

Poli(vinil-klorid) matrice s kserogel-ugljkovim nanočesticama-AgCuS kompozitima kao osjetilnim elementom za elektrokemijsko određivanje vodikovog peroksida

Bandov, Ivan

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:715344>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-07**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ ORGANSKE KEMIJE I BIOKEMIJE

**POLI(VINIL-KLORID) MATRICE S KSEROGEL-UGLJIKOVIM
NANOČESTICAMA-AgCuS KOMPOZITIMA KAO
OSJETILNIM ELEMENTOM ZA ELEKTROKEMIJSKO
ODREĐIVANJE VODIKOVOG PEROKSIDA**

DIPLOMSKI RAD

IVAN BANDOVIĆ

Matični broj: 67

Split, listopad 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ ORGANSKE KEMIJE I BIOKEMIJE

**POLI(VINIL-KLORID) MATRICE S KSEROGEL-UGLJIKOVIM
NANOČESTICAMA-AgCuS KOMPOZITIMA KAO
OSJETILNIM ELEMENTOM ZA ELEKTROKEMIJSKO
ODREĐIVANJE VODIKOVOG PEROKSIDA**

DIPLOMSKI RAD

IVAN BANDOVIĆ

Matični broj: 67

Split, listopad 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

POLI(VINYL-CHLORIDE) MATRICES WITH XEROGEL-CARBON NANOPARTICLES-AgCuS COMPOSITES AS A SENSITIVE ELEMENT FOR ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF HYDROGEN PEROXIDE

DIPLOMA THESIS

IVAN BANDOVIĆ

Parent number: 67

Split, October 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Splitu

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet

Preddiplomski studij kemije

Tema rada je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Mentor: izv. prof. dr. sc. Marijo Buzuk

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Radovan Metelka, Fakultet kemijskog inženjerstva, Sveučilište u Pardubicama, Pardubice, Češka Republika

POLI(VINIL-KLORID)MATRICE S KSEROGEL-UGLJIKOVIM NANOČESTICAMA- AgCuS KOMPOZITIMA KAO OSJETILNIM ELEMENTOM ZA ELEKTROKEMIJSKO ODREĐIVANJE VODIKOVOG PEROKSIDA

Ivan Bandov, 67

Sažetak: U ovom radu su razvijeni kompozitni materijali sol-gel postupkom koji su sadržavali ugljikove materijale te ugljikove materijale i ternarni sulfid AgCuS. Razvijeni kserogelni kompoziti su upotrijebljeni kao osjetilni elementi u poli(vinil) klorid matricama za modificiranje površine elektrode od staklastog ugljika. Ispitivano je elektrokemijsko ponašanje ovih elektroda u prisutnosti vodikovog peroksida. Elektrokemijski procesi uočeni na elektrodama modificiranim s kompozitima koji su sadržavali AgCuS ukazuju mogućnost direktnog određivanja vodikovog peroksida na anodnim potencijalima od +0,3 V. Mjerenja su vršena pri tri pH vrijednosti (pH 5, 7 i 9) te je kao optimalna pH vrijednost odabrana pH = 9. Kao pogodna metoda pokazala se amperometrija. Amperometrijska mjerenja su pokazala mogućnost određivanja vodikovog peroksida u području koncentracija od 5-90 $\mu\text{g cm}^{-3}$ s osjetljivošću od 1,47 nA $\text{cm}^{-3} \mu\text{g}^{-1}$ i granicom detekcije od 0,12 $\mu\text{g cm}^{-3}$ te granicom određivanja od 0,42 $\mu\text{g cm}^{-3}$.

Ključne riječi: vodikov peroksid, elektrokemijsko određivanje, sol-gel postupak, ciklička voltometrija, amperometrija, sulfidi, modifikacije, elektroda od staklastog ugljika

Rad sadrži: 62 stranica, 36 slika, 5 tablica, 0 priloga, 42 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. **Doc. dr. sc. Maša Buljac** – predsjednik
2. **Doc. dr. sc. Nives Vladislavić** – član
3. **Izv. prof. dr. sc. Marijo Buzuk** – član-mentor

Datum obrane: (30. listopada 2019.)

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Split

DIPLOMA THESIS

Faculty of chemistry and technology

Graduate Study on Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Chemistry and Technology, session no. 19

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Mentor: Marijo Buzuk – PhD, associated prof.

Technical assistance: Radovan Metelka – PhD, associated prof., Faculty of Chemical technology, university in Pardubice, Pardubice, Czech Republic

POLI(VINYL-CHLORIDE) MATRICES WITH XEROGEL-CARBON NANOPARTICLES-AgCuS COMPOSITES AS A SENSITIVE ELEMENT FOR ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF HYDROGEN PEROXIDE

Ivan Bandov, 67

Abstract: This paper investigated the development of composite materials using sol-gel method which contained carbon materials as well as carbon materials with ternary sulfide AgCuS. The developed xerogel composites are used as a sensing element in poly(vinyl-chloride) matrices for modifying the surface of glassy carbon electrodes. Electrochemical behaviour of these electrodes were tested in presence of hydrogen peroxide. The electrochemical behaviour spotted on the electrodes modified with composite AgCuS show the possibility of direct detection of hydrogen peroxide on + 0,3 V anode potential. The measurements were made at three different pH values (pH 5, 7, and 9) and pH 9 was chosen to be the optimal pH value. Amperometry has proved to be a suitable method for measuring. Amperometric measurements have shown a possibility of detection of hydrogen peroxide in concentration ranging from 5 to 90 $\mu\text{g cm}^{-3}$ with the value of sensibility of 1,47 nA $\text{cm}^3 \mu\text{g}^{-1}$, a detection limit of 0,12 $\mu\text{g cm}^{-3}$ and a limit of determination of 0,42 $\mu\text{g cm}^{-3}$.

Keywords: Hydrogen peroxide, electrochemical determination, sol-gel method, cyclic voltammetry amperometry, sulfides, modifications, glassy carbon electrode.

Thesis contains: 62 pages, 36 figures, 5 tables, 0 supplements, 42 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. **Maša Buljac, assistant prof. - chair person**
2. **Nives Vladislavić, assistant prof.assistant prof. member**
3. **Marijo Buzuk- PhD, associated prof. supervisor**

Defence date: (October 30th 2019.)

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 izv. prof. dr. sc. Marija Buzuka i izv. prof. Radovana Metelke, u razdoblju od travnja do listopada 2019. godine.

Zahvala

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

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

Zadatak diplomskog rada

1. Razviti sol-gel kompozit u kojemu će biti inkorporirane ugljikove nanočestice i osjetilni element na bazi ternarnog sulfida AgCuS.
2. Ugraditi razvijeni kompozit u osjetilni sloj s matricom od poli(vinil) klorida te modificirati radnu elektrodu od staklastog ugljika.
3. Ispitati elektrokemijsko ponašanje svih razvijenih elektroda (modificiranih i nemodificiranih) u prisutnosti vodikovog peroksida pri različitim pH vrijednostima pH=5, 7, 9
4. Na osnovu dobivenih rezultata odabrati pogodnu elektrokemijsku metodu i optimirati uvjete za elektroanalitičko određivanje vodikovog peroksida.

SAŽETAK

U ovom radu su razvijeni kompozitni materijali sol-gel postupkom koji su sadržavali ugljikove materijale te ugljikove materijale i ternarni sulfid AgCuS. Razvijeni kserogelni kompoziti su upotrijebljeni kao osjetilni elementi u poli(vinil) klorid matricama za modificiranje površine elektrode od staklastog ugljika. Ispitivano je elektrokemijsko ponašanje ovih elektroda u prisutnosti vodikovog peroksida. Elektrokemijski procesi uočeni na elektrodama modificiranim s kompozitima koji su sadržavali AgCuS ukazuju mogućnost direktnog određivanja vodikovog peroksida na anodnim potencijalima od +0,3 V. Mjerenja su vršena pri tri pH vrijednosti (pH 5, 7 i 9) te je kao optimalna pH vrijednost odabrana pH = 9. Kao pogodna metoda pokazala se amperometrija. Amperometrijska mjerenja su pokazala mogućnost određivanja vodikovog peroksida u području koncentracija od 5-90 $\mu\text{g cm}^{-3}$ s osjetljivošću od 1,47 nA $\text{cm}^3 \mu\text{g}^{-1}$ i granicom detekcije od 0,12 $\mu\text{g cm}^{-3}$ i granicom određivanja od 0,42 $\mu\text{g cm}^{-3}$.

Ključne riječi: vodikov peroksid, elektrokemijsko određivanje, sol-gel postupak, ciklička voltometrija, amperometrija, sulfidi, modifikacije, elektroda od staklastog ugljika

SUMMARY

This paper investigated the development of composite materials using sol-gel method which contained carbon materials as well as carbon materials with ternary sulfide AgCuS. The developed xerogel composites are used as a sensing element in poly(vinyl-chloride) matrices for modifying the surface of glassy carbon electrodes. Electrochemical behaviour of these electrodes were tested in presence of hydrogen peroxide. The electrochemical behaviour spotted on the electrodes modified with composite AgCuS show the possibility of direct detection of hydrogen peroxide on + 0,3 V anode potential. The measurements were made at three different pH values (pH 5, 7 and 9) and pH 9 was chosen to be the optimal pH value. Amperometry has proved to be a suitable method for measuring. Amperometric measurements have shown a possibility of detection of hydrogen peroxide in concentration ranging from 5 to 90 $\mu\text{g cm}^{-3}$ with the value of sensitivity of 1,47 $\text{nA cm}^{-3} \mu\text{g}^{-1}$, a detection limit of 0,12 $\mu\text{g cm}^{-3}$ and a limit of determination of 0,42 $\mu\text{g cm}^{-3}$.

Keywords: Hydrogen peroxide, electrochemical determination, sol-gel method, cyclic voltammetry amperometry, sulfides, modifications, glassy carbon electrode.

Sadržaj

1	OPĆI DIO	3
1.1	Elektrokemijski senzori	4
1.1.1	Građa elektrokemijskog senzora	4
1.1.2	Troelektrodni mjerni sistem	6
1.1.3	Otapala u elektrokemijskim ćelijama	7
1.1.4	Uklanjanje kisika	8
1.2	Vodikov peroksid	10
1.2.1	Važnost određivanja vodikovog peroksida	10
1.2.2	Dosadašnji elektrokemijski senzori za određivanje vodikovog peroksida	11
1.2.3	Berlinsko modriilo	11
1.2.4	Metalni oksidi	12
1.2.5	CuFe_2O_4	13
1.2.6	Grafenski nanokompozit pomiješanom sa zlatom, CuFe_2O_4 i platinastim nanočesticama	13
1.3	AgCuS	14
1.3.1	Elektrode od ugljika	14
1.4	Sol-gel materijali	16
1.4.1	Sol-gel materijali u senzorici	17
1.4.2	Priprava sol-gel kompozita s ugljikovim materijalima	18
1.5	Elektrokemijske metode	21
1.5.1	Voltometrija	23
1.5.2	Ciklička voltometrija	24
1.5.3	Amperometrija	25
1.5.4	Amperometrijski biosenzori	26
2	Eksperimentalni dio	28
2.1	Priprava otopina	29
2.1.1	Priprava osnovnog elektrolita	29
2.1.2	Priprava otopine kalijevog nitrata, KNO_3	30
2.1.3	Priprava otopine CH_3COONa	30
2.1.4	Priprava otopine octene kiseline, CH_3COOH	30
2.1.5	Priprava otopine acetatnog pufera pH 5	30
2.1.6	Priprava otopine natrijevog hidrogenfosfata, Na_2HPO_4	30

2.1.7	Priprava otopine amonijevog klorida, NH_4Cl	30
2.1.8	Priprava otopine fosfatnog pufera; pH 7.....	31
2.1.9	Priprava otopine amonijačnog pufera, pH 9	31
2.1.10	Priprava otopine vodikovogperoksida.....	31
2.2	Aparatura i elektrodni materijal	32
2.2.1	Aparatura.....	32
2.2.2	Priprava radnih elektroda.....	32
2.2.2.1	Sol-gel metoda priprave materijala.....	32
2.2.2.2	Inkorporacija ugljikovih nano cijevi-sinteza kompozitnih materijala	33
2.2.2.3	Inkorporacija ugljikovih nanocijevi i osjetnog materijala (AgCuS)-sinteza kompozitnih materijala.....	33
2.2.2.4	Priprava osjetnog sloja	33
3.1.	Elektrokemijsko ponašanje nGCE	36
3.1.1	Utjecaj pomaka anodne i katodne granice na nGCE	36
3.1.2	Promjena CV-a GCE elektrode dodatkom vodikovog peroksida	39
3.2.	Elektrokemijsko ponašanje H_2O_2 na modificiranoj GCE elektrodi sa kompozitom sol-gel/MWCNT (GCE-MWCNT)	41
3.2.1	GCE elektroda modificirana sa 10 mg kompozita sol-gel/MWCNT (GCE-MWCNT-10)	41
3.2.2	GCE elektroda modificirana sa 30 mg kompozita sol-gel/MWCNT (GCE-MWCNT-30)	43
3.2.3	GCE elektroda modificirana sa 50 mg kompozita sol-gel/MWCNT (GCE-MWCNT-50)	45
3.3.	Elektrokemijsko ponašanje H_2O_2 na modificirane GCE elektrode s kompozitom MWCNT-AgCuS (GCE-MWCNT-AgCuS).....	47
3.3.1	GCE elektroda modificirana sa 10 mg kompozita sol-gel/MWCNT/AgCuS (GCE-MWCNT-AgCuS-10)	47
3.3.2	GCE elektroda modificirana sa 30 mg kompozita sol-gel/MWCNT/AgCuS (GCE-MWCNT-AgCuS-30)	50
3.3.3	GCE elektroda modificirana sa 50 mg kompozita sol-gel/MWCNT/AgCuS (GCE-MWCNT-AgCuS-50)	52
3.4.	Utjecaj posmika	54
3.5.	Amperometrijska mjerenja.....	56
4	Zaključak.....	58
5	Literatura.....	60

UVOD

Sol-gel postupkom razvijeni su kompozitni materijali koji su sadržavali ugljikove materijale te ugljikove materijale i ternarni sulfid AgCuS. Razvijeni kserogelni kompoziti su upotrijebljeni kao osjetilni elementi u poli(vinil) klorid matricama za modificiranje površine elektrode od staklastog ugljika. Ispitivano je elektrokemijsko ponašanje ovih elektroda u prisutnosti vodikovog peroksida. Kao pogodna metoda pokazala se amperometrija.

U ovom radu mjerenja su vršena pri tri pH vrijednosti (pH 5,7 i 9) za određivanje optimalnog pH za mjerenje. Amperometrijska mjerenja su pokazala mogućnost određivanja i detekcije vodikovog peroksida.

1 OPĆI DIO

1.1 Elektrokemijski senzori

Senzori koji pretvaraju djelovanje elektrokemijske interakcije analit-elektroda u koristan električni signal nazivaju se elektrokemijski senzori.¹ Danas je upotreba elektrokemijskih senzora veoma rasprostranjena što ujedno prati i njihova tržišna dostupnost. Ako je princip rada mjerenje potencijala radi se o potenciometrijskim sensorima, a ako se mjerenje temelji na strujnom odzivu radi se o amperometrijskim sensorima te ako mjerenje temelji na različitoj električkoj vodljivosti imamo konduktometrijske senzore. Za svaku od ovih grupa senzora se koriste elektrode posebne konstrukcije zavisno od toga da li se na njima odvija kemijska reakcija ili je prijenos naboja kao posljedica kemijske reakcije. Zahtjev koji mora biti ispunjen da bi elektroda bila npr. amperometrijski senzor je postojanje zatvorenog strujnog kruga kroz koji teče istosmjerna ili izmjenična električna struja. Struja prenosi neku mjernu informaciju koju izražava instrument u obliku definirane veličine. Za električni strujni tok u zatvorenom krugu potrebne su najmanje dvije elektrode od kojih je jedna povratna ili protu-elektroda. Za taj slučaj mjerenja kod potenciometrijskih senzora gdje se potencijal određuje bez strujnog toka, električni krug mora biti zatvoren zbog mjerenja potencijala. Elektrode ovog tipa senzora su najčešće od metala sa katalitičkim svojstvima, elektrode prevučene ugljikom i razne modificirane elektrode. Konstrukcijom elektroda se nastoji napraviti što veća moguća kontaktna površina u datom slučaju da bi reagirala što veća količina analita i time proizvela veći signal. Mogućnost modifikacije elektroda otvara brojne mogućnosti poboljšanja brzine reakcije i radnog vijeka.²

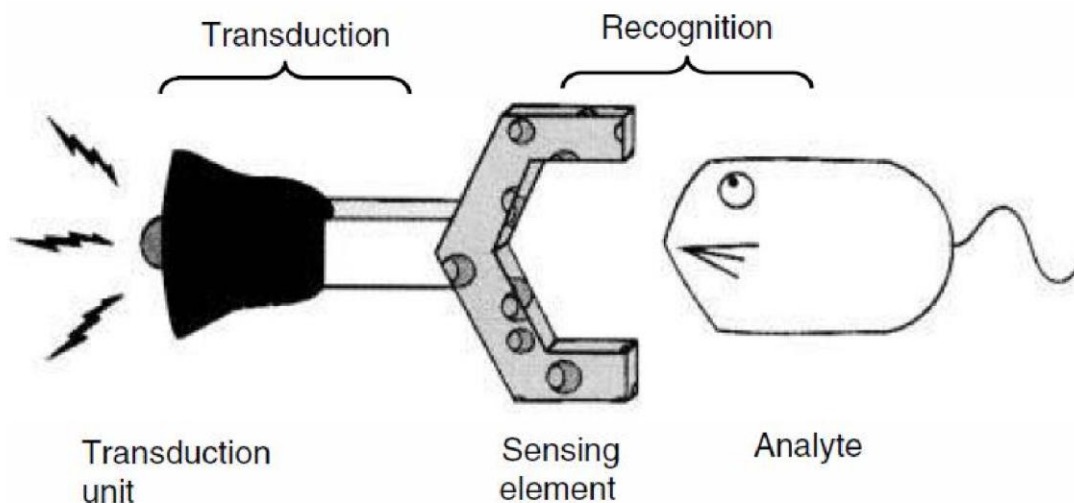
1.1.1 Građa elektrokemijskog senzora

Elektrokemijski senzor se sastoji od 2 dijela (Slika 1):

- Pretvornika (eng. *Transduction unit*)
- Osjetilnog elementa (eng. *Sensing element*)

Analit više ili manje selektivno međudjeluje sa osjetilnim elementom koji pokazuje afinitet za analit. Kao rezultat interakcije između analita i osjetilnog elementa, određena fizikalna i kemijska svojstva osjetilnog elementa se mijenjaju kao funkcija koncentracije analita. Kemijski senzor

pretvara navedenu promjenu u mjerljivu fizičku veličinu. Ovaj proces se zove pretvorba (eng. *transduction*) ili stvaranje signala (eng. *signaling*). Uređaj koji pretvara informaciju iz jednog sustava u drugi zove se pretvornik (eng. *transducer*).³



Slika 1. Elektrokemijski senzor³

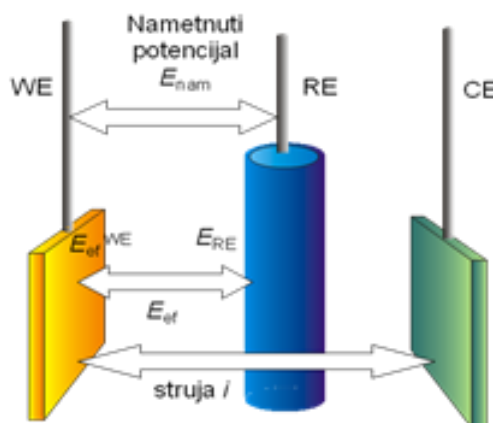
Elektrokemijski senzori su najveća i najstarija grupa kemijskih senzora. Oni odmah stvaraju električni signal što je njihova glavna prednost u odnosu na ostale vrste senzora. To je ujedno i razlog da su sve elektrokemijske metode eksperimentiranja našle svoju primjenu u području kemijskih senzora, a u prilog tome ide i činjenica da se unutar elektrokemije najviše modeliraju praktične izvedbe mjernih tehnika od strane samih elektrokemičara koji poznaju principe na kojima elektrokemijski instrumenti rade kako bi mogli upravljati bitne parametre mjerenja. Time je područje senzora postalo jedno od najvažnijih za primjenu elektrokemije uopće. Prema načinu mjerenja oni se mogu podijeliti u tri podgrupe. Tablica 1.

