

Priprema Cu(II)/politiraminskog kompleksa kao katalizatora za mjerenje koncentracije askorbinske kiseline

Đalapa, Alen

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:097064>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-28**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Alen Đalapa

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Alen Đalapa

**Priprema Cu(II)/politiraminskog kompleksa kao katalizatora za
mjerjenje koncentracije askorbinske kiseline**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: Izv. prof. dr. sc. Stjepan Milardović

Članovi ispitnog povjerenstva:

Izv. prof. dr. sc. Stjepan Milardović

Izv. prof. dr. sc. Marijana Kraljić Roković

Dr. sc. Ema Horak

Zagreb, rujan 2017.

Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Stjepanu Milardoviću na nesebičnoj potpori, smjernicama i strpljenju pri izradi ovog diplomskog rada. Također zahvaljujem Ireni Ivaniševi, dipl. ing, na susretljivosti i pomoći pri izvođenju eksperimentalnog djela rada te kod same izrade.

Na kraju veliko hvala obitelji, curi i prijateljima na svu potporu, koju ste mi pružili tijekom studiranja. Bez svih vas ovo ne bi bilo moguće.

SAŽETAK

U ovom radu izvedena je priprema Cu(II)/politiraminskog kompleksa kao katalizatora za mjerenje koncentracije askorbinske kiseline, modificiranjem zlatne (Au) elektrode politiraminom i naknadnim kompleksiranjem politiramina bakrom. Ciklička voltometrija korištena je kao glavna tehnika za pripremu i karakterizaciju elektrode.

Sloj politiramina nanesen je na zlatnu elektrodu elektropolimerizacijom tiramina iz 2,5 mM otopine tiramina pripravljene u fosfatnom puferu pH=4,10. Naneseno je ukupno 20 slojeva polimera. Cu(II)/politiraminski kompleks pripremljen je uranjanjem Au-PTy modificirane elektrode u 1 mM otopinu bakrovih iona pripravljenju u HEPES puferu pH=8. Akumulacija bakra provedena je u trajanju od 20 minuta, nakon čega je elektroda temeljito isprana deioniziranom vodom. Provedena su mjerenja odziva zlatne te modificiranih Au-PTy i Au-PTy-Cu elektroda uz promjenu koncentracije askorbinske kiseline, te su u rezultatima prikazane njihove usporedbe. Provjerena je stabilnost Au-PTy-Cu modificirane elektrode. Napravljena je optimizacija vremena akumulacije bakra, pH medija pogodnog za akumulaciju bakra, te broja slojeva politiramina nanesenih na površinu zlatne elektrode.

Oslojavanjem zlatne elektrode politiraminom uspješno je uklonjeno interferiranje mokraćne kiseline te je tako omogućeno mjerenje koncentracije askorbinske kiseline. Modifikacijom Au-PTy elektrode bakrom dolazi do pojave katalitičkog efekta koji se očituje u procesu oksidacije askorbinske kiseline. Stabilnost Au-PTy-Cu modificirane elektrode smanjuje se s vremenom stajanja na zraku i uzastopnim mjerenjem. Za mjerenje koncentracije askorbinske kiseline uočeno je optimalno vrijeme akumulacije bakra od 20 minuta u blago lužnatom mediju (pH=8).

Ključne riječi: bakar(II), zlatna elektroda, modificirana elektroda, politiramin, ciklička voltometrija, askorbinska kiselina

Preparation of polytyramine Cu(II) complex layer as catalyst for ascorbic acid determination

ABSTRACT

In this thesis Cu(II)/polytyramine complex is prepared as a catalyst for determination of ascorbic acid by modification of a gold electrode with polytyramine and further modification by copper complexation. Cyclic voltammetry is used as the main technique for preparation and characterization of the electrode.

Polytyramine layer is deposited on the gold electrode with electropolymerization of tyramine from 2,5 mM solution of tyramine and phosphate buffer pH=4,10. Altogether 20 layers of polytyramine is deposited on the gold electrode. Cu(II)/polytyramine complex is prepared by immersion of Au-PTy modified electrode into a 1 mM solution of copper ions prepared in HEPES buffer pH=8. Accumulation is carried out for 20 minutes, after which the electrode was thoroughly washed with deionized water. Responses of Au, Au-PTy and Au-PTy-Cu electrodes are measured with changing concentrations of ascorbic acid and comparisons of these measurements is shown in the results section. Stability of the Au-PTy-Cu modified electrode is tested. Optimization of time of copper accumulation, pH of solution from which copper is accumulated and number of polytyramine layers deposited on gold electrode was carried out.

With deposited polytyramine on the gold electrode the interference of uric acid with ascorbic acid is removed, thus enabling measurement of ascorbic acid. Modified Au-PTy electrode with copper shows catalytic effect on oxidation of ascorbic acid. Stability of Au-PTy-Cu modified electrode decreases with time of the electrode being exposed to air and its repeated use. Optimal time of accumulation of copper is 20 minutes and optimal pH of solution from which copper is accumulated is pH= 8.

Key words: copper(II), gold electrode, modified electrode, polytyramine, cyclic voltammetry, ascorbic acid

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Voltometrija	2
2.1.1. Ciklička voltometrija	2
2.2. Polimerom modificirane elektrode.....	9
2.2.1. Elektropolimerizacija nevodljivih polimera	9
2.3. Politiramin	10
2.4. Askorbinska kiselina.....	12
2.5. Bakar	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijali	15
3.2. Priprema otopina i instrumentacija	16
3.2.1. Priprema otopina	16
3.2.2. Instrumentacija	17
3.3. Priprema Au elektrode.....	18
3.3.1. Čišćenje površine zlatne elektrode	18
3.4. Priprema Au-PTy modificirane elektrode.....	18
3.4.1. Karakterizacija Au-PTy modificirane elektrode	18
3.5. Priprema Au-PTy-Cu modificirane elektrode	19
3.5.1. Karakterizacija Au-PTy-Cu modificirane elektrode.....	19
3.6. Optimizacija	20
3.6.1. Optimizacija vremena akumulacije	20
3.6.2. Optimizacija pH medija akumulacije bakra	20
3.6.3. Optimizacija broja slojeva politiramina.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4.1. Karakterizacija zlatne elektrode	21
4.2. Karakterizacija Au-politiraminom modificirane elektrode.....	24
4.2.1. Priprema Au-politiraminom modificirane elektrode	24
4.2.2. Karakterizacija Au-politiraminom modificirane elektrode.....	25
4.3. Karakterizacija Au-politiramin-Cu modificirane elektrode	28
4.4. Optimizacija	30
4.4.1. Optimizacija vremena akumulacije	30

4.4.2. Optimizacija pH medija za akumulaciju bakra	31
4.4.3. Optimizacija broja slojeva politiramina.....	33
4.5. Baždarenje Au-politiramin-Cu modificirane elektrode	35
5. ZAKLJUČAK	38
6. POPIS SIMBOLA	39
7. LITERATURA	41
8. ŽIVOTOPIS.....	44

1. UVOD

Polimerom modificirane elektrode pružaju niz posebnosti, koje se mogu dizajnirati za različite elektrokatalitičke i elektroanalitičke aplikacije. Proces elektropolimerizacije nije ograničen geometrijskom površinom elektrode i nudi mnoge prednosti kao što su jednostavna kontrola debljine sloja, te obnovljivost i ravnomjernost polimernog sloja na površini elektrode [1].

Nevodljivi polimeri počeli su se više koristiti kao potporna matrica za imobilizaciju biomolekula jer omogućuju odličnu propusnost za mjerni analit, pospješuju selektivnost i obnovljivost senzorske površine. Rast sloja takvih polimera je limitiran (dolazi do površinske električne izolacije), pa je sloj stvoren na elektrodi zbog toga tanji od vodljivih polimera. Zbog debljine sloja nevodljivih polimera, koja iznosi 10 do 100 nm, supstrati i produkti stalno difundiraju prema i od enzima imobiliziranih unutar matrice nevodljivih polimera. Također, nevodljivi polimeri su polupropusni, što je korisno za sprečavanje dolaska interferenta na površinu elektrode [1,2].

Elektrokemijska polimerizacija derivata fenola, kao što je tiramin, pažljivo se istražuje zbog njegovih primjena u izradi biosenzora i imunosenzora. Prisutnost slobodne amino skupine je idealna za kovalentno vezanje enzima formiranjem peptidne veze [3].

U literaturi je do sada zabilježeno nekoliko izvedbi senzora modificiranih s politiraminom. Neki od njih su elektroda od staklastog ugljika (engl. *glassy carbon*, GC) modificirana politiraminom za određivanje dopamina i askorbinske kiseline [3], impedimetrijski biosenzor elektropolimeriziran politiraminom za određivanje salmonele [4], sulfitni biosenzor modificiran politiraminom za aplikacije u analizi vina [5], te platinasta disk elektroda modificirana politiraminom za određivanje mokraćne kiseline [6].

Različite mjerne tehnike koriste se za određivanje askorbinske kiseline kao npr.: potenciometrijsko određivanje u farmaceutskim uzorcima [7], elektrokatalitičko određivanje [8], detekcija u voćnim sokovima cikličkom voltametrijom [9] te amperometrijsko određivanje askorbinske kiseline [10,11].

2. OPĆI DIO

2.1. Voltometrija

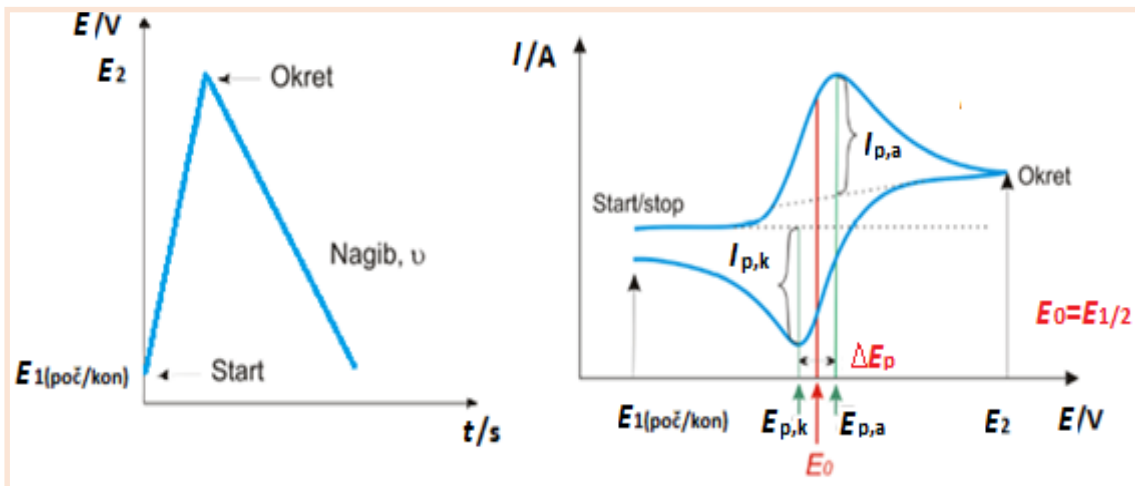
Voltometrija se temelji na odnosu između napona, struje i vremena koji se mjere u elektrokemijskoj ćeliji s tri elektrode: radne, referentne i pomoćne elektrode. U voltimetriji primjenom vanjskog potencijala na radnu elektrodu mijenjamo njezin potencijal relativno u odnosu na stalni potencijal referentne elektrode, te mjerimo struju koja prolazi kroz radnu i pomoćnu elektrodu. Potencijal primijenjen na radnu elektrodu služi kao pokretačka sila za reakciju (oksidacija ili redukcija) koja se odvija na površini elektrode [12,13].

Pomoćna elektroda je obično platinasta žica, a referentna elektroda je standardna Hg|Hg₂Cl₂ elektroda (kalomelova elektroda) ili Ag|AgCl elektroda. Radna elektroda može biti građena od različitih materijala, uključujući zlato, živu, platinu, srebro i ugljik [13].

Voltometrijske metode koriste se za kvalitativne i kvantitativne analize organskih, anorganskih i bioloških specija te uključuju: voltometriju s linearnom promjenom potencijala (engl. *linear sweep voltammetry*, LSV), cikličku voltometriju (engl. *cyclic voltammetry*, CV), diferencijalnu pulsnu voltometriju (engl. *differential pulse voltammetry*, DPV), voltometriju s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (engl. *square wave voltammetry*, SWV), voltometriju katodnog i anodnog otapanja (engl. *anodic and cathodic stripping voltammetry*, ASV i CSV), adsorptivnu „stripping“ voltometriju (engl. *adsorptive stripping voltammetry*, AdSV) i elektrokemijski „immunoassay“ [14,15].

2.1.1. Ciklička voltometrija

Ciklička voltometrija je elektroanalitička tehnika koja se temelji na linearnoj promjeni potencijala radne elektrode. Početni ciklus predstavlja promjenu potencijala od željene početne do konačne vrijednosti, a povratni ciklus od krajnjeg prema početnom potencijalu. Na vremenskoj skali ovakav signal pobude ima karakterističan trokutasti oblik (*slika 1a*). Kao rezultat pobudnog signala na radnoj se elektrodi odvija elektrokemijska reakcija koju registriamo kao struja-potencijal krivulju, odnosno *ciklički voltamogram* (*slika 1b*). Skeniranje potencijala u oba smjera omogućuje istraživanje elektrokemijskog ponašanja elektroaktivnih vrsta generiranih uz površinu elektrode, što je ujedno prednost cikličke voltometrije prema ostalim voltometrijskim tehnikama [12,13].



Slika 1. Prikaz signala: a) pobude, b) odziva u cikličkoj voltametriji.

