

Elektrokemijska karakterizacija slojeva berlinskog modrila na ugljičnim elektrodama

Molnar, Andrej

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:149:428705>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Andrej Molnar

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidat Andrej Molnar

Predao je izrađen završni rad dana: 13. rujna 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Izv. prof. dr. sc. Petar Kassal, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
prof. dr. sc. Marijana Kraljić Roković, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
izv. prof. dr. sc. Igor Dejanović, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
prof. dr. sc. Šime Ukić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 18. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ
PRIMIJEJENA KEMIJA

Andrej Molnar

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA SLOJEVA
BERLINSKOG MODRILA NA UGLJIČNIM ELEKTRODAMA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj završnog rada: izv. prof. dr. sc. Petar Kassal

Članovi povjerenstva: Izv. prof. dr. sc. Petar Kassal

Prof. dr. sc. Marijana Kraljić Roković

Izv. prof. dr. sc. Igor Dejanović



Ovaj rad financirala je Hrvatska zaklada za znanost kroz projekt UIP-2020-02-9139.

SAŽETAK

Biosenzori su korišteni dugi niz godina za određivanje koncentracije biomolekula. Najčešća izvedba biosenzora sadrži enzim oksidazu. Oksidaza oksidira supstrat, pri čemu nastaje oksidirani oblik supstrata i vodikov peroksid, kao sporedni produkt. Mjerenjem koncentracije vodikovog peroksida moguće je dobiti informacije o koncentraciji biomolekule. Pri tome koristimo berlinsko modrilo, koje je medijator koji selektivno katalizira redukciju vodikovog peroksida pri potencijalima bliskim 0,0 V prema Ag/AgCl elektrodi i pri tome ga detektira.

U ovom radu, berlinsko modrilo nanoseno je kemijskom depozicijom, koja je spontana reakcija FeCl_3 i $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, na konvencionalnu elektrodu od staklastog ugljika, komercijalnu sitotiskanu elektrodu i *inkjet* ispisanu grafensku elektrodu tijekom različitih vremena depozicije. Deponirani sloj berlinskog modrila elektrokemijski je karakteriziran cikličkom voltametrijom u KCl te u fosfatnim puferima, te je ispitana pH-ovisnost odziva. Nakon provedenih cikličkih voltometrija, na ispisanim elektrodama je provedena kronoamperometrijska detekcija otopina vodikovog peroksida različitih koncentracija kako bi se provjerila funkcionalnost potencijalnih biosenzora. Cilj rada bio je odrediti optimalne uvjete depozicije berlinskog modrila za korištenje u biosenzorima.

ABSTRACT

Biosensors have been used for many years to determine the concentration of biomolecules. The most used configuration of biosensors is that involving the use of oxidase enzymes. Oxidase enzymes oxidize the substrate and produce an oxidized form of the substrate and hydrogen peroxide as a side product. The measurement of H_2O_2 concentration can provide information about the concentration of the target analyte. That is the reason why Prussian Blue is used, because it is a mediator that can selectively catalyze the reduction of hydrogen peroxide at an applied potential around 0,0 V vs Ag/AgCl and that way it can detect hydrogen peroxide.

In this work, Prussian Blue was deposited chemically, by mixing FeCl_3 and $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and drop casting the reaction mixture on a conventional glassy carbon electrode, commercial carbon-based screen-printed electrodes and in-house inkjet printed graphene electrodes with different times of deposition. Chemically deposited Prussian Blue layers were characterized electrochemically via cyclic voltammetry in KCl and phosphate buffers and the pH-response was evaluated. After recording cyclic voltamograms, chronoamperometric detection of hydrogen peroxide was conducted on printed electrodes to check the functionality of deposited layers. The goal of this work was to find optimal deposition conditions for biosensing applications.

SADRŽAJ

Contents

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Kemijski senzori	2
2.1.1 Elektrokemijski senzori	3
2.1.2. Biosenzori.....	5
2.2. Berlinsko modrilo	8
2.2.1 Struktura i svojstva	9
2.2.2. Primjena berlinskog modrila kao medijatora	12
2.3. Elektrokemijske metode	14
2.3.1 Ciklička voltometrija.....	15
2.3.2. Kronoamperometrija.....	18
2.4. <i>Inkjet</i> ispis	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1 Kemikalije.....	23
3.2. Aparatura	24
3.3. Priprema otopina.....	25
3.4. Priprema elektroda	25
3.5 Karakterizacija elektrode.....	26
3.5.1 Ciklička voltometrija	28
3.5.2. Amperometrijska detekcija vodikovog peroksida.....	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. Elektrokemijska karakterizacija cikličkom voltametrijom.....	30
4.1.1 Elektroda od staklastog ugljika (GC elektroda)	30
4.1.2. Komercijalna sitotiskana elektroda	38
4.1.3. <i>Inkjet</i> ispisane elektrode	47
4.2. Amperometrijska detekcija vodikovog peroksida	57
4.2.1. Komercijalne sitotiskane elektrode	57
4.2.2. <i>Inkjet</i> ispisane elektrode	62
ZAKLJUČAK.....	66

POPIS SIMBOLA.....	67
LITERATURA.....	68

1. UVOD

Istraživanje i razvoj jednostavnih, malih nosivih biosenzora posljednjih je godina privuklo pažnju mnogih kemičara. Biosenzori služe za određivanje koncentracije biomolekula, npr. glukoze, laktata, antitijela itd. Najčešće biosenzori sadrže enzim oksidazu, koja oksidira biomolekule i proizvodi vodikov peroksid kao sporedni produkt. Amperometrijski biosenzori detektiraju vodikov peroksid, pri čemu je problem što se za to koristi visoki prenapon (0,6 V prema Ag/AgCl elektrodi) pri čemu oksidiraju i druge biomolekule u realnim uzorcima i stvaraju interferencije. Taj se problem pokušao riješiti membranama, no onda je prisutan problem difuzije vodikovog peroksida. Potom se probalo riješiti djelovanjem hren peroksidaze koja katalizira redukciju H_2O_2 , no ona je skupa i nestabilna. U zadnjih nekoliko desetljeća otkriva se korištenje medijatora koji ubrzavaju prijenos elektrona između elektrode i otopine, ali pri potencijalima oko 0 V prema Ag/AgCl elektrodi. Jedan od njih je i berlinsko modrilo koje katalizira redukciju vodikovog peroksida [1].

U okviru ovog rada, obrađena je kemijska depozicija berlinskog modrila na različite elektrode pri različitim vremenima depozicije. Elektrode su elektrokemijski karakterizirane i testirane kako bi se vidjela svojstva potencijalnih biosenzora. Korištenjem berlinskog modrila, smanjena je mogućnost detekcije interferencija jer se mjerenja odvijaju pri nižim potencijalima te je povećana selektivnost za detekciju vodikovog peroksida. Cilj je dobiti funkcionalan biosenzor sa što većom linearnosti, što nižom granicom detekcije, što većom osjetljivošću i što boljom stabilnošću. Tu nailaze problemi poput optimalne debljine sloja, kvalitete sloja, slabije stabilnosti u lužnatom itd.

2. OPĆI DIO

2.1. Kemijski senzori

Kemijski senzor je uređaj koji pretvara kemijsku informaciju, u rasponu od pojedine komponente uzorka sve do ukupnog sastava uzorka, u analitički rezultat. To je uređaj kojim se utvrđuje postojanje (kvalitativno) i koncentracija (kvantitativno) analita u uzorku. Kemijska informacija može biti posljedica kemijske reakcije ili fizikalnog svojstva analita.

Svaki senzor čine dva osnovna dijela: receptor i pretvornik. Receptor pretvara kemijsku informaciju u oblik energije koju pretvornik pretvara u analitičku informaciju i nije selektivan na analit. Ovisno o vrsti receptora, kemijski senzori se mogu podijeliti u više vrsta:

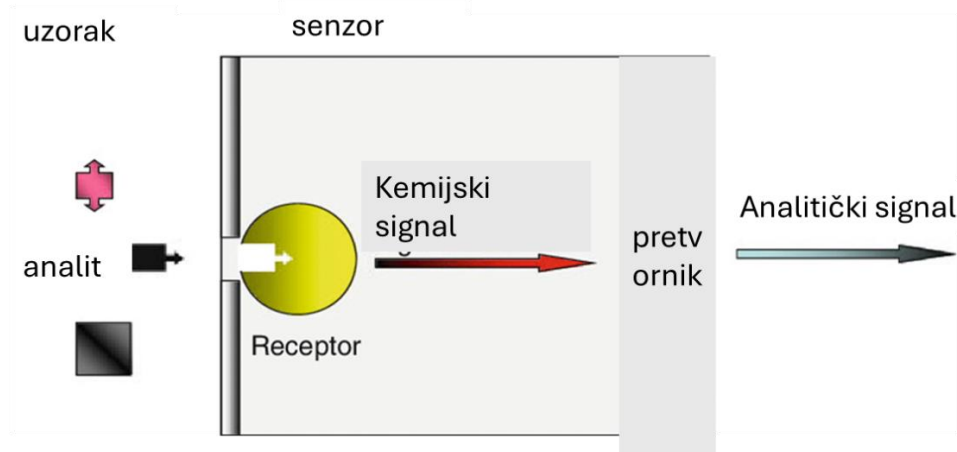
- 1) **fizikalni** kojem je signal posljedica promjene fizikalnih svojstava (vodljivost, apsorpcija, indeks loma itd.),
- 2) **kemijski** kojem signal nastaje uslijed kemijske reakcije analita,
- 3) **biokemijski** kojem je izvor analitičkog signala biokemijski proces.

Biokemijski senzor se naziva i biosenzor.

Osim različitih vrsta receptora, moguća je i primjena različitih vrsta pretvornika. Prema vrsti pretvornika, kemijski senzori se dijele na:

- 1) **optičke**: prevode optičke promjene (koje su posljedice interakcije analita i receptora) u signal;
 - 2) **elektrokemijske**: pretvaraju elektrokemijsku interakciju analita s površinom elektrode u koristan signal;
 - 3) **električne**: nema elektrokemijske reakcije, već je signal posljedica promjene u električnim svojstvima;
 - 4) **masene**: detektiraju promjenu mase nastale akumulacijom analita na površini i pretvaraju u signal;
 - 5) **magnetske** koji mjere promjenu paramagnetskih svojstava plina;
 - 6) **termometrijske** koji mjere promjenu topline uslijed kemijske reakcije ili adsorpciju analita.
- Senzori se mogu kombinirati tako da imaju višestruku funkciju.

Karakteristike idealnog kemijskog senzora su: osjetljivost u interesnom koncentracijskom području, selektivnost za ciljani analit, široko dinamičko područje, linearnost, brz odziv, jeftina izrada, mala veličina itd. [2].



Slika 1. Shema rada kemijskog senzora [21].

2.1.1 Elektrokemijski senzori

Elektrokemijski senzori se temelje na elektrokemijskoj interakciji analita i elektrode, pretvarajući ju u koristan električni signal. Kada se elektrokemijska reakcija analita i aktivne tvari senzora odvija spontano, nastaje razlika potencijala koja se mjeri potenciometrijskim senzorom. Kada se pak reakcija odvija uz vanjsku pobudu, koriste se amperometrijski senzori kojima mjerimo jakost struje, u ovisnosti o narinutom naponu [5]. Elektrokemijski senzori dijele se na **amperometrijske, potenciometrijske i konduktometrijske**. Sve elektroanalitičke metode provode se u elektrokemijskoj ćeliji, koja se, u dvoelektrodnom sustavu sastoji od radne elektrode (na kojoj se odvija reakcija) i protuelektrode (služi za zatvaranje strujnog kruga). Sve se češće mjerenja provode u troelektrodnom sustavu u kojoj je prisutna i referentna elektrode (služi za mjerenje potencijala). Troelektrodni sustav je praktičniji budući da protuelektroda ne mora imati konstantan potencijal, a potreban je pri mjerenjima kako bi se odredio potencijal radne elektrode [4].

Elektrokemijski senzori prevode signal pobude u odzivni signal, a shema rada elektrokemijskog senzora prikazana je na slici 2. Signali pobude u elektrokemijskom senzoru mogu biti:

a) **električne veličine**: električni napon, električna struja i električni naboj;

b) **kemijske veličine:** promjena koncentracije, promjena molekulske vrste;

c) **elektromagnetsko zračenje**

d) **temperatura.**

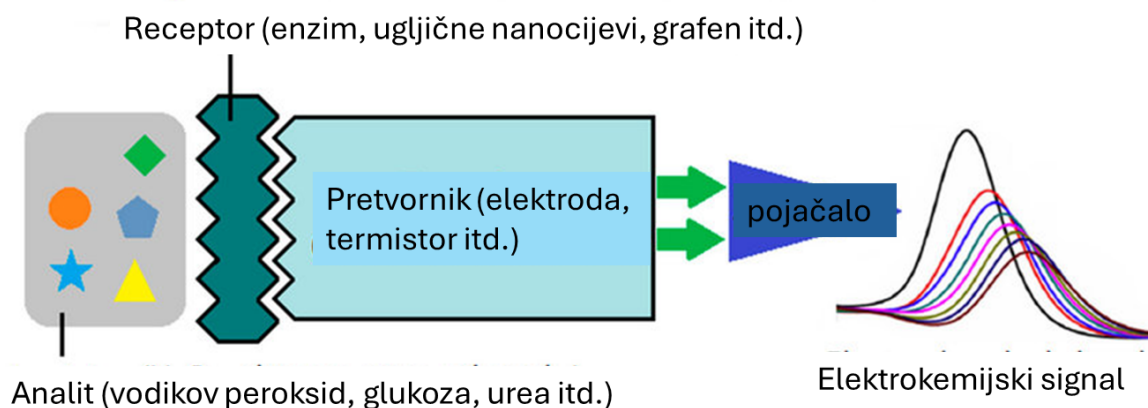
Signali odziva su:

a) **električne veličine:** električna struja, električni napon, električni naboj te frekvencija te

b) **kemijske veličine:** masa izlučene tvari te volumen [2].

Budući da su elektrode mjesta na kojima se odvija elektrokemijska reakcija, one se često modificiraju katalizatorima, membranama, a čak i drugim metalima kako bi bile osjetljivije i selektivnije na analit u uzorku.

Elektrokemijski senzori imaju prednosti zbog visoke osjetljivosti, niske granice detekcije, širokog dinamičkog područja, brzog analitičkog odgovora... No, ima i nedostataka, zbog kojih se još uvijek istražuju. Neki od nedostataka elektrokemijskih senzora su: skidanje senzorskog materijala u realnim uzorcima, ograničena selektivnost, zagađenje površine senzora u uzorcima i sl. [3].



Slika 2. Shema rada elektrokemijskog senzora [22].

2.1.2. Biosenzori

Biosenzori čine podgrupu kemijskih senzora gdje je biokemijska reakcija izvor analitičkog signala. Cilj biosenzora je biološki proizvesti električni signal kojim možemo dobiti informacije o koncentraciji biomolekule. Oni sadrže biološki senzorski element (mikroorganizmi, enzimi, nukleinske kiseline, antitijela itd.) koji se povezuje s pretvornikom koji pretvara biokemijsku reakciju analita u mjerljivu veličinu. Analit se povezuje sa biološkim materijalom te nastaje vezani analit koji stvara električni odziv koji se može mjeriti [7].

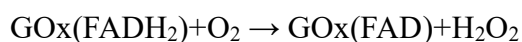
Biosenzori se dijele na tri generacije. U onima prve generacije produkt nastao reakcijom difundira do pretvornika koji pretvara signal reakcije u električni signal. Biosenzori druge generacije uključuju specifične posrednike (medijatore) između reakcije i pretvornika kako bi se poboljšao odziv, dok u biosenzorima treće generacije sama reakcija daje odziv te nije potreban posrednik, niti difuzija produkta do pretvornika. Kao i u elektrokemijskim sensorima, pretvornici u biosenzorima mogu biti amperometrijski (mjeri se struja) ili potenciometrijski (mjeri se razlika potencijala)[14].

Biosenzori se najčešće rade tako da se na elektrodu nanese sloj enzima oksidaze, koja oksidira supstrat, pri čemu nastaju oksidirani oblik biomolekule i vodikov peroksid kao drugi produkt. Biosenzori temeljeni na enzimima se dijele na tri generacije:

Prva generacija enzimatskih biosenzora se bazira na korištenju prirodnog kofaktora kisika. Na elektrodu je nanesen enzim koji oksidira biomolekulu, pri čemu se flavinska grupa u enzimu (FAD) reducira u FADH₂, a biomolekula se oksidira. Reakcija oksidacija glukoze uz primjenu enzima glukoza oksidaze je sljedeća:



Enzim se nakon toga vraća u početno stanje oksidacijom, a nastaje i vodikov peroksid redukcijom kisika:



Vodikov peroksid se oksidira na potencijalima oko 0,6 V prema Ag/AgCl elektrodi te se tako detektira, no problem je što pri tim potencijalima oksidiraju i druge molekule u realnim uzorcima (poput askorbinske kiseline, uree Stoga je cilj povećati selektivnost, a i osjetljivost senzora za detekciju peroksida. Selektivnost se može povećati korištenjem selektivnih membrana, elektropolimeriziranih filmova, filmova celuloze... Osim toga, može se povećati i

smanjenjem prenapona detekcije vodikovog peroksida na oko 0,0 V. To se postiže korištenjem npr. berlinskog modrila, koji katalizira redukciju vodikovog peroksida na oko 0,0 V prema Ag/AgCl elektrodi, čime je povećana i selektivnost i osjetljivost. Budući da biosenzori ovise o koncentraciji kisika u sustavu, on mora biti konstantan pri mjerenju, što je teško postići. Stoga se koriste medijatori (od kojih je jedan i berlinsko modrilo), koji dopuštaju enzimsku reakciju neovisno o kisiku.

Druga generacija enzimatskih biosenzora uključuje korištenje medijatora, koji zamjenjuju kisik te služe kao nefiziološki akceptor elektrona koji prenosi elektrone sa redoks središta enzima do elektrode. Prijenos elektrona od enzima oksidaze do elektrode i jest limitirajući faktor u biosenzorima, a poboljšan je nanošenjem medijatora na površinu elektrode. Osim toga, mjerenje vodikovog peroksida se može provoditi pri nižim potencijalima pri kojima se ne detektiraju interferencije. Reakcije koje se događaju na elektrodi su:

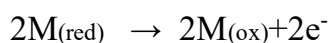
1. Biomolekula (u ovom slučaju glukoza) se oksidira djelovanjem enzima oksidaze



2. Reducirani oblik enzima se nazad oksidira djelovanjem medijatora, a ne kisika kao prije. Pri tome se medijator reducira

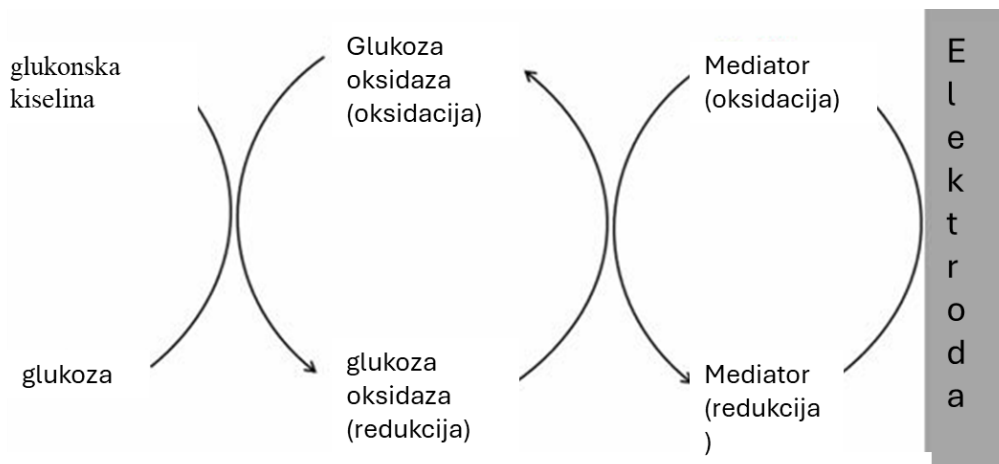


3. Reducirani oblik medijatora se vraća u početni, oksidirani oblik

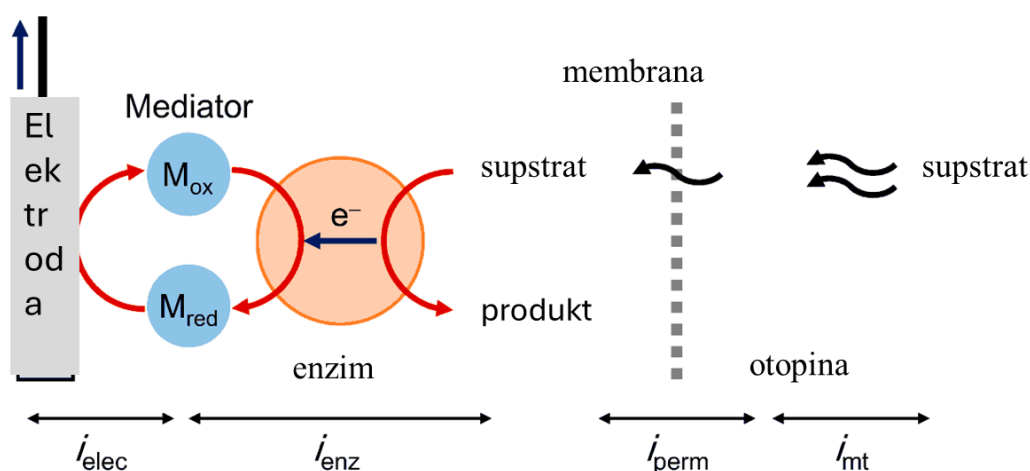


Tijekom treće reakcije (oksidacije medijatora), nastaje signal struje koji je proporcionalan koncentraciji biomolekule (u ovom slučaju glukoze). Shema djelovanja medijatora u biosenzorima prikazan je na slikama 3 i 4.

Elektronski medijatori korišteni u drugoj generaciji enzimatskih biosenzora su heksacijanoferati, vodljive organske soli, kompleksi prijelaznih metala... Svojstva koja medijator mora imati da bi bio korišten su brza reakcija sa reduciranim oblikom enzima, slaba topljivost u vodenim medijima, dobra elektrokemijska svojstva kako bi se mogao senzor koristiti u amperometrijskim mjerenjima, kemijska stabilnost. No, čak i kad je prisutan medijator, reakcija oksidacije reduciranog oblika enzima s kisikom nije u potpunosti svedena na nulu.



Slika 3: Mehanizam djelovanja medijatora na transport elektrona u biosenzoru glukoze [23].



Slika 4. Mehanizam djelovanja medijatora na transport elektrona u enzimatskim biosenzorima [24].

Električni kontakt između enzima i elektrode je poboljšán korištenjem dugačkih, fleksibilnih, hidrofilnih polimera, poput polivinilpirolidona. Oni rezultiraju višim strujama, stabiliziranjem medijatora na površinu elektrode. Također se razvijaju i nanomaterijali za povezivanje enzima i elektrode. Neki od njih su nanočestice zlata i ugljične nanocijevi koje značajno ubrzavaju transport elektrona u reakcijama.

Treća generacija enzimatskih biosenzora ne sadrži medijator, već se elektron direktno prenosi sa aktivnog mjesta enzima na elektrodu (nema niti kisika koji prenosi elektrone kao u prvoj generaciji biosenzora, a nema ni medijatora kao u drugoj generaciji biosenzora koji prenosi elektrone). Funkcionira za mali broj redoks sustava i mali broj elektroda te se razvijaju

elektrode na kojima bi se elektroni mogli efikasno prenijeti sa aktivnog mjesta enzima na elektrodu [6].

2.2. Berlinsko modrilo

Budući da je berlinsko modrilo (BM) najčešće korišteni elektrokemijski medijator za prijenos elektrona, često se koristi u biosenzorima. Berlinsko modrilo je zapravo željezov(III) heksacijanoferat(II), $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$. Fe^{2+} ion je okružen ugljikovim, a Fe^{3+} dušikovim atomima, i to oktaedarski. Može se pripremiti kemijskom depozicijom, odnosno izravnim miješanjem željezovih(III) i heksacijanoferatnih(II) iona, a rjeđe i miješanjem željezovih(II) i heksacijanoferatnih(III) iona. Elektrokemijski se može prirediti redukcijom otopine heksacijanoferata(III). Kristalizira u plošno centriranoj kubičnoj rešetki, u kojoj se naizmjenično raspoređuju Fe^{2+} i Fe^{3+} ioni. Budući da je nukleacija vrlo brza, a sintezom nastaju vrlo sitne čestice koloidnih dimenzija, stehiometrija berlinskog modrila ovisi o uvjetima sinteze[8]. U krutom stanju je kristaličan prah plave boje, kao što je prikazano na slici 5.