Tablica 1. Tipovi transducera (pretvarača) i mjerne tehnike elektrokemijskih senzora

Senzor	Princip pretvarača	Izmjerena veličina
Potentciometrijski	Promjena energije	Napon (visoka impedancija)
Amperometrijski i kulonometrijski	Granična gustoća	Struja (niska impedancija)
Konduktometrijski ili impedimetrijski	Otpor	Otpornost (= recipročna vrijedost provodljivosti)

1.1.2 Troelektrodni mjerni sistem

Sustav sa tri elektrode (troelektrodni) je najrasprostranjeniji u elektrokemijskim mjerenjima jer omogućava najbolju kontrolu svih parametara bitnih za izučavanje elektrokemijskih reakcija. Radna elektroda (WE - *Working Electrode*) je mjesto na kojem se događa ciljana reakcija i njena struja je izvor analitičke informacije (Slika 2). Električni signal se formira i mjeri u odnosu na protu-elektrodu (CE – *Counter Electrode*), koja se u nekoj literaturi označava kao pomoćna elektroda (AE – *Auxiliary Electrode*), i na njoj se ne događa reakcija tako da njen materijal ne mora biti katalitički nego inertan kako bi se samo uspostavio strujni tok. Treća elektroda, referentna elektroda (RE – *Reference Electrode*), ima ulogu da omogući zadani raspon potencijala radne elektrode tako da preko sistema povratne sprege u električnom krugu mjernog instrumenta vrši stalnu i trenutnu korekciju strujnih parametara. Referentna elektroda također ispravlja greške koje nastaju uslijed polarizacije radne elektrode i ova elektroda ima veliki unutarnji otpor kako njena struja ne bi bila uključena u glavni strujni tok čime bi se unosila greška. Zapravo je njena struja tako mala da je njen utjecaj, a time i greška zanemariva. Elektrolit je medij koji zatvara strujni krug putem iona umjesto elektrona. Ovakav sustav sastavljen od tri elektrode sa elektrolitom se naziva elektrokemijska ćelija i može raditi pod različitim uvjetima kontrole parametara zavisno od toga koja se veličina ispituje: kapacitet, struja, potencijal ili otpor. Postoje brojne voltametrijske, potenciometrijske, kulometrijske i amperometrijske metode mjerenja koje su u modernim elektrokemijskim instrumentima vođene i kontrolirane odgovarajućim softverima.⁴



Slika 2. Troelektrodni mjerni sistem

1.1.3 Otapala u elektrokemijskim ćelijama

Obzirom da elektrolit može biti vodeni i nevodeni i da od njegovih osobina zavisi kvalitet a i mogućnost izvođenja odgovarajućih mjerenja, razvijeni su brojni sistemi takozvanih pomoćnih elektrolita kojima se puni elektrokemijska ćelija u zavisnosti od specifičnih zahtjeva mjerenja. Izbor medija (elektrolita) određuje se prvenstveno na bazi topljivosti analita i njegovim redoks osobinama te osobinama otapala kao što su električna provodljivost, elektrokemijski aktivitet i kemijska reaktivnost. Otapalo ne smije reagirati sa analitom (ili njegovim produktom) i ne smije ulaziti u elektrokemijske reakcije u rasponu potencijala određivanja.

U vodenim otopinama, na primjer, postoji ograničenje u rasponu potencijala radne elektrode jer dolazi do elektrolize vode što narušava uvjete mjerenja i praktično ga onemogućava.

Ukoliko je u vodenim medijima važno održavanje pH upotrebljavaju se acetatni, fosfatni ili citratni puferski sistemi. Sastav elektrolita može utjecati na selektivnost voltametrijskih određivanja. Tendencija mnogih elektrolita da kompleksiraju metalne ione može se iskoristiti za analizu otopine metala u uzorku, a osim toga maskirajući agensi, kao što je etilendiaminotetraoctena kiselina EDTA, mogu ukloniti neželjene interference.⁴

U slučajevima potrebe da se mjerenje vrši pri višim odnosno nižim potencijalima od razgradnje vode, koriste se nevodena otapala kao što su: acetonitril, propilen karbonat, dimetilformamid (DMF), dimetilsulfoksid (DMSO) ili metanol. Ponekad se upotrebljavaju i mješovita otapla. Dvostruko destilisana voda zadovoljava zahtjeve u većini slučajeva za mjerenja u elektrokemijskoj ćeliji. Trostruko destilisana voda se upotrebljava za analizu tragova pomoću striping analize.

U troelektrodnom sistemu se kontrolira efektivni potencijal radne elektrode preko narinutog potencijala E_{nam} i poznatog potencijala referentne elektrode E_{RE} , (XC)

$$E_{efWE} = E_{nam} - E_{RE}$$

Organska otapala za posebno zahtjevna određivanja moraju se predestilisati. Suport elektroliti imaju ulogu da pri mjerenjima sa kontroliranim potencijalom smanje otpor otapala, uklone elektromigracijske efekte i održavaju stalnu ionsku jakost. Inertni pomoćni elektrolit može biti anorganska sol, mineralna kiselina ili pufer. U vodenim otopinama se najviše upotrebljavaju kalij klorid, kalij nitrat, amonij klorid, natrij hidroksid ili klorna kiselina, a od organskih otapala su

najčešće korišteni tetraalkil amonij soli, a neki od drugih često upotrijebljivanih su prikazani u tablici 2.

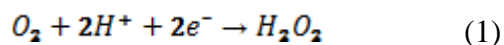
Tablica 2. Fizičko-kemijska svojstva nekih organskih otapala za anorgansku elektrokemiju

Otapalo	Temp raspon tekućine (°C)	Dielektrična konstanta	Viskoznost (cP)	Pomoćni elektroliti
Aceton	od -95 do +56	21	0,32	[NEt ₄][ClO ₄],[NBu ₄][PF ₆], NaClO ₄
Acetonitril	od -45 do +82	36	0,33	[NEt ₄][ClO ₄],[NBu ₄][PF ₆], LiClO ₄
Diklormetan	od -97 do +40	8,9	0,39	[NBu ₄][ClO ₄],[NBu ₄][ClO ₄], [NBu ₄][halogenid]
Trifluorometilbenzen	od -29 do +102	9,2	0,57	[NBu ₄][ClO ₄],[NBu ₄][BF ₄]
Dimetilformamid	od -61 do +153	37	0,80	[NEt ₄][ClO ₄], [NBu ₄][PF ₆], LiCl, NaClO ₄
Dimetilsulfoksid	od +18 do +189	47	1,99	[NEt ₄][ClO ₄], NBu ₄ PF ₆
Tetrahidrofuran	od -108 do +66	7,6	0,55	LiClO ₄ , [NBu ₄][PF ₆], NaClO ₄

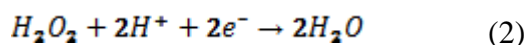
1.1.4 Uklanjanje kisika

Uklanjanje kisika koji je normalno prisutan u destiliranoj vodi do nivoa njegove topljivosti za datu temperaturu vrši se pomoću inertnih plinova. U nekim slučajevima je on neophodan kao pomoćni reagens da bi se odvijala željena reakcija kao što je oksidacija glukoze katalizirana enzimom glukoza oksidaza u radu biosenzora za glukozu. U mnogim drugim slučajevima je kisik potrebno ukloniti iz pufera zbog ometanja ciljanog procesa. Kisik se elektrokemijski spontano uklanja kroz dvije dvoelektronske reakcije redukcije:

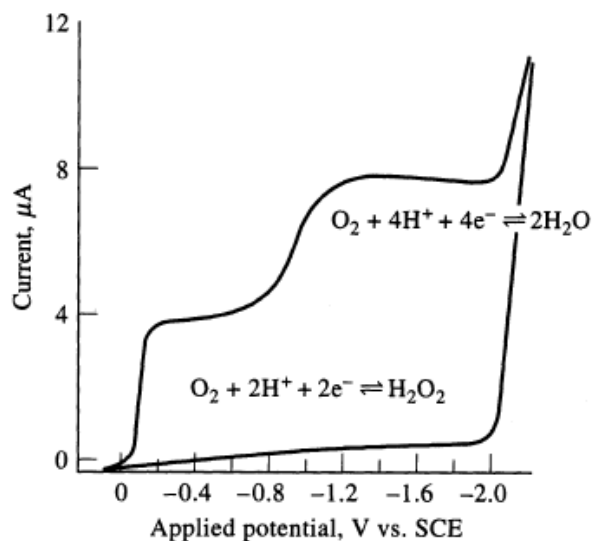
Prva reakcija odgovara formiranju vodika peroksida:



A druga reakcija odgovara redukciji vodika preoksida:



Potencijali ove dvije reakcije u zavisnosti od vrste medija iznose oko -0,1 i -0,9 V (vs. SCE; zasićena kalomelova elektroda). Velika noseća struja (background current) uzrokovana ovim postupnim smanjenjem koncentracije kisika u elektrolitu ometa mjerenje mnogih reducirajućih analita. Produkti redukcije kisika mogu i dodatno utjecati na elektrokemijski proces koji se ispituje. U ovakvim slučajevima se primjenjuje neka od mnogih metoda za uklanjanje kisika iz otopine. Najčešća metoda je barbotiranje pufera sa nekim elektrokemijski inertnim plinom, dušikom ili argonom.⁵



Slika 3. Elektrokemijska eliminacija otopljenog kisika iz otopine

1.2 Vodikov peroksid

1.2.1 Važnost određivanja vodikovog peroksida

Vodikov peroksid nastaje u peroksisomima i kloroplastima reakcijama oksidacije. Također nastaje u mitohondrijima biljaka u transportnom lancu elektrona i oksidacijskoj fosforilaciji.⁶ Kao jedan od reaktivnih spojeva kisika vodikov peroksid je prirodni produkt metabolizma te nastaje u neenzimskim i enzimskim reakcijama. Vodikov peroksid može nastati na nekoliko načina: oksalat oksidaza katalizira stvaranje vodikovog peroksida i ugljikovog dioksida iz oksalata u prisutnosti kisika, a amino oksidaza katalizira oksidaciju biogenih amina u aldehide uz oslobađanje amonijaka i vodikovog peroksida. Vodikov peroksid inaktivira brojne metaloenzime jer u prisutnosti metala formira visoko reaktivni hidroksilni radikal. Zbog važnosti vodikovog peroksida (H_2O_2) u biološkim sustavima i praktičnim primjenama, razvoj učinkovitih elektrokemijskih senzora H_2O_2 posebno je važan. Za razvoj H_2O_2 senzora primijenjeni su različiti materijali temeljeni na prijelaznim spojevima metala. Sinergijski učinak između nanotehnologije i elektrokemijskog određivanja H_2O_2 posebno predmet interesa zadnjih godina.

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

H_2O_2 se može oksidirati ili reducirati izravno na običnim čvrstim elektrodama. Međutim, ti procesi u analitici ograničeni su kinetikom reakcije, dok će visok potencijal smanjiti senzorsku osjetljivost izazvati interferencije od drugih postojećih elektro aktivnih vrsta u stvarnim uzorcima

kao što su askorbat, urat, bilirubin itd. Stoga se sadašnje istraživanje otkrivanja H_2O_2 uglavnom fokusira na modifikacije elektroda kako bi smanjili visoki potencijal i povećali kinetiku prijenosa elektrona.

1.2.2 Dosadašnji elektrokemijski senzori za određivanje vodikovog peroksida

U svrhu određivanja vodikovog peroksida, kao osjetilni materijali, upotrijebljen je veliki broj materijala kao što su redoks proteini, prijelazni metali, metalni oksidi, metalni ftalocijanini, metalni porfirini, redoks polimeri i ugljikove nano-cijevi. U drugu ruku, zadnjih godina, nanomaterijali su privukli ogroman interes zbog njihovog poželjnih kemijskih, fizikalnih i elektronskih svojstava koji se razlikuju od krupnih (makro) materijala. Dimenzije i strukture od nanomaterijala mogu biti prilagođeni dizajnu novih osjetilnih platformi i poboljšati osjetljivost.⁷

1.2.3 Berlinsko modriilo

Željezov heksacijanoferat ili berlinsko modriilo (BP) je umjetna peroksidaza, tj. reducirana forma PB-a, Berlinsko bijelo, je u stanju da katalizira redukciju od H_2O_2 na niskim potencijalima kao ostale peroksidaze.^{7,8} PB ima dobra katalitička svojstva prema H_2O_2 zbog polikristalne strukture koja omogućava samo prolaz malih molekula kroz kristalnu rešetku a sprječava prolaz ostalih većih molekula kao što su askorbinska kiselina (AA), mokraćne kiseline (UA) i *para*-acetilaminofenola (APAP). Zbog toga, PB i na PB bazirani spojevi su bili detaljno proučavano i imali široku upotrebu u biosenzorskim konstrukcijama.^{7,9,10} Najčešća upotreba od PB-a u detekciji H_2O_2 je elektrokemijsko obavijanje površine radne elektrode sa PB-om nakon čega se nanose dodatni slojevi koji mogu biti korišteni za unošenje enzima, stabilizaciju PB-a, povećavanje selektivnosti, i sl.

Glavni nedostatak od PB elektroda je njihova nestabilnost u neutralnim i alkalnim otopinama jer reducirana forma, Berlinsko bijelo, se otapa u dodiru da hidroksidnim ionima.^{11,12} Zato je potrebno povećati stabilnost pri relativno visokim pH vrijednostima. Sva sreća postoje studije koje su pokazale da se s pomoću surifkanata kao što su cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) ili polivinilpirolidon mogu učinkovito povećati stabilnost od metalnih heksacijanoferata.¹³

1.2.4 Metalni oksidi

Neki tranzicijski metalni oksidi kao što su manganov oksid,^{14,15-22} kobaltov oksid,²³ titanov oksid,²⁴ bakrov oksid²⁵ i iridijev oksid²⁶ pokazali su elektrokatalitičku aktivnost prema H₂O₂. Međutim, mnogi od njih su navedeni na osnovi elektrokatalitičke oksidacije H₂O₂ pri kojoj su se koristili visoki naponi na radnoj elektrodi. Kao npr., MnO₂ nanočestice i diheksadecil hidrogenfosfat kompozitni film modificirana elektroda je korištena u određivanju H₂O₂ na potencijalu od +0.65V (vs. zasićene kalomelove elektrode (SCE))²⁷ i TiO₂ /MWCNT modificirana elektroda na potencijalu od +0.4 V (vs. Ag/AgCl).²⁸ S aplikacijskog stajališta, radni potencijali senzora su previsoki da bi bili korišteni u biološkim uzorcima.

MnO₂/MWCNT modificirane elektrode za određivanje H₂O₂ su pokazala velika protu-interferencijska svojstva i bez korištenja permselektivnih membrana za AA, limunsku kiselinu i UA unatoč korištenju visokih radnih potencijala od +0.45 V (vs. Ag/AgCl). MnO₂ nanonočestice modificirane elektrode pokazuju elektokatalitička svojstva i prema redukciji i oksidaciji H₂O₂. Kada je ova elektroda bila radila pod naponom od 0 V (vs. Ag/AgCl) u H₂O₂ redukcijskom putu, izrazito je potisnuta interferencija sa AA.²²

Bakrov oksid je najviše odgovarajući materijal za određivanje H₂O₂. CuO/CPE elektrode pokazale su odličnu elektrokatalitičku aktivnost na oksidaciju i redukciju od H₂O₂. Ova elektroda je radila na potencijalu od -0.1 V (vs. Ag/AgCl) za određivanje glukoze.²⁵

Magnetit (Fe₃O₄) ima dobra katalitička svojstva na redukciju H₂O₂. Fe₃O₄ /citosan modificirane stakleno karbonske rotirajuće disk elektrode za detekciju H₂O₂ posjeduju posebna svojstva elektrokatalitičke redukcije i interferencijske eliminacije. Ovaj senzor je pokazao prednosti jer radi na malim primijenjenim potencijalima od 0.2 V (vs Ag/AgCl), niske pozadinske struje, daje brz odgovor te vrijeme polu života elektrode je dosta dug (9 mjeseci na sobnoj temperaturi).²⁹

1.2.5 CuFe₂O₄

Za određivanje vodikovog peroksida (H₂O₂) dizajniran je vrlo osjetljivi voltametrijski senzor temeljen na elektrodama od paste ugljikovih materijala (reducirani grafenski oksid) modificiranim s CuFe₂O₄ (RGO / CuFe₂O₄ / CPE). Elektrokatalitička redukcija H₂O₂ ispitivana je primjenom različitih tehnika kao što su ciklička voltometrija (CV), kronoamperometrija, amperometrija. Nanočestice CuFe₂O₄ sintetizirane su metodom sutaloženja i karakterizirane s elektronskom skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM), transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM), rendgenskom difrakcijom (XRD). Zatim je pripravljena elektroda od ugljikove modificirana s nanočesticama RGO i CuFe₂O₄ prikladna za određivanje vodikovog peroksida. Pod optimalnim uvjetima (pH 5), modificirana elektroda pokazala je brz amperometrijski odgovor od < 2s, dobar linearni raspon od 2 do 200 μM, niske granice detekcije od 0,52 μM za određivanje vodikovog peroksida. Isto tako, vršna struja diferencijalne pulsne voltametrije (DPV) vodikovog peroksida linearno se povećava s povećanjem koncentracije od 2 do 10 uM i 10 do 1000 uM. Dobivena granica detekcije za vodikov peroksid procijenjena je na 0,064 μM pomoću DPV. Dizajniran senzor uspješno je primijenjen za ispitivanje vodikovog peroksida u biološkim i farmaceutskim uzorcima kao što su mlijeko, zeleni čaj i krem boje za kosu i otopini za ispiranje usta.

