

Razvoj plošnog elektrokemijskog biosenzora za laktat

Obrovac, Ivana

Master's thesis / Diplomski 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:075312>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Obrovac

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

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

Kandidatkinja Ivana Obrovac

Predala je izrađen diplomski rad dana: 23. rujna 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Izv. prof. dr. sc. Petar Kassal, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Izv. prof. dr. sc. Jozefina Katić, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Dr. sc. Lidija Furač, v. pred., Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 26. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Obrovac

**RAZVOJ PLOŠNOG ELEKTROKEMIJSKOG BIOSENZORA ZA
LAKTAT**

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. Izv. prof. dr. sc. Petar Kassal
2. Izv. prof. dr. sc. Jozefina Katić
3. Doc. dr. sc. Matija Cvetnić

Zagreb, rujan 2024.



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

SAŽETAK

Jedna od aktualnih tema današnjice, kako u medicini tako i za sportsku primjenu, odnosi se na određivanje koncentracije laktata u krvi i znoju.

U ovom radu naglasak je stavljen na razvoj elektrokemijskog biosenzora za laktat pri čemu se ispitivanje jedne od potencijalnih izvedbi provodilo na dvije elektrode: 3D disk elektrodi od staklastog ugljika - GCE (engl. *Glassy Carbon Electrode*) i plošnoj tiskanoj ugljikovoj elektrodi ED-S1PE-C2, Micrux Fluidic. Obje elektrode oslojavane su: slojem berlinskog modrila kao elektrokatalizatorom za redukciju vodikovog peroksida, enzimom laktat oksidazom kao katalizatorom za reakciju oksidacije laktata, te slojem kitozana čija je uloga bila da sigurno zadržava sloj enzima na elektrodnoj površini. Odziv pojedinačnih slojeva na elektrodama te odziv konačne, potpuno oslojene elektrode sa svim slojevima, ispitan je metodama cikličke voltametrije i kronoamperometrije.

U potpunosti oslojena GC elektroda nije dala smislen odziv na laktat. Zbog neprovedene modifikacije kitozana 1 M NaOH i posljedično loše adhezije, sloj je prilikom prvog uranjanja skliznuo s elektrode. Potpuno oslojena plošna tiskana ugljikova elektroda s modificiranim slojem kitozana, ni u jednom slučaju tijekom snimanja cikličke voltametrije nije dala smislen odziv u ovisnosti o promjeni koncentracije laktata. Kronoamperometrijski odziv pokazao je uspješan odziv na laktat u koncentracijskom rasponu od 17 mM do 41 mM. Dobiveni odziv pokazao je vrlo lošu linearnost ($R^2 = 0,7706$) i lošu osjetljivost ($-0,0572 \mu\text{A}/\text{mM}$), što ukazuje da se vrijednost struje ne mijenja značajno s promjenom koncentracije laktata.

Ključne riječi: biosenzor, laktat, mliječna kiselina, amperometrija

ABSTRACT

One of the main topics currently, both in medicine and sports applications, is the determination of lactate concentration in blood and sweat. This paper focuses on the development of an electrochemical biosensor for lactate, in which the testing of one potential design was conducted on two electrodes: a 3D glassy carbon disk electrode (GCE) and a screen-printed carbon electrode (ED-S1PE-C2, Micrux Fluidic). Both electrodes were coated with layers: a Prussian blue layer as an electrocatalyst for hydrogen peroxide reduction, lactate oxidase as a catalyst for the oxidation reaction of lactate, and a chitosan layer whose role was to securely retain the enzyme layer on the electrode surface. The response of individual layers on the electrodes, as well as the response of the final, fully coated electrode with all layers, was examined using cyclic voltammetry and chronoamperometry methods.

The fully coated GC electrode did not provide a meaningful response to lactate. Due to the absence of chitosan modification with 1 M NaOH and consequently poor adhesion, the layer slid off the electrode during the first immersion. The fully coated screen-printed carbon electrode with the modified chitosan layer did not, in any case, provide a meaningful response in relation to the change in lactate concentration during cyclic voltammetry recordings. The chronoamperometric response showed a successful response to lactate in the concentration range of 17 mM to 41 mM. The obtained response showed very poor linearity ($R^2 = 0,7706$) and poor sensitivity ($-0,0572 \mu\text{A}/\text{mM}$), indicating that the current value does not significantly change with the change in lactate concentration.

Key words: biosensor, lactate, lactic acid, amperometry

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1 Kemijski senzori	3
2.1.1 Općenito o kemijskim sensorima.....	3
2.1.2 Podjela kemijskih senzora i biosenzora	4
2.1.3 Elektrokemijski senzori.....	5
2.1.4 Senzori za laktat	7
2.2 Berlinsko modriilo	8
2.3 Kitozan.....	9
2.4 Primjeri elektrokemijskih laktatnih senzora iz literature	10
2.5 Ciklička voltometrija.....	14
2.6 Amperometrija	20
3.EKSPERIMENTALNI DIO	22
3.1 Materijali i oprema.....	22
3.1.1 Kemikalije.....	22
3.1.2. Instrumenti i uređaji.....	23
3.2 Karakterizacija elektrode i postupak oslojavanja.....	26
3.2.1. Priprema otopina.....	26
3.2.2 Modifikacija elektrode berlinskim modrilom	27
3.2.3. Modifikacija elektrode enzimom laktat oksidazom	28
3.2.4. Modifikacija elektrode kitozanom	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1 Odziv čiste GC elektrode	29
4.2 Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom	39
4.3 Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom, laktat oksidazom i kitozanom	52
4.4 Karakterizacija plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21, Micrux Fluidic slojem berlinskog modrila	53
4.5 Karakterizacija plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21, Micrux Fluidic slojem berlinskog modrila, enzimom laktat oksidazom i kitozanom	58
5. ZAKLJUČAK	64
6. POPIS SIMBOLA I KRATICA.....	66
7. LITERATURA	67

8.DODACI.....	69
8.1 Popis slika	69
8.2 Popis tablica.....	72

1. UVOD

Kemijski senzori predstavljaju vrlo važnu ulogu u procesu dobivanja informacija iz fizičkog, kemijskog i biološkog sustava. Posebna skupina kemijskih senzora koja je detaljnije istraživana u eksperimentalnom dijelu ovoga rada su elektrokemijski biosenzori. Elektrokemijski biosenzori su analitički uređaji koji su posljednjih godina počeli plijeniti sve veću pažnju.

Prema tome, pojavili su se i dugoročni zahtjevi analitičke kemije koji su usmjereni na poboljšanje osjetljivosti i selektivnosti, dobivanje informacije na molekularnoj odnosno atomskoj razini, razvoj novih tehnika s naglaskom na instrumentalne, automatizaciju, robotizaciju i sustave s umjetnom inteligencijom. Sve to kako bi se poboljšala i omogućila što bolja kvaliteta života te njihova učestalija primjena i šira dostupnost. Ipak, interferencija matrice iz stvarnih uzoraka, koja ima značajan utjecaj na biomolekularnu interakciju, i dalje se smatra jednim od najvećih problema koje je potrebno riješiti s praktičnog aspekta u elektrokemijskim biosenzorima. [1]

Osnova rada elektrokemijskih biosenzora temelji se na reakciji enzim-substrat koja potom rezultira određenim električnim signalom odnosno odzivom, što je u našoj izvedbi senzora bila električna struja. U elektrokemijskom biosenzoru ključnom komponentom smatra se elektroda koja služi kao čvrsta potpora za imobilizaciju biomolekula i kretanje elektrona. Prema tome, velika važnost leži u odabiru same elektrode i elektrodnog materijala, a isto tako i funkcionalnih materijala kojima će elektroda biti modificirana.

Kako bi se omogućila što bolja izvedba senzora, do danas je istraženo mnogo materijala čija primjena značajno može unaprijediti njegov rad. Kao jedan od primjera takvih materijala je berlinsko modrilo (engl. *Prussian Blue*) koje karakteriziraju jedinstvena katalitička svojstva. Berlinsko modrilo pokazuje iznimnu katalitičku aktivnost, a isto tako i selektivnost u procesu redukcije vodikovog peroksida te je sukladno tome predstavljalo jedan od ključnih slojeva za razvoj senzora u ovom radu. [3]

Kitozan je polimer koji je zbog svoje biokompatibilnosti i sposobnosti stvaranja filmova i membrana također postao jedan od materijala čija je primjena postala gotovo neizostavna u velikom broju senzora te je zbog navedenih svojstava predstavljao važnu ulogu u imobilizaciji enzima. [4]

Kao što je već spomenuto, mliječna kiselina (i njena konjugirana baza, laktatni anion) i određivanje njezine koncentracije smatraju se korisnim pokazateljem zdravlja organizma čemu svjedoče brojni radovi i istraživanja. Određivanje laktata ima značajnu ulogu, kako u zdravstvu, tako i u prehrambenoj industriji, a posebna važnost određivanja njegove koncentracije je u stanjima kao što su hemoragija, poteškoće s disanjem, bolesti jetre, sepsa i hipoksija tkiva. Informacije o navedenim zdravstvenim stanjima mogu se dobiti na temelju određivanja njegove koncentracije u znoju. [5, 6]

Prema tome, koncentracija laktata u znoju daje unikatne informacije o zdravstvenom stanju pojedinca. S druge strane, kada govorimo o koncentraciji laktata u krvi, dokazano je kako tijekom visokih koncentracija dolazi do značajnog pada pH krvi, a takvo stanje poznatije je pod imenom laktacidoza. Isto tako, promjene u koncentracijama laktata u krvi najčešće se koriste kako bi se pratila izdržljivost i intenzitet vježbanja kod profesionalnih sportaša. Praćenje koncentracije laktata stoga je od velike važnosti kako za sportsku primjenu, tako i za dijagnosticiranje i što raniju prevenciju danas sveprisutnih bolesti. [6]

Pri razvoju i karakterizaciji elektrokemijskih senzora ključnu ulogu igraju elektrokemijske tehnike, a prilikom karakterizacije elektrode primjenjivane su ciklička voltometriju i amperometrija. Obje metode su uobičajene elektrokemijske tehnike koje pružaju informacije o elektrokemijskim procesima na elektrodnoj površini što je ključno za dizajn i karakterizaciju senzora.

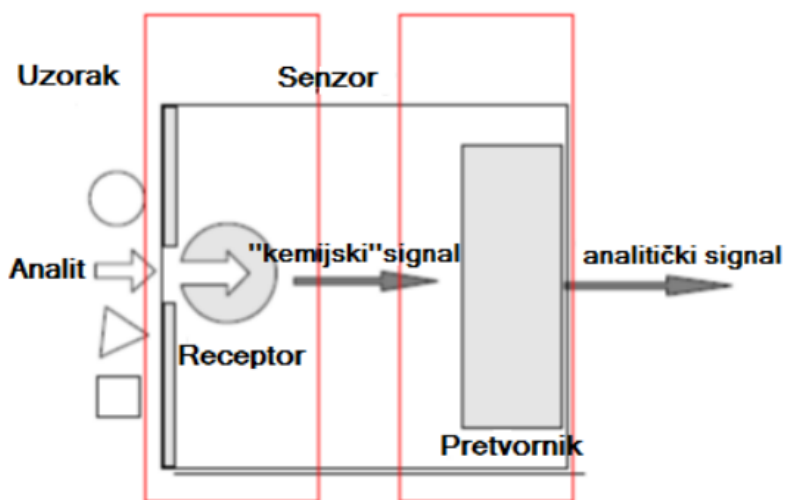
2. OPĆI DIO

2.1 Kemijski senzori

2.1.1 Općenito o kemijskim sensorima

Kemijski senzor je uređaj koji kemijsku informaciju pretvara u korisni analitički signal, u rasponu od koncentracije specifične komponente uzorka do ukupne analize sastava pri čemu kemijska informacija proizlazi iz kemijske reakcije analita ili iz fizičkog svojstva sustava koji se proučava. [1]

Osnovu svakog kemijskog senzora čine dvije funkcionalne jedinice: receptorski i pretvornički dio. Receptorski dio senzora ima ulogu pretvorbe kemijske informacije u oblik energije koji se može mjeriti pretvornikom. Sukladno navedenom, uloga pretvorničkog dijela senzora je pretvoriti energiju (koja nosi kemijsku informaciju o uzorku) u koristan analitički signal. Ono što je važno naglasiti je to da pretvornik sam po sebi ne pokazuje selektivnost. Shematski prikaz kemijskog senzora s njegovim funkcionalnim jedinicama prikazan je na **Slici 1**.



Slika 1. Shematski prikaz kemijskog senzora s njegovim funkcionalnim jedinicama [1].

Razlikujemo nekoliko načela na kojima se temelji receptorski dio kemijskog senzora, a to su:

1. Fizikalna
2. Kemijska

3. Biokemijska

U receptorskom dijelu koji se temelji na fizikalnim načelima, ne odvija se kemijska reakcija. Kao primjeri ovakvih senzora mogu se navesti oni senzori koji se temelje na mjerenju apsorbancije, vodljivosti, temperature i slično. S druge strane, receptorski dio temeljen na kemijskim načelima kao osnovu ima kemijsku reakciju u kojoj sudjeluje analit što uzrokuje analitički signal. Receptorski dio temeljen na biokemijskim načelima kao izvor analitičkog signala ima biokemijski proces. Kemijski senzori čiji se receptorski dio temelji na biokemijskim načelima smatraju se podgrupom kemijskih senzora, a nazivaju se biosenzori. [2]

2.1.2 Podjela kemijskih senzora i biosenzora

Klasifikacija kemijskih senzora može se temeljiti na načelima rada pretvornika. Sukladno navedenome razlikujemo:

1. Elektrokemijske senzore

Temelje se na pretvaranju efekta elektrokemijske interakcije analit-elektroda u koristan signal. Elektrokemijski senzori detaljnije će biti objašnjeni u zasebnom poglavlju **2.1.3**.

2. Optičke senzore

Temelj optičkih senzora je reakcija koja rezultira optičkom promjenom koja je rezultat interakcije analita s receptorskim dijelom.

3. Električne senzore

Električni senzori temelje se na mjerenjima gdje se ne odvijaju elektrokemijski procesi već signal proizlazi iz promjene električkog svojstva uzrokovanog interakcijom analita.

4. Masene senzore

Maseni senzori pretvaraju promjenu mase na posebno modificiranoj površini u promjenu svojstva nosećeg materijala, a promjena mase uzrokovana je akumulacijom analita.

5. Magnetske senzore

Magnetski senzori temelje se na promjeni paramagnetskih svojstava analiziranog plina.

6. Termometrijske senzore

Termometrijski senzori temelje se na mjerenju topline specifične kemijske reakcije ili adsorpcije koja uključuje analit.

7. Senzore koji se mogu temeljiti na različitim fizikalnim svojstvima

Na primjer X^- , β^- ili Γ^- zračenje mogu biti osnova za kemijski senzor u slučaju da se koriste za određivanje kemijskog sastava. [2]

Senzori se također mogu klasificirati prema primjeni za detektiranje određenog analita. Primjeri su senzori za pH, za metalne ione ili za određivanje kisika ili ostalih plinova. Još jedan temelj za klasifikaciju kemijskih senzora je prema načinu primjene, na primjer senzori namijenjeni za primjenu *in-vivo*, senzori za praćenje procesa, itd.

Biosenzori čine podgrupu kemijskih senzora gdje je biokemijska reakcija izvor odzivnoga (analitičkog) signala senzora. Biosenzori nisu predstavljeni kao posebna skupina jer je proces na kojem su temeljeni zajednički kemijskim sensorima. Mogu se razlikovati prema biološkim elementima upotrebljenima u receptorskom dijelu što mogu biti organizmi, tkiva, stanice, organele, membrane, enzimi, antitijela, itd. [2]

2.1.3 Elektrokemijski senzori

Temelj elektroanalitičkih mjerenja predstavlja elektrokemijska reakcija na radnoj ili indikatorskoj elektrodi. Prema tome elektrokemijski senzori su uređaji koji pretvaraju efekt elektrokemijske interakcije analit-elektroda u koristan signal. Ovakvi efekti mogu biti potaknuti električki ili mogu rezultirati spontanom interakcijama bez djelovanja vanjskog izvora.

Elektrokemijski senzori općenito se mogu podijeliti na:

- a) voltametrijske senzore, uključujući amperometrijske senzore, kod kojih se mjeri električna struja u DC ili AC modu. Ova podgrupa može uključiti senzore temeljene na kemijski inertnim elektrodama, kemijski reaktivnim elektrodama i modificiranim elektrodama. U

amperometrijskim sensorima mjeri se jakost struje kroz dodirnu površinu, odnosno najčešće se mjeri struja pri uspostavljenom stanju stalnoga dotoka (engl. *steady state*) molekulske vrste o kojoj ovisi jakost električne struje.

b) potenciometrijski senzori, koji djeluju u termodinamički ravnotežnim uvjetima. Kod ovakvih vrsta senzora potencijal indikatorske elektrode (ion-selektivna elektroda, redoks elektroda, metal/metalni oksid elektroda) se mjeri u odnosu na referentnu elektrodu.

Dakle, osnovna razlika između potenciometrijskih i amperometrijskih senzora je u tome da potenciometrijskim sensorima odziv (napon) mjerimo pod termodinamički ravnotežnim uvjetima dok u amperometrijskim sensorima mjerimo jakost struje pod uvjetima stalnoga dotoka analita pod učinkom vanjske pobude, koja može biti različita, ovisno o tehnici.

