

Primjena inkjet ispisa u razvoju plošnog elektrokemijskog biosenzora za laktate

Ratković, Tomislav

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:149:588530>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Tomislav Ratković

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Tomislav Ratković

PRIMJENA *INKJET* ISPISA U RAZVOJU PLOŠNOG
ELEKTROKEMIJSKOG BIOSENZORA ZA LAKTATE

ZAVRŠNI RAD

Mentor: doc. dr. sc. Petar Kassal

Članovi ispitnog povjerenstva:

doc. dr. sc. Petar Kassal

dr. sc. Irena Ivanišević

prof. dr. sc. Helena Otmačić Ćurković

Zagreb, rujan 2023.

Zahvaljujem se prvo Bogu koji mi je kroz ovo putovanje dao snage i koji je uslišao moje molitve.

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Petru Kassalu na ukazanom povjerenju i prenesenom znanju. Zahvaljujem se dr. sc. Ireni Ivanišević na strpljivosti u laboratoriju i svim smjernicama u izradi ovog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji koja me je bezuvjetno podržala kroz ovaj dio studiranja.

Zahvaljujem se svim prijateljima i kolegama koji su ovo studiranje učinili lakšim i ljepšim.

SAŽETAK

U ovom radu proučavana je primjena (bio)senzora za laktate. Izvršeni su eksperimenti na 3D elektrodi koja je disk elektroda od staklastog ugljika (**engl.** *glassy carbon electrode*) i 2D elektrodi koja je pripremljena *inkjet* ispisom tinte na bazi amfifilnih nanočestica srebra na poliimidnoj podlozi oslojenoj slojem grafena interkaliranog melaminom. Na obje vrste elektrode proučavani su odzivi struje (voltometrija) na način da su snimani ciklički voltamogrami i kronoamperogrami. Elektrode su oslojene berlinskim modrilom koje selektivno katalizira redukciju vodikovog peroksida te enzimom laktat oksidaza imobiliziranim kitozonom koji će katalizirati oksidaciju laktata u vodikov peroksid i piruvat. Snimanjem kronoamperometrijskog odziva, struja redukcije biosenzora rasla je povećanjem koncentracije laktata u slučaju 3D elektrode oslojene laktat oksidazom. Pri snimanju amperometrijskog odziva kod plošne elektrode oslojene laktat oksidazom, nije uočena skokovita promjena, ali dolazi do porasta struje oksidacije s porastom koncentracije laktata.

Ključne riječi: biosenzor, *inkjet* ispis, laktat, voltometrija

ABSTRACT

This work examined the application of bio(sensors) for lactate. Experiments were conducted on a 3D electrode, which is a glassy carbon disc electrode and a 2D electrode prepared by inkjet printing ink based on amphiphilic silver nanoparticles on a polyimide substrate coated with a layer of graphene intercalated with melamine. Current responses (voltammetry) were studied on both types of electrodes by recording cyclic voltammograms and chronoamperograms. The electrodes were coated with Prussian Blue which selectively catalyzes the reduction of hydrogen peroxide, and with lactate oxidase immobilized by chitosan, which catalyzes the oxidation of lactate to hydrogen peroxide and pyruvate. By recording chronoamperometric responses, the current of the reduction of the biosensor increased with the increasing concentration of lactate in the case of the 3D electrode coated with lactate oxidase. When recording the amperometric response on the planar electrode coated with lactate oxidase, no abrupt change was observed, but there was an increase in the oxidation current with the increase in lactate concentration.

Keywords: biosensor, inkjet printing, lactate, voltammetry

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Kemijski senzori	2
2.1.1. Elektrokemijski senzori.....	2
2.1.2. Nosivi senzori za laktat.....	2
2.2. Voltametrijske metode.....	7
2.2.1. Ciklička voltometrija.....	7
2.2.2. Amperometrija	9
2.3. <i>Inkjet</i> ispis	9
2.3.1. Kontinuirana tehnika ispisa.....	10
2.3.2. „Kapljevina na zahtjev“ tehnika ispisa	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Kemikalije.....	11
3.2. Aparatura.....	11
3.3. Opis rada	12
3.3.1. Priprema otopina.....	13
3.3.2. Modifikacija elektrode berlinskim modrilom	13
3.3.3. Imobilizacija enzima laktat oksidaze	14
3.3.4. Priprava planarnog elektrokemijskog biosenzora za laktat.....	14
3.3.5. Voltametrijska mjerenja.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. Odziv elektrode od staklastog ugljika.....	16
4.2. Odziv elektrode od staklastog ugljika oslojene berlinskim modrilom.....	21
4.3. Odziv elektrode od staklastog ugljika oslojenen laktat oksidazom	27
4.4. Primjena <i>ink-jet</i> ispisane elektrode	30
5. ZAKLJUČAK.....	36
6. POPIS SIMBOLA I KRATICA.....	37
7. LITERATURA	38
8. ŽIVOTOPIS.....	40

1. UVOD

Napretkom tehnologije omogućeno je šire korištenje senzora. Brojni senzori koriste se u medicinske svrhe za prikupljanje parametara u svrhu očuvanja zdravlja. U posljednje vrijeme izrazito se istražuju nosivi senzori, zbog njihove jednostavnosti i praktičnosti. Među nosivim sensorima vrlo su bitni oni koji skupljaju znoj te na temelju znoja daju korisne informacije o zdravlju.

Znoj kao smjesa u sebi sadrži i mliječnu kiselinu čije proučavanje i njena koncentracija se mogu povezati s nekim bolestima, ali i s opterećenjem prilikom treninga. ^[1] Stoga, biosenzori za laktat su vrlo korisni u sportskoj fiziologiji. Biosenzori za laktat mogu biti elektrokemijskog tipa, zbog prisutnosti enzima laktat oksidaze koji laktat uz prisutnost kisika oksidira u piruvat i vodikov peroksid te se na temelju dobivene struje dobiva koncentracija, koja je izlazni parametar na senzoru.

2. OPĆI DIO

2.1. Kemijski senzori

Kemijski senzori su uređaji koji pretvaraju kemijsku informaciju u analitički koristan signal. Kemijska informacija može proizlaziti iz kemijske reakcije analita ili iz fizikalnog svojstva proučavanog sustava. Kemijski senzori sastoje se od dva dijela: receptora (**engl. receptor**) i pretvornika (**engl. transducer**), a neki senzori imaju i membrane.

Kemijski senzori klasificiraju se prema pretvorniku na:

- a) Elektrokemijske senzore, koji iz elektrokemijske reakcije daju signal,
- b) Optičke senzore, koji se temelje na promjeni optičkih karakteristika analita,
- c) Masene senzore, koji se temelje na promjeni mase analita,
- d) Magnetske senzore, koji se temelje na paramagnetičkim svojstvima plina kao analita,
- e) Termičke senzore, čija je osnova promjena topline kemijske reakcije. ^[2]

2.1.1. Elektrokemijski senzori

Elektrokemijski senzori se dijele na dvije skupine:

- 1) Potenciometrijski senzori, koji daju signal kada je elektrokemijska reakcija na dodirnoj granici između analita i aktivne tvari senzora spontana. Pri tome se uspostavlja razlika električnog potencijala.
- 2) Amperometrijski senzori, kod kojih signal proizlazi iz elektrokemijske reakcije analita pod utjecajem vanjskog izvora, koji se izražava kao jakost struje. ^[3]

2.1.2. Nosivi senzori za laktat

Kemijski senzori koriste se u mnoge svrhe, kao što su glukometar, test za trudnoću, PCR test itd. Najnovija istraživanja pokušavaju iskoristiti ljudski znoj kao uzorak u medicini te da se iz njega mogu očitati podaci o ljudskom zdravlju. Znoj je otopina koja se sastoji od vode (99%), ali

sadrži i elektrolite, metabolite i makronutrijente. Među mnogim spojevima nalazi se i laktat, za koji znanstvenici tvrde da se njegova koncentracija može povezati sa intenzitetom vježbanja.

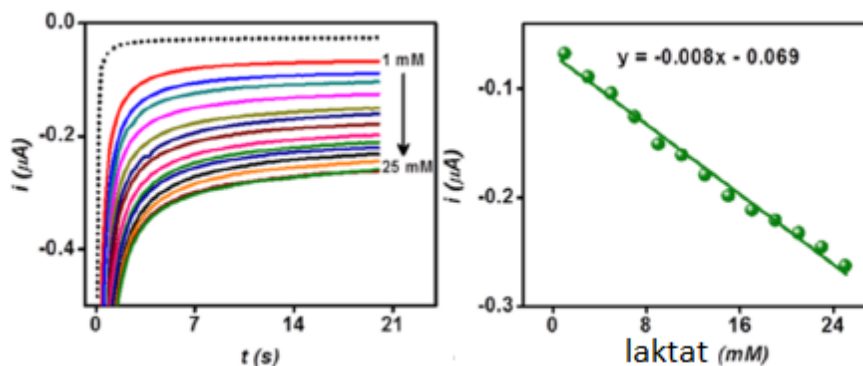
Da bi senzor za laktat mogao biti korišten, mora zadovoljiti neke kriterije:

- 1) Znoj se mora adekvatno prikupiti, bez ikakvih gubitaka zbog isparavanja.
- 2) Senzor fiksiran na kožu ne smije ometati proces znojenja.
- 3) Senzor je biokompatibilan i nije citotoksičan za organizam.
- 4) Senzor brzo izbacuje podatke te mora biti selektivan samo za laktat. ^[4]

Mehanizam detekcije laktata temelji se na kronoamperometrijskom odzivu laktata, pri čemu je struja proporcionalna koncentraciji laktata. Da bi detekcija bila lakša, senzor je potrebno modificirati. Najčešće istraživane modifikacije su one u kojima se rad biosenzora temelji na oksidaciji laktata u H_2O_2 (vodikov peroksid) i piruvat pomoću enzima laktat oksidaze (LOx) u prisustvu kisika. Sloj berlinskog modrila (**engl.** *Prussian blue*, PB) služi kao umjetna peroksidaza (selektivno će katalizirati redukciju vodikovog peroksida) ^[5] i elektron medijator kako bi promovirao raspad H_2O_2 . Sloj PB može poboljšati transport elektrona. Kitozan služi za učvršćivanje sloja LOx. Ugljikove nanocijevi služe za transport elektrona od redoks centra enzima do površine elektrode. U nastavku su navedene neke izvedbe senzora.

Vinoth i suradnici ^[6] su za analizu laktata koristili enzim laktat oksidazu te se detekcija laktata temeljila na amperometrijskim mjerenjima. Aktivni dio (radna elektroda) elektrokemijskog (bio)senzora za laktat sastojao bi se od više slojeva. Prvi sloj sastojao se od jednostjenčane ugljikove nanocijevi (**engl.** *Single-walled carbon nanotube*) sa karboksilnom skupinom (COOH). Ovaj sloj omogućuje modifikaciju površine za visoku osjetljivost na laktat. Sljedeći sloj je berlinsko modriilo koji služi kao redoks medijator za vodikov peroksid. Dodavanjem 5 mM vodikovog peroksida u otopinu analizirana je osjetljivost senzora modificiranog s berlinskim modrilom. Snimanjem cikličkog voltamograma, pri $-0,17$ V vidi se povećanje katodne struje. Sloj koji ide na berlinsko modriilo je laktat oksidaza, koja je učvršćena kitozonom koji služi kao vezivo te zaštita od ispiranja prethodnih slojeva. U otopini 0,1 M fosfatnog pufera dodavanjem 5 mM otopine mliječne kiseline kod snimljenog cikličkog voltamograma vidi se na potencijalu od

– 0,17 V povećanje katodne struje. Promatrani senzor pokazuje linearni raspon detekcije laktata od 1 mM do 25 mM.

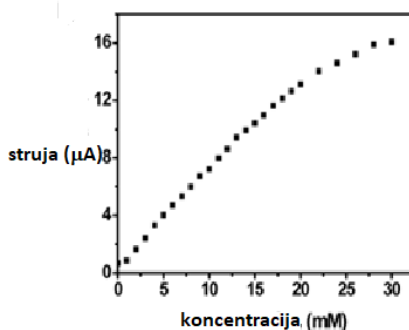


Slika 1. Kronoamperogram snimljen dodavanjem različitih koncentracija laktata (lijevo), baždarni pravac (desno). Adaptirano iz reference [6].

