u prisutnosti acetatnog pufera. Iz CV je vidljivo povećanje osnovne struje u odnosu na CV koji je snimljen u  $\text{KNO}_3$  što odgovara promjeni ionske jakosti. Nadalje, izraženija je reakcija katodnog izlučivanja vodika što je u skladu s pH vrijednošću otopine.



**Slika 11** – Utjecaj dodatka vodikovog peroksida ( $\text{mol dm}^{-3}$ ) na CV nCPE pri pH 4.

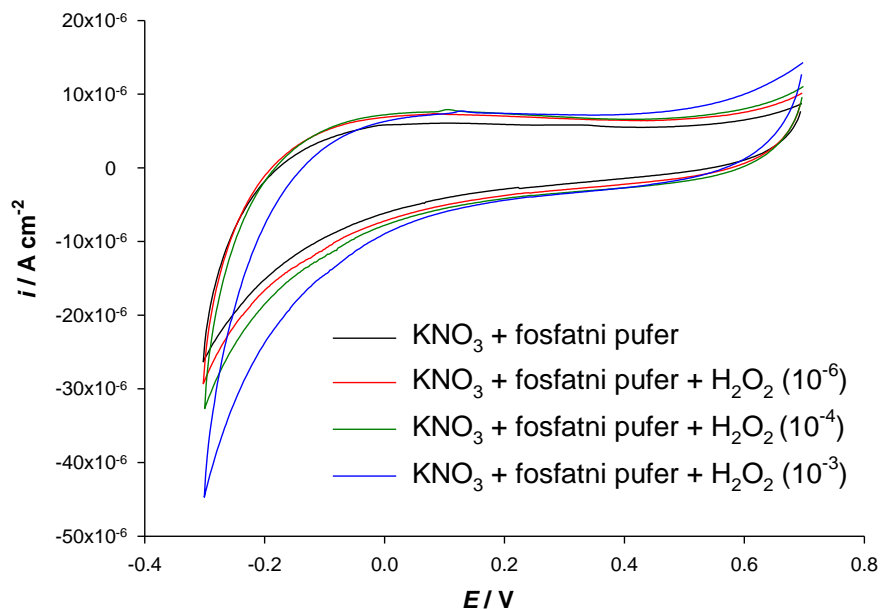
Moguća katalitička svojstva nCPE naspram elektrokemijske oksidacije ili redukcije vodikovog peroksida u kiselom mediju, u datom području potencijala, ispitivana su snimanjem CV u prisutnosti različitih koncentracija peroksida. Snimljeni CV prikazani su na Slici 11. Iz CV vidljive su nešto izraženije katodne struje pri koncentraciji peroksida  $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , vjerojatno kao posljedica katodne redukcije peroksida. Prema tome značajnije promjene CV s dodatkom vodikovog peroksida nisu uočene.





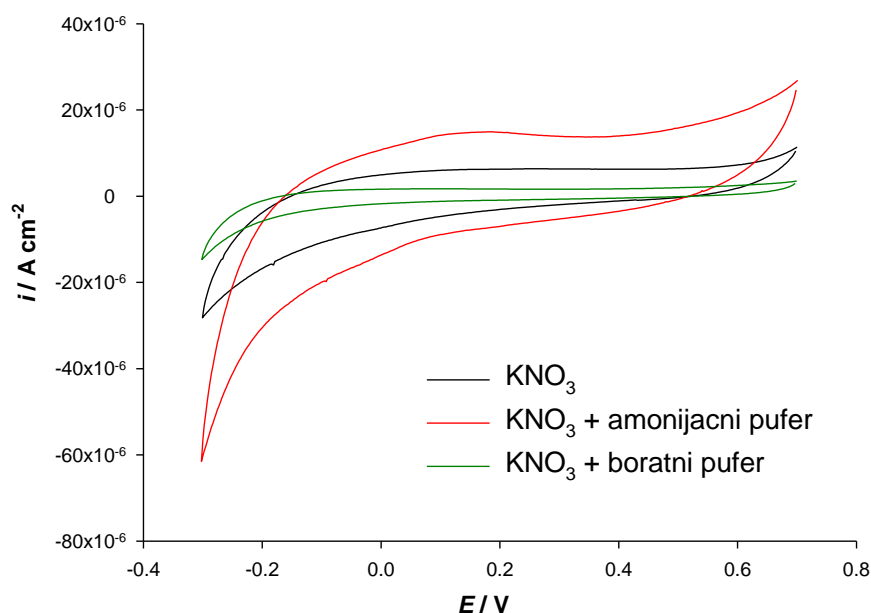
**Slika 12** – Utjecaj fosfatnog pufera (pH 7) na CV nCPE.