1.2.6 Grafenski nanokompozit pomiješanom sa zlatom, CuFe₂O₄ i platinastim nanočesticama

Visoke razine H₂O₂ se odnose na visoki oksidacijski stres i povezane su s karcinomom, autoimunim i neurodegenerativnim bolestima i drugim srodnim bolestima. U ovom je istraživanju napravljen osjetljiv H₂O₂ biosenzor za procjenu oksidacijskog stresa na osnovi nanokompozita grafen oksida (RGO) pomiješanog s Au, Fe₃O₄ i Pt nanočesticama (RGO / AuFe₃O₄ / Pt) modificirane staklene ugljikove elektrode (GCE) i koristi se za otkrivanje otpuštenog H₂O₂ iz stanica raka i procjenu oksidacijskog stresa izazvanog zbog H₂O₂ u živim stanicama. Elektrokemijsko ponašanje nanokompozita RGO / AuFe₃O₄ / Pt pokazuje dobru osjetljivost, nizak prenapon od 0 V, niske granice detekcije od ~ 0,1 μM, velik linearni raspon od 0,5 μM do 11,5 mM i izvrsnu ponovljivost. Tako pripremljeni biosenzor primijenjen je u mjerenju protoka H₂O₂ iz živih stanica uključujući zdrave normalne stanice i tumorske stanice

pod vanjskom stimulacijom. Rezultati pokazuju da je ovaj novi biosenzor temeljen na nanokompoziciji obećavajući kandidat neenzimatskog H_2O_2 senzora koji ima mogućnost primjene u kliničkoj dijagnostici za procjenu oksidativnog stresa različitih vrsta živih stanica.³⁰

Isto tako MnO_2/C nanokompozitne elektrode pripremljene su uranjanjem vodljive Ni pjene ili Ti folija u otopinu Mn-oleata / heksana dulje vrijeme. Ove elektrode bile su korištene za detekciju vodikovog peroksida (H_2O_2) u rasponu potencijala od 0,01-3,0 V korištenjem Ag / AgCl referentne elektrode. Uočena je značajna promjena gustoće struje u prisutnosti H_2O_2 . Postignuta je ravnoteža unutar vremenskog razdoblja od 5-10 s. Ograničenje detekcije za ove senzore je 2 μM .³⁰

1.3 AgCuS

Uporaba ternarnih srebro bakrovih sulfida, kao potencijalnih medijatora za elektrokemijsko određivanje vodikovog peroksida je ispitivano u radu (referenca Vukadin). U tu svrhu pripravljene su elektrode od ugljikove paste s različitom količinom medijatora. Elektrokemijski procesi uočeni na ovako modificiranim elektrodama ukazuju na mogućnost direktnog određivanja vodikova peroksida i amonijaka. Mjerenja su vršena pri tri pH vrijednosti (pH=5, 7 i 9) te je kao optimalna pH vrijednost odabrana pH=5. Elektroanalitičko određivanje vodikovog peroksida je vršeno amperometrijom, a preliminarna istraživanja cikličkom voltametrijom, koja su otkrila da su elektrokemijski procesi na površini elektrode kontrolirani difuzijom i adsorpcijom.

1.3.1 Elektrode od ugljika

Najviše korištena matrica koja je bila korištena za izradu elektroda je ona na bazi ugljikove paste (*CPE – Carbon Paste Electrodes*). Elektrodni materijal u obliku paste je jednostavan za rukovanje i ispunu komercijalnih elektrodnih tijela ali i onih koja se veoma lako mogu napraviti u svakom laboratoriju.

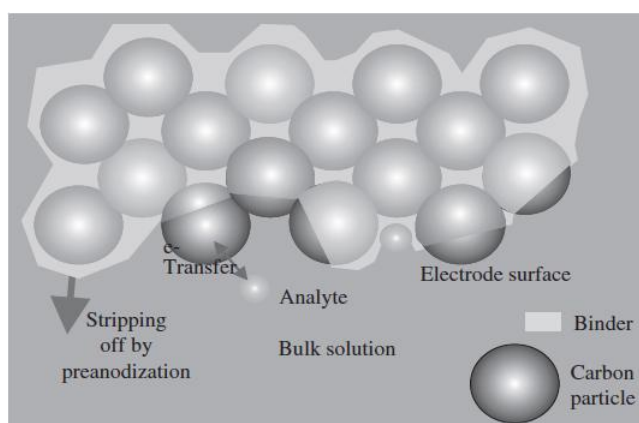
Elektrode izrađene od ugljika trebaju zadovoljiti sljedeće osobine:

- netopljivost u mjernom elektrolitu, koji je najčešće vodena otopina, zbog sprječavanja dezintegracije elektrodnog materijala;

- mali napon pare zbog potrebe stabilnosti elektrode u dužem vremenskom periodu;
- elektrokemijska inertnost u području potencijala primjene za slučajeve potenciometrijskih i amperometrijskih mjerenja kako bi se postigla što manja ”pozadinska struja” (*background current*).

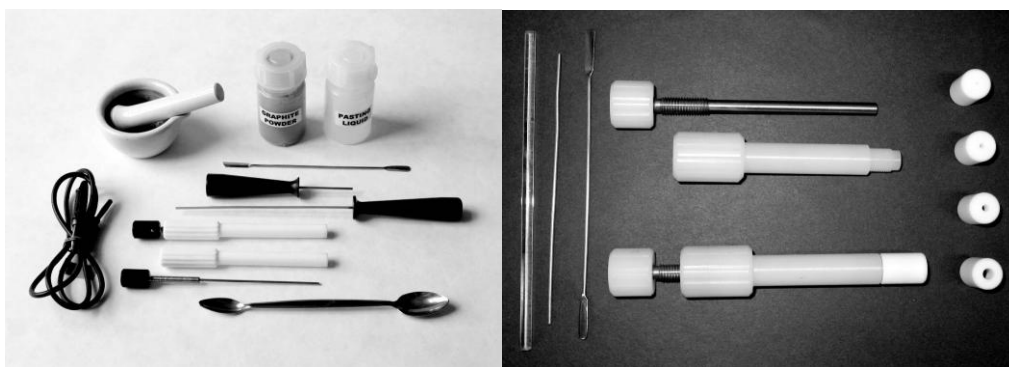
Opisani su i načini konstrukcije i najvažniji načini primjene nemodificiranih i modificiranih elektroda u anorganskoj, biokemijskoj i farmaceutskoj analizi. Ubrzo zatim, objavljuje se studija o upotrebi CPE modificiranih enzimima, tkivima i ćelijama, u elektroanalitičke svrhe. Modifikacija se izvodi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

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



Slika 4. Model obične ugljik elektrode

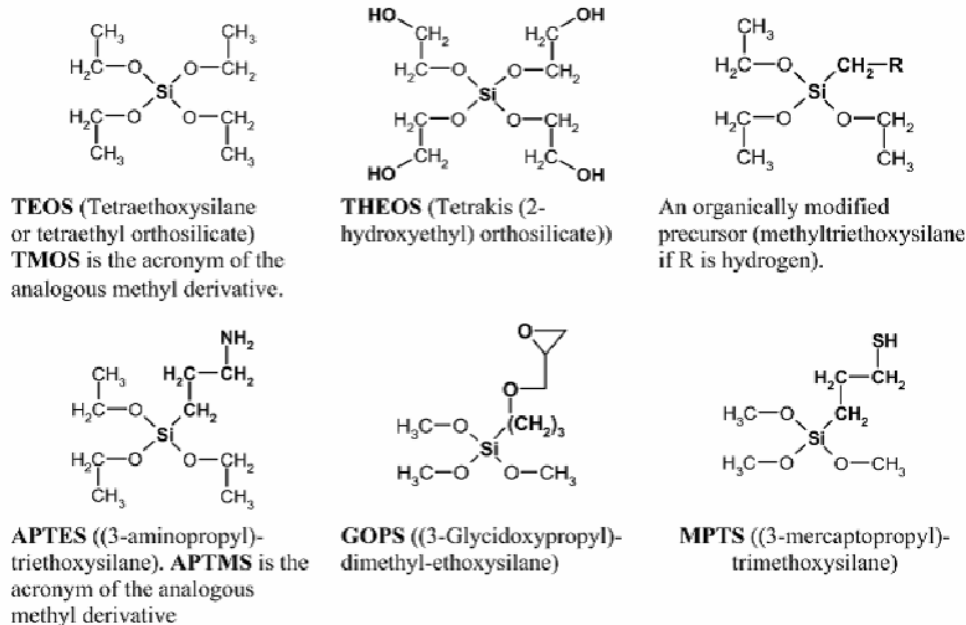
Na slici 4 prikazana je elektroda izrađena od ugljikove paste. Čestice ugljika predstavljene u obliku kuglica osiguravaju električnu provodljivost pri konačno podešenoj konzistenciji paste odnosom ugljik/vezivo. Čestice ugljika su direktno izložene ispitivanoj otopini i one su centri na kojima se manifestira elektrokemijska aktivnost pri amperometrijskim i voltometrijskim određivanjima. Pored slobodnih čestica ugljika koje su direktnom kontaktu sa otopinom postoji i značajan broj pokrivenih slojem ulja. Ove su čestice nepristupačne za elektron prijelazne reakcije koje se pod odgovarajućim naponskim režimom događaju samo na dostupnim, uljem nepokrivenim česticama. Uobičajena ugljik komponenta je grafit ali se mogu upotrijebiti i ostali praškasti materijali na bazi ugljika kao npr. Staklasti ugljik.³¹



Slika 5. Materijal i pribor za izradu elektroda od ugljika

1.4 Sol-gel materijali

Sol-gel materijali su metastabilne krutine nastale kinetički kontroliranom reakcijom iz molekularnih prekursora, a služe kao građivni blokovi za daljnje (*eng. later*) materijale. U sol-gel sintezi najčešće se koriste komercijalno dostupni alkoksidi silicija, aluminijska, cirkonijeva i titanijeva, čija kemijska reaktivnost ovisi o metalu i veličini alkoksidne skupine. Kao polazne tvari najčešće se upotrebljavaju silicijevi alkoksidi ili alkoksisilani - $\text{Si}(\text{OR})_4$, zbog svoje postojanosti, razmjerno jednostavnog rukovanja i dostupnosti. Dva najčešća alkoksisilana su tetrametoksisilan, TMOS (R je $-\text{CH}_3$), i tetraetoksisilan, TEOS (R je $-\text{C}_2\text{H}_5$).³³



Slika 6. Elektrokemijska eliminacija otopljenog kisika iz otopine

Krajnji rezultat sol-gel postupka su ultra-čisti, homogeni anorganski oksidni materijali sa poželjnim svojstvima poput tvrdoće, optičke transparentnosti, kemijske postojanosti, ciljane poroznosti, otpornosti na visoke temperature itd. Također, moguće je proizvesti materijale u različitim formama: ultra-fine sferične praške, tanke filmove i prevlake, keramička vlakna, mikroporozne anorganske membrane, monolitnu keramiku i staklo te ekstremno porozne aerogelove.³⁴

1.4.1 Sol-gel materijali u senzoricima

Organsko-anorganski hibridni materijali vrsta su nanostrukturiranih materijala u kojima su organska i anorganska faza međusobno pomiješane na molekulskoj razini. Anorganska faza u hibridnim materijalima priprema se sol-gel postupkom koji obuhvaća reakcije hidrolize i kondenzacije metalnih (većinom silicijevih) alkoksida. Hibridi mogu varirati od gipkih i mekih do krutih i tvrdih, ovisno o strukturi organske i anorganske komponente i udjelu obje faze. Osim hibrida s polimernom maticom razvijeni su i hibridi kojima je glavna faza anorganska, a organski modifikatori služe poboljšanju pojedinih svojstava, primjerice mehaničkih (fleksibilnost monolita ili prevlaka), površinskih (hidrofobnost organskih skupina na površini pora) ili optičkih (bojila

postojano vezana na anorgansku maticu).¹⁵ Zahvaljujući brojnim mogućnostima kombiniranja organskih i anorganskih polaznih tvari i reakcija, mogu se pripraviti materijali najrazličitijih struktura. No u praksi nije lako naći put do korisnog materijala koji bi se primijenio, pogotovo što je potreban znatan trošak za ostvarenje poželjnih svojstava. Budući da hibridi nisu u termodinamički ravnotežnom stanju, dolazi do faznog razdvajanja faza koji se ne miješaju unutar materijala. Fazno razdvajanje nije potpuno zahvaljujući kinetičkim učincima, i zaustavlja se prilikom prijelaza materijala u čvrsto stanje. Da bi nastao istinski hibridni materijal, razina razdvojenosti faza treba biti vrlo niska, a faze trebaju biti u dobrom doticaju. U tom slučaju materijal se ponaša kao jednofazni, što je i glavna karakteristika hibridnog materijala. Stupanj faznog razdvajanja ovisi o više čimbenika, kao što su molarna masa organske komponente, razlika brzina nastajanja organske i anorganske faze, pojava faznog prijelaza u jednoj od faza. Fazno razdvajanje može se ublažiti poboljšanjem svojstva miješanja faza u sustavu bilo stvaranjem kemijskih veza, bilo poboljšanjem fizikalnog međudjelovanja faza.³³

1.4.2 Priprava sol-gel kompozita s ugljikovim materijalima

Ugljikove nanocijevi su privukle mnogo pažnje zbog svojih jedinstvenih mehaničkih, kemijskih i električnih svojstava. Posebno od interesa je korištenje karbon nanotuba-baziranih materijala za razvijanje elektrokemijskih pogona, superkondenzatora, baterija i elektrokemijskih senzora. Ugljikove nanocijevi se mogu inkorporirati i graditi različite kompozitne materijale pa tako i u sol-gel kompozite

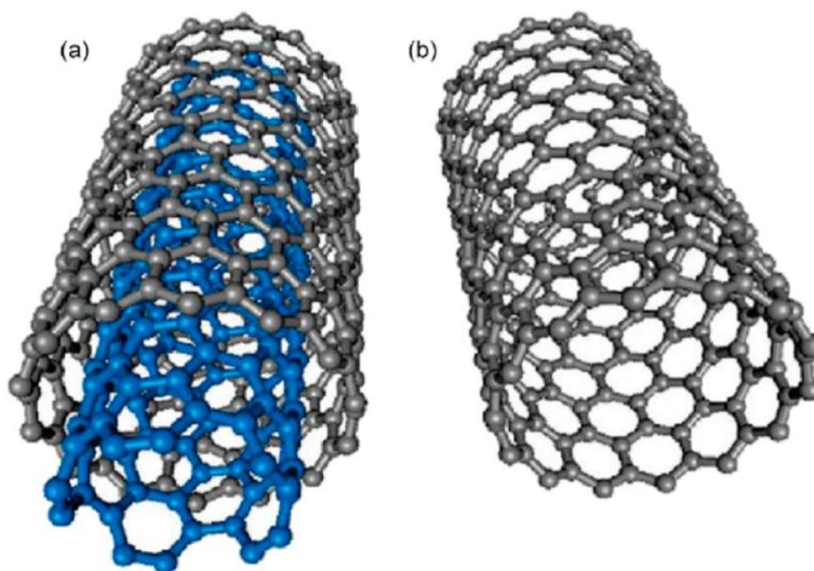
Sol-gel tehnologija je unaprijedila proizvodnju materijala preko hidrolize i kondenzacije od odgovarajućih alkoksisilanskih prekursora. Kompozitni materijali na osnovi sol-gelova su bili primijenjeni u uređajima za elektrokemijska određivanja. Sol-gel pruža relativno jednostavan način za uključivanje osjetilnih vrsta u stabilno okruženje. Kompozitni materijali objavljeni u literaturama uglavnom su bili bazirani na uključivanje ugljičnog praha ili zlatnih čestica u sol-gel.

Prednost kod sol-gel kemije je mogućnost upotrebe različitih silanskih prekursora za prilagodbu svojstava gela u kontroliranim uvjetima. U ovim proučavanjima, tri različita tipa silanskih prekursora su korišteni u pripravi kompozita: metiltrimetoksisilan (MTMOS), etiltrimetoksisilan (ETMOS) i propiltrimetoksisilan (PTMOS).

Ugljik se u prirodi može naći u dvije alotropske modifikacije: grafit i dijamant. Ostale alotropske modifikacije, kao što je fuleren, dobivene su sintetskim putem. Fuleren predstavlja molekulu izgrađenu u potpunosti od ugljika, a ima oblik šuplje sfere, elipsoida ili cijevi. Vrsta fulerena koja je od najveće važnosti za izgradnju senzora su ugljikove nanocijevi (CNTs).

Ugljikove nanocijevi su šuplji cilindri izgrađeni od listova grafita. Razlikujemo dvije vrste ugljikovih nanocijevi (Slika 13):

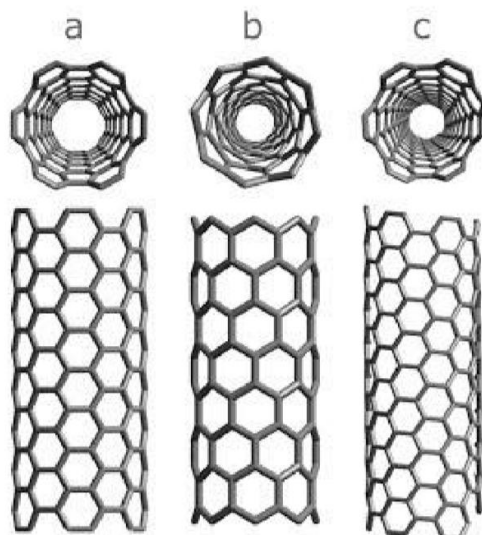
- Jednozidne ugljikove nanocijevi (eng. *Single-Walled Carbon Nanotubes, CWCNTs*)
- Višezidne ugljikove nanocijevi (eng. *Multi-Walled Carbon Nanotubes, MWCNTs*)



*Slika 7. Jednozidne (a) i višezidne (b) ugljikove nanocijevi*³⁵

S obzirom na kut pod kojim su svinuti listovi grafita (Slika 14) razlikujemo:

- Armchair nanocijevi ($\theta=30^\circ$; $n=m$)
- Zigzag nanocijevi ($\theta=0^\circ$; $m=0$)
- Kiralne nanocijevi ($\theta \neq 0^\circ$, $\theta \neq 30^\circ$)



Slika 8. Armchair (a), Zigzag (b) i kiralne (c) nanocijevi³⁶

Nova vrsta kompozitnih materijala može se dobiti kombiniranjem ugljikovih nanocijevi i solgel materijala. Takvi kompoziti otvaraju nove mogućnosti u razvoju elektrokemijskih uređaja jer iskorištavaju pogodne elektrokemijske karakteristike ugljikovih nanocijevi. Varijacije u prekursorima i količini ugljikovih nanocijevi u kompozitu određuju svojstva konačnog materijala.