Važno je napomenuti da izrada elektrokemijskoga senzora (nemodificirane ili modificirane elektrode) može biti ista za potenciometrijske ili amperometrijske senzore, jedina je razlika u načinu djelovanja (režimu rada). [1, 2]

c) CHEMFET (engl. *Chemically Sensitized Field Effect Transistor*) koristi kemijski osjetljiv sloj na kojem se generira spontana razlika potencijala zbog kemijske reakcije analita odnosno promjene u ionskoj koncentraciji ili kemijskim svojstvima okoline. Mjeri se promjena struje u tranzistorskom modu.

d) plinski potenciometrijski senzori sa čvrstim elektrolitom rade s visokotemperaturnim krutim elektrolitima i obično se koriste za detekciju plinova. [2]

Elektrokemijski senzori u odnosu na ostale vrste senzora imaju brojne prednosti, a kao neke od njih mogu se navesti: visoka osjetljivost, široko dinamičko područje, kompaktnost (mogućnost minijaturizacije), niska potrošnja električne energije, izvrsno ponašanje u otopinama elektrolita, određivanje aktiviteta (koncentracije). Uz prednosti pojedine vrste senzora, uvijek su prisutni i određeni nedostaci i izazovi koje je potrebno prevladati ili unaprijediti za što bolji rad senzora, a to su za slučaj elektrokemijskih senzora: difuzijski potencijal, skidanje (trošenje) senzorskog materijala u realnim uzorcima, osjetljivost na elektromagnetska polja, zagađivanje površine, ograničena selektivnost. [1]

2.1.4 Senzori za laktat

Laktat, kao biološki važan analit, primarno je određivan u krvi, a u posljednje vrijeme uočena je važnost njegova određivanja i u ljudskom znoju. Određivanje laktata u krvi smatra se jednim od ključnih čimbenika za procjenu metaboličkog stanja organizma, posebno u kontekstu anaerobne glikolize i dijagnostike stanja kao što su sepsa, hipoksija i dijabetes. Normalne koncentracije laktata u krvi kod zdravih odraslih osoba obično su kreću u rasponu od 0.5 do 2.2 mmol L⁻¹. Znoj u ljudskom tijelu osim vode, koja čini 99 % njegovog sastava, sadrži i druge komponente kao što su elektroliti (npr. ioni natrija, kalija, bikarbonata), različiti mikronutrijenti (željezo, magnezij, bakar, kalcij, cink, različiti vitamini) i metaboliti (glukoza, urea, amonijak, etanol, aminokiseline). U posljednje vrijeme znoj je počeo plijeniti sve veću pažnju i smatra se novim neinvazivnim uzorkom za medicinsku dijagnozu cistične fibroze, raka pluća i Parkinsonove bolesti. Kao što je već rečeno, dokazano je da laktat ima različite korisne uloge u ljudskom tijelu i da ima ključnu ulogu tijekom izvođenja tjelesnih aktivnosti. Koncentracije laktata u znoju, koje se također mogu koristiti kao indikator metaboličkog stanja organizma, variraju i obično se kreću u rasponu od 5 do 25 mmol L⁻¹, ovisno o intenzitetu vježbanja i individualnim faktorima. Laktat nastaje kao nusprodukt anaerobnog metabolizma glukoze u ljudskom tijelu, a njegove brojne fiziološke uloge mogu se sažeti u tri najvažnije, a to su:

1. Laktat omogućuje brzu proizvodnju energije tijekom kratkotrajnih, intenzivnih aktivnosti kada se ne može osigurati dovoljno kisika za potpuno oksidiranje glukoze
2. Laktat se može prevesti natrag u glukozu procesom glukoneogeneze što omogućuje ponovnu pretvorbu u glukozu koja se može koristiti kao izvor energije
3. Laktat je stanična signalna molekula [7]

Kada govorimo o istraživanim konceptima za određivanje koncentracije laktata u znoju, u velikom broju publikacija obično dominiraju senzori temeljeni na enzimima s amperometrijskim očitanjem.

Osnovni koncept ovakvih senzora, koji je uspješno implementiran u brojnim novim nosivim uređajima, temelji se na korištenju berlinskog modrila (PB) u kombinaciji s enzimom laktat oksidazom (LOx) pri čemu enzim laktat oksidaza pretvara odnosno oksidira laktat u piruvat i

vodikov peroksid (H_2O_2). Strujni odziv koji se prati mijenja se ovisno o koncentraciji nastalog vodikovog peroksida na elektrodi.

Ostali koncepti za određivanje koncentracije laktata temeljeni su na istraživanju biosenzora druge generacije s tetratiafulvalenom (TTF) kao redoks-medijatorom. Osim toga, istraživani su i brojni neenzimski pristupi koji uključuju klasične impedancijske, voltametrijske i potenciometrijske tehnike. Dok impedancijska i voltametrijska mjerenja dopuštaju samo diskretna opažanja laktata, kontinuirani profili mogu biti dostupni s potenciometrijskim očitavanjem. Prema trenutnim saznanjima, prikazani raspon odziva ne pokriva razine laktata u znoju. [8]

2.2 Berlinsko modrilo

Berlinsko modrilo (engl. *Prussian Blue*) $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, predstavlja vrstu koordinacijskog kompleksa na bazi cijanida koji je s razvojem senzora dobio znatan istraživački interes. Dobiva se reakcijom otopine kalijeva heksacijanoferata i soli trovalentnog željeza te kao takav, on i njemu slični spojevi, dobili su obećavajuće primjene u polju elektrokemijskih senzora. Njihova široka primjena u sensorima rezultat je njihove izvrsne elektrokemijske aktivnosti i jedinstvenih strukturnih karakteristika uključujući otvorenu strukturu, veliku specifičnu površinu i prilagodljiva metalna aktivna mjesta. [13]

Važnost berlinskog modrila u biosenzorima leži u njegovim jedinstvenim katalitičkim svojstvima što se očituje u katalitičkoj aktivnosti i selektivnosti u redukciji vodikovog peroksida. Sukladno tome, u usporedbi s platinom, koja je materijal koji se najčešće koristi za detekciju vodikovog peroksida u neinvazivnim sensorima, elektroda modificirana berlinskim modrilom ima slijedeće ključne prednosti:

1. aktivnost u redukciji i oksidaciji vodikova peroksida je veća za tri reda veličine, što pruža znatno bolju osjetljivost
2. tri reda veličine veća selektivnost u redukciji vodikovog peroksida u odnosu na redukciju kisika.

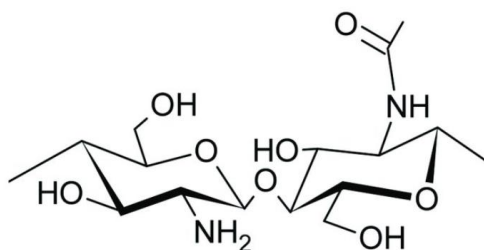
Navedena jedinstvena svojstva omogućila su izradu brojnih senzora i biosenzora s poboljšanim analitičkim karakteristikama. [13. 14]

2.3 Kitozan

Kitozan je biokompatibilan materijal dobiven iz hitina, a pažnju za dodatno istraživanje i primjenu u sensorima i elektrokemijskoj detekciji privukao je zbog svojih jedinstvenih svojstava. Neka od njegovih svojstava uključuju biokompatibilnost, kemijsku svestranost te veliku površinu zbog čega se često, uz ostale kemijske spojeve, koristi za modifikaciju elektrode.

Jedno od vrlo važnih svojstava kitozana je prisutnost amino skupine u njegovoj kemijskoj strukturi te njegove pozitivno nabijene površine što je vidljivo na **Slici 5**. Pozitivno nabijena površina i pKa vrijednost od 6,5 kitozanu daju mogućnost interakcije s negativno nabijenim molekulama kao što su nukleinske kiseline zbog čega često ima ulogu nosača ili transportera lijekova. Nadalje, kitozan se može modificirati uvođenjem brojnih funkcionalnih skupina poput amino ili karboksilne skupine koje se mogu koristiti za imobilizaciju biomolekula ili poboljšanje performansi samog senzora. [4]

Svaki senzor teži imati što bolju selektivnost i osjetljivost, a primjena kitozana u kombinaciji s ostalim materijalima koji su trenutno od velikog interesa poput ugljikovih nanomaterijala, nanočestica i vodljivih polimera pokazali su znatan doprinos navedenim karakteristikama senzora. U posljednje vrijeme sve češće se proučavaju različite kombinacije kitozana s brojnim nanomaterijalima te je utvrđeno da se time značajno poboljšavaju detekcijske sposobnosti elektrokemijskih senzora. Uz navedeno, miješanjem s polimerima poput polivinil alkohola ili polietilen glikola, kitozanu se poboljšavaju mehanička svojstva i mogućnost stvaranja filmova. [4, 15]



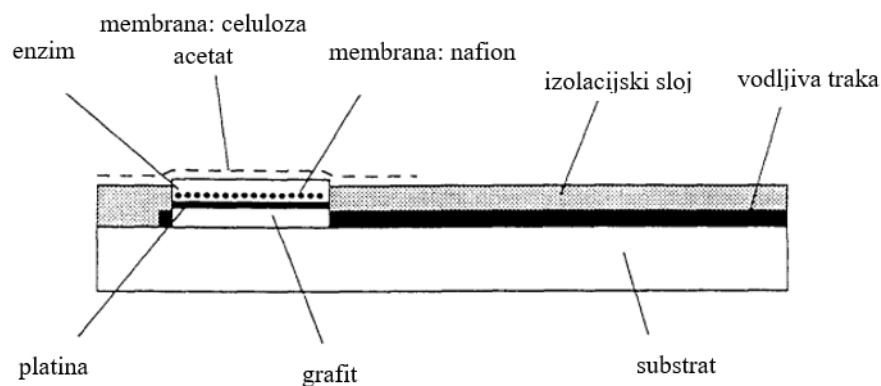
Slika 2. Kemijska struktura kitozana [4].

2.4 Primjeri elektrokemijskih laktatnih senzora iz literature

A.L Hart i suradnici među prvima su koji su u svome radu predstavili prototip elektrokemijskih laktatnih elektroda na bazi LOx enzima. [9] Raspored komponenti senzora prikazan je na **Slici 2**. Elektrode su otisnute na listove prozirnog PVC-a koji su prethodno bili izrezani na komade odgovarajuće veličine 60mm x 80mm. Potom, na komade PVC-a nanese su vodljive trake od srebrne tinte te je nanesen sloj sušen pri sobnoj temperaturi 2-3 sata, a nakon toga nanese se i grafitna tinta i također ostavljena da se osuši. Preko osušenih slojeva nanese se izolacijski sloj od vinilne tinte. Nakon sušenja, terminali trake povezani su u troelektrodni sustav i uslijedilo je uranjanje u 5 mM otopinu heksakloroplatinske kiseline u 0,1 M fosfatnom puferu, pH = 7,0. Primijenjen je potencijal u rasponu od +0,25 do -0,75 V (vs. SCE) pri brzini promjene potencijala od 50 mVs⁻¹ kako bi se istaložio sloj platine na grafitne jastučice.

Tinta koja je sadržavala enzim napravljena je miješanjem laktat oksidaze i grafitnog praha s 2% hidroksietil celuloze u 0,1 M fosfatnom puferu, pH 7,0. Elektrode su zatim sušene preko silika gela pod sniženim tlakom na sobnoj temperaturi 1 h. Hidroksietilceluloza je korištena kao matrica za „zarobljavanje“ enzima te je na taj način enzim zarobljen u stabilnom stanju bez potrebe za modificiranjem stvaranjem kovalentnih veza. 3%-tna otopina celuloznog acetata u acetonu nanese se na vanjsku površinu enzimskog sloja uranjanjem (engl. *Dip Coating*). Elektrode su potom ponovno sušene pri sobnoj temperaturi 30 minuta.

Poveznica između bioloških i fizičkih komponenti elektrode bila je platinizirana površina sitotiskanih grafitnih jastučica koji, kada su postavljeni na odgovarajući potencijal, mogu oksidirati vodikov peroksid koji proizvodi laktat oksidaza. U nekim izvedbama nanese se i dodatan sloj Nafiona. Bez Nafiona, platinizirani grafitni jastučici bili su osjetljivi na askorbat pa je prema tome premazivanje jastučica Nafionom smanjilo interferenciju askorbata.

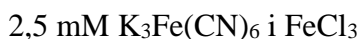


Slika 3. Raspored komponenti senzora. Adaptirano iz reference [9].

Svojstva ovako dobivenih elektroda pokazala su da su sitotisak i *ink-jet* ispis izvedive tehnike za strojnu proizvodnju laktatnih senzora osobito jer se mediju koji se koristi mogu dati električna i kemijska/biološka svojstva. Ova metoda proizvodnje vrlo je atraktivna zbog svoje preciznosti, brzine i niske cijene. U nastavku će biti prikazane neke od novijih izvedba senzora temeljenih na sličnom principu.

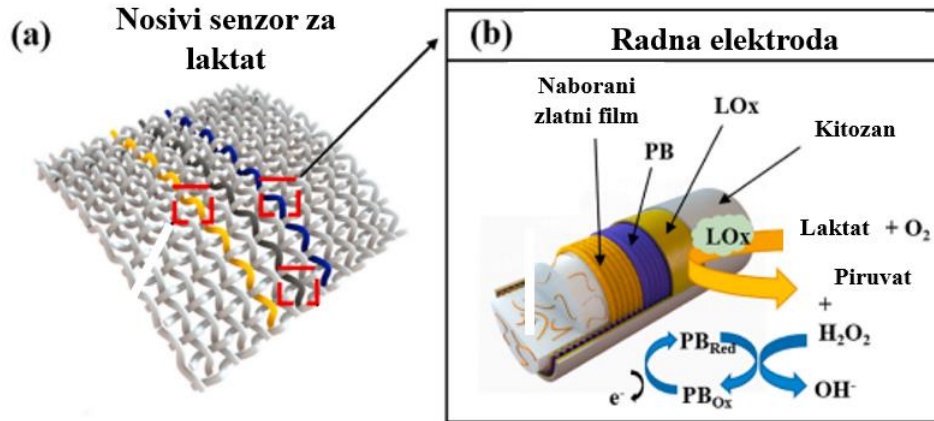
Wang i suradnici razvili su i opisali rastezljivi tekstilni nosivi elektrokemijski biosenzor na bazi zlatnih vlakana za praćenje laktata u znoju. [10] Navedeni senzor prikazan je na **Slici 3**. Radna elektroda oslojena je slojevima berlinskog modrila, enzimom laktat oksidazom i kitozanom.

Priprema radne elektrode temeljila se na nanošenju sloja berlinskog modrila koji je elektrodeponiran na elastomerna zlatna vlakna metodom cikličke voltametrije. Ciklički voltamogrami snimani su pri brzini promjene potencijala od 20 mVs^{-1} u rasponu potencijala od $-0,3 \text{ V}$ do $0,5 \text{ V}$ u slijedećim otopinama:



Na sloj berlinskog modrila potom je nanoseno $4 \mu\text{L}$ laktat oksidaze, a nakon sušenja na sobnoj temperaturi, dodano je i $8 \mu\text{L}$ otopine kitozana (1% kitozan u 1% otopini octene kiseline) pri čemu

je uloga kitozana bila imobilizacija enzima i održavanje njegove bioaktivnost. Kronoamperometrija je snimana pri vrijednosti potencijala od $-0,1$ V za koncentraciju laktata 0-30 mM.



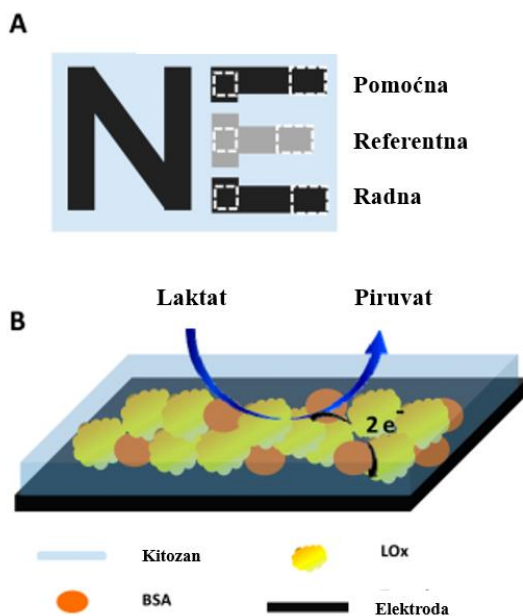
Slika 4. Izvedba senzora za laktat temeljenog na zlatnim vlaknima. Adaptirano iz reference [10].

Ovakav elektrokemijski biosenzor rezultirao je izvrsnom osjetljivošću i niskom granicom detekcije, a istovremeno je pokazao i značajnu selektivnost, a najbolji linearni odziv dobiven je u rasponu 0-5 mM. [10]

Nadalje, Jia i suradnici razvili su senzor prikazan na **Slici 4**. Senzor se sastoji od isprintane radne elektrode pripremljene funkcionalizacijom tetratiafulvalenom (TTF) i višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama (MWCNT, *Multi-walled carbon nanotubes*), a zatim nanošenjem slojeva enzima laktat oksidaze i na kraju sloja kitozana. [11] Kombinacija Tetratiafulvalena (TTF) i višeslojnih ugljikovih nanocjevčica (MWCNT) odabrana je kako bi se poboljšala učinkovitost senzora odnosno kako bi se omogućio bolji prijenos elektrona na radnu elektrodu. Još jedna od ključnih uloga TTF-a je omogućavanje konverzije laktata pomoću enzima laktat oksidaze pri niskim potencijalima budući da amperometrijska detekcija laktata, koja se temelji na enzimu laktat oksidazi, obično zahtjeva vrlo visok potencijal od 0,65 V kako bi se pratio nastali vodikov peroksid, a time je podložna smetnjama i ostalih elektroaktivnih tvari u sustavu.

Radna elektroda je oslojavana tako da su višeslojne ugljikove nanocjevčice prvo suspendirane u etanolu što je izloženo ultrazvuku nekoliko sati, a potom je suspenzija pomiješana s 0,1 M

otopinom TTF etanol / aceton u omjeru 9:1. Ovakva suspenzija nanescena je u volumenu od 3 μL na površinu elektrode i ostavljena je da se osuši. Nakon sušenja na zraku, 3 μL otopine laktat oksidaze (40 mg / mL s 10 mg / mL BSA stabilizatora) nanesceno je na elektrodu i sušeno pri sobnoj temperaturi. Na kraju je nanesceno 2 μL otopine kitozana (1%-tna otopina u 1% otopini octene kiseline).



Slika 5. Elektrokemijski biosenzor za neinvazivno praćenje laktata u stvarnom vremenu.

Adaptirano iz reference [11].

Gao i suradnici modificirali su elektrodu na slijedeći način: prvo je nanescen sloj berlinskog modrila nakon čega je provedena ciklička voltometrija pri brzini promjene potencijala od 50 mV s^{-1} u rasponu potencijala od $-0,5 \text{ V}$ do $0,6 \text{ V}$. [12] Ciklički voltamogrami snimljeni su u slijedećim otopinama 2,5 mM FeCl_3 , 100 mM KCl , 2,5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ i 100 mM HCl . Potom je na sloj berlinskog modrila nanesceno 3 μL prethodno pripravljene otopine kitozana i SWCNT (engl. *Single-walled carbon nanotubes*). Navedena otopina pripravljena je tako da je 1%-tna otopina kitozana otopljena u 2% otopini octene kiseline te se nakon miješanja na magnetskoj mješalici pomiješala s otopinom SWCNT ($\gamma = 2 \text{ mg mL}^{-1}$). Takva otopina je ostavljena u ultrazvučnoj kupelji kako bi se dobila homogena smjesa te je nakon toga nanescena na sloj berlinskog modrila. Na tako pripravljenu elektrodu dodano je 2 μL otopine laktat oksidaze ($\gamma = 40 \text{ mg mL}^{-1}$), a na

kraju je ponovno dodano još 3 μL otopine kitozana i SWCNT. Elektroda je ostavljena na sušenje pri 4° C.