Gao i suradnici [7] su za pripremu senzora koristili 1% otopinu kitozana otopljen u 2% otopini octene kiseline uz miješanje na magnetskoj miješalici 1 h. Otopina kitozana zatim je pomiješana s otopinom jednostjenčanih ugljikovih nanocijevi (SWCNT) masene koncentracije 2 mg mL^{-1} te se homogenizirala na ultrazvučnoj kupelji 30 minuta. Berlinsko modriilo nanoseno je na Au elektrode (aktivni dio senzora) te je snimljen ciklički voltamogram u rasponu potencijala od - 0,5 V do 0,6 V pri brzini promjene potencijala od 50 mV s^{-1} , 10 ciklusa u otopinama 2,5 mM FeCl_3 , 100 mM KCl, 2,5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ i 100 mM HCl. Berlinsko modriilo daje širi linearni raspon rezultata od 5 mM do 15 mM laktata. $3 \mu\text{L}$ otopine kitozana i SWCNT dodana su na sloj te osušena. Na osušeni sloj je stavljeno $2 \mu\text{L}$ otopine laktat oksidaze (40 mg mL^{-1}) te na kraju još $3 \mu\text{L}$ otopine kitozana i SWCNT. Senzor je ostavljen na sušenje preko noći na 4°C bez svjetlosti.

Jia i suradnici [8] su radnu elektrodu funkcionalizirali sa višestjenčanim ugljikovim nanocijevima (**engl.** *multi-walled carbon nanotubes*, MWCNT) koje su suspendirane u etanolu i ostavljene na ultrazvučnoj kupelji nekoliko sati. Dobivena otopina je pomiješana s 0,1 M otopini tetratiafulvalena (TTF) etanol / aceton (9:1) i ostavljena u ultrazvučnoj kupelji 1 h. $3 \mu\text{L}$ otopine nanoseno je na radnu elektrodu te je ona sušena na zraku. Nakon sušenja, $3 \mu\text{L}$ laktat oksidaze

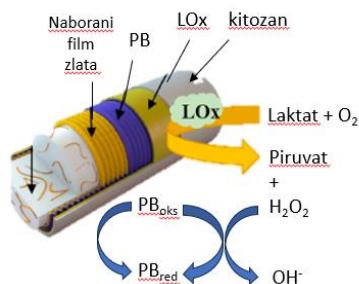
(LOx) je dodano te osušeno, a sve je povezano sa 2 μL 1% otopine kitozana pripremljene u 1% otopini octene kiseline. Senzori koji se temelje na LOx amperometriji često zahtijevaju visok potencijal (veći od 0,65 V) da bi se mogao pratiti peroksidni produkt. TTF služi kao medijator za smanjenje interferencija uzrokovanih malom elektrokatalitičkom aktivnošću LOx. TTF u smjesi sa CNT pokazuje efektivno „prikazivanje“ elektrona na radnoj elektrodi. Snimanjem cikličkog voltamograma, pojavljuje se anodni vrh na 0,05 V. Razlog malog potencijala je smjesa TTF/CNT koja djeluje tako da premješta elektrone od redoks centra enzima do površine elektrode. Snimanjem amperometrijskog dijagrama u 0,1 M fosfatnom puferu, povećanjem koncentracije LOx za 1 mM dobije se linearni pravac ovisnosti struje o koncentraciji laktata u rasponu od 1 mM do 20 mM.



Slika 2. Grafički prikaz ovisnosti struje o koncentraciji laktata. Adaptirano iz reference [8].

Wang i suradnici ^[9] su prvi sloj, berlinsko modriilo, elektrodeponirali na elastomer zlatnog vlakna i snimljen je ciklički voltamogram u: 2,5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ i FeCl_3 i 0,1 M KCl i HCl u rasponu potencijala od $-0,3$ V do 0,5 V, 15 ciklusa sa brzinom promjene potencijala od 20 mV s^{-1} . Nakon snimanja, na sloj berlinskog modrila dodano je 4 μL laktat oksidaze. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, dodano je 8 μL otopine kitozana (1% kitozan u 1% otopini octene kiseline) za očuvanje aktivnosti LOx. Pri potencijalu $-0,1$ V sniman je kronoamperometrijski odziv za koncentraciju laktata 0-30 mM. Zbog nedovoljno dobre linearnosti, fosfatni pufer je modificiran i u njemu je dodano NH_4Cl , urea, CaCl_2 , MgCl_2 , KCl, NaCl i glukoza, čime se poboljšala linearnost

u koncentracijskom rasponu 0-30 mM laktata, pri čemu je najbolji linearni odziv je u rasponu 0-5 mM.



Slika 3. Dizajn radne elektrode elektrokemijskog senzora. Adaptirano iz reference [9].

Imami i suradnici ^[10] razvili su senzor u kojem je radna elektroda isprintana korištenjem berlinskog modrila, zbog visoke elektrokatalitičke selektivnosti na redukciju H₂O₂, koji je produkt oksidacije laktata. Kao i u prethodnim primjerima, pri - 0,1 V sniman je kronoamperometrijski odziv dodavanjem od 1 mM do 28 mM laktata. Osjetljivost ovog senzora je 98 nA mM⁻¹.

Shitanda i suradnici ^[11] su na isprintanu poliimidnu podlogu, deponirali sloj MgOC te sušili na 80°C 24 sata. Nakon toga dodano je 5 μL NQ (naftokvinon) otopine. Zadnji sloj je dodan LOx. Mjerenja su obavljena u 1 M otopini fosfatnog pufera koji sadrži 0-100 mM laktata. Kronoamperometrijska snimanja su obavljena pri potencijalu - 0,1 V, dok su CV snimanja obavljena u rasponu potencijala od -0,2 V do 0,4 V. Snimanjem kronoamperometrije, dobiveno je da struja raste linearno s porastom koncentracije laktata do 10 mM.

2.2. Voltametrijske metode

Voltametrijske metode predstavljaju skupine elektroanalitičkih postupaka u kojima je signal pobude električni napon. Signal odziva je struja, koja se mjeri kao funkcija narinutog napona.

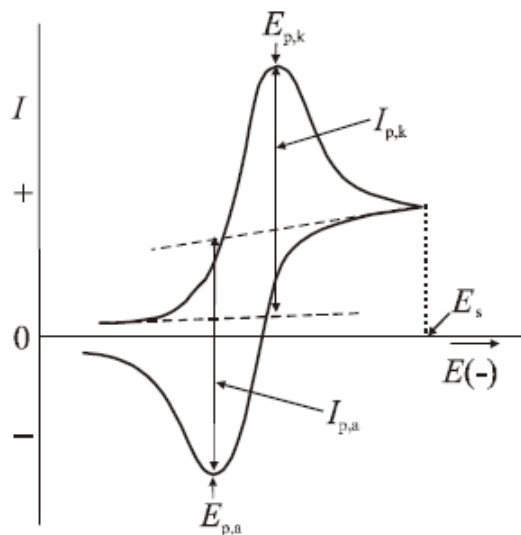
Na granici elektrolita i elektrode događa se redoks reakcija:



Gdje je O oksidirani oblik analita, z je broj izmijenjenih elektrona, a R reducirani oblik tvari.

2.2.1. Ciklička voltametrija

Kod cikličke voltametrije, signal pobude linearno raste te jednom dosegne izabranu vrijednost (E_s) nakon čega se smjer posmika potencijala mijenja. U pomaku potencijala prema desno razvija se redukcija produkata, dok se u pomaku potencijala prema lijevo (u povratnom posmiku) odvija oksidacija produkata. [3]



Slika 4. Primjer cikličkog voltamograma.

Eksperimentalne veličine koje karakteriziraju ciklički voltamogram su razlika potencijala vrhova katodnog ($E_{p,k}$) i anodnog vala ($E_{p,a}$).

Razlika potencijala vrha katodnog ($E_{p,k}$) i anodnog ($E_{p,a}$) vala kod reverzibilnog procesa iznosi:

$$E_{p,k} - E_{p,a} = \frac{57}{z} \text{ mV} \quad (2)$$

Kod reverzibilnog elektrodnog procesa, odnos struja vrha vala, odnosno odnos visina katodnog i anodnog vala, uz uvjet da su obje vrste redoks sustava stabilne i topljive u rabljenom otapalu:

$$\frac{I_{p,k}}{I_{p,a}} = 1 \quad (3)$$

Gdje su $I_{p,k}$ i $I_{p,a}$ jakost struje redukcijskog vala, odnosno jakost struje oksidacijskog vala.

Uvjeti koji mogu prosuditi reverzibilnost elektrodnog procesa su sljedeći za reverzibilni elektrodni proces:

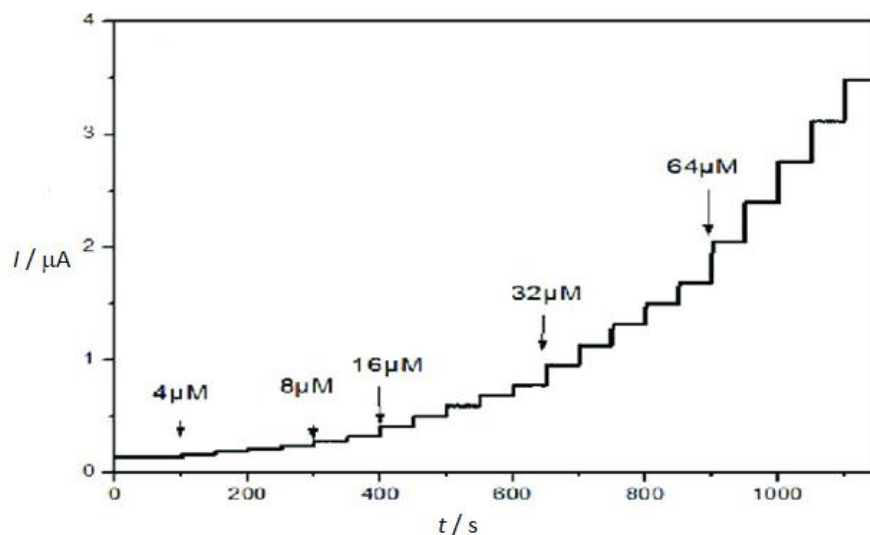
- $E_{p,k}$ i $E_{p,a}$ ne ovise o brzini promjene potencijala,
- $E_{p,k} - E_{p,a}$ je $57/z$ mV kod 25 °C te ne ovisi o brzini promjene potencijala,
- $I_{p,k} / I_{p,a}$ je 1 i ne ovisi o brzini promjene potencijala

Ireverzibilni procesi ovise o sljedećim parametrima:

- E_p ovisi o brzini promjene potencijala, za procese redukcije pomiče se za $(30/az)$ prema negativnijim vrijednostima potencijala kod deseterostrukog povećanja brzine promjene potencijala, a obratno kod oksidacije – prema pozitivnijim vrijednostima potencijala
- i_p / v je konstantan

2.2.2. Amperometrija

Amperometrija je elektroanalitička metoda u kojoj se koristi stalni potencijal te se mjeri odzivni signal koji je struja. Tijekom mjerenja zadana je vrijednost konstantnog potencijala, a struja je funkcija vremena. Prednost amperometrije je mogućnost određivanja difuzijskog koeficijenta čak i pri sporij heterogenoj elektrodnoj kinetici te je proces pod difuzijskom kontrolom. [3]



Slika 5. Primjer grafa snimanog metodom amperometrije. Preuzeto i adaptirano iz [12]

2.3. Inkjet ispis

Tehnologija tintnog ispisa (**engl.** *Inkjet printing technology*) je tehnika u kojoj se kontrolirano nanosi funkcionalni materijal na tiskovnu podlogu. Tekući dio tinte uklanja se isparavanjem otapala, kristalizacijom, a provode se i naknadni procesi kao što su sinteriranje i žarenje. Prednosti ove tehnologije su manja količina kemijskog otpada, niska cijena proizvodnje i mogućnost izrade personaliziranog otiska. S obzirom na način formiranja kapljice razlikuju se kontinuirana i „kapljevina na zahtjev“ tehnika ispisa. [13]

2.3.1. Kontinuirana tehnika ispisa

Kontinuirana tehnika ispisa (**engl.** *Continuous inkjet, CIJ*) je tehnika u kojoj se na temelju primjene visokog tlaka potiskuje tinta u mlaznice pisača iz spremnika. Kada tinta prođe kroz elektrodne ploče, mlaz se razdvaja u kapljice koje se selektivno nabijaju. Nenabijene kapljice prolaze kroz mlaznicu i završavaju na podlozi, dok se nabijene kapljice vraćaju odvodnim kanalom u spremnik.