Karakteristične veličine svakog voltamograma su katodni i anodni potencijali strujnog vrha ($E_{p,k}$ i $E_{p,a}$), visine katodnog i anodnog vrha ($I_{p,k}$ i $I_{p,a}$) i razlika potencijala strujnih vrhova (ΔE_p). Standardni elektrodni potencijal se određuje kao prosječna vrijednost jedne polovine razlike potencijala anodnog i katodnog vrha vala te se opisuje izrazom (1).

$$E^{\circ} = \frac{E_{p,a} - E_{p,k}}{2} \quad (1)$$

Obzirom na međusobni odnos brzine izmjene naboja i difuzije, procese koji se odvijaju na elektrodi možemo podijeliti u tri skupine: reverzibilni, ireverzibilni i kvazireverzibilni [16].

a) Reverzibilan proces

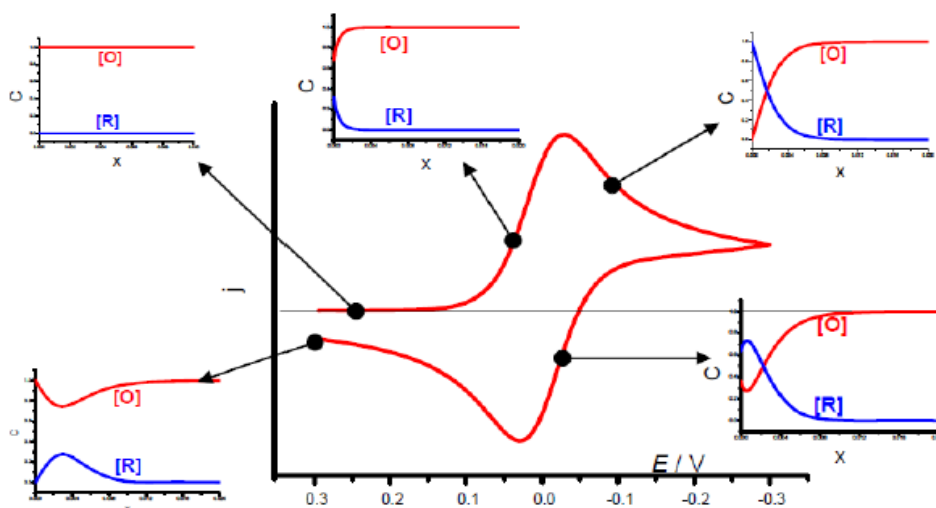
Prijenos naboja kod reverzibilnih procesa je puno brži od difuzije. Signal odziva ovisi samo o brzini difuzije produkta od elektrode prema masi otopine, odnosno brzini difuzije reaktanta prema površini elektrode. Kod svakog potencijala na površini radne elektrode dolazi do uspostave ravnotežnog omjera koncentracija oksidiranog $c_e(O)$ i reduciranog $c_e(R)$ oblika redoks sustava. Taj se omjer opisuje Nernst-ovom jednačinom:

$$\frac{c_e(O)}{c_e(R)} = \exp \left[\frac{z \cdot F}{R \cdot T} (E - v \cdot t - E^{0'}) \right] \quad (2)$$

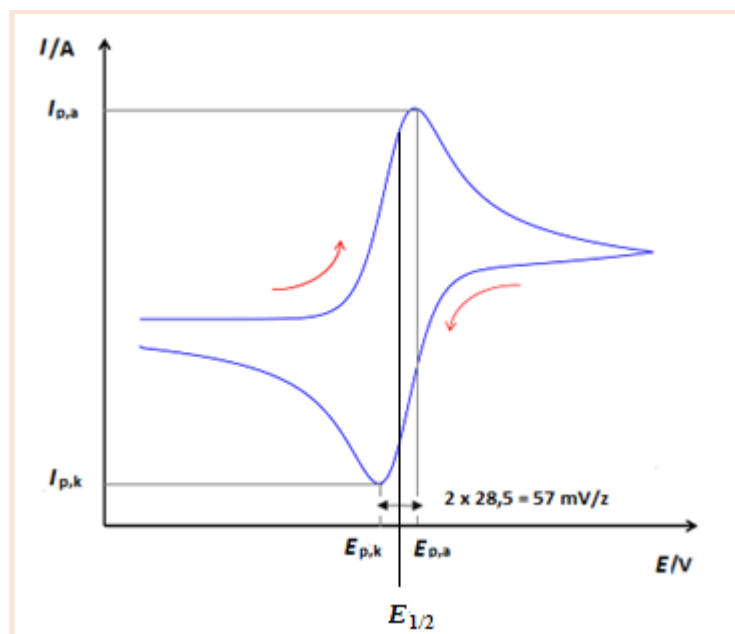
gdje je: E^0 – standardni elektrodni potencijal redoks sustava, E – ravnotežni elektrodni potencijal, v – brzina promjene potencijala, R – opća plinska konstanta, koja iznosi $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, T – termodinamička temperatura.

U početku kroz ćeliju protječe samo osnovna struja, sve dok potencijal radne elektrode ne dostigne standardni elektrodni potencijal. U toj fazi ne dolazi do elektrodne reakcije, što se na cikličkom voltamogramu prikazuje kao ravan tok krivulje (Slika 2 i 3). Rastom potencijala elektrode povećava se brzina elektrodne reakcije oksidacije, pa na voltamogramu nastaje ulazni dio anodne krivulje. Kod određenog potencijala struja dostiže svoju maksimalnu vrijednost, rezultirajući nastankom anodnog strujnog vrha. Zbog nestajanja reaktanta neposredno uz površinu elektrode dolazi do postepenog smanjenja struje.

Tek kada se, nakon promjene smjera potencijala, približimo vrijednosti standardnog elektrodnog potencijala elektroaktivne vrste, počinje se odvijati proces redukcije. Produkt nastao na površini elektrode procesom oksidacije u toj se fazi reducira, što rezultira nastankom katodnog strujnog vrha. Što je veća koncentracija tvari, više izmijenjenih elektrona, veća površina elektrode i brža promjena potencijala u vremenu, to će katodni strujni vrh biti izraženiji. Pomicanjem potencijala prema negativnijim vrijednostima dolazi do smanjivanja koncentracije oksidirane vrste i struja ćelije postupno opada na vrijednost osnovne struje.



Slika 2. Koncentracijski profil oksidirane i reducirane vrste za reverzibilni ciklički voltamogram.



Slika 3. Ciklički voltamogram reverzibilnog elektrodnog procesa.

Randles-Ševčik-ova jednačba (3) matematički opisuje gore navedene tvrdnje:

$$I_p = 0,4463 \cdot z \cdot F \cdot c \cdot A \cdot \left(\frac{z \cdot F \cdot D \cdot v}{R \cdot T} \right)^{1/2} \quad (3)$$

gdje je: z – broj izmijenjenih elektrona; F – Faraday-eva konstanta, $C \text{ mol}^{-1}$; c – koncentracija elektroaktivne vrste, mol cm^{-3} ; A – površina elektrode, cm^2 ; D – difuzijski koeficijent, $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$; v – brzina promjene potencijala, V s^{-1} ; R – opća plinska konstanta, $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$; T – temperatura, K ; I_p – struja vrha vala, A .

Potencijal vrha katodnog vala je negativniji od polarografskog poluvalnog potencijala elektroaktivne vrste, što je pokazano jednačbom (4):

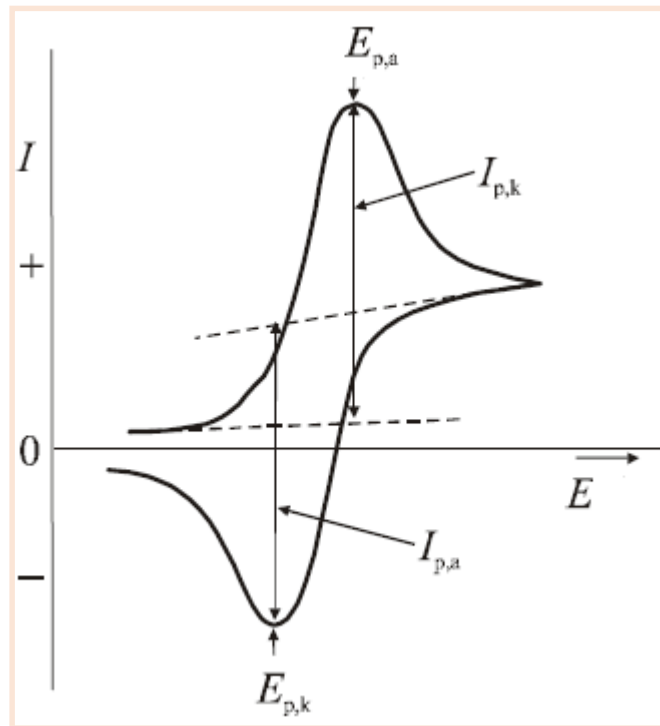
$$E_p = E_{1/2} - 1,109 \cdot \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \quad (4)$$

uvrštanjem vrijednosti $R=8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, $T=298 \text{ K}$ i $F=96487 \text{ C mol}^{-1}$ vrijedi:

$$E_p = E_{1/2} - \frac{28,5}{z} \text{ mV} \quad (5)$$

Potencijal vrha anodnog vala je pozitivniji od polarografskog poluvalnog potencijala za $28,5 \text{ mV } z^{-1}$, što čini razliku između potencijala katodnog i anodnog vrha vala kod reverzibilnih procesa pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ $57 \text{ mV } z^{-1}$, te ne ovisi o brzini promjene potencijala.

Za reverzibilni elektrodni proces, uz uvjet stabilnosti obje vrste redoks sustava, odnos visine katodnog i anodnog vala cikličkog voltamograma iznosi $I_{p,k}/I_{p,a}=1$ i ne ovisi o brzini promjena potencijala (Slika 4). Omjer odziva struje u bilo kojoj točki vala i drugog korijena brzine promjene potencijala je konstantan i također ne ovisi o brzini promjene potencijala [16].



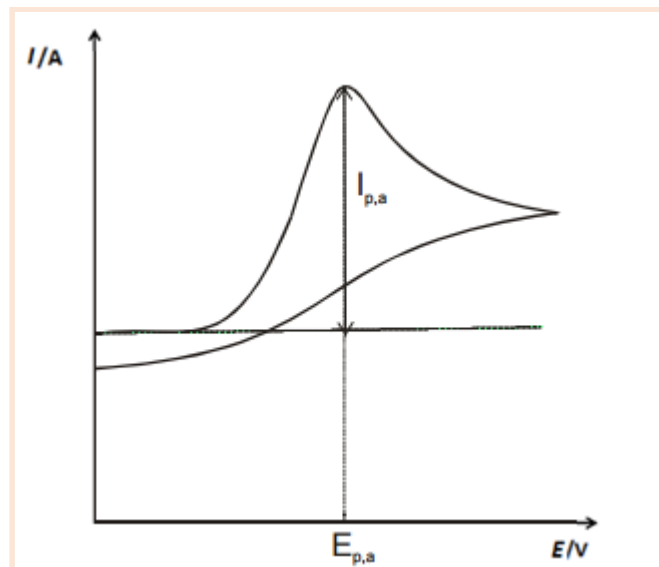
Slika 4. Prikaz obrade cikličkog voltamograma.

b) Ireverzibilan proces

Ciklički voltamogram kod ireverzibilnih procesa (Slika 5) ima samo polazni val, tj. ne dolazi do povratnog procesa redukcije. Kako je difuzija elektroaktivne vrste relativno brza, reakcija se odvija pod kontrolom izmjene naboja kao njenog najsporijeg stupnja. Zbog spore elektrodne reakcije promjena potencijala elektrode ne ovisi o koncentracijskom omjeru oksidiranog i reduciranog oblika, tj. ne može se opisati Nernst-ovom jednačbom.

Omjer odziva struje u bilo kojoj točki vala i drugog korijena brzine promjene potencijala je konstantan i ne ovisi o brzini promjene potencijala, ali ovisi o koncentraciji tvari i kinetičkim parametrima elektrodne reakcije, odnosno standardnoj konstanti brzine elektrodne reakcije (k^0) i koeficijentu prijelaza elektrona (α).

Potencijal vrha vala znatno je pozitivniji od standardnog potencijala sustava i ovisi o kinetičkim parametrima te raste s povećanjem brzine promjene potencijala za $30 \text{ mV } \alpha^{-1} z_a^{-1}$, pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$, za svako deseterostruko povećanje brzine [16].



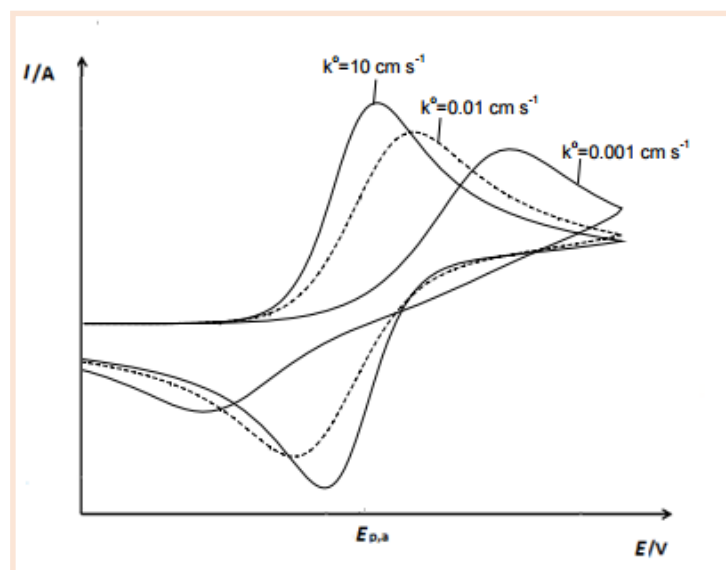
Slika 5. Ciklički voltamogram ireverzibilnog procesa.

c) Kvazireverzibilan proces

Brzina izmjene naboja i difuzije su kod kvazireverzibilnih procesa usporedive pa kod malih brzina promjene potencijala pokazuju reverzibilan oblik ponašanja, dok porastom brzine poprimaju karakteristike ireverzibilnog procesa.

Struja odziva u kvazireverzibilnoj reakciji ovisi o kinetici redoks procesa. Oblik i visina strujnih vrhova ovise o brzini promjene potencijala (v), koeficijentu prijelaza elektrona (α), standardnoj konstanti brzine elektrodne reakcije (k^0) (Slika 6) i o difuzijskim koeficijentima oksidirane i reducirane vrste (D_O , D_R).

Kod kvazireverzibilnog procesa vršna se struja vala povećava s porastom drugog korijena brzine promjene potencijala. Razlika između potencijala vrha katodnog i anodnog vala veća je od razlike za reverzibilni proces i raste s povećanjem brzine promjene potencijala, jer se potencijal katodnog vrha vala pomiče prema negativnijim vrijednostima [16].



Slika 6. Ciklički voltamogram kvazireverzibilnog procesa za različite vrijednosti standardnih konstanti izmjene naboja (k^0) ($E_0=0 \text{ V}$, $c_O=5 \text{ mM}$, $v=1 \text{ V s}^{-1}$, $D_O=D_R=10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

2.2. Polimerom modificirane elektrode

Elektrokemijskim nanošenjem slojeva na vodljive čvrste površine dobivamo polimerom modificirane elektrode. Ovako pripremljene elektrode korisne su zbog mogućnosti njihove primjene na razne elektrokemijske sustave bez modifikacije njihovih svojstava [6,17].