Na Slici 13 prikazan je CV nCPE u odabranom području potencijala u prisutnosti fosfatnog pufera. Iz CV nisu vidljive značajnije promjene s dodatkom fosfatnog pufera.



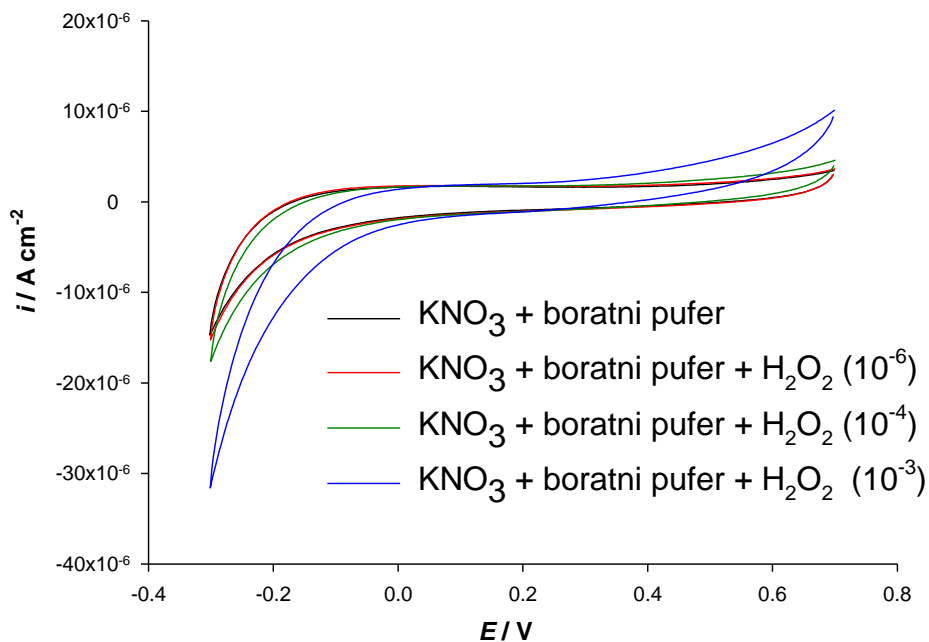
**Slika 13** – Utjecaj dodatka vodikovog peroksida ( $\text{mol dm}^{-3}$ ) na CV nCPE pri pH 7.

Moguća katalitička svojstva nCPE naspram elektrokemijske oksidacije ili redukcije vodikovog peroksida u neutralnom mediju, u datom području potencijala, ispitivana su snimanjem CV u prisutnosti različitih koncentracija peroksida. Snimljeni CV prikazani su na Slici 13. Iz CV vidljive su nešto izraženije katodne struje pri koncentraciji peroksida  $10^{-3}$   $\text{mol dm}^{-3}$ , vjerojatno kao posljedica katodne redukcije peroksida. U odnosu na CV pri istim koncentracijama vodikovog peroksida pri pH 4, katodne struje nešto su manje, što je i u skladu s reakcijom 4. Prema tome značajnije promjene CV s dodatkom vodikovog peroksida nisu uočene.



**Slika 14** – Utjecaj boratnog (pH 9) i amonijačnog (pH 9) pufera na CV nCPE.

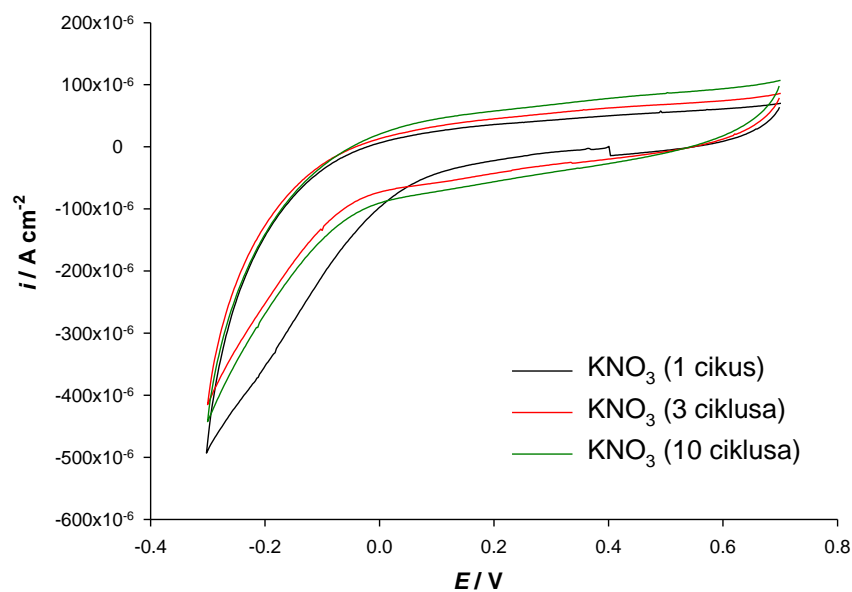
Utjecaj vrste pufera pri pH 9 na CV snimljene na nCPE prikazani su na Slici 14. Iz CV vidljive su znatno veće osnovne struje u slučaju kada je kao pufer korištena amonijačna otopina. U skladu s dobivenim rezultatima zbog manjih osnovnih struja mjerenja pri pH 9 rađena su s boratnim puferom.