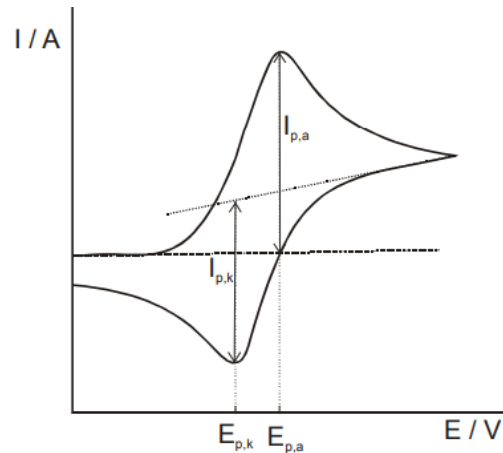
Većina dosadašnjih izvedbi senzora za laktat ne zadovoljava barem jedan od slijedećih kriterija:

1. Odgovarajuću linearnost koja pokriva razine laktata u znoju
2. Neovisnost o drugim parametrima znojenja kao što su pH, temperatura, interferirajuće vrste
3. Dokazana pouzdanost mjerenja na tijelu

Ključno je realizirati nosivi senzor koji će pružati točna i kontinuirana mjerenja laktata u znoju u stvarnom vremenu pri čemu se točnost odnosi na uspješnu i odgovarajuću validaciju.

2.5 Ciklička voltametrij

Ciklička voltametrij predstavlja jednu od osnovnih elektroanalitičkih metoda, a temelji se na linearnoj promjeni potencijala. Kontrola promjene potencijala, od određenog početnog $E_{\text{poč}}$ do konačnog E_{kon} potencijala, uz stalnu i prethodno definiranu brzinu promjene potencijala, omogućuje nam praćenje strujnog odziva. Promjena napona na elektrodi uzrokovat će elektrokemijsku reakciju koja će potom izazvati promjenu jakosti struje koja protječe kroz elektrodu pri čemu, na temelju strujnog odziva, dobivamo informacije o elektrokemijskom ponašanju molekularnih vrsta u promatranom sustavu. Na **Slici 6.** je prikazan tipičan primjer cikličkog voltamograma na kojem je prikazana ovisnost struje o potencijalu. Također, vidljive su i dvije karakteristične grane koje predstavljaju početnu anodnu i povratnu katodnu struju. [1]



Slika 6. Signal odziva u cikličkoj voltametriji za reverzibilni proces. Adaptirano iz reference [1].

Osnovni eksperimentalni parametri koji karakteriziraju ciklički voltamogram su: $I_{p,k}$ i $I_{p,a}$ odnosno visine katodnog i anodnog strujnog vrha te $E_{p,k}$ i $E_{p,a}$ što su potencijali katodnog i anodnog strujnog vrha. Porastom potencijala nakon određenog vremena dolazi do oksidacije analita što se očituje porastom anodne struje. Nakon što potencijal dostigne vrijednost u točki $E_{p,a}$ dolazi do trenutne oksidacije svakog reduciranog oblika analita koji je u kontaktu s elektrodom. Kretanje potencijala prema nižim vrijednostima odnosno od točke $E_{p,k}$ prema početnoj vrijednosti dovodi do redukcije oksidiranog oblika analita. Sukladno navedenome, reakcija oksidacije i redukcije se detektiraju kao promjene u strujnom odzivu te je intenzitet strujnog odziva direktno povezan s koncentracijom analita u promatranom sustavu.

Procesi koji se odvijaju na elektrodi tijekom provedbe mjerenja metodom cikličke voltametrije mogu se podijeliti u tri skupine prema brzini prijenosa naboja:

1. Reverzibilne procese
2. Ireverzibilne procese
3. Kvazireverzibilne procese [16]

1. Reverzibilan proces

Reverzibilan proces je difuzijski kontroliran proces odnosno proces kod kojeg je prijenos naboja puno brži od procesa difuzije pa će prema tome struja ovisiti o brzini difuzije reaktanta prema

elektrodnoj površini i o brzini difuzije produkta s elektrodne površine prema otopini. Na elektrodnoj površini, pri svakoj vrijednosti potencijala uspostavlja se ravnotežni omjer koncentracija oksidiranog i reduciranog oblika redoks sustava, a taj omjer opisuje se Nernst-ovom jednadžbom:

$$E = E^0 + \left(\frac{RT}{zF}\right) * \ln \left(\frac{c_{oks}}{c_{red}}\right)$$

gdje je:

E^0 – standardni elektrodni potencijal redoks sustava,

E – ravnotežni elektrodni potencijal,

R – opća plinska konstanta, čiji je iznos $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$,

T – termodinamička temperatura, K,

z – broj izmijenjenih elektrona,

F – Faraday-eva konstanta, čija je približna vrijednost 96500 C mol^{-1} ,

c_{oks}/c_{red} – koncentracija oksidiranog/reduciranog oblika, mol cm^{-3}

Promatramo li ciklički voltamogram za tipičan reverzibilni proces, prikazan na **Slici 6.**, vidljivo je da u početku kroz ćeliju protječe samo osnovna struja što se očituje prema ravnom toku krivulje. Tek kada potencijal radne elektrode počne rasti i dostigne standardni potencijal, na voltamogramu će se očitovati uzlazni dio anodne krivulje. Kada potencijal dostigne određenu vrijednost dolazi do trenutačne oksidacije tvari koje su procesom difuzije pristigle na elektrodu i struja poprima maksimalnu vrijednost pri čemu se formira anodni strujni vrh. Iscrpljivanje reaktanta neposredno uz površinu elektrode dovodi do postupnog smanjenja struje. Slično tome, kada govorimo o procesu redukcije, od ne nastupa odmah nakon promjene smjera potencijala, koji će u ovom slučaju imati znatno negativniju vrijednost od standardnog elektrodnog potencijala. Redukcija će nastupiti kada se ta vrijednost ponovno približi vrijednosti standardnog elektrodnog potencijala te se formira katodni vrh. Vrijednost katodnog strujnog vrha bit će veća što je veća koncentracija

tvori u ćeliji, što se više elektrona izmjenjuje, što je veća elektroda površina te što je veća promjena potencijala u jedinici vremena.

Matematički se ovakav proces može opisati Randles-Ševčik-ovom jednačbom:

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

Gdje je:

z – broj izmijenjenih elektrona,

F – Faraday-eva konstanta, čija je približna vrijednost 96500 C mol^{-1} ,

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

A – površina radne elektrode, cm^2 ,

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

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

R – opća plinska konstanta, čiji je iznos $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$,

T – termodinamička temperatura, K ,

I_p – Struja vrha vala, A ,

Potencijal vrha katodnog vala je negativniji od poluvalnog potencijala elektroaktivne vrste, a to se može prikazati slijedećom jednačbom:

$$E_p = E_{1/2} - 1,109 \frac{RT}{zF}$$

Pri 25°C vrijedi:

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

Iz navedenih jednadžbi možemo izvesti zaključke o parametrima koji karakteriziraju reverzibilan proces:

$E_{p,k}$ i $E_{p,a}$ odnosno potencijali anodnog i katodnog vrha, ne ovise o brzini promjene potencijala.

$E_{p,k} - E_{p,a} = 57/n$, pri 25 °C.

$I_{p,k} / I_{p,a}$ iznosi 1 i također ne ovisi o brzini promjene potencijala.

$I_p / v^{1/2}$ je konstantan i ne ovisi o brzini promjene potencijala.

2. Ireverzibilan proces

Ireverzibilan proces je onaj u kojem reakcija prati Butler-Volmerovu kinetiku, a brzina reakcije je pod kontrolom izmjene naboja jer je u ovom procesu difuzija proces koji se odvija znatno brže. Butler-Volmerova jednadžba povezuje odnos između struje elektrode u ovisnosti o prenaponu elektrodne reakcije:

$$I = I_0 \{ e^{-z\alpha F\eta} - e^{z(1-\alpha)F\eta} \}$$

Gdje su:

I_0 – struja izmjene

η – prenapon elektrodne reakcije

α – koeficijent prijelaza

z – broj izmijenjenih elektrona

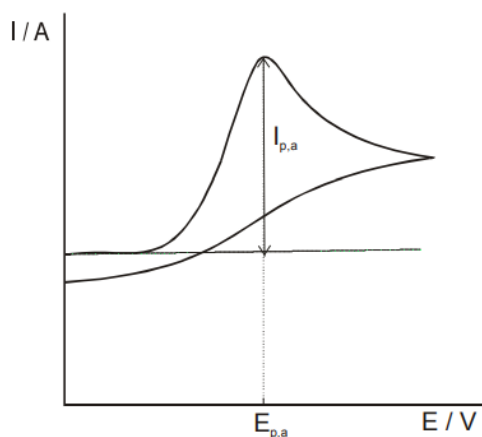
F – Faraday-eva konstanta, 96500 C mol⁻¹

Struja izmjene je veličina koja u sebi sadrži koncentraciju elektroaktivnih vrsta koje sudjeluju u elektrokemijskoj reakciji, površinu elektrode i sve kinetičke parametre koji uvjetuju brzinu

elektrodne reakcije. O struji izmjene ovisit će elektrokemijska reverzibilnost elektrodne reakcije pa kada govorimo o velikom strujama izmjene tada govorimo o reverzibilnim procesima, dok pri vrlo malim vrijednostima struja izmjene govorimo o ireverzibilnim procesima. Za pobudu toka neto struje u katodnom ili anodnom smjeru za slučaj ireverzibilnih procesa bit će potrebna velika vrijednost prenapona. Sukladno navedenome, kod ireverzibilnih procesa ne dolazi do povratnog procesa redukcije i na cikličkom voltamogramu bit će izražen samo anodni val. Pri promjeni potencijala elektrode ne dolazi do promjene omjera koncentracija oksidiranog i reduciranog oblika zbog toga što je elektrodna reakcija vrlo spora.

Iz navedenog možemo zaključiti da za slučaj ireverzibilnog procesa:

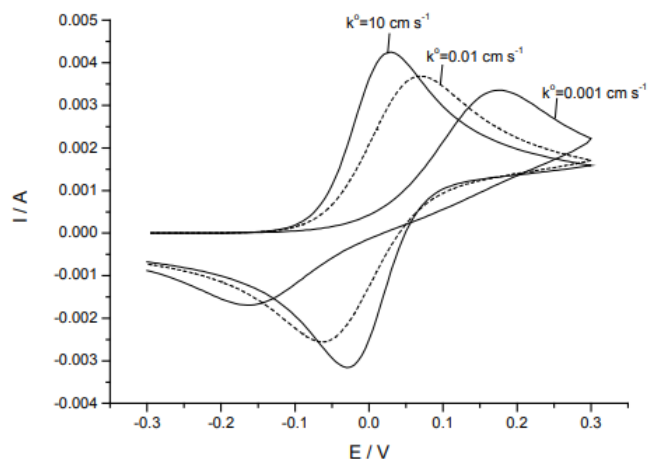
$E_{p,k}$ i $E_{p,a}$ ovise o brzini promjene potencijala. Kod redukcije se pomiče za $30/\alpha n$ mV prema negativnijim vrijednostima potencijala i obrnuto kod oksidacije. [1, 16]



Slika 7. Ciklički voltamogram za ireverzibilan proces.

3. Kvazireverzibilan proces

Kvazireverzibilni procesi su procesi koji se pri niskim brzinama promjene potencijala ponašaju reverzibilno, a pri visokim brzinama promjene potencijala odstupaju od reverzibilnog ponašanja pa za njih kažemo da su to procesi pod miješanom kontrolom. Struja odziva ovisi o kinetici procesa, a oblik i visina strujnih vrhova ovise o brzini promjene potencijala (v), koeficijentu prijelaza (α), standardnoj konstanti brzine elektrodne reakcije (k^0) i difuzijskim koeficijentima oksidirane i reducirane vrste redoks sustava. [16]

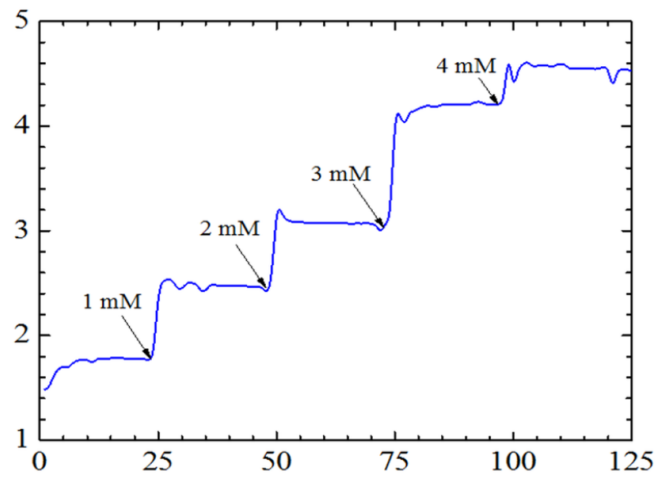


Slika 8. Ciklički voltamogram pri različitim vrijednostima standardnih konstanti izmijene naboja (k^0).

2.6 Amperometrija

Amperometrija je elektrokemijska tehnika koja se temelji na mjerenju struje koja prolazi kroz elektrokemijsku ćeliju pri konstantnoj vrijednosti potencijala. Ova metoda se između ostalog može koristiti i za određivanje koncentracije promatrane vrste u otopini. Brojne vrste prisutne u otopini mogu se oksidirati ili reducirati pri određenoj vrijednosti potencijala koja je karakteristična za njih. Ako se vrijednost potencijala održava konstantnom, kako bi reakcija redukcija ili oksidacije bila brza, jakost struje odnosno granična struja, bit će izravno proporcionalna koncentraciji analita koji se promatra. U drugom slučaju, ako se potencijal mijenja od vrijednosti pri kojoj je reakcija oksidacije ili redukcije spora, do vrijednosti graničnog potencijala, jakost struje će ovisiti ne samo o koncentraciji analita već i o brzini i vremenskoj ovisnosti promjene potencijala.

S obzirom na to da su sustavi u kojima se radi obično složeni i prisutan je veliki broj elektroaktivnih vrsta, važno je odabrati vrijednost potencijala kako bi se postigla selektivna oksidacija one vrste čije ponašanje želimo promatrati. Međutim, granice potencijala za redukciju (oksidaciju) elektroaktivnih vrsta u vodenim otopinama iznose oko 2,5 V. Navedena vrijednost potencijala određena je redukcijom vode u elementarni vodik na negativnoj granici i oksidacijom u elementarni kisik na pozitivnoj granici, što predstavlja područje polarizabilnosti elektrode. [1, 17]



Slika 9. Prikaz primjera amperometrijskog odziva na različite koncentracije glukoze. Preuzeto i adaptirano iz reference [18].

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali i oprema

3.1.1 Kemikalije

Tablica 1. Kemikalije korištene za izradu radnih otopina i oslojavanje radne elektrode.

Naziv	Kemijska formula	Molekulska masa / g mol ⁻¹	Proizvođač
Natrijev klorid	NaCl	58,44	Gram mol, Hrvatska
Kalijev klorid	KCl	74,56	Kemika, Hrvatska
Natrijev hidrogen fosfat	Na ₂ HPO ₄	177,99	Kemika Hrvatska
Kalijev dihidrogen fosfat	KH ₂ PO ₄	136,09	Merck, Njemačka
Željezov (III) klorid	FeCl ₃	270,30	Gram mol, Hrvatska
Vodikov peroksid, w(H ₂ O ₂) = 30%	H ₂ O ₂	34,01	Gram mol, Hrvatska
Kalijev heksacijanoferat (III)	K ₃ [Fe(CN) ₆]	329,96	Merck, Njemačka
Mliječna kiselina	C ₃ H ₆ O ₃	90,08	Sigma Aldrich, SAD
Klorovodična kiselina, w(HCl) = 37%	HCl	36,46	Kemika, Hrvatska
Octena kiselina, w(CH ₃ COOH) = 2%	CH ₃ COOH	60,05	Sigma Aldrich, Njemačka
Natrijev hidroksid	NaOH	39,99	Kemika, Hrvatska
Kitozan	C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O	Srednja molekulska masa	Sigma Aldrich, Njemačka

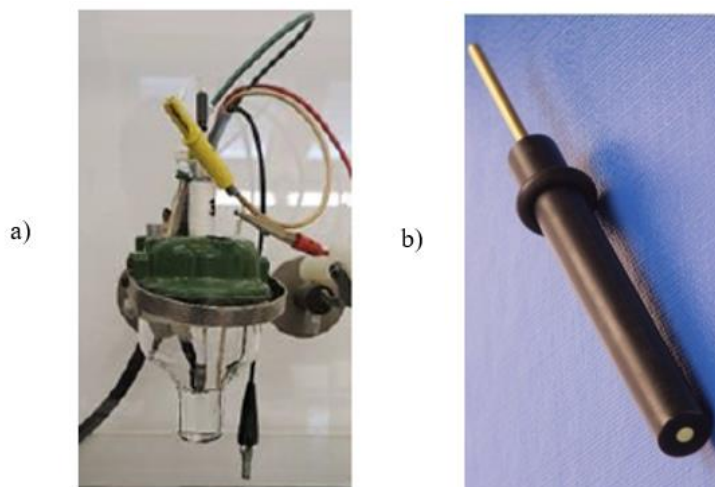
Sve otopine pripravljene su demineraliziranom vodom dobivenom pomoću Milipore-MilliQ uređaja.

3.1.2. Instrumenti i uređaji

Za potrebe ovog rada korištene su dvije vrste elektroda, 3D disk elektroda od staklastog ugljika - GCE (engl. *Glassy Carbon Electrode*) i plošna tiskana ugljikova elektroda ED-S1PE-C2, Micrux Fluidic. Sukladno navedenome, u nastavku su opisani korišteni sustavi s njihovim karakteristikama.

1) Troelektrodni sustav:

- radna elektroda: GCE, $A = 0,070 \text{ cm}^2$
- referentna elektroda: $\text{Ag}|\text{AgCl}| 3\text{M KCl} || 2\text{M NaNO}_3$
- Pt pomoćna elektroda



Slika 10. a) Korišteni troelektrodni sustav s GC radnom elektrodom
b) GC radna elektroda.

2) Plošna tiskana ugljikova elektroda ED-S1PE-C2, Micrux Fluidic.