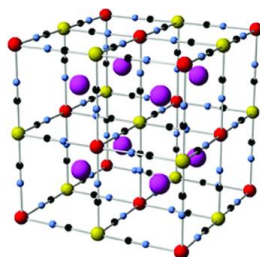


Slika 5: berlinsko modrilo [25].

2.2.1 Struktura i svojstva

1978. godine Neff je otkrio elektrokemijsko ponašanje berlinskog modrila, deponirao ga na elektrodu od platine i okarakterizirao. Cikličkom voltametrijom otkriveno je više oblika BM, čime je objašnjena i njegova struktura i elektrokemijska aktivnost.

Itaya je 1984. godine pokazao da reducirani oblik BM (berlinsko bijelo, BB) pokazuje katalitičku aktivnost za redukciju vodikovog peroksida, zbog čega se primjenjuje u biosenzorima baziranim na enzimu oksidaze. Oksidirani oblik BM (berlinsko zeleno, BZ) pokazuje katalitička svojstva za oksidaciju H_2O_2 . Katalitička svojstva berlinskog modrila su pripisana njegovoj specifičnoj strukturi. Kristalizira u plošno centriranoj kubičnoj rešetki, s duljinom brida jedinične ćelije $10,2 \text{ \AA}$ i promjerom kanala oko $3,2 \text{ \AA}$ koji omogućuje difuziju molekula malih molekulskih masa (poput O_2 i H_2O_2) u rešetku BM. Difrakcijskom analizom, Ludi i Gudel su otkrili da svaka jedinična ćelija u strukturi sadrži osam nekoordiniranih molekula vode, a u centar praznine ulaze molekule H_2O_2 , pri čemu je svaka molekula okružena sa četiri Fe^{2+} iona, pri čemu se reakcija redukcije H_2O_2 odvija preko četiri elektrona.



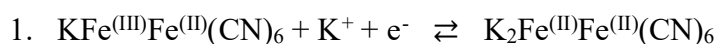
Slika 6: Kubična rešetka berlinskog modrila [26].

Keggin i Miles prvi su opisali strukturu BM te su na temelju rendgenske difrakcijske analize otkrili postojanje dvije forme modrila: topljiva i netopljiva forma. Riječi topljiva i netopljiva ne odnose se na topljivost u vodi, već na lakoću kojom kalijevi ioni ulaze u rešetku. Obje forme BM su vrlo netopljive u vodi ($K_{sp}=10^{-40}$), no topljiva forma lakše prima kalijeve ione u rešetku. Topljiva forma ima kubičnu strukturu u kojoj su Fe^{2+} i Fe^{3+} ioni u plošno centriranoj jediničnoj ćeliji, u kojoj su Fe^{2+} ioni okruženi ugljikovim atomima, a Fe^{3+} su oktaedrijski okruženi dušicima. Netopljiva forma se razlikuje od topljive jer sadrži višak Fe^{3+} iona koji zamjenjuju kalijeve ione.

Ludi je predložio drugačiju strukturu netopljive forme. Utvrdio je da je struktura neuređena s $1/4$ nezaposjednutih mjesta heksacijanoferata(II), $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Dokazana je i prisutnost 14-16

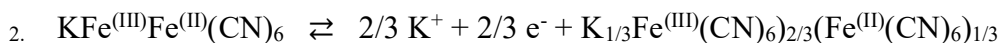
molekula vode po jediničnoj ćeliji, a ne 8 kao što se prije tvrdilo. Dio molekula vode zauzima prazna mjesta dušika u prazninama heksacijanoferata(II), dok ostale molekule zauzimaju intersticije i zapravo su nekoordinirane. Osim toga, Fe³⁺ ioni nisu bili pronađeni u intersticijama.

Međutim, i dalje se ne zna točna struktura BM, budući da je prilično komplicirana za određivanje. Nije sigurno ni koja forma modrila se deponira na elektrodi. Prvo se smatralo da topljiva forma modrila reagira na elektrodi, po reakcijama redukcije (1.) i oksidacije (2.):



topljivo berlinsko modrilo

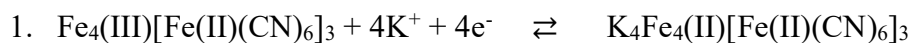
berlinsko bijelo



Topljivo berlinsko modrilo

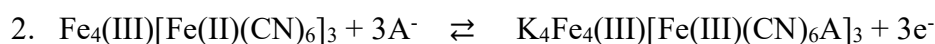
berlinsko zeleno

Itaya je vidio da modrilo na elektrodi nije sadržavalo kalijeve ione, čime je zaključio da je na elektrodi prisutan netopljivi oblik BM. Predložene reakcije redukcije (1.) i oksidacije (2.) netopljivog oblika su:



Netopljivo berlinsko modrilo

berlinsko bijelo



Netopljivo berlinsko modrilo

berlinsko zeleno

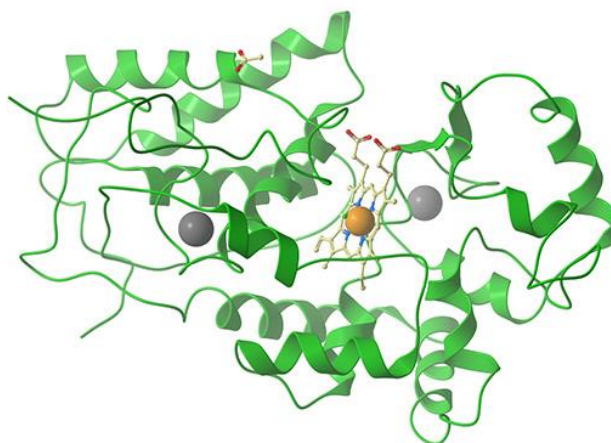
Međutim, nije sigurno ni je li netopljiva forma prisutna na elektrodi, budući da prisutnost kalijevih iona u rešetci berlinskog modrila povećava elektroaktivnost, kao i prisutnost Rb⁺, Cs⁺ i NH₄⁺ iona [9].

Berlinsko modrilo još je uvijek tema istraživanja, budući da nema jednaku stabilnost i aktivnost u različitim pH (manje je stabilan i aktivan u lužnatom) koje ovise o načinu pripreve. Manja stabilnost u lužnatom objašnjava se viškom OH⁻ iona, koji imaju jaku interakciju sa Fe³⁺ ionima, pri čemu se stvara Fe(OH)₃, Fe-CN veze u BM se kidaju, a sloj se otapa. Različite

metode depozicije uzrokuju različitu dostupnost Fe^{3+} iona da reagiraju, budući da različitim metodama depozicije nastaju trodimenzijske strukture modrila. Kemijskom depozicijom na elektrodi nastaje stabilniji sloj, koji se može koristiti i u biosenzorima koji sadrže enzime sa optimalnim radom u lužnatom pH (npr. kolin oksidaza). Kemijskom depozicijom na elektrodi nastaje više slojeva topljive forme modrila koja je stabilnija od netopljive koja nastaje elektrokemijskom depozicijom. No, tijekom ciklizacije topljivi sloj se pretvara u netopljivi... Još uvijek se ne može sa sigurnošću objasniti zašto je kemijskom depozicijom sloj stabilniji. Korištenje raznih polimera, poput polianilina, poli(*o*-fenilendiamina) i drugih također stabiliziraju sloj, kao i korištenje tetrabutylamonijevog toluen-4-sulfonata u otopini [10].

2.2.2. Primjena berlinskog modrila kao medijatora

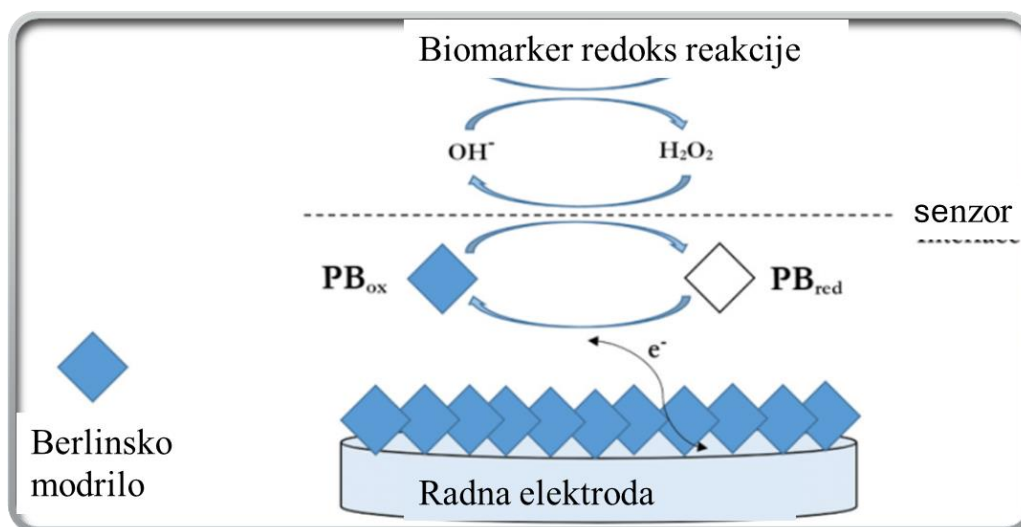
Problem detekcije vodikovog peroksida tema je istraživanja mnogih kemičara koji se bave istraživanjem biosenzora, budući da je on produkt reakcija kataliziranih enzimom oksidaze te je njegova koncentracija direktno proporcionalna koncentraciji substrata. U biosenzorima prve generacije, za detekciju vodikovog peroksida, koristila se oksidacija vodikovog peroksida pri potencijalima oko 0,6 V prema Ag/AgCl referentnoj elektrodi, a za to su bile korištene konvencionalne elektrode. Međutim, i druge biomolekule prisutne u realnim otopinama bile bi oksidirane pri tim potencijalima (bilirubin, urea, askorbinska kiselina itd.) čime je smanjena osjetljivost i selektivnost biosenzora. Prvo rješenje bilo je korištenje membrane koja bi uklonila interferencije. Međutim, time je smanjena difuzija vodikovog peroksida do elektrode, a uz to je i način pripreve kompliciran. Taj problem riješen je korištenjem hren peroksidaze, koja selektivno katalizira redukciju vodikovog peroksida. No, peroksidaza, iako je selektivna i precizna, ima negativne strane jer je skupa, nestabilna i loše prijanja na čvrste podloge [9].



Slika 7: Hren peroksidaza koja katalizira redukciju H_2O_2 [27].

Kako bi se osigurao put prijenosa elektrona između aktivnog mjesta enzima i elektrode, koriste se imobilizirani medijatori na elektrodi (druga generacija biosenzora). Time je povećana selektivnost detekcije vodikovog peroksida, a mjerenja se mogu provoditi pri nižim potencijalima pri kojima se ne detektiraju interferencije [11]. Berlinsko modriilo već se duže vrijeme istražuje u području elektrokemijskih biosenzora, budući da ima sposobnost selektivnog kataliziranja redukcije vodikovog peroksida. Zbog toga se naziva i umjetna

peroksidaza. Reducirani oblik berlinskog modrila (berlinsko bijelo) se na elektrodi oksidira u berlinsko modrilo, pri čemu se vodikov peroksid reducira u hidroksidne ione. Mehanizam toga prikazan je na slici 8.

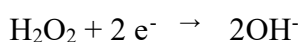


Slika 8: Shema reakcija, koje se odvijaju na elektrodi modificiranoj slojem berlinskog modrila, tijekom detekcije H_2O_2 [28].



berlinsko bijelo

netopljivo berlinsko modrilo



Gornje reakcije prikazuju reakcije koje se odvijaju djelovanjem berlinskog modrila kao medijatora. Berlinsko bijelo se oksidira u berlinsko modrilo, a vodikov peroksid se reducira u OH^- ione.

Prva elektroda modificirana berlinskim modrilom bila je elektroda od ugljične paste, testirana prvi put 1990. godine. Karyakin je 1994. godine otkrio da je katalitička aktivnost berlinskog modrila 100 puta veća za vodikov peroksid, nego za kisik. Konstanta brzine redukcije vodikovog peroksida uz prisutnost sloja modrila na elektrodi, bila je $3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, što je slično kao i konstanta djelovanja peroksidaze ($2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Selektivnost berlinskog modrila prema vodikovom peroksidu objašnjena je strukturom modrila, koja prima u sebe molekule male molekulske mase.

Do sada, berlinsko modriilo je bilo testirano na većinu konvencionalnih elektroda: staklasti ugljik, grafit, ugljična pasta, platina, zlato itd. Također je bila testirana i na sitotiskane elektrode, elektrode temeljene na nanocijevima ugljika. Od konvencionalnih elektroda, na elektrodi od staklastog ugljika pokazana je najveća osjetljivost u dosadašnjim mjerenjima ($1 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^2$), kao i najniža granica detekcije (10^{-8} M), dok je na sitotiskanim elektrodama najveća osjetljivost bila pokazana na zlatnoj elektrodi ($2 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^2$) [9].

Kao što je već rečeno, berlinsko modriilo se koristi u biosenzorima zbog selektivnosti za kataliziranje redukcije vodikovog peroksida, a elektrode modificirane njime bile su testirane raznim amperometrijskim tehnikama. Berlinsko modriilo može se koristiti za određivanje koncentracije glukoze, laktata, kolesterola, glutamata, lizina i mnogih drugih biomolekula, tako da se upari sa enzimom oksidaze ili više njih odjednom, pri čemu vodikov peroksid spontano nastaje kao produkt djelovanja enzima oksidaze. Međutim, slabija stabilnost u lužnatom pH, a time i smanjena osjetljivost i dalje stvaraju problem koji se pokušava riješiti [9].

2.3. Elektrokemijske metode

Elektrokemijske metode su tehnike kojima elektrokemijski dolazimo do eksperimentalnih rezultata. Elektrokemijske tehnike se koriste u istraživanju i provedbi elektrokemijskih procesa, ali i u elektroanalitici. Služe za pripravu i sintezu organskih i anorganskih spojeva, deponiranje prevlaka na elektrode, određivanje vrste i koncentracije tvari u otopini, praćenje korozijskih procesa, testiranje elektrokemijskih senzora... Elektrokemijske tehnike istraživanja elektrodnih reakcija provode se u elektrokemijskom sustavu, koji može biti dvoelektrodni, troelektrodni ili rjeđe četveroelektrodni. Svaki elektrokemijski sustav mora sadržavati:

1. Anodu - elektroda na kojoj se odvija reakcija oksidacije
2. Katodu - elektroda na kojoj se odvija reakcija redukcije
3. osnovni elektrolit - kiselina, sol ili baza koji omogućuju električnu provodnost
4. otapalo - otapa reaktante i osnovni elektrolit
5. membrana - separator koji odvaja anodni od katodnog dijela

Najčešće se mjerenja provode u troelektrodnom sustavu, kojeg čine:

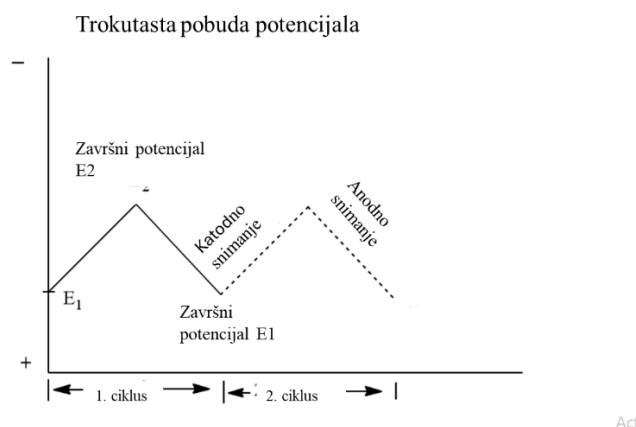
1. radna elektroda - na njoj se odvija reakcija od interesa
2. protuelektroda - služi za zatvaranje strujnog kruga
3. referentna elektroda- održava međufaznu granicu potencijala radna elektroda/elektrolit

Elektrokemijske tehnike se najčešće izvode tako da se sustav pobudi naponom ili strujom te se prati odziv sustava. Takve tehnike se nazivaju tranzijentne elektrokemijske tehnike, a dijele se na:

1. tehnike s upravljanjem potencijala elektrode:
 - a) ciklička voltametrija
 - b) kronoamperometrija
 - c) kronokulometrija
 - d) elektrokemijska impedancijska spektroskopija
2. tehnike s kontroliranom strujom:
 - a) kronopotenciometrija [12]

2.3.1 Ciklička voltametrija

Ciklička voltametrija pripada skupini elektroanalitičkih tehnika, u kojima je signal pobude linearno promjenjivi potencijal, a signal odziva je struja, koja se mjeri kao funkcija narinutog potencijala. Potencijal radne elektrode se linearno mijenja u vremenu, i to od početnog potencijala $E_{\text{poč}}$, do konačnog potencijala E_{kon} , i natrag. Za narinanje željenog potencijala i dobivanje strujnog odziva, koristi se uređaj koji se naziva potenciostat.



Slika 9: Signal pobude u cikličkoj voltametriji [29]

Rezultat linearne trokutaste pobude je elektrokemijska reakcija na elektrodi, a registrira se kao struja-potencijal krivulja. Ta krivulja se naziva ciklički voltamogram, u kojem se na x -osi nalazi signal pobude, tj. potencijal, a na y -osi signal odziva, tj. struja. Osim odabiranja raspona potencijala između kojih se snima ciklički voltamogram, odabire se i brzina promjene potencijala (tzv. *scan rate*); v (mV/s).

Prema brzini prijenosa naboja, procesi koji se odvijaju na elektrodi tijekom cikličke voltometrije mogu se svrstati u tri skupine:

1. reverzibilne reakcije:

prijenos naboja je puno brži od difuzije; reakcija je pod kontrolom transporta tvari (difuzijskom kontrolom). Na površini elektrode se u svakom trenutku uspostavlja ravnoteža opisana Nernstovom jednačinom; Nernstova jednačina je:

$$E_r = E^0 - \frac{RT}{zF} \ln \frac{a(oks)}{a(red)}$$

gdje je E_r ravnotežni potencijal (V), E^0 =standardni potencijal (V), R =opća plinska konstanta (8,314 J/molK), T = termodinamička temperatura (K), z = broj izmijenjenih elektrona, F = Faradayeva konstanta (96 485 C/mol), $a_{(oks)}$ i $a_{(red)}$ su aktiviteti oksidirane i reducirane vrste u otopini.

Na početku, kada nije narinut potencijal, kroz ćeliju protječe samo osnovna struja. Pozitiviranjem potencijala elektrode, u sustavu raste brzina elektrodne reakcije oksidacije (otpuštanje elektrona). Na voltamogramu dolazi do uzlaznog dijela krivulje odziva, tj. raste struja prema pozitivnim vrijednostima. Kad potencijal elektrode dostigne dovoljno pozitivnu vrijednost, dolazi do trenutačne oksidacije svih čestica na površini elektrode, a struja je maksimalna. Takvu najveću vrijednost struje nazivamo anodni strujni vrh. Potom struja počinje padati jer je proces pod kontrolom transporta tvari, a sve čestice u blizini elektrode su već oksidirane. Nakon postizanja konačnog potencijala E_{kon} (koji je određen signalom pobude), potencijal se počinje negativirati. Što je potencijal negativniji, dolazi do ubrzanja reakcije redukcije (primanje elektrona). Reducira se oksidirana tvar koja je nastala oksidacijom pri pozitivnijim potencijalima. Struja u reakciji redukcije je negativna i naziva se katodna struja, a u trenutku gdje je reakcija redukcije najbrža, postiže se katodni strujni vrh. Nakon postizanja najnegativnije struje, ona počinje rasti jer je transport tvari usporen.

Reverzibilni ciklički voltamogram karakteriziran je sljedećim parametrima:

- $E_{p,k}$ (V) i $E_{p,a}$ (V) ne ovise o v (V/s): potencijali katodnih i anodnih strujnih vrhova ne ovise o brzini promjene potencijala te su konstantni
- $E_{p,k} - E_{p,a} = 59$ mV za sve brzine promjene potencijala (razlika im ne ovisi o v)
- $I_{p,k} / I_{p,a} = 1$ (omjer katodnog i anodnog strujnog vrha je uvijek 1 i ne ovisi o v)

- $I_p/v^{1/2}$ je konstantan i ne ovisi o v , što je opisano Randles-Ševčikovom jednažbom:

$$I_p = 2,69 \times 10^5 \times z^{\frac{3}{2}} \times A \times c_0 \times \sqrt{D_0 \times v}$$

gdje je I_p struja strujnog vrha (A); z broj izmijenjenih elektrona; A površina radne elektrode (cm^2); D_0 difuzijski koeficijent oksidiranog oblika elektroaktivne vrste (cm^2/s); v brzina promjene potencijala (V/s); c_0 koncentracija elektroaktivne vrste (mol/cm^3)

Randles-Ševčikova jednažba pokazuje da strujni vrh raste s korijenom brzine promjene potencijala

2. Ireverzibilne reakcije:

Ciklički voltamogram ireverzibilne elektrodne reakcije u povratku ne registrira strujni vrh jer se suprotna reakcija ne odvija. Potencijal vrha pomiče se prema pozitivnijim vrijednostima s povećanjem brzine promjene potencijala. Reakcija je pod kontrolom izmjene naboja jer je to najsporiji stupanj, a slijedi Butler- Volmerovu kinetiku:

Butler Volmerova jednažba:

$$j = j_0 \times \left\{ e^{\left[\frac{(1-\alpha)zF\eta}{RT} \right]} - e^{\left[\frac{-\alpha zF\eta}{RT} \right]} \right\}$$

Gdje je: j = gustoća struje (A/cm^2); j_0 = gustoća struje izmjene (A/cm^2); α = koeficijent prijelaza naboja; z = broj izmijenjenih elektrona; F = Faradayeva konstanta ($96\,485\text{ C}/\text{mol}$); η = prenapon (V); R = opća plinska konstanta ($8,314\text{ J}/\text{molK}$); T = termodinamička temperatura (K)

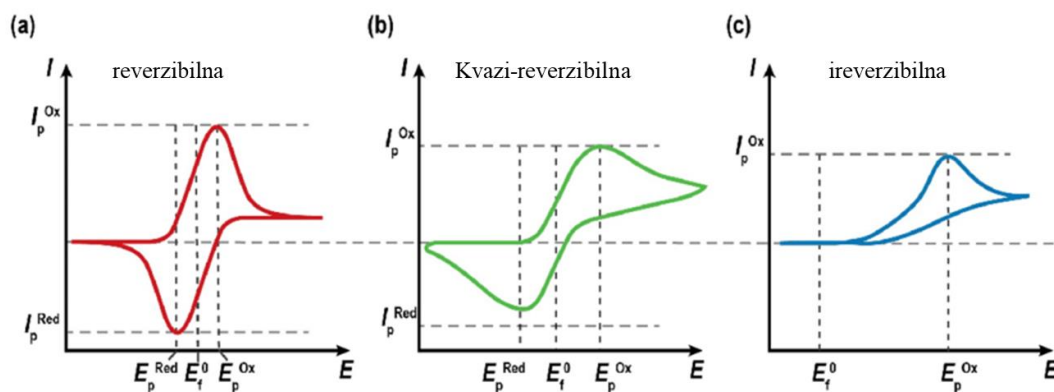
Za ireverzibilni voltamogram vrijede parametri:

- E_p ovisi o v (za proces oksidacije, potencijal se pomiče za $30/\alpha z$ mV prema pozitivnim vrijednostima kod deseterostrukog povećanja brzine promjene potencijala, a za proces redukcije prema negativnim vrijednostima)
- I_p je konstantan i ne ovisi o v (strujni vrh ne ovisi o brzini promjene potencijala, nema strujnog vrha u povratku)

3. Kvazireverzibilne reakcije

U kvazireverzibilnoj reakciji oksidacije struja voltametrijskog odziva ovisi o kinetici polaznog i povratnog procesa elektrodne reakcije. Visina i oblik strujnih vrhova ovisi o koeficijentu prijelaza (α), standardnoj konstanti brzine elektrodne reakcije (k^0), brzini promjene potencijala (v) i o difuzijskim koeficijentima oksidirane i reducirane vrste (D).