**Slika 15** – Utjecaj dodatka vodikovog peroksida ( $\text{mol dm}^{-3}$ ) na CV nCPE pri pH 9.

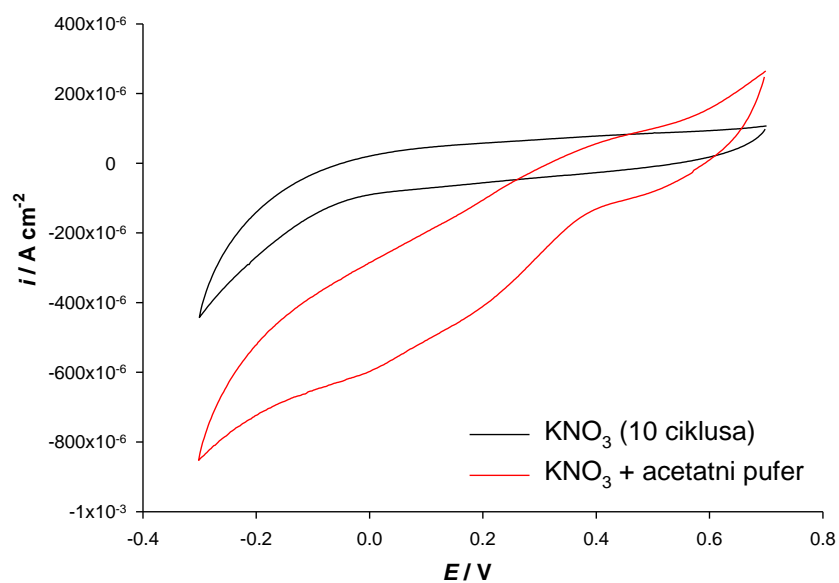
Moguća katalitička svojstva nCPE naspram elektrokemijske oksidacije ili redukcije vodikovog peroksida u lužnatom mediju, u datom području potencijala, ispitivana su snimanjem CV u prisutnosti različitih koncentracija peroksida. Snimljeni CV prikazani su na Slici 15. Iz CV vidljive su nešto izraženije katodne struje pri koncentraciji peroksida  $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , vjerojatno kao posljedica katodne redukcije peroksida. U odnosu na CV pri istim koncentracijama vodikovog peroksida pri pH 4 i pH 7, katodne struje još su nešto manje, što je i u skladu s reakcijom 4. Prema tome značajnije promjene CV s dodatkom vodikovog peroksida nisu uočene.

### 3.2. Elektrokemijsko ponašanje mCPE



**Slika 16** – Utjecaj broja ciklusa na CV za elektrodu modificiranu s 5%  $\text{MnO}_2$  (mCPE) u  $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$ .

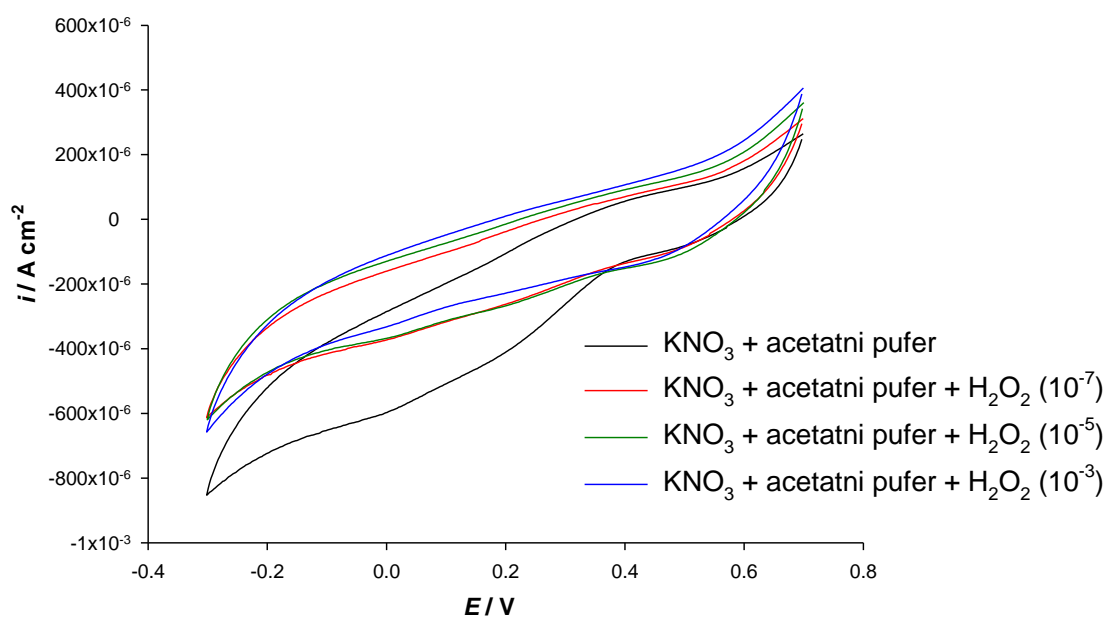
Radi uvida u moguće elektrokemijske reakcije  $\text{MnO}_2$ , snimljeni su CV elektrode modificirane s 5%  $\text{MnO}_2$  s različitim brojem ciklusa. Na Slici 16 nije vidljiv utjecaj broja ciklusa na CV mCPE.