2.2.1. Elektropolimerizacija nevodljivih polimera

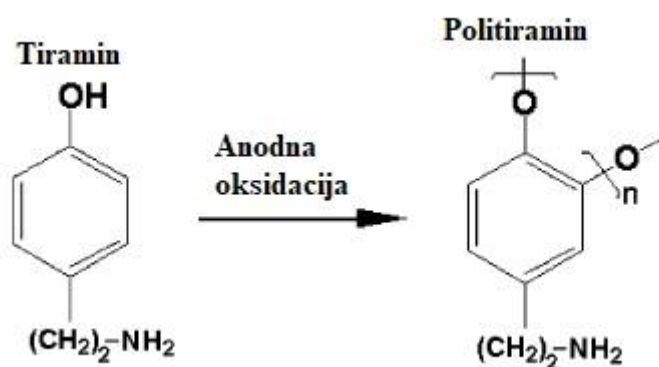
Elektropolimerizacija vodljivih polimera, kao što su polipirol, polianilin, poliacetilen i drugi, opširno je istražena zbog njihove visoke vodljivosti te stabilnosti na zraku i u vodenim otopinama. Tijekom elektropolimerizacije moguće je kontrolirati debljinu sloja i količinu imobiliziranog enzima.

Nakon vodljivih polimera, nevodljivi polimeri počeli su se sve više koristiti kao potporna matrica za imobilizaciju biomolekula jer pružaju odličnu permselektivnost i obnovljivost senzorske površine.

Biosenzori s nevodljivim polimerima za imobiliziranje enzima imaju nekoliko prednosti u odnosu na one modificirane vodljivim slojevima. Prvo, debljina sloja kod nevodljivih je polimera samokontrolirana tijekom elektropolimerizacije, prilikom čega dolazi do tvorbe jednolikog i vrlo tankog sloja. Takvi biosenzori općenito posjeduju prednosti brzog odziva i visoke osjetljivosti zbog relativno velike količine vezanog enzima. Drugo, sloj nevodljivih polimera je uglavnom učinkovit kod sprječavanja utjecaja interferenata i uklanjanja smetnji elektroaktivnih vrsta, kao npr. aksorbinska i mokraćna kiselina, koje na čistim elektrodama pokazuju vrlo slične potencijale oksidacije. Nadalje, slojevi nevodljivog polimera pogodni su za mjerenje kapaciteta kada površina elektrode treba biti pravilno izolirana [6].

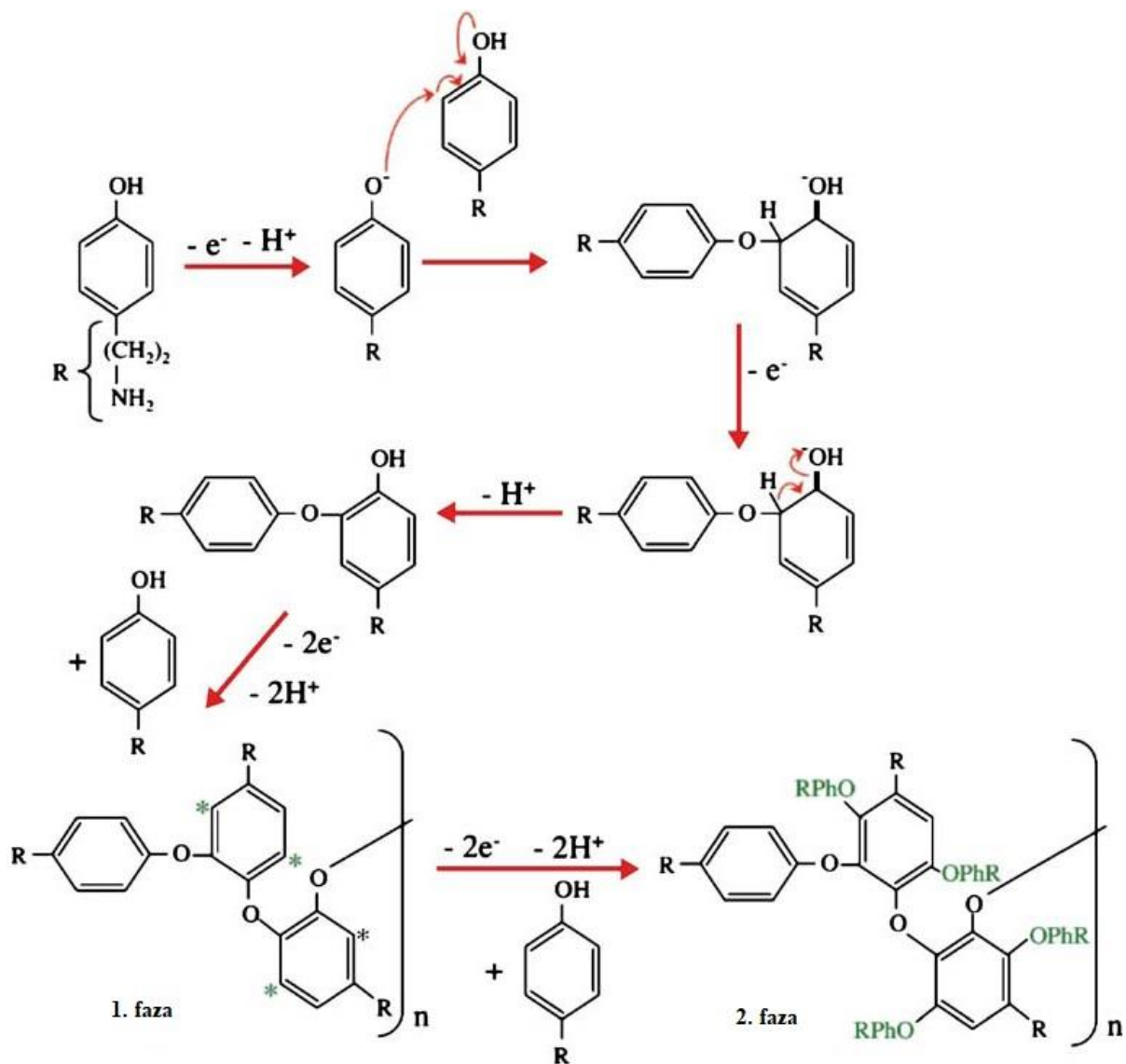
2.3. Politiramin

Tiramin, ili 4-(2-aminoetil) fenol, je biogeniaminski derivat aminokiseline tirozin, koji se prirodno nalazi u biljnom i životinjskom tkivu. Ova se monomerna jedinica koristi kao polazni spoj za sintezu sloja nevodljivog polimera, te ima važnu primjenu kod izrade biosenzora. Proces i mehanizam elektropolimerizacije tiramina prikazan je na slikama 7 i 8. Prisutnost slobodne amino skupine na glavnom lancu polimera omogućuje kovalentno vezanje enzima formiranjem peptidne veze.



Slika 7. Shematski prikaz polimerizacije tiramina.

Prvi korak u polimerizaciji obuhvaća formiranje dimera u kojem su dvije molekule tiramina povezane preko atoma kisika. Reakciju prati izmjena dva elektrona te gubitak dva protona. Vezanjem dimernih jedinica nastaju kratki oligomerni lanci relativno slabe provodljivosti, dok daljnjom polimerizacijom dolazi do formiranja ravnog sloja politiramina. Reaktivna mjesta u procesu polimerizacije monomera, kao i sam mehanizam reakcije, prikazani su na slici 8 [18].



Slika 8. Mehanizam polimerizacije tiramina na površini elektrode.

2.4. Askorbinska kiselina

Askorbinska kiselina, ili vitamin C, je esencijalna biološki važna molekula topljiva u vodi. Jedan je od najviše istraživanih vitamina, te prvi sintetski priređeni vitamin. Sudjeluje kao reducens u brojnim biološkim procesima kao što su: vezanje slobodnih radikala, metabolizam masti, sinteza kolagena i sprječavanju nastanka tumorskih stanica. Askorbinsku kiselinu možemo pronaći u hrani, biljkama i životinjskom tkivu. Koristi se u farmaceutskoj industriji, kozmetičkim aplikacijama te kao antioksidans u hrani.

Pomanjkanje askorbinske kiseline može voditi do simptoma skorbuta i krvarenja desni, dok višak vitamina C rezultira nastankom mokraćnog kamenca, konvulzije želuca i dijareje [10].

Određivanje koncentracije askorbinske kiseline od velikog je značaja u industriji, farmaciji i kontroli hrane. Kvantifikacija askorbinske kiseline općenito se temelji na redukcijskim svojstvima same molekule ili mogućnosti tvorbe optički aktivnih produkata. Askorbinska kiselina može se određivati titrimetrijskim, spektrofotometrijskim, enzimskim, kromatografskim i elektrokemijskim metodama. U laboratorijima su najčešće korištene *spektrofotometrijske metode*, koje za nedostatak imaju istovremeno određivanje askorbinske i dehidroksiaskorbinske kiseline, kao njenog glavnog oksidacijskog produkta. *Kromatografske metode* zahtijevaju relativno dugačko vrijeme analize i skupu instrumentaciju. *Enzimske metode*, koje su jako selektivne, teško je kontrolirati zbog specifičnih uvjeta rada potrebnih za sprečavanje denaturacije enzima.

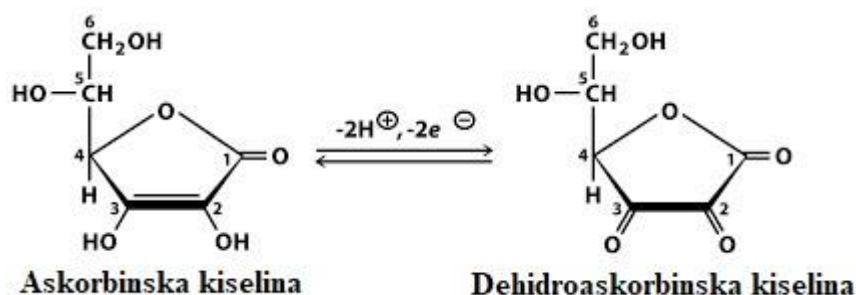
Elektrokemijske metode ne zahtijevaju prethodnu pripremu uzorka, pokazuju relativno visoku osjetljivost i mogu se uspješno koristiti u obojenim matricama te, shodno tome, daju brojne prednosti u odnosu na prethodno opisane metode. Iako je askorbinska kiselina elektroaktivna molekula, njezina oksidacija na ugljikovim i metalnim elektrodama obično zahtijeva nepoželjne visoke radne potencijale, što kao rezultat ima učestalu interferenciju drugih lako oksidirajućih spojeva. Ovaj se problem može savladati upotrebom modificiranih elektroda, koje favoriziraju elektrokatalizu [11].

2.4.1. Molekulska struktura

L-askorbinska kiselina je dvoprotonska kiselina s ugrađenom enediol grupom u peteročlani heterociklički laktonski prsten. Kemijska i fizikalna svojstva askorbinske kiseline mogu se povezati s njenom strukturom.

J. Hvoslef 1967. godine difrakcijom rendgenskih zraka na monokristalu opisuje kristalnu i molekulsku strukturu L-askorbinske kiseline. U sastav jedinične ćelije ulaze četiri molekule kiseline, od kojih su dvije povezane u asimetričnu jedinicu vodikovim vezama [19]. Molekula askorbinske kiseline sastoji se od dva asimetrična C-4 i C-5 ugljikova atoma, stoga pored L-askorbinske kiseline postoje i još tri druga stereoizomera: D-askorbinska kiselina, D-izoaskorbinska kiselina i L-izoaskorbinska kiselina. Navedeni izomeri imaju vrlo malo ili ništa skorbutne aktivnosti [20].

Askorbinska se kiselina u organizmu reverzibilno oksidira do dehidroaskorbinske kiseline, koja pokazuje potpunu vitaminsku aktivnost. Elektrokemijska ispitivanja naznačuju da askorbinska i dehidroaskorbinska kiselina tvore reverzibilni redoks par (*slika 9*).



Slika 9. Shematski prikaz oksidacije askorbinske kiseline.

2.5. Bakar

Bakar je element prve periode prijelaznih metala. Pripada 11. skupini periodnog sustava elemenata, zajedno s Ag i Au, međutim nemaju slično kemijsko ponašanje. Smatra se da je bakar nakon željeza tehnički najvažniji metal, s primjenom u svakodnevnom životu [21,22].

Iako se u prirodi može pronaći kao elementarna tvar, pretežno se javlja u obliku sulfidnih, arsenidnih, kloridnih ili karbonatnih ruda, iz kojih se najčešće dobiva. Bez obzira na upotrijebljenu rudu, dobiveni sirovi metal pročišćava se postupkom elektrolitske rafinacije. Čisti bakar je metal karakteristične crvenkastosmeđe boje, relativno mekan i rastezljiv. Stabilan je na zraku, ali se s vremenom presvlači slojem patine. Kemijski reagira samo s kiselinama koje nemaju oksidacijsko djelovanje. Također je topljiv u amonijaku.

Kao i ostali prijelazni metali, bakar pravi široki spektar binarnih i kompleksnih spojeva stupnja oksidacije +1, +2 i +3, od čega su u vodenim otopinama stabilni samo bakar(II) spojevi. Bakar je, nakon željeza i cinka, treći po zastupljenosti biogeni element, gdje ulazi u sastav različitih enzima. Shodno tome, u posljednje se vrijeme kompleksni spojevi bakra i biološki važnih molekula intenzivno istražuju kao modelni spojevi u svrhu razumijevanja njegove biološke uloge [23].