Primjer kompozitnog materijala je CNT/SiO₂ kompozit. Važan uvjet za poboljšanje svojstava ovih materijala je dobro raspršenje ugljikovih nanocijevi na molekularnoj razini u silikatnoj matrici, kao i orijentacija ugljikovih nanocijevi u matrici. Sol-gel postupak je najbolja metoda za ostvarivanje ovih uvjeta, u usporedbi s konvencionalnim fizikalnim metodama koje uključuju miješanje prahova. Sol-gel postupkom ostvaruje se dobro raspršivanje i molekularno međudjelovanje između nanocijevi i silikatne matrice. Također, kompozitni materijali se formiraju pri sobnoj temperaturi pri čemu početno disperzno stanje ugljikovih nanocijevi ostaje očuvano za vrijeme nastajanja gela. Još jedno zanimljivo svojstvo sol-gel matrice je to što sadrži brojne pore koje mogu enkapsulirati molekule, metalne nanočestice i u novije vrijeme, ugljikove nanočestice. Postoje dva pristupa pri sintezi kompozita sol-gel postupkom: organski pristup i anorganski pristup.³⁷

1.5 Elektrokemijske metode

Elektrokemija je dio znanosti posvećen razumijevanju posebnih vrsta fizikalnih i kemijskih pojava te procesa pretvorbe tvari vezanih za postojanje i djelovanje osnovne čestice elektriciteta „slobodnih“ (pokretnih) elektrona koji u koordiniranom gibanju predstavljaju električnu struju. Prema jednoj od vodećih ličnosti u elektrokemiji druge polovine 20. st. J. O'M. Bockrisu, elektrokemija je područje znanosti koja opisuje stvaranje tvari pomoću elektriciteta i stvaranje elektriciteta trošenjem tvari. On je s tog stajališta, kao i s energetskog stajališta, obzirom da tom prilikom elektrokemijske reakcije mijenjaju energetsko stanje sustava, sve elektrokemijske sustave podijelio u tri grupe: ćelije koje se pokreću izvana – proizvođače tvari, gorive ćelije – proizvođače električne struje i elektrokemijske uređaje – elektrode koje se spontano troše rasipajući energiju. U prvoj grupi procesi zahtijevaju unošenje energije izvana; u drugoj grupi električna energija se dobiva na račun energije kemijskog procesa, dok treća grupa obuhvaća spontanu razgradnju tvari uz gubitak energije u čijem mehanizmu postoji i izmjena elektrona, a odnose se na procese elektrokemijske korozije. Posebnu ulogu elektrokemija ima u kemijskoj analizi. Elektroanalitička kemija danas dominira u ovom području zbog toga što se njene metode mogu automatizirati, i izgraditi elektronski instrument pomoću kojih se lako dobivaju kompjuterski zapisi rezultata. Ovo je danas široko zastupljeno naročito u kliničkoj medicinskoj praksi, i u ekološkim istraživanjima onečišćenosti zraka, vode i tla pomoću elektrokemijskih senzora. Elektroanalitička mjerenja provodimo u elektrokemijskoj ćeliji. Tu ćeliju čini posudica s otopinom u koju su uronjene elektrode. Elektrode su elementi ćelije na kojima nastaje analogna električna veličina, odnosno one služe za dovođenje električne veličine iz vanjskog izvora. Na elektrodama se odvijaju elektrokemijske reakcije. Te se kemijske reakcije odvijaju uz prijenos nosioca električnih naboja (elektroni, ioni) kroz dodirnu površinu elektroda-otopina. Elektroanalitičke metode čine skupinu analitičkih postupaka kod kojih informaciju odnosno podatak o koncentraciji, aktivitetu ili nekom drugom, npr. Termodinamičkom, podatku određivane molekulske vrste dobivamo posredstvom međusobno razmjernih odnosno analognih električnih veličina, tj. s pomoću električnog napona, električne struje ili električnog naboja.³⁸

Elektroanalitičke metode dijelimo u dvije osnovne kategorije:

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

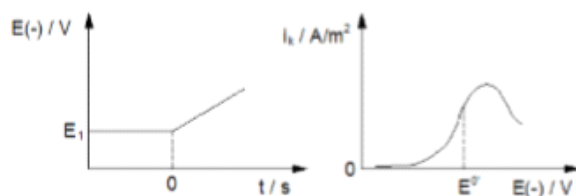
Kod metoda kod kojih nema protoka električne struje električni napon, što nastaje između elektroda, uspostavlja se spontano, odvijanjem elektrokemijskih reakcija na elektrodama. Budući da između elektroda, odnosno vanjskim električnim krugom, ne teče električna struja, elektrokemijske reakcije na elektrodama mogu postići stanje dinamičke ravnoteže. Tako se na elektrodama uspostavlja određeni, ravnotežni, elektrodni potencijal. Razlika potencijala, odnosno napona, između elektroda pokazuje samo nakanu tijeka reakcije koja bi se odvijala u elektrokemijskoj ćeliji kada bi vanjskim električnim krugom omogućili tok (zatvorili strujni krug) električne struje s jedne elektrode na drugu. Ova metoda se naziva potenciometrija. Zbog tendencije odvijanja reakcije na elektrodama, u graničnom sloju otopine uz elektrode, mijenja se koncentracija tzv. Elektroaktivnih čestica koje sudjeluju u elektrodnim reakcijama. Druga, mnogo brojnija skupina elektroanalitičkih metoda, je ona kod kojih kroz elektrokemijski članak teče električna struja kao posljedica djelovanja vanjskog izvora struje. Elektrokemijsku ćeliju u kojoj se odvijaju ovi procesi nazivamo elektrolitička ćelija, a sam proces elektrolizom. Tok električne struje kroz elektrolitičku ćeliju, a time i kroz vanjski električni krug koji povezuje elektrode, uzrokuju elektrokemijske reakcije na elektrodama, tj. odvijanje reakcija redukcije i oksidacije. Mjerena fizikalna veličina jest odziv sustava u ćeliji na vanjski signal pobude. Dakle, ako je signal pobude električni napon, kroz radnu će elektrodu teći električna struja, čija jakost ovisi o obliku naponskog signala pobude, vrsti primijenjene elektrode i koncentraciji elektroaktivnih čestica. Prema tome, rezultirajuća fizikalna veličina, tj. signal odziva je električna struja. Možemo je mjeriti kao funkciju narinutog napona te tada govorimo o voltometrijskim metodama. Kod većine elektroanalitičkih metoda mjereni podatak o svojstvima elektrolitne otopine dobivamo pomoću jedne od elektroda elektrolitičke ćelije. Tu elektrodu nazivamo radnom kada kroz ćeliju teče električna struja, a indikatorskom pri potenciometrijskim mjerenjima. Stoga, temelj elektroanalitičkih mjerenja jest elektrokemijska reakcija na radnoj ili indikatorskoj elektrodi.³⁸

1.5.1 Voltometrija

Voltametrija s linearnom promjenom potencijala i ciklička voltametrija pripadaju u skupinu elektroanalitičkih postupaka u kojima je signal pobude električni napon. Signal odziva je struja ćelije, koja se mjeri kao funkcija narinutog napona. Oblik i vremenska ovisnost amplitude signala pobude može biti različit.³⁹

Grafički prikaz signala odziva kod voltametrije nazivamo voltamogramom. Elektrokemijska ćelija koja se koristi pri ovoj metodi se sastoji od posude koja sadrži smjesu otopine analita i nereaktivnog elektrolita u koju su uronjene tri elektrode. Prva od elektroda je radna i njen potencijal se mijenja linearno s vremenom, a njena površina je mala kako bi se poboljšala njena polarizacija. Druga elektroda je referentna, najčešće zasićena kalomel elektroda čiji je potencijal konstantan ($E = +0.241 \text{ V}$). Treća elektroda je protuelektroda koja je uglavnom oblika namotane platinske žice i ona služi za provođenje struje od izvora signala, kroz otopinu, do radne elektrode.³⁹

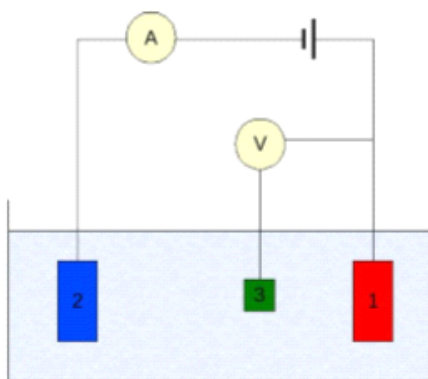
Radne elektrode se javljaju u različitim oblicima. Najčešće su oblika ravnog diska koji je utisnut u štap inertnog materijala poput teflona. Ove elektrode se mogu koristiti pri širokom rasponu potencijala, a to ovisi ne samo o elektrodi već i otopini u koju je elektroda uronjena. Kod visokih vrijednosti pozitivnog potencijala dolazi do pojave velikih struja kao posljedica oksidacije vode, pri kojoj nastaje elementarni kisik. S druge strane, pri jako negativnim potencijalima zbog redukcije vode dolazi do pojave visokih katodnih struja uzrokovano razvijanjem elementarnog vodika.⁴⁰



Slika 9. Signal pobude i signal odziva voltametrije

1.5.2 Ciklička voltametrija

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



Slika 10. Troelektrodna elektrolitička ćelija

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

Visina strujnog odziva ovisi o koncentraciji elektroreduktanata (O) u otopini (co), o broju razmijenjenih elektrona po čestici (z), o površini radne elektrode (A) i o čimbenicima što određuju brzinu difuzije odnosno koncentracijski gradijent.⁴⁰

Na slici 11 pokazan je oblik signala pobude cikličke voltametrije, zajedno s rezultirajućom strujom odziva za elektrodni proces redukcije. Signal pobude najprije, kroz određeno vrijeme, linearno raste. Pošto signal pobude dosegne izabranu vrijednost (E_s), promijeni se smjer posmika potencijala. U povratnom posmiku, potencijal elektrode E u bilo kojem trenutku (t), nakon vremena promjene smjera posmika (t_s), ima vrijednost:

$$E = E_i - 2 v t_s + v t$$

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



Slika 11. Signal pobude i signal odziva za cikličku voltametriju

1.5.3 Amperometrija

Amperometrija je elektrokemijska tehnika pri kojoj se mjeri jakost struje kao funkcija narinutog napona i koncentracije elektroaktivne vrste, analita. Kada je potencijal nametnut na radnu elektrodu konstantan mjerimo struju kao funkciju vremena. Pošto se potencijal ne mijenja ishodni dijagram nije voltamogram nego amperogram. Mnoge molekulske vrste mogu se oksidirati ili reducirati pri potencijalu elektrode karakterističnom za dotičnu vrstu. Držimo li potencijal elektrode konstantnim, potrebnim za brzu reakciju redukcije ili oksidacije, jakost struje (tzv. Granična struja) izravno je proporcionalna koncentraciji elektroaktivne vrste, tj. analita. Mijenja li se potencijal elektrode od potencijala pri kojem je reakcija redukcije (oksidacije) vrlo spora do graničnoga potencijala, jakost struje ovisi o koncentraciji analita, ali i brzini i vremenskoj ovisnosti promjene potencijala. Tada odzivni signal ima različit oblik i ovisan je o obliku promjene potencijala. Sadrži li ispitivana otopina veći broj elektroaktivnih vrsta (analita), izborom (regulacijom) potencijala radne elektrode postićemo selektivnu redukciju (oksidaciju) pojedine vrste. Međutim, granice električnoga potencijala u kojima provodima redukciju (oksidaciju) elektroaktivnih vrsta u vodenim otopinama jesu oko 2,5 V. To je određeno redukcijom H^+ iona u elementarni vodik na negativnoj granici i oksidacijom OH^- u elementarni kisik na pozitivnoj granici, što je tzv. *Elektrokemijski prozor* ili područje polarizabilnosti elektrode.

Amperometrija je gotovo idealna metoda za mjerenja analita u protočnim sistemima upotrebom odgovarajućih senzora i biosenzora, uključujući *in vivo* analizu krvi pacijenata ili brza selektivna mjerenja analita u laboratorijskim uvjetima.^{39,40}

1.5.4 Amperometrijski biosenzori

Temelje se na imobilizaciji biološki osjetljivog sloja npr. enzima, antitijela, DNA, na površinu radne elektrode. Mehanizmom prepoznavanja aktivna tvar stupa u interakciju s ciljanim analitom i omogućuje nastajanje elektrokemijskog analitičkog odzivnoga signala. Srodne elektrode imaju na površini suspenziju bakterija ili biološkog biljnog ili životinjskog tkiva. U mnogim slučajevima enzim odnosno suspenzija drže se uz površinu elektrode s pomoću propusne polimerne membrane, npr. membrane za dijalizu. Imobilizacija aktivne tvari na površinu elektrode može se učiniti uklapanjem u gel, adsorpcijom, kovalentnim (unakrsnim) vezanjem i stvaranjem ovojnice (kapsule). Mnogi biosenzori jesu amperometrijski senzori zasnovani na selektivnim biokemijskim reakcijama kojima se ostvaruje visoka selektivnost senzora. Priroda je razvila spektar biomolekula i biostruktura koje karakterizira molekularni specifično prepoznavanje koje stoji iza mnogih životnih procesa. Svaka biološka vrsta ima tri cilja da bi preživjela: metabolizirati, reproducirati se i procesuirati informacije. Ovo posljednje znači prikupiti informaciju i prenijeti molekulske mase, tzv. prostetičke skupine.

Imunosustavi prepoznavanju tkiva kao kompatibilna i nekompatibilna. Raspoznavanje mirisa i okusa i ostali osjeti ovise o selektivnoj interakciji molekula s kemoreceptorima uz neuralno kodiranje informacije. Mjeri se elektrokemijski odziv produkta enzimske katalizirane biokemijske reakcije ili molekulske vrste koja se troši pri enzimskoj reakciji ili struja neizravne oksidacije supstrata (analita) na elektrodi posredovanjem medijatora. Enzimi su proteini, točnije globulaste bjelančevine relativne molekulske mase od 12000 do više stotina tisuća (12-500 kDa). Relativne molekulske mase biokemičari često izražavaju u daltonima (Da, kDa i dr.). Pri tom je Da jedinica relativne atomske mase. To je uvriježeno u biokemiji, ali ne pripada u jedinice SI-sustava. Jednom tipu enzima katalitičko djelovanje ovisi samo o strukturi bjelančevina od kojih su izgrađeni. To su tzv. čisti enzimi. No postoje i složeni enzimi, koji osim molekula bjelančevina sadrže i nisko molekularne neproteinske sastojke, tzv. koenzime. Jednim se složenim enzimima može neproteinski sastojak (koenzim ili prostetska skupina) lako odvojiti od proteinske komponente (apoenzim) (npr. Dijalizom), no tada tako razdvojeni dijelovi više nemaju katalitičko

djelovanje. Ponovnim spajanjem apoenzima s koenzimom dobije se ponovno aktivni cjeloviti složeni enzim (holoenzim). Drugi složeni enzimi jesu konjugirane (složene) bjelančevine (proteini) koji razgradnjom daju sastojke koji potječu od velikog proteinskog dijela i sastojke male relativne molekulske mase.⁴⁰

2 Eksperimentalni dio

2.1 Priprava otopina

Za pripravu otopina korištene su sljedeće kemikalije:

Tablica 3. kemikalije za pripravu otopina

KEMIKALIJA	MOLEKULSKA FORMULA	DOBAVLJAČ
amonijak	NH ₃	T.T.T. d.o.o.
amonijev klorid	NH ₄ Cl	Kemika d.d., Zagreb
etanol	C ₂ H ₅ OH	T.T.T. d.o.o.
fluorovodična kiselina	HF	Alkaloid, Skopje
fosforna kiselina	H ₃ PO ₄	T.T.T. d.o.o.
kalijev nitrat	KNO ₃	T.T.T. d.o.o.
manganov (IV) oksid	MnO ₂	Kemika d.d., Zagreb
MWCNT		NTP
natrijev acetat	CH ₃ COONa	Kemika d.d., Zagreb
natrijev fosfat	Na ₂ HPO ₄	Kemika d.d., Zagreb
natrijev hidroksid	NaOH	Gram-Mol d.o.o., Zagreb
octena kiselina	CH ₃ COOH	Gram-Mol d.o.o., Zagreb
TEOS	C ₈ H ₂₀ O ₄ Si	Ru –Ve d.o.o.
vodikov peroksid	H ₂ O ₂	T.T.T. d.o.o.

2.1.1 Priprava osnovnog elektrolita

Osnovna elektrolitna otopina se sastojala od 0,09 dm³ KNO₃, koncentracije 0,1 mol dm⁻³ i 0,1 dm³ odgovarajućeg pufera.

2.1.2 Priprava otopine kalijevog nitrata, KNO₃

U destiliranoj vodi je otopljeno 101,075 g kalijevog nitrata te zatim razrijeđeno na konačni volumen od 2 dm³. Koncentracija ove otopine je bila 0,5 mol dm⁻³. Zatim je od ove otopine pripravljena 0,1 mol dm⁻³ otopina kalijevog nitrata, korištenjem 0,018 dm³ otopine KNO₃ koncentracije 0,5 mol dm⁻³ koja je razrijeđena do konačnog volumena od 0,09 dm³.

2.1.3 Priprava otopine CH₃COONa

U destiliranoj vodi je otopljeno 2,05 g CH₃COONa te zatim razrijeđeno na konačni volumen od 0,25 dm³. Koncentracija ove otopine je 0,1 mol dm⁻³.

2.1.4 Priprava otopine octene kiseline, CH₃COOH

U destiliranoj vodi je otopljeno 1,5 g CH₃COOH te zatim razrijeđeno na konačni volumen od 0,25 dm³. Koncentracija ove otopine je 0,1 mol dm⁻³.

2.1.5 Priprava otopine acetatnog pufera pH 5

Dodavanjem 0,1 mol dm⁻³ otopine CH₃COOH u otopinu CH₃COONa, koncentracije 0,1 mol dm⁻³, prilagođava se pH do željene vrijednosti (pH = 4). Ovo dodavanje se vrši uz stalno praćenje pH vrijednosti pH – metrom.

2.1.6 Priprava otopine natrijevog hidrogenfosfata, Na₂HPO₄

Za pripravu 0,1 mol dm⁻³ otopine Na₂HPO₄ odvagano je 3,548 g Na₂HPO₄ te otopljeno u 100 dm³ destilirane vode.

2.1.7 Priprava otopine amonijevog klorida, NH₄Cl

U destiliranoj vodi je otopljeno 1,56 g amonijevog klorida te zatim razrijeđeno na konačni volumen od 0,25 dm³. Koncentracija ove otopine je 0,1 mol dm⁻³.

2.1.8 Priprava otopine fosfatnog pufera; pH 7

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

2.1.9 Priprava otopine amonijačnog pufera, pH 9

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

2.1.10 Priprava otopine vodikovogperoksida

Otopina vodikovog peroksida, koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, pripravljena je otapanjem $0,373 \text{ g}$ tj. $335 \mu\text{L}$ vodikovog peroksida (H_2O_2), u deioniziranoj vodi razrjeđenjem na konačni volumen od 30 cm^3 . Za pripravu $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ uzeto je 3 cm^3 prethodno napravljene ($0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) otopine vodikovog peroksida te razrijeđeno na volumen od 30 cm^3 , a zatim je 3 cm^3 te otopine iskorišteno za pripravu $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$. Ovako priređene otopine korištene su u elektrokemijskim mjerenjima i to na način da se od svake dodavao određeni volumen u ćeliju s 100 cm^3 osnovnog elektrolita.