**Slika 17** – Utjecaj acetatnog pufera (pH 4) na CV mCPE.

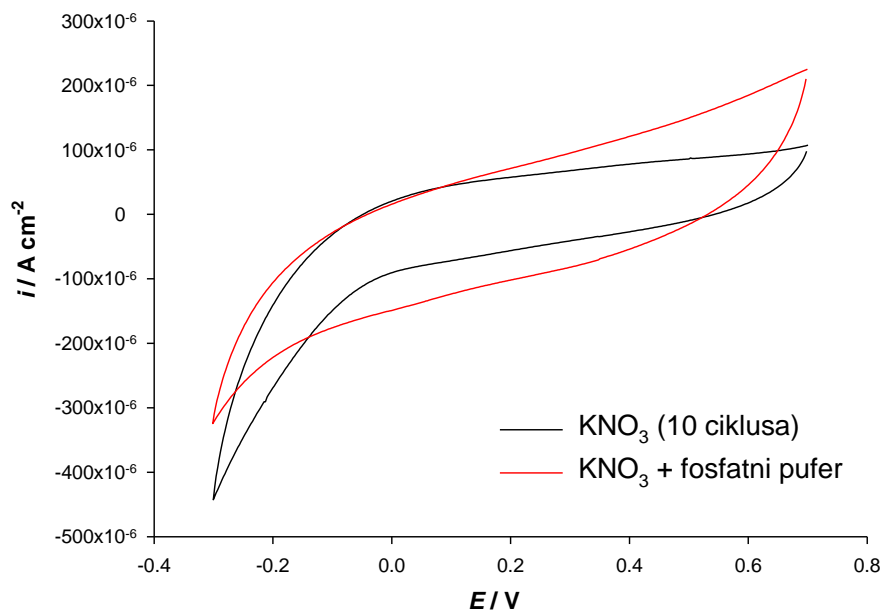


Na Slici 17 prikazan je CV mCPE u odabranom području potencijala u prisutnosti acetatnog pufera. Iz CV je vidljivo povećanje osnovne struje u odnosu na CV snimljen u  $\text{KNO}_3$ , zajedno s izraženijom reakcijom katodnog izlučivanja vodika što je u skladu s pH vrijednošću otopine i možebitnog elektrokatalitičkog djelovanja  $\text{MnO}_2$  na reakciju 3.