Zbog visoke toplinske i električne vodljivosti elementarnog bakra, glavno mu je područje primjene na polju elektrotehnike. Čisti bakar koristi se za proizvodnju električnih žica i kablova, električne kontakte i ostale dijelove kod kojih je potrebno postići mali otpor prijelazu električne struje. Drugo važno područje primjene bakra jest metalurgija. Bakrove legure poput mjedi i bronce, te legure bakra i nikla, upotrebljavaju se za automobilske radijatore, izmjenjivače topline, sisteme grijanja, solarne kolektore i ostale aplikacije za koje je potrebno brzo provođenje topline preko metalne površine. Zbog odlične otpornosti na koroziju svoju primjenu pronalaze i u cijevima, ventilima, brtvama, sistemima za prijenos pitke i procesne vode te ostalih tekućina i industrijskih plinova. Također, vrlo bitnu funkciju bakar ima i zbog smanjivanja razine bakterija na dodirnim površinama [24].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

- Askorbinska kiselina, $C_6H_8O_6$, Kemika d.d.
- Aluminijev(III) oksid, Al_2O_3 , Sigma-Aldrich, USA
- Bakrov nitrat, $Cu(NO_2)_3 \cdot 3H_2O$, AnalaR, UK
- HEPES natrijeva sol, $C_8H_{17}N_2O_4SNa$, Sigma-Aldrich, USA
- Kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 , Kemika d.d., Hrvatska
- Kalijev heksacianoferrat(II) trihidrat, $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$, Kemika d.d., Hrvatska
- Kalijev heksacianoferrat(III), $K_3[Fe(CN)_6]$, Merck d.o.o., Njemačka
- Mokraćna kiselina, $C_5H_4N_4O_3$, Kemika d.d., Hrvatska
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, Kemika d.d., Hrvatska
- Natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, Sigma-Aldrich, USA
- Natrijev acetat, $C_2H_3O_2Na$, Kemika d.d., Hrvatska
- Ledena octena kiselina, $w(C_2H_4O_2) = 99,5 \%$, AnalaR, UK
- Perklorna kiselina, $w(HClO_4) = 70 \%$, Merck d.o.o., Njemačka
- Tiramin hidroklorid, $w(C_8H_{11}NO \cdot HCl) = 98 \%$, Sigma-Aldrich, USA

3.2. Priprema otopina i instrumentacija

3.2.1. Priprema otopina

Za pripremu svih otopina korištena je dvostruko deoionizirana voda iz Millipore-milliQ sustava.

0,1 M vodena otopina HClO_4 pripremljena je u odmjernoj tikvici volumena 100 mL razrjeđivanjem 842,5 μL perklorne kiseline ($w=70\%$).

Kao osnovni elektrolit korišteni su fosfatni puferi $\text{pH}=4,10$ i $\text{pH}=6,99$. Za pripremu fosfatnog pufera $\text{pH}=4,10$ korišten je KH_2PO_4 . Fosfatni pufer $\text{pH}=6,99$ pripremljen je otapanjem $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

0,1 M otopina askorbinske kiseline pripremljena je otapanjem 176,13 mg askorbinske kiseline u tikvici volumena 10 mL.

10 mM otopina mokraćne kiseline pripremljena je otapanjem 168,11 mg mokraćne kiseline u tikvici volumena 100 mL.

Otopina kalijevog heksacianoferrata(III), koncentracije 10 mM, napravljena je dodavanjem 32,926 mg $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ u tikvicu volumena 10 mL. Otapanjem 42,241 mg $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ u odmjernoj tikvici volumena 10 mL pripravljena je 10 mM otopina kalijevog heksacianoferrata(II). Otopine heksacianoferrata(II) i (III) služile su kao redoks par u elektrokemijskim mjerenjima, te su priređene svježe neposredno prije početka mjerenja.

Otopina bakrovih(II) iona, koncentracije 10 mM, pripremljena je otapanjem 24,16 mg bakrova(II) nitrata u tikvici volumena 10 mL.

Otopina tiramina, koncentracije 25 mM, pripravljena je otapanjem 43,41 mg tiramin hidroklorida u tikvici volumena 10 mL.

0,1 M acetatni puferi pH vrijednosti 4,00/5,00/6,00/7,04 i 0,1 M HEPES pufer $\text{pH}=8$, korišteni su za akumulaciju bakra na Au/politiraminsku elektrodu. Za pripremu acetatnih pufera korišteni su natrijev acetat i ledena octena kiselina, a za pripremu HEPES pufera korištena je HEPES natrijeva sol. Svi su puferi pripremljeni u odmjernim tikvicama volumena 250 mL.

Acetatni pufer pH=4,00 pripremljen je otapanjem 2,0507 grama natrijeva acetata i 8,210 mL ledene octene kiseline ($w=99,5\%$) u odmjernej tikvici od 250 mL. Ovakva otopina je korištena kao ishodna otopina za pripravu acetatnih pufera viših pH vrijednosti podešavanjem s 5 M vodenom otopinom natrijeva hidroksida.

3.2.2. Instrumentacija

Za provedbu mjerenja korišten je polarograf/stripping voltametar model 264A (R&G Princeton Applied Research, USA) povezan s osobnim računalom pomoću ecodera (*eDAQ Australia*).

Sva su mjerenja provedena u elektrokemijskom sustavu s tri elektrode uz miješanje elektrolita magnetskom miješalicom. Zlatna elektroda (Au) je služila kao radna elektroda, za protuelektrodu je korištena platinasta elektroda (Pt), a kao referentna elektroda rabljena je Ag|AgCl|3 M KCl elektroda. Sustav je prikazan na *slici 10*.



Slika 10. Troelektrodni elektrokemijski sustav za mjerenje.

Programi eDAQ chart verzija v.5.5.5 i PowerSuite OriginPro 8.1 korišteni su za obradu eksperimentalnih podataka.

3.3. Priprema Au elektrode

3.3.1. Čišćenje površine zlatne elektrode

Neposredno prije početka mjerenja zlatnu je elektrodu potrebno očistiti mehaničkim i elektrokemijskim putem. Mehaničko čišćenje podrazumijeva poliranje zlatne elektrode prahom korunda (Al_2O_3) u trajanju od 15 minuta, kako bi se postigao zrcalni površinski sjaj. Nakon ispiranja s deioniziranom vodom pristupa se elektrokemijskom čišćenju. Elektrokemijsko čišćenje provedeno je u ćeliji s 0,1 M perklornom kiselinom cikliziranjem u rasponu potencijala od 0 do 1,5 V, uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s.

3.4. Priprema Au-PTy modificirane elektrode

Au-PTy modificirana elektroda je pripravljena oslojavanjem zlatne elektrode elektropolimerizacijom tiramina. Oslojavanje je provedeno iz 2,5 mM otopine tiramina u osnovnom elektrolitu (0,1 M fosfatni pufer pH=4,10), u rasponu potencijala od -200 do 1000 mV, te uz promjenu brzine potencijala od 50 mV/s. Na zlatnu elektrodu je nanoseno 20 slojeva politiramina.

3.4.1. Karakterizacija Au-PTy modificirane elektrode

Provedeno je snimanje odziva Au-PTy modificirane elektrode u 1 mM otopini $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. U ćeliju je stavljeno po 1 mL otopina kalijevog heksacianoferata(II) i kalijevog heksacianoferata(III), koncentracija 10 mM, i 8 mL fosfatnog pufera pH=4,10. Ciklički voltamogrami snimljeni su u rasponu potencijala vrijednosti od -100 do 700 mV, te uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s.

Snimljeno je ponašanje 1 mM otopine bakrovih iona na Au-PTy modificiranoj elektrodi na način da je u elektrokemijsku ćeliju dodano 1 mL 10 mM otopine bakrovih(II) iona i 9 mL 0,1 M fosfatnog pufera pH=4,10. Ciklički voltamogrami su snimljeni u rasponu potencijala od -100 do 700 mV, uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s.

Radi detaljnije karakterizacije načinjen je i ciklički voltamogram ove modificirane elektrode u osnovnom elektrolitu (0,1 M fosfatni pufer pH=6,99). Raspon potencijala iznosi -200 do 700 mV, uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s.

Snimljeni su odzivi Au-PTy modificirane elektrode uz promjenu koncentracije askorbinske i mokraćne kiseline. Mjerenje odziva elektrode uz promjenu koncentracija askorbinske kiseline je provedeno s pet dodataka po 100 μ L 10 mM otopine askorbinske kiseline u 10 mL osnovnog elektrolita (0,1 M fosfatni pufer pH=6,99). Kod mjerenja odziva elektrode uz promjenu koncentracija mokraćne kiseline dodano je pet puta po 1 mL 10 mM otopine mokraćne kiseline u 6 mL osnovnog elektrolita (0,1 M fosfatni pufer pH=6,99). Između svakog dodatka uključena je magnetska miješalica na dvije minute, nakon čega je napravljena pauza od 15 s kako bi se otopina umirila. Ciklički voltamogrami su snimljeni u rasponu potencijala od -200 do 700 mV, uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s.

3.5. Priprema Au-PTy-Cu modificirane elektrode

Au-PTy-Cu modificirana elektroda je pripremljena akumulacijom bakra iz 10 mM otopine bakrovih iona otopljenih u 100 mM otopine HEPES pufera pH=8. Akumuliranje je trajalo 20 minuta. Nakon završetka akumulacije elektroda je izvađena iz otopine i temeljito isprana deioniziranom vodom, kako bi se uklonio zaostali bakar s površine, koji nije vezan u kompleks.

3.5.1. Karakterizacija Au-PTy-Cu modificirane elektrode

Snimljeni su odzivi Au-PTy-Cu modificirane elektrode uz promjenu koncentracije askorbinske kiseline. U ćeliju je, u 10 mL osnovnog elektrolita (0,1 M fosfatni pufer pH=6,99), dodano 5 dodataka volumena 100 μ L 10 mM otopine askorbinske kiseline. Između svakog je dodatka uključena magnetska miješalica u trajanju od 2 minute, kako bi se sadržaj što bolje homogenizirao. Nakon toga je ostavljeno 15 sekundi da se otopina smiri. Ciklički voltamogrami su snimljeni u rasponu potencijala od -200 do 700 mV, uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s.

Snimljeni su odzivi Au-PTy-Cu modificirane elektrode uz promjenu koncentracije askorbinske kiseline pri konstantnim potencijalima od 200 mV, 250 mV i 300 mV. Mjerenje je provedeno dodavanjem 10 mM askorbinske kiseline u 10 mL osnovnog elektrolita (0,1 M fosfatni pufer pH=6,99). Započelo se s koncentracijama askorbinske kiseline u osnovnom elektrolitu od 0,1 μ M pa sve do zasićenja otopine.

Provedeno je mjerenje stabilnosti površine Au-PTy-Cu modificirane elektrode snimanjem odziva elektrode uz promjenu koncentracije askorbinske kiseline. Postupak je identičan onome opisanom u prethodnom odlomku. Snimanje je provedeno neposredno nakon modifikacije Au-PTy elektrode bakrom i nakon 4 dana stajanja iste elektrode na zraku. Modifikacija Au-PTy elektrode je provedena akumuliranjem bakra iz 100 mM otopine HEPES pufera s pH=8, uz vrijeme akumulacije od 20 sati.

3.6. Optimizacija

3.6.1. Optimizacija vremena akumulacije

Provedeno je snimanje odziva Au-PTy-Cu modificirane elektrode uz promjenu koncentracije askorbinske kiseline (odlomek 3.4.1.) kod različitih vremena akumulacije bakra iz 1 mM otopine bakrovih iona u HEPES puferu (0,1 M, pH=8). Akumuliranje je trajalo 5, 10, 15, 20 i 25 minuta.

3.6.2. Optimizacija pH medija akumulacije bakra

Provedena je optimizacija pH medija akumulacije bakra uranjanjem Au-PTy modificirane elektrode u otopine pufera i bakrovih iona. Za akumulaciju su korišteni acetatni puferi s pH=4,00/5,00/6,00/7,04 i HEPES pufer pH=8. Nakon svake akumulacije provedeno je snimanje odziva modificirane elektrode promjenom koncentracije askorbinske kiseline postupkom opisanom u odlomku 3.4.1.

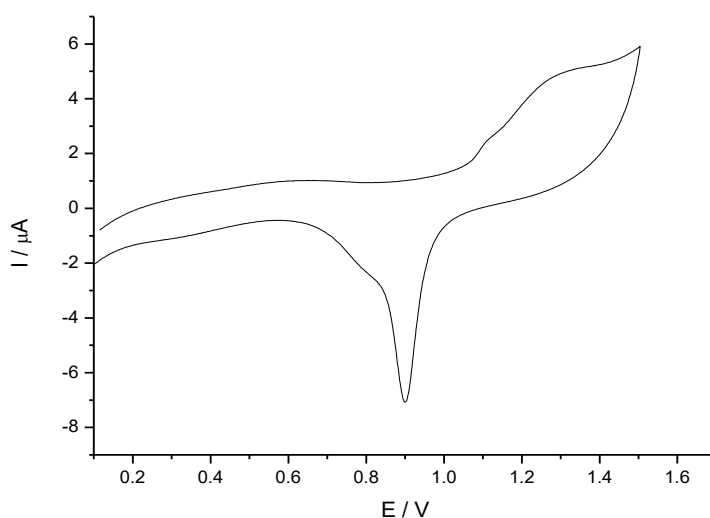
3.6.3. Optimizacija broja slojeva politiramina

Na zlatnu elektrodu je elektropolimerizacijom nanoseno 15 slojeva politiramina postupkom koji je opisan u odlomku 3.4. Prije samog nanošenja politiramina na elektrodu, zlatna je elektroda ispolirana s Al_2O_3 i očišćena elektrokemijski cikliziranjem u 0,1 M perklornoj kiseline. Nakon oslojavanja zlatne elektrode politiraminom dodatno je modificirana bakrom. Provedeno je snimanje odziva Au-PTy-Cu modificirane elektrode uz promjenu koncentracije askorbinske kiseline postupkom opisanom u odlomku 3.4.1. Sve navedeno je ponovljeno s elektrodom na koju je nanoseno 40 slojeva politiramina.