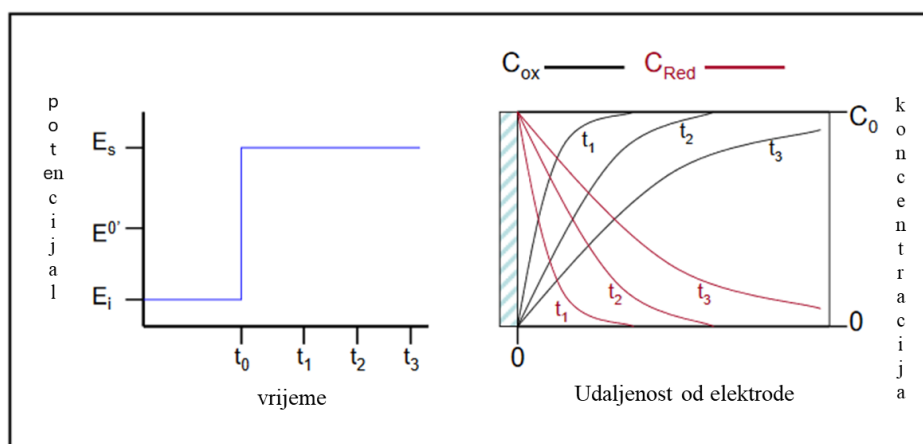
Razlika potencijala strujnih vrhova povećava se povećanjem brzine promjene potencijala, kao i omjer struja u strujnim vrhovima [13].



Slika10: Izgled reverzibilnog, kvazireverzibilnog i ireverzibilnog cikličkog voltamograma [30]

2.3.2. Kronoamperometrija

Kronoamperometrija je elektrokemijska tehnika u kojoj se potencijal skokomično mijenja od potencijala pri kojem nema reakcije do potencijala pri kojem koncentracija elektroaktivne tvari, koja je bila na početku prisutna, pada na nulu na površini elektrode. Signal odziva je graf struje u ovisnosti o vremenu (kronoamperogram). Budući da se prijenos tvari odvija difuzijom (ako se koristi stacionarna elektroda u nemiješanom elektrolitu), krivulja struja-vrijeme opisuje promjenu koncentracije u blizini površine elektrode. Difuzijski sloj se povećava sa smanjenjem dostupnog reaktanta, a time se događa pad nagiba koncentracijskog profila s vremenom. Struja je proporcionalna koncentracijskom gradijentu na površini elektrode [14].



Slika 11: Skokovita pobuda potencijala u kronoamperometriji (lijevo,a) i prikaz koncentracijskog profila u ovisnosti o vremenu(desno,b) [15]

Ako se razmotri gornja slika 11. b, prisutna je situacija u kojoj je elektroda uronjena u otopinu u kojoj je prisutna oksidirana vrsta elektroaktivne tvari, a u početku je elektroda na potencijalu E_i . U trenutku t_0 , potencijal se naglo smanji na negativnu vrijednost, pri čemu se oksidirani oblik elektroaktivne tvari (označen crno) uz površinu elektrode pretvara u reducirani oblik te raste koncentracija reduciranog oblika, a pada koncentracija oksidiranog. To dovodi do stvaranja gradijenta koncentracije za oksidiranu vrstu, kroz koji ona iz mase otopine mora difundirati na površinu elektrode, gdje se odmah reducira. Što je elektroda dulje podvrgnuta tom redukcijskom potencijalu, to se dalje od elektrode proteže područje osiromašeno oksidiranom vrstom, koje se naziva difuzijski sloj. Sličan, ali suprotan gradijent prisutan je za reducirani oblik tvari, koja nakon formiranja na površini elektrode može difundirati u otopinu dalje od površine elektrode [15].

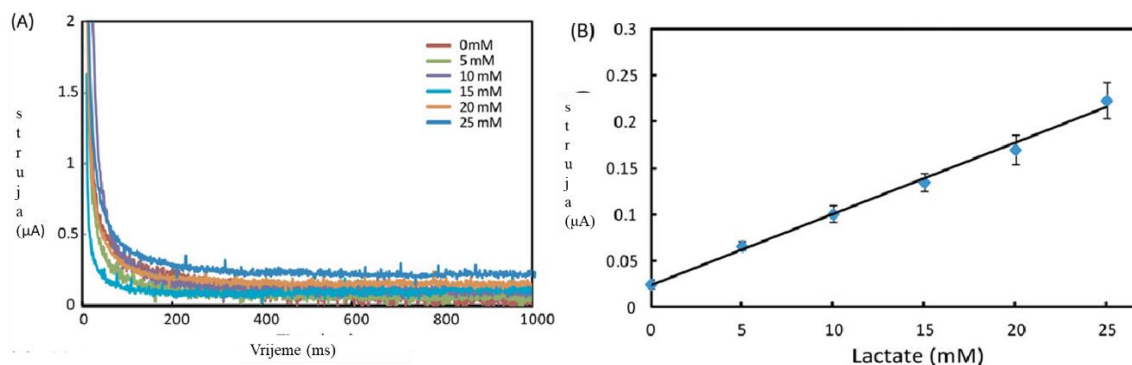
Strujni odziv u kronoamperometriji ovisit će o relativnom omjeru brzina izmjene naboja i brzine transporta mase elektroaktivne tvari do elektrode. U slučaju kad je transport mase pod kontrolom difuzije, struja pada s vremenom i vrijedi Cottrellova jednadžba.

Ako je transport mase difuzija i potencijal je dovoljno visok da je koncentracija tvari na površini elektrode jednaka nuli, kronoamperogram se opisuje Cottrellovom jednadžbom:

$$I(t) = \frac{n \times F \times C \times D^{\frac{1}{2}}}{\pi^{\frac{1}{2}} \times t^{\frac{1}{2}}}$$

gdje je I = jakost struje (A); n = broj elektrona koji sudjeluju u reakciji; F = Faradayeva konstanta (96 485 C/mol); C = koncentracija tvari u otopini (mol/cm³); D = difuzijski koeficijent (cm²/s); t = vrijeme(s)

Kronoamperometrija se često koristi za određivanje difuzijskog koeficijenta elektroaktivne tvari ili određivanje površine elektrode. Također se koristi i za određivanje koncentracije elektroaktivnih tvari tj. mjerenja u biosenzorima.



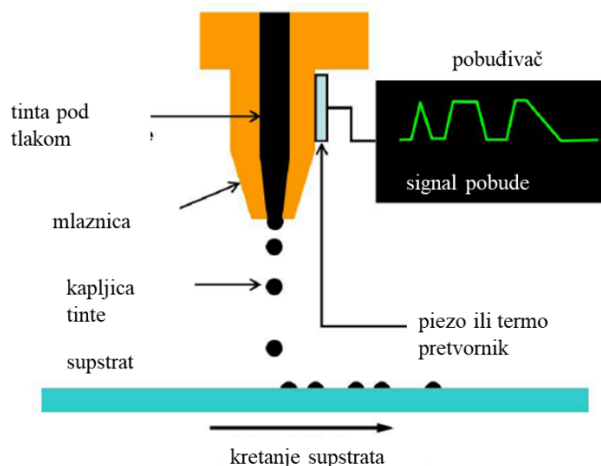
Slika 12: Prikaz strujnog tranzijenta (slika lijevo, a) i ovisnosti struje o koncentraciji (slika desno, b) [31]

2.4. Inkjet ispis

Tiskana elektronika privlači veliku pažnju u istraživanju i komercijalizaciji jer omogućuje izradu velikih, jeftinih elektroničkih uređaja na raznim podlogama. Najveće prednosti tiskane elektronike su niska cijena, brzina izrade i fleksibilnost proizvoda. Tiskana elektronika se dijeli u dvije velike kategorije: kontaktno nanošenje i beskontaktno nanošenje, u koje spada *inkjet printing* (tintni ispis).

Inkjet ispis je beskontaktna digitalna tehnika ispisa kod koje se kapljice tinte izbacuju iz spremnika direktno na površinu zbog tlaka primijenjenog nakon pobude električnim signalom. Dva su različita mehanizma po kojima rade *inkjet* pisači: *drop on demand* (DOD) ispis i kontinuirani ispis. U ispisu kontinuiranim načinom, tinta pod tlakom se probija kroz mlaznicu i razbija na ujednačene kapi pod djelovanjem površinske napetosti. DOD mehanizam karakteriziraju manje kapljice i veća točnost položaja. Tim mehanizmom kapljice se izbacuju impulsom tlaka koji se generira u šupljini iza mlaznice za ispis. Impuls tlaka koji pokreće

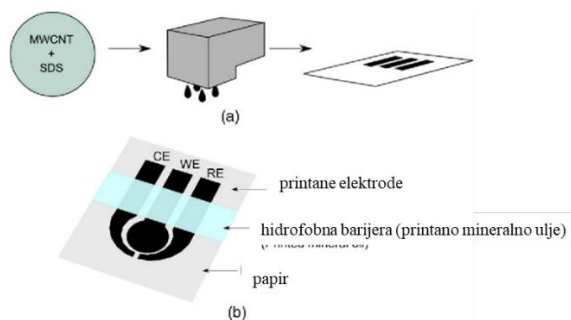
stvaranje kapljica može se generirati toplinskim pulsom koji stvara mjehurić pare ili piezoelektričnim pokretačem. DOD pisači češće se upotrebljavaju od kontinuiranih u istraživanju materijala [16].



Slika 13. Shema DOD pisača [33].

Kako bi se izbjeglo aglomeriranje komponenata koji bi začepili mlaznicu, tinte koje se koriste za izradu funkcionalnih materijala moraju imati zadovoljavajuća svojstva, od kojih su najbitniji veličina čestica, viskoznost i površinska napetost.

Često se kao vodljiva tinta u ispisu koristi grafenska tinta, budući da ima visoku električnu i toplinsku vodljivost, veliku specifičnu površinu, kemijsku stabilnost te mehaničku fleksibilnost. Stoga se upravo tinte na bazi grafena koriste za istraživanje savitljivih i nosivih elektroničkih uređaja, kao što su biosenzori. Disperzija grafena u obliku tinte se temelji na organskim otapalima, poput izopropanola, *N*-metilpirolidona, dimetilformamida... Međutim, češće se u tintu dodaju disperzanti koji sprječavaju aglomeraciju molekula grafena, a stabiliziraju grafenske nanoplahte. Polimeri koji se često koriste su polivinilpirolidon ili etil-celuloza. Budući da je korištenjem polimera kao stabilizatora smanjena vodljivost, tinta se mora obraditi kako bi se uklonio nevodljivi polimer i ostao samo vodljivi grafen [17].



Slika 14: Shema inkjet ispisa elektroda [34]

Da bi se stvorio vodljivi tiskani uzorak, vodljive čestice moraju se sinterirati kako bi se stvorila kontinuirana povezanost. Sinteriranje je povezivanje čestica zajedno pri temperaturama ispod temperature taljenja, pri čemu se uklanja nevodljivi sloj stabilizatora, a ostaje vodljiva tinta. Sinteriranje može biti termalno, fototermalno, mikrovalovima, plazmom, električnim naponom ili kemijskim reagensom. U prošlosti se najčešće provodilo termalno sinteriranje, no loša strana toga je što se toplinski osjetljiv supstrat time može oštetiti. Stoga je u današnje vrijeme popularnija fototermalna obrada intenzivnom pulsirajućom svjetlosti pri kojoj se uklanja stabilizator, a supstrat tj. vodljiva tinta ostaje stabilna [18].

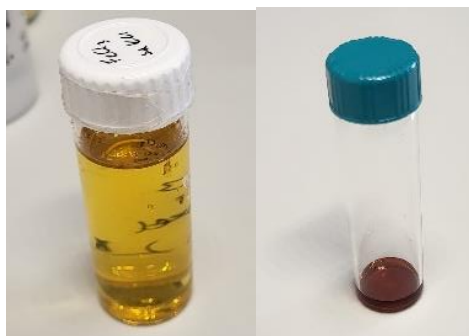
Prednosti *inkjet* ispisa u odnosu na druge metode ispisa su jednostavnost, nanošenje raznih materijala na podlogu, niska cijena i ispis uzorka visoke rezolucije.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Kemikalije

Kemikalije korištene u eksperimentu bile su:

- Dijamantna pasta: DP- Paste M (15 μm) - Struers, Danska
- Dijamantna pasta: DP- Paste (1 μm) - Struers, Danska
- Glinica (Al_2O_3): OP-A suspenzija (0,1 μm) - Struers, Danska
- Deionizirana voda (H_2O)
- apsolutni etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)
- željezov (III) klorida (FeCl_3)
- kalijev heksacijanoferat(III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)
- kalijev klorid (KCl)
- klorovodična kiselina (HCl)
- Tri otopine pufera KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 5,4; pH=6,4 i pH=7,4)
- Otopine vodikovog peroksida različitih koncentracija (H_2O_2)
- Grafenska tinta „Sigma Aldrich“



Slika 15. otopina FeCl_3 (lijevo) i reakcijska smjesa za depoziciju (desno)

3.2. Aparatura

Aparatura korištena u radu:

- elektroda od staklastog ugljika ($A = 0,07 \text{ cm}^2$)
- komercijalna sitotiskana *Micrux* ugljična elektroda ($A = 0,07 \text{ cm}^2$)
- *inkjet* ispisana elektroda ($A = 0,07 \text{ cm}^2$)
- protuelektroda: platinska žica
- referentna elektroda: Ag/AgCl (srebro/srebrov klorid)
- *inkjet* pisač Gateway s Epson XP600 glavom
- IPL sustav Xenon X1100
- laboratorijska miješalica BioSan Vortex V-1 plus
- ultrazvučna kupelj Bandelin SONOREX SUPER RK 31
- Iskra pH metar MA 5740
- potenciostat EG&G Princeton Applied Research Model 263A
- potenciostat PalmSens Sensit BT



Slika 16. IPL sustav Xenon X-1100 za fototermalno sinteriranje [35]

3.3. Priprema otopina

Otopina berlinskog modrila:

Otopina berlinskog modrila za kemijsku depoziciju na elektrode pripremljena je miješanjem **0,1 M otopine $K_3[Fe(CN)_6] \times 6H_2O$** u 0,1 M KCl i 10 mM HCl i **0,1 M otopine $FeCl_3$** u 0,1 M KCl u 10 mM HCl.

Priredi se 5 mL 0,1 M otopine $K_3[Fe(CN)_6] \times 6H_2O$ u 0,1 M KCl u 10 mM HCl i 5 mL 0,1 M otopine $FeCl_3$ u 0,1 M KCl i 10 mM HCl. Pripremljene otopine pomiješane su u volumnom omjeru 1:1 te je 40 μ L reakcijske smjese nakapano na radnu površinu elektrode. Spontanom reakcijom ekvimolarnih količina $K_3[Fe(CN)_6]$ i $FeCl_3$ nastaje berlinsko modriilo.

Na elektrodi od staklastog ugljika provedene su depozicije u trajanju od 10 minuta te od 60 minuta, dok su na sitotiskanim i *inkjet* ispisanim elektrodama depozicije trajale 10, 20 i 60 minuta.

Otopine pufera:

Otopine fosfatnog pufera pH 5,4; 6,4 i 7,4 pripremljene su miješanjem 1/15 M otopine KH_2PO_4 i 1/15 M otopine K_2HPO_4 . Otopine se miješaju u određenim količinama dok se ne dođe željeni pH, a provjerava se na pH metru.

Otopine vodikovog peroksida:

Otopine vodikovog peroksida pripremaju se razrjeđenjem 250 mL 0,1 M otopine H_2O_2 otopinom 0,1 M KCl te su priređene otopine koncentracija 0,01 mM; 0,05 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM te 5 mM H_2O_2 .

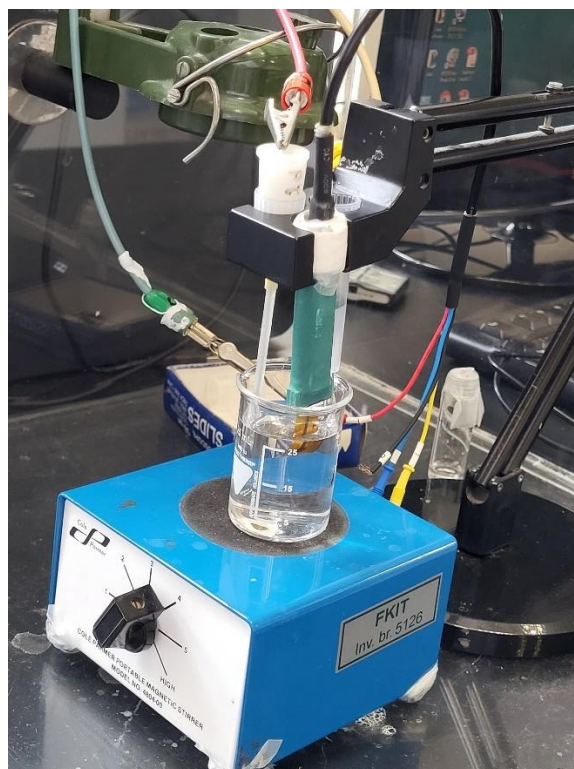
3.4. Priprema elektroda

Elektroda od staklastog ugljika polirana je na baršunastoj podlozi tri minute dijamantnom pastom veličine zrna 15 μ m, zatim dijamantnom pastom veličine zrna 1 μ m, Nakon toga je na baršunastoj podlozi polirana glinicom veličine čestica 0,1 μ m te u zadnjem koraku samo na navlaženoj baršunastoj podlozi. Nakon poliranja, kako bismo uklonili zaostale čestice paste i glinice, elektroda je držana 15 minuta na ultrazvučnom miješanju u etanolu te 15 minuta u vodi. Nakon obrade elektrode snimljen je ciklički voltamogram u 0,1 M KCl za provjeru je li elektroda čista.

Inkjet elektrode ispisane su u laboratoriju Zavoda za opću i anorgansku kemiju na *inkjet* pisaču Gateway s Epson XP600 glavom, a nanesen je jedan sloj grafenske tinte Sigma Aldrich na poliimidnu foliju. Potom se provodi termalno sinteriranje pri 300 °C u trajanju od 30 minuta u peći kako bi sloj grafena bio kompaktan na poliimidu. Provedeno je i fototermalno sinteriranje intenzivnom pulsirajućom svjetlosti na IPL sustavu Xenon X-1100. Uvjeti fototermalnog sinteriranja bili su 10 pulseva energije 539 J, a napon kondenzatora je 2500 V. Sinteriranje, termalno i fototermalno, provodi se kako bi se uklonili stabilizatori grafenske tinte, budući da se radi o nevodljivoj komponenti.

3.5 Karakterizacija elektrode

Na elektrode je, nakon njihove obrade, kemijskom depozicijom nanesen sloj berlinskog modrila. Nakon kemijske depozicije berlinskog modrila i stabilizacije nastalog sloja sat vremena na 100 °C u pećnici, provedena je elektrokemijska karakterizacija elektroda modificiranih berlinskim modrilom. Sva mjerenja su provedena u troelektrodnom sustavu, u kojem je platina bila protuelektroda, Ag/AgCl/3M NaCl referentna, dok je radna elektroda bila ispitivana elektroda modificirana berlinskim modrilom. Za sve tri elektrode (staklasti ugljik, sitotiskana i *inkjet* ispisana) provedena su ista mjerenja, ali su za *inkjet* ispisanu elektrodu bili drukčiji uvjeti. Elektrokemijske tehnike korištene za karakterizaciju elektroda bile su ciklička voltometrija i kronoamperometrija



Slika 66: Troelektrodni sustav: radna elektroda-komercijalna sitotiskana; referentna elektroda-Ag/AgCl; protuelektroda-platina

3.5.1 Ciklička voltametrija

Ciklička voltametrija provedena je na tri različita načina. Prvo mjerenje, aktivacija sloja berlinskog modrila, provedeno je u KCl s ciljem dodatne stabilizacije sloja berlinskog modrila na elektrodi. Drugo mjerenje bilo je također u KCl, ali pri različitim brzinama promjene potencijala, kako bi se mogla okarakterizirati reakcija na samoj elektrodi. Treće snimanje cikličkih voltamograma, bilo je provedeno u fosfatnim puferima različitih pH vrijednosti, kako bi se testirala stabilnost sloja pri različitim pH.

Uvjeti mjerenja za troelektrodne sustave u kojima su radne elektrode staklasti ugljik i komercijalna sitotiskana elektroda:

1. Aktivacija sloja berlinskog modrila
 - Elektrolit: 0,1 M KCl
 - Raspon potencijala: od -0,2 V do 0,5 V
 - Brzina promjene potencijala (*scan rate*): 50 mV/s
 - Broj ciklusa: 20
2. Ciklička voltametrija pri različitim brzinama promjene potencijala
 - Elektrolit: 0,1 M KCl
 - Raspon potencijala: od -0,2 V do 0,5 V
 - Brzina promjene potencijala (*scan rate*): od 10 mV/s do 100 mV/s, uz razmak 10 mV/s za svako mjerenje
 - Broj ciklusa: 5 za svaku brzinu promjene potencijala
3. Ciklička voltametrija u različitim pH
 - Elektrolit: KH_2PO_4 - K_2HPO_4 puferi
 - pH pufera: 5,4 ; 6,4 ; 7,4
 - raspon potencijala: od -0,2 V do 0,5 V
 - brzina promjene potencijala (*scan rate*): 50 mV/s
 - broj ciklusa: 15

Uvjeti mjerenja za troelektrodni sustav u kojem je *inkjet* printana elektroda radna su bili slični, no raspon potencijala snimanja je proširen, a broj ciklusa smanjen. Sada su ciklički voltamogrami pri različitim brzinama promjene potencijala bili snimani u rasponu od -0,5 V do 1 V, a snimljena su dva ciklusa za ovisnost voltamograma o brzini promjene potencijala.

3.5.2. Amperometrijska detekcija vodikovog peroksida

Nakon provedene cikličke voltametrije kojom je elektrokemijski okarakterizirana elektroda, trebalo je testirati koliko dobro elektrode na kojima je nanesen sloj berlinskog modrila detektiraju vodikov peroksid, koji bi inače spontano nastajao oksidacijom biomolekule. Stoga je provedena kronoamperometrijska kalibracija u otopinama vodikovog peroksida različitih koncentracija. Pri tome je troelektrodni sustav isti kao i za snimanje cikličkih voltamograma. Kao i za cikličku voltametriju, uvjeti snimanja kronoamperograma bili su malo drukčiji za *inkjet* printanu elektrodu, u odnosu na uvjete za staklasti ugljik i sitotiskanu elektrodu

Uvjeti snimanja kronoamperograma za elektrodu od staklastog ugljika i komercijalnu sitotiskanu *Micrux* elektrodu

- Otopina: H₂O₂ otopine različitih koncentracija
- Potencijal pri kojem se snima: -0,1 V
- Vrijeme snimanja: 30 sekundi

Uvjeti snimanja kronoamperograma za *inkjet* printanu elektrodu bili su slični, no potencijal pri kojem je bila provedena kronoamperometrija iznosio je -0,5 V.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Provedene su kemijske depozicije berlinskog modrila na elektrodi od staklastog ugljika (GC), komercijalnu sitotiskanu elektrodu te grafensku *inkjet* printanu elektrodu. Na GC elektrodi, depozicije su trajale 10 i 60 minuta, dok su na sitotiskanima i *inkjet* ispisanima depozicije trajale 10, 20 te 60 minuta, a potom su elektrode karakterizirane kako bi se odredili optimalni uvjeti

4.1. Elektrokemijska karakterizacija cikličkom voltametrijom

4.1.1 Elektroda od staklastog ugljika (GC elektroda)

10 minuta depozicije na GC elektrodi

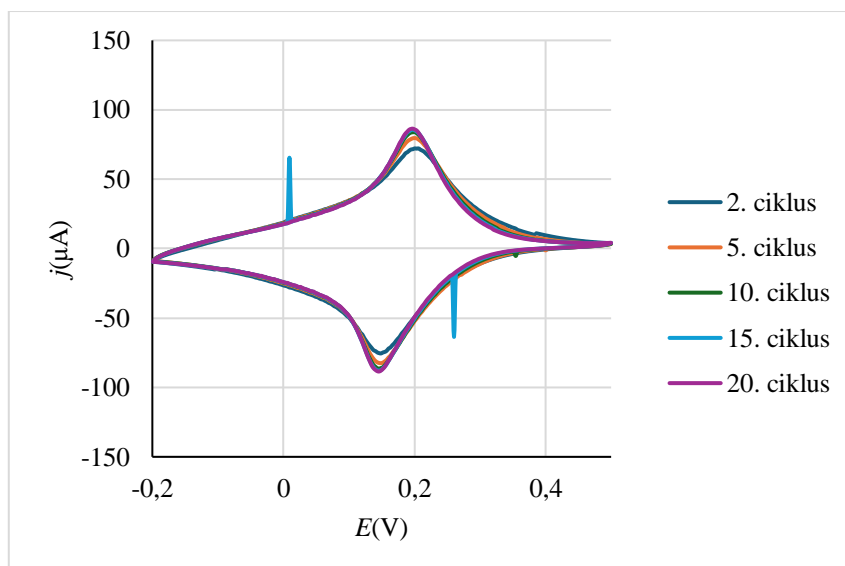


Slika 17. čista elektroda od staklastog ugljika [36]



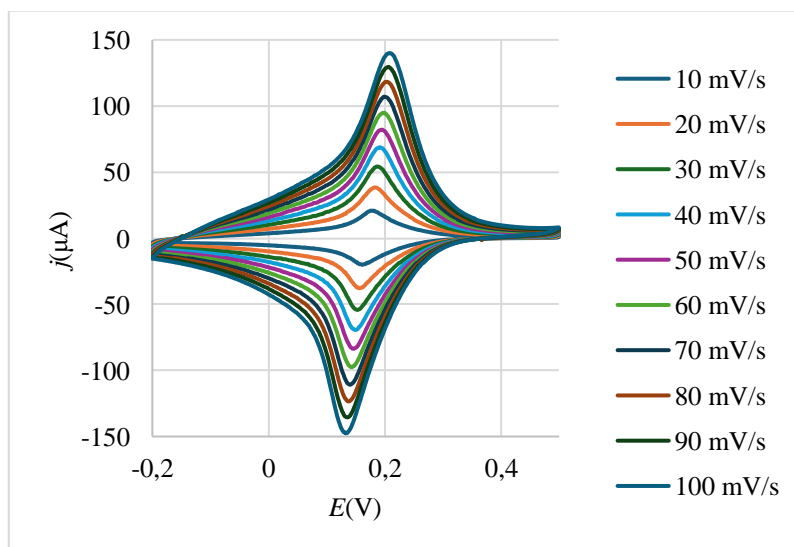
Slika 18. Elektroda od staklastog ugljika modificirana berlinskim modrilom

Nakon depozicije berlinskog modrila, na elektrodi se vidi karakteristična plava boja modrila, što se vidi na slici 18.