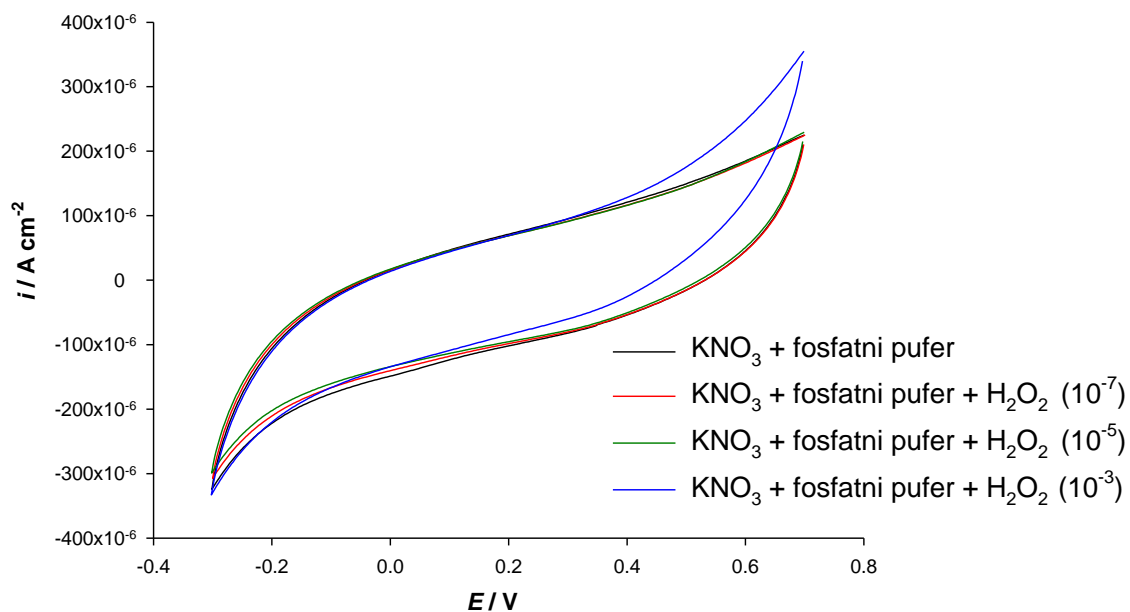
**Slika 18** – Utjecaj dodatka vodikovog peroksida ( $\text{mol dm}^{-3}$ ) na CV mCPE pri pH 4.

Moguća katalitička svojstva mCPE naspram elektrokemijske oksidacije ili redukcije vodikovog peroksida u kiselom mediju, u datom području potencijala, ispitivana su snimanjem CV u prisutnosti različitih koncentracija peroksida. Snimljeni CV prikazani su na Slici 18. Iz CV vidljive su nešto manje katodne struje pri dodatku peroksida, vjerojatno kao posljedica slabije katodne redukcije vodika na površini modificirane elektrode zbog prisutnosti vodikovog peroksida i uloge vodikovih kationa kod njegove redukcije. Prema tome značajnije promjene CV s dodatkom vodikovog peroksida nisu uočene.



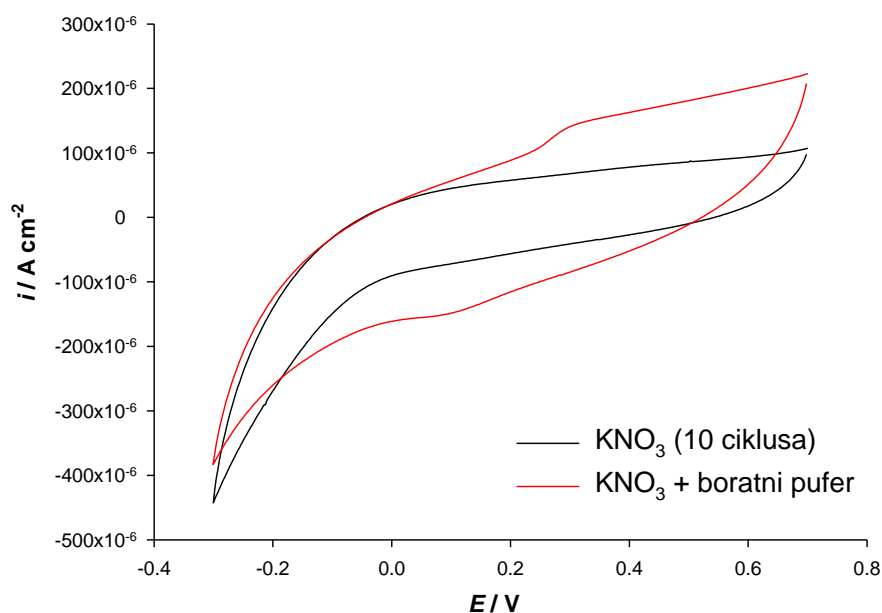
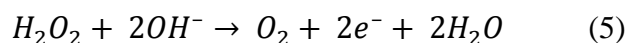
**Slika 19** – Utjecaj fosfatnog pufera (pH 7) na CV mCPE.

Na Slici 20 prikazan je CV mCPE u odabranom području potencijala u prisutnosti fosfatnog pufera. Iz CV nisu vidljive značajnije promjene s dodatkom fosfatnog pufera, osim nešto većih osnovnih struja u anodnom području potencijala.