4. REZULTATI I RASPRAVA

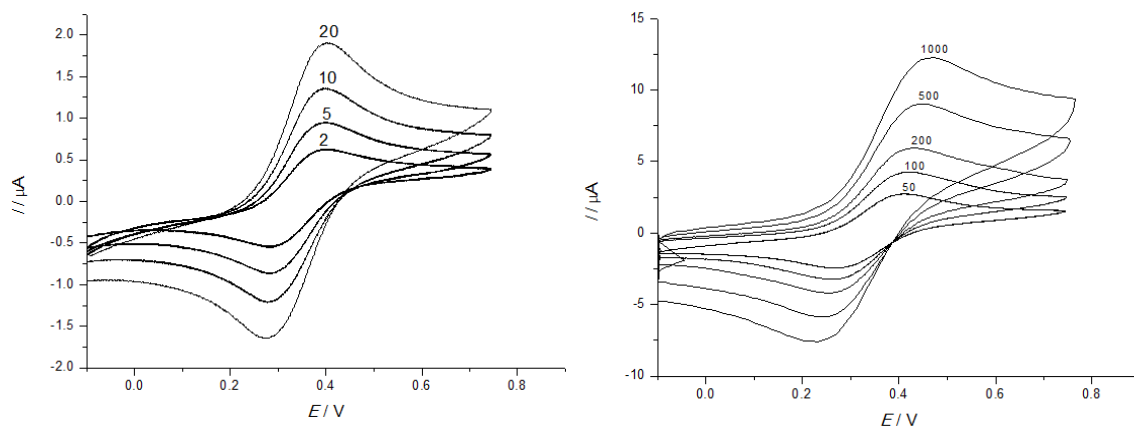
4.1. Karakterizacija zlatne elektrode

Na *slici 11* prikazan je ciklički voltamogram ponašanja zlatne elektrode u 0,1 M otopini HClO_4 , koji je snimljen uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s. Na grafičkom su prikazu vidljivi karakteristični oksidacijski i redukcijski valovi zlata. Oksidacija elementarnog zlata započinje pri potencijalu od približno 1 V te se odvija u dva koraka. Prvo dolazi do nastanka Au(I) , nakon čega se javlja izraženiji val kod potencijala približno 1,25 V koji pripisujemo pojavi oksidacijskog broja +3. Izraženi redukcijski val zlata zabilježen je pri potencijalu od 0,9 V.



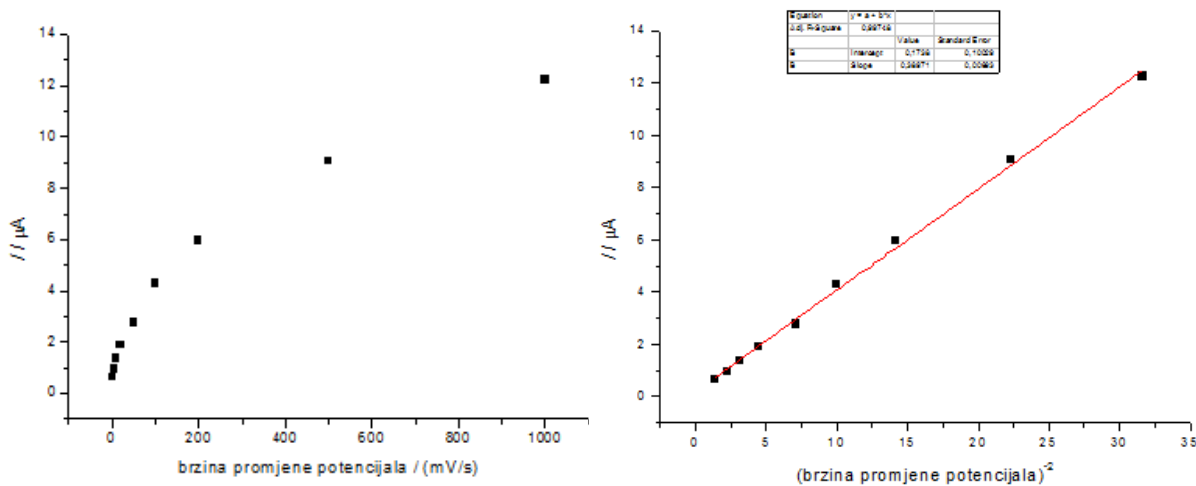
Slika 11. Au elektroda u 0,1 M HClO_4 . Snimljeno uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s, te uz referentnu Ag|AgCl|3 M KCl elektrodu.

Provedeno je snimanje odziva zlatne elektrode u 1 mM otopini $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. U ćeliju je stavljeno po 1 mL 10 mM otopina kalijevog heksacianoferata(II) i kalijevog heksacianoferata(III), te 8 mL fosfatnog pufera $\text{pH}=4,10$. Ciklički voltamogrami snimljeni su u rasponu potencijala od -100 do 700 mV i uz brzinu promjene potencijala od 2 do 1000 mV/s (*slika 12*).

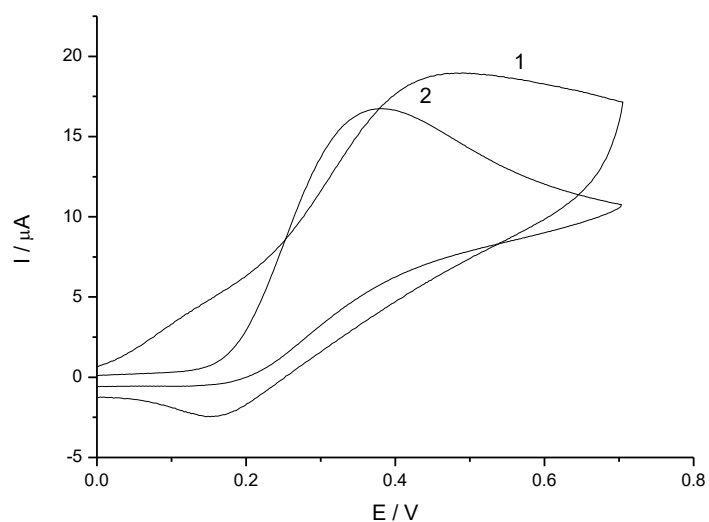


Slika 12. Odziv Au elektrode u 1 mM otopini $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ te 0,1 M fosfatnom puferu pH=4,10. Snimljeno uz brzine promjene potencijala u području od 2 do 1000 mV/s.

Povećanjem brzine promjene potencijala anodni strujni vrhovi se pomiču prema pozitivnijim, a katodni strujni vrhovi prema negativnijim vrijednostima potencijala. Također, povećanjem brzine promjene potencijala dolazi do povećanja struja anodnih vrhova. Iz *slike 13* je vidljivo da se struja povećava linearno s porastom drugog korijena brzine promjene potencijala, što dokazuje da je mehanizam reakcije kontroliran difuzijom.



Slika 13. Ovisnost struje vrha vala o brzini promjene potencijala odnosno korijena brzine promjene potencijala.

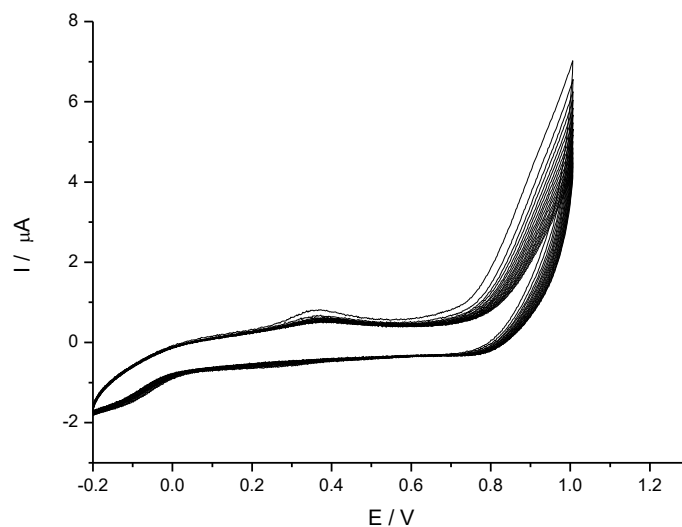


Slika 14. Ponašanje: **1)** 10 mM otopine mokraćne kiseline te **2)** 10 mM otopine askorbinske kiseline u osnovnom puferu (0,1 M fosfatni pufer pH=4,10) na čistoj Au elektrodi. Snimano uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s.

Na *slici 14* prikazani su ciklički voltamogrami zlatne elektrode u 10 mM otopini askorbinske i 10 mM otopini mokraćne kiseline. Vidljivo je da dolazi do oksidacije mokraćne kiseline već na potencijalu od 0 V. Struja oksidacije askorbinske kiseline počinje rasti tek na potencijalu od približno 150 mV. Takvo ponašanje ukazuje na nemogućnost zlatne elektrode kao senzora za mjerenje koncentracije askorbinske kiseline. Drugim riječima dolazi do interferiranja mokraćne kiseline, što onemogućuje određivanje askorbinske kiseline na potencijalima od 200 odnosno 300 mV, gdje dobivamo struje dovoljno velike za mjerenje. Kako bi se uklonile interferencije mokraćne kiseline provedeno je oslojavanje zlatne elektrode politiraminom procesom elektropolimerizacije tiramina.

4.2. Karakterizacija Au-politiraminom modificirane elektrode

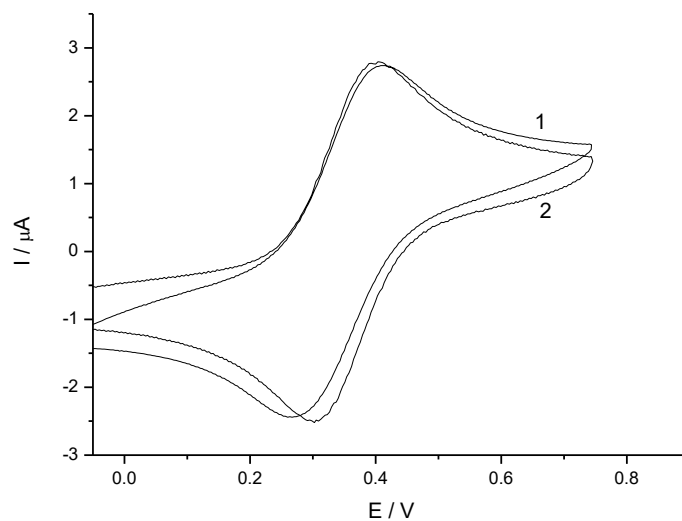
4.2.1. Priprema Au-politiraminom modificirane elektrode



Slika 15. Oslojavanje Au elektrode slojem politiramina (2,5 mM otopina tiramina u fosfatnom puferu pH=4,10). Ukupno je nanoseno 20 slojeva. Snimano uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s.

Slika 15 prikazuje oslojavanje zlatne elektrode politiraminom procesom elektropolimerizacije tiramina iz otopine. Slojevi su nanoseni cikliziranjem na potencijalima od -0,2 V do 1 V. Sveukupno je provedeno 20 ciklusa, što znači da je na zlatnu elektrodu nanoseno 20 slojeva politiramina. Budući da je proces polimerizacije tiramina ireverzibilan ne dolazi do njegove redukcije, pa se na voltamogramu uočava samo anodni strujni vrh. Povećanjem broja ciklusa površina elektrode postaje sve manje vodljiva, što dovodi do znatnog opadanja struje u odnosu na početni ciklus.

4.2.2. Karakterizacija Au-politiraminom modificirane elektrode

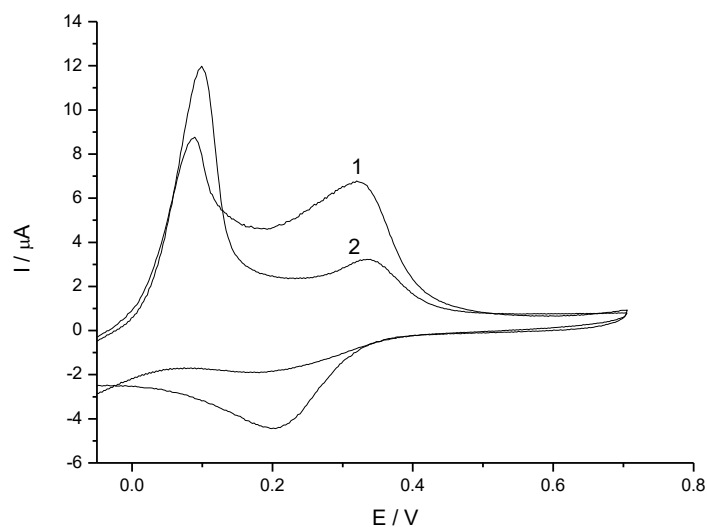


Slika 16. Usporedba cikličkih voltamograma 1 mM otopine $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ u osnovnom elektrolitu (0,1 M fosfatni pufer, pH=4,10) na: 1) Au elektrodi; 2) Au-PTy modificiranoj elektrodi. Snimano uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s.

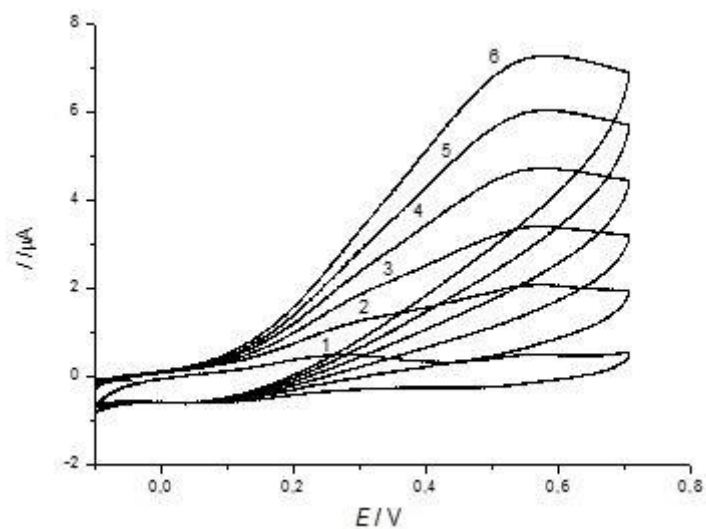
Na *slici 16* je prikazana usporedba cikličkih voltamograma snimljenih na zlatnoj elektrodi i zlatnoj elektrodi modificiranoj politiraminom. Ciklički voltamogrami su snimljeni u 1 mM otopini $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ pripravljenoj u osnovnom elektrolitu (0,1 M fosfatni pufer pH=4,10). Vidljivo je da dolazi do razdvajanja anodnih, a još i više katodnih vrhova valova, što upućuje na prisutnost formiranog sloja na površini elektrode. Također, nastali je sloj i optički vidljiv. Mala razlika u strujnom odzivu između politiraminom oslojene elektrode i osnovne zlatne elektrode upućuje da sloj politiramina, koji je dobar izolator, nije u potpunosti prekrpio površinu zlatne elektrode, nego da postoje mjesta kroz koja elektroaktivna vrsta prisutna u otopini može difundirati.