Specifikacije:

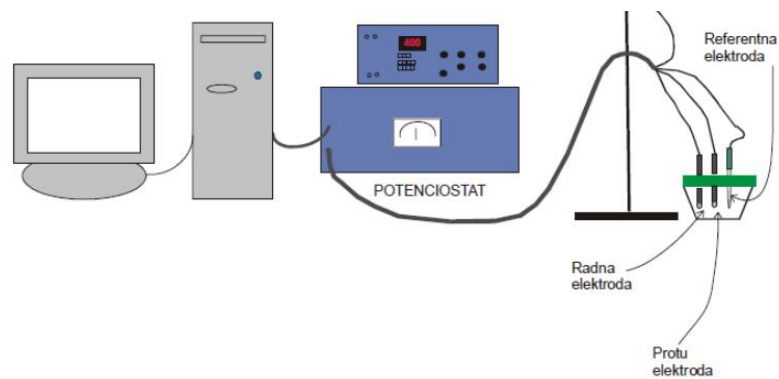
- dimenzije: 27.5 x 10.1 x 0.35 mm
- Substrat: PET
- Elektrodni materijal:
 - radna elektroda: ugljik
 - referentna elektroda: Ag/AgCl

- pomoćna elektroda: ugljik
- Dimenzije radne elektrode: 3 mm \varnothing (7.1 mm²)
- Volumen uzorka: 20 - 50 μ L



Slika 11. Plošna tiskana ugljikova elektroda ED-S1PE-C2, Micrux Fluidic.

Za oba od navedenih sustava provedena su identična mjerenja i karakterizacija elektrode pomoću uređaja i aparature navedenih u nastavku.



Slika 12. Shematski prikaz aparature korištene za karakterizaciju elektrode metodama cikličke voltametrije i kronoamperometrije.



Slika 13. Potenciostat: Potentiostat Model 263A, Princeton Applied Research.

Baždarenje pufera provedeno je pomoću digitalnog voltmetra odnosno uređajem pH METER MA5740, Iskra, prikazanog na **Slici 14.** pomoću standardnih pufera (pH = 7) i (pH = 4), proizvođač Reagecon, Irska.



Slika 14. pH METER MA5740, Iskra, Slovenija.

Ostala aparatura uključivala je analitičku vagu koja je korištena prilikom pripremanja otopina te sušionik u kojem su sušeni slojevi nanošeni na elektrodu.



Slika 15. Analitička vaga: Sartorius Lab Instruments, Njemačka.



Slika 16. Sušionik: Instrumentaria ST-01/02, Zagreb.

3.2 Karakterizacija elektrode i postupak oslojavanja

Elektrode su oslojene s ukupno tri sloja pri čemu je prvo nanesen sloj berlinskog modrila, potom enzim laktat oksidaza i na kraju kitozan. Sva mjerenja, za obje elektrode, provedena su u elektrokemijskoj ćeliji gdje je prethodno dodano 10 mL elektrolita, ovisno o tome što se ispitivalo.

3.2.1. Priprema otopina

Za potrebe karakterizacije i oslojavanje radne elektrode pripremljene su slijedeće otopine:

1. 100 mL 0,1 M otopine H_2O_2
2. 10 mL 0,1 M otopine K_3FeCN_6
3. 10 mL 0,1 M otopine FeCl_3
4. 1 L fosfatnog pufera ($\text{pH} \approx 7$)

Soli i njihove množine korištene za pripremu fosfatnog pufera:

- $n(\text{NaCl}) = 0,137 \text{ mol}$
- $n(\text{KCl}) = 2,7 \times 10^{-3} \text{ mol}$
- $n(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,01 \text{ mol}$
- $n(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 1,8 \times 10^{-3} \text{ mol}$

Dobivena pH vrijednost za pripremljeni pufer iznosila je $\text{pH} = 7,264$.

5. 1 L 0,1 M NaCl
6. 100 mL 0,1 M mliječne kiseline
7. 100 mL 0,1 M HCl

3.2.2 Modifikacija elektrode berlinskim modrilom

Postupak nanošenja sloja berlinskog modrila na GC elektrodu proveden je nekoliko puta u različitim izvedbama kako bi se dobio sloj koji bi pokazao najbolju adheziju i koji bi dao najbolje rezultate i odzive primjenom metode cikličke voltametrije. Ispitane su ukupno tri izvedbe sloja, a za svaku od izvedbi način pripreme prikazan je u **Tablici 2**. Kao najbolja izvedba pokazala se kombinacija 0,1M FeCl₃ + 0,1M K₃FeCN₆ u kiseljoj otopini. Utvrđeno je kako je kiseli medij nužan da bi nastao sloj berlinskog modrila, a uz to potreban je i suvišak KCl.

Tablica 2. Prikaz slojeva berlinskog modrila i njihove izvedbe

0,1 M FeCl ₃ + 0,1 M K ₃ FeCN ₆ , vodena otopina	0,1 M FeCl ₃ + 0,1 M K ₄ FeCN ₆ , kisela otopina	0,1 M FeCl ₃ + 0,1 M K ₃ FeCN ₆ , kisela otopina
<u>0,1 M FeCl₃ u tikvici od 10 mL</u> m(FeCl ₃) = 0,2740 g Priprema: dodano 5 mL destilirane vode i dopunjeno do vrha s 0,1 M KCl	<u>0,1 M FeCl₃ u tikvici od 10 mL</u> m(FeCl ₃) = 0,2730 g Priprema: dodano 5 mL 0,1 M HCl i dopunjeno do vrha s 0,1 M KCl	<u>0,1 M FeCl₃ u tikvici od 10 mL</u> m(FeCl ₃) = 0,2732 g Priprema: dodano 5 mL 0,1 M HCl i nadopunjeno do vrha s 0,1 M KCl
<u>0,1 M K₃FeCN₆ u tikvici od 10 mL</u> m(K ₃ FeCN ₆) = 0,3306 g Priprema: dodano 5 mL destilirane vode i dopunjeno do vrha s 0,1 M KCl	<u>0,1 M K₄FeCN₆ u tikvici od 10 mL</u> m(K ₄ FeCN ₆) = 0,4246 g Priprema: dodano 5 mL 0,1 M HCl i dopunjeno do vrha s 0,1 M KCl	<u>0,1 M K₃FeCN₆ u tikvici od 10 mL</u> m(K ₃ FeCN ₆) = 0,3308 g Priprema: dodano 5 mL 0,1 M HCl i dopunjeno do vrha s 0,1 M KCl

Svaki od tri sloja na identičan je način nanošen na elektrodu slijedećim postupkom: 4,5 μL otopine 0,1M FeCl₃ nakapano je na elektrodu te je potom nakapano 4,5 μL 0,1M otopine K₃FeCN₆ odnosno K₄FeCN₆ pri čemu je takav sloj ostavljen na sušenje prvo 45 minuta na sobnoj temperaturi, a potom je elektroda nošena u peć na 1 sat gdje se sušenje odvijalo na temperaturi od 100°C.

Prve dvije izvedbe sloja pokazale su vrlo lošu adheziju pri čemu je prva izvedba sloja ostala postojana nakon sušenja, ali se već nakon prvog uranjanja u 0,1 M otopinu KCl u ćeliji i provedbe mjerenja, sloj u potpunosti odvojio od elektrode dok se u drugoj izvedbi sloj u potpunosti oljuštio te skliznuo s elektrode netom nakon procesa sušenja u peći. Prema tome konačna izvedba sloja koja je odabrana je treća izvedba odnosno 0,1 M FeCl₃ + 0,1 M K₃FeCN₆ u kiseloj otopini. Tako pripremljen sloj pokazao je vrlo dobru adheziju, postojanost i stabilnost nakon provedbe više mjerenja i nakon više postupaka ispiranja elektrode između mjerenja destiliranom vodom i 0,1 M klorovodičnom kiselinom. Ovako pripremljen sloj berlinskog modrila koristio se za konačno oslojavanje 3D disk elektrode od staklastog ugljika - GCE (engl. *Glassy Carbon Electrode*) i plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C2, Micrux Fluidic.

3.2.3. Modifikacija elektrode enzimom laktat oksidazom

Nakon što se osušio sloj berlinskog modrila, na elektrodu je nanesen sloj enzima. Otopina enzima pripremljena je u tikvici od 10 mL, a masena koncentracija enzima iznosila je 40 mg/ mL. Nakon pripreme otopine, na osušeni sloj berlinskog modrila dodano je 4,7 µL iste u jednom obroku. Elektroda je nakon nanošenja sloja enzima ostavljena na sušenje u frižideru pri temperaturi od 4 °C 1h.

3.2.4. Modifikacija elektrode kitozanom

Nakon sušenja sloja enzima, na elektrodu je nanesen sloj kitozana. Pripremljena je 1 % otopina kitozana u 2 % octenoj kiselini te je na elektrodnu površinu prethodno oslojenu berlinskim modrilom i laktat oksidazom naneseo 4,7 µL ovako pripremljene otopine u jednom obroku. Karakterizacija 3D disk elektrode od staklastog ugljika - GCE ispitana je s ovakvom izvedbom kitozana te se pokazalo da se kitozan sam po sebi ne zadržava na elektrodnoj površini zbog čega ovako oslojena elektroda nakon provedbe mjerenja nije pokazala očekivani rezultat. Zbog njegove loše adhezije i kiselog karaktera, kitozanu je dodano 4,7 µL 1 M otopine NaOH kako bi se pripravio hidrogel koji je imao bolja mehanička svojstva i propusnost za laktat. Ovakva izvedba kitozana korištena je za karakterizaciju plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21, Micrux Fluidic što je u konačnici pokazalo dobar rezultat odnosno njegovo zadržavanje na elektrodnoj površini.

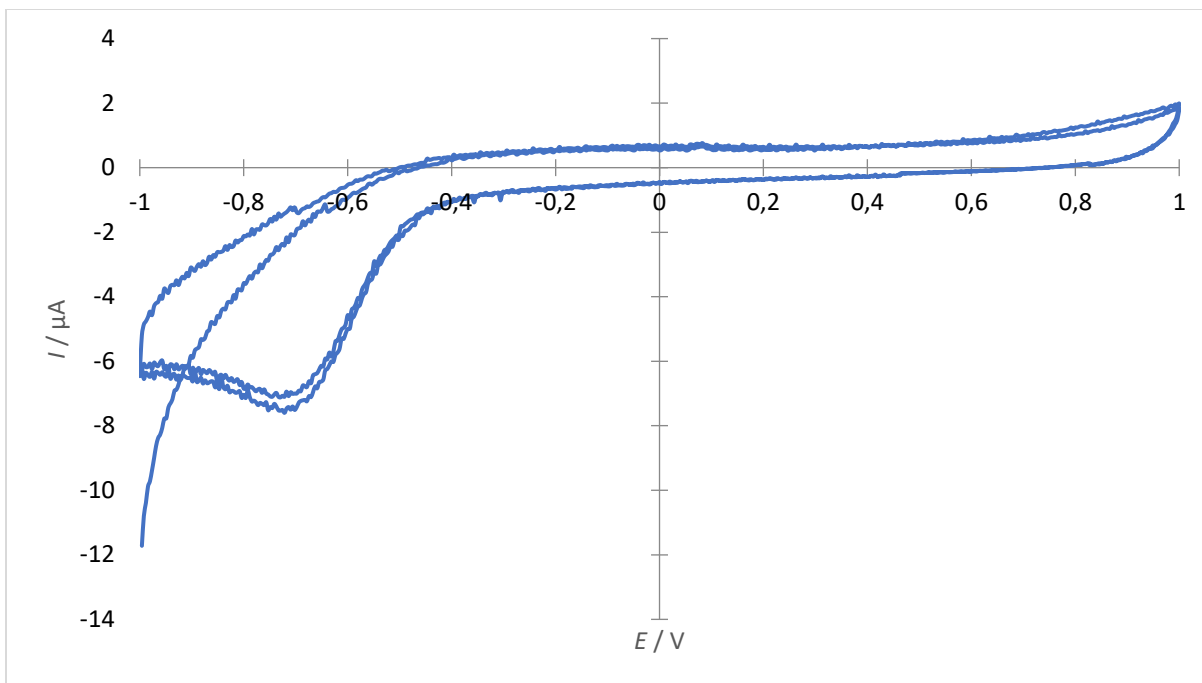
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Odziv čiste GC elektrode

Prije provedbe samog mjerenja, čista GC elektroda je temeljito isprana s 0,1 M HCl, ispolirana pomoću filter papira te nakon toga ponovno isprana MiliQ vodom i osušena. Za provedbu metoda cikličke voltametrije i kronoamperometrije korišten je program PowerSuite.

Mjerenja su provođena u nekoliko elektrolita: u pripremljenom PBS (pH = 7,264) (engl. *Phosphate-buffered saline*), puferaska otopina čiji je pH neutralan i sličan fiziološkom pH u ljudskom tijelu. Ova otopina kasnije je modificirana i za niže pH vrijednosti u kojima su provedena dodatna mjerenja kao i u prethodno pripremljenim 0,1 M NaCl te 0,1 M KCl. Prva mjerenja na čistoj elektrodi provedena su kako bi se utvrdila čistoća elektrodne površine i raspon potencijala u kojem će se provoditi ostatak mjerenja kako bi dobiveni strujni odziv bio približno jednak nuli. S obzirom na prisutnost velikog broja ionskih vrsta u promatranim sustavima, smatra se da su pojedine vrste i molekule poput vode aktivne u niskim područjima potencijala te je prema tome od velike važnosti bilo odabrati ispravan raspon potencijala.

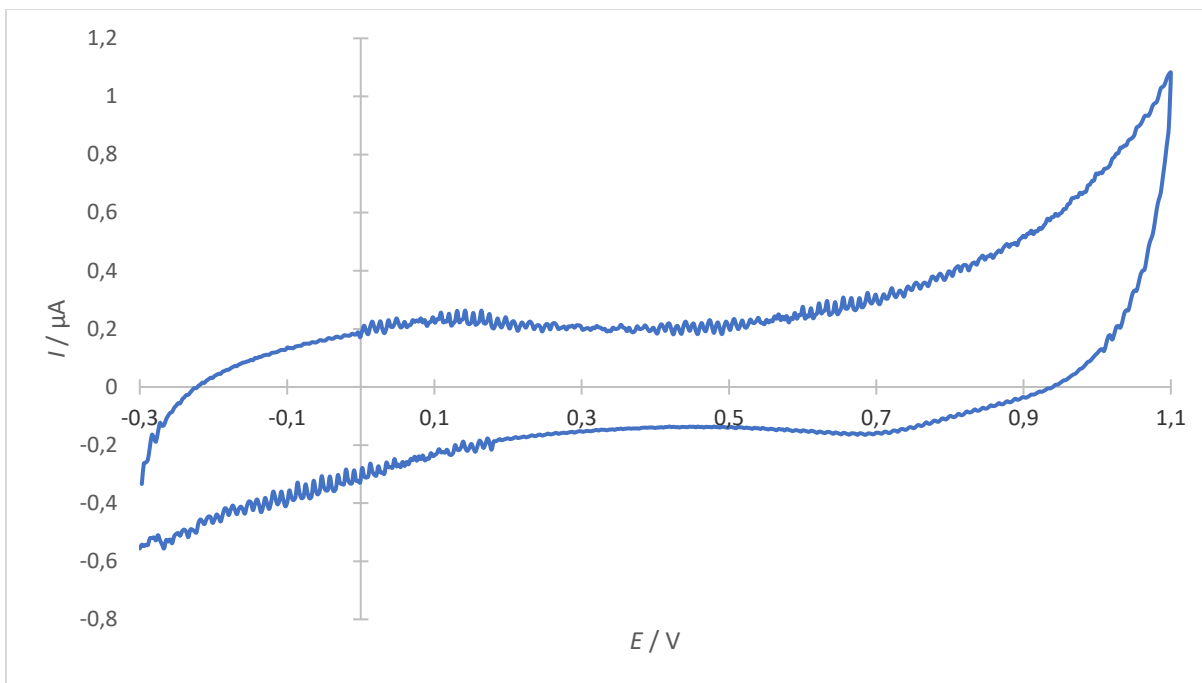
Sukladno navedenome provedena je ciklička voltametrija u dva ciklusa u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 7,2), čiji je odziv prikazan na **Slici 17.**, gdje je jasno vidljivo da pri potencijalu od oko -0,7 V dolazi do redukcije vode do vodika unutar promatranog sustava te je prema tome potrebno odabrati uže područje potencijala.



Slika 17. Odziv neoslojene GC elektrode u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 7,2). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 50 mV/s unutar potencijala od -1 V do 1 V.

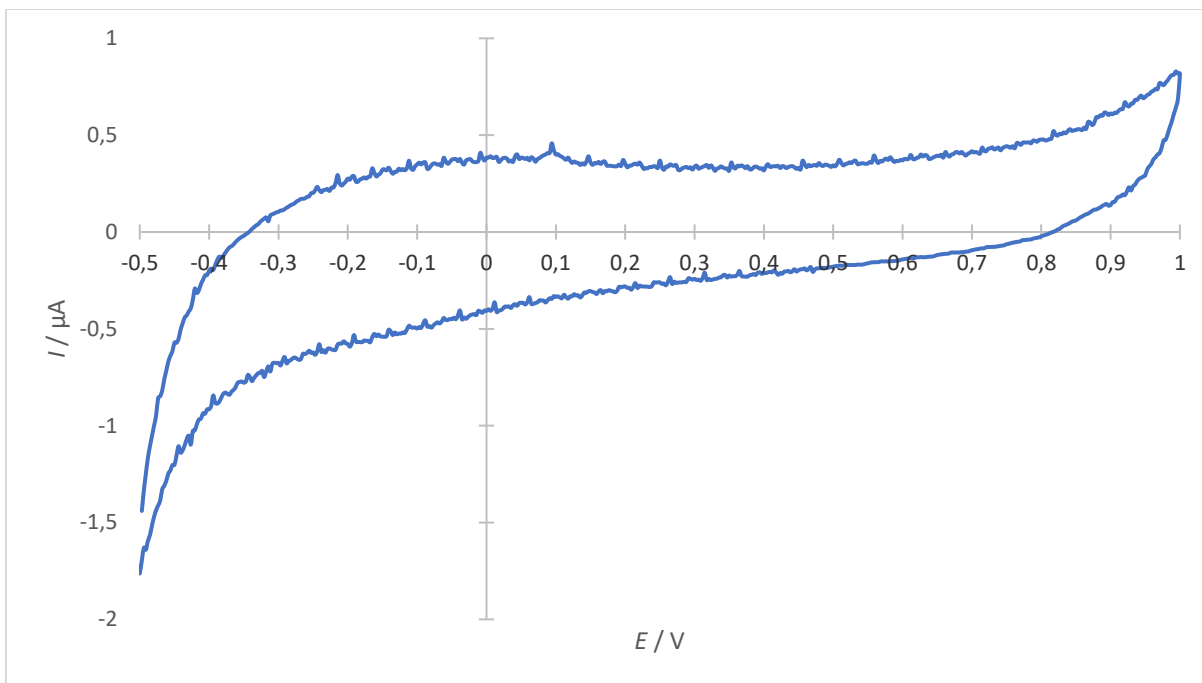
Nakon toga provedeno je nekoliko mjerenja pri istim uvjetima, uz istu brzinu promjene potencijala od 50 mV/s, ali u užem području potencijala kako bi se odabrao konačni radni potencijal.