Slika 19: Graf aktivacije sloja Berlinskog modrila u KCl na GC elektrodi (10 min depozicije)

Slika broj 19 prikazuje prvu provedenu cikličku voltametriju; aktivacija sloja berlinskog modrila u KCl-u. Iz grafa je vidljivo da se s povećanjem broja ciklusa povećavaju anodne (pozitivne) i katodne (negativne) struje, budući da se sloj berlinskog modrila aktivira ulaskom kalijevih iona u rešetku. Sloj se u KCl elektrokemijski aktivira i dodatno stabilizira. Anodna reakcija je oksidacija berlinskog bijelog u berlinsko modrilo, a katodna redukcija berlinskog modrila u berlinsko bijelo. (reakcije u 2.2.2.) Nakon 20 ciklusa, sloj je aktiviran što se vidi preklapanjem posljednjih nekoliko ciklusa, odnosno ne dolazi do daljnjeg rasta struje.



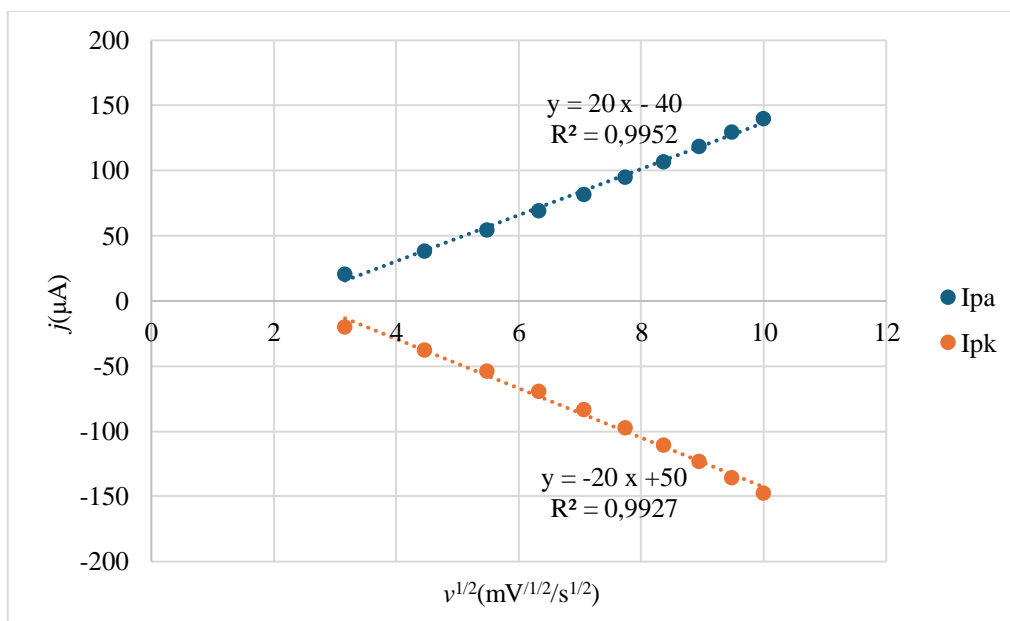
Slika 20: Ciklički voltamogrami pri različitim brzinama promjene potencijala za GC elektrodu (10 min depozicije)

Graf na slici 20. prikazuje cikličke voltamograme pri različitim brzinama promjene potencijala. Iz grafa vidimo da su reakcije na elektrodi kvazireverzibilne, budući da se s povećanjem brzine promjene potencijala povećava razlika potencijala anodnog i katodnog strujnog vrha. Pri većim brzinama promjene potencijala, strujni vrhovi su veći budući da je reakcija brža.

Tablica 1: Vrijednosti razlika potencijala u milivoltima te omjera katodnih i anodnih strujnih vrhova pri različitim brzinama promjene potencijala (10 min)

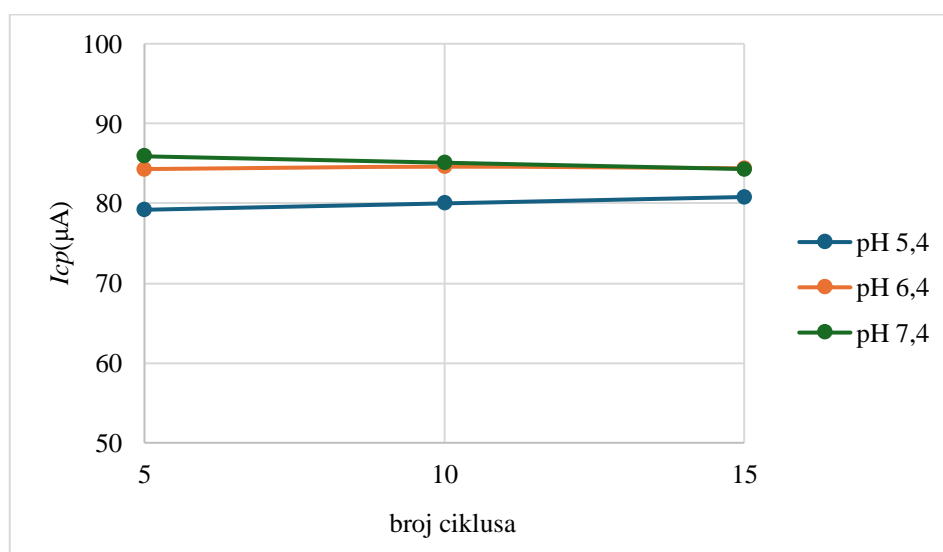
v (mV/s)	ΔE_p (mV)	I_{pa}/I_{pk}
10	16,50	1,050
20	28,90	1,020
30	33,31	1,000
40	42,60	0,993
50	49,50	0,982
60	56,53	0,974
70	59,05	0,967
80	65,98	0,959
90	70,28	0,958
100	78,50	0,950

Tablica 1 prikazuje razliku potencijala pri različitim brzinama promjene potencijala te omjer katodnih i anodnih strujnih vrhova. Razlike potencijala se povećavaju povećanjem v što pokazuje da su reakcije u sustavu kvazi-reverzibilne, a uz to se omjer strujnih vrhova smanjuje jer je razlika veća. Razlika potencijala pri 100 mV/s je skoro pet puta veća nego pri 10 mV/s, a idealnih 59 mV postiže se pri 70 mV/s brzine, dok se idealni omjer struja (1) postiže pri 30 mV/s



Slika 21: Graf ovisnosti strujnih vrhova o korijenu brzine promjene potencijala (10 min)

Graf broj 21 prikazuje linearnu ovisnost anodnih i katodnih strujnih vrhova o korijenu brzine promjene potencijala. Prema Randles-Ševčíkovej jednadžbi, linearna ovisnost strujnih vrhova o $v^{1/2}$ je pokazatelj da je reakcija u sustavu pod difuzijskom kontrolom.



Slika 22: Graf ovisnosti apsolutnih vrijednosti katodnih strujnih vrhova o broju ciklusa pri pH 5,4; 6,4 i 7,4 (10min)

Zadnja ciklička voltometrija bila je provedena u fosfatnim puferima različitih pH. Ciklički voltamogrami snimani su od najkiselijeg pufera do najlužnatijeg. Na grafu se primjećuje mali porast katodnih strujnih vrhova u 10. i 15. ciklusu u odnosu na 5. ciklus u puferu čiji je pH 5,4

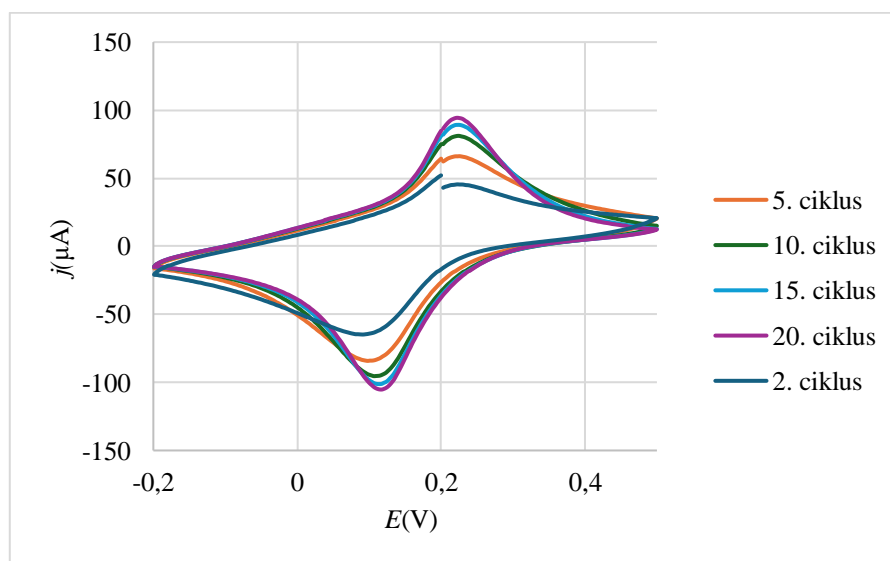
jer se sloj još uvijek aktivira. U puferima pH 6,4 i 7,4 struje su prilično slične te ne dolazi do pada u strujama što je pokazatelj dobre stabilnosti sloja na elektrodi u sva tri pufera.

60 minuta depozicije na GC elektrodi



Slika 23: GC elektroda modificirana berlinskim modrilom (60 min depozicije)

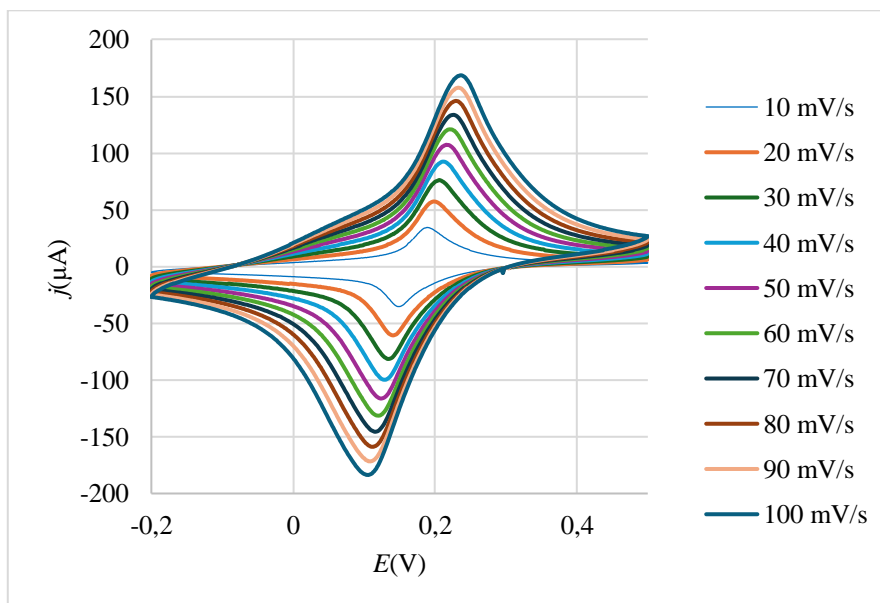
Ponovno primjećujemo plavi sloj berlinskog modrila na elektrodi, ovoga puta intenzivnije boje zbog dulje depozicije.



Slika 24: Graf aktivacije sloja berlinskog modrila na GC elektrodi (2; 5; 10; 15 i 20. ciklus) (60 min)

Na cikličkom voltamogramu aktivacije sloja u KCl vidljive su veće struje za 60 min depoziciju u odnosu na 10 min. Razlog tome je dulja depozicija, zbog koje je prisutno više elektroaktivne

tvari na elektrodi. Struje ponovno rastu s povećanjem broja ciklusa jer se sloj stabilizira i elektrokemijski aktivira [20].

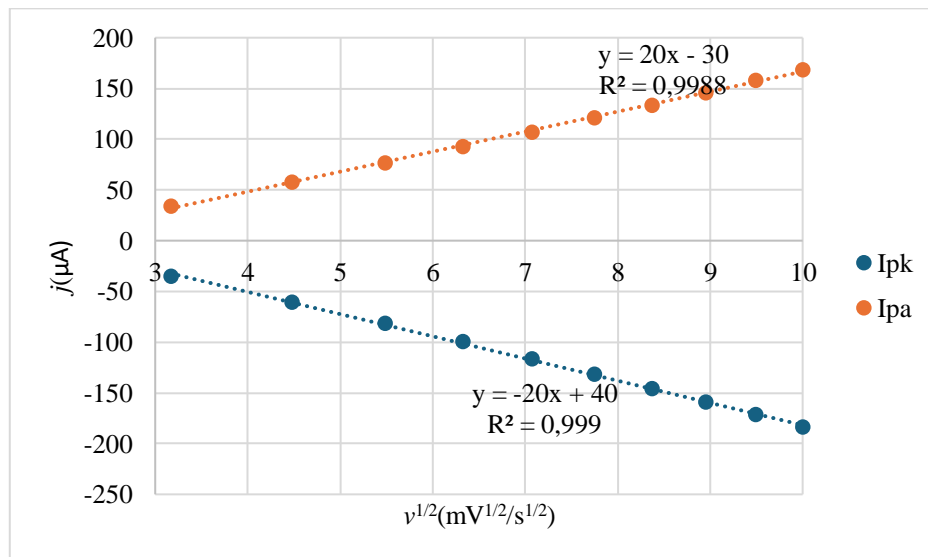


Slika 25: Ciklički voltamogrami pri različitim brzinama promjene potencijala (5. ciklusi) (60 min)

Tablica 2: Vrijednosti razlika potencijala u milivoltima te omjera katodnih i anodnih strujnih vrhova pri različitim brzinama promjene potencijala

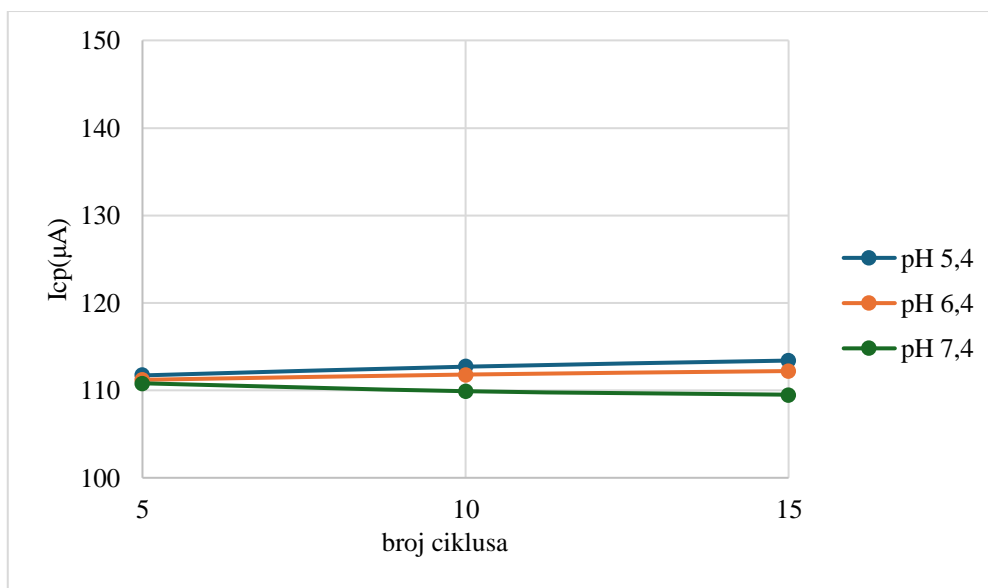
$v/\text{mV s}^{-1}$	$\Delta E_p(\text{mV})$	$I_{p,k}/I_{p,a}$
10	39,95	0,980
20	56,50	0,947
30	73,00	0,937
40	83,88	0,928
50	93,68	0,923
60	100,40	0,921
70	110,28	0,918
80	118,28	0,918
90	125,00	0,918
100	133,25	0,918

Na ovim cikličkim voltamogramima na slici 25 vidljivo je ponovno da se povećanjem brzine promjene potencijala povećava razlika potencijala anodnih i katodnih strujnih vrhova. No, osim toga, vidljivo je da su i te razlike potencijala veće nego za 10 min depoziciju na GC elektrodi. Razlog tome je što je berlinsko modrilo nevodljivi materijal te se povećanjem sloja, odnosno duljom depozicijom, povećava otpor u sustavu zbog čega je razlika potencijala veća, a strujni vrhovi su prošireniji. To je najbolje vidljivo iz tablice 2. u kojoj je razlika potencijala mnogo veća, nego za 10 min depoziciju (skoro dvostruko veće) Omjeri katodnih i anodnih strujnih vrhova manji su od 1, a povećanjem v se smanjuju sve više, dok razlika potencijala ponovno raste.



Slika 26: Graf ovisnosti anodnih i katodnih strujnih vrhova o korijenu brzine promjene potencijala (60 min)

Iz grafa na slici 26 vidimo da je i u ovom slučaju reakcija na elektrodi pod difuzijskom kontrolom, odnosno u pretvorbi berlinskog modrila u berlinsko bijelo i obrnuto je najsporiji stupanj reakcije transport tvari. Struje rastu što znači da je sloj stabilan na elektrodi.

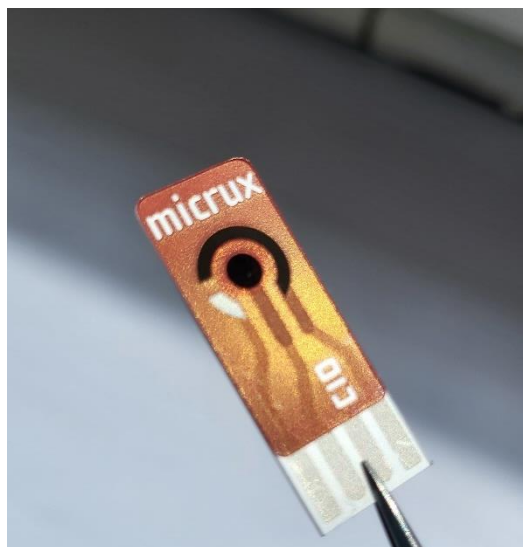


Slika 27: Ovisnost apsolutnih vrijednosti katodnih struja o broju ciklusa u puferima pH 5,4; 6,4 i 7,4

Jakost katodne struje raste u puferima pH 5,4 i 6,4, dok u puferu 7,4 postoji blagi pad u jakosti struje, no sloj je i dalje prilično stabilan, pogotovo jer je depozicija dulja pa je teže otopiti deblji sloj berlinskog modrila. Pad je toliko malen da se zanemaruje.

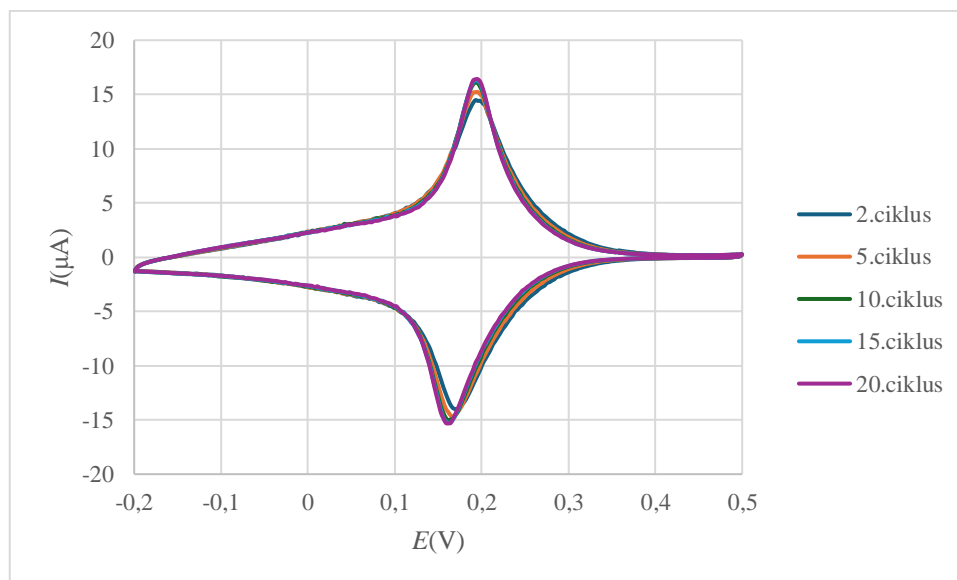
4.1.2. Komercijalna sitotiskana elektroda

10 minuta depozicije na sitotiskanoj elektrodi



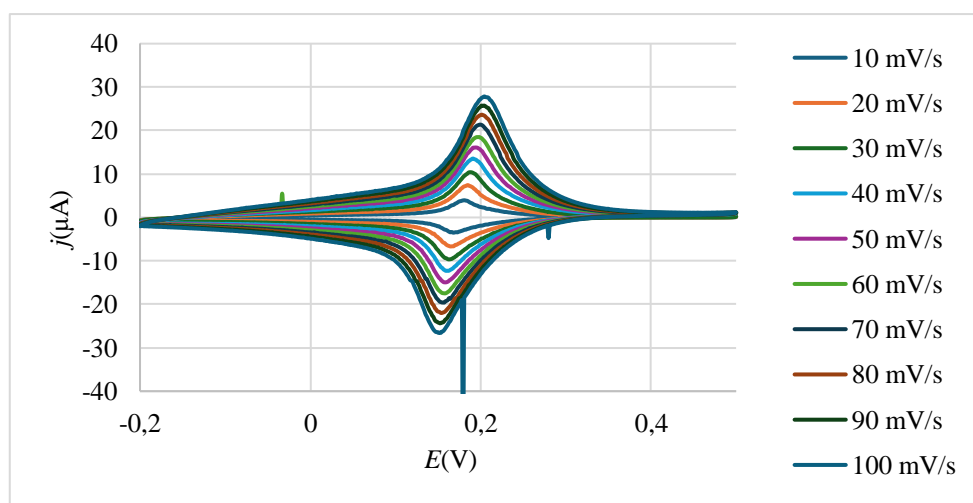
Slika 28. Sitotiskana elektroda modificirana BM (10 min)

Sloj berliskog modrila teško je uočljiv na sitotiskanoj „Micrux“ elektrodi.