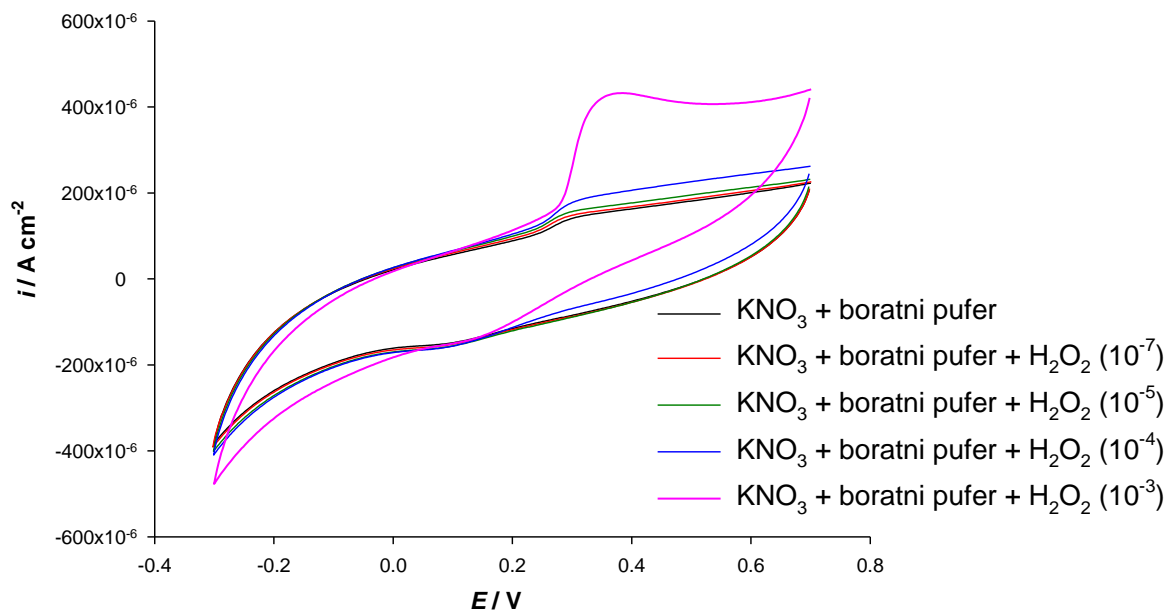
**Slika 20** – Utjecaj dodatka vodikovog peroksida ( $\text{mol dm}^{-3}$ ) na CV mCPE pri pH 7.

Moguća katalitička svojstva mCPE naspram elektrokemijske oksidacije ili redukcije vodikovog peroksida u neutralnom mediju, u datom području potencijala, ispitivana su snimanjem CV u prisutnosti različitih koncentracija peroksida. Snimljeni CV prikazani su na Slici 20. Iz CV vidljiva je nešto izraženija anodna struja pri koncentraciji peroksida  $10^{-3}$  mol $\text{dm}^{-3}$ , vjerojatno kao posljedica anodne oksidacije peroksida. U odnosu na CV pri istim koncentracijama vodikovog peroksida pri pH 4, katodne struje nešto su manje, što je i u skladu s reakcijom 5.



**Slika 21** - Utjecaj boratnog pufera (pH 9) na CV mCPE.

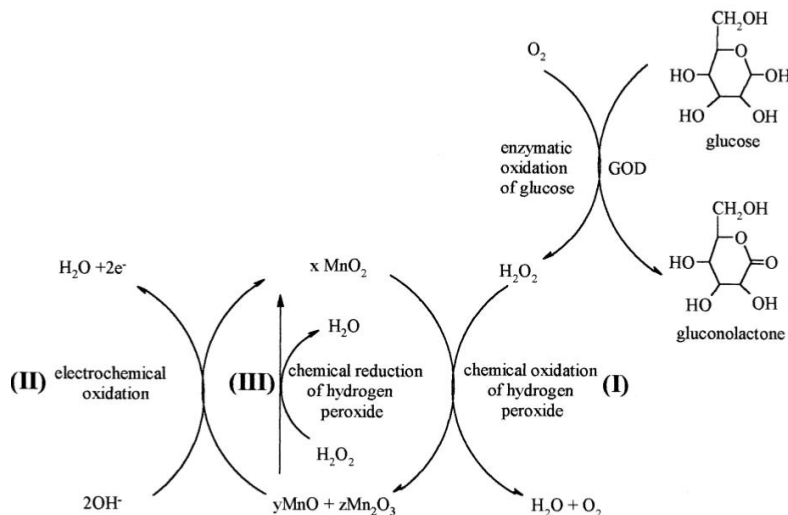
Na Slici 21 prikazan je CV mCPE u odabranom području potencijala u prisutnosti boratnog pufera. Iz CV nisu vidljive značajnije promjene s dodatkom boratnog pufera, osim nešto većih osnovnih struja u mjernom području potencijala.