Na **Slici 18.** je prikazan odziv čiste GC elektrode u PBS pH = 7,2 kao osnovnom elektrolitu. Konačno područje radnih potencijala izabrano je s obzirom na redukciju vode za koju je poznato da se odvija pri potencijalima negativnijim od -0,4 V, a kao gornja granica potencijala odabrana je vrijednost od 1,1 V jer pri višim vrijednostima potencijala dolazi do procesa oksidacije vode u kisik. Na prikazu je vidljivo da se u navedenom području ne odvija reakcija oksidacije ili redukcije te se može smatrati da je vrijednost struje približno jednaka 0.



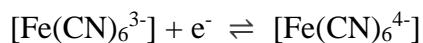
Slika 18. Odziv neoslojene GC elektrode u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 7,2). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.

Identična karakterizacija čiste GC elektrode provedena je i u 0,1 M NaCl kao osnovnom elektrolitu što je prikazano na **Slici 19**. Vidljivo je da neoslojena elektroda u 0,1 M NaCl pokazuje vrijednosti koje se mogu smatrati približnima 0. Sukladno navedenome, raspon potencijala unutar kojeg je prihvatljivo provoditi mjerenje u vodenom mediju kreće se od -0,3 V do 1,1 V.



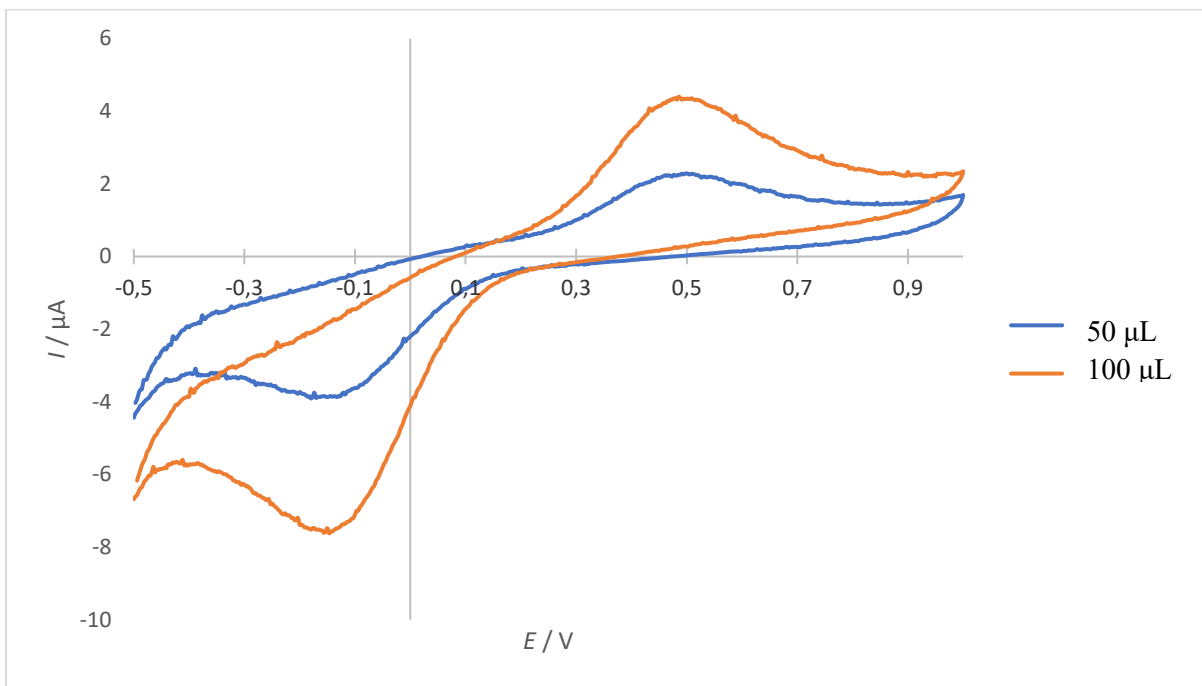
Slika 19. Odziv neoslojene GC elektrode u osnovnom elektrolitu (0,1 M NaCl). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,5 V do 1 V.

Prije daljnjih mjerenja i dodatnog oslojavanja elektrode važno je bilo napraviti probe za redoks par heksacijanoferat (II/III) pri čemu je ciklička voltametrijna snimljena u PBS, pH = 7,2 i 0,1 M NaCl. Redoks par koji je promatran prikazan je sljedećom jednadžbom:

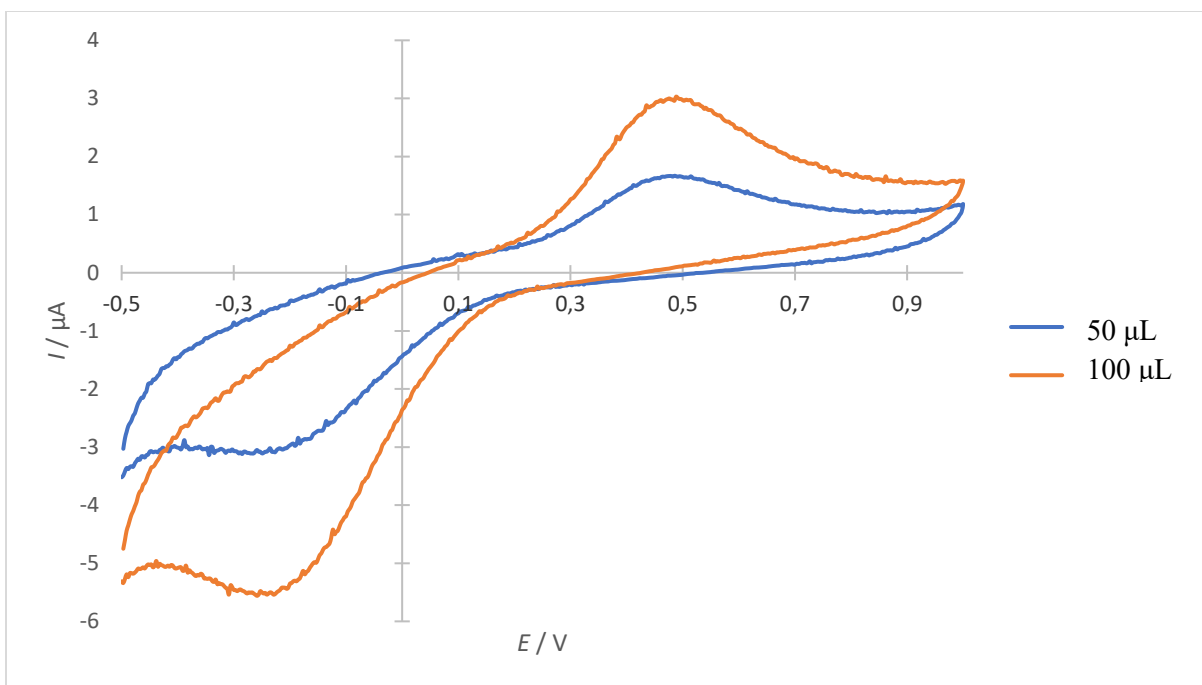


Pripravljeno je 10 mL 0,1 M vodene otopine kalijeva heksacijanoferata (II/III). Tako pripremljena vodena otopina dodana je u dva obroka po 50 μL u ćeliju u koju je prethodno dodano 10 mL PBS (pH = 7,2) te je provedena ciklička voltametrijna za svaki od dva dodatka što je prikazano na **Slici 20**. Isto mjerenje provedeno je i u ćeliji u koju je prethodno dodano 10 mL 0,1 M NaCl, a odziv je vidljiv na **Slici 21**. Ono što možemo uočiti u oba slučaja je to da povećanjem koncentracije heksacijanoferata u otopini rastu i vrijednosti anodnih i katodnih struja te da redoks par pokazuje reverzibilno ponašanje što se očituje po izraženom anodnom valu, na vrijednosti potencijala od 0,5

V te katodnom valu pri vrijednosti potencijala od -0,22 V. Ono što je također važno uočiti je to da u oba slučaja nema pomaka anodnog i katodnog strujnog maksimuma prema pozitivnijim ili negativnijim vrijednostima potencijala. Također, dobiveni ciklički voltamogram s jednim pripadajućim anodnim i katodnim valom potvrđuje prethodno navedenu jednadžbu za redoks par u kojoj se izmjenjuje samo jedan elektron.

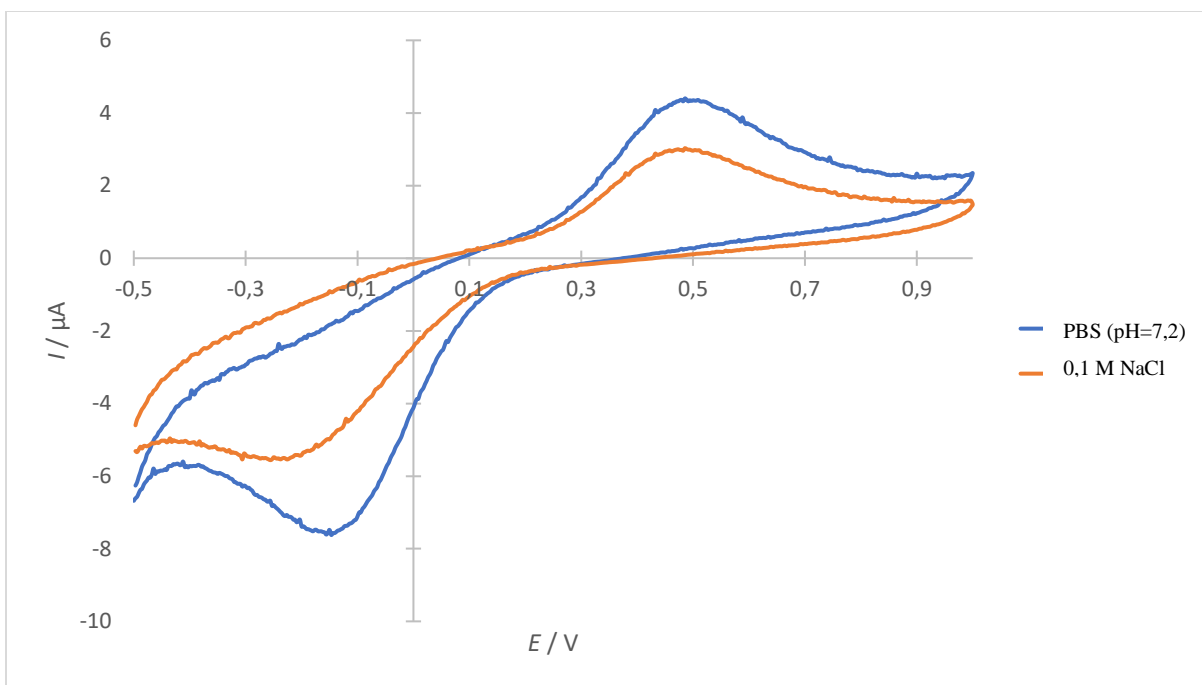


Slika 20. Odziv neoslojene GC elektrode uz dva dodatka po 50 μL 0,1 M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ u osnovnom elektrolitu (PBS, $\text{pH} = 7,2$). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,5 V do 1 V.



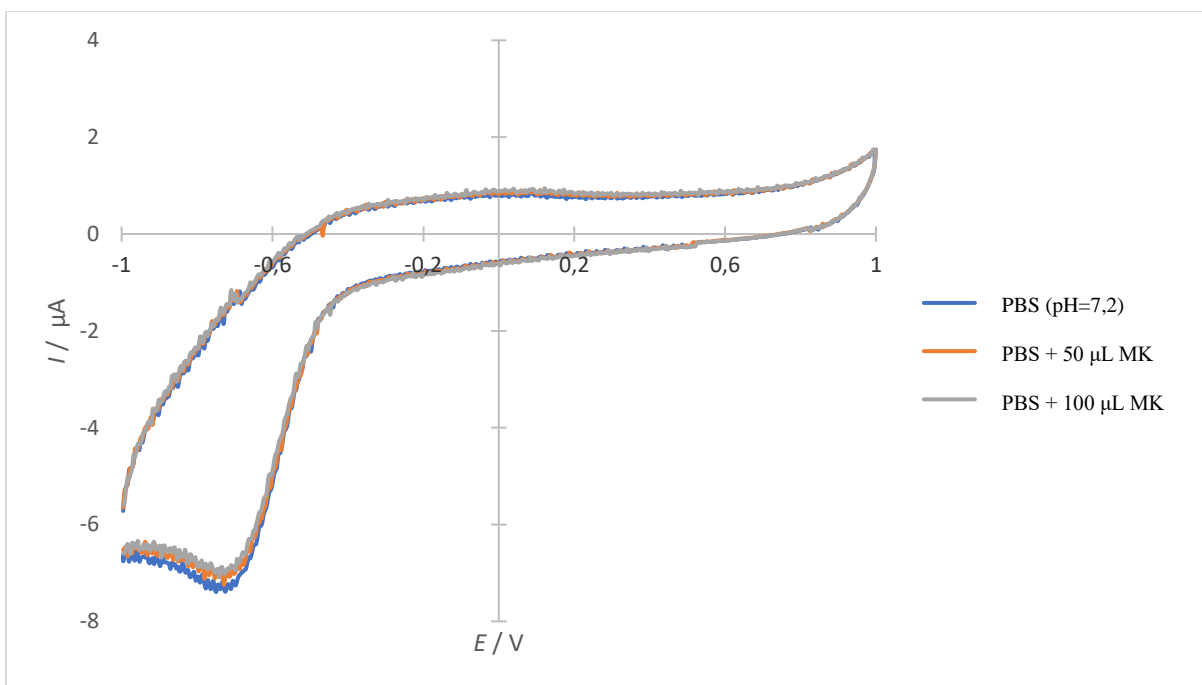
Slika 21. Odziv neoslojene GC elektrode uz dva dodatka po 50 μL 0,1 M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ u osnovnom elektrolitu (0,1 M NaCl). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,5 V do 1 V.

Usporedimo li prethodno prikazane strujne odzive i prikažemo ih grafički radi lakše usporedbe, što je vidljivo na **Slici 22.**, za ukupno dodanih 100 μL u PBS, pH = 7,2 i 0,1 M NaCl, jasno je vidljivo da su za istu vrijednost koncentracije heksacijanoferata u PBS, pH = 7,2 dobivene veće vrijednosti anodne i katodne struje.



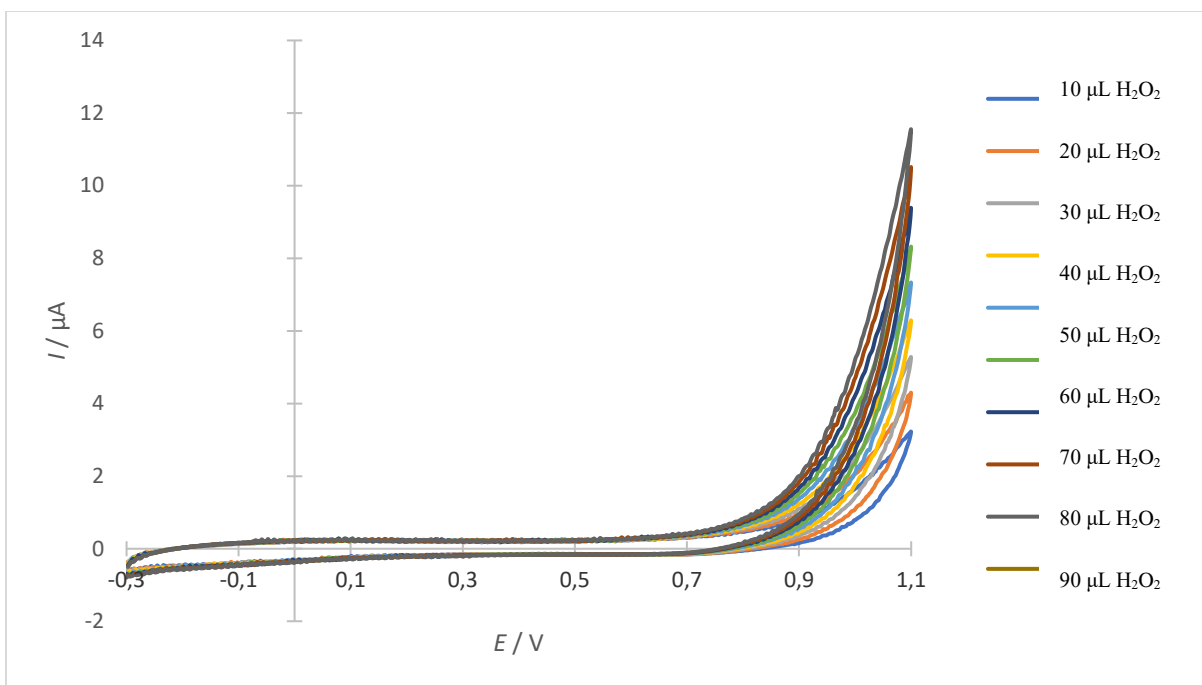
Slika 22. Usporedba odziva neoslojene GC elektrode uz dodatak od 100 μL 0,1 M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ u oba elektrolita: PBS, pH = 7,2 i 0,1 M NaCl. Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,5 V do 1 V.

Napravljena je i proba na mliječnu kiselinu (MK) u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 7,2) uz dodatak 2 obroka po 50 μL 0,1 M mliječne kiseline. Na **Slici 23.** vidljivo je da nema promjene s dodatkom mliječne kiseline u otopinu PBS, pH = 7,2, odnosno ne dolazi do oksidacije ili redukcije laktata. Ono što je vidljivo da primijenjeno područje potencijala ne odgovara onom području u kojem želimo provoditi mjerenje jer dolazi do redukcije vode u vodik pri već spomenutom potencijalu od -0,7 V. Sukladno navedenome, potrebno je suziti područje radnog potencijala koje će za većinu mjerenja u nastavku biti u rasponu od -0,3 do 1,1 V.