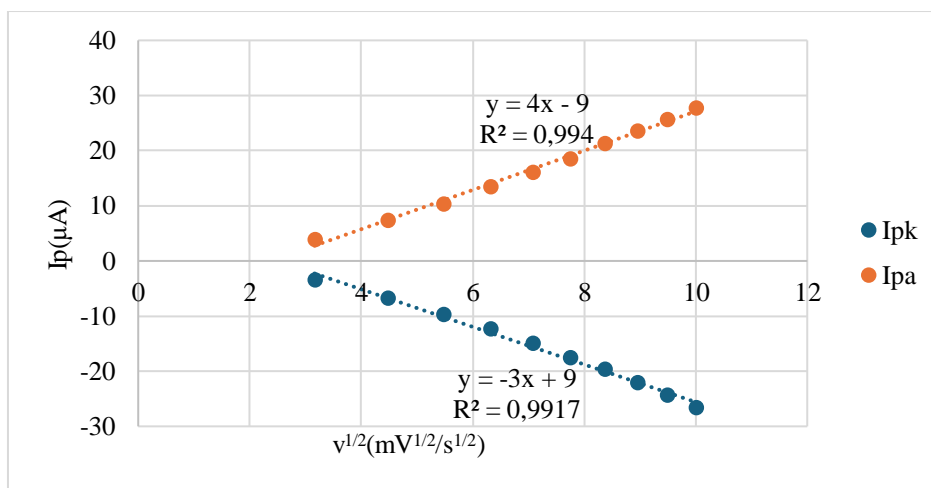
Slika 29: Ciklički voltamogrami aktivacije sloja berlinskog modrila na „Micrux“ elektrodi u KCl (2; 5; 10; 15 i 20. ciklus) (10 min)

Iz cikličkih voltamograma vidljive su manje jakosti struje na sitotiskanim elektrodama u odnosu na depoziciju istog trajanja na GC elektrodi. Nije poznat točan uzrok, ali se radi o elektrodama znatno drukčije morfologije i strukture ugljika, a poznato je da rezultat kemijske depozicije znatno ovisi o supstratu. Ugljična tinta koja se koristi za ispisivanje elektroda sadrži grafit, ali i razna veziva koja povećavaju viskoznost tinte. Stoga elektrokemijsko pretretiranje printanih elektroda može poboljšati elektrokemijsko ponašanje elektroda aktiviranjem površine, a to se radi polariziranjem elektrode na pozitivne potencijale pri različitim vremenima, koje u ovom slučaju nije bilo provedeno [10].



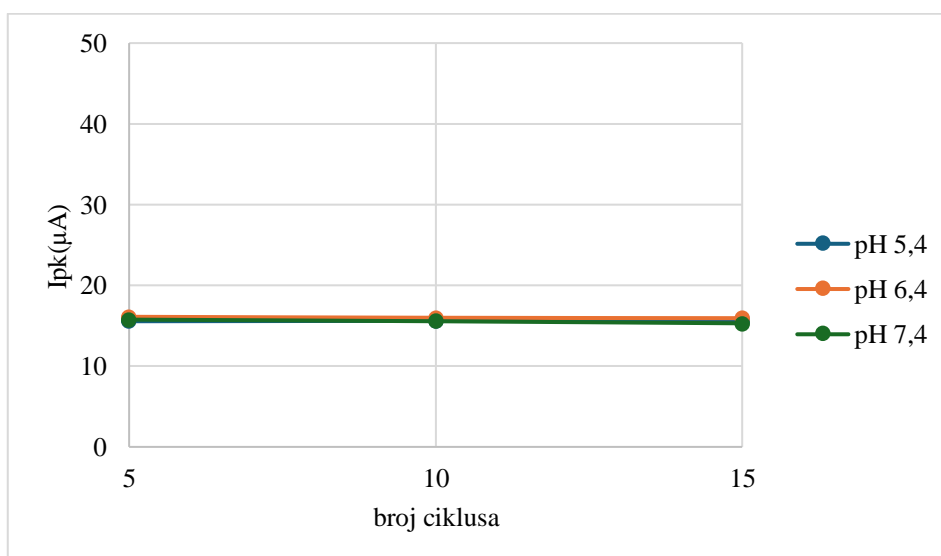
Slika 30: Ciklički voltamogrami pri različitim brzinama promjene potencijala snimljeni u KCl (5. ciklusi)

Struje ponovno rastu povećanjem brzine promjene potencijala jer je reakcija brža. Vrh na oko 0,2 V je posljedica potencioštata koji stvara takav strujni odziv kad mijenja raspon struja.



Slika 31: Graf ovisnosti anodnih i katodnih strujnih vrhova o korijenu brzine promjene potencijala (10 min)

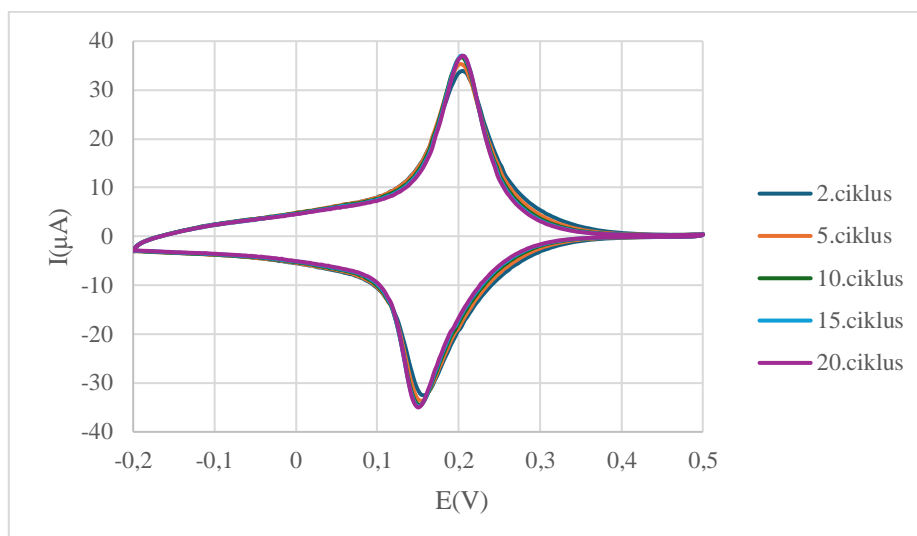
I na komercijalnim sitotiskanim elektrodama, reakcija se odvija pod difuzijskom kontrolom.



Slika 32: Graf ovisnosti apsolutnih vrijednosti katodnih strujnih vrhova o broju ciklusa u puferima pH 5,4; 6,4 i 7,4 (10 min)

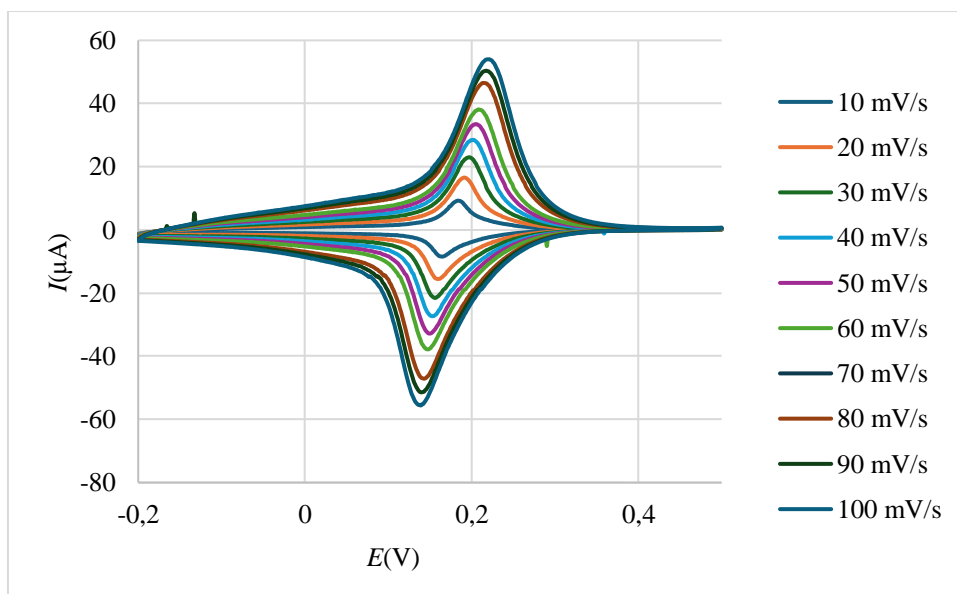
Što se tiče stabilnosti u različitim pH, rezultati su vrlo slični za sitotiskanu elektrodu kao za GC elektrodu, no struje su puno manje za sitotiskanu elektrodu. Struje su bile praktički jednake i konstantne u svim puferima i nije došlo do znatnog otapanja sloja, kao ni na GC elektrodi.

20 minuta depozicije na sitotiskanoj elektrodi



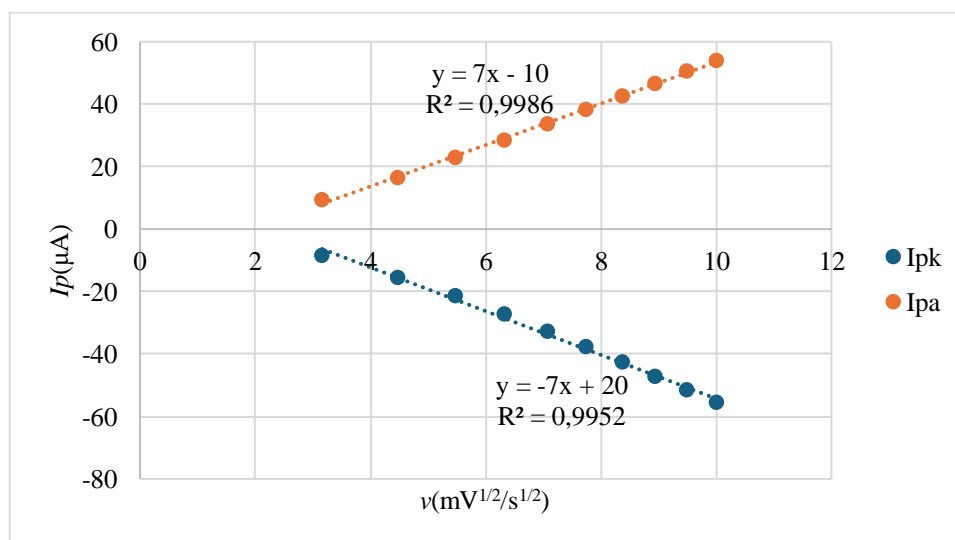
Slika 33: Aktivacija sloja berlinskog modrila na sitotiskanoj elektrodi (2; 5; 10; 15. i 20. ciklus) (20 min)

Struje se povećavaju duljom ciklizacijom jer se sloj na elektrodi aktivira. Nakon 20. ciklusa, struje su bile dvostruko veće u odnosu na 10 min depozicije na sitotiskanoj elektrodi. Zbog dulje depozicije dolazi do deponiranja veće količine berlinskog modrila, a time i do veće razlike potencijala pikova uslijed većeg otpora nevodljivog berlinskog modrila na elektrodi.



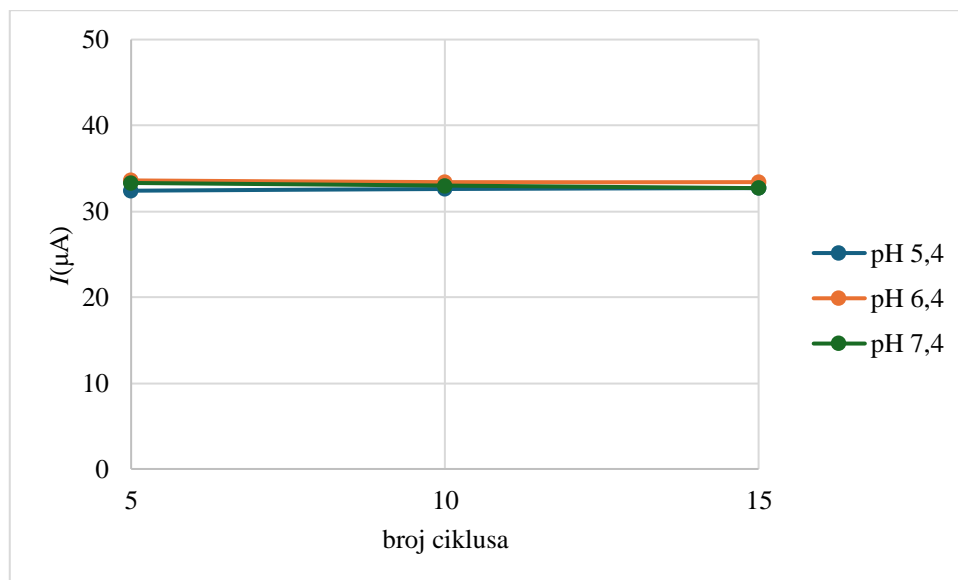
Slika 34: Ciklički voltamogrami pri različitim brzinama promjene potencijala (5. ciklusi) na sitotiskanoj elektrodi (20 min)

Rezultati su prilično slični kao i za 10 min depoziciju, ali su struje veće za 20 min depozicije za istu brzinu promjene potencijala zbog više elektroaktivne tvari na elektrodi.



Slika 35: Graf ovisnosti katodnih i anodnih strujnih vrhova o korijenu brzine promjene potencijala za sitotiskanu elektrodu (20 min)

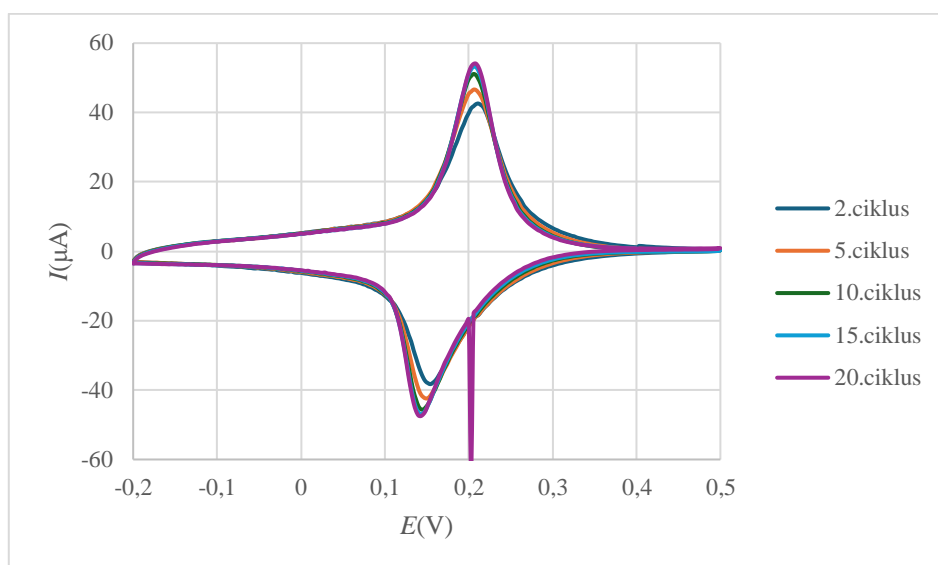
I dalje je reakcija pod difuzijskom kontrolom, a vidimo da je linearnost strujnih vrhova sa korijenom brzine promjene potencijala još povećana što pokazuje da je transport kalijevih iona do elektrode usporeniji. Za dulje depozicije i manje brzine promjene potencijala općenito je reakcija više pod kontrolom difuzije, nego pod kontrolom izmjene naboja [19].



Slika 36: Graf ovisnosti apsolutnih vrijednosti katodnih strujnih vrhova o broju ciklusa u puferima pH 5,4; 6,4 i 7,4

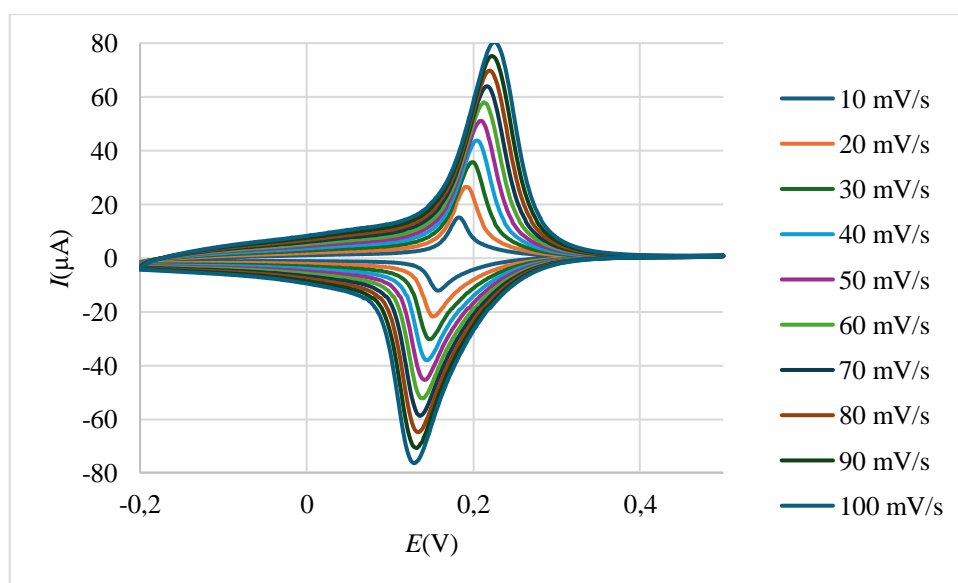
Za 20-minutnu depoziciju berlinskog modrila na sitotiskanoj elektrodi, katodne struje bile su veće u odnosu na 10-minutnu depoziciju. Struje su skoro pa jednake u sva tri fosfatna pufera, što pokazuje da je sloj modrila vrlo stabilan nakon 15 ciklusa.

60 minuta depozicije na sitotiskanoj elektrodi



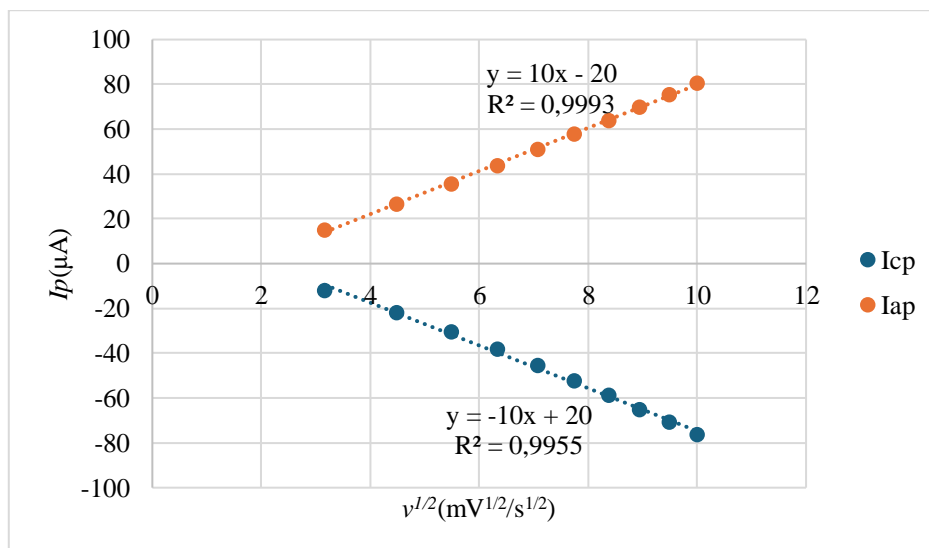
Slika 37: Graf aktivacije sloja berlinskog modrila na sitotiskanoj elektrodi u KCl (2; 5; 10 i 15. ciklus) (60 min)

Najniža katodna struja za 60-minutnu depoziciju bila je $-50 \mu\text{A}$, dok je za 20-minutnu iznosila $-35 \mu\text{A}$. Opet je razlog tome dulja depozicija, čime je još više elektroaktivne tvari na elektrodi prisutno pa su veće struje. Struje ponovno rastu s brojem ciklusa.

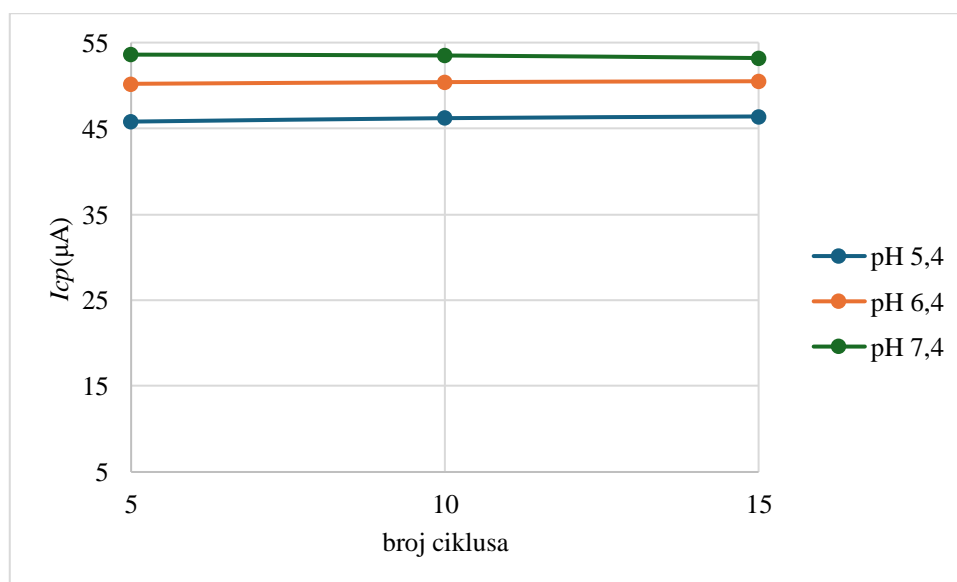


Slika 38: Ciklički voltamogrami pri različitim brzinama promjene potencijala na sitotiskanoj elektrodi (60 min)

Razlika potencijala strujnih vrhova ponovno je veća, budući da je nakon 60 minuta depozicije sloj berlinskog modrila najdeblji pa je najveći otpor u sustavu. Reakcija je još više pod difuzijskom kontrolom, što vidimo na slici 39; R^2 je najbliže 1 što znači da su rezultati najlinearniji. Struje rastu s povećanjem v što znači da se sloj ne otapa te je stabilan na elektrodi.



Slika 39: Graf ovisnosti anodnih i katodnih strujnih vrhova o korijenu brzine promjene potencijala (60 min)

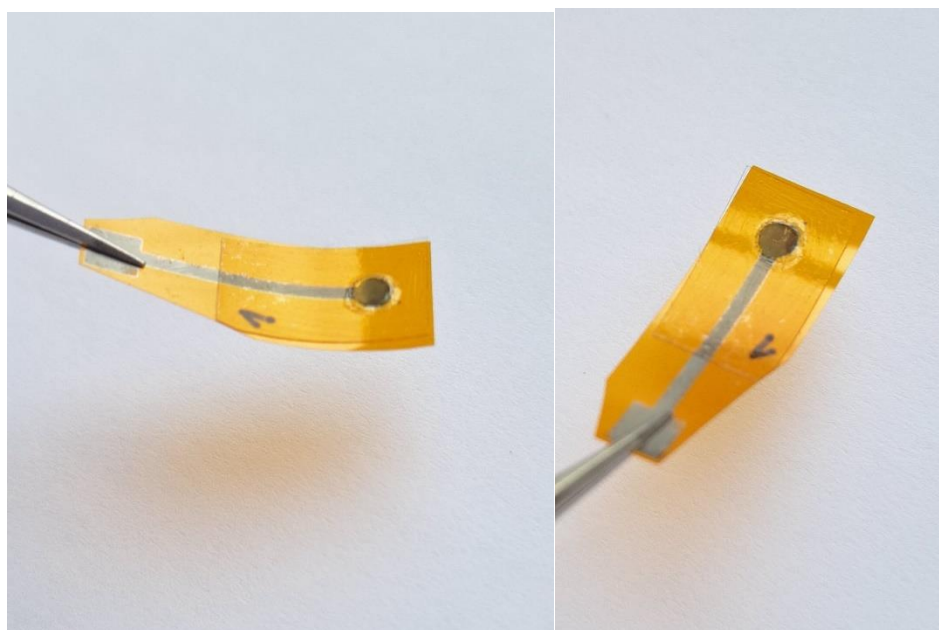


Slika 40: Graf ovisnosti apsolutnih vrijednosti katodnih struja o broju ciklusa u puferima pH 5,4; 6,4 i 7,4 (60 min)

Zanimljivo je primijetiti da su u slučaju 60-minutne depozicije struje bile veće čak i u puferu pH 7,4, što ukazuje na izrazitu stabilnost sloja. U svim fiziološkim pH je sloj bio vrlo stabilan nakon 15 ciklusa te nije bilo značajnog pada struje.