2.3.2. „Kapljevina na zahtjev“ tehnika ispisa

U tehnici „kapljevina na zahtjev“ (**engl.** *Drop on Demand, DoD*) glava pisača sastoji se od desetke, stotine pa čak i tisuće mlaznica. S obzirom na način formiranja „kapljevina na zahtjev“ razlikuju se termalni tintni pisači i piezo tehnologija.

Termalni tintni pisači formiraju kapljice tako da se tintni rezervoar selektivno zagrijava te nastaje mjehurić plina koji istiskuje kapljicu tinte, čiji je volumen proporcionalan volumenu plina.

Piezo tehnologija formira kapljicu zbog mehaničke deformacije piezoelektrične pločice. Piezoelektrična pločica se uvlači te se njen volumen smanjuje, a tlak unutar komore raste te dolazi do izbacivanja tinte kroz mlaznice pisača. ^[14]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

U tablici 1. prikazane su kemikalije korištene prilikom izrade ovog završnog rada. Sve kemikalije su *p.a.* (**lat. pro analysi**), odnosno analitičnog stupnja čistoće. Otopine su pripravljane ultra čistom vodom dobivenom Milipore-MilliQ uređajem.

Tablica 1. Popis korištenih kemikalija i njihovi proizvođača.

Kemikalija	Proizvođač	Država
Kalijev heksacijanoferat (III), $K_3[Fe(CN)_6]$	Merck	Njemačka
Željezov (III) klorid heksahidrat, $FeCl_3 \times 6 H_2O$	Gram-mol	Hrvatska
Vodikov peroksid, $w(H_2O_2) = 30\%$	Gram-mol	Hrvatska
Mliječna kiselina, C_3H_6O	Sigma-Aldrich	SAD
Natrijev klorid, NaCl	Gram-mol	Hrvatska
Kalijev klorid, KCl	Kemika	Hrvatska
Natrijev hidrogenfosfat dihidrat, $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	Kemika	Hrvatska
Kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4	Merck	Njemačka
Laktat oksidaza	Sigma-Aldrich	SAD
Kitozan, $w(C_{12}H_{24}N_2O_9) = 1\%$	Sigma-Aldrich	SAD
Klorovodična kiselina, $w(HCl) = 37\%$	Gram-mom	Hrvatska

3.2. Aparatura

Prilikom izrade ovog rada korišteni su sljedeći uređaji, neki su prikazani na slici 6.

- potenciostat / galvanostat model 263A (EG&G *Priceton Applied Research*) povezan s osobnim računalom te detektorom frekvencije (Frequency Response Detector, EG&G *Priceton Applied Research*)
- troelektrodna elektrokemijska ćelija
 - radna elektroda: (1) disk elektroda od staklastog ugljika (**engl. glassy carbon electrode**, GCE, $A = 0,07 \text{ cm}^2$); (2) *inkjet* – ispisana srebrova elektroda oslojena slojem grafena interkaliranim melamimom
 - referentna elektroda: Ag|AgCl| 3M KCl||2M NaNO₃
 - pomoćna elektroda: Pt elektroda

- digitalni voltmetar: pH-metar MA 5740, Iskra, Slovenija
- analitička vaga: Sartorius Lab Instruments, Njemačka
- sušionik: Instrumentaria, Tvornica medicinskih instrumenata, aparata i šprica, Zagreb



Slika 6. Prikaz aparature: potenciostat / galvanostat model 263A (lijevo), troelektrodna elektrokemijska ćelija s GC elektrodom (u sredini) i *inkjet* printana elektroda (desno).

3.3. Opis rada

Tijekom eksperimentalnog rada pripravljene su otopine potrebne za izradu (bio)senzora i provedbu voltametrijskih mjerenja. Ispitane su analitičke značajke dva različita dizajna elektrokemijskog senzora korištenjem: (a) 3D disk-elektrode i (b) 2D plošne elektrode kao radnih elektroda. Za klasičnu štapičastu elektrodu odabrana je elektroda od staklastog ugljika, dok je plošna srebrna elektroda pripravljena *inkjet* tiskom tinte na bazi nanočestica srebra. Različita voltametrijska mjerenja provedena su korištenjem potenciostata / galvanostata i troelektrodne elektrokemijske ćelije.

3.3.1. Priprema otopina

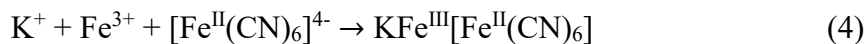
Za sva voltametrijska snimanja pripravljene su otopine određenih koncentracija.

- 0,1 M otopina $K_3Fe(CN)_6$
- 0,1 M otopina $FeCl_3$
- 0,1 M otopina H_2O_2
- 0,1 M otopina mliječne kiseline
- 0,01 M otopina KCl
- 0,01 M otopina HCl
- Osnovni elektrolit: 0,01 M fosfatni pufer ($pH = 7,387$)
- Otopine fosfatnog pufera ($pH = 5,5$, $pH = 6,5$, $pH = 6,1$) pripravljene su zakiseljavanjem ishodne otopine dodatkom klorovodične kiseline

Sve otopine pripravljene su u odmjernoj tikvici određenog volumena bilo otapanjem mase tvari ili razrjeđenjem iz originalne boce. Otopine vodikova peroksida, mliječne kiseline, kalijeva klorida te fosfatni pufer pripravljene su nadopunjavanjem odmjerne tikvice do oznake ultračistom vodom, dok su otopine željezovih soli korištene za pripravu berlinskog modrila pripravljene otapanjem odvage u klorovodičnoj kiselini (0,01 M HCl) i u suvišku kalijevih iona (0,1 M KCl).

3.3.2. Modifikacija elektrode berlinskim modrilom

Berlinsko modrilo (*engl.* Prussian Blue (PB), $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$) poznato je pod nazivom umjetna peroksidaza, te se često koristi u dizajnu neenzimatskog elektrokemijskog senzora za vodikov peroksid. Ujedno je nužan faktor kod dizajna enzimatškog biosenzora za detekciju laktata. Shodno tome, disk elektroda od staklastog ugljika primarno je oslojena slojem berlinskog modrila. Sloj berlinskog modrila pripravljen je nanošenjem kiselih otopina $FeCl_3$ i $K_3Fe(CN)_6$ ($V = 5 \mu L$) na aktivnu površinu GC elektrode, prilikom čega dolazi do sljedeće kemijske promjene.



Elektroda je ostavljena sat vremena, prilikom čega isparavanjem vode dolazi do formiranja sloja berlinskog modrila. Radi bolje adhezije na površinu GC elektrode, ali i nastanka netopljivog filma, elektroda se dalje suši u sušioniku 1 h pri temperaturi od 100°C.

3.3.3. Imobilizacija enzima laktat oksidaze

Nakon imobilizacije i karakterizacije GC elektrode oslojene berlinskim modrilom, na primarni sloj nanosi se otopina enzima laktat oksidaze ($V = 5 \mu\text{L}$), te se ostavi sušiti 30 minuta na sobnoj temperaturi i pri atmosferskom tlaku. Uzevši u obzir da se radi o vodenoj otopini enzima, pri čemu bi uranjanjem elektrode u vodenu otopinu pufera prilikom mjerenja došlo do otapanja senzorskog sloja, enzimatski sloj mora se dodatno zaštititi. Kao zaštitni polimer u dizajnu enzimatskog biosenzora odabran je kitozan zbog svoje biokompatibilnosti s enzimima i proteinima. Nakon sušenja LOx, nanešeno je 5 μL 1% otopine kitozana u 2% octenoj kiselini. U svrhu neutralizacije kiselog medija te priprave hidrogela dobrih mehaničkih svojstava, adhezije na postojeće slojeve, te propusnosti za laktat, kitozan je neutraliziran dodatkom: (a) 1 M otopine NaOH; (b) amonijačnog pufera $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ (pH = 9,915).

3.3.4. Priprava planarnog elektrokemijskog biosenzora za laktat

Planarna srebrova elektroda, korištena kao baza za izradu plošnog biosenzora, pripravljena je *inkjet* ispisom tinte na bazi amfifilnih nanočestica srebra na poliimidnu podlogu. Za ispis vodljive tinte korišten je tiskarski sustav Epson Stylus L800, pri čemu su definirani sljedeći parametri:

- Veličina kapljice: M + L
- Rezolucija: 1440 x 720 DPI
- Boja: crna

U svrhu postizanja tankog filma srebra izvrsnih električnih značajki za daljnji dizajn biosenzora, ispisana suspenzija nanosrebra podvrgnuta je kombiniranom termalnom sinteriranju (1 h pri 180°C) te sinteriranju uporabom intenzivne pulsirajuće svjetlosti.

Prije nanošenja slojeva biosenzora, ispisana srebrova elektroda oslojena je čvrstim kontaktom na bazi grafena interkaliranog melaminom. ^[15] Ispisano je ukupno 50 slojeva.

3.3.5. Voltametrijska mjerenja

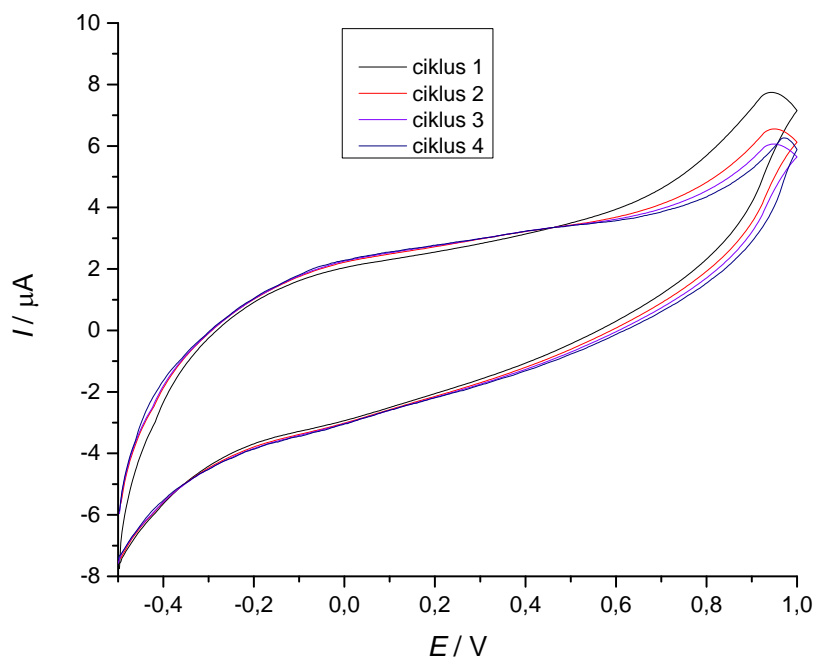
Sva voltametrijska mjerenja provedena su korištenjem potenciostata / galvanostata (model 263A), spojenog na računalo (*PowerSuite* software), uz Ag|AgCl| 3M KCl||2M NaNO₃||Pt žica||GC elektroda. Sva mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi u elektrokemijskoj ćeliji volumena 10 mL (sustav s GC elektrodom) ili 700 μL (sustav s plošnom elektrodom), pri brzini promjene potencijala (**engl.** *Scan rate*) od (najčešće) 50 mV/s.