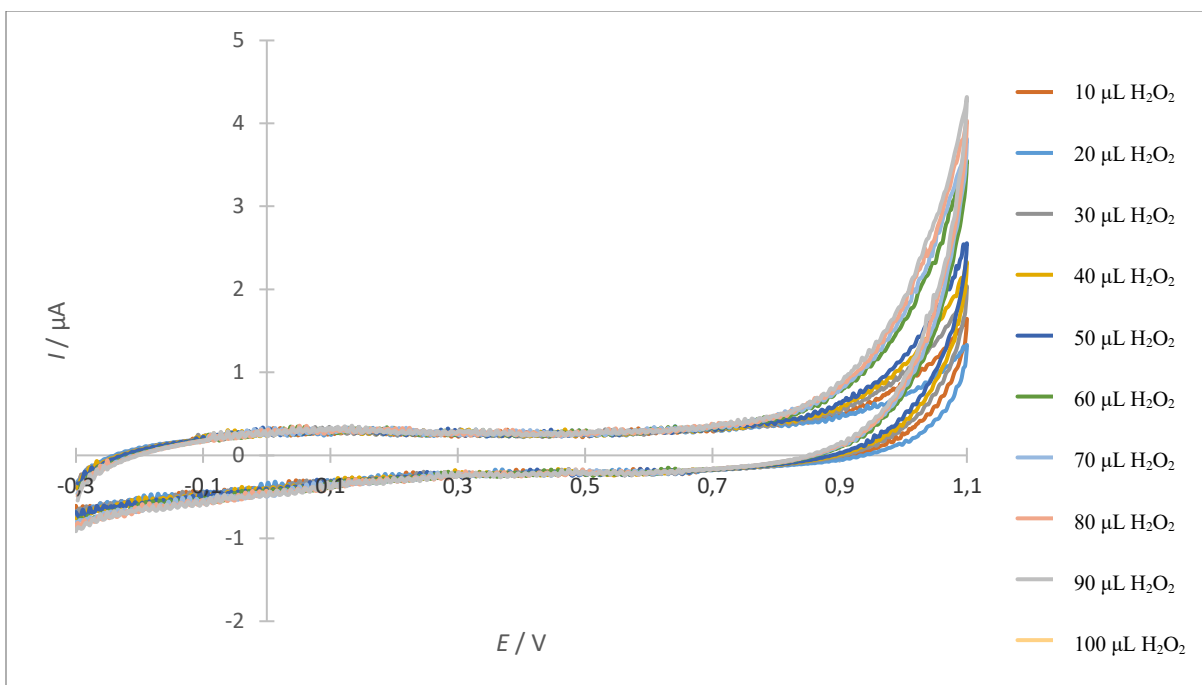


Slika 23. Odziv neoslojene GC elektrode osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 7,2) uz dodatak 2 obroka po 50 μL 0,1 M mliječne kiseline (MK). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 50 mV/s unutar potencijala od -1 V do 1 V.

Odziv neoslojene elektrode ispitan je konačno i uz dodatak 0,1 M H_2O_2 u oba elektrolita odnosno PBS, pH = 7,2 i 0,1 M NaCl što je prikazano na **Slici 24.** i **Slici 25.** U oba elektrolita dodavano je po 10 μL 0,1 M H_2O_2 uz miješanje magnetskom miješalicom na laganoj brzini kako bi se otopina homogenizirala te je za svaki dodatak snimljen ciklički voltamogram. Ono što je vidljivo u oba slučaja je to da je reakcija oksidacije vodikova peroksida ireverzibilna te da povećanjem koncentracije vodikova peroksida rastu struje oksidacije. Također, uočljivo je da su u PBS, pH = 7,2 vrijednosti struje značajno veće.

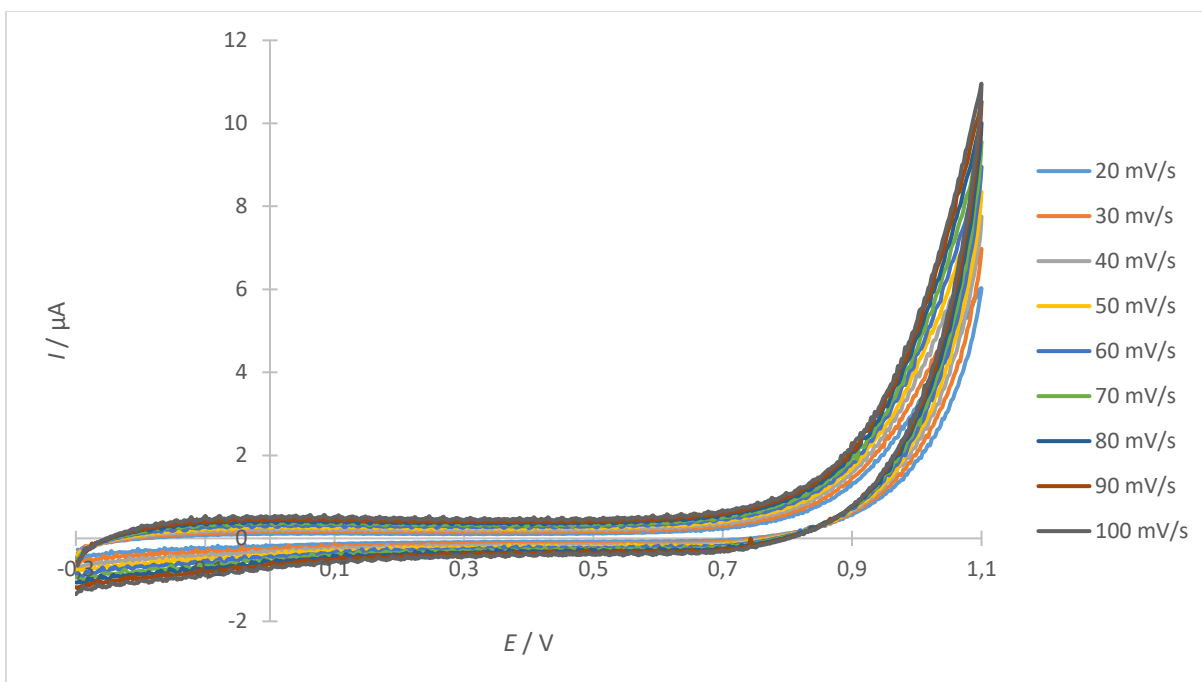


Slika 24. Odziv čiste (nemodificirane, neoslojene) GC elektrode uz dodatak po 10 μL 0,1 M H_2O_2 u osnovnom elektrolitu (PBS, $\text{pH} = 7,2$). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.



Slika 25. Odziv čiste (nemodificirane, neoslojene) GC elektrode uz dodatak po 10 μL 0,1 M H_2O_2 u osnovnom elektrolitu (0,1 M NaCl). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.

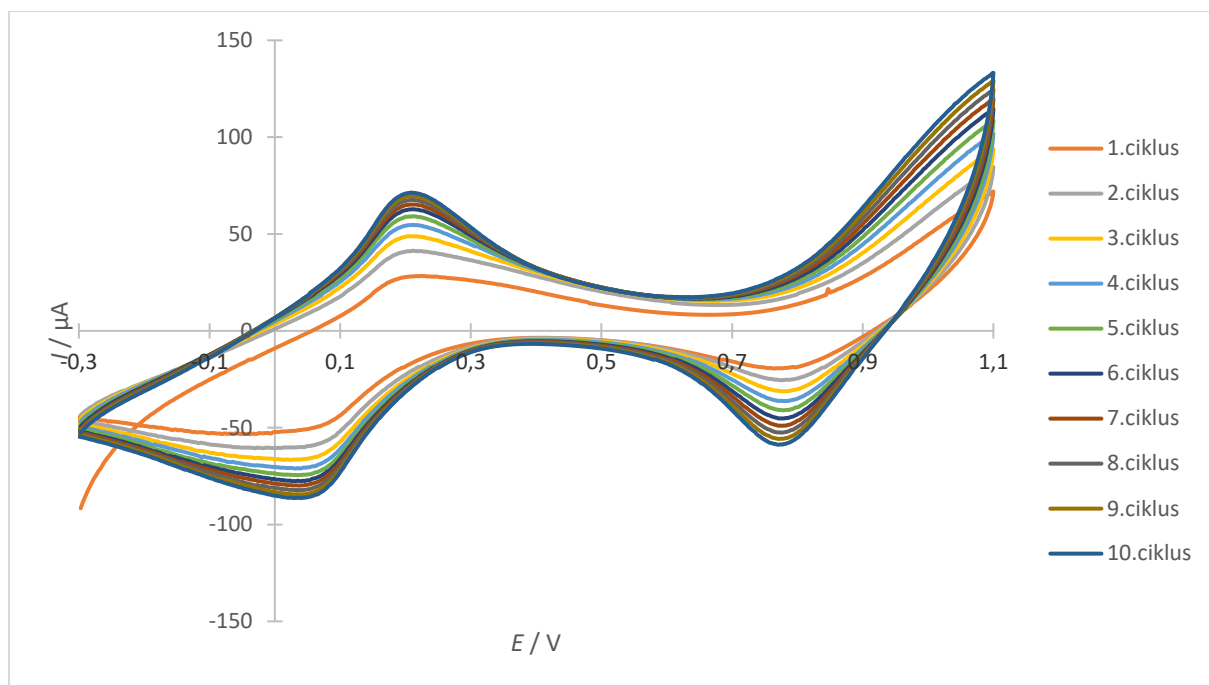
Elektroda je nakon provedenih mjerenja ispolirana i isprana te je u ćeliju stavljena nova otopina PBS pH = 7,2 u koju je potom dodano 50 μL 0,1 M H_2O_2 te je provedena ciklička voltametrija pri čemu se mijenjala vrijednost brzine promjene potencijala od 20 mV/s do 100 mV/s. Na priloženom grafu na **Slici 26.** vidljivo je kako struje oksidacije rastu s porastom vrijednosti brzine promjene potencijala. Veće vrijednosti struje pri većim brzinama promjene potencijala pripisuju se tome što veća brzina promjene potencijala omogućuje bržu kinetiku elektrokemijske reakcije na elektrodi odnosno elektroni se brže oslobađaju ili prihvaćaju između elektrode i elektrolita, što u konačnici rezultira većim strujama.



Slika 26. Odziv čiste (nemodificirane, neoslojene) GC elektrode uz dodatak 50 μL 0,1 M H_2O_2 u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 7,2). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzine promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 20 mV/s do 100 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.

4.2 Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom

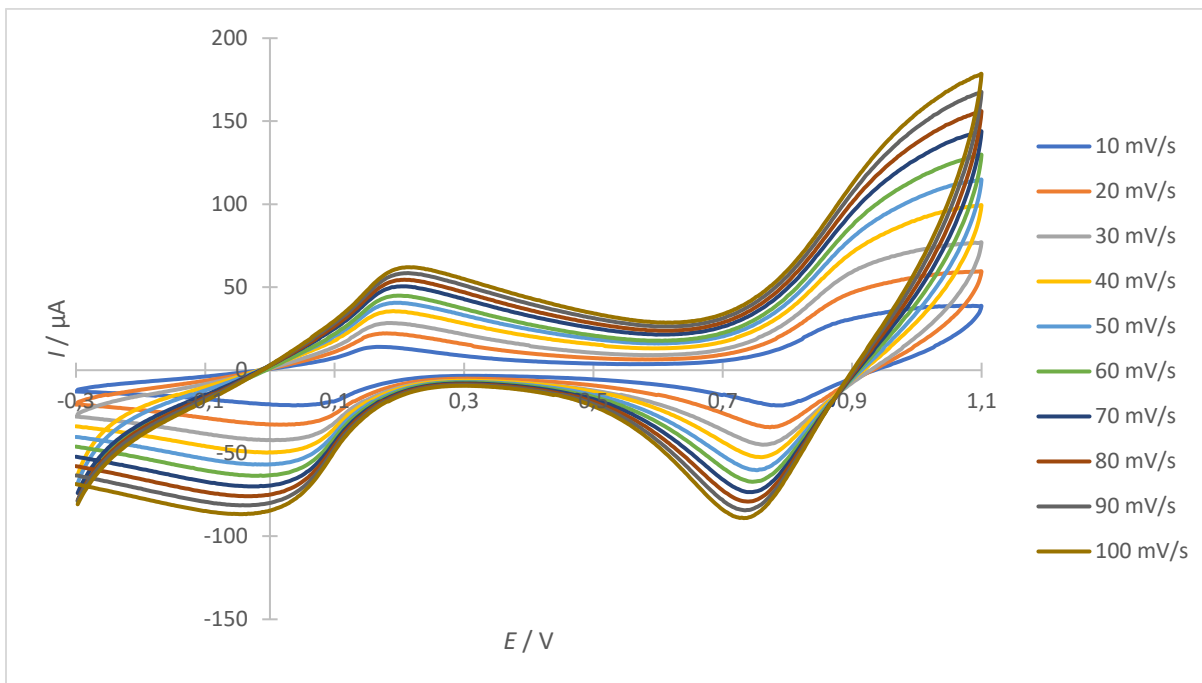
Nakon što je elektroda isprana i ispolirana, na nju je nanesen sloj berlinskog modrila postupkom opisanim u eksperimentalnom dijelu rada te je nakon sušenja sloja provedena ciklička voltametrija. Na **Slici 27.** prikazan je strujni odziv elektrode oslojene slojem berlinskog modrila u 0,1 M KCl. Dobiveni odziv karakterističan je za berlinsko modrilo gdje su vidljiva dva izražena oksidacijska strujna vrha i dva redukcijska strujna vrha, koja se mogu pripisati oksidaciji/redukciji berlinskog modrila u druge aktivne vrste, kao što su engl. *prussian green* (anodni val) i engl. *prussian white* (redukcijski val). Snimljeno je ukupno 10 ciklusa kako bi se utvrdilo ponašanje ovog sloja na elektrodi te kako bi se elektroda aktivirala.



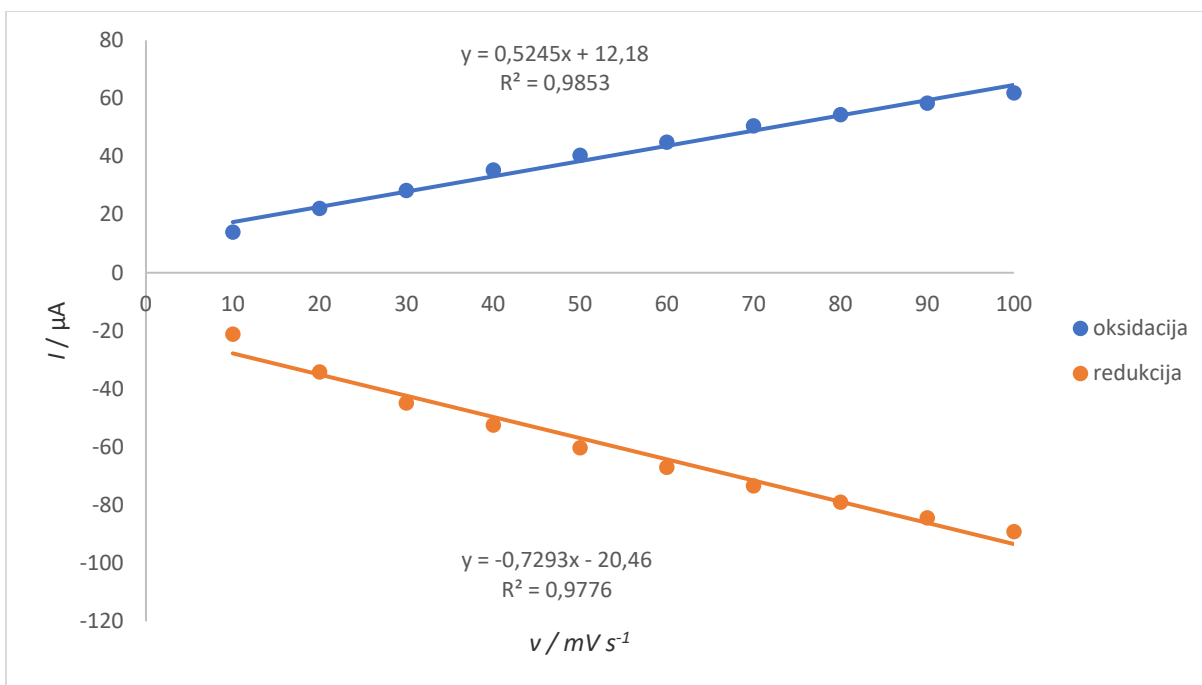
Slika 27. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (0,1 M KCl) Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.

Nakon aktiviranja elektrode, provedeno je ponovno mjerenje u 0,1 M KCl no ovoga puta pri različitim brzinama promjene potencijala koje su se kretale od 10 mV/s do 100 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V. Na **Slici 28.** je vidljivo da s porastom brzine promjene potencijala rastu i vrijednosti struje. Veće vrijednosti struje pri većim brzinama promjene potencijala pripisuju se tome, kao što je i prethodno spomenuto, što veća brzina promjene potencijala omogućuje da se elektroni brže oslobađaju ili prihvaćaju na površini elektrode. Prema Faraday-evom zakonu, struja je proporcionalna brzini promjene naboja te će sukladno tome imati i veću vrijednost. Porastom vrijednosti brzine promjene potencijala osim vidljivog porasta strujnog maksimuma vidljiv je i pomak vrha anodnog vala prema većim vrijednostima potencijala, odnosno pomak vrha katodnog vala prema nižim vrijednostima potencijala. Pomak vrha potencijala prema pozitivnijim odnosno negativnijim vrijednostima potencijala ukazuje na činjenicu da je oksidacija/redukcija berlinskog modrila proces koji se odvija uz izmjenu protona, odnosno pH ovisan proces. Također, kada

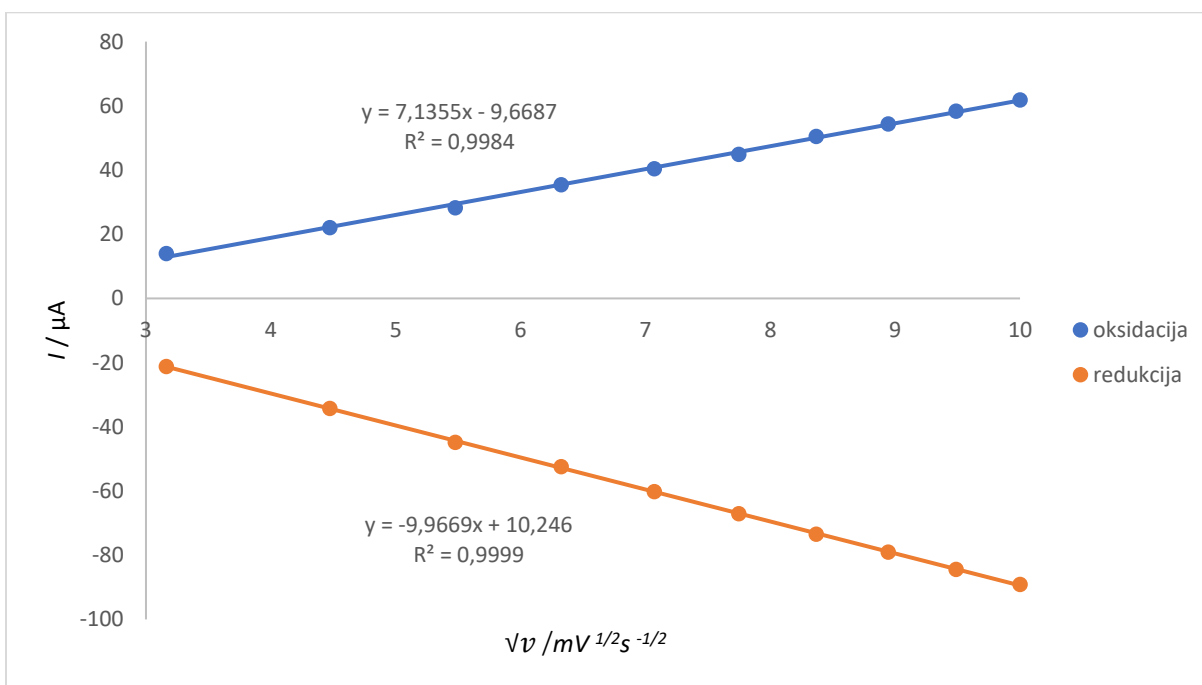
govorimo o reverzibilnosti procesa, s obzirom na to da su pomaci vrhova približno simetrični i proporcionalni s povećanjem brzine promjene potencijala, možemo zaključiti da je promatrani proces reverzibilan. Kako bi se dodatno ispitao utjecaj brzine promjene potencijala, vršne struje anodnog i katodnog vala očitane sa **Slike 28.** te prikazane grafički u ovisnosti o brzini promjene potencijala te drugom korijenu brzine promjene potencijala što je prikazano na **Slici 29.** i **Slici 30.**



Slika 28. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (0,1 M KCl). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 10 mV/s do 100 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.