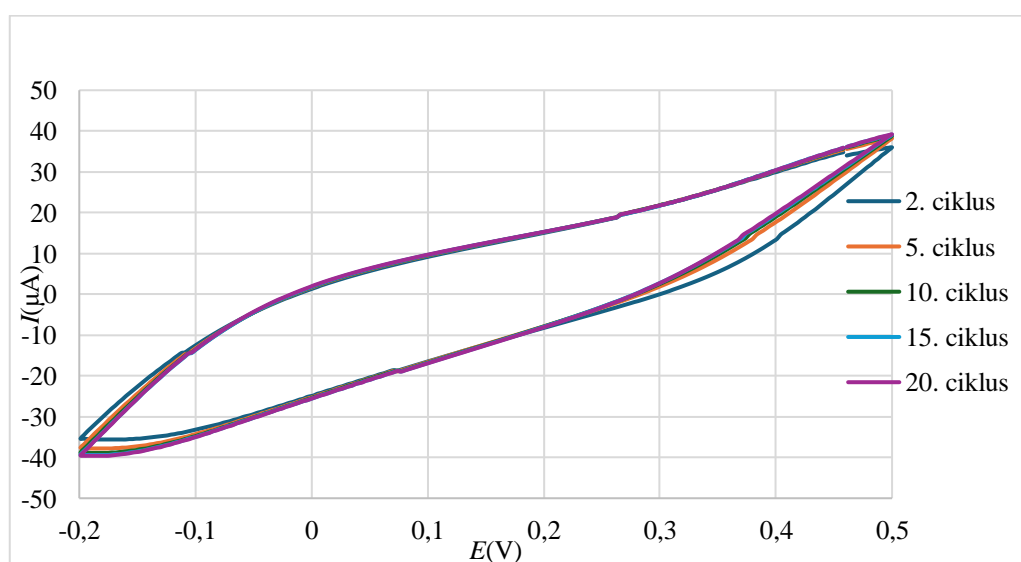
4.1.3. Inkjet ispisane elektrode

10 minuta depozicije na *inkjet* ispisanu elektrodu



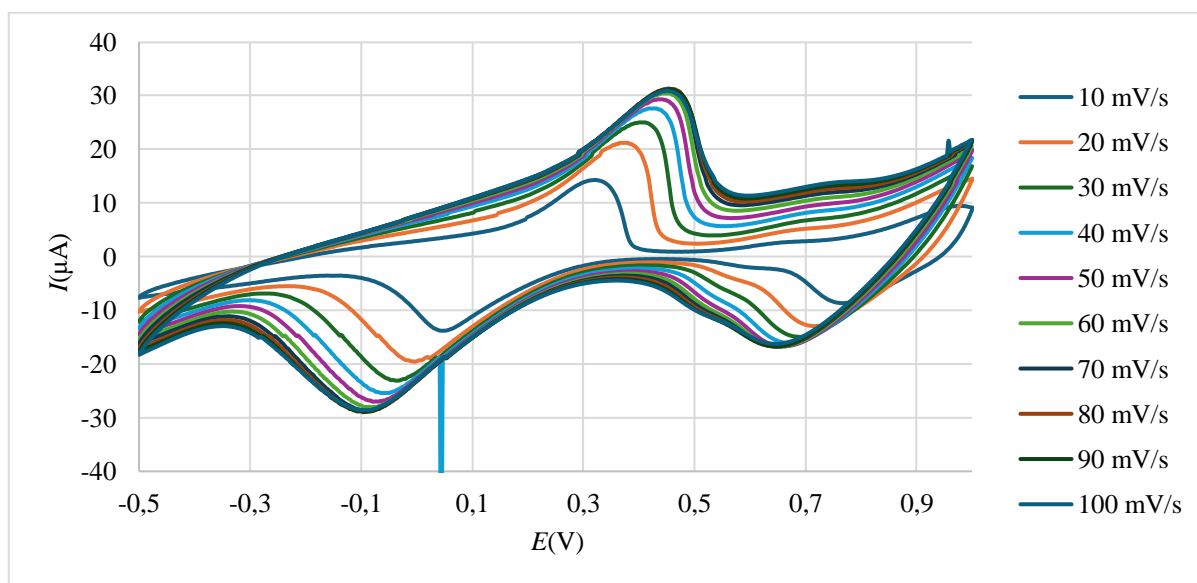
Slika 41: *Inkjet* ispisane elektrode modificirane berlinskim modrilom (10 minuta depozicije)

Nakon 10 minuta depozicije, sloj berlinskog modrila nije bio toliko uočljiv na *inkjet* ispisanoj elektrodi, ali je vidljiv zelenkastoplavi odsjaj.



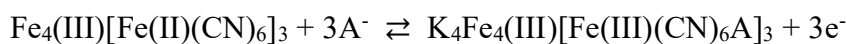
Slika 42: Graf aktivacije sloja berlinskog modrila na *inkjet* ispisanoj elektrodi u KCl (2; 5; 10; 15. i 20. ciklus) (10 min depozicije)

Budući da je *inkjet* ispisana elektroda zapravo tanki sloj vodljivog grafena isprintan na poliimidu, otpor deponiranog berlinskog modrila prilično utječe na vodljivost u takvom sustavu. Za ispisivanje elektrode korišten je jedan sloj tinte te je sloj berlinskog modrila je čak i nakon 10-minutne depozicije predebeo, odnosno otpor je prevelik, kako bi se anodni i katodni vrhovi vidjeli u rasponu potencijala od -0,2 V do 0,5 V. Zato se u aktivaciji, na slici 42, u tom rasponu ne vide karakteristični vrhovi jer se reakcija oksidacije odvija na višim potencijalima, a reakcija redukcije na još nižim.



Slika 43.: Ciklički voltamogrami pri različitim brzinama promjene potencijala na *inkjet* ispisanoj elektrodi (3.ciklusi) (10 min)

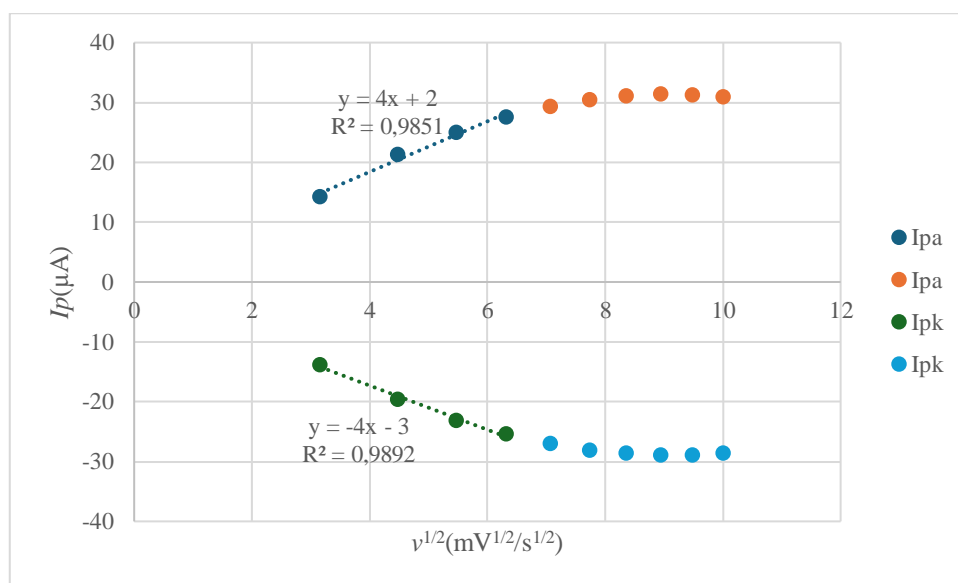
Ciklički voltamogrami pri različitim brzinama promjene potencijala na *inkjet* ispisanoj elektrodi snimljeni su u rasponu potencijala od -0,5 V do 1 V jer se u rasponu potencijala u kakvom su snimane ostale elektrode odzivi ne vide za *inkjet* ispisanu. Također su snimana tri ciklusa za svaki v jer je sloj manje stabilan pa bi možda došlo do otapanja sloja pri većem broju ciklusa. Prvi anodni vrhovi (na oko 0,5 V) posljedica su oksidacije berlinskog bijelog u berlinsko modrilo, kao i prije. Drugi anodni vrhovi posljedica su oksidacije berlinskog modrila u njegov oksidirani oblik, berlinsko zeleno. Ta reakcija prikazuje se jednadžbom:



netopljivo berlinsko modrilo

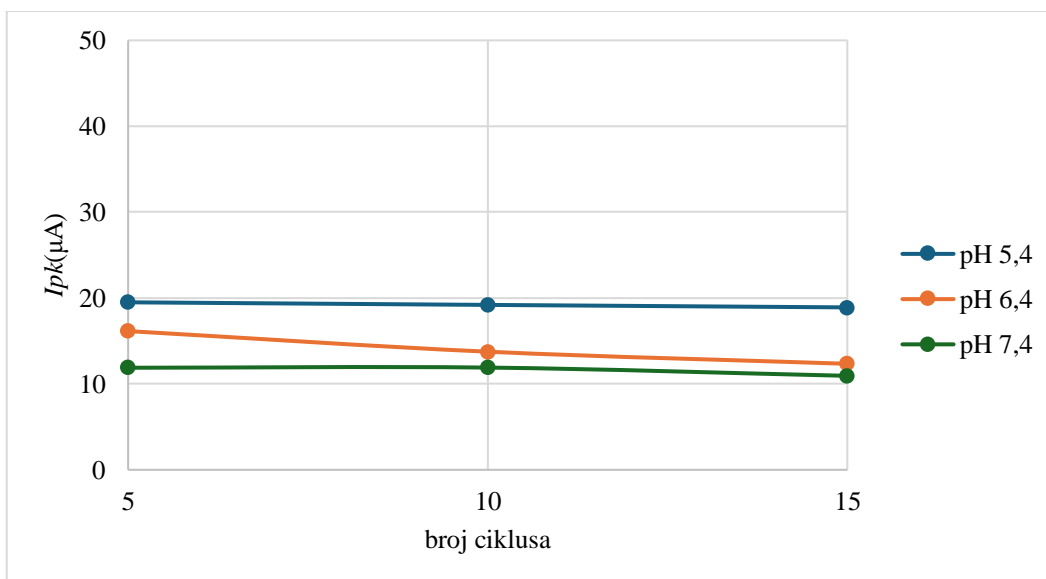
berlinsko zeleno

Isto tako vide se i dva katodna vrha (za svaku brzinu promjene potencijala). Pri vraćanju potencijala od pozitivnih prema negativnima, na oko 0,7 V vidi se reakcija redukcije berlinskog zelenog u berlinskog modrilo, dok su drugi katodni vrhovi na oko -0,2 V i posljedica su redukcije berlinskog modrila u berlinsko bijelo. Vidljivi su prilični pomaci u strujnim vrhovima s povećanjem brzine promjene potencijala te je reakcija kvazireverzibilna. Razlika potencijala između oksidacije berlinskog modrila u berlinsko zeleno i redukcije berlinskog zelenog u berlinsko modrilo su čak oko 0,3 V za brzinu promjene potencijala od 50 mV/s. Struje su znatno manje nego na GC elektrodi, a otprilike su iste kao na sitotiskanoj elektrodi za jednako vrijeme depozicije.



Slika 44: Graf ovisnosti anodnih i katodnih strujnih vrhova o korijenu brzine promjene potencijala (10 min)

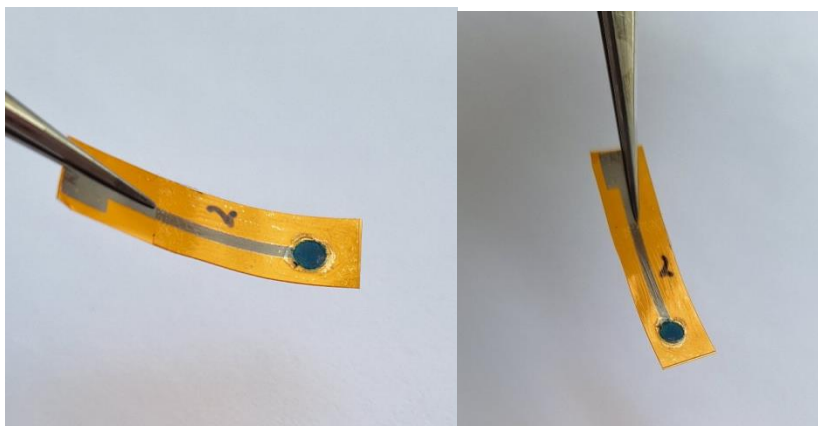
Na *inkjet* ispisanim elektrodama vidi se manja linearnost pozitivnih tj. anodnih strujnih vrhova i negativnih tj. katodnih strujnih vrhova o korijenu brzine promjene potencijala. Reakcije su manje pod difuzijskom kontrolom, a struje nakon 70 mV/s počinju stagnirati kao posljedica paralelnog efekta povećanja brzine promjene potencijala zbog kojeg rastu struje, ali i otapanja sloja berlinskog modrila zbog kojeg bi struje padale. Budući da su prisutna ta dva efekta, struje stagniraju. Pri manjim brzinama promjene potencijala reakcije su reverzibilnije te su pod difuzijskom kontrolom, dok su za više v reakcije pod kontrolom izmjene naboja te su strujni vrhovi linearniji sa brzinom promjene potencijala, a ne korijenom brzine kao što je slučaj za reverzibilne reakcije.



Slika 45: Graf ovisnosti apsolutnih katodnih struja o broju ciklusa u puferima pH 5,4; 6,4 i 7,4 (10min)

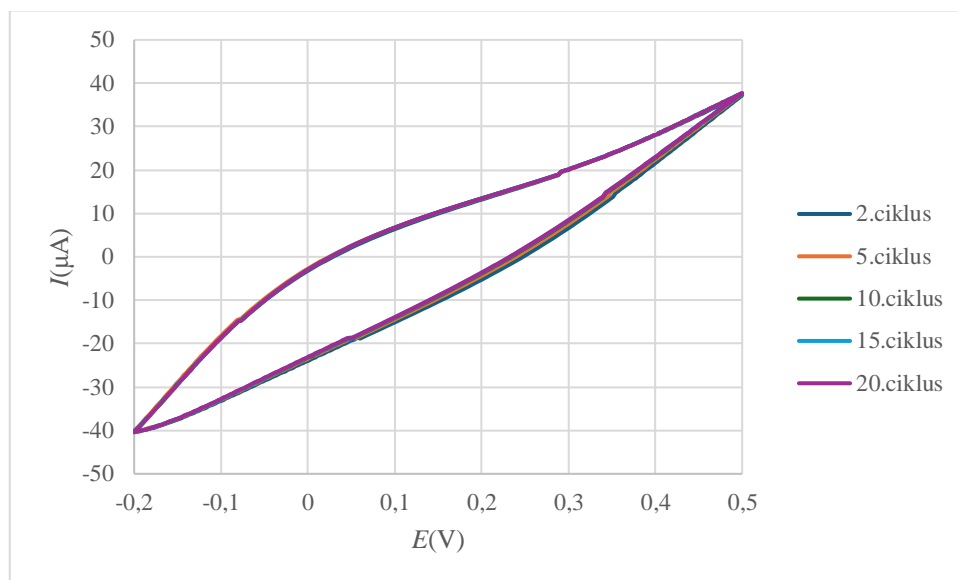
Na *inkjet* ispisanim elektrodama strujni vrhovi u pH 6,4 su bili manji nego u pH 5,4 što znači da se sloj prestao aktivirati, ali struje su i dalje vrlo malo padale u 15 provedenih ciklusa u svim puferima, što pokazuje da je sloj bio prilično stabilan tijekom pojedinog mjerenja. Struje su bile dvostruko manje u puferu pH 7,4 u odnosu na pufer pH 5,4, dok su na sitotiskanoj elektrodi za isto vrijeme depozicije struje bile jednake u svim pH, a na GC elektrodi čak malo više u puferu pH 6,4. no, i u slučaju *inkjet* printane elektrode, sloj je bio prilično stabilan nakon 15 ciklusa.

20 minuta depozicije na *inkjet* ispisanu elektrodu



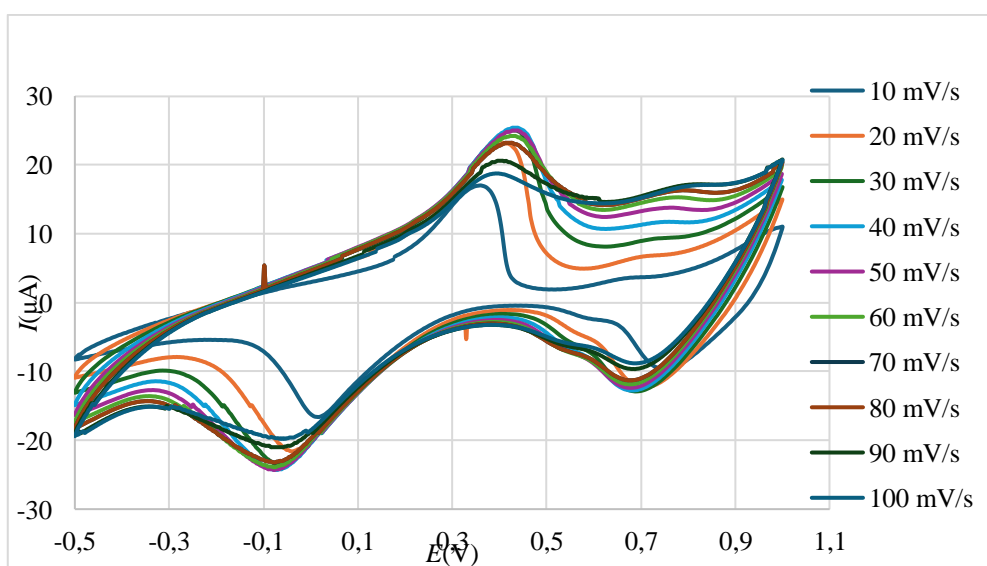
Slika 46: *Inkjet* ispisane elektrode modificirane berlinskim modrilom (20 min)

Nakon 20 minuta depozicije, sloj berlinskog modrila je bio vidljiv na elektrodi i to kao plavi sloj.



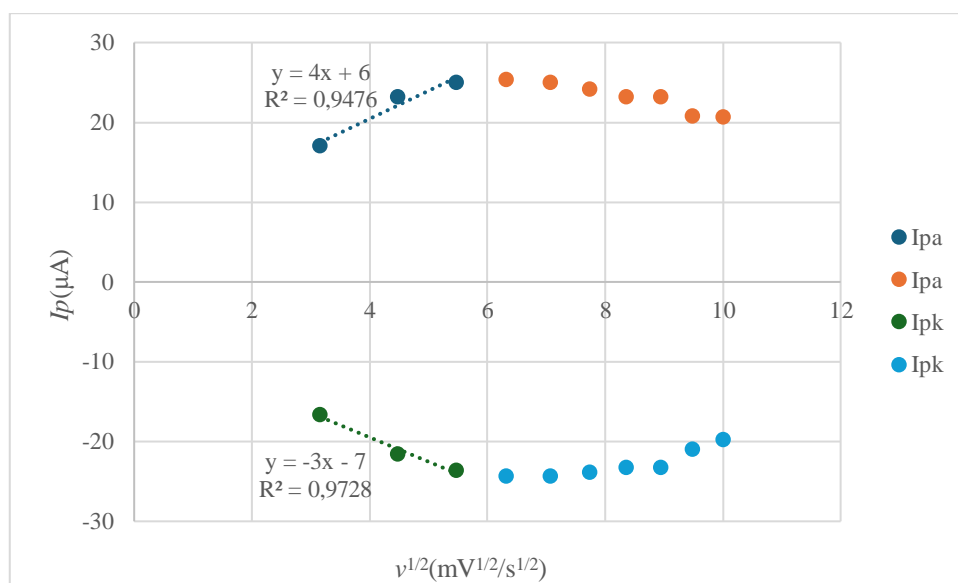
Slika 47: Graf aktivacije sloja berlinskog modrila na *inkjet* ispisanjoj elektrodi u KCl (2; 5; 10; 15. i 20. ciklus)(20 min)

Budući da 20-minutnom depozicijom nastaje deblji sloj berlinskog modrila na elektrodi nego u 10-minutnoj depoziciji, električni otpor je još veći te nije moguće vidjeti strujne vrhove u rasponu potencijala od -0,2 V do 0,5 V



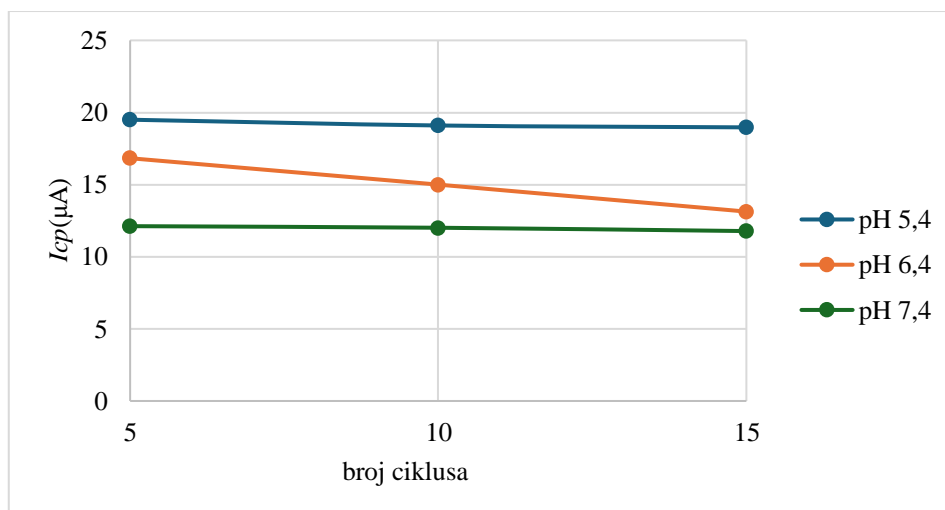
Slika 48: Ciklički voltamogrami pri različitim brzinama promjene potencijala (20 min)

Na cikličkim voltamogramima na slici 48 vidi se pad anodnih i katodnih struja pri brzinama promjene potencijala većim od 70 mV/s. To je posljedica otapanja sloja, čime je prisutno manje aktivne tvari za ulazak kalijevih iona u rešetke te su struje manje. Razlika potencijala strujnih vrhova je prilično velika, pogotovo za veće brzine promjene potencijala, a drugi anodni strujni vrh se za veće brzine promjene potencijala zbog toga ni ne vidi jer se oksidacija berlinskog modrila u berlinsko zeleno odvija pri još većim potencijalima od 1 V.



Slika 49: Graf ovisnosti strujnih vrhova o korijenu brzine promjene potencijala (20 min)

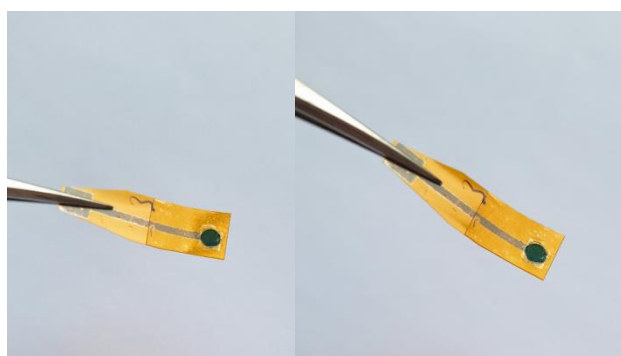
Linearnost je prisutna samo u prva tri strujna vrha, što znači da je sustav pod difuzijskom kontrolom (kontrolom transporta kalijevih iona u rešetku) samo pri brzinama promjene potencijala do 30 mV/s. Struje nakon toga počinju padati što je posljedica otapanja sloja, a sustav je više pod kontrolom izmjene naboja, nego pod kontrolom transporta tvari. Čak i pri manjim brzinama promjene potencijala, linearnost nije dobra kao na GC ili sitotiskanoj elektrodi jer je R^2 svega 0,95 za anodne struje.