Prilikom svakog novog mjerenja pripremljena je uvijek nova otopina H_2O_2 .

Tablica 4. Koncentracije vodikovog peroksida korištene pri mjerenju konačne koncentracije

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

2.2 Aparatura i elektrodni materijal

2.2.1 Aparatura

Korištena je elektrokemijska ćelija sa srebro/srebrov klorid (3 mol dm^{-3} , proizvođač: Radiometer, model XR 300) kao referentnom elektrodom, platinskom pločicom kao protu elektrodom te modificirane i ne modificirane elektrode od staklastog ugljika (GCE) kao radne elektrode. Sva elektrokemijska mjerenja su izvršena s potenciostatom (Autolab PGSTAT 302N) spojenim na osobno računalo (PC), a kojim se upravlja pomoću GPES 4,9 Softwarea (Eco Chemie).

2.2.2 Priprava radnih elektroda

Tijekom mjerenja korištene su nemodificirana elektroda od staklastog ugljika (GCE), modificirane elektrode sa ugljikovim nano cijevima bez osjetnog metala (GCE-MWCNT) i modificirane elektrode sa osjetnim materijalom (GCE-MWCNT-AgCuS). Medijatorski materijal je uzet kao sintetiziran⁴¹ i poznatog sastava identificiranog na XRD u koji ulazi $\text{Ag}_{1,2}\text{CuS}_2$, AgCuS te Ag (prah A).⁴²

2.2.2.1 Sol-gel metoda priprave materijala

Sol-gel je pripremljen prema radu.⁴² Postupak je modificiran na način da se koristilo 5 puta manje množine. Pripremljena je otopina miješanjem TEOS-a (3 mL) i 3 mL etanola 20 min, čineći tako molni omjer TEOS : etanol 1 : 3,8. Ova smjesa je razdijeljena na tri jednaka dijela (po 2 mL) u epruvete. U jednu od epruveta koja je sadržavala 2 mL smjese TEOS-a i etanola dodano je 0,4 mL vode, uz ultrazvučno miješanje kroz 10 minuta. Nakon toga u smjesu je dodano 36 μL 40 % HF i tretirano u ultrazvučnoj kupelji do pojave krutine. Omjer za nastanak sola je bio TEOS : etanol: voda: HF = 1 : 3,8: 5 : 0,035.

2.2.2.2 Inkorporacija ugljikovih nano cijevi-sinteza kompozitnih materijala

Sol-gel postupak je modificiran na način da je u smjesu TEOS-etanol (2 mL) dodano 0,075 g ugljikovih nanocijevi (MWCNT) kod ultrazvučnog miješanja (20 min) te je postupak nastavljen prema opisu u poglavlju 2.2.2.1.

2.2.2.3 Inkorporacija ugljikovih nanocijevi i osjetnog materijala (AgCuS)-sinteza kompozitnih materijala

Sol-gel postupak je modificiran na način da je u smjesu TEOS-a i etanola dodana prethodno homogenizirana smjesa sastava 0,07 g višezidnih nanocijevi i 0,07 g praha A (AgCuS), nakon čega je suspenzija ultrazvučno tretirana 20 min te je postupak nastavljen prema opisu u poglavlju 2.2.2.1.

Ovako pripremljeni kompoziti su tretirani u sušioniku na 60 °C 4 sata i ostavljeni na zraku 24 sata. Nastali kserogel je usitnjen u tarioniku i kao takav upotrijebljen u daljnjem postupku modifikacije.

2.2.2.4 Priprava osjetnog sloja

Odvagane su različite količine pripremljenih kompozita (10 mg, 30 mg, 50 mg) i u svaku je dodano po 33 mg PVC, te 66 mg plasifikatora (o-NPOE). U takve smjese dodano je 0,5 mL THF i smjesa je miješana staklenim štapićem do homogenosti. Elektrode od staklastog ugljika su modificirane sa po 20 µL pripremljenih smjesa. Elektrode su ostavljene 24 sati na zraku za uklanjanje otapala (THF). Na ovakav način dobilo se 6 modificiranih elektroda s kompozitnim materijalima: 3 modificirane s ugljikovim nanocijevima i 3 modificirane s ugljikovim nanocijevima i AgCuS.

Tablica 5. Elektrode korištene u mjerenjima

elektroda	kompozit	m (kompozita)/mg	PVC/mg	o-NPOE/mg	THF/cm ³
GCE	-	-	-	-	-
GCE-MWCNT-10	sol-gel/MWCNT	10	33	66	0,5
GCE-MWCNT-30		30			
GCE-MWCNT-50		50			
GCE-MWCNT-AgCuS-10	sol-gel/MWCNT/ AgCuS	10			
GCE-MWCNT-AgCuS-30		30			
GCE-MWCNT-AgCuS-50		50			

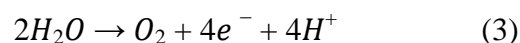
3 Rezultati i rasprava

3.1. Elektrokemijsko ponašanje nGCE

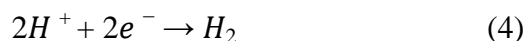
3.1.1 Utjecaj pomaka anodne i katodne granice na nGCE

Za elektrokemijska istraživanja koja su bila usmjerena na određivanje ponašanja nemodificirane radne elektrode od staklastog ugljika korištena je ciklička voltometrija. Snimani su ciklički voltamogrami (CV) od otvorenog strujnog kruga prema anodnim i katodnim potencijalima. Voltamogrami su snimljeni u $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ otopini KNO_3 puferiranoj s različitim puferima za postizanje tri pH vrijednosti (5, 7, 9). Sva mjerenja su rađena u stacionarnim uvjetima i pri posmiku od 25 mV s^{-1} ukoliko nije drukčije naglašeno.

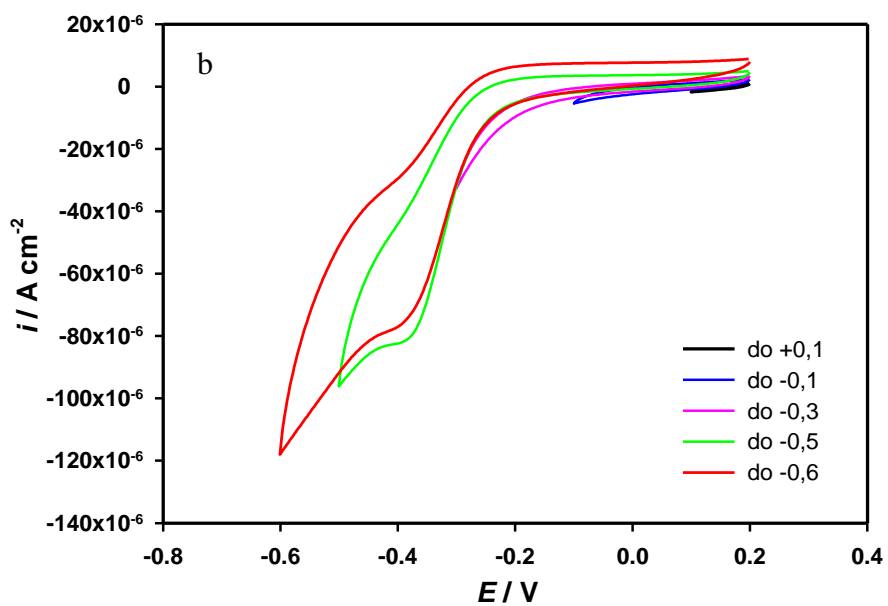
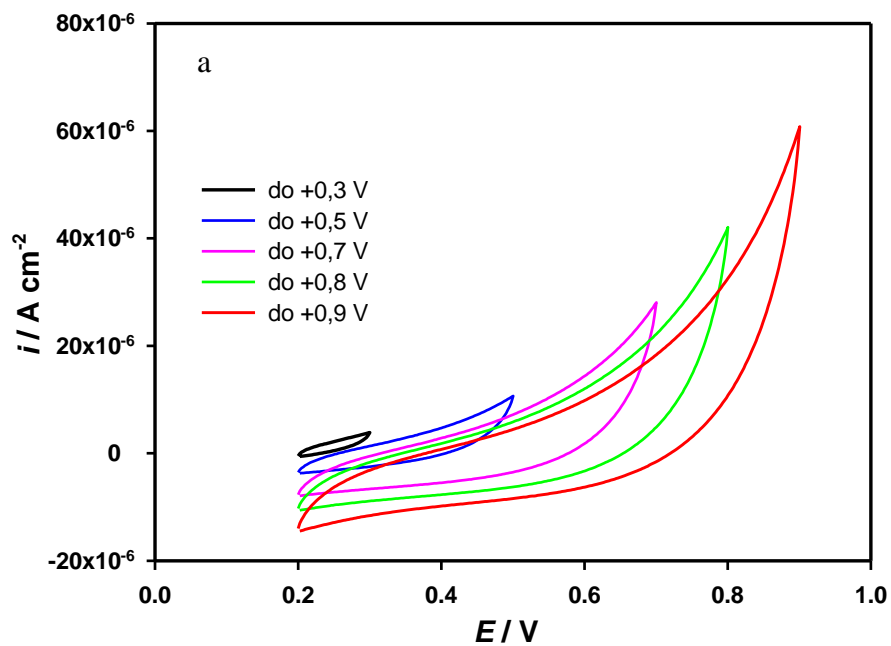
Na slici 12 prikazani su ciklički voltamogrami koji su snimljeni pri različitim katodnim i anodnim granicama. Pri potencijalima većima od $+0,8 \text{ V}$ dolazi do anodnog izlučivanja kisika, što je vidljivo i na slici 12 a prema jednadžbi (3).



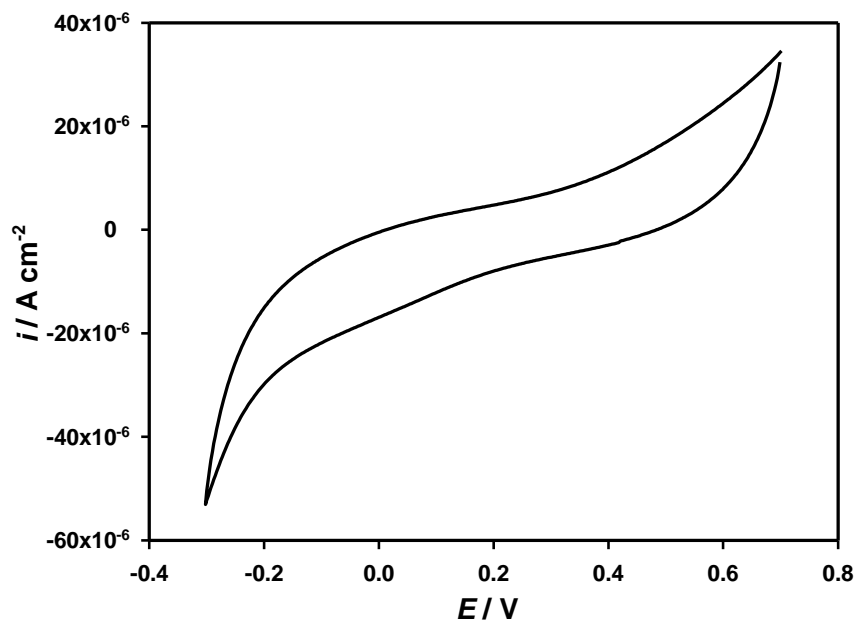
Pri potencijalima od $-0,4 \text{ V}$ dolazi do katodnog izlučivanja vodika, prema jednadžbi (4). Prikazano na slici 12b.



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



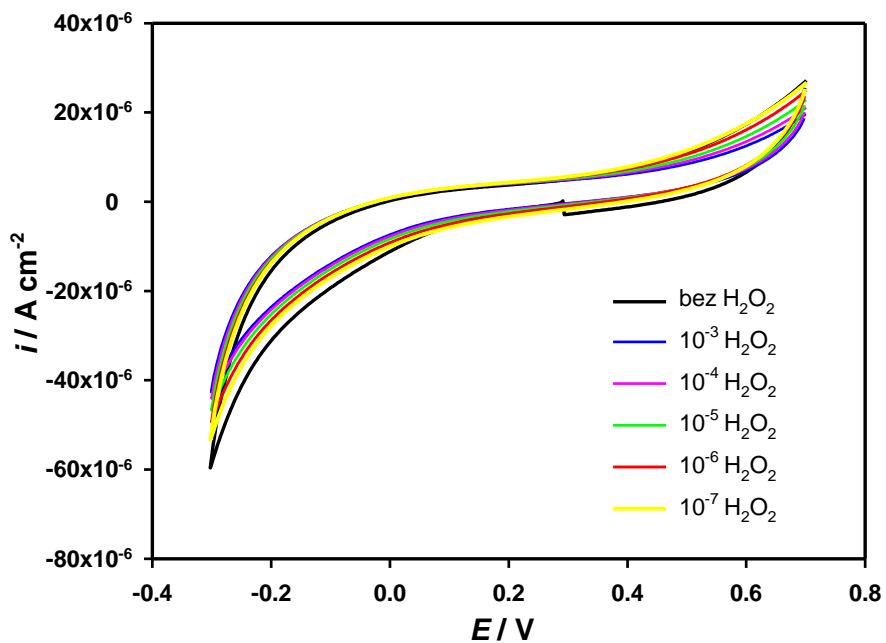
Slika 12. Utjecaj pomaka anodne (a) i katodne (b) granice na cikličke voltamograme GCE u osnovnom elektrolitu, $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$



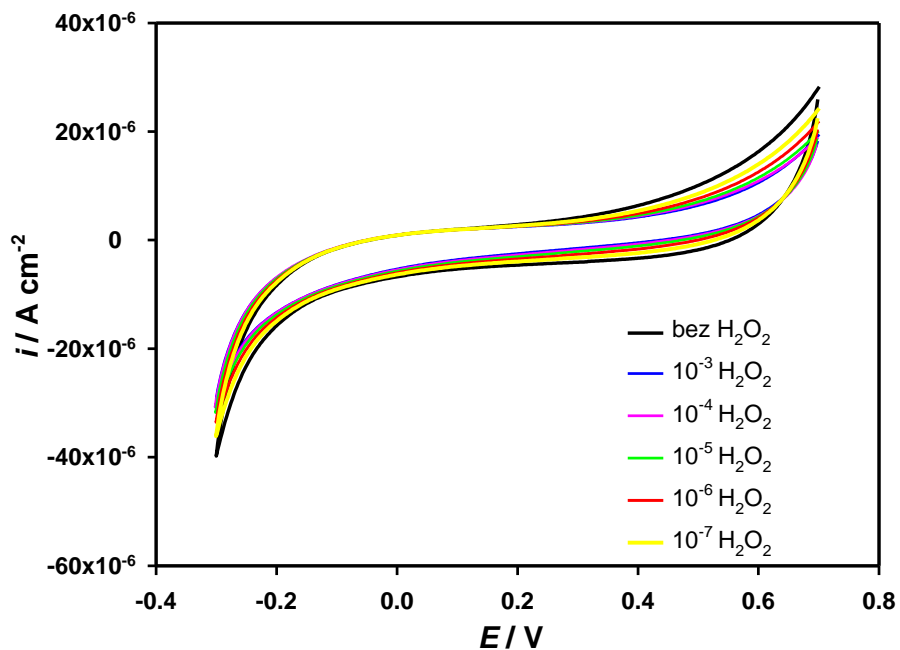
Slika 13. Ciklički voltagram snimljen na GCE elektrodi u područjima potencijala $-0,3\text{V}$ do $+0,7\text{V}$

3.1.2 Promjena CV-a GCE elektrode dodatkom vodikovog peroksida

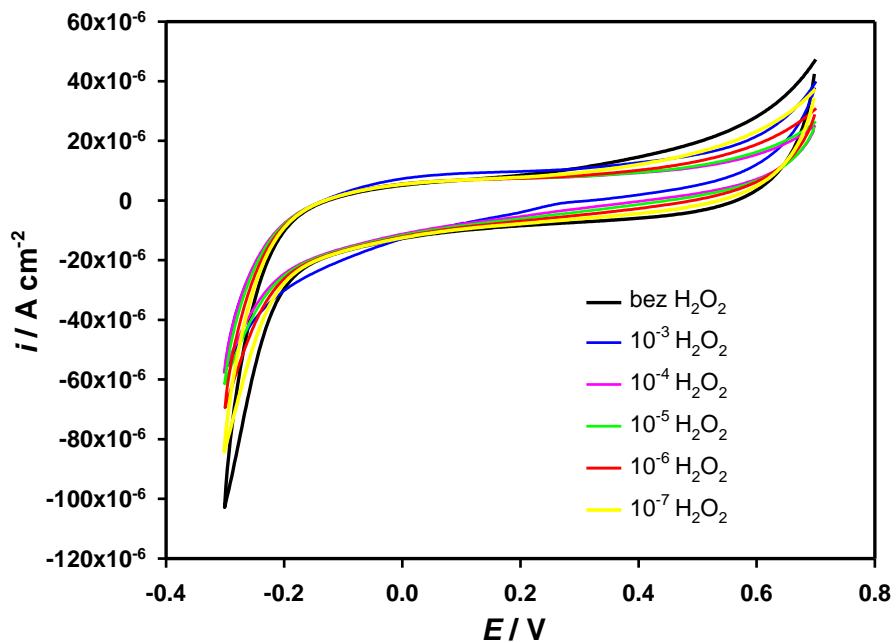
Slike 14, 15 i 16 prikazuje utjecaj dodatka vodikovog peroksida u različitim pH vrijednostima otopine na ciklički voltamogram nemodificirane elektrode od staklastog ugljika u odabranom području potencijala, Ne mogu se uočiti značajnije promjene u voltamogramima s dodatkom peroksida.