**Slika 22** – Utjecaj dodatka vodikovog peroksida ( $\text{mol dm}^{-3}$ ) na CV mCPE pri pH 9.

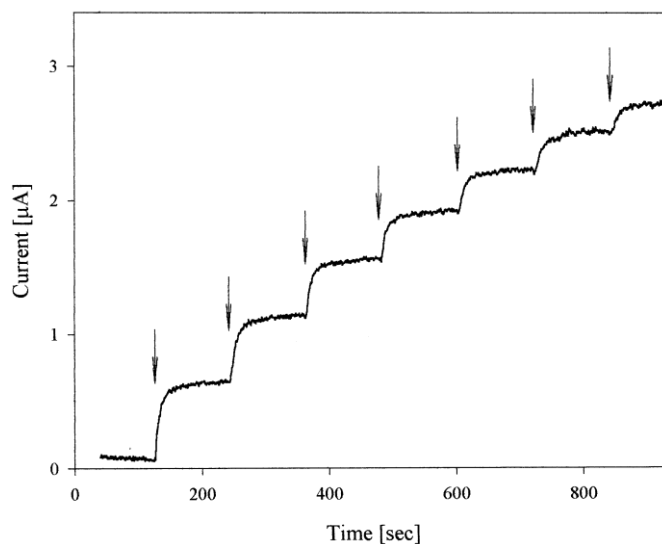
Utjecaj dodatka vodikovog peroksida na CV pri pH 9 za elektrodu mCPE je prikazan na Slici 22. Vidljivo je da do koncentracija peroksida  $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  ova elektroda ne pokazuje elektrokatalitička svojstva. Za koncentracije veće od  $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  dolazi do pojave ireverzibilne oksidacije peroksida. Pojava ovog pika na +0,4 V je u skladu s jednadžbom 5 u lužnatom mediju. Iz CV nije vidljiv katodni pik.

U skladu s uočenim rezultatima, može se zaključiti da je moguće ovako modificiranu elektrodu koristiti kao pretvornik za neke enzimske reakcije u kojima sudjeluje vodikov peroksid, bilo kao reaktant ili produkt te reakcije. Kao jedan od primjera korištenja  $\text{MnO}_2$  kao pretvornika u takvim reakcijama može se navesti razvoj biosenzora za određivanje glukoze u krvi [30].



**Slika 23** – Reakcijski mehanizam glukoze na elektrodi modificiranoj s  $\text{MnO}_2/\text{GOD}$  bazirane na heterogenom ugljičnom materijalu.

U navedenom istraživanju optimalni maseni udio modifikatora je bio između 3,8 i 5 %. Autori su uporabili tehniku printanja senzora uporabom modificirane ugljikove paste na keramičku podlogu. Na navedeni sloj modificirane ugljikove paste je izliven enzim glukoza oksidaza (GOD) prethodno otopljen u polimeru Nafion<sup>®</sup>. Ovako pripravljen biosenzor je bio korišten za određivanje glukoze u hidrodinamičkim uvjetima pri konstantnom potencijalu od 0,48 V prema Ag/AgCl elektrodi.



**Slika 24** – Hidrodinamički amperogram glukoze na elektrodi modificiranoj s  $\text{MnO}_2/\text{GOD}$  pri: radnom potencijalu od 0,48 V prema Ag/AgCl u fosfatnom puferu pH 7.4 ( $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ); strijelice predstavljaju dodatak  $250 \mu\text{g cm}^{-3}$  glukoze [30].

#### 4. ZAKLJUČAK

1. Nikakve značajnije elektrokemijske promjene se nisu uočile za nemodificiranu elektrodu pri različitim pH vrijednostima dodatkom vodikovog peroksida.
2. Modificirana elektroda (s 5%  $\text{MnO}_2$ ) je pokazala oksidacijski pik pri pH 9 u boratnom puferu kod dodane koncentracije vodikovog peroksida od  $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ .
3. Ova pojava je vezana za oksidaciju  $\text{Mn}_2\text{O}_3/\text{MnO}$  u  $\text{MnO}_2$ , koji je prethodno kemijski reduciran u reakciji s dodanim vodikovim peroksidom.
4. Ova reakcija je potvrda ovog tipa modifikacije kao druge generacije biosenzora za određivanje bioloških vrsta koje kao produkt imaju vodikov peroksid.