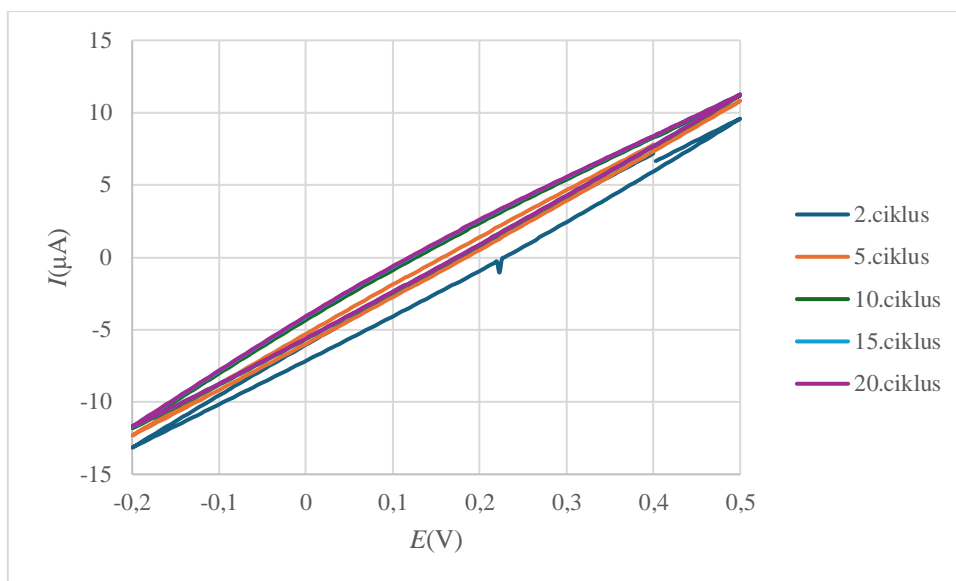
Slika 50: Graf ovisnosti apsolutnih vrijednosti katodnih strujnih vrhova o broju ciklusa u puferima pH 5,4; 6,4 i 7,4 (20 min)

Graf pH-ovisnosti je prilično sličan kao za 10-minutnu depoziciju. Struje su stabilne u puferu pH 5,4, no ne rastu kao za druge elektrode. Svakim sljedećim mjerenjem struje se smanjuju zbog otapanja sloja berlinskog modrila. U puferu pH 6,4 struje su pale za 5 μA nakon 15 ciklusa, što je dokaz prilično loše stabilnosti sloja. U puferu pH 7,4 struje su bile najmanje, međutim bile su konstante tijekom 15 ciklusa.

60 minuta depozicije na *inkjet* ispisanu elektrodu

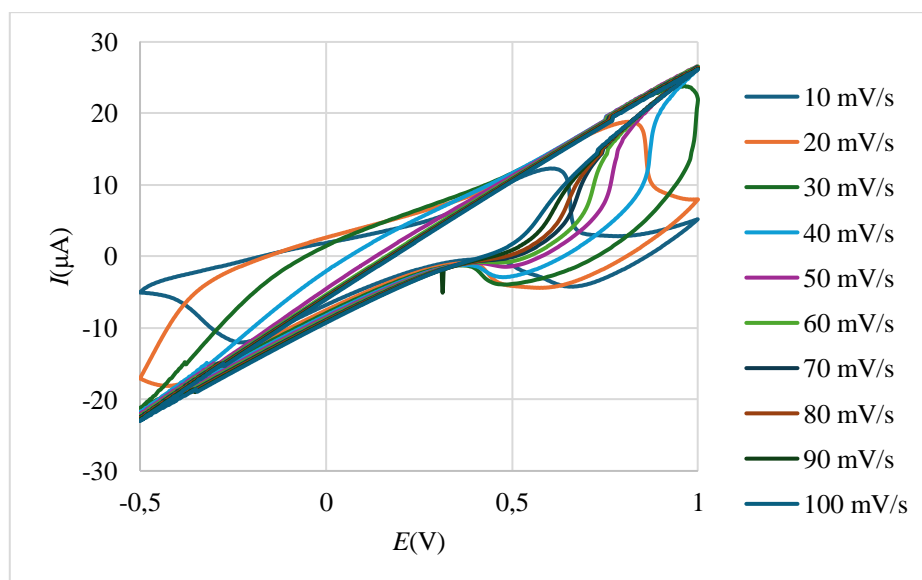


Slika 51: *Inkjet* ispisana elektroda modificirana berlinskim modrilom (60 minuta depozicije)



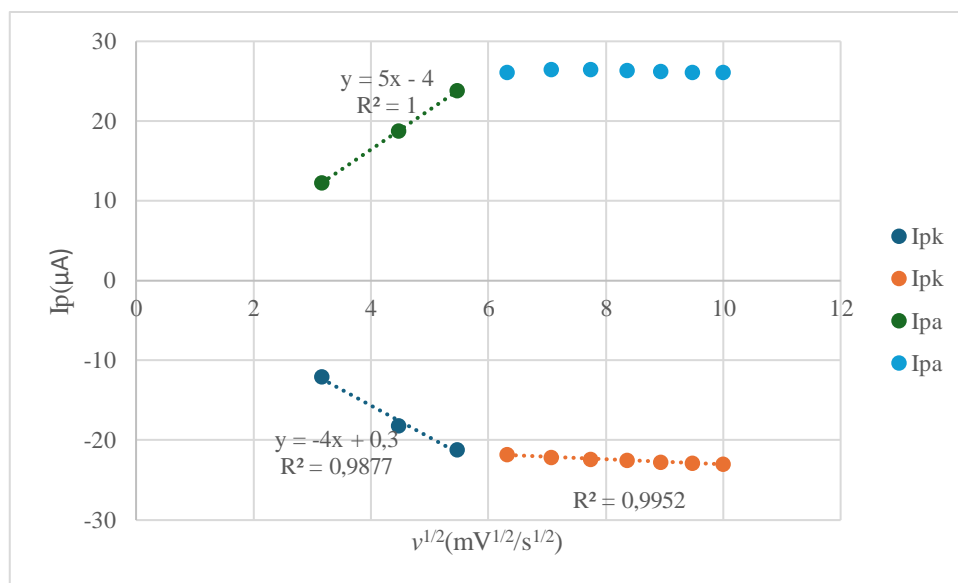
Slika 52: Graf aktivacije sloja berlinskog modrila na *inkjet* ispisanjoj elektrodi u KCl (2; 5; 10; 15. i 20. ciklus) (60 min depozicije)

Na cikličkim voltamogramima aktivacije vidljivo je da strujni vrhovi nisu ni približno vidljivi u rasponu potencijala od -0,2 V do 0,5 V. Otpor je prevelik da bi se elektroda mogla elektrokemijski karakterizirati jer je nevodljivi sloj berlinskog modrila predebeo.



Slika 53: Ciklički voltamogrami pri različitim brzinama promjene potencijala (3. ciklusi) (60 min depozicije)

Za 60-minutnu depoziciju i na slici broj 53 može se uočiti koliko je otpor velik. Za snimanja cikličkih voltamograma pri brzinama promjene potencijala većima od 60 mV/s, strujni vrhovi oksidacije i redukcije nisu uočljivi čak ni za raspon potencijala od -0,5 V do 1V. Da bi se ti vrhovi vidjeli, trebao bi se dodatno proširiti raspon potencijala, a onda bi pri višim potencijalima došlo do razvijanja kisika, a pri nižim do razvijanja vodika.



Slika 54: Graf ovisnosti anodnih i katodnih strujnih vrhova o korijenu brzine promjene potencijala (60 min)

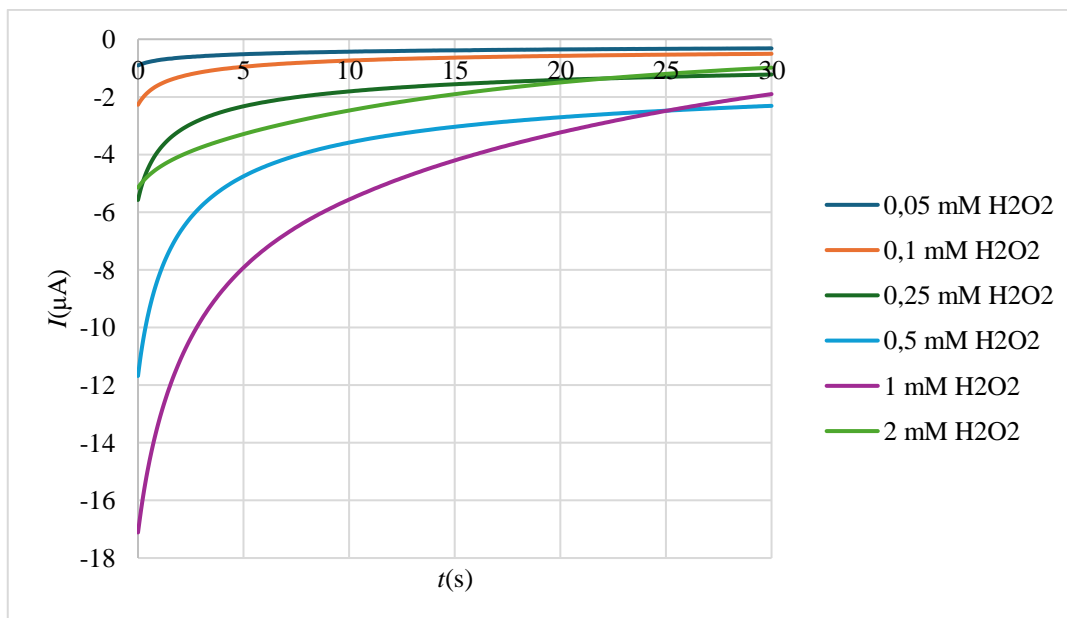
Ponovno se uočava da su strujni vrhovi linearni sa korijenom brzine promjene potencijala do 30 mV/s te nakon toga struje stagniraju, a čak i padaju. Do 30 mV/s, anodni strujni vrhovi su u potpunosti pod difuzijskom kontrolom što pokazuje $R^2=1$. Pri nižim brzinama promjene potencijala, reakcije na elektrodi su pod difuzijskom kontrolom, ali pri višim brzinama promjene potencijala dolazi do stagnacije i zatim pada jakosti struje, što je posljedica otapanja sloja berlinskog modrila na elektrodi.

Ciklički voltamogrami u različitim pH nisu bili snimani za 60-minutnu depoziciju na *inkjet* ispisanu elektrodu jer se sloj počeo otapati već u KCl-u te se ne bi vidjeli strujni vrhovi u željenom rasponu potencijala.

4.2. Amperometrijska detekcija vodikovog peroksida

4.2.1. Komercijalne sitotiskane elektrode

10 minuta depozicije na sitotiskanoj elektrodi



Slika 55: Kronoamperogrami u otopinama H_2O_2 različitih koncentracija snimljen na -0,1 V za sitotiskanu elektrodu (10 min)

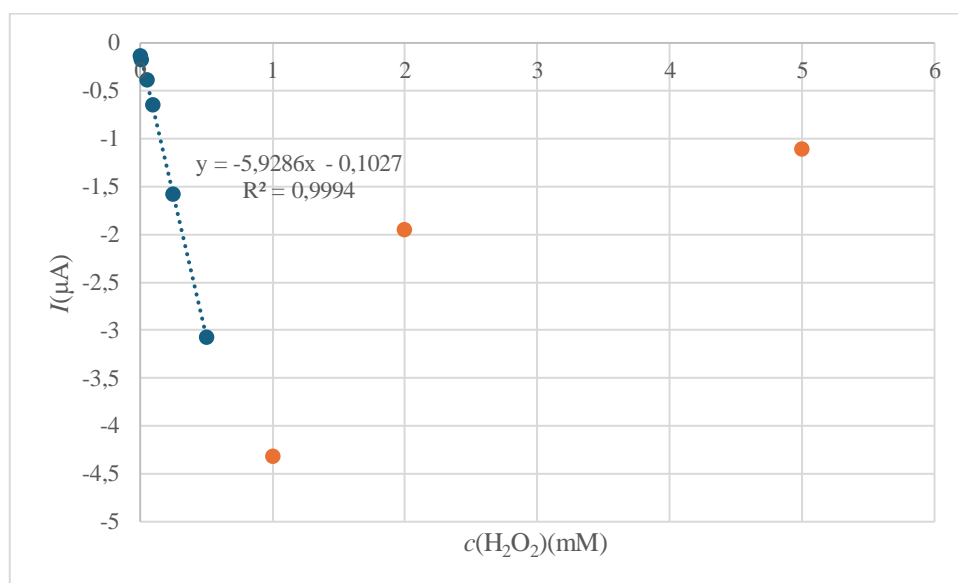
Prvo se treba razumijeti zašto je kronoamperogram bio snimljen na -0,1 V. Cilj svakog biosenzora je što veća osjetljivost, linearno područje, ali i što manja granica detekcije. Najmanja granica detekcije postiže se na negativnom potencijalu blizu katodnog strujnog vrha, ali na mjestu gdje je sigurno prisutno samo berlinsko bijelo na elektrodi. Berlinsko bijelo je potrebno jer upravo ono reducira vodikov peroksid, a sebe oksidira u berlinsko modrilo. Za sve sitotiskane elektrode, odabrani potencijal bio je -0,1 V prema Ag/AgCl elektrodi jer je tamo prisutno berlinsko bijelo, a nema šumova tijekom snimanja.

Na kronoamperogramu uočljivi su sve veći nagibi za veće koncentracije vodikovog peroksida. Katodne struje su sve negativnije, odnosno odziv je sve veći tijekom redukcije vodikovog peroksida u otopini. Tijekom snimanja kronoamperograma reakcije u sustavu su:



berlinsko bijelo

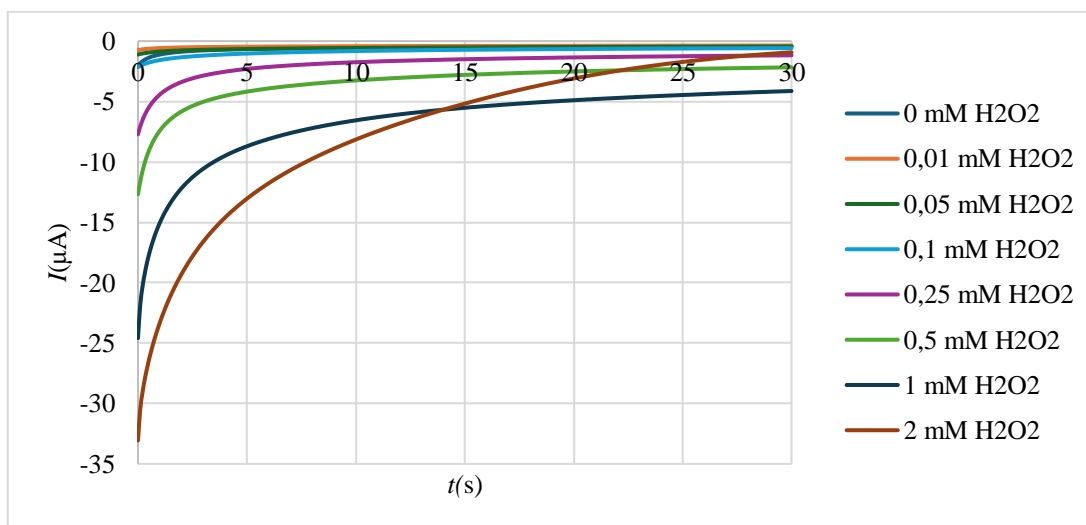
netopljivo berlinsko modrilo



Slika 56: Kalibracijski dijagram za H_2O_2 otopine različitih koncentracija (10 min) (očitano nakon 15 sekundi snimanja)

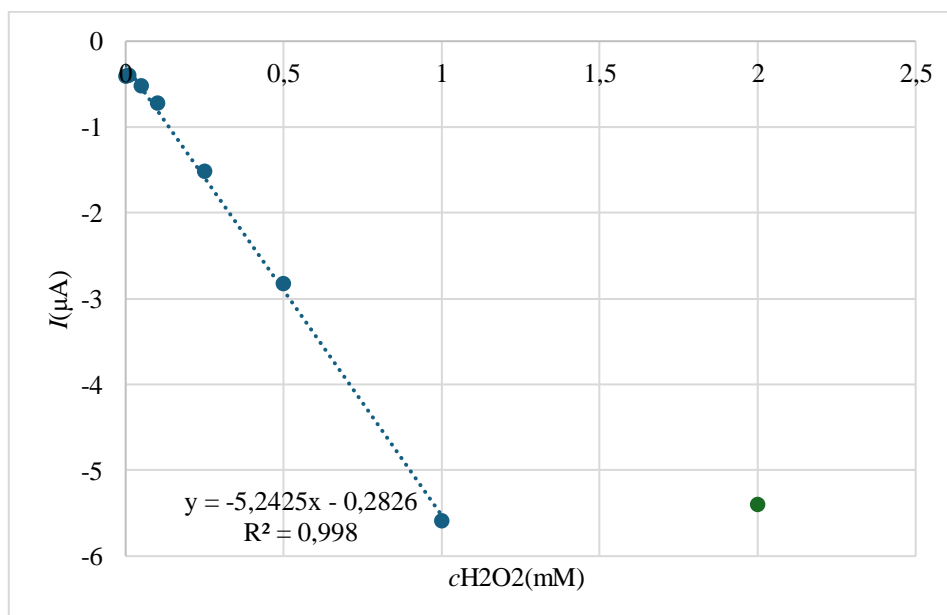
Kalibracijski dijagram prikazuje ovisnost katodnih struja o koncentraciji vodikovog peroksida. Na kalibracijskom dijagramu vidljiva je prilično dobra linearnost do 0,5 mM otopine H_2O_2 ($R^2=0,9994$). Granica detekcije bila je 0,1 mM otopina H_2O_2 , a osjetljivost 5,9 $\mu\text{A}/\text{mM}$. Nakon 1mM otopine, sloj Berlinskog modrila na elektrodi se počeo otapati te je struja naglo narasla sa -4,3 μA na -1,9 μA zbog nastajanja OH^- iona u sustavu.

20 minuta depozicije na sitotiskanoj elektrodi



Slika 57: Kronoamperogrami u otopinama H_2O_2 različitih koncentracija snimljeni na $-0,1\text{ V}$ na sitotiskanoj elektrodi (20 min)

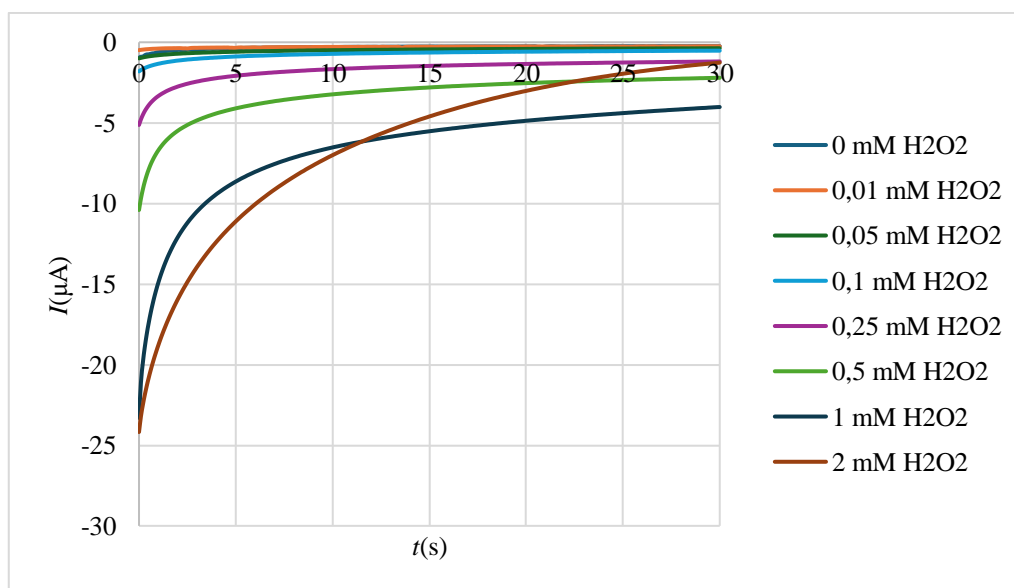
I ovi kronoamperogrami su bili snimljeni na $-0,1\text{ V}$. Odziv je bio prilično sličan, ali je primjetno da su katodne struje bile dvostruko veće zbog više elektroaktivne tvari. Kronoamperogram u 2 mM H_2O_2 preklapao se sa drugim krivuljama što je pokazatelj da se sloj na elektrodi otopio.



Slika 58: Kalibracijski dijagram za H_2O_2 otopine različitih koncentracija (20 min) (očitano nakon 15 sekundi snimanja)

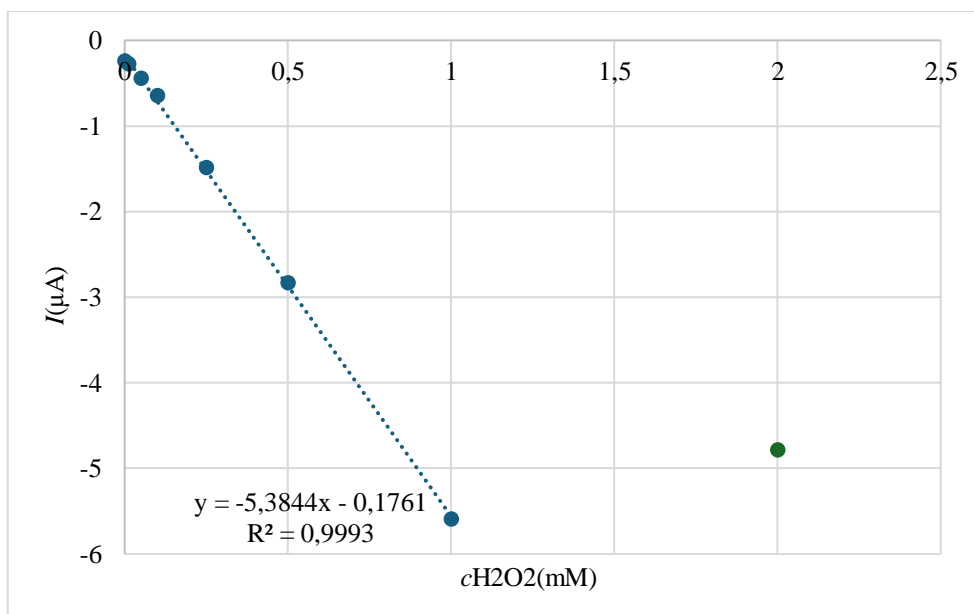
Na kalibracijskom dijagramu za 20-minutnu depoziciju vidi se bolja linearnost, a sada do 1 mM otopine H_2O_2 . Najniža granica detekcije bila je 0,05 mM H_2O_2 , što je niže u odnosu na 10-minutnu depoziciju. Osjetljivost je iznosila je 5,24 $\mu\text{A}/\text{mM}$. Također, vidi se da su struje tijekom snimanja kronoamperograma za 2 mM otopinu H_2O_2 manje narasle, nego u 10-minutnoj depoziciji što pokazuje da se sloj manje otopio i da je stabilniji.

60 minuta depozicije na sitotiskanoj elektrodi



Slika 59: Kronoamperogrami u otopinama H_2O_2 različitih koncentracija snimljeni na -0,1 V na sitotiskanoj elektrodi (60 min)

Kronoamperogrami za 60-minutnu depoziciju slični su kao za 20-minutnu, uz malo većestruje.

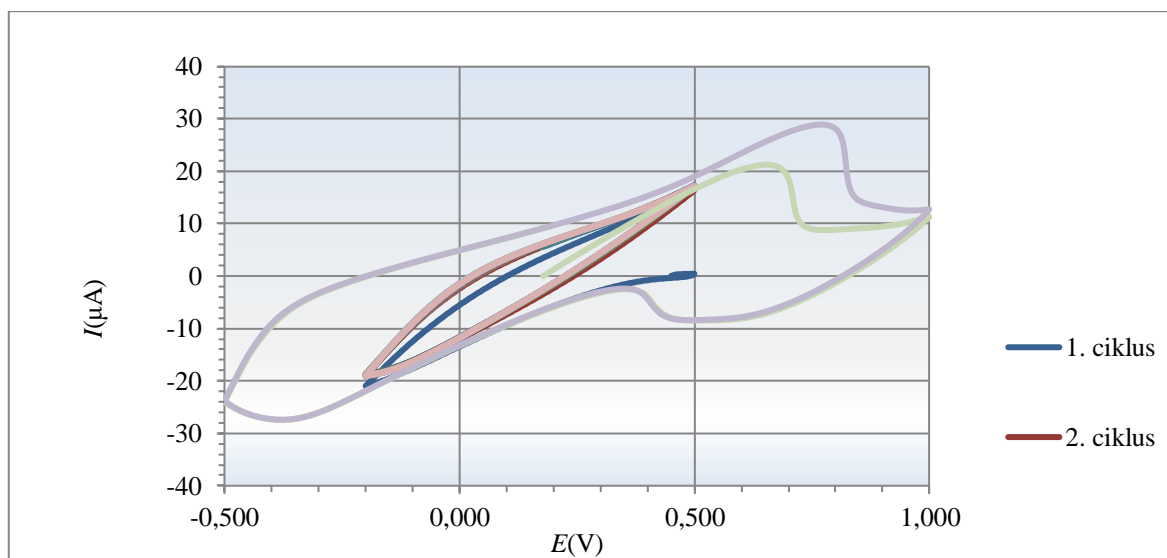


Slika 60: Kalibracijski dijagram u otopinama H₂O₂ različitih koncentracija (60 min) (očitano nakon 15 sekundi snimanja)

60-minutna depozicija pokazala je najbolju linearnost u rasponu od 0,01 mM H₂O₂ do 1 mM H₂O₂. R² bio je 0,9993 što je skoro potpuno linearno. Granica detekcije bila je ponovno 0,05 mM otopina H₂O₂. osjetljivost ovog potencijalnog biosenzora bila je 5,38 μA/mM što je više nego za 10-minutnu i 20-minutnu depoziciju. U 2 mM otopini se sloj ipak malo više otopio za razliku od 20-minutne depozicije, što se vidi po tome što je katodna struja bila pozitivnija u 2 mM otopini.