Slika 29. Ovisnost oksidacijskih i redukcijских strujnih maksimuma o brzini promjene potencijala.

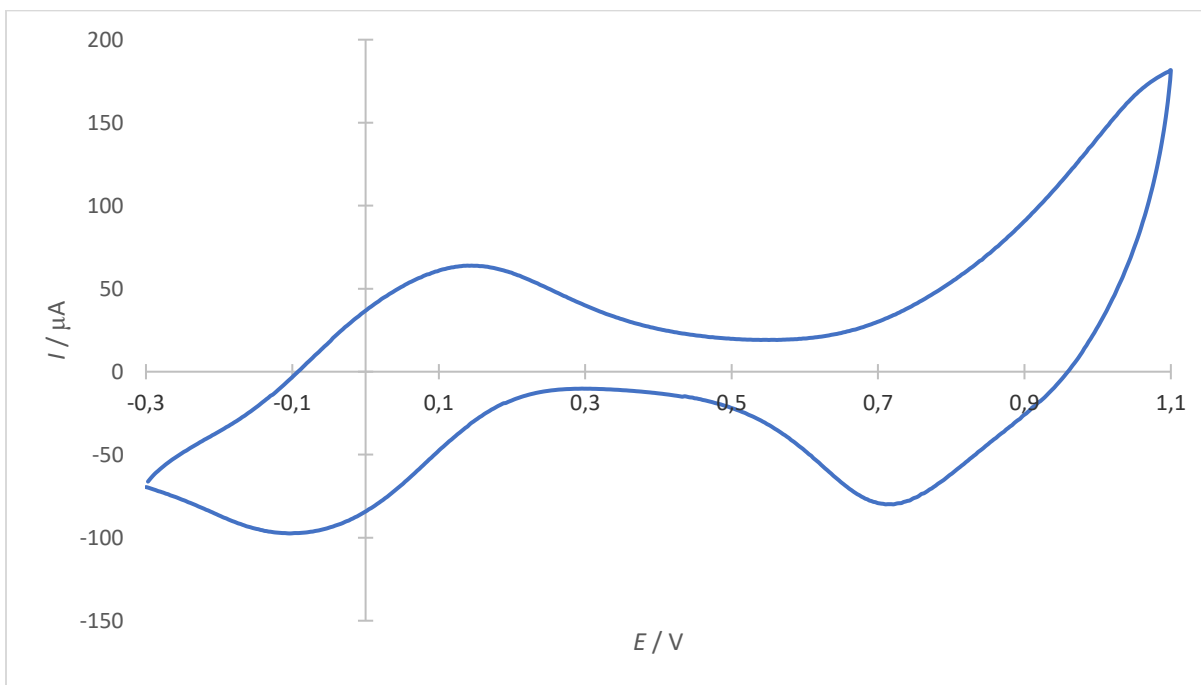


Slika 30. Ovisnost oksidacijskih i redukcijских strujnih maksimuma o korijenu brzine promjene potencijala.

Na **Slici 29.** i **Slici 30.** vidljivo je da se povećanjem vrijednosti brzine promjene potencijala rastu i vrijednosti anodnih i katodnih strujnih vrhova, iako je linearnost izraženija u ovisnosti struje o drugom korijenu promjene brzine potencijala što se očituje prema vrijednost R^2 koja se znatno približava 1. Sukladno navedenom, možemo smatrati da je $I_{p,k} / I_{p,a} \approx 1$ što potvrđuje da je navedeni proces reverzibilan.

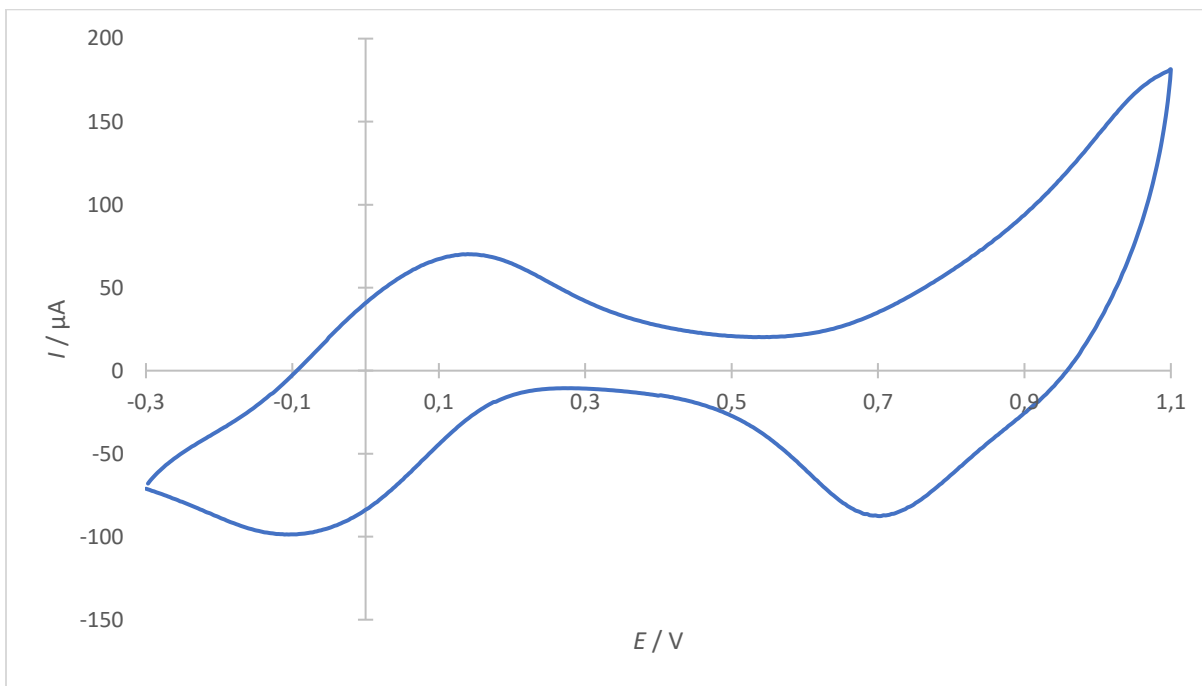
Redoks svojstva berlinskog modrila općenito su se pokazala kao bolja u kiselom puferu jer se smatra da pri blago lužnatim uvjetima berlinsko modrilo gubi svoju katalitičku sposobnost. Prema tome, ispitao se odziv ovako oslojene elektrode u puferima s nižim pH vrijednostima od prethodno pripremljenog PBS, pH = 7,2. Novi puferi pripremljeni su koristeći prethodno pripremljen PBS, pH = 7,2 pri čemu je za podešavanje pH vrijednosti korištena 0,1 M HCl.

Prvo je pripremljen pufer čija je pH vrijednost iznosila 6,1 te je potom provedena ciklička voltometrija što je grafički prikazano na **Slici 31.**



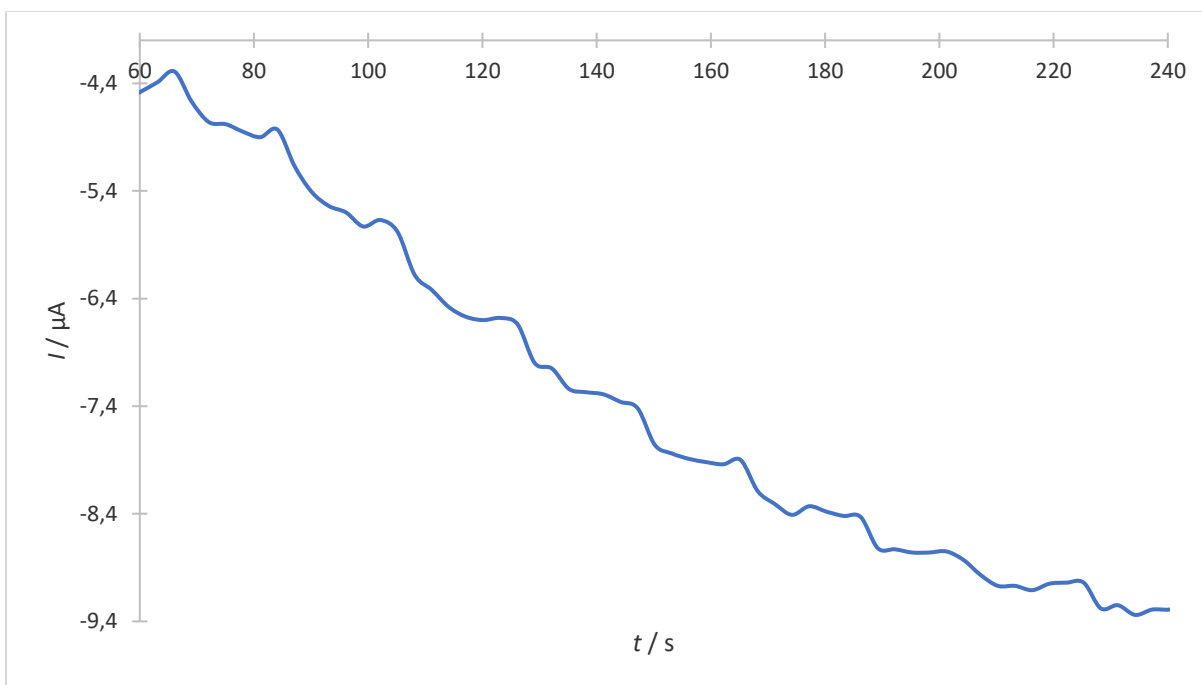
Slika 31. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 6,1). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode uz brzinu promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.

U istome puferu ponovno je napravljena proba za redoks par heksacijanoferat (II/III) dodatkom 100 μL 0,1M vodene otopine kalijeva heksacijanoferata (II/III) te je provedena ciklička voltometrija. Iz dobivenog odziva prikazanog na **Slici 32**. vidljivo je da dodatak kalijeva heksacijanoferata (II/III) ne pokazuje razliku u odnosu na odziv elektrode oslojene berlinskim modrilom u čistom PBS, pH = 6,1.



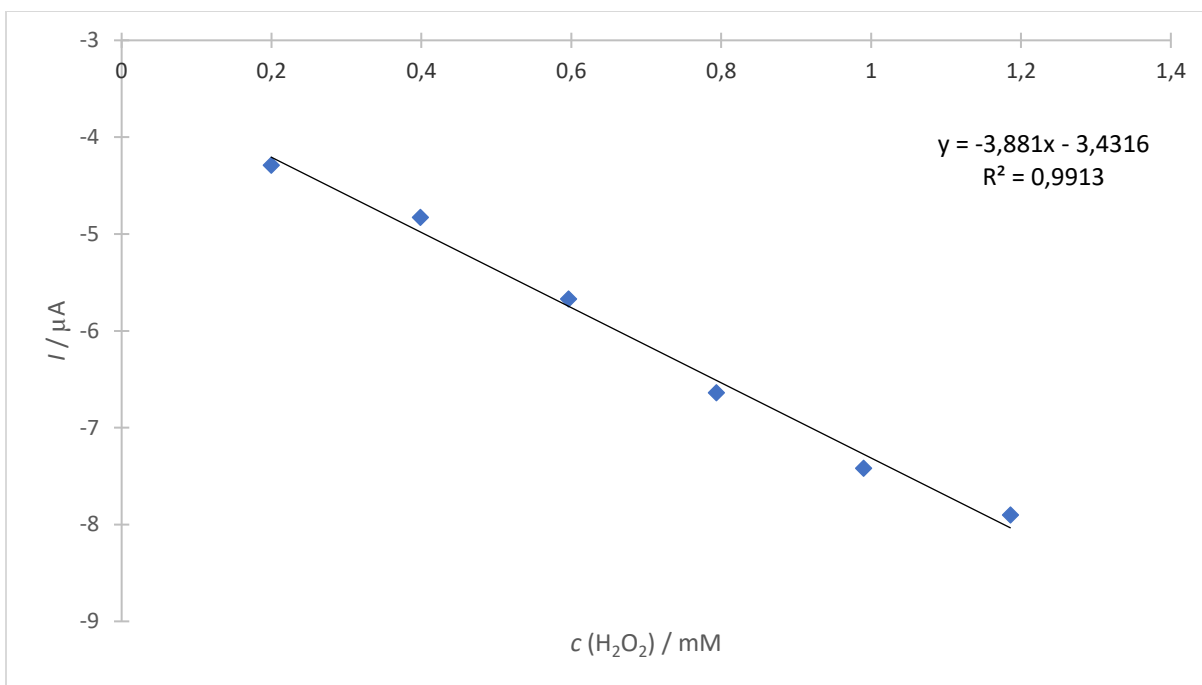
Slika 32. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 6,1) uz dodatak 100 μL $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ heksacijanoferata. Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.

U ovome puferu (pH = 6,1) provedena je i kronoamperometrija uz dodavanje 20 μL 0,1M H_2O_2 svakih 20 sekundi uz lagano miješanje magnetskom mješalicom kako bi se otopina homogenizirala. Mjerenje je provedeno pri potencijalu od -0,1 V jer se pri navedenoj vrijednosti potencijala berlinsko modrilo nalazi u svom reduciranom obliku. Kronoamperometrijski odziv prikazan je na **Slici 33**.



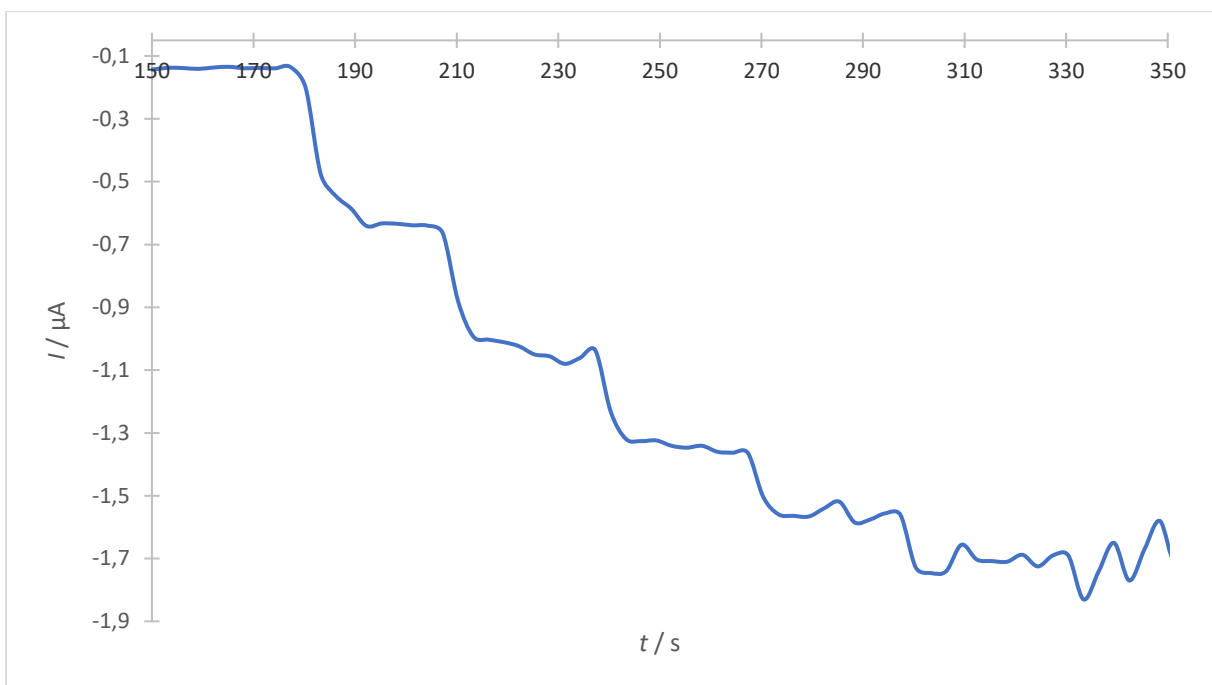
Slika 33. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 6,1) uz dodavanje 20 μL 0,1M H_2O_2 svakih 20 sekundi. Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, pri vrijednosti potencijala od -0,1 V.