Za karakterizaciju (bio)senzora cikličkom voltametrijom korišten je (ukoliko nije drugačije naglašeno) raspon potencijala od – 0,5 V do + 0,1 V, a broj snimanih ciklusa iznosi 2. Za karakterizaciju (bio)senzora kronoamperometrijom potencijal radne elektrode (klasične ili plošne) postavljen je na vrijednost $E = -100$ mV, te je dodatkom različitih koncentracija otopine analita praćen strujni odziv u vremenu. Mjerenja su provedena u temeljnom fosfatnom puferu (pH = 7,387), te u kiselim puferskim otopinama. Struje za baždarne dijagrame određene su na temelju prosječnih vrijednosti struja između dva dodatka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

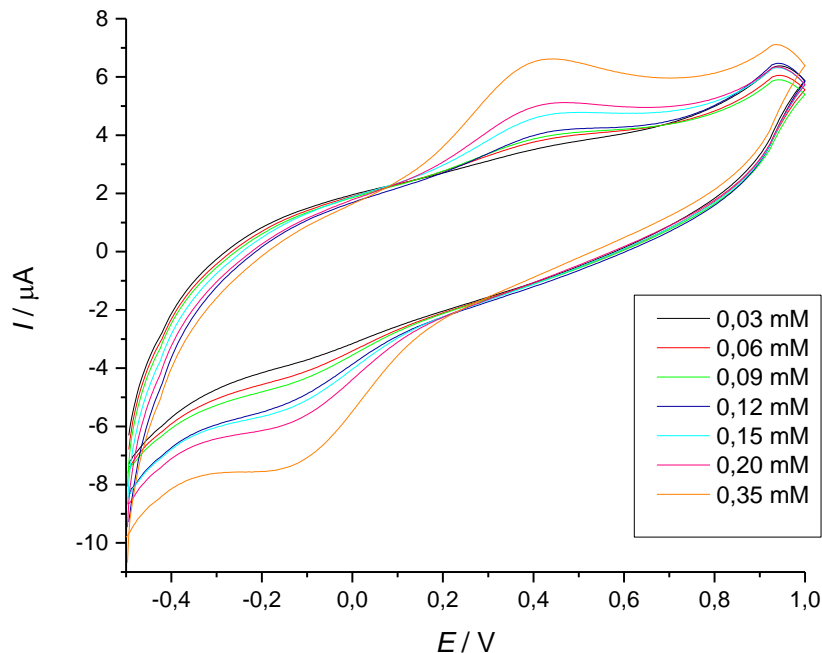
4.1. Odziv elektrode od staklastog ugljika

Elektroda od staklastog ugljika (**engl.** *Glassy carbon electrode, GCE*) jedna je od najčešće korištenih podloga za izradu elektrokemijskih (bio)senzora. Prednosti GC elektrode očituju se u njenoj inertnosti u kiselom i lužnatom mediju, te dobroj adheziji raznih materijala na aktivnu površinu elektrode. ^[16] Koristi se za voltametrijska snimanja zbog mogućnosti snimanja u rasponu potencijala od oko $-0,5$ V do čak $1,3$ V u kiselim i lužnatim medijima. Preliminarna ispitivanja odziva GC elektrode u različitim otopinama provedena su u svrhu ispitivanja čistoće senzorske površine, provjere radnog raspona potencijala elektrode, te redoks - ponašanja analita (vodikova peroksida i mliječne kiseline). Za ovu svrhu korištena je metoda cikličke voltametrije.



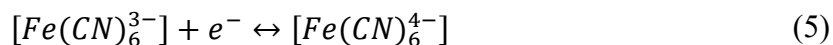
Slika 7. Odziv elektrode od staklastog ugljika u fosfatnom puferu.

Na slici 7. prikazan je strujni odziv elektrode u fosfatnom puferu ($\text{pH} = 7,387$). Snimljeno je četiri ciklusa, a odziv (struja) je vrlo mali, gotovo teži u nulu.

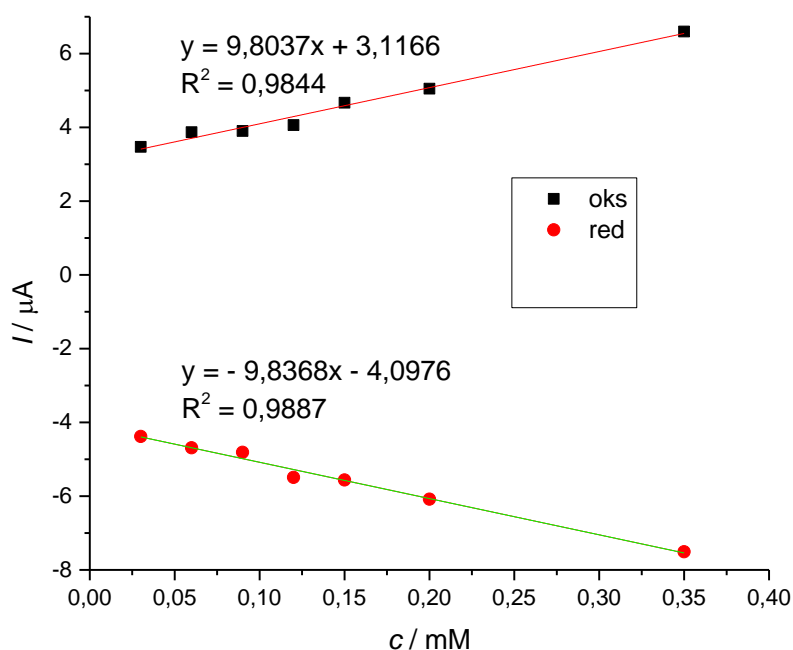


Slika 8. Odziv elektrode od staklastog ugljika u puferu dodatkom $K_3Fe(CN)_6$ bez miješanja.

Na slici 8. prikazani su ciklički voltamogrami dobiveni sukcesivnim dodatkom po 30 μ L 10 mM otopine kalijeva heksacijanoferata (II/III) u osnovni elektrolit. Vidljivo je reverzibilno ponašanje ovog redoks-para, s izraženim anodnim valom pri potencijalu 0,41 V, te redukcijskim valom pri potencijalu od $-0,15$ V prema referentnoj srebro/srebro klorid elektrodi. Također je primjetan porast i anodne i katodne struje povećanjem koncentracije heksacijanoferata, pri čemu je pri najvećoj koncentraciji analita postignuta maksimalna struja oksidacijskog vala od 6,60 μ A, a vrh redukcijskog vala bilježi maksimalnu struju iznosa 7,51 μ A. Porastom koncentracije heksacijanoferata u elektrokemijskoj ćeliji ne dolazi do promjene u položaju ni anodnog ni katodnog maksimuma. Postojanje samo jednog anodnog i katodnog vala potkrepljuje činjenicu da tijekom oksidacije odnosno redukcije dolazi do izmjene samo jednog elektrona, prema jednadžbi:



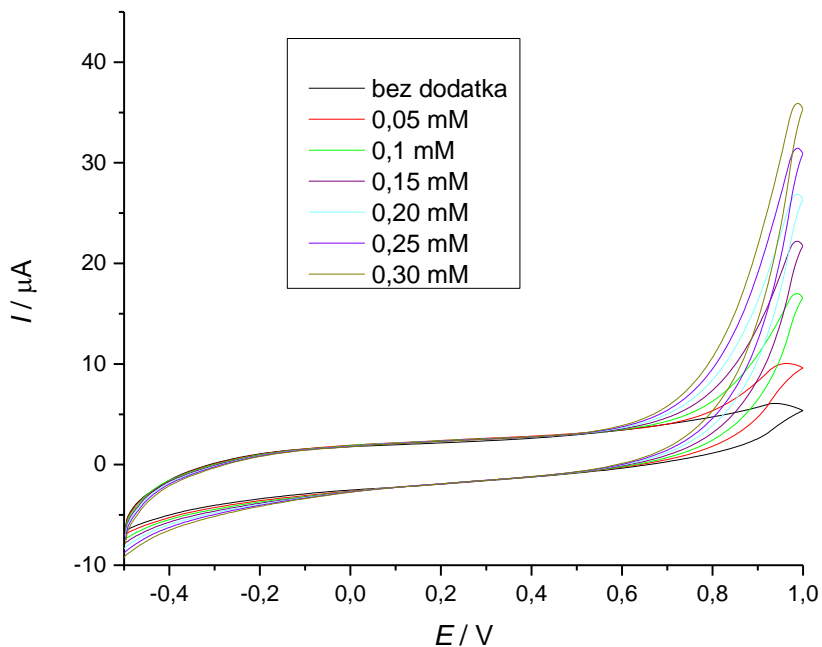
Izračunata vrijednost standardnog redoks potencijala za navedeni proces iznosi $E^\circ = 0,281$, što se dobro slaže s literaturnom vrijednošću izraženoj prema srebro/srebro klorid referentnoj elektrodi. ^[17] Ovakvo gotovo idealno elektrokemijsko ponašanje heksacijanoferat (II/III) redoks-probe ukazuje na brzu izmjenu elektrona između analita i površine radne elektrode, te potvrđuje GC elektrodu kao prikladan elektrodni materijal za dizajn (bio)senzora.



Slika 9. Ovisnost vršnih struja oksidacije i redukcije o koncentraciji $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4}$.

Na slici 9. dan je prikaz ovisnosti vršne struje oksidacije i redukcije o koncentraciji heksacijanoferata. Vidljivo je da povećanjem koncentracije heksacijanoferata maksimalna anodna struja raste te katodna struja također raste pri čemu je linearan odziv postignut u koncentracijskom rasponu heksacijanoferata. Prema legendi oks označava vrhove anodnih struja, a red vrhove anodnih struja.

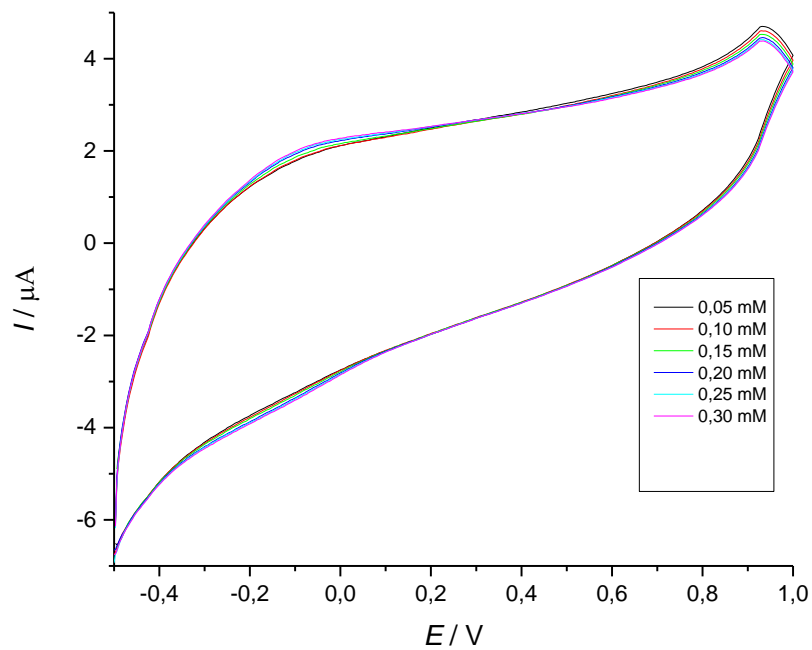
U sljedećoj fazi sniman je odziv struje u fosfatnom puferu ($\text{pH} = 7,387$) dodatkom $50 \mu\text{L}$, $100 \mu\text{L}$, $150 \mu\text{L}$, $200 \mu\text{L}$, $250 \mu\text{L}$ i $300 \mu\text{L}$ $0,1 \text{ M}$ otopine H_2O_2 u ćeliju. Volumeni su preračunati u koncentracije.



Slika 10. Odziv elektrode od staklastog ugljika u puferu ($\text{pH} = 7,387$) dodatkom H_2O_2 bez miješanja.

Na prikazanoj slici 10. može se primijetiti da je redoks reakcija vodikova peroksida ireverzibilna.

Nakon dodatka vodikovog peroksida, po istom principu, (po $50 \mu\text{L}$ alikvota) dodavala se $0,1 \text{ M}$ otopina mliječne kiseline.