Slika 14. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u acetatnom puferu (pH 5). GCE elektroda



Slika 15. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u fosfatnom puferu (pH 7). GCE elektroda



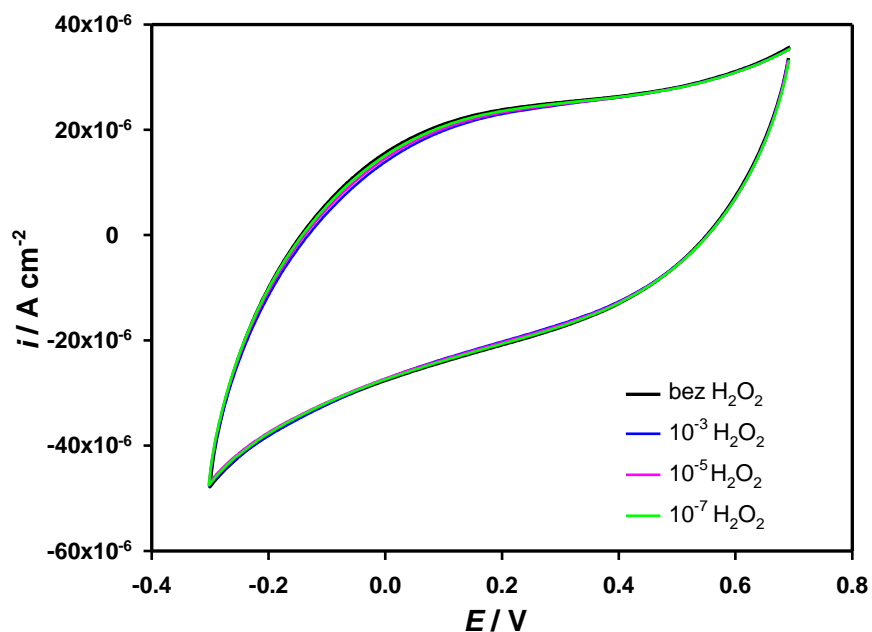
Slika 16. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u amonijakalnom puferu (pH 9). GCE

3.2. Elektrokemijsko ponašanje H_2O_2 na modificiranoj GCE elektrodi sa kompozitom sol-gel/MWCNT (GCE-MWCNT)

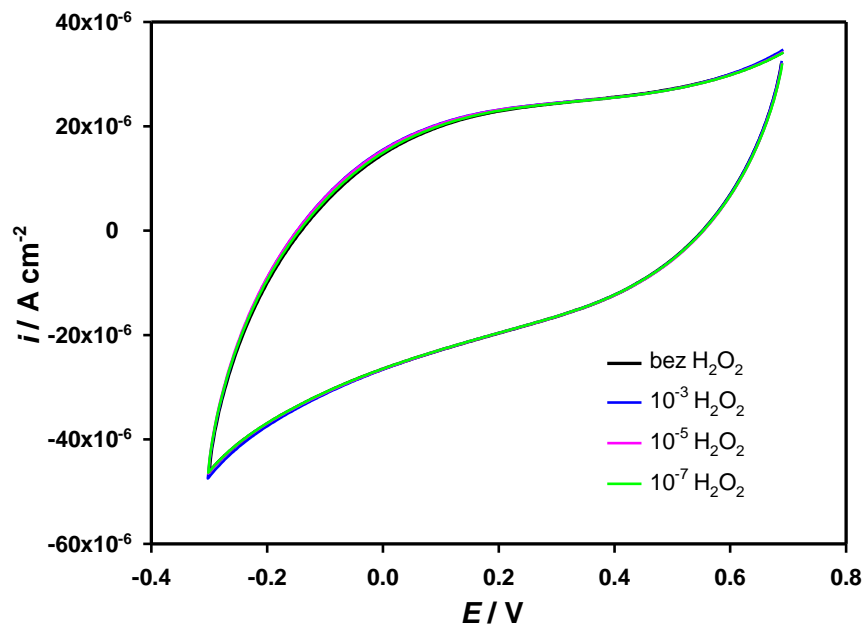
3.2.1 GCE elektroda modificirana sa 10 mg kompozita sol-gel/MWCNT (GCE-MWCNT-10)

CV snimljeni na elektrodi modificiranoj s 10 mg kompozita u PVC matrici (GCE-MWCNT-10), u prisutnosti H_2O_2 pri različitim pH vrijednostima su prikazani na Slici 17, Slici 18 i Slici 19.

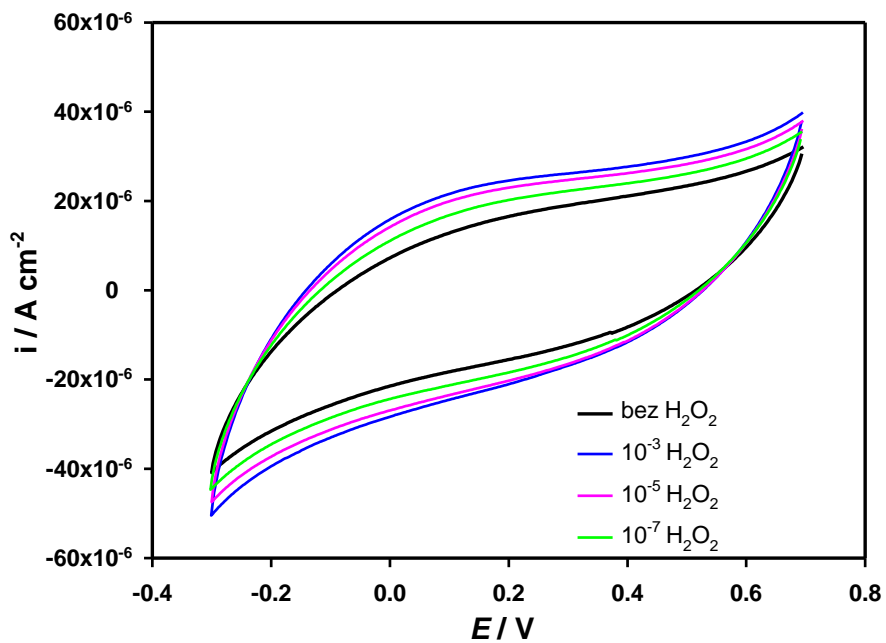
Ne može se primjetiti utjecaj prisutnosti H_2O_2 na CV pri pH 5 (Slika 17) i pH 7 (Slika 18). Pri pH 9 (Slika 19) uočavamo širenje CV dodatkom H_2O_2 što sugerira pseudokapacitivno ponašanje elektrode MWCNT-10.



Slika 17. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u acetatnom puferu (pH 5). GCE-MWCNT-10



Slika 18. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u fosfatnom puferu (pH 7). GCE-MWCNT-10

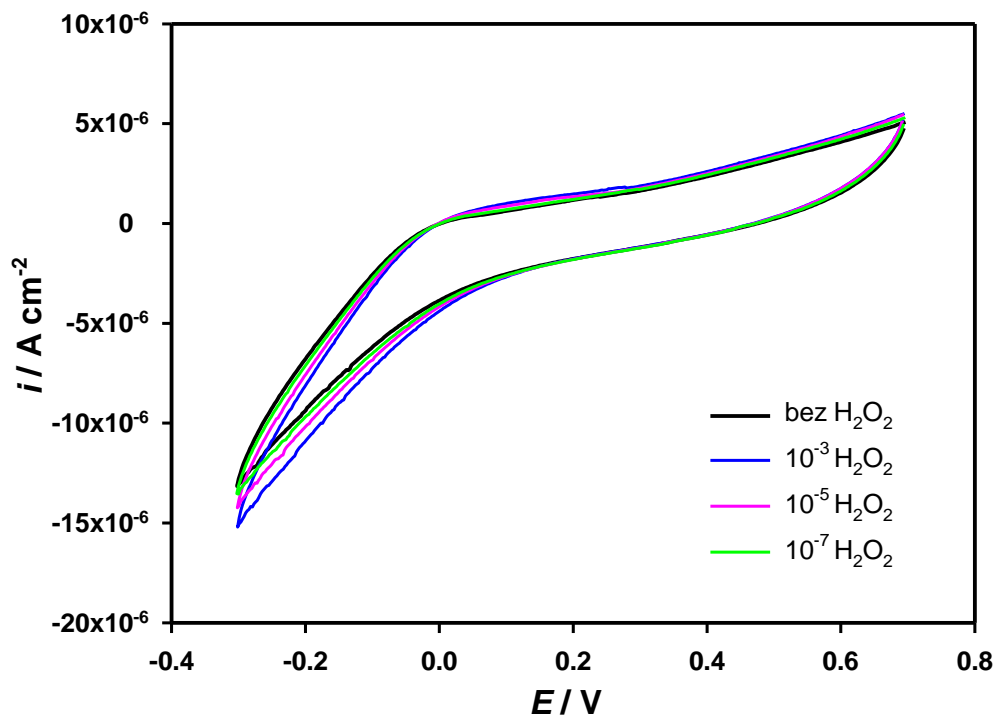


Slika 19. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u amonijakalnom puferu (pH 9). GCE-MWCNT-10

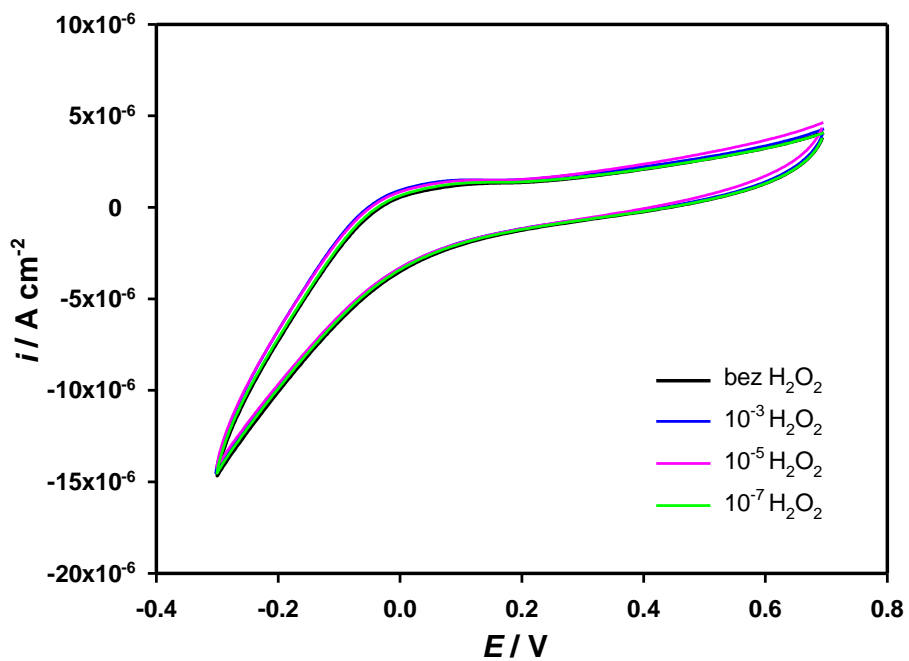
3.2.2 GCE elektroda modificirana sa 30 mg kompozita sol-gel/MWCNT (GCE-MWCNT-30)

Slika 20, Slika 21 i Slika 22 prikazuju CV snimljene na elektrodi modificiranoj s 30 mg kompozita u PVC matrici (GCE-MWCNT-30), u prisutnosti H_2O_2 pri različitim pH vrijednostima.

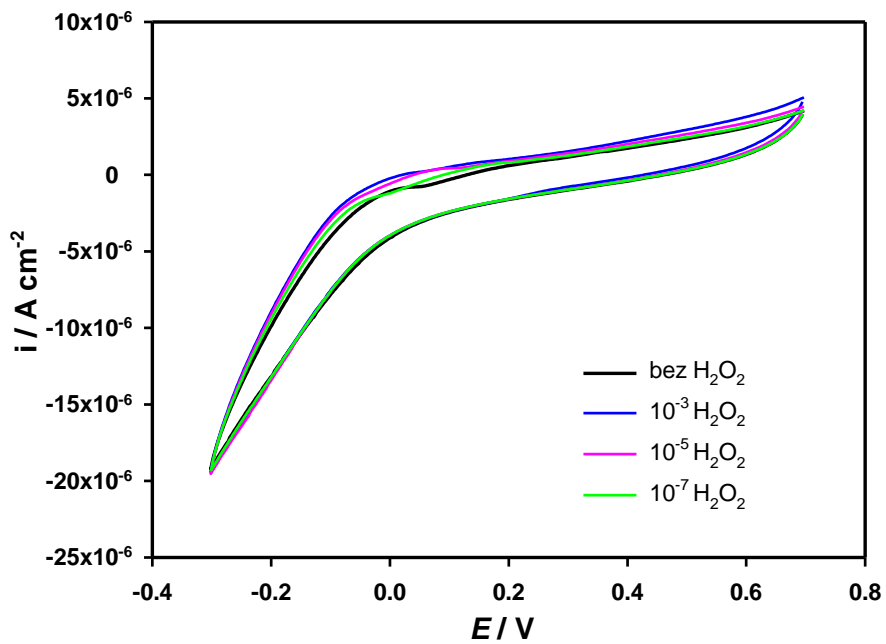
Nisu uočene značajnije promjene na snimljenim CV s dodatkom H_2O_2 pri različitim pH vrijednostima.



Slika 20. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u acetatnom puferu (pH 5). GCE-MWCNT-30

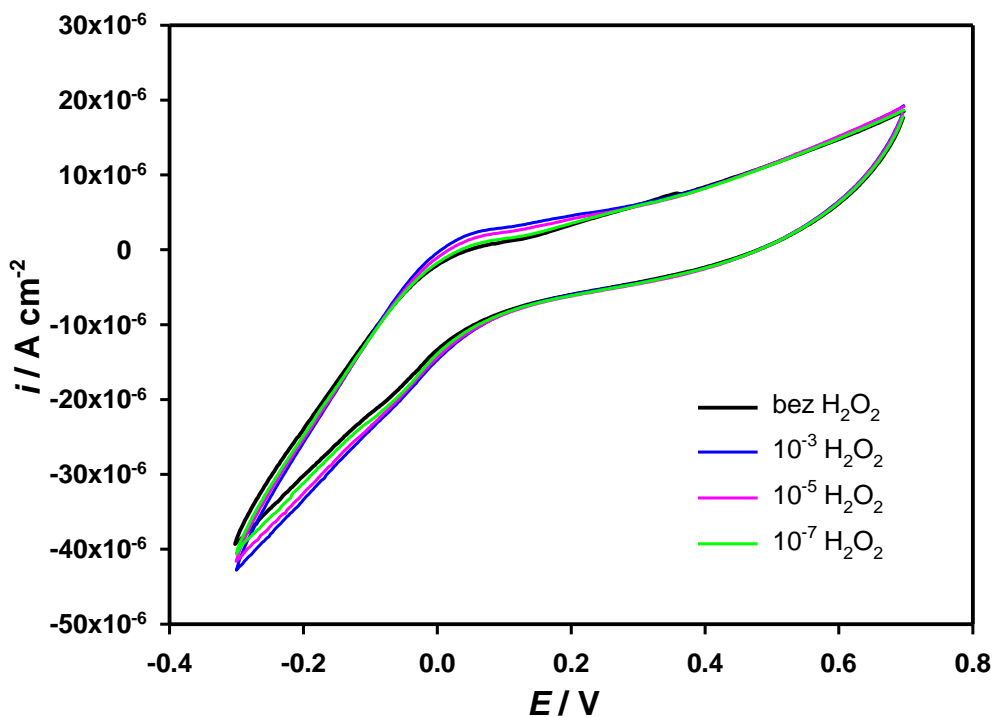


Slika 21. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u fosfatnom puferu (pH 7). GCE-MWCNT-30



Slika 22. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u amonijakalnom puferu (pH 9). GCE-MWCNT-30

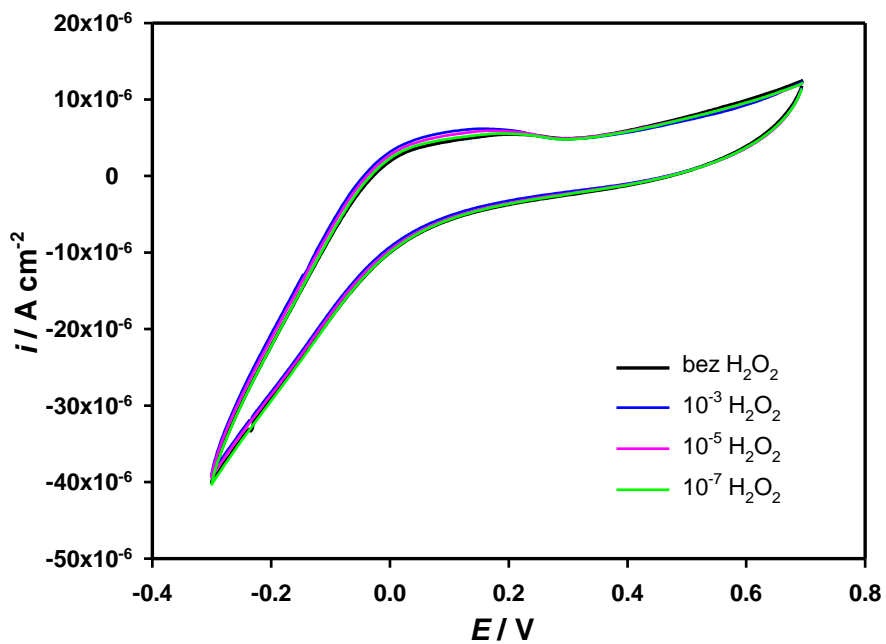
3.2.3 GCE elektroda modificirana sa 50 mg kompozita sol-gel/MWCNT (GCE-MWCNT-50)



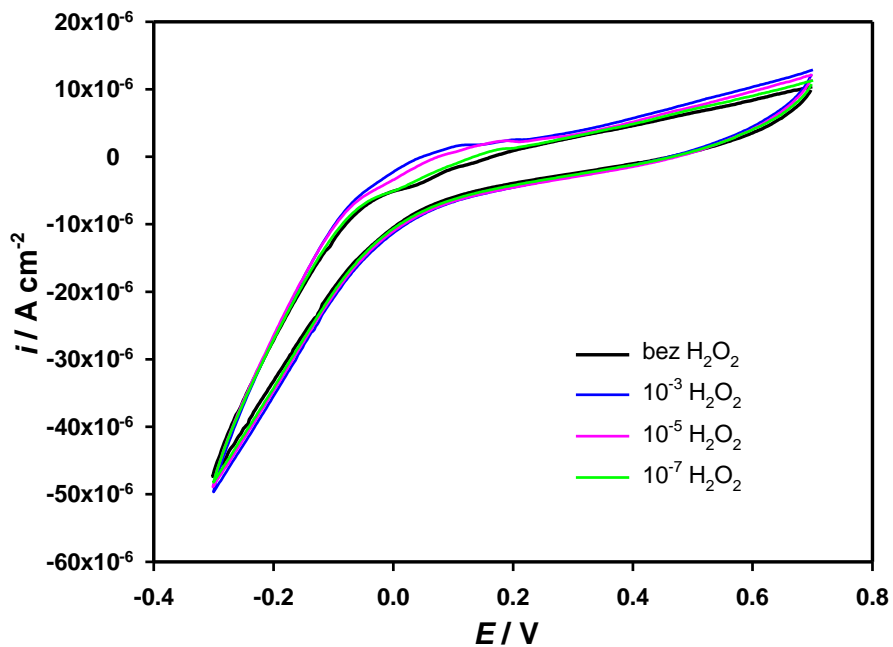
Slika 23. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u fosfatnom puferu (pH 7). GCE-MWCNT-50

Slika 23, Slika 24 i Slika 25 prikazuju CV snimljene na elektrodi modificiranoj s 30 mg kompozita u PVC matrici (GCE-MWCNT-50), u prisutnosti H_2O_2 pri različitim pH vrijednostima.

Nisu uočene značajnije promjene na snimljenim CV s dodatkom H_2O_2 pri različitim pH vrijednostima.