Slika 17 prikazuje usporedbu cikličkih voltamograma 1 mM otopine Cu^{2+} iona u osnovnom elektrolitu na Au i Au-PTy modificiranoj elektrodi. Vidljivo je da kod potencijala 0,1 V dolazi do oksidacije elementarnog bakra u Cu^+ , a kod potencijala od približno 0,3 V do daljnje oksidacije u Cu^{2+} . Modifikacijom zlatne elektrode politiraminom dolazi do smanjenja drugog oksidacijskog vala, a redukcijski val je izraženiji nego na nemedificiranoj elektrodi, što se može pripisati stvorenom kompleksu bakrova(II) iona s

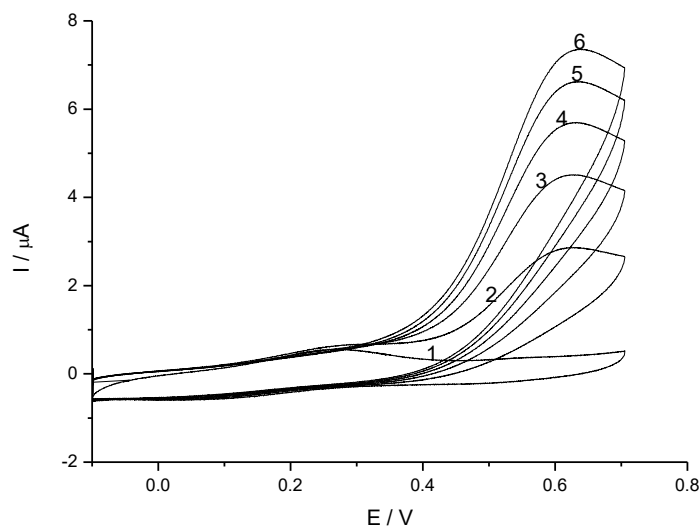
politiraminom na površini elektrode. Izraženiji redukcijski val na Au-PTy elektrodi je i dokaz nastanka kompleksa bakra s amino skupinama politiramina.



Slika 17. Usporedba cikličkih voltamograma 1 mM otopine Cu²⁺ iona u osnovnom elektrolitu (0,1 M fosfatni pufer pH=4,10) na: 1) Au elektrodi; 2) Au-PTy modificiranoj elektrodi. Snimano uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s.

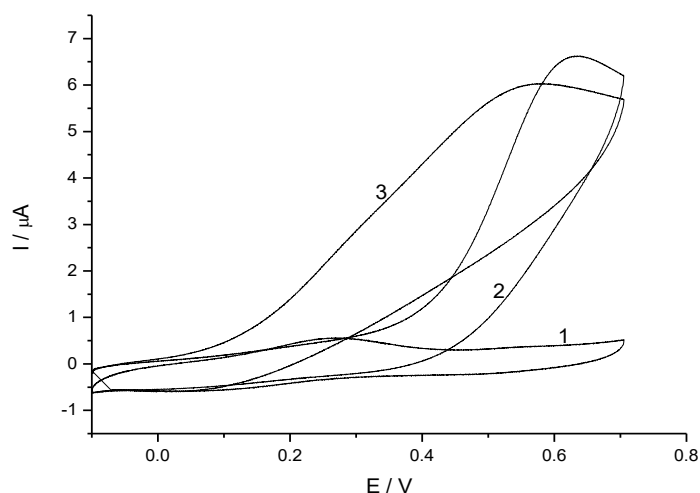


Slika 18. Grafički prikaz odziva Au-PTy modificirane elektrode u osnovnom elektrolitu (0,1 M fosfatni pufer pH=6,99) (1), te uz promjenu koncentracije askorbinske kiseline: 1 (2), 2 (3), 3 (4), 4 (5) i 5 (6) mM. Snimljeno uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s, te uz referentnu Ag|AgCl|3 M KCl elektrodu.



Slika 19. Ponašanje Au-PTy modificirane elektrode u osnovnom elektrolitu (0,1 M fosfatni pufer pH=6,99) (1), i uz promjenu koncentracija mokraćne kiseline: 1,43 (2), 2,86 (3), 3,33 (4), 4,00 (5) i 4,55 (6) mM. Snimljeno uz brzinu promjene potencijala 50 mV/s i uz referentnu Ag|AgCl|3 M KCl elektrodu.

Na slikama 18 i 19 su prikazani odzivi Au-PTy modificirane elektrode u osnovnom elektrolitu uz promjenu koncentracije askorbinske, odnosno mokraćne kiseline. Vidljivo je da povećanjem koncentracije i askorbinske i mokraćne kiseline rastu vrijednosti struje. U oba primjera uočljivo je ireverzibilno ponašanje, tj. dolazi samo do procesa oksidacije. Rast struje askorbinske kiseline počinje kod potencijala od 0,1 V, a mokraćne kiseline kod približno 0,4 V. Ovo ukazuje na pomak potencijala oksidacije mokraćne kiseline na zlatnoj elektrodi modificiranoj politiraminom naspram čiste zlatne elektrode, gdje je rast struje vidljiv već kod potencijala od 0 V (Slika 14). Modificiranjem zlatne elektrode politiraminom dolazi do razdvajanja valova askorbinske i mokraćne kiseline pomakom vala mokraćne kiseline prema pozitivnijim vrijednostima potencijala, čime se eliminira njezino interferiranje kod mjerenja koncentracije askorbinske kiseline (Slika 20).

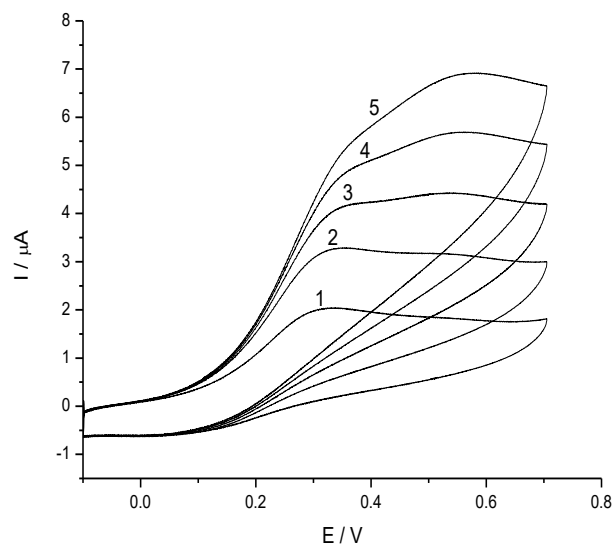


Slika 20. Usporedba cikličkih voltamograma dobivenih odzivom Au/PTy modificirane elektrode u: **1)** osnovnom elektrolitu (0,1 M fosfatni pufer pH=6,99), **2)** osnovnom elektrolitu uz dodatak 4 mM mokraćne kiseline i **3)** osnovnom elektrolitu uz dodatak 4 mM askorbinske kiseline. Snimljeno uz brzinu promjene potencijala 50 mV/s. Kao referentna elektroda uporabljena je Ag|AgCl|3 M KCl elektroda.

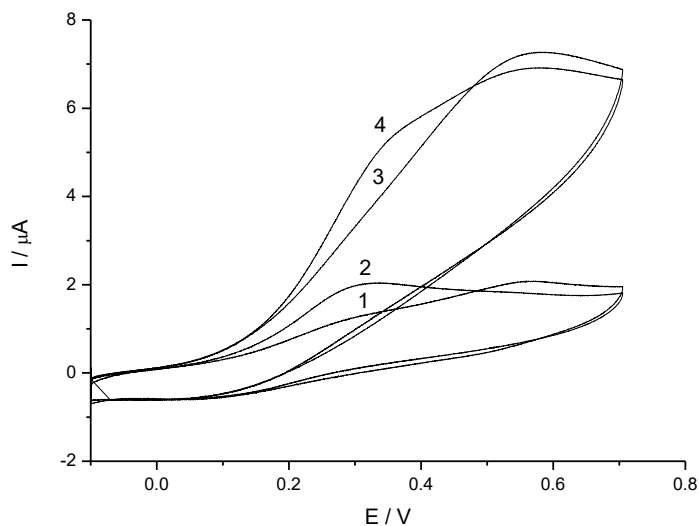
Na prethodnoj slici prikazano je ponašanje zlatne elektrode modificirane politiraminom u otopinama mokraćne i askorbinske kiseline istih koncentracija. Vidljivo je da na modificiranoj elektrodi nije došlo do značajnijeg pomaka oksidacijskog vala za askorbinsku kiselinu u odnosu na zlatnu elektrodu (*slika 14*). Međutim, oksidacijski val za mokraćnu kiselinu pomaknut je gotovo za 400 mV prema pozitivnijim potencijalima.

4.3. Karakterizacija Au-politiramin-Cu modificirane elektrode

Slika 21 prikazuje odzive zlatne elektrode modificirane politiraminom koji je dodatno kompleksiran bakrom(II), uz dodatak različitih koncentracija askorbinske kiseline u osnovnom elektrolitu. Modifikacija s bakrom je provedena kompleksiranjem iz 1 mM otopine Cu^{2+} /HEPES pufera (100 mM; pH=8), u vremenu akumulacije od 20 minuta. S povećanjem koncentracije askorbinske kiseline dolazi do većeg strujnog odziva elektrode. Na potencijalu od 300 mV dolazi do izraženijeg vrha vala na voltamogramu, što je posljedica kompleksiranja Au-politiraminske elektrode s bakrom.



Slika 21. Ciklički voltamogram Au-PTy-Cu modificirane elektrode u različitim koncentracijama askorbinske kiseline: 1 (1), 2 (2), 3 (3), 4 (4) i 5 (5) mM, otopljene u 0,1 M fosfatnom puferu pH=6,99. Snimljeno uz brzinu promjene potencijala 50 mV/s. Kao referentna elektroda uporabljena je Ag|AgCl|3 M KCl elektroda.



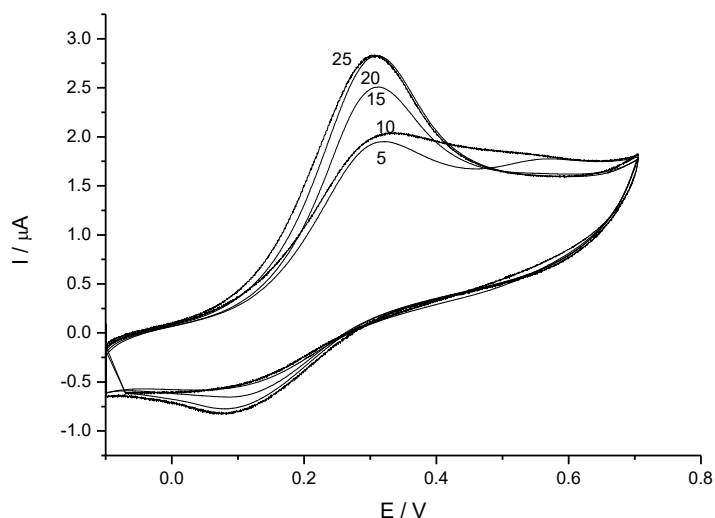
Slika 22. Usporedba cikličkih voltamograma dobivenih na Au-PTy (1, 3) i Au-PTy-Cu (2, 4) modificiranoj elektrodi u 0,1 M fosfatnom puferu (pH=6,99), uz dodatak askorbinske kiseline koncentracija 1 (1, 2) i 5 (3, 4) mM. Snimljeno uz brzinu promjene potencijala 50 mV/s. Kao referentna elektroda korištena je Ag|AgCl|3 M KCl elektroda.

Na *slici* 22 je prikazana usporedba voltamograma dobivenih na Au-PTy i Au-PTy-Cu modificiranim elektrodama uz dodatak dvije različite koncentracije askorbinske

kiseline. Vidljivo je da kod Au-PTy-Cu modificirane elektrode na potencijalima od 0,3 V dolazi do povećanja struje u odnosu na zlatnu elektrodu modificiranu s politiraminom. To se može pripisati katalitičkom efektu bakra na proces oksidacije askorbinske kiseline, što je ujedno i dokaz vezanosti bakra u kompleks s politiraminom na površini zlatne elektrode.

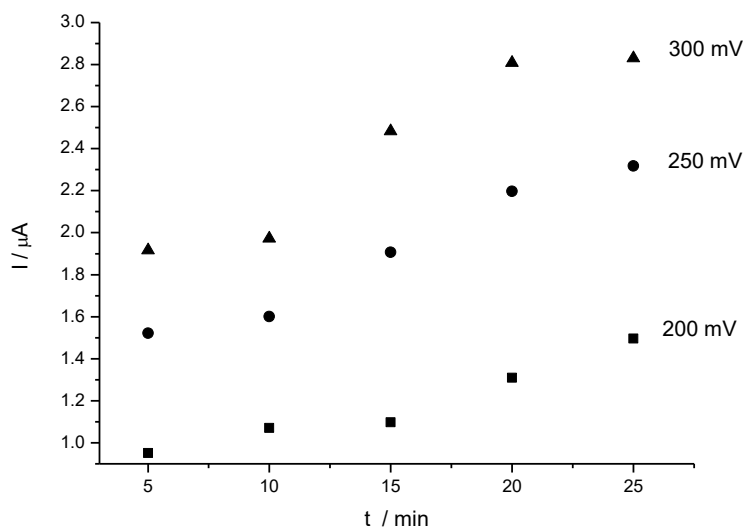
4.4. Optimizacija

4.4.1. Optimizacija vremena akumulacije



Slika 23. Grafički prikaz odziva Au-PTy-Cu modificirane elektrode u osnovnom elektrolitu (0,1 M fosfatni pufer pH=6,99) uz dodatak 1 mM askorbinske kiseline kod različitih vremena akumulacije bakra iz 1 mM otopine Cu^{2+} /HEPES pufera (100 mM; pH=8). Snimljeno uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s, te uz referentnu Ag|AgCl|3 M KCl elektrodu.

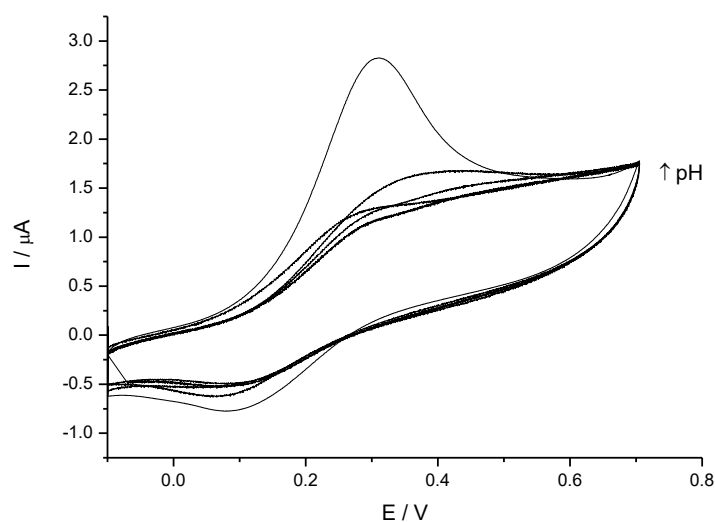
Slika 23 prikazuje optimiziranje vremena akumulacije bakra iz 1 mM otopine bakrovih iona u 0,1 M HEPES puferu s pH=8. Snimljeni su odzivi Au-PTy-Cu modificirane elektrode u osnovnom elektrolitu uz dodatak 1 mM askorbinske kiseline. Prema iznosima vršnih struja vidljivo je da količina akumuliranog bakra iz otopine na površini elektrode raste s vremenom akumulacije sve do dvadesete minute, nakon čega je rast zanemariv. Možemo zaključiti da optimalno vrijeme akumulacije bakra iznosi 20 minuta. Istovremeno, *slika 23* pokazuje da je najviše kompleksa bakra s politiraminom na površini elektrode stvoreno između 10-te i 20-te minute. Sve navedeno je vidljivo i iz *slike 24*, gdje je odziv elektrode snimljen pri konstantnim potencijalima od 200, 250 i 300 mV.