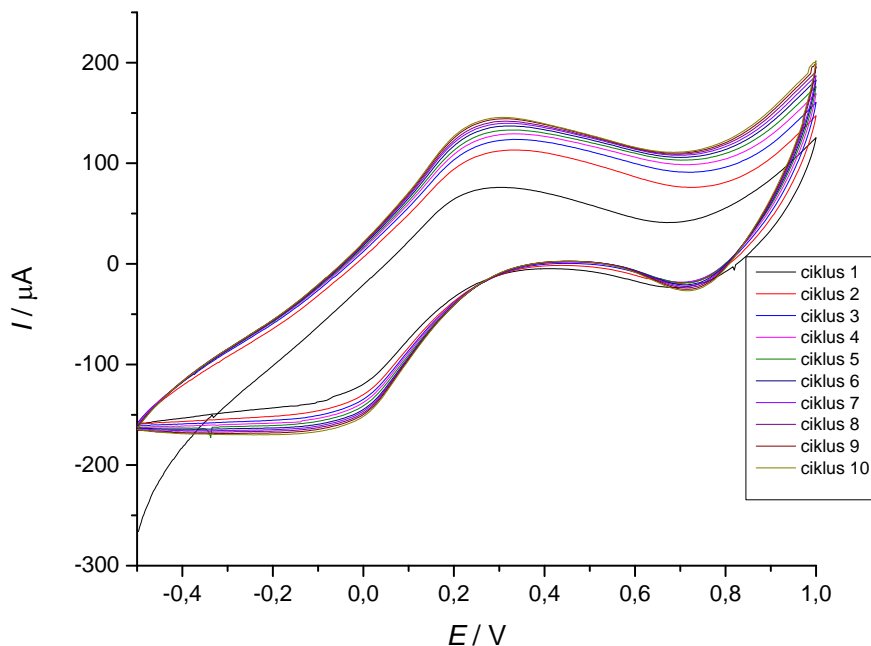


Slika 11. Odziv elektrode od staklastog ugljika u puferu (pH = 7,387) dodatkom mliječne kiseline bez miješanja.

Prema cikličkom voltamogramu sa slike 11. odziv struje u ćeliji dodatkom mliječne kiseline je gotovo isti ma koliko god se dodalo. Laktat se nije reducirao niti oksidirao pri ovim uvjetima. Time je i strujni odziv jednak odzivu elektrode u čistom puferu (slika 7).

4.2. Odziv elektrode od staklastog ugljika oslojene berlinskim modrilom

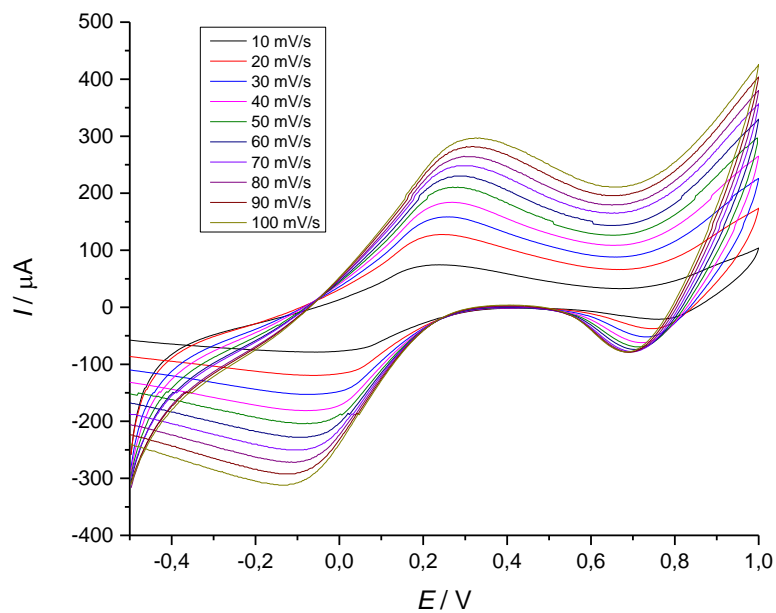
GC elektroda je, kako je u eksperimentalnom dijelu opisano, oslojena sa slojem berlinskog modrila. Nakon procesa oslojavanja, potrebno je aktivirati elektrodu u otopini KCl množinske koncentracije 0,1 M u pri čemu je snimljeno 10 ciklusa.



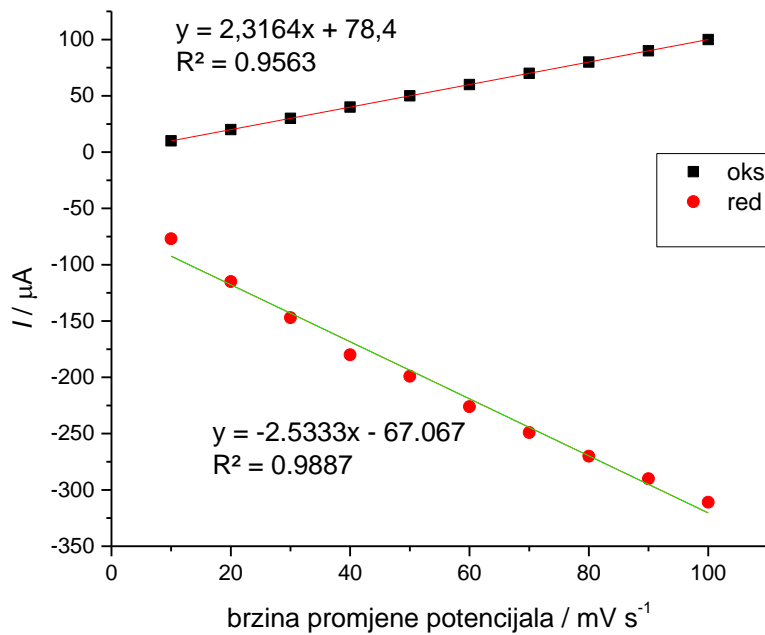
Slika 12. Aktivacija GC elektrode oslojene berlinskim modrilom.

Vidljivo je iz cikličkog voltamograma da je katodni vrh struje na oko $-0,1$ V dok je anodni strujni vrh na oko $0,3$ V.

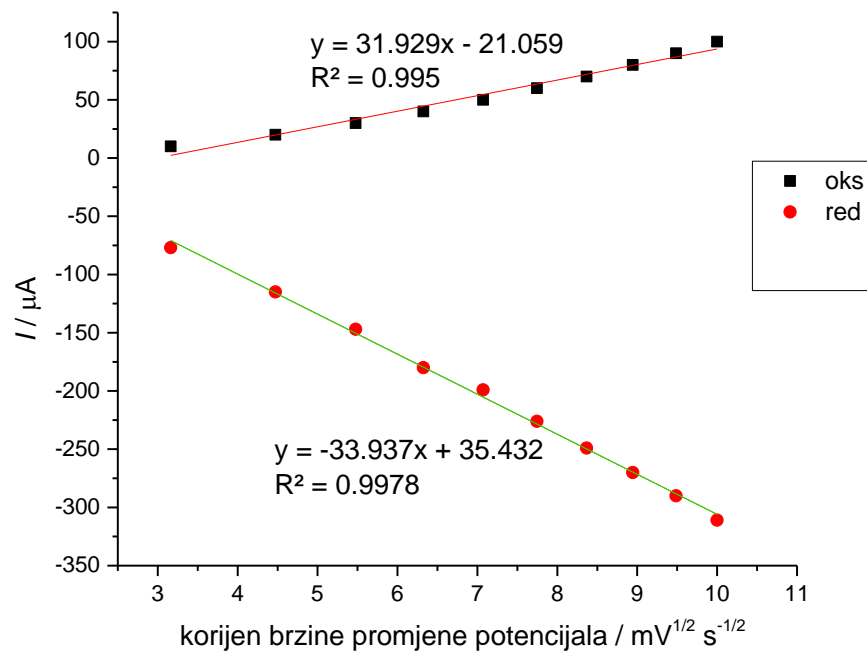
U sljedećim prikazima snimljen je ciklički voltamogram u 10 mL 0,1 M otopine KCl, s brzinom promjene potencijala od 10 mV s^{-1} do 100 mV s^{-1} . Konstruiran je baždarni dijagram iz strujnih vrhova reakcija oksidacije i redukcije gdje su sa oks prikazani vrhovi anodnih struja, a sa red vrhovi katodnih struja.



Slika 13. Aktivacija GC elektrode oslojene berlinskim modrilom promjenom brzine promjene potencijala.



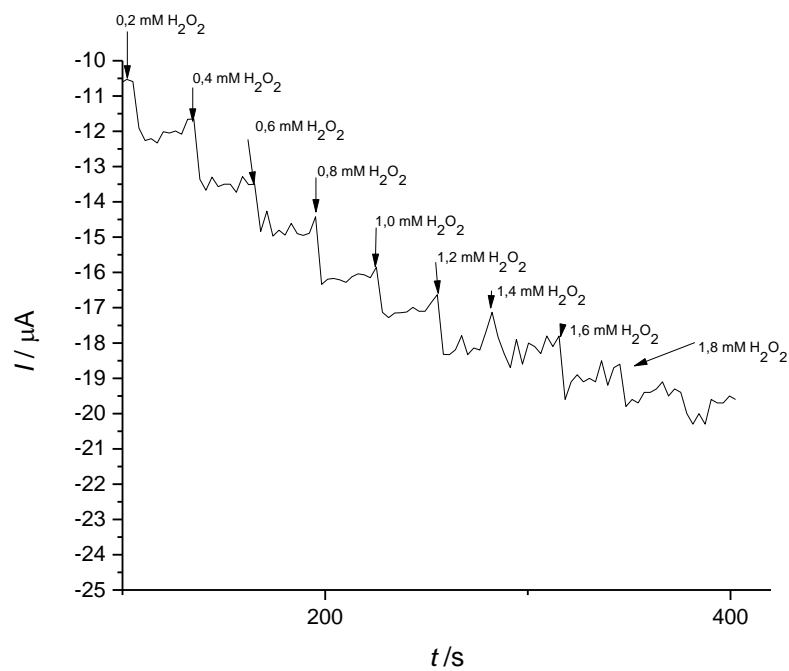
Slika 14. Grafički prikaz ovisnosti anodne i katodne jakosti struje o brzini promjene potencijala.



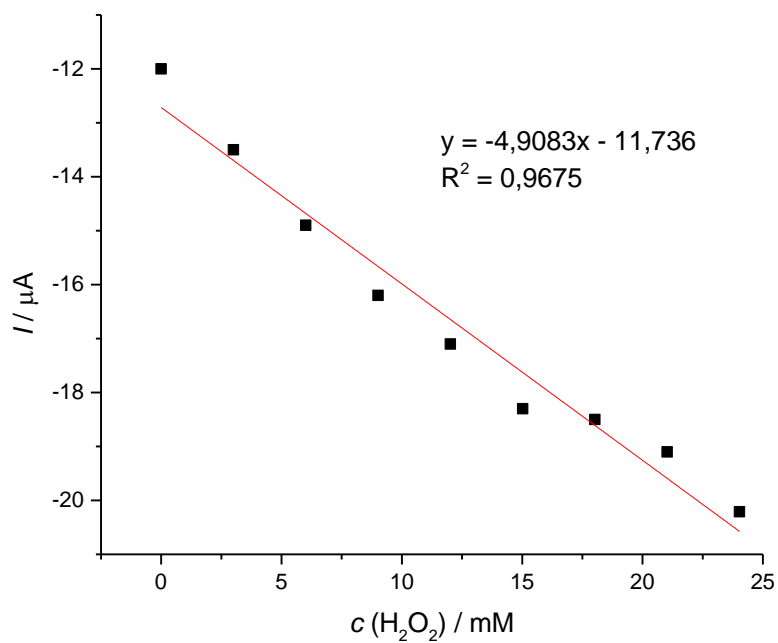
Slika 15. Grafički prikaz ovisnosti anodne i katodne struje o korijenu brzine promjene potencijala.

Vidljivo je da se povećanjem brzine promjene potencijala i korijena brzine promjene potencijala struja anodnih vrhova raste te struja katodnih vrhova raste. Kod prikaza sa korijenom brzine promjene potencijala (slika 15.), linearnost je izraženija (R^2 je gotovo pa jednak 1) dok kod prikaza sa brzinom promjene potencijala (slika 14.), pravci ne prate u potpunosti točke. U ovom procesu $I_{p,k} / I_{p,a}$ oko 1 te ovaj parametar upućuje na reverzibilnosti procesa.