Slika 24. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u fosfatnom puferu (pH 7). GCE-MWCNT-50

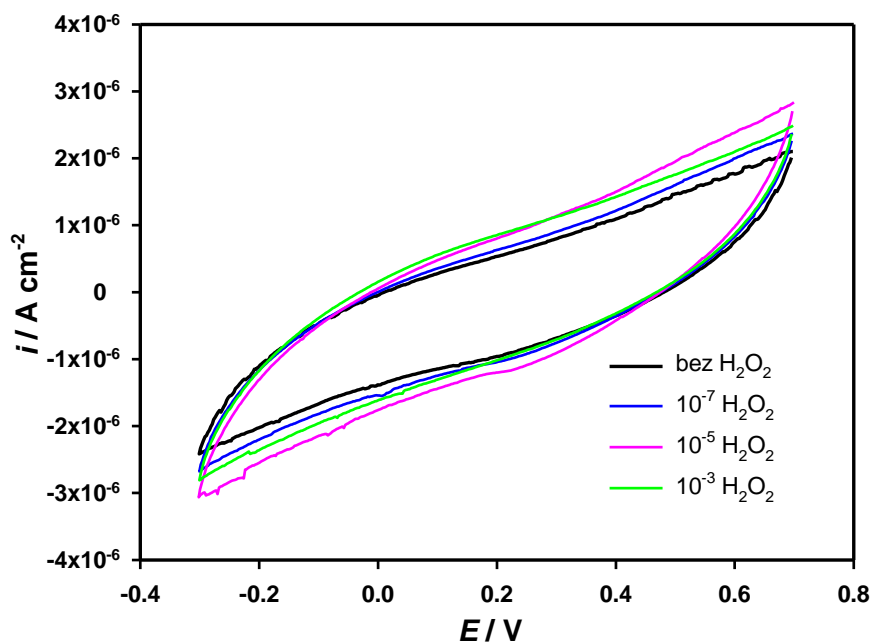


Slika 25. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u amonijakalnom puferu (pH 9). GCE-MWCNT-50

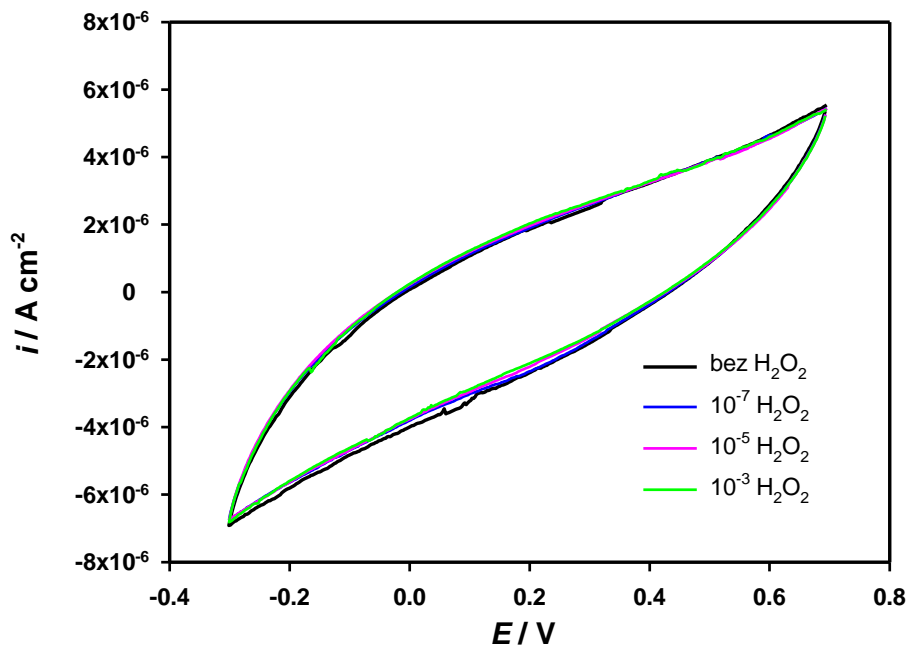
3.3. Elektrokemijsko ponašanje H_2O_2 na modificirane GCE elektrode s kompozitom MWCNT-AgCuS (GCE-MWCNT-AgCuS)

3.3.1 GCE elektroda modificirana sa 10 mg kompozita sol-gel/MWCNT/AgCuS (GCE-MWCNT-AgCuS-10)

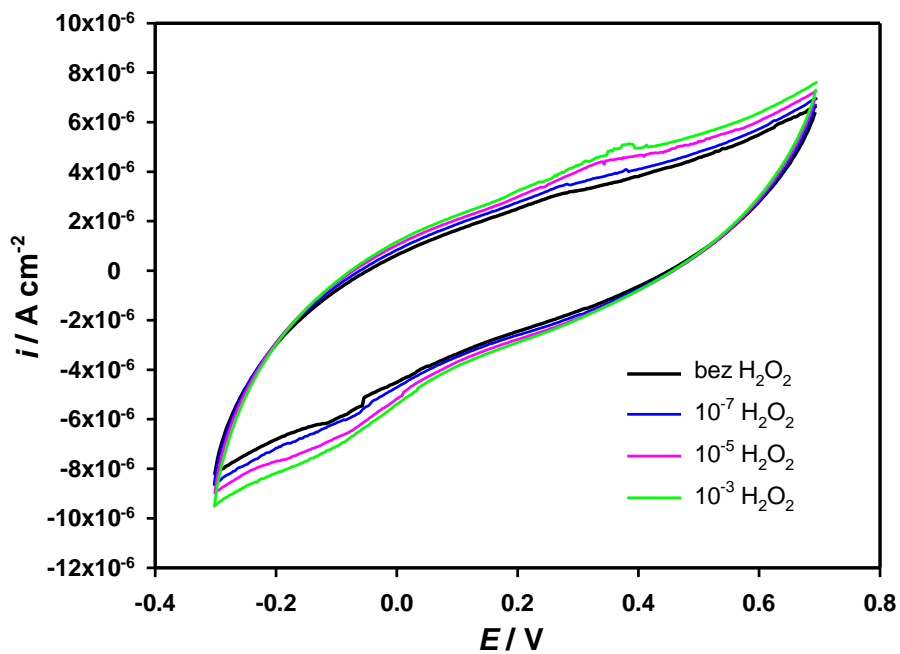
Voltamogrami snimljeni na elektrodi modificiranoj s 10 mg kompozita koji je sadržavao AgCuS, pri različitim pH vrijednostima i u prisutnosti različite konc. vodikovog peroksida su prikazani na slici 26., 27., 28. Značajnije promijene pri pH 5 i pH 7 u voltamogramima kod različite količine vodikovog peroksida se ne mogu uočiti. Promijene u voltamogramima snimljenim pri pH 5 se ne mogu pripisati utjecaju peroksida već mogućem "redoks" uravnoteživanju samog osjetilnog materijala (AgCuS) u osjetilnoj matrici.



Slika 26. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u acetatnom puferu (pH 5). GCE-MWCNT-AgCuS-10



Slika 27. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u fosfatnom puferu (pH 7). GCE-MWCNT-AgCuS-10



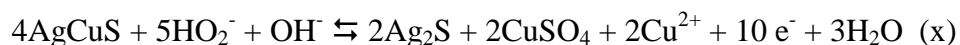
Slika 28. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u amonijakalnom puferu (pH 9). GCE-MWCNT-AgCuS-10

Voltamogrami snimljeni s ovom elektrodom pri pH 9 otkrivaju porast anodnog signala s povećanjem koncentracije vodikovog peroksida na potencijalima oko +0,4 V, te pojavi povećanih katodnih struja pri potencijalima oko -0,1 V.

Anodno povećanje struje s dodatkom vodikovog peroksida se može pripisati olakšanoj oksidaciji ternarnog sulfida prema reakciji



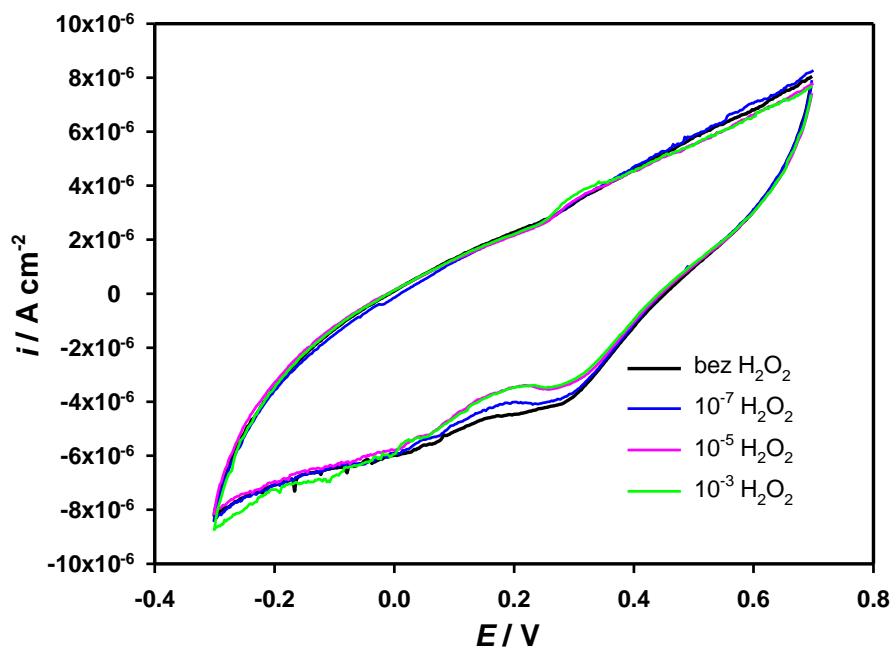
ili u lužnatom mediju



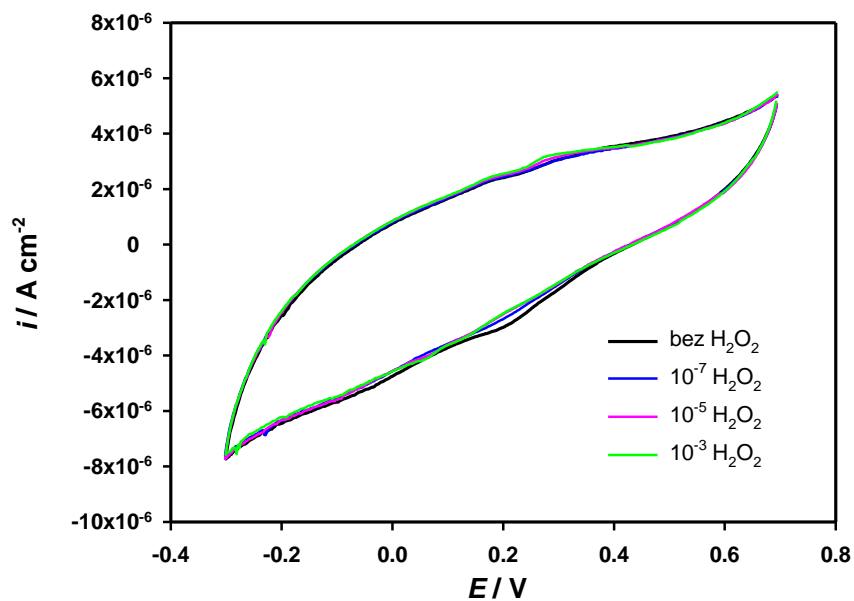
Slijedno ovoj reakciji, katodna redukcija bi se pripisala redukciji produkata anodne oksidacije, prvenstveno redukciji bakrovog (II) kationa. Reakcija je preferirana u lužnatom mediju te stoga ne iznenađuje pojava struja pri pH 9.

3.3.2 GCE elektroda modificirana sa 30 mg kompozita sol-gel/MWCNT/AgCuS (GCE-MWCNT-AgCuS-30)

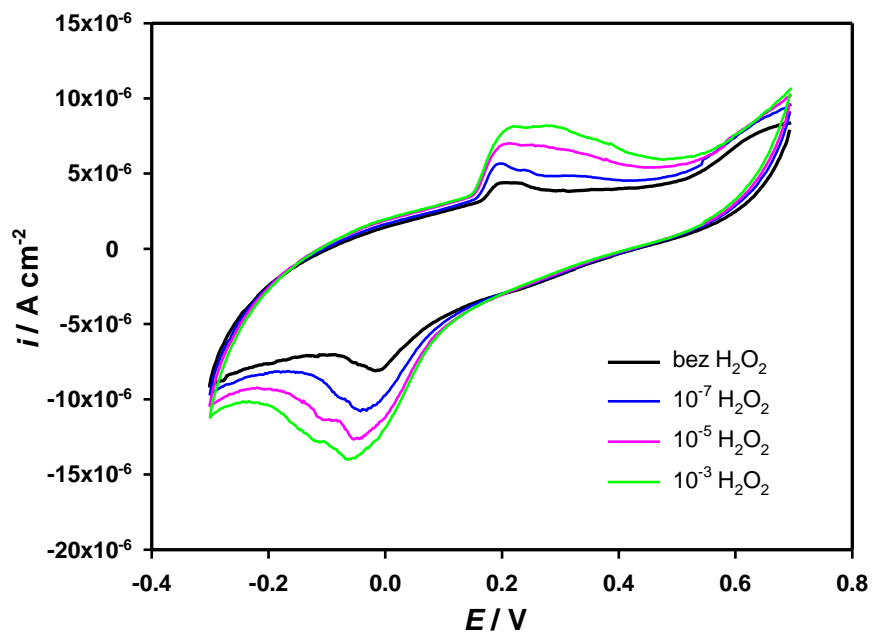
Voltamogrami snimljeni na elektrodi modificiranoj s 30 mg kompozita koji je sadržavao AgCuS, pri različitim pH vrijednostima i u prisutnosti različite konc. vodikovog peroksida su prikazani na slici 29., 30. i 31. Značajnije promijene pri pH 5 i pH 7 u voltamogramima kod različite količine vodikovog peroksida se ne mogu uočiti.



Slika 29. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u acetatnom puferu (pH 5). GCE-MWCNT-AgCuS-30



Slika 30. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u fosfatnom puferu (pH 7). GCE-MWCNT-AgCuS-30



Slika 31. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u amonijakalnom puferu (pH 9). GCE-MWCNT-AgCuS-30

Voltamogrami snimljeni s ovom elektrodom pri pH 9 otkrivaju porast anodnog signala s povećanjem koncentracije vodikovog peroksida na potencijalima oko +0,2 V, te pojavi povećanih katodnih struja pri potencijalima oko 0 V.

Anodno povećanje struje s dodatkom vodikovog peroksida se može pripisati olakšanoj oksidaciji ternarnog sulfida prema predloženoj reakciji (x).

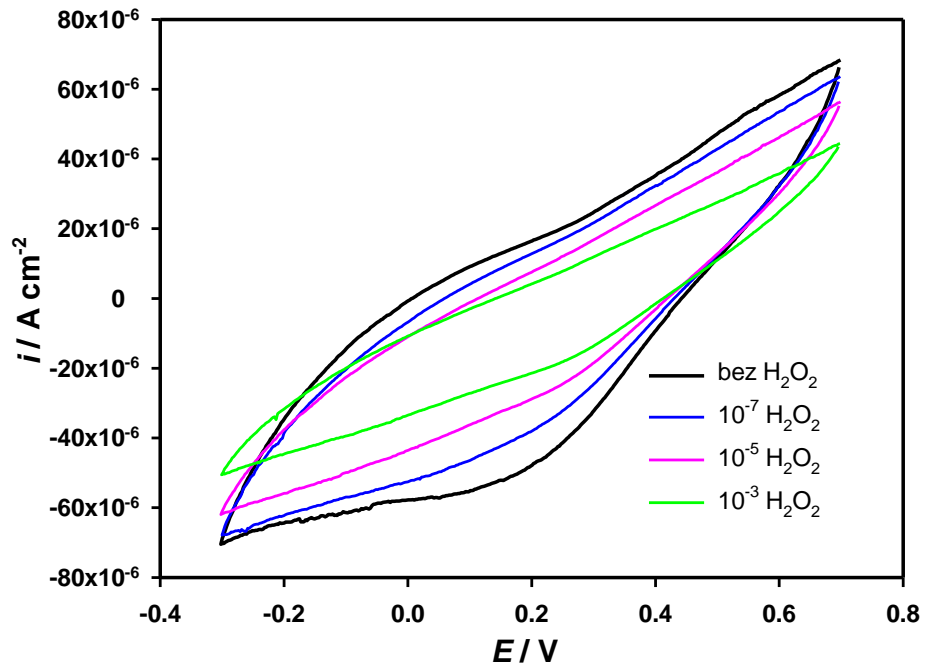
Slijedno ovoj reakciji, katodna redukcija bi se pripisala redukciji produkata anodne oksidacije, prvenstveno redukciji bakrovog (II) kationa. Reakcija je preferirana u lužnatom mediju te stoga ne iznenađuje pojava struja pri pH 9. Zbog povećane količine osjetilnog materijala gustoće struja su nešto viših iznosa od onih snimljenih kod elektrode GCE-MWCNT-AgCuS-10.

3.3.3 GCE elektroda modificirana sa 50 mg kompozita sol-gel/MWCNT/AgCuS (GCE-MWCNT-AgCuS-50)

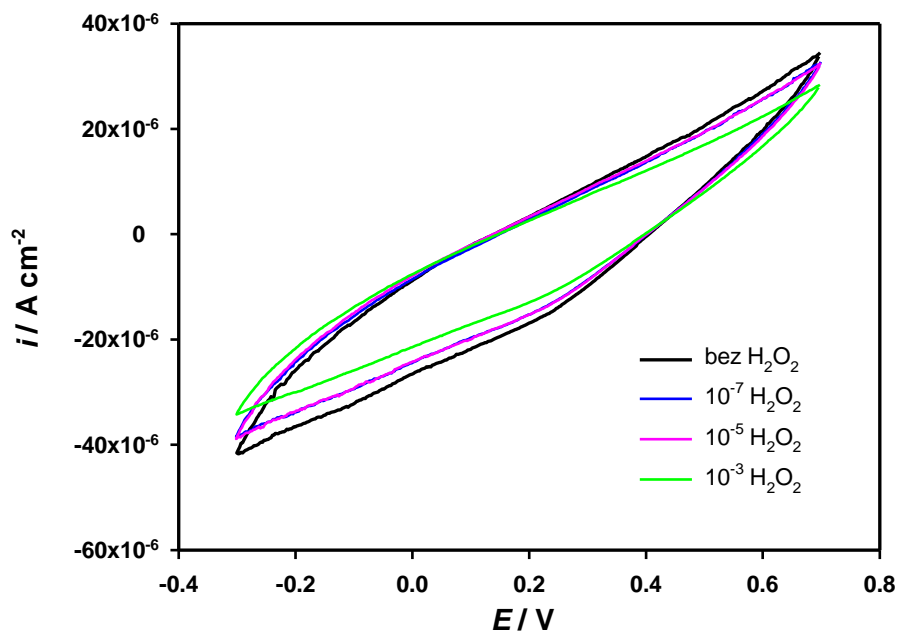
Voltamogrami snimljeni s ovom elektrodom pri pH 9 otkrivaju porast anodnog signala s povećanjem koncentracije vodikovog peroksida na potencijalima oko +0,2 V, te pojavi povećanih katodnih struja pri potencijalima oko 0 V.

Anodno povećanje struje s dodatkom vodikovog peroksida se može pripisati olakšanoj oksidaciji ternarnog sulfida prema predloženoj reakciji (x).