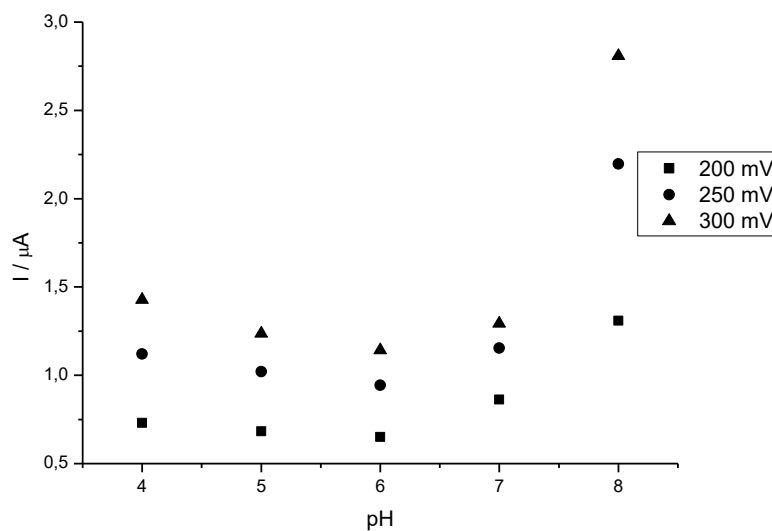
Slika 24. Graf ovisnosti odziva struje Au-PTY-Cu modificirane elektrode u osnovnom elektrolitu (0,1 M fosfatni pufer pH=6,99) o vremenu akumulacije bakra iz 1 mM otopine Cu^{2+} /HEPES pufera (100 mM; pH=8) uz dodatak 1 mM askorbinske kiseline kod potencijala 200, 250 i 300 mV. Snimljeno uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s, te uz referentnu Ag|AgCl|3 M KCl elektrodu.

4.4.2. Optimizacija pH medija za akumulaciju bakra

Na slici 25 je prikazana optimizacija pH medija za akumulaciju bakra na površini Au-politiraminske elektrode. Akumulacija je provedena u vremenu od 20 minuta iz 1 mM otopine bakrovih iona pripravljene u puferskim otopinama pH vrijednosti 4,00/5,00/6,00/7,04 (acetatni pufer) i pH=8 (HEPES pufer). Odzivi ove elektrode snimljeni su uz dodatak askorbinske kiseline. Do najvećeg katalitičkog efekta na oksidaciju askorbinske kiseline dolazi kod HEPES pufera pH=8. Ovo se može pripisati amino skupini politiramina koja je u lužnatom mediju potpuno deprotonirana, što omogućuje kompleksiranje bakra(II).



Slika 25. Ciklički voltamogrami odziva Au-PTY-Cu modificirane elektrode u ovisnosti o pH mediju akumulacije bakra iz 1 mM otopine Cu^{2+} iona u 0,1 M acetatnom puferu pH redom 4,00/5,00/6,00/7,04 te u 0,1 M HEPES puferu pH=8; vrijeme akumulacije 20 minuta. Snimano u osnovnom elektrolitu (0,1 M fosfatni pufer pH=6,99), uz promjenu potencijala od 50 mV/s i uz referentnu Ag|AgCl|3 M KCl elektrodu.

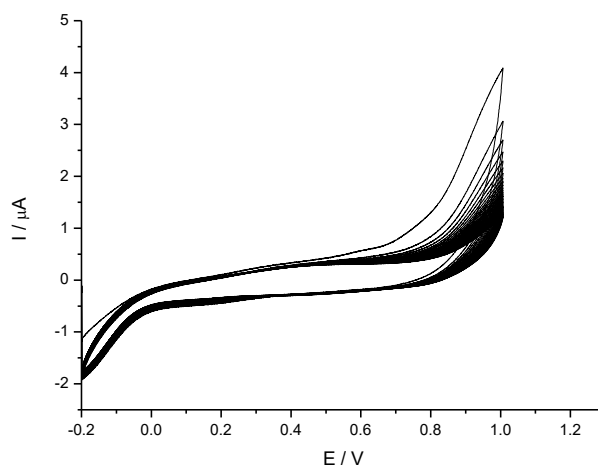


Slika 26. Graf ovisnosti strujnog odziva Au-PTY-Cu modificirane elektrode u osnovnom elektrolitu (0,1 M fosfatni pufer pH=6,995) o pH medija. Modifikacija elektrode provedena uranjanjem Au-PTY elektrode (20 minuta) u 1 mM otopinu Cu^{2+} /0,1 M acetatni pufer pH vrijednosti 4,00/5,00/6,00/7,04 te u otopinu Cu^{2+} /0,1 M HEPES pufera pH=8, uz dodatak 1 mM askorbinske kiseline. Snimljeno uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s, te uz referentnu Ag|AgCl|3 M KCl elektrodu.

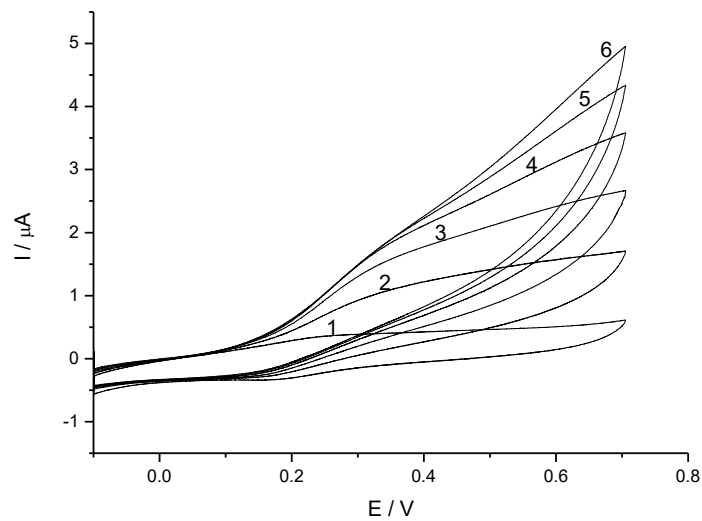
Slika 26 prikazuje odzive struje Au-PTy-Cu modificirane elektrode o pH mediju akumulacije bakra kod konstantnih potencijala. Vidljivo je da kod pH=8 dolazi do najvećih vrijednosti struja, što potvrđuje gore obrazloženo.

4.4.3. Optimizacija broja slojeva politiramina

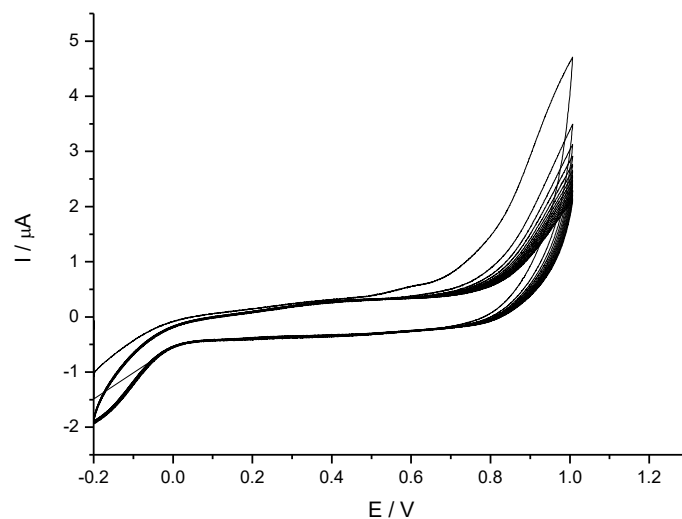
U svrhu optimiranja broja slojeva politiramina, na zlatnu je elektrodu prvi put nanoseno 40 slojeva (slika 27), a drugi put 15 slojeva (slika 29). U oba slučaja dolazi do pada struje nakon prvog nanesenog sloja politiramina, iz čega se može zaključiti da u prvom ciklusu nastaje najdeblji politiraminski sloj. Modifikacija Au-PTy elektrode bakrom u oba slučaja je provedena akumuliranjem bakra iz 1 mM otopine bakrovih iona i HEPES pufera pH=8 u vremenskom periodu od 20 minuta. Mjeren je odziv modificiranih elektroda uz promjenu koncentracija askorbinske kiseline. Kod modificirane elektrode na koju je nanoseno 15 slojeva politiramina (slika 30) dolazi do malo manjih struja u usporedbi s elektrodom na koju je nanoseno 20 slojeva, vjerojatno zbog manjeg broja slobodnih amino skupina koje vežu bakar u kompleks, što utječe na smanjenje katalitičkog efekta na oksidaciju askorbinske kiseline. Kod modificirane elektrode na koju je nanoseno 40 slojeva dolazi do znatnog smanjenja struja (slika 28) u odnosu na elektrodu s 20 slojeva. Zbog veće količine slojeva na površini elektrode dolazi do njene potpune pasivacije i s time smanjenja odziva. Iz gore navedenog određeno je da optimalni broj slojeva vezanog politiramina iznosi 20.



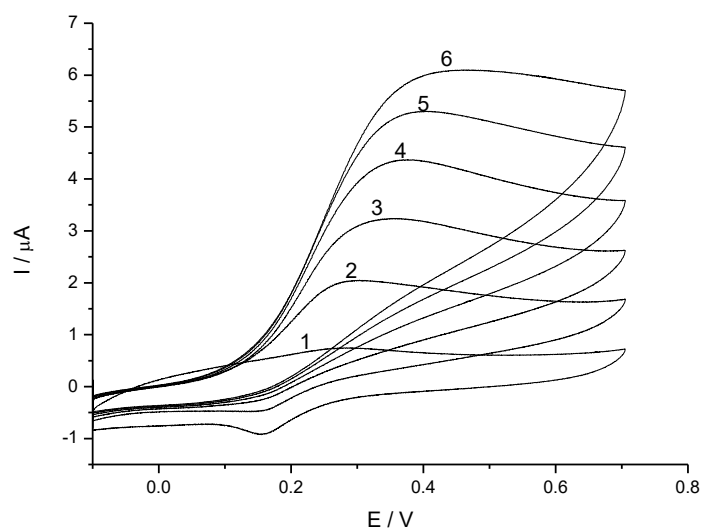
Slika 27. Oslojavanje Au elektrode slojem politiramina (2,5 mM otopina tiramina u fosfatnom puferu pH=4,10). Ukupno je nanoseno 40 slojeva. Snimano uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s.



Slika 28. Grafički prikaz odziva Au-PTy-Cu modificirane elektrode u osnovnom elektrolitu (0,1 M fosfatni pufer pH=6,99) (1), te uz promjenu koncentracije askorbinske kiseline: 1 (2), 2 (3), 3 (4), 4 (5) i 5 (6) mM. Naneseno je 40 slojeva politiramina, akumulacija bakra iz 1 mM otopine Cu^{2+} /HEPES pufera (100 mM pH=8) 20 minuta. Snimljeno uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s, te uz referentnu Ag|AgCl|3 M KCl elektrodu.



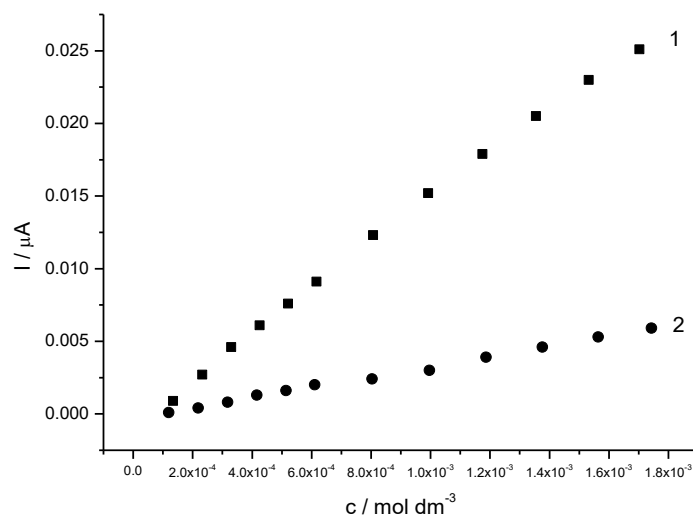
Slika 29. Oslojavanje Au elektrode slojem politiramina (2,5 mM otopina tiramina u fosfatnom puferu pH=4,10). Ukupno je nanoseno 15 slojeva. Snimano uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s.



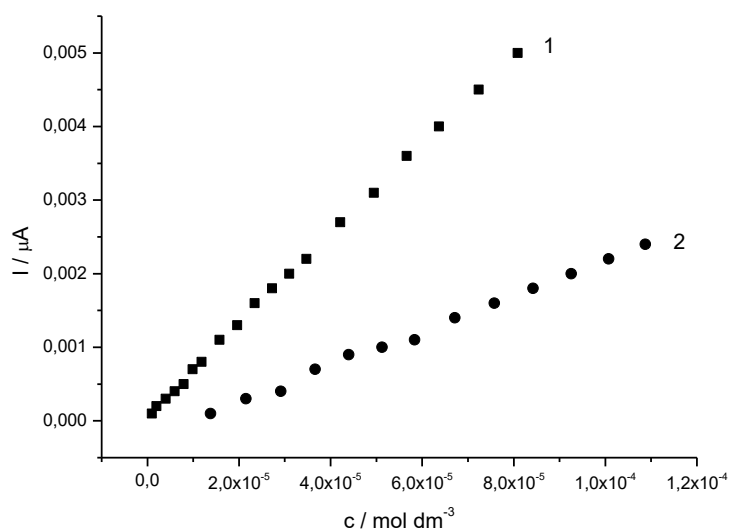
Slika 30. Grafički prikaz odziva Au-PTy-Cu modificirane elektrode u osnovnom elektrolitu (0,1 M fosfatni pufer pH=6,99) (1), te uz promjenu koncentracije askorbinske kiseline: 1 (2), 2 (3), 3 (4), 4 (5) i 5 (6) mM. Naneseno je 15 slojeva politiramina. Akumulacija bakra provedena je uranjanjem Au-PTy elektrode u 1 mM otopinu Cu^{2+} /HEPES pufera (100 mM pH=8) u periodu od 20 minuta. Snimljeno uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s, te uz referentnu Ag|AgCl|3 M KCl elektrodu.