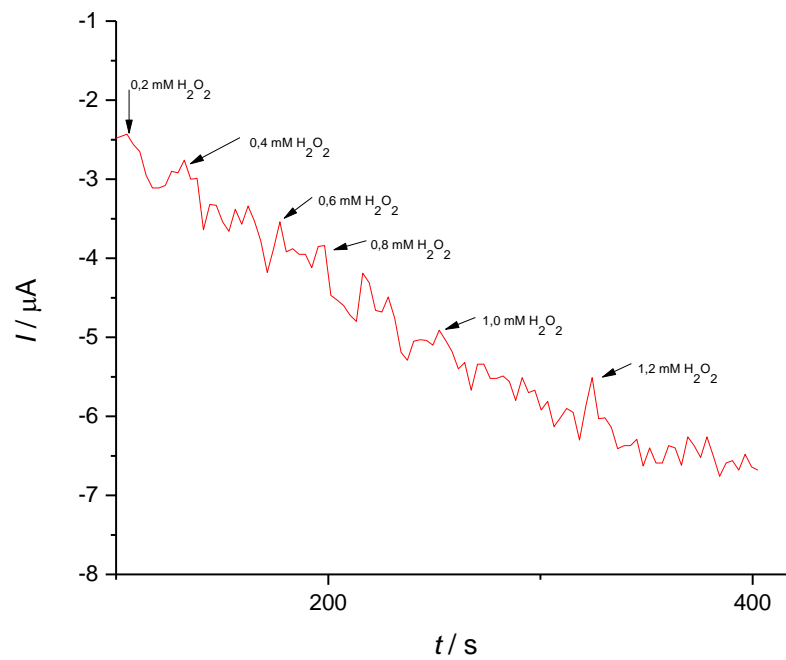
Na sljedećim slikama prikazani su kronoamperometrijski snimci dodatka po 20 μL 0,1 M otopine H_2O_2 u otopinama pufera različitih pH vrijednosti. U nekim slučajevima je korištena magnetska miješalica, dok u nekima nije. Miješanje će utjecati na homogenizaciju otopine. Korišteni su puferi različitih pH vrijednost (pH = 6,1 i pH = 5,5) jer je pH vrijednost ljudskog znoja u rasponu od 4,5 do 7,0. Najčešća vrijednost je pH = 6,3.



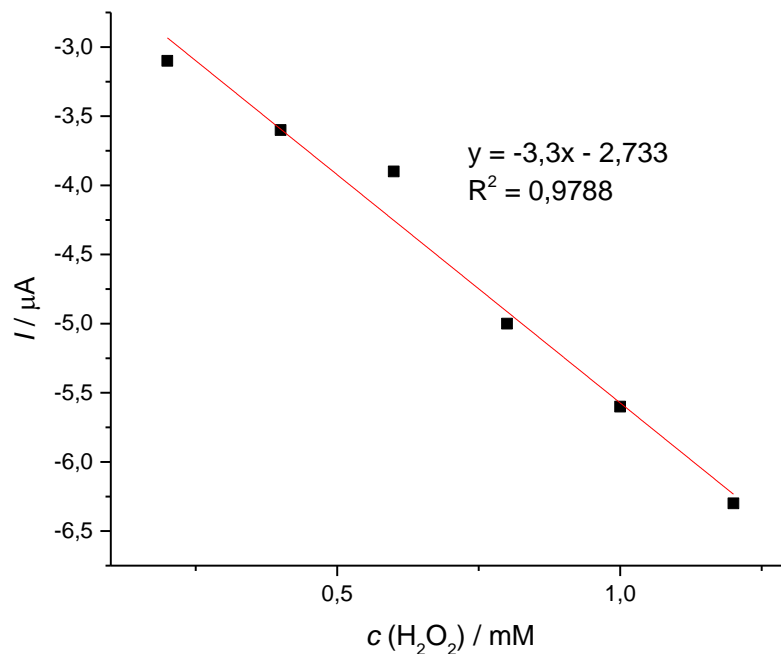
Slika 16. Kronoamperometrijski prikaz dodatka 0,1 M otopine H₂O₂ u fosfatni pufer (pH = 6,1) uz miješanje pri potencijalu od -0,1 V



Slika 17. Grafički prikaz ovisnosti struje o koncentraciji vodikovog peroksida u fosfatnom puferu (pH = 6,1).



Slika 18. Kronoamperometrijski prikaz dodatka 0,1 M otopine H₂O₂ u fosfatni pufer (pH = 5,5) bez miješanja pri potencijalu od - 0,1 V.



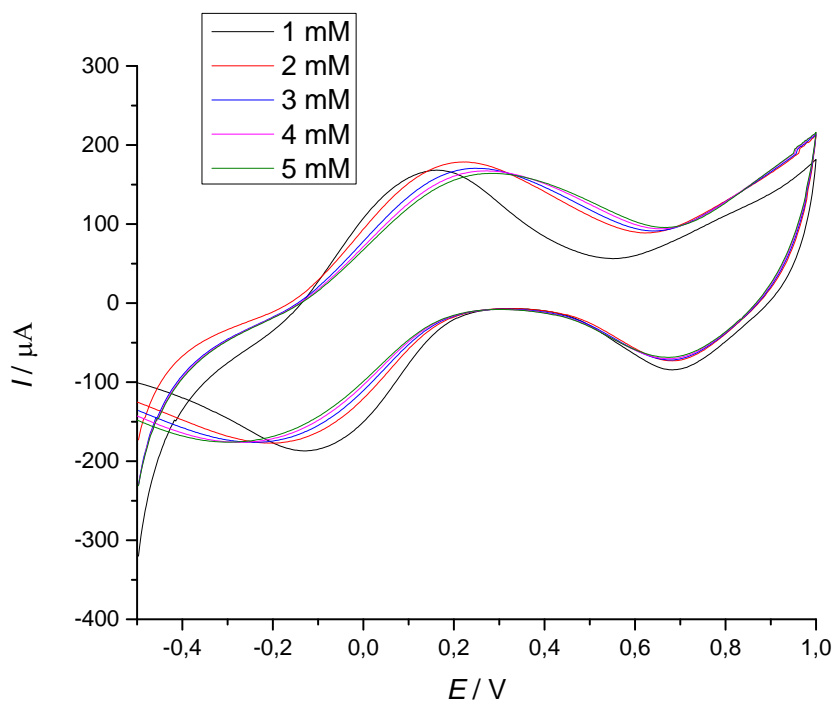
Slika 19. Grafički prikaz ovisnosti struje redukcije o koncentraciji vodikovog peroksida u fosfatnom puferu (pH = 5.5).

Iz prikazanog je vidljivo da se u otopini pufera veće vrijednosti pH pojavljuju više negativnije struje dodatkom H₂O₂, dok se u otopini pufera pH vrijednosti 5,5 pojavljuju veće struje. Pri kronoamperometrijskom snimanju u otopini fosfatnog pufera pH = 5,5 vidljivo je da je u baždarnom dijagramu R^2 bolji, što bi značilo da je fosfatni pufer sa pH = 5,5 prikladniji za redukciju vodikovog peroksida. Na rezultat je utjecalo i miješanje. Miješanjem se injektirani vodikov peroksid odnosi od površine elektrode u elektrolit, čime dolazi do većih padova vrijednosti struja prilikom redukcije H₂O₂.

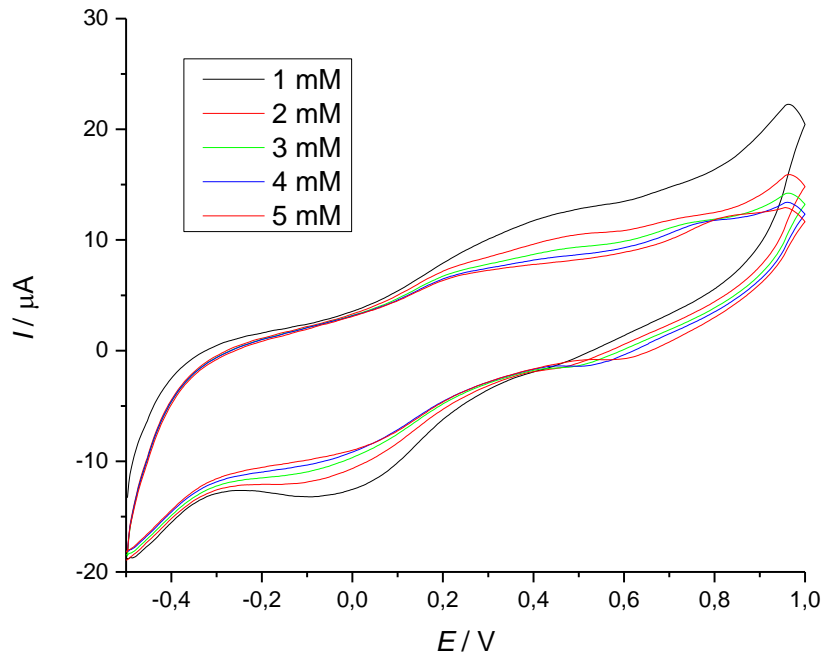
4.3. Odziv elektrode od staklastog ugljika oslojenen laktat oksidazom

Nakon snimljenih voltametrijskih grafova GC elektroda je oslojena s novim slojem – laktat oksidazom. Postupak je naveden u Eksperimentalnom dijelu. Za dodatnu zaštitu sloja korištena je 1% otopina kitozana. Zbog svog kiselog karaktera, kitozan je neutraliziran s NaOH ili u drugom slučaju sa otopinom amonijačnog pufera (pH = 9,915).

Snimljeni su ciklički voltamogrami u kojem svaki voltamogram odgovara sukcesivnom dodatku od po 100 μL laktata. Snimljena su dva grafa, jer je kitozan neutraliziran na dva načina. Volumeni su preračunati u koncentracije.



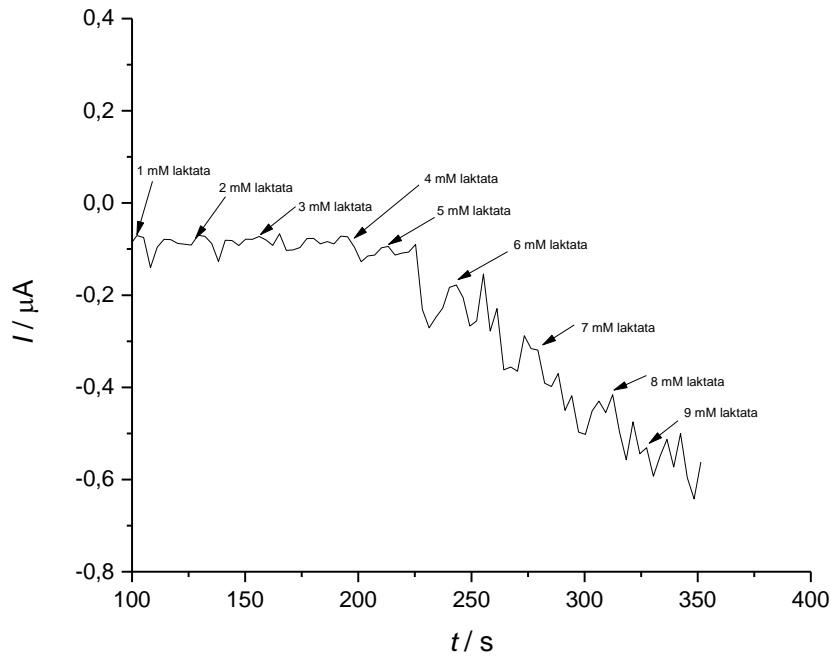
Slika 20. Odziv GC elektrode oslojene LOx i kitozanom, neutraliziranim amonijačnim puferom bez miješanja