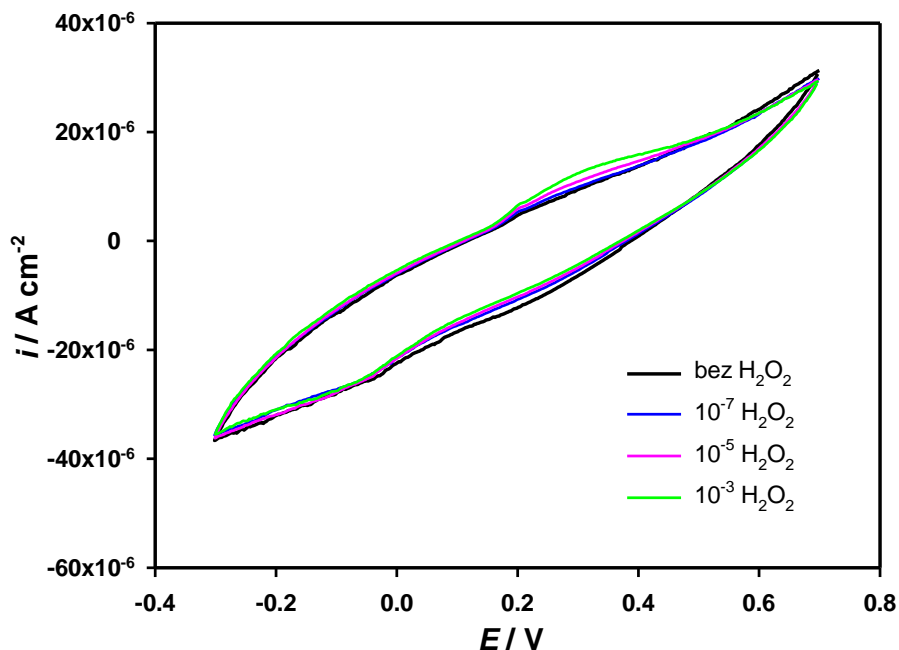
Slijedno ovoj reakciji, katodna redukcija bi se pripisala redukciji produkata anodne oksidacije, prvenstveno redukciji bakrovog(II) kationa. Reakcija je preferirana u lužnatom mediju te stoga ne iznenađuje pojava struja pri pH 9. Zbog povećane količine osjetilnog materijala gustoće struja su nešto viših iznosa od onih snimljenih kod elektrode GCE-MWCNT-AgCuS-10.



Slika 32. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u acetatnom puferu (pH 5). GCE-MWCNT-AgCuS-50



Slika 33. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u fosfatnom puferu (pH 7). GCE-MWCNT-AgCuS-50

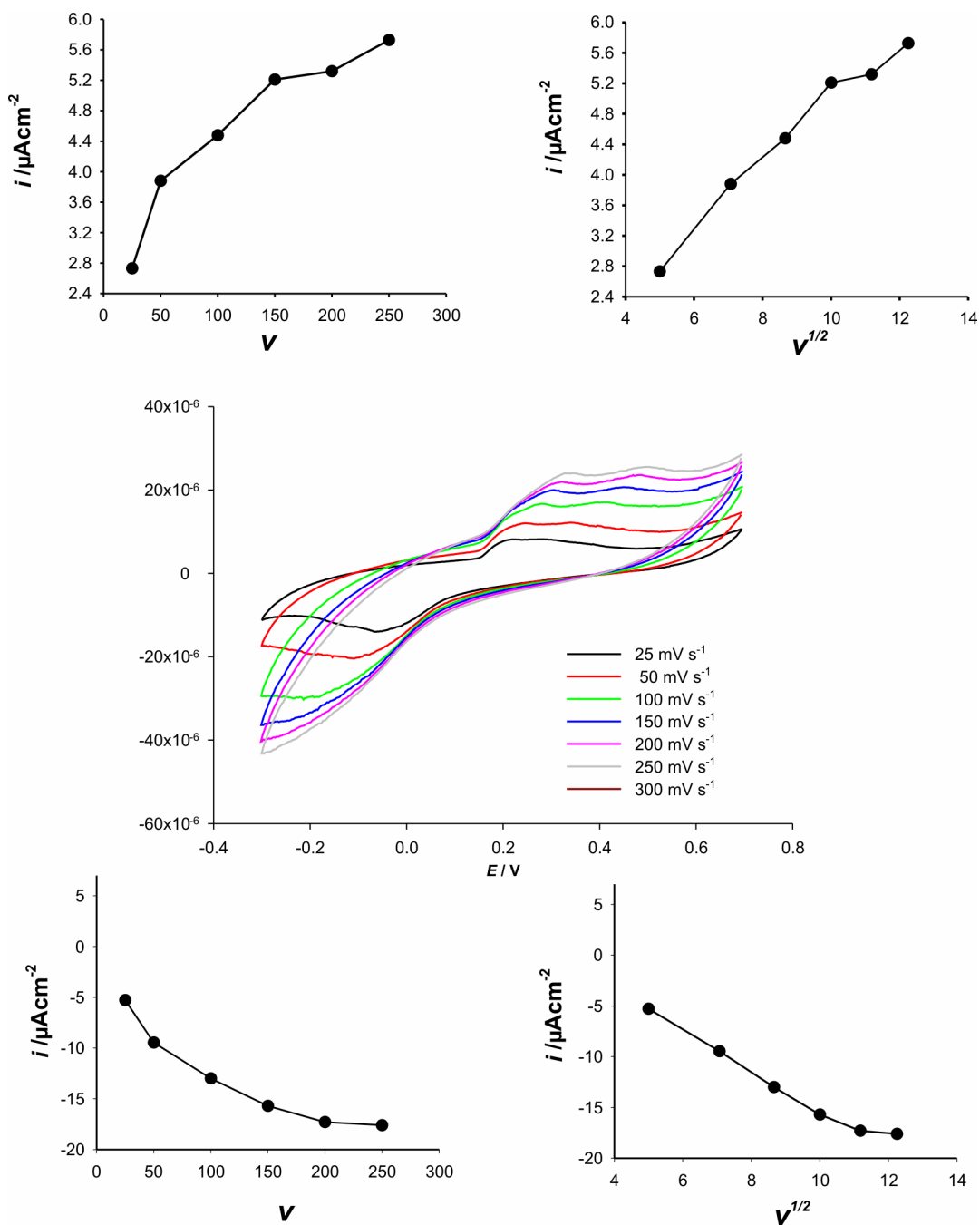


Slika 34. Utjecaj dodatka H_2O_2 na CV u amonijakalnom puferu (pH 9). GCE-MWCNT-AgCuS-50

Neočekivano, ova elektroda nije pokazala strujne pikove u lužnatom mediju. Gustoće struje voltamograma su znatno veće od onih snimljenih kod elektrode GCE-MWCNT-AgCuS-30. Ova pojava zahtjeva dodatna istraživanja, a koja bi se usmjerila u ispitivanju ponovljivosti modifikacije elektrode od staklastog ugljika s ovom količinom AgCuS.

3.4. Utjecaj posmika

Za utvrđivanje mehanizama oksidacije i redukcije snimani su voltamogrami pri različitim brzinama posmika, a pri konstantnoj koncentraciji vodikovog peroksida. Može se primijetiti da se položaj pikova, u odnosu na potencijal, ne mijenja s posmikom. Snimljeni voltamogrami prikazani su na Slici 35 zajedno s ovisnošću gustoće struje katodnih i anodnih pikova o posmiku i vrijednosti njegovog korijena. Može se prijetiti veća linearnost kod ovisnosti strujnih pikova kako anodne, tako katodne struje o ovisnosti o korijenu vrijednosti posmika sugerirajući difuzijski kontroliran mehanizam reakcije.



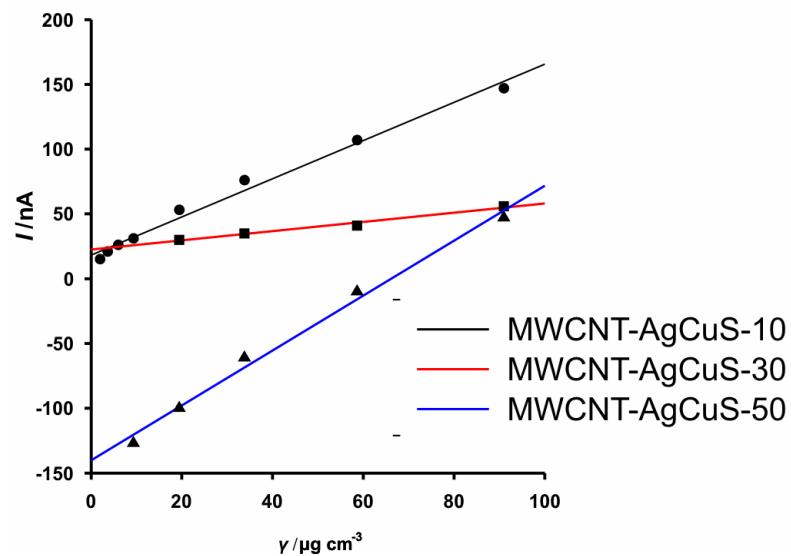
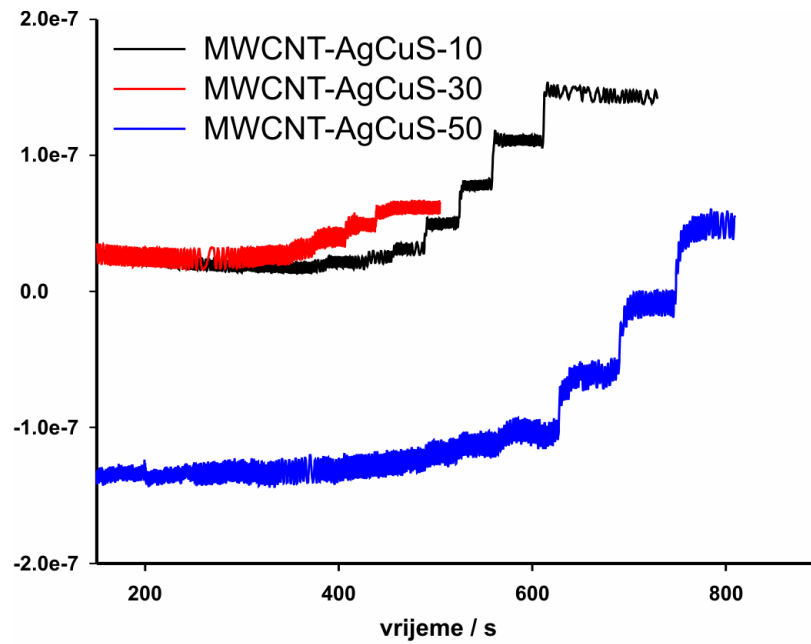
Slika 35. Utjecaj posmika na CV elektrode MWCNT-AgCuS-30 u otopini puferiranoj amonijakalnim puferom (pH 9), pri konc. H_2O_2 $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Ovisnost anodnih i katodnih struja pika o posmiku i njegovom korijenu.

3.5. Amperometrijska mjerenja

Na osnovu rezultata voltametrijskih mjerenja, odabran je anodni potencijal od +0,3 V i pH 9 pri kojem su snimani amperogrami pri sukcesivnim dodatkom vodikovog peroksida. Rezultati za sve tri elektrode modificirane s AgCuS su prikazani na slici 36., a analitički parametri u tablici 6. Granice detekcije (LOD) i granice određivanja (LOQ) su utvrđene prema IUPAC-ovim odrednicama $LOD = 3\sigma/b$ (gdje je σ standardna devijacija regresijskog pravca, a b je njegov nagib) te $LOQ = 10\sigma/b$. Zanimljivo, najšire linearno područje i zadovoljavajuću osjetljivost je pokazala elektroda s 10 mg kompozita sol-gel/MWCNT/AgCuS.

Tablica 6. Rezultati validacije analitičke metode za elektrode GCE-MWCNT-AgCuS

Parametar	Elektroda		
	GCE-MWCNT-AgCuS-10	GCE-MWCNT-AgCuS-30	GCE-MWCNT-AgCuS-50
Radni potencijal +0,3 V			
Linearno mjerno konc. područje/ $g\ cm^{-3}$	5-91	20-91	9-91
Osjetljivost/ $nA\ cm^{-3}\ g^{-1}$	1,47	0,35	2
Presjek s ordinatom / nA	15	22	-140
LOQ / $g\ cm^{-3}$	0,12	0,3	0,143
LOD / $g\ cm^{-3}$	0,42	1	0,475
r^2	0,996	0,988	0,991



Slika 36. Amperometrijski odziv elektrode GCE-MWCNT-AgCuS na sukcesivni dodatak H_2O_2 pri radnom potencijalu od $+0,3 \text{ V}$ i pri $pH \ 9$, uz pripadajuće regresijske pravce.

4 Zaključak

1. Razvijeni su kompozitni materijali sol-gel postupkom koji su sadržavali ugljikove materijale te ugljikove materijale i ternarni sulfid AgCuS.
2. Razvijeni kserogelni kompoziti su upotrijebljeni kao osjetilni elementi u poli(vinil) klorid matricama za modificiranje površine elektrode od staklastog ugljika.
3. Elektrokemijski procesi uočeni na elektrodama modificiranim s kompozitima koji su sadržavali AgCuS ukazuju mogućnost direktnog određivanja vodikovog peroksida na anodnim potencijalima od +0,3 V.
4. Mjerenja su vršena pri tri pH vrijednosti (pH 5, 7 i 9) te je kao optimalna pH vrijednost odabrana pH = 9.
5. Kao pogodna metoda pokazala se amperometrija.
6. Amperometrijska mjerenja su pokazala mogućnost određivanja vodikovog peroksida u području koncentracija od 5-90 $\mu\text{g cm}^{-3}$ s osjetljivošću od 1,47 nA $\text{cm}^3 \mu\text{g}^{-1}$ i granicom detekcije od 0,12 $\mu\text{g cm}^{-3}$ i granicom određivanja od 0,42 $\mu\text{g cm}^{-3}$.

- [1] URL: <https://www.slideshare.net/babudipak/ppt-55966071> (21.9.2019)
- [2] Janata, J., Principles of Chemical Sensors; New York: Plenum Press, 1989,
- [3] F. G. Banica, Chemical sensors and biosensors, Trondheim, Norway: A John Willey and Sons, 2012, str. 1-531.
- [4] Chemical Sensors, An Introduction for Scientists and Engineers, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.
- [5] Gorton, L., Electroanalysis 7, 23 (1995).
- [6] E. Braidot, E. Petrucci, A. Vianello, F. Macri, Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates, FEBS Letters, 1999, 451, 347.
- [7] J. Wang, Analyst, 2005, 130, 421-426
- [8] A. A. Karyakin, E. E. Karyakina and L. Gorton, Anal. Chem., 2000, 72, 1720–1723.
- [9] F. Ricci and G. Palleschi, Biosens. Bioelectron., 2005, 21, 389–407
- [10] R. Koncki, Crit. Rev. Anal. Chem., 2002, 32, 79–96.
- [11] A. A. Karyakin, E. E. Karyakina and L. Gorton, Talanta, 1996, 43, 1597-1606.
- [12] U. Scharf, Electrochim. Acta, 1996, 41, 233–239.
- [13] S. Varma, Y. Yigzaw and L. Gorton, Anal. Chim. Acta, 2006, 556, 319-325.
- [14] G. L. Luque, N. F. Ferreyra and G. A. Rivas, Microchim. Acta, 2006, 152, 277–283.
- [15] 191 Y. H. Lin, X. L. Cui and L. Y. Li, Electrochem. Commun., 2005, 7, 166–172.
- [16] S. J. Yao, J. H. Xu, Y. Wang, X. X. Chen, Y. X. Xu and S. S. Hu, Anal. Chim. Acta, 2006, 557, 78–84
- [17] Y.-H. Bai, H. Zhang, J.-J. Xu and H.-Y. Chen, J. Phys. Chem. C, 2008, 112, 18984–18990.
- [18] X. Chen, X. Zhang, W. Yang and D. G. Evans, Mater. Sci. Eng., C: Biomimetic Supramol. Syst., 2009, 29, 284–287.
- [19] B. Sljukic and R. G. Compton, Electroanalysis, 2007, 19, 1275–1280.

- [20] X. Cui, G. Liu and Y. Lin, *Nanomed.: Nanotechnol., Biol. Med.*, 2005, 1, 130–135.
- [21] C. E. Langley, B. Sljukic, C. E. Banks and R. G. Compton, *Anal. Sci.*, 2007, 23, 165–170.
- [22] B. Xu, M.-L. Ye, Y.-X. Yu and W.-D. Zhang, *Anal. Chim. Acta*, 2010, 674, 20–26.
- [23] A. Salimi, R. Hallaj, S. Soltanian and H. Mamkhezri, *Anal. Chim. Acta*, 2007, 594, 24–31.
- [24] 201 R. Yuan, X. M. Miao, Y. Q. Chai, Y. T. Shi and Y. Y. Yuan, *J. Electroanal. Chem.*, 2008, 612, 157–163.
- [25] G. L. Luque, M. C. Rodriguez and G. A. Rivas, *Talanta*, 2005, 66, 467–471.
- [26] H. Elzanowska, E. Abu-Irhayem, B. Skrzynecka and V. I. Birss, *Electroanalysis*, 2004, 16, 478–490.
- [27] S. J. Yao, J. H. Xu, Y. Wang, X. X. Chen, Y. X. Xu and S. S. Hu, *Anal. Chim. Acta*, 2006, 557, 78–84.
- [28] L.-C. Jiang and W.-D. Zhang, *Electroanalysis*, 2009, 21, 988–993.
- [29] M. S. Lin and H. J. Len, *Electroanalysis*, 2005, 17, 2068–2073.
- [30] A. Pandikumar, GT. How, HN Ming, LH. Ngee, Highly exposed {001} facets of titanium dioxide modified with reduced graphene oxide for dopamine sensing, *Sci Rep.*, 2014, 4, 5044
- [31] K. Kalcher, *Electroanalysis*, *Fresenius Z. Anal. Chemie*, 1995, 7, 5
- [32] U. Schubert, *The Sol–Gel Handbook: Synthesis, Characterization, and Applications*, First Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2015, doi: 10.1002/9783527670819.
- [33] J. Macan, Sol-gel postupak za pripravu organsko-anorganskih hibridnih materijala, *Kemija u industriji : Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, 2008, 57, 355.
- [34] J. Macan, Sol-gel postupak za pripravu hibridnih materijala, 2008, 57, 355.
- [35] URL: https://www.researchgate.net/publication/328526735_Highperformance_removal_of_diazinon_pesticide_from_water_using_multiwalled_carbon_nanotubes/figures?lo=1 (29.7.2019)
- [36] URL: <https://sites.google.com/site/cntcomposites/structure-of-cnts> (7.9.2019)

- [37] M. J. d. Andrade, Carbon nanotube/silica composites obtained by sol–gel and highpressure techniques, *Nanotechnology*, 2008, 18, 265607
- [38] J. O. M. Bockris, *Modern electrochemist 2A*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2nd Edition, New York, 2000, p. 763
- [39] I. Piljac, *Elektroanalitičke metode*, RMC Zagreb, 1995. p. 409
- [40] I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Media print, Zagreb, 2010, p.712
- [41] D. Krivić, *Elektrokemijsko ponašanje L-cisteina na miješanim srebro-bakrovim sulfidima u svrhu analitičke primjene*, *Kemijsko-tehnološki fakultet*, rujan 2016.
- [42] C.A. Razzino et al., *Food Chemistry* 170 (2015) 360-365