## 5. LITERATURA

- [1] A. Vogel, *Textbook of quantitative chemical analysis*, Longma Scientific and Technical, **1989**
- [2] W. H. McCurdy Jr., H. F. Bell, Titrimetric determination of hydrogen peroxide in alkaline solution, *Talanta* **1994**, *13*, 925
- [3] H. Elias, S. Vayssié in *Peroxide Chemistry, Vol.5* (Eds.: A. Waldemar), Wiley-VCH, **2005**, pp. 128-138
- [4] M. Lopez-Lazaro in *Encyclopedia of Cancer* (Eds.: M.Schwab), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, **2007**, pp. 145-316
- [5] W. Conner, Hydrogen peroxide safety issues, *Office of Scientific and Technical Information*, U.S. Department of Energy, **1993**
- [6] C.C. Winterbourn, *Methods in Enzymology, Vol. 528*, Elsevier, **2013**, pp. 3-25
- [7] H. Choi, J. Cuenca, A novel concentration detection method of hydrogen peroxide using microwave cavity perturbation technique, *2014 44th European Microwave Conference*, IEEE, **2014**
- [8] L. Hu, S. Han, *Electrochemistry Communication*, **2011**, *13*, 1536.
- [9] L. Guadagnini, D. Tonelli, M. Giorgetti, Improved performances of electrodes based on Cu<sub>2</sub>-loaded copper hexacyanoferrate for hydrogen peroxide detection, *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 5036
- [10] L. Giannoudi, E. V. Piletska, S. A. Piletsky, *Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevices*, Landes Bioscience, **2006**, pp. 175-191
- [11] C. S. Pundir, R. Deswal, V. Narwal, Quantitative analysis of hydrogen peroxide with special emphasis on biosensors, *Bioproc. Biosyst. Eng* **2017**, *41*, 313
- [12] IUPAC, **1992**, *64*, p. 148
- [13] D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 121

- [14] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, C. Adley, An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors, *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 232
- [15] L. Xuemei, J. G. Kieran, D. Rayan, D. N. Dowling, Whole-Cell Fluorescent Biosensors for Bioavailability and Biodegradation of Polychlorinated Biphenyls, *Sensors* **2010**, *10*, 232
- [16] K. Schachl, *Development of Electrochemical Sensors based on Carbon Electrodes Modified with Manganese Dioxide*, Inaugural Dissertation, Karl-Franzens University, Graz, Austria, **1998**.
- [17] R. Schmidt, F. Scheler, *Biosensors, Fundamentals, Technologies and Applications, Vol. 17*, VCH Publishing, **1992**.
- [18] P. N. Bartlett, P. Tebbutt, R. P. Whitaker, Kinetic aspects of the use of modified electrodes and mediators in bioelectrochemistry, *Prog. React. Kinet.* **1991**, *16*, 55
- [19] L. Gorton, Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells, *Electroanal.* **1995**, *7*, 23
- [20] C. Gondran in *Chemical Sensors and Biosensors, Vol. 13* (Eds.: René Lalauze), ISTE Ltd, **2013**, pp. 313- 333
- [21] S. Yunus, A. M. Jonas, B. Lakard in *Encyclopedia of Biophyscis* (Eds.: G. C. K. Roberts), European Biophysical Societies' Association (EBSA), **2013**, pp. 51-73.
- [22] J. Punter Villagrasa, J. Colomer-Farrarons, *State of Art in Biosensors, Vol. 10*, **2013**.
- [23] D. Zhang, H. Zhao, Z. Fan, A highly sensitive and selective hydrogen peroxide biosensor based on gold nanoparticles and three-dimensional porous carbonized chicken eggshell membrane, *Plos One* **2015**, *10*, 6.
- [24] H. Yue, J. He, D. Xiao, Biosensor for determination of hydrogen peroxide based on *Yucca filamentosa* membrane, *Anal. Methods-UK* **2013**, *5*, 5437.
- [25] S. Mutyala, J. Mathiyarasu, *Materials Science and Engineering: C*, **2016**, *69*,398.
- [26] T. Kondo, A. Tamura, A. Fujishima, T. Kawai, High Sensitivity Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide at a Cobalt Phthalocyanine-Modified Boron-Doped Diamond Electrode, *ECS Transactions* **2008**, *16*, 465
- [27] F. Gruo, X. Xu, Z. Sun, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2011**, pp. 140-145



- [28] A. Kafi, F. Yin, H.-K. Shin, Y.-S. Kwon, *Thin Solid Films*, Vol. 499, Elsevier, **2006**, 86.
- [29] T. K. Behera, S. C. Sahu, B. Satpati, Branched Platinum Nanostructures on Reduced Graphene: An excellent Transducer for Nonenzymatic Sensing of Hydrogen Peroxide and Biosensing of Xanthine, *Electrochim. Acta* **2016**, 206, 238
- [30] E. Turkušić, K. Kalcher, K. Schachl, A. Komersova, M. Bartos, H. Moderegger, I. Svancara, K. Vytras, Amperometric determination of glucose with an MnO<sub>2</sub> and glucose oxidase bulk-modified screen-printed carbon ink biosensor, *Anal. Let.*, 34, **2001**, 15, 2633-2647.