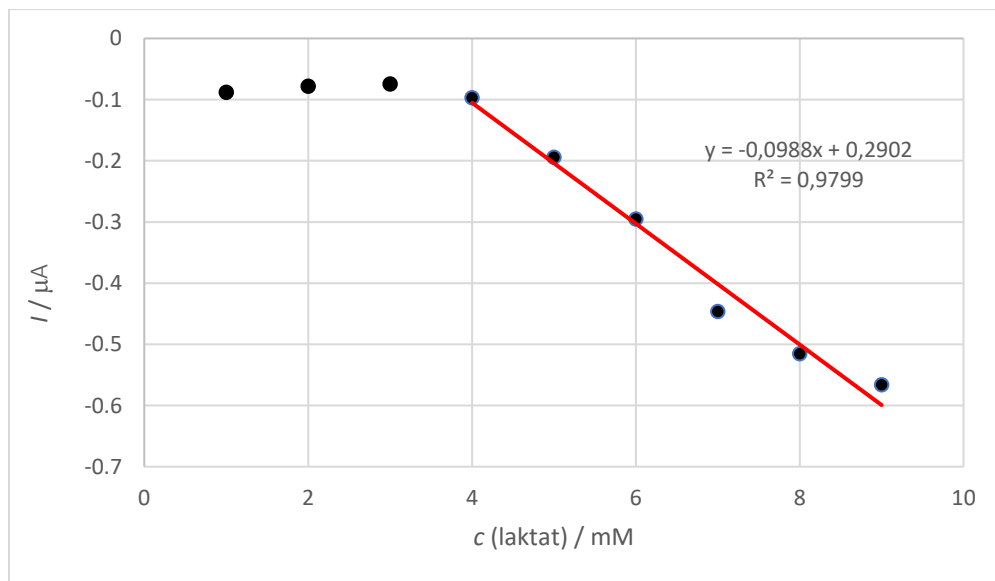
Slika 21. Odziv GC elektrode oslojene LOx i kitozanom, neutraliziranim NaOH bez miješanja

Vidljivo je da su kod GC elektrode u kojem je kitozan neutraliziran amonijačnim puferom struje oksidacije i redukcije izraženije, odnosno njihova vrijednost je oko $170 \mu\text{A}$ za anodne struje, a za katodne struje oko $170 \mu\text{A}$. Kada je kitozan sa GC elektrode neutraliziran s NaOH, struje su izrazito manje te se kreću od 6 do $10 \mu\text{A}$ za oksidaciju i od 10 do $15 \mu\text{A}$ za redukciju. Ni u jednom slučaju nije dobiven smislen odziv elektrode u ovisnosti o promjeni koncentracije laktata.

U fosfatnom puferu ($\text{pH} = 6,1$) dodavano je po $100 \mu\text{L}$ laktata svakih 30 sekundi, počevši od $100.$ sekunde zbog stabilizacije sustava te je sniman kronoamperometrijski prikaz. Kitozan je u ovom slučaju neutraliziran amonijačnim puferom.



Slika 22. Kronoamperometrijski odziv laktata u fosfatnom puferu (pH = 6,5) uz miješanje pri potencijalu od $-0,1$ V.

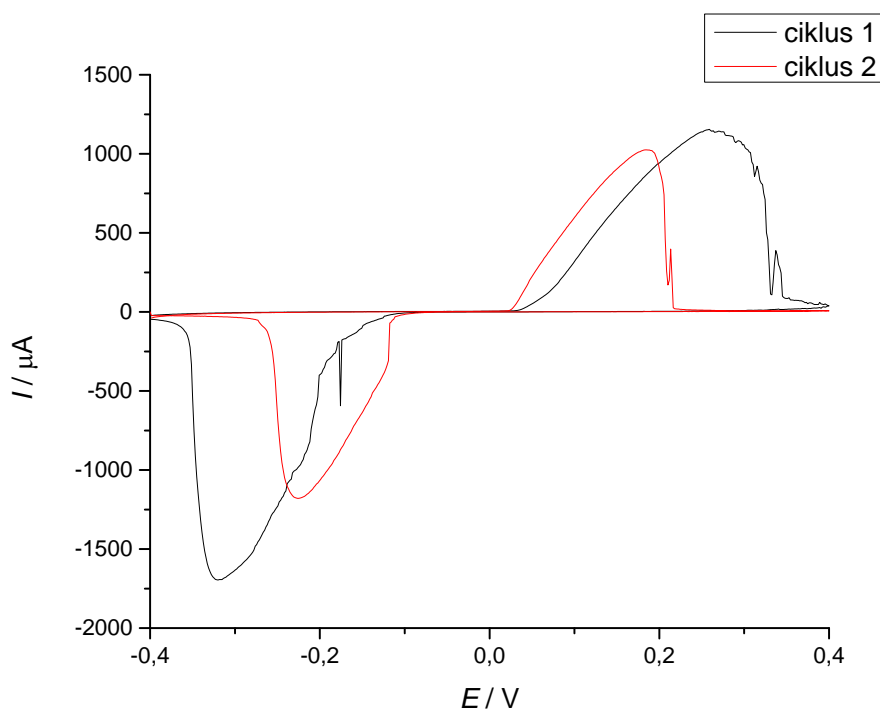


Slika 23. Grafički prikaz ovisnosti struje redukcije o koncentraciji laktata u fosfatnom puferu (pH = 6,5).

Baždarni dijagram na slici 23. konstruiran je očitavanje strujnog odziva iz kronoamperograma neposredno prije idućeg dodatka. Odziv na laktat je linearan ($R^2 = 0,9799$) u koncentracijskom području od 4 mM do 9 mM.

4.4. Primjena *ink-jet* ispisane elektrode

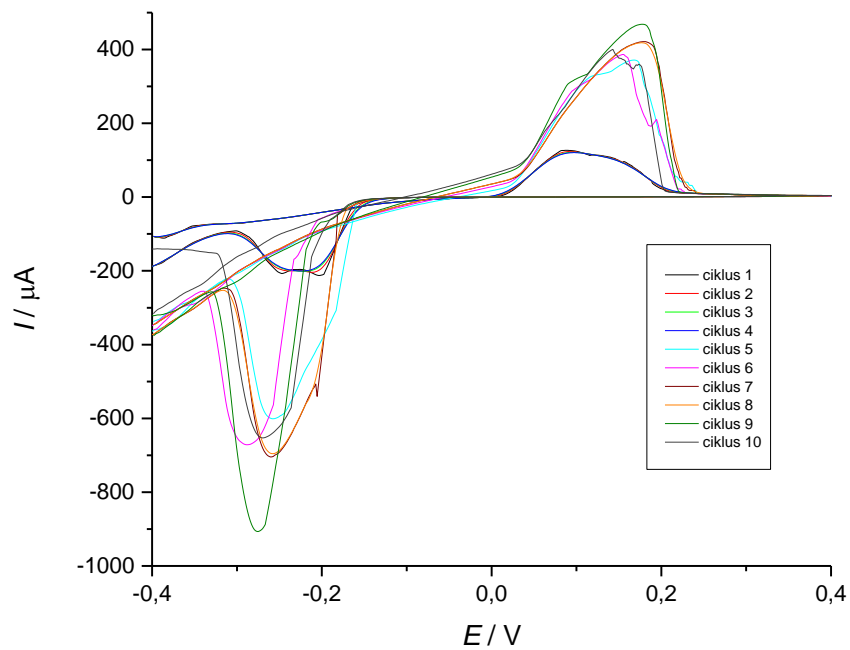
Voltametrijska mjerenja provedena su na *inkjet* ispisanoj radnoj elektrodi, odnosno ćeliji Ag|AgCl| 3M KCl||2M NaNO₃||Pt žica||plošna elektroda.



Slika 24. Odziv plošne elektrode u fosfatnom puferu (pH = 7,387).

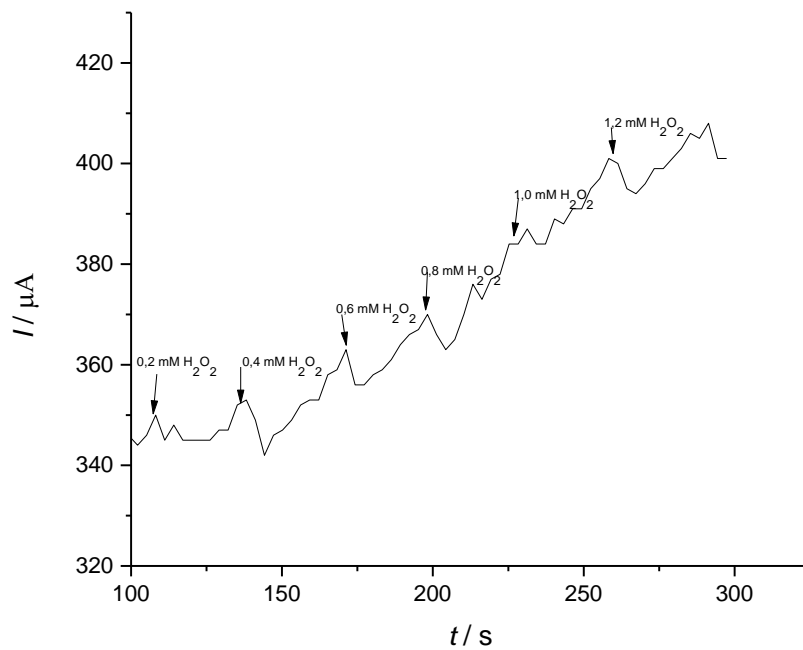
Ciklički voltamogram nije uobičajen jer je sloj srebra izložen oksidaciji i redukciji.

Radni dio plošne elektrode je oslojen slojem berlinskog modrila kako je navedeno. Na početku je potrebno aktivirati PB sloj u 0,1 M otopini KCl, 10 ciklusa pri navedenom potencijalu.

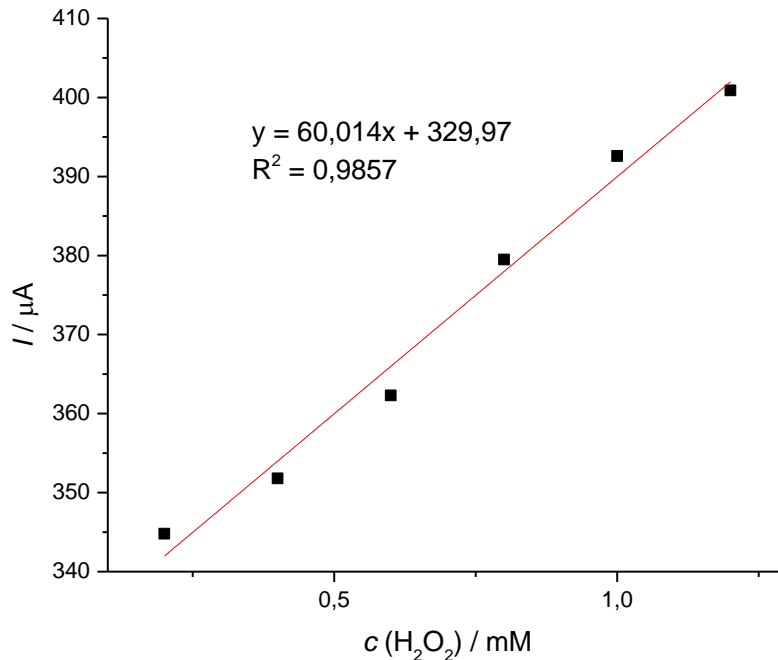


Slika 25. Aktivacija PB sloja na plošnoj elektrodi.

Nakon aktivacije, sniman je kronoamperogram u kojem je dodavano po 50 μL vodikovog peroksida bez miješanja. Dodano je ukupno 300 μL vodikovog peroksida krenuvši od 100. sekunde zbog stabilizacije. Svake 30. sekunde je dodan vodikov peroksid. Volumeni su izraženi kao koncentracije u legendi, a konstruiran je i baždarni dijagram.