4.5. Baždarenje Au-politiramin-Cu modificirane elektrode

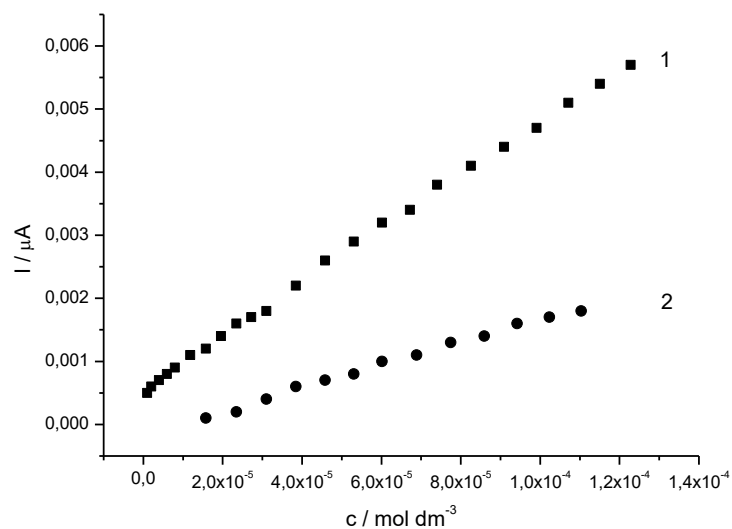
Na slikama 31, 32 i 33 prikazane su usporedbe jakosti struje u ovisnosti o koncentraciji askorbinske kiseline pri konstantnim potencijalima od 200, 250 i 300 mV. Načinjene su i usporedbe mjerenja neposredno nakon akumulacije bakra te nakon 4 dana stajanja iste elektrode na zraku. Kod svih potencijala vidljivo je da vrijednosti struje rastu linearno s promjenom koncentracije askorbinske kiseline. Stajanjem elektrode 4 dana na zraku, te ponovnim mjerenjem, uočeno je da dolazi do pada vrijednosti struja, što znači da stabilnost elektrode s vremenom pada. Iz tablice 1 je također vidljivo da uzastopnim mjerenjem koristeći elektrodu dolazi do smanjenja njene osjetljivosti. Mjerenje askorbinske kiseline s Au-PTy-Cu modificiranom elektrodom je u području 10 μM , a područje detekcije je 3 μM .



Slika 31. Usporedba jakosti struje o promjeni koncentracije askorbinske kiseline pri konstantom potencijalu od 200 mV. Mjerenje provedeno neposredno nakon modifikacije Au-PTy elektrode bakrom (1), te nakon stajanja iste elektrode 4 dana na zraku (2).



Slika 32. Usporedba ovisnosti jakosti struje o promjeni koncentracije askorbinske kiseline pri konstantom potencijalu od 250 mV. Mjerenje provedeno neposredno nakon modificiranja Au-PTy elektrode slojem bakra (1), te nakon stajanja iste elektrode 4 dana na zraku (2).



Slika 33. Usporedba jakosti struje o promjeni koncentracije askorbinske kiseline pri konstantnom potencijalu od 300 mV. Mjerenje provedeno neposredno nakon modificiranja Au-PTy elektrode bakrom (1), te nakon stajanja iste elektrode 4 dana na zraku (2).

Tablica 1. Usporedba limita detekcije i limita kvantifikacije Au-PTy-Cu modificirane elektrode pri konstantnim potencijalima odmah nakon akumulacije bakra i nakon stajanja iste elektrode 4 dana na zraku.

<i>Potencijal</i> [mV]	Mjerenje nakon akumulacije			Mjerenje nakon 4 dana		
	R^2	LOD [mol/dm ³]	LOQ [mol/dm ³]	R^2	LOD [mol/dm ³]	LOQ [mol/dm ³]
200	0,9981	$1,5397 \cdot 10^{-4}$	$4,6237 \cdot 10^{-4}$	0,9969	1,9721E-04	$5,9222 \cdot 10^{-4}$
250	0,9994	$3,4143 \cdot 10^{-6}$	$1,0253 \cdot 10^{-5}$	0,9972	1,2875E-05	$3,8664 \cdot 10^{-5}$
300	0,9989	$7,2632 \cdot 10^{-6}$	$2,1812 \cdot 10^{-5}$	0,9949	1,7670E-05	$5,3545 \cdot 10^{-5}$

5. ZAKLJUČAK

Izrađena je Au-PTy-Cu modificirana elektroda oslojavanjem zlatne elektrode politiraminom i vezanjem bakra u kompleks sa slobodnim amino skupinama polimera. Sloj politiramina je potvrđen karakterizacijom Au i Au-PTy elektrode u 1 mM otopini $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, gdje kod Au-PTy modificirane elektrode dolazi do značajnijeg pomaka redoks potencijala. Sloj vezanog politiramina vidljiv je na površini elektrode.

Oslojavanjem zlatne elektrode politiraminom sve većim brojem ciklusa dolazi do njene smanjene vodljivosti. Reakcija elektropolimerizacije tiramina na površini elektrode je ireverzibilan proces. Kod oslojavanja ne dolazi do potpune prekrivenosti površine elektrode, već ostaju slobodna mjesta kroz koja elektroaktivna vrsta prisutna u otopini difundira. Modificiranjem zlatne elektrode slojem politiramina dolazi do uklanjanja interferencija uzrokovanih prisutnošću mokraćne kiseline, što nije bilo moguće postići na čistoj zlatnoj elektrodi..

Pokazan je katalitički efekt Au-PTy-Cu modificirane elektrode na oksidaciju askorbinske kiseline i dokazana vezanost bakra u kompleksu s politiraminom na površini elektrode. Mjerenje koncentracije askorbinske kiseline s Au-PTy-Cu modificiranom elektrodom je izvedeno u području od 10 μ M pa sve do mM koncentracija, a ostvareno je područje detekcije od 3 μ M. Stabilnost Au-PTy-Cu modificirane elektrode se smanjuje s vremenom stajanja na zraku. Također, uzastopnim mjerenjem dolazi do pada osjetljivosti elektrode.

Količina vezanog bakra na površini elektrode raste s vremenom njegove akumulacije. Optimalno vrijeme iznosi 20 minuta, a najpogodniji pH medija je 8, kada je amino skupina potpuno deprotonirana i u mogućnosti stvaranja kompleksa. Oslojavanjem zlatne elektrode s 15 slojeva politiramina dolazi do smanjenja odziva struje, zbog manjeg broja slobodnih amino skupina koje vežu bakar u kompleks. Nanošenjem 40 slojeva na elektrodu dolazi do njene potpune pasivacije i s time slabijeg odziva. Optimalni broj slojeva politiramina na površini elektrode je 20.

6. POPIS SIMBOLA

A – površina elektrode, cm^2 ,

$E_{p,k}$ – katodni potencijal strujnog vrha, V,

$E_{p,a}$ – anodni potencijal strujnog vrha, V,

E^0 – standardni elektrodni potencijal, V

ΔE_p – razlika potencijala strujnih vrhova, V,

$I_{p,k}$ – visina katodnog vrha, A,

$I_{p,a}$ – visina anodnog vrha, A,

$c_e(\text{O})$ – koncentracija oksidiranog oblika redoks sustava

$c_e(\text{R})$ – koncentracija reduciranog oblika redoks sustava

E – ravnotežni elektrodni potencijal, V,

v – brzina promjene potencijala, V s^{-1}

R – opća plinska konstanta, koja iznosi $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

z – broj izmijenjenih elektrona,

F – Faraday-eva konstanta, C mol^{-1} ,

c – koncentracija elektroaktivne vrste, mol cm^{-3}

D – difuzijski koeficijent, $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$

I_p – struja vrha vala, A

$E_{1/2}$ – polarografski poluvalni potencijal, V,

k^0 – standardna konstanta brzine reakcije

α – koeficijent prijelaza elektrona

D_O – difuzijski koeficijent oksidirane vrste, $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$

D_R – difuzijski koeficijent reducirane vrste, $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$

Au-PTy – zlatna elektroda modificirana politiraminom

Au-PTy-Cu – zlatna elektroda modificirana politiraminom i bakrom

LOD – limit detekcije

LOQ – limit kvantifikacije

7. LITERATURA

1. Yuqing, M., Jianrong, C., Xiaohua, W., Using electropolymerized non-conducting polymers to develop enzyme amperometric biosensors, *Trends in Biotechnology*, **22** (5) (2004) 227-231.
2. Situmorang, M., Gooding, J. J., Hibbert, D. B., Immobilisation of enzyme throughout a polytyramine matrix: a versatile procedure for fabricating biosensors, *Analytica Chimica Acta*, **394** (1999) 211-223.
3. Khudaish, E. A., Al-Ajmi, K. Y., Al-Harhi, S. H., Al-Hinai, A. T., A solid state sensor based polytyramine film modified electrode for the determination of dopamine and ascorbic acid in a moderately acidic solution, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **676** (2012) 27-34.
4. Pournarasa, A. V., Korakib, T., Prodromidisa, M. I., Development of an impedimetric immunosensor based on electropolymerized polytyramine films for the direct detection of Salmonella typhimurium in pure cultures of type strains and inoculated real samples, *Analytica chimica acta*, **624** (2008) 301-307.
5. Situmorang, M., Hibbert, D. B., Gooding, J. J., Barnett, D., A sulfite biosensor fabricated using electrodeposited polytyramine: application to wine analysis, *Analyst*, **124** (1999) 1775–1779.
6. Kursun, S., Pasahan, A., Ekinci, B. Z., Ekinci, E., Electropolymerized Polytyramine Film for the Selective Determination of Uric Acid, *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, **51** (2012) 1209–1212.
7. Fernandes, J. C. B., Rover Jr., L., Kubotaa, L. T., De Oliveira Neto, G., Potentiometric Determination of L-Ascorbic Acid in Pharmaceutical Samples by FIA Using a Modified Tubular Electrode, *J. Braz. Chem. Soc.*, **11** (2) (2000) 182-186.
8. Ijeri, V. S., Algarra, M., Martins, A., Electrocatalytic Determination of Vitamin C Using Calixarene Modified Carbon Paste Electrodes, *Electroanalysis*, **16** (24) (2004) 2082-2086.

9. Pisoschi, A. M., Danet, A. F., Kalinowski, S., Ascorbic Acid Determination in Commercial Fruit Juice Samples by Cyclic Voltammetry, *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, (2008).
10. Helia, H., Sattarahmady, N., Amperometric Determination of Ascorbic Acid in Pharmaceutical Formulations by a Reduced Graphene Oxide-cobalt Hexacyanoferrate Nanocomposite, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **14** (2) (2015) 453-463.
11. Khorasani, H., Amini, J., Kazem, M., Ghanei, Hamideh and Tangestaninejad., Flow-Injection Amperometric Determination of Ascorbic Acid Using a Graphite-Epoxy Composite Electrode Modified with Cobalt Phthalocyanine, *Iran. J. Chem. & Chem. Eng.*, **20** (2) (2001) 66-74.
12. Farghaly, Abdel Hameed, O. A. and Abu-Nawwas, A. H., Analytical Application Using Modern Electrochemical Techniques, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **9** (2014) 3287 – 3318.
13. Harvey, D., *Analytical Chemistry 2.0 by David Harvey*, dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/50927915_Analytical_Chemistry_20, (pristup 19. lipnja 2017.)
14. Behfara, A. A., Sadeghib, N., Jannatc, B., Oveisib, M. R., Determination of L-Ascorbic Acid in Plasma by Voltammetric Method, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **9** (2) (2010) 123-128.
15. Piljac, I., *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Media Print, Zagreb, (2010), 391-478.
16. Marcinek, S., *Politiramin kao osnova senzorske površine*, Završni rad, Zagreb, 2015, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije.
17. Abbas, W., Lin, L., Electrode Modification Through Chemical and Electrochemical Deposition of Polytyramine Film for Biosensing Application, *International Journal of Engineering Research & Technology*, **4** (6) (2015) 427-433.

18. Ismail, F., Adeloju, S. B., Galvanostatic Entrapment of Penicillinase into Polytyramine Films and its Utilization for the Potentiometric Determination of Penicillin, *Sensors* **10** (2010) 2851-2868.
19. Hvosleff, J., The Crystal Structure of L-Ascorbic Acid, Vitamin C, The X-ray Analysis, *Acta Cryst.*, B **24** (23) (1968) 23-35.
20. Hacısevki, A., An overview of ascorbic acid biochemistry, *J. Fac. Pharm.*, **38** (3) (2009) 233-255.
21. Foregs Geochemical Atlas, dostupno na: <http://weppi.gtk.fi/publ/foregsatlas/text/Cu.pdf>, (pristup 19. lipnja 2017.).
22. Filipović, I., Lipanović, S., *Opća i anorganska kemija: II dio kemijski elementi i njihovi spojevi*, Školska knjiga, Zagreb, 1987, 1072-1079.
23. Cotton, F.A., Wilkinson, G., Murillo, C.A., Bochmann, M., *Advanced inorganic chemistry*, 6th ed., John Wiley & Sons, Inc. New York, 1999, 854-876.
24. A Guide to Working With Copper and Copper Alloys. Dostupno na: https://www.copper.org/publications/pub_list/pdf/a1360.pdf, (pristup 19. lipnja 2017.).

8. ŽIVOTOPIS

Alen Đalapa [REDACTED] gdje je pohađao osnovnu školu i gimnaziju. Nakon završene gimnazije 2011. godine upisuje preddiplomski studij kemijskog inženjerstva na Fakultetu za kemiju in kemijsko tehnologiju u Ljubljani. Završava preddiplomski studij 2014. godine te iste godine upisuje diplomski studij kemijskog inženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Od 2015. godine aktivan je u studentskoj udruzi eSTUDENT i početkom 2017. godine zapošljava se kao student u Shimadzu d.o.o.