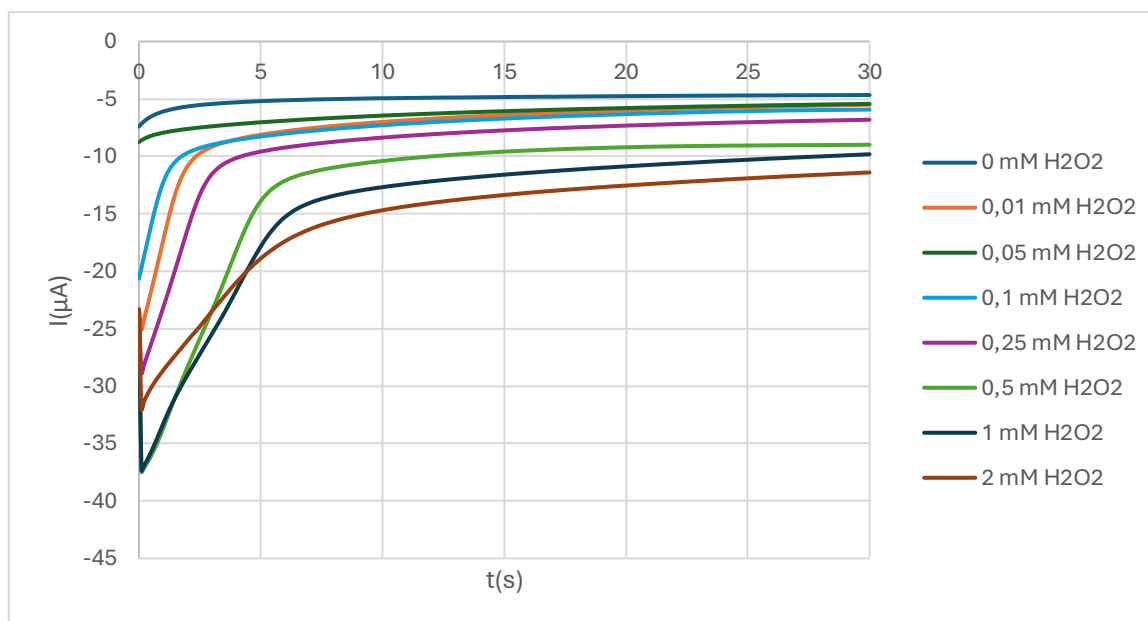
4.2.2. Inkjet ispisane elektrode

10 minuta depozicije na *inkjet* ispisanu elektrodu



Slika 61: Aktivacija sloja berlinskog modrila na *inkjet* ispisanoj elektrodi u KCl prije kalibracije u otopinama H₂O₂ (10 min)

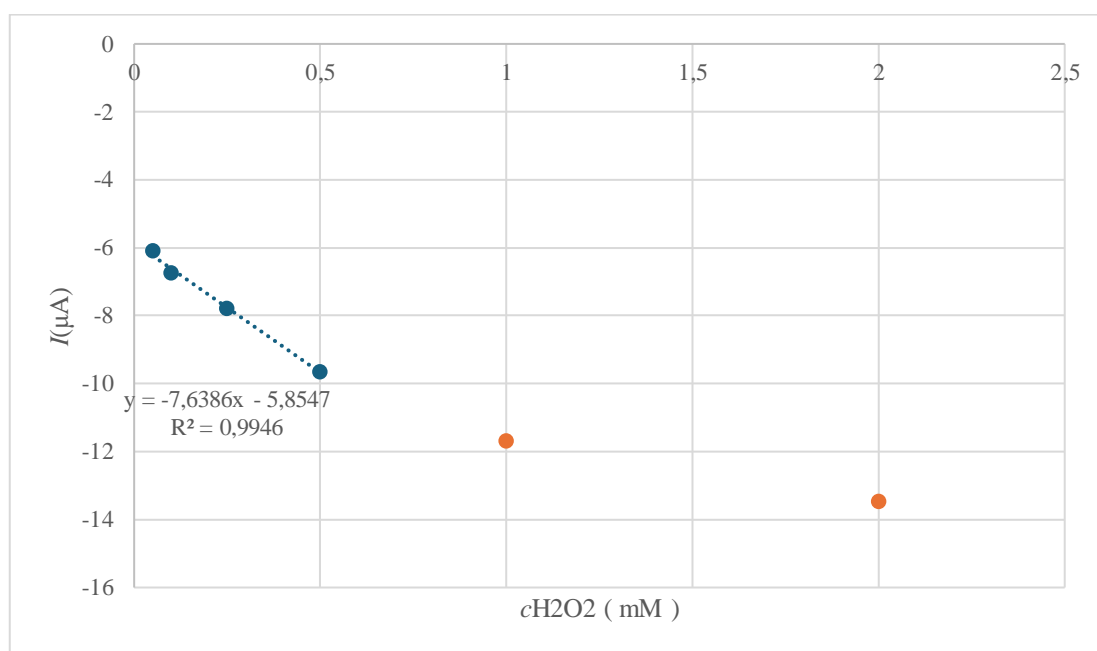
Aktivacija sloja, odnosno ciklička voltometrija u KCl provedena je prije kalibracije na *inkjet* ispisanim elektrodama kako bi se odredio potencijal pri kojem će se snimati kronoamperogrami, s obzirom da bi potencijal trebao biti onaj pri kojem je u sustavu prisutno samo berlinsko bijelo



Slika 62: Kronoamperogrami u otopinama H₂O₂ različitih koncentracija snimljeni na -0,5 V na *inkjet* ispisanoj elektrodi (10 min)

Kronoamperogrami na inkjet ispisanim elektrodama su snimljeni na -0,5 V jer se pri tom potencijalu na elektrodi sigurno nalazi berlinsko bijelo te nema šumova u signalima. Razlog pomaku prema negativnijem potencijalu je veći otpor u sustavu koji pomiče katodni strujni vrh prema negativnijim vrijednostima, što je vidljivo na slici 61. Veći otpor u sustavu posljedica je toga što je *inkjet* ispisana elektroda tanak sloj vodljivog grafena, a berlinsko modrilo je deblji, nevodljivi sloj na toj elektrodi.

Struje su veće (negativnije) za 10-minutnu depoziciju na inkjet ispisanoj elektrodi u odnosu na jednako dugačku depoziciju na sitotiskanoj elektrodi.

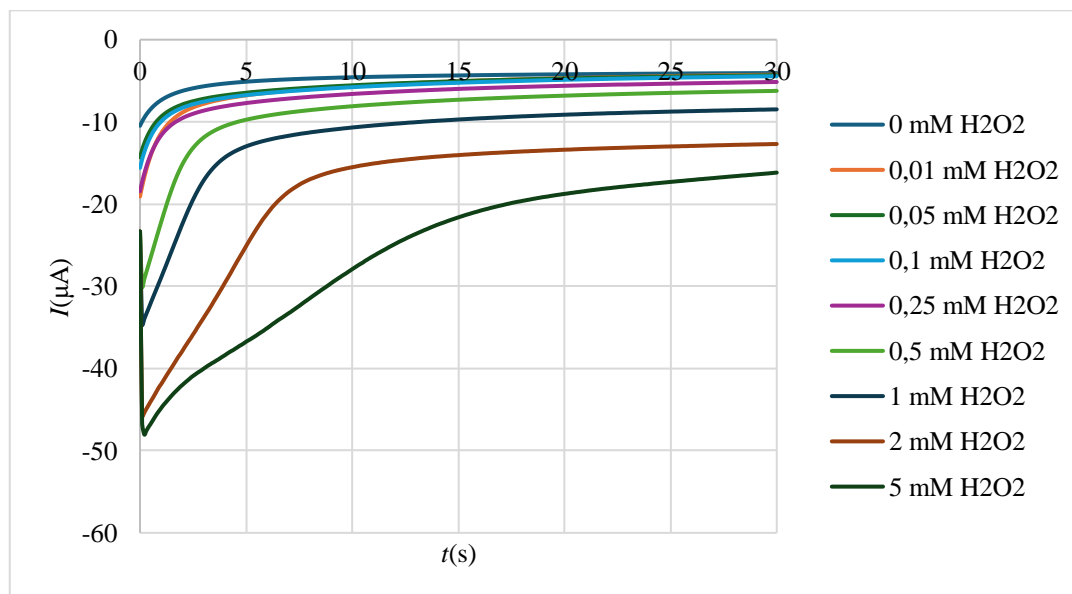


Slika 63: Kalibracijski dijagram u otopinama H_2O_2 različitih koncentracija (10 min) (očitano nakon 15 sekundi snimanja)

Kalibracijski dijagram za inkjet printanu elektrodu pokazao je dobru linearnost u području od 0,05 mM do 0,5 mM otopine H_2O_2 , a nešto lošiju do 1 mM otopine. R^2 iznosi 0,9946 u rasponu do 0,5 mM otopine, a do 1 mM iznosi 0,975. Struje su padale cijelo vrijeme, a granica detekcije bila je 0,01 mM otopina H_2O_2 , što je niža granica detekcije u odnosu na sitotiskane elektrode.

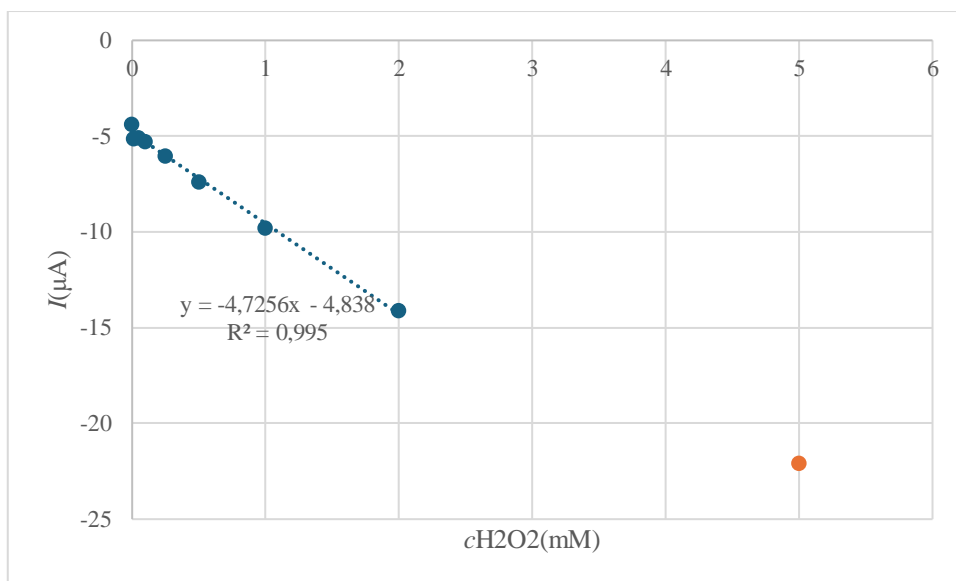
Osjetljivost je bila $7,64 \mu\text{A}/\text{mM}$, što je više nego na sitotiskanim elektrodama. Struje su bile veće u odnosu na 10-minutnu depoziciju na sitotiskanoj elektrodi.

20 minuta depozicije na *inkjet* ispisanu elektrodi



Slika 64: Kronoamperogrami u otopinama H_2O_2 različitih koncentracija snimljeni na $-0,5 \text{ V}$ na *inkjet* ispisanu elektrodi (20 min)

Vidljivo je na kronoamperogramima da se krivulje struje u ovisnosti o vremenu ne preklapaju, čak ni za 5 mM otopinu H_2O_2 . Nagibi rastu povećanjem koncentracije vodikovog peroksida, a ovaj kronoamperogram je također snimljen na $-0,5 \text{ V}$, budući da je otpor čak i veći nego na 10-minutnoj depoziciji.



Slika 65: Kalibracijski dijagram u otopinama H₂O₂ različitih koncentracija (20 min) (nakon 15 sekundi snimanja)

Važno je primijetiti da je kalibracija bila veoma uspješna, a graf je bio vrlo linearan u rasponu od 0,01 mM do 2 mM otopine, što je najveća linearnost od svih ispitivanja. R^2 bio je za taj dio 0,995, s time da nije previše pala linearnost ni do 5 mM otopine peroksida. Kalibracija je bila uspješna čak i za 5 mM otopinu H₂O₂, bez otapanja sloja zbog nastalih OH⁻ iona. Sloj je bio najstabilniji od svih, a granica detekcije je bila 0,01 mM otopina što je također i najmanja granica detekcije. Osjetljivost je bila nešto manja, a iznosila je 4,7 μA/mM.

Kronoamperometrija za 60-minutnu depoziciju nije bila snimljena jer je razmak strujnih vrhova bio prevelik te bi se kronoamperogrami trebali snimati pri pre niskom potencijalu.

ZAKLJUČAK

Berlinsko modrilo izvrstan je medijator u biosenzorima temeljenima na enzimima oksidaze jer njegov reducirani oblik (BM) katalizira redukciju vodikovog peroksida koji nastaje tijekom oksidacije biomolekule. Kemijskom depozicijom nastaje stabilan sloj berlinskog modrila koji se može deponirati na konvencionalne i printane elektrode. Kemijski deponirani slojevi berlinskog modrila karakterizirani su na elektrodi od staklastog ugljika, komercijalnim sitotiskanim elektrodama te *inkjet* ispisanim elektrodama. Elektrokemijski je sloj karakteriziran prvo cikličkom voltametrijom, kojom je pokazano da su reakcije na elektrodi kvazireverzibilne. Osim toga, reakcije na GC i sitotiskanim elektrodama su pod difuzijskom kontrolom jer su katodne struje ovisne o korijenu brzine promjene potencijala. Dokazano je da se produljenjem trajanja depozicije povećava razmak potencijala između strujnih vrhova, a time je i otpor u sustavu veći, budući da je berlinsko modrilo nevodljivo. No, za dulje depozicije, sloj je stabilniji u lužnatom pH što se primijetilo time da struje ne padaju tijekom 15 ciklusa u puferima različitih pH. Najstabilniji sloj bio je 60-minutna depozicija na sitotiskanoj elektrodi, gdje su struje čak i rasle u puferu pH 7,4, međutim na svim mjerenjima je sloj modrila bio stabilan nakon 15 ciklusa u različitim pH. Struje rastu produljenjem depozicije jer je prisutno više elektroaktivne tvari, a najveće struje bile su na GC elektrodi nakon 60 minuta depozicije. Nakon provedene cikličke voltetrije za printane elektrode provedena je kronoamperometrijska detekcija vodikovog peroksida. Komercijalna sitotiskana elektroda imala je visoku linearnost, pogotovo za dulje depozicije (20 i 60 minuta). No, sloj se otapao u 2 mM otopini vodikovog peroksida, dok se u 5 mM otopini sloj potpuno otapio. Najniža granica detekcije na sitotiskanoj elektrodi bila je 0,05 mM, a najveća osjetljivost 5,34 $\mu\text{A}/\text{mM}$ depoziciju od 60 min. *Inkjet* ispisane elektrode, predstavljale su problem u karakterizaciji jer je nevodljivi sloj berlinskog modrila za sva vremena depozicije bio predebeo u odnosu na materijal elektrode, a time otpor prevelik. Raspon potencijala snimanja cikličkih voltamograma morao se proširiti kako bi se vrhovi uopće vidjeli, no odzivi u kalibraciji su bili veoma dobri. No, najbolja kalibracija bila je upravo na *inkjet* ispisanoj elektrodi sa slojem deponiranim 20 min, na kojoj je linearnost bila velika, granica detekcije 0,01 mM, osjetljivost 4,7 $\mu\text{A}/\text{mM}$, a sloj je ostao stabilan na elektrodi i u 5 mM otopini H_2O_2 , što niti na jednoj drugoj elektrodi nije uspjelo. Najveća osjetljivost bila je na *inkjet* ispisanoj elektrodi uz 10-minutnu depoziciju te je iznosila 7,64 $\mu\text{A}/\text{mM}$. Dulja depozicija ima prednosti kao što su povećana stabilnost pri kalibraciji, proširenje linearnosti, smanjenje granice detekcije, no loša stvar je što je veći otpor u sustavu i otežana karakterizacija sloja te se treba proširiti raspon potencijala za snimanje.

POPIS SIMBOLA

BM= Berlinsko modrilo

BB= Berlinsko bijelo

BZ=Berlinsko zeleno

e^- = elektron

A^+ = ion

$E_r(V)$ =ravnotežni potencijal otopine

$E^0(V)$ = standardni potencijal otopine

R (J/molK) = opća plinska konstanta

T (K) = termodinamička temperatura

z = broj elektrona

F (C/mol) = Faradayeva konstanta

a (mol/dm³)=aktivitet

$E_{p,k}$ (V) = katodni strujni vrh

$E_{p,a}$ (V) = anodni strujni vrh

v (mV/s)= brzina promjene potencijala

A (cm²)= površina elektrode

D_0 (cm²/s)= difuzijski koeficijent

C_0 (mol/cm³)= koncentracija elektroaktivne vrste

J (A/cm²)=gustoća struje

J_0 (A/cm²)= gustoća struje izmjene

α = koeficijent prijelaza naboja

η (V)= prenapon

LITERATURA

- [1] Francesco Ricci, Danila Moscone, Giuseppe Palleschi, *Mediated enzyme screen-printed electrode probes for clinical, environmental and food analysis*, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 49 (2007.), 559-584
- [2] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, *Chemical Sensors, Definitions and Classification*, *Pure & Applied Chemistry*, **63(9)** (1991.) 1247-1250
- [3] I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Media Print, Tiskara Hrastić, Zagreb, 2010.
- [4] Bruen, D., Delaney, C., Florea, L., & Diamond, D., *Glucose Sensing for Diabetes Monitoring: Recent Developments*. *Sensors*, **17(8)**, (2017.) 1866
- [5] P. Kassal, Ž. Boček, *Razvoj i karakterizacija grafenskog čvrstog kontakta za inkjet ispisane ion-selektivne elektrode bez unutarnjeg elektrolita*, diplomski rad, Fakultet Kemijskog Inženjerstva i Tehnologije, Zagreb, 2022.
- [6] J.Wang, *Electrochemical glucose biosensors*, *Chemical Reviews*, **108** (2007) 814-825
- [7] V.Perumal, U. Hashim, *Advances in biosensors: Principle, architecture and applications*, *Journal of Applied Biomedicine*, **12(1)**, (2014.)1-15
- [8] S. Čičić, *Utjecaj strukturnih defekata na elektrokatalitička svojstva Berlinskog modrila i njegovih analoga*, Doktorski rad, Prirodoslovno Matematički Fakultet, Zagreb, 2020.
- [9] F. Ricci, G. Palleschi, *Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes*, *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, (2005.) 389-407
- [10] F.Ricci, A. Amine, G. Palleschi, D. Moscone. *Prussian Blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability*, *Biosensors and Bioelectronics*, **18**, (2003.) 165-174
- [11] A. Karyakin, E. Karyakina, *Prussian Blue-based 'artificial peroxidase' as a transducer for hydrogen peroxide detection. Application to biosensors*, *Sensors and Actuators B*, **57**, (1999.) 268-273
- [12] Z. Mandić, *Elektrokemija- predavanja*, Zavod za elektrokemiju, FKIT, Zagreb
- [13] J. Katić, *Kemijsko Tehnološke Vježbe*, Zavod za elektrokemiju, FKIT, Zagreb
- [14] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Second edition, (2000.), 60-62; 171-173
- [15] N. Raja, T. Kokulnathan, S.-M. Chen, W.-C. Liao, T.S. Priya, *Amperometric detection of gallic acid based on electrochemically activated screen printed carbon electrode*, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **12(6)** (2017.) 4620–4629

- [16] Q. Huang, Y. Zhu- *Printing Conductive Nanomaterials for Flexible and Stretchable Electronics: A Review of Materials, Processes, and Applications*, *Advanced Materials Technologies*, **4(5)**, (2019.) 1-7
- [17] A. Kamyshny, S. Magdashi- *Conductive nanomaterials for 2D and 3D printed flexible electronics*, *Chemical Society Reviews*, **48(6)** (2019.) 1712-1740
- [18] Ž. Boček, prof. Dr. sc. Petar Kassal- *Određivanje analitičkih značajki čvrstofazne amonij-selektivne elektrode*, Diplomski rad, FKIT, Zagreb, 2023.
- [19] S. Cinti, F. Arduini, D. Moscone, G. Palleschi, A. Killard- *Development of a Hydrogen Peroxide Sensor Based on Screen-Printed Electrodes Modified with Inkjet-Printed Prussian Blue Nanoparticles*, *Sensors*, **14** (2014)14222-14234
- [20] B. Haghighi, S. Varma, F. Alizadeh, Y. Yigzaw, L. Gorton, *Prussian blue modified glassy carbon electrodes—study on operational stability and its application as a sucrose biosensor*, *Talanta*, **64** (2004.) 3-12
- [21] A. Lobnik, M. Turel, Š. Korent Urek, A. Košak, *Nanostructured Materials Use in Sensors: Their Benefits and Drawbacks*, *Carbon and Oxide Nanostructures*, **5** (2010.) 307-354
- [22] K. Chen, W. Chou, L. Liu, Y. Cui, P. Xue, M. Jia, *Electrochemical Sensors Fabricated by Electrospinning Technology: An Overview*, *Sensors*, **19(17)** (2019.) 3676
- [23] N.K. Katiyar, G. Goel, S. Goel, *Nanomaterials Based Biosensing: Methods and Principle of Detection*, *Advanced Micro- and Nano-manufacturing Technologies*, **10** (2022.) 1-27
- [24] T. Adachi, Y. Kitazumi, O. Shirai, K. Kano, *Development Perspective of Bioelectrocatalysis Based Biosensors*, *Sensors*, **20(17)** (2020.) 4826
- [25] <https://www.swastikinterchem.net/pigment-powder.html> (pristup 11.srpnja)
- [26] C. Bazzicalupi, A. Bianchi, E. Garcia, E. Delgado, *Metals in supramolecular chemistry*, *Inorganica Chimica Acta*, **417(38)**, (2014.), 3-26
- [27] P. Nakane, A. Kawaoi, *Peroxidase-Labeled Antibody, A New Method of Conjugation*, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **22** (1974.) 1084-1091
- [28] S. Takaloo, M. Moghimi Zand, *Wearable electrochemical flexible biosensors: With the focus on affinity biosensors*, *Sensing and Bio-Sensing Research*, **32** (2021)
- [29] I. Santos Mendoza, J. Vazquez-Arenas, I. Gonzalez, G. Ramos-Sanchez, *Revisiting Electrochemical Techniques to Characterize the Solid-State Diffusion Mechanism in Lithium-Ion Batteries*, *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, **17**, (2019), 1-19
- [30] K. Wijeratne, *Conducting Polymer Electrodes for Thermogalvanic Cells*, 1st ed; Linkopings Universitet: Linkoping, Switzerland; ProQuest: Ann Arbor, MI, USA, (2018.)

[31]C.Zhao, M.Thuo, X.Liu, *A microfluidic paper-based electrochemical biosensor array for multiplexed detection of metabolic biomarkers*, Science and Technology of Advanced Materials, **14(5)**, (2013.), 4402

[33]E.Jaari, F.Livari, E.Toyserkani, *2D printing of graphene: a review*, 2D Materials, **6**, (2019.)

[34]T.H.D Costa, E.Song, J.Woo Choi, *A Paper-Based Electrochemical Sensor Using Inkjet-Printed Carbon Nanotube Electrodes*, ECS Journal of Solid State Science and Technology, **4(10)**, (2015.), 3044-3047

[35] <https://tw.ttnet.net/products/p24gn3bzjiujlpmzj26a.html> (pristup 13.srpnja 2024.)