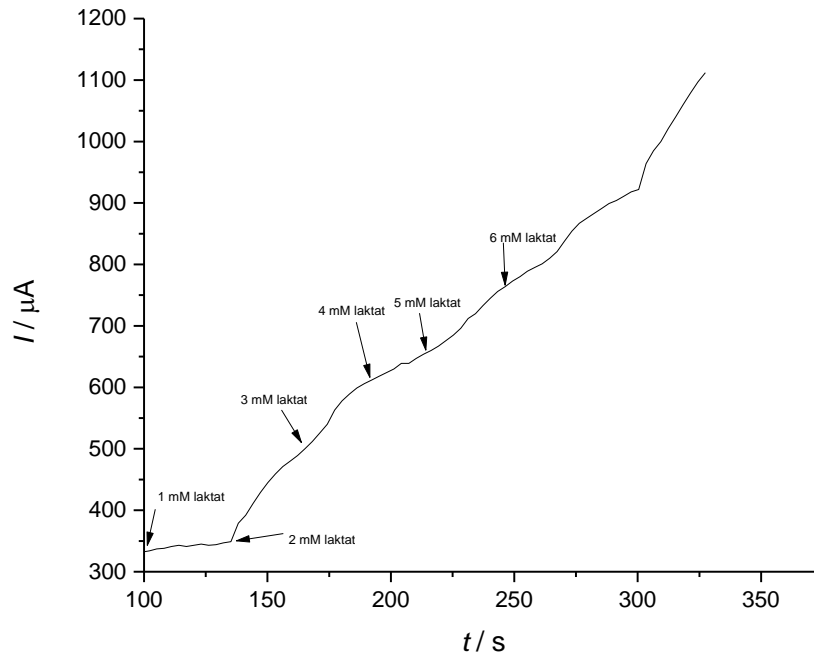
Slika 26. Kronoamperometrijski prikaz dodatka 0,1 M otopine H₂O₂ u fosfatni pufer (pH = 6,1) na plošnoj elektrodi uz miješanje pri potencijalu – 0,1 V.



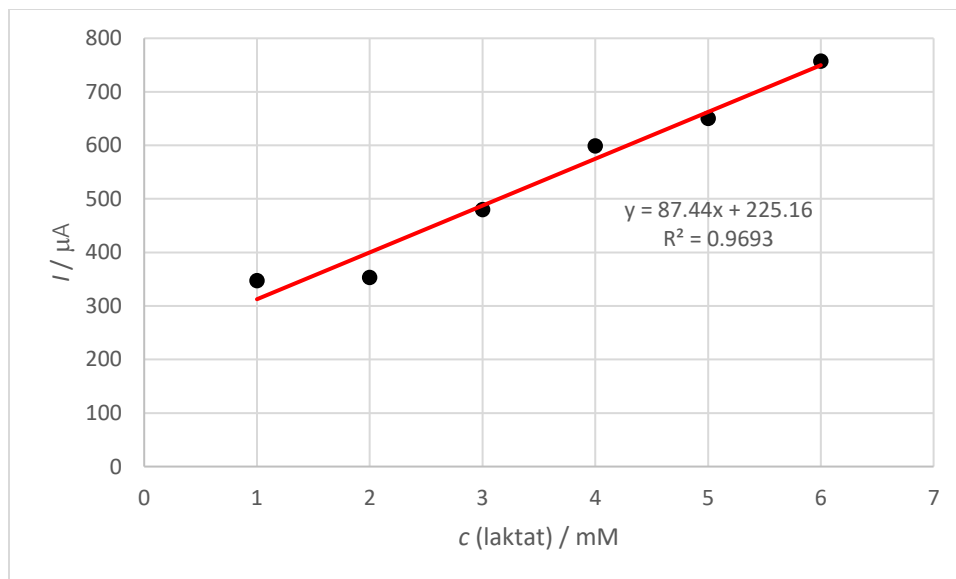
Slika 27. Grafički prikaz ovisnosti struje oksidacije o koncentraciji H_2O_2 u fosfatnom puferu (pH = 6,1).

Iz baždarnog dijagrama je vidljivo da struja raste s porastom koncentracije vodikovog peroksida te točke prate pravac. Graf je obrnut od onoga kod GC elektrode gdje pri navedenom potencijalu raste struja redukcije s porastom koncentracije H_2O_2 .

Radni dio elektrode je oslojen LOx kako je prethodno opisano. Nakon sušenja, sloj je ojačan kitozonom te neutraliziran amonijačnim puferom. Snimljen je graf kao kod GC elektrode u kojem je u fosfatni pufer (pH = 6,1) dodavano po 100 μL otopine laktata svakih 30 sekundi, počevši od 100. sekunde.



Slika 28. Kronoamperometrijski odziv laktata u fosfatnom puferu (pH = 6,1) na plošnoj elektrodi uz miješanje pri potencijalu od -0,1 V.



Slika 29. Grafički prikaz ovisnosti struje oksidacije o koncentraciji laktata u fosfatnom puferu (pH = 6,1).

S obzirom da neke skokovite promjena struje nema, vrlo je lako moguće da sloj berlinskog modrila nije aktiviran u otopini KCl-a.

Baždarni dijagram na slici 29. konstruiran je očitavanje strujnog odziva iz kronoamperograma neposredno prije idućeg dodatka. Iz baždarnog pravca vidi se linearan rast struje oksidacije u području koncentracije laktata od 1 mM do 6 mM. Međutim, s obzirom da nema skokovite promjene i da odziv nastavlja rasti i nakon prestanka dodavanja mliječne kiseline, potrebno je dodatno ispitati radi li se o odzivu na laktat ili nekom drugom procesu.

5. ZAKLJUČAK

Ispitana je primjena (bio)senzora za laktat korištenjem 3D elektrode i 2D elektrode. Obje vrste elektroda su modificirane. Modifikacija se činila oslojavanjem berlinskim modrilom i laktat oksidazom, koja je zbog sigurnosti povezana kitozanom. Kitozan je kiselog karaktera i neutraliziran je na 2 načina, pomoću otopine NaOH i amonijačnog pufera.

GC elektroda neoslojena nije davala odzive na struju u fosfatnom puferu i za mliječnu kiselinu, dok je redoks reakcija vodikovog peroksida ireverzibilna. Berlinsko modrilo je omogućilo određivanje vodikovog peroksida na malim potencijalima (- 0,1 V u odnosu na Ag/AgCl referentnu elektrodu) ^[18] te je uspjelo reducirati vodikov peroksid. Povećanjem koncentracije vodikovog peroksida, struja redukcije je linearno padala.

Oslojavanje GC elektrode s LOx dalo je dodatnu mogućnost određivanja laktata. Oksidacijom laktata dobije se produkt vodikov peroksid. Povećanjem koncentracije laktata u uzorku došlo je do porasta redukcijske struje biosenzora.

U slučaju plošne elektrode, odziv u fosfatnom puferu je postojao te je iznosio 1 mA za oksidaciju i oko 1 mA za redukciju. Oslojavanjem s berlinskim modrilom te snimanjem kronoamperograma dodavanjem vodikovog peroksida, dobiven je dijagram koji prikazuje da struja oksidacije raste s porastom koncentracije vodikovog peroksida. Dodavanjem sloja LOx, kitozana i neutralizacijom amonijačnim puferom je omogućeno snimanje kronoamperograma dodavanjem mliječne kiseline. Nije uočena skokovita promjena, ali dolazi do porasta oksidacijske struje s porastom koncentracije laktata.

6. POPIS SIMBOLA I KRATICA

A – površina / cm^2

E – električno potencijal / V

$E_{p,k}$ – potencijal vrha katodnog vala / V

$E_{p,a}$ – potencijal vrha anodnog vala / V

GCE – **engl.** *glassy carbon electrode*, disk elektroda od staklastog ugljika

$I_{p,k}$ – struja vrha katodnog vala / μA

$I_{p,a}$ – struja vrha anodnog vala / μA

LOx – laktat oksidaza

O – oksidirani oblik analita

PB – **engl.** *Prussian blue*, berlinsko modriilo

pH – negativni logaritam koncentracije vodikovih iona

R – reducirani oblik analita

ν – brzina promjene potencijala / mV s^{-1}

z – broj izmijenjenih elektrona

7. LITERATURA

- [1] Liu L., Zhang X.. *A Focused Review on the Flexible Wearable Sensors for Sports: From Kinematics to Physiologies*. *Micromachines* (Basel). 2022., 13(8), 1356.
- [2] Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F., Chemical sensors definitions and classification, *Pure & Appl. Chem*, 1991., 1247-1250.
- [3] Piljac, I., *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Media Print, 2010.
- [4] Hoovels, K. van, Xuan, X., Cuartero, M., Gijssel, M., Swaren, M., Crespo, G. A., *Can wearable sweat lactate sensors contribute to sport physiology?*, *ACS Senosrs*, 2021., 6 (10), 3496 – 3508.
- [5] Karyakin, A. A., Karyakina, E. E, *Prussian Blue-based 'artificial peroxidase' as a transducer for hydrogen peroxide detection. Application to biosensors*. *Sens. and Actuators B: Chem*, 1999. 57 (1-3), 268–273.
- [6] Vinoth, R., Nakagawa, T, Mathiyarasu, J., Mohan, A. V., *Fully printed wearable microfluidic devices for high-throughput sweat sampling and multiplexed electrochemical analysis*, *ACS Sensors*, 2021. 6 (3), 1174-1186.
- [7] Gao, W.; Emaminejad, S.; Nyein, H. Y. Y.; Challa, S.; Chen, K.; Peck, A.; Fahad, H. M.; Ota, H.; Shiraki, H.; Kiriya, D. *Fully integrated wearable sensor arrays for multiplexed in situ perspiration analysis*. *Nature* 2016, 529 (7587), 509– 514.
- [8] Jia, W., Bandodkar, A. J., Valdés-Ramírez, G., Windmiller, J. R., Yang, Z., Ramírez, J., Chan, G., Wang, J. *Electrochemical tattoo biosensors for real-time noninvasive lactate monitoring in human perspiration*. *Anal. Chem.* 2013, 85 (14), 6553– 6560.
- [9] Wang, R., Zhai, Q., An, T., Gong, S., Cheng, W. *Stretchable gold fiber-based wearable textile electrochemical biosensor for lactate monitoring in sweat*. *Talanta* 2021., 222, 121484.
- [10] Imani, S., Bandodkar, A. J., Mohan, A. V., Kumar, R., Yu, S., Wang, J., Mercier, P. P. *A wearable chemical–electrophysiological hybrid biosensing system for real-time health and fitness monitoring*. *Nat. Commun.* 2016., 7 (1), 11650.

- [11] Shitanda, I., Mitsumoto, M., Loew, N., Yoshihara, Y., Watanabe, H., Mikawa, T., Tsujimura, S., Itagaki, M., Motosuke, M. *Continuous sweat lactate monitoring system with integrated screen-printed MgO-templated carbon-lactate oxidase biosensor and microfluidic sweat collector. Electrochim. Acta*, 2021, 368, 137620.
- [12] https://www.researchgate.net/figure/a-Amperometric-current-versus-time-i-t-curve-for-the-detection-of-GSH-at_fig4_282897777 preuzeto 14.08.2023.
- [13] Ivanišević, I., *Sinteza i karakterizacija nanočestica srebra pogodnih za ispis tintnim pisačem*, Disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2020.
- [14] Raut, N. C., Al-Shamery, K., *Inkjet printing metals on flexible materials for plastic and paper electronics*, Royal society of chemistry, 2018.
- [15] Kralj, M., Krivačić, S., Ivanišević, I., Zubak, M., Subina, A., Marciuš, M., Halasz, I., Kassal, P., *Conductive inks based on melamine intercalated graphene nanosheets for inkjet printed flexible electronics*, *Nanonmaterials*, 2022., 12 (17), 2936.
- [16] McCreery, R. L., *Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry*, *Chem. Rev.*, 2008., 108 (7), 2646 – 2687.
- [17] Frenzel, N., Hartley, J., Frisch, G., *Voltametric and spectroscopic study of ferrocene and hexacyanoferrate and the suitability of their redox couples as internal standard in ionic liquids*, *Phys, Chem*, 2017., 19 (47), 28841 – 28852.
- [18] Cinti, S., Arduini, F., Moscone, D., Palleschi, G., Killard, A. J., *Development of a Hydrogen Peroxide Sensor Based on Screen-Printed Electrodes Modified with Inkjet-Printed Prussian Blue Nanoparticles*, *Sensors (Basel)*, 2014., 14 (8), 14222 – 14234.