Na temelju početne koncentracije H_2O_2 , volumena dodatka i ukupnog volumena u ćeliji nakon uzastopnih dodataka po 20 μL izračunate su koncentracije H_2O_2 u ćeliji te je na **Slici 34.** prikazana ovisnost vršnih vrijednosti struje očitanih sa **Slike 33.** o koncentraciji H_2O_2 u elektrokemijskoj ćeliji. Vidi se da je strujni odziv linearan u koncentracijskom rasponu vodikovog peroksida od 0,2 do 1,2 mM

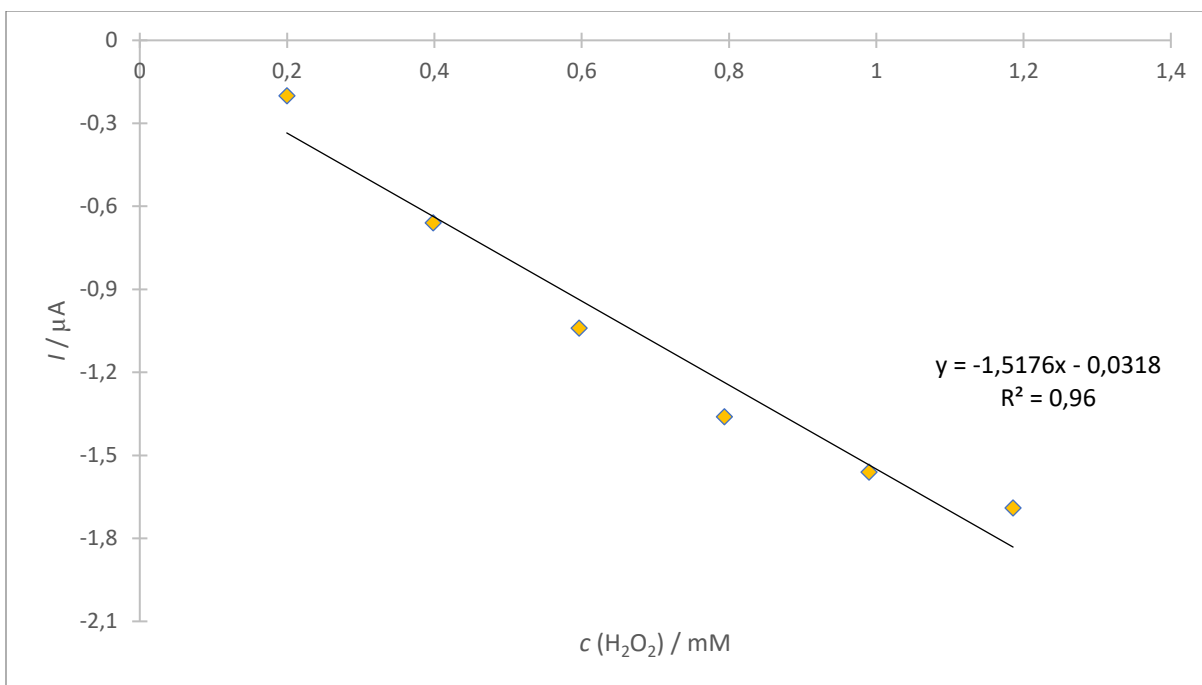


Slika 34. Ovisnost struje o koncentraciji vodikovog peroksida u elektrokemijskoj ćeliji u PBS, pH = 6,1.

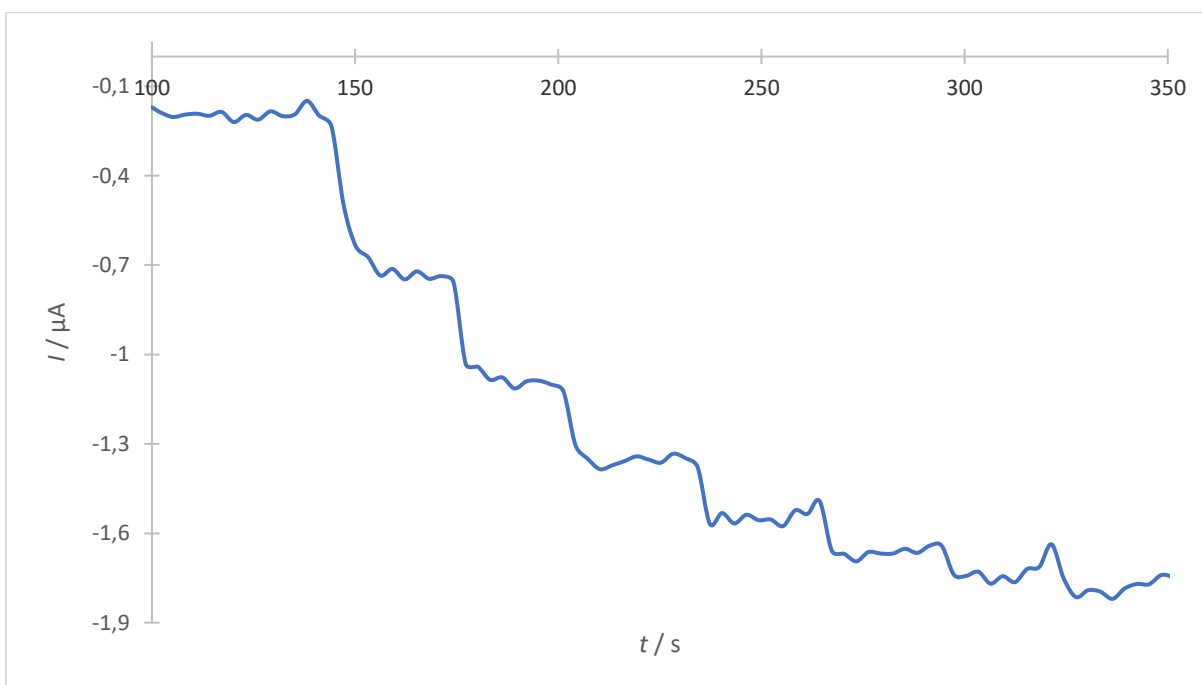
Kronoamperometrijsko mjerenje provedeno je u dva dodatna pufera čije su pH vrijednosti iznosile 5,5 te 5 što je prikazano na **Slici 35.** i **Slici 37.** Za oba mjerenja izračunate su konačne vrijednosti koncentracije H₂O₂ u ćeliji za pojedini dodatak te je grafički prikazana ovisnost struje o koncentraciji H₂O₂ u elektrokemijskoj ćeliji što je za pojedini pufer prikazano na **Slici 36.** i **Slici 38.**



Slika 35. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 5,5) uz dodatak 20 μL H₂O₂ svakih 30 sekundi. Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, pri vrijednosti potencijala od -0,1 V.

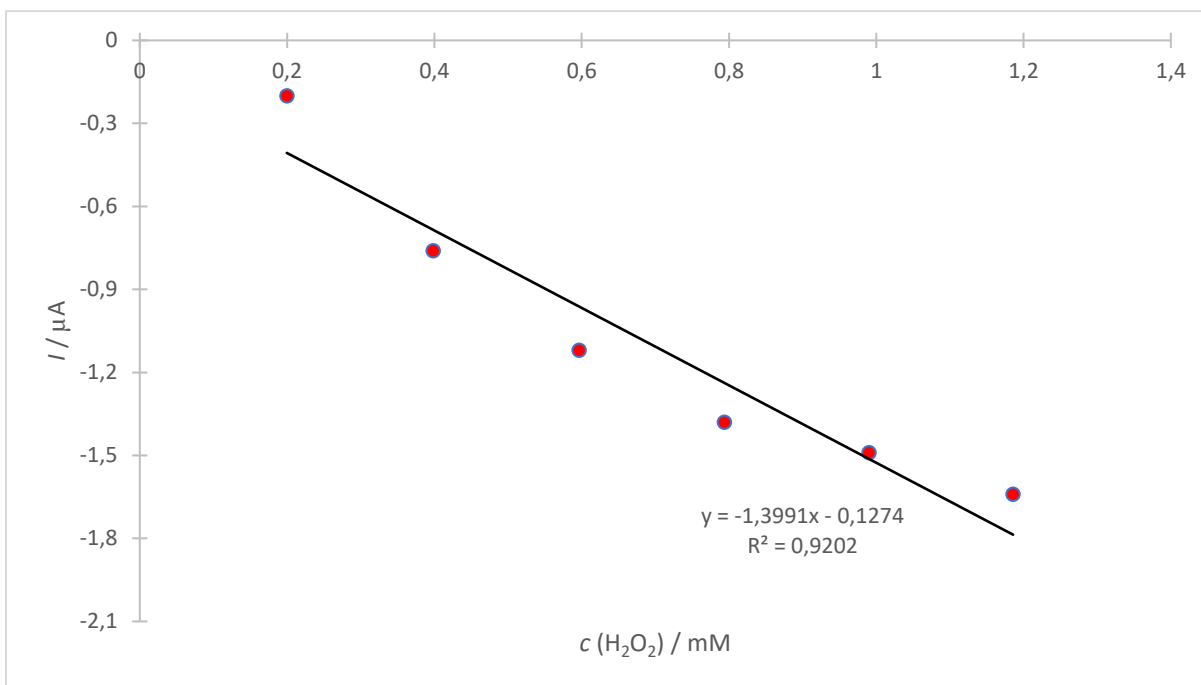


Slika 36. Ovisnost struje o koncentraciji vodikovog peroksida u elektrokemijskoj ćeliji u PBS, pH = 5,5.



Slika 37. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 5,0) uz dodatak 20 μL H_2O_2 svakih 30 sekundi. Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji

uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, pri vrijednosti potencijala od -0,1 V.

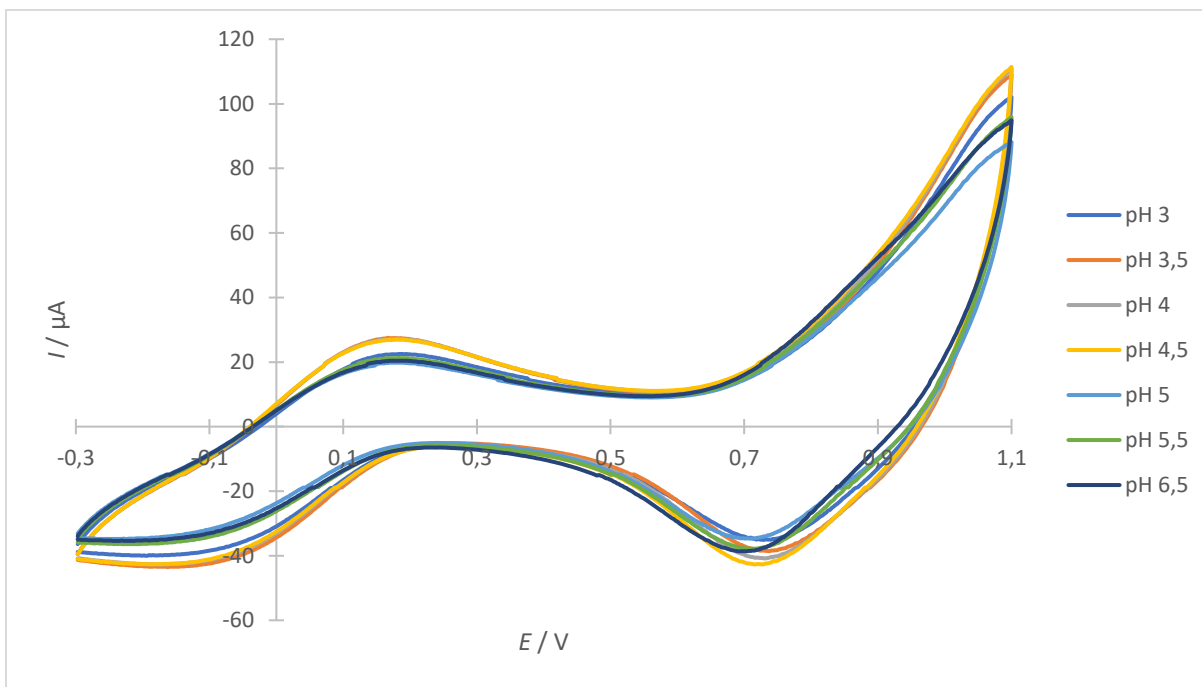


Slika 38. Ovisnost struje o koncentraciji vodikovog peroksida u elektrokemijskoj ćeliji u PBS, pH = 5.

Iz prikazanih grafova možemo zaključiti da se u puferu pH = 6,1 pojavljuju veći padovi strujnih vrijednosti za razliku od pufera niže pH vrijednost gdje su vidljivi manji padovi struje u odnosu na pufer pH = 6,1. Usporedimo li vrijednost R^2 one nam daju do znanja da je PBS pH = 6,1 prikladniji za redukciju vodikovog peroksida. Također, grafički prikazi upućuju na to da se dodatkom 0,1 M H₂O₂ u ćeliju nanese sloj berlinskog modrila nepovratno uništi.

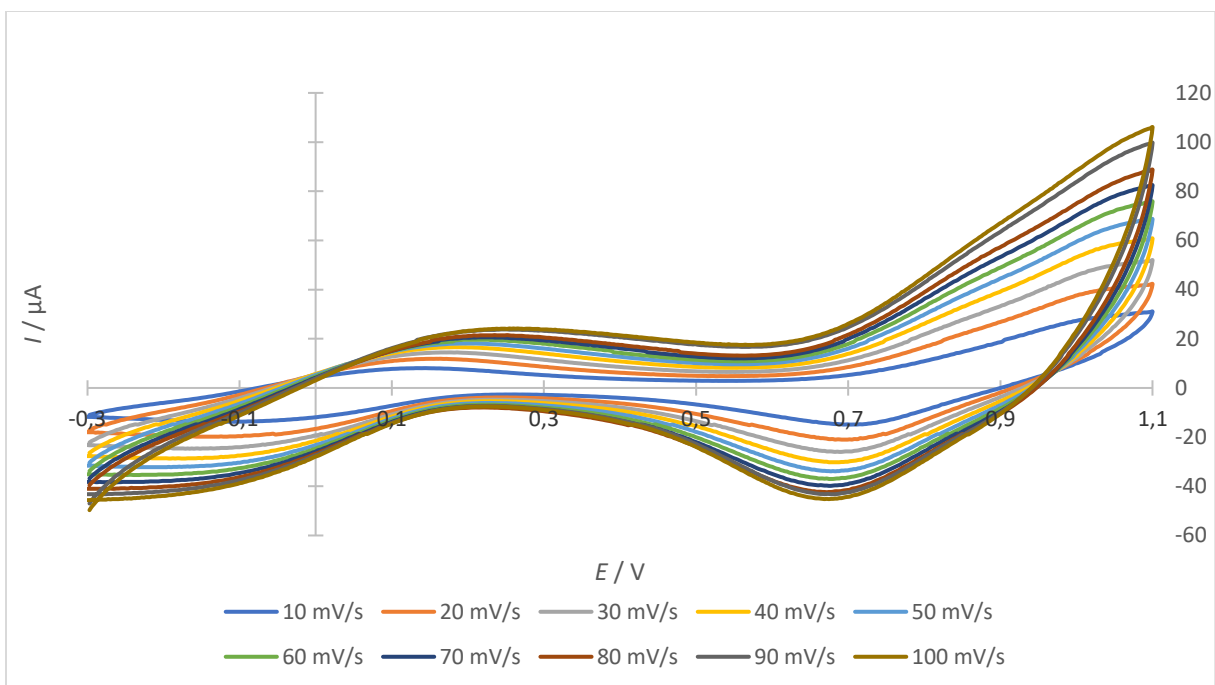
Nakon prethodno opisanog mjerenja, na radnu elektrodu ponovno je nanesen sloj berlinskog modrila uobičajenim postupkom. Pripremljeno je ukupno sedam novih pufera čije su pH vrijednosti iznosile: 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5 i 6,5. Za svaku od navedenih pH vrijednosti snimljen je ciklički voltamogram pri istim uvjetima što je grafički prikazano na **Slici 39**. Ono što je uočljivo je to da su anodni i katodni strujni vrhovi pomaknuti prema pozitivnijim odnosno negativnijim

vrijednostima potencijala, ovisno o pH vrijednosti, što ponovno dokazuje da je oksidacija/redukcija berlinskog modrila proces koji se odvija uz izmjenu protona, odnosno pH ovisan proces. Anodni i katodni strujni vrh najveće vrijednosti pokazuju pri pH vrijednosti od 4,5.



Slika 39. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 3 - 6,5). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode uz brzinu promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.

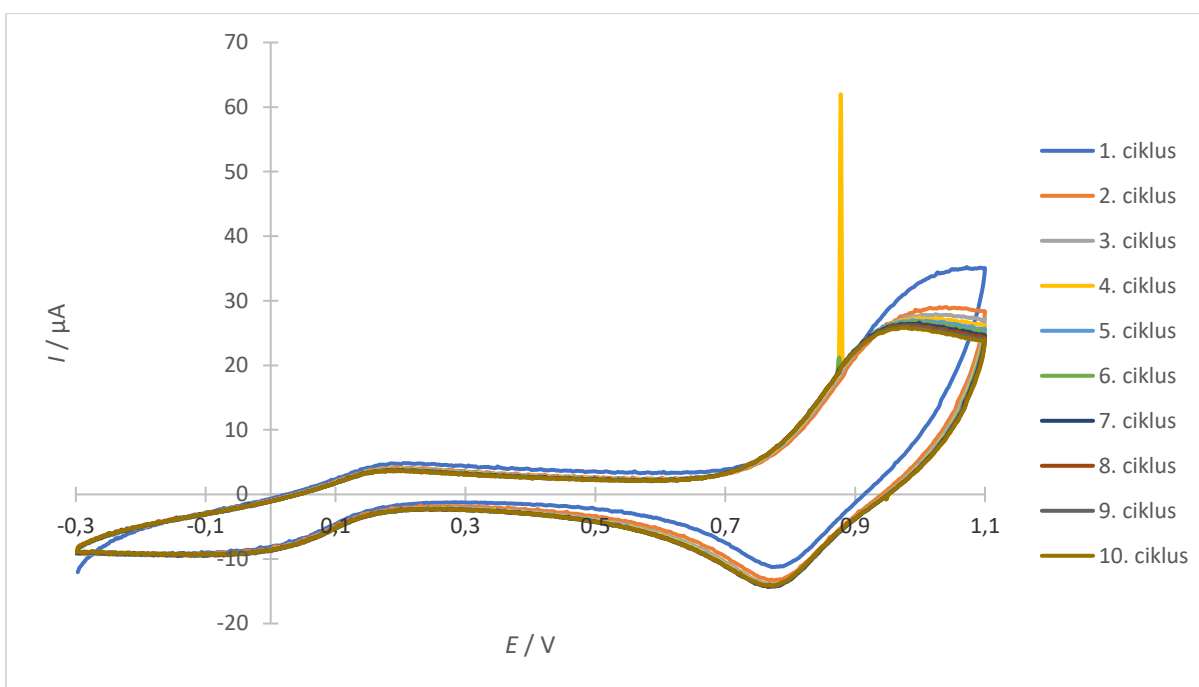
Kao zadnji korak karakterizacije elektrode oslojene berlinskim modrilom provedena je ciklička voltametrija pri različitim brzinama promjene potencijala u PBS, pH = 6,1 što je grafički prikazano na **Slici 40**. Usporedimo li dobiveni prikaz s onim u snimljenim u 0,1 M KCl prikazanom na **Slici 28**, vidljivo je kako su vrijednosti anodnih i katodnih strujnih vrhova znatno izraženije u 0,1 M KCl. Sukladno tome, grafički prikaz prethodno prikazan na **Slici 28**, odabran je za detaljnije razmatranje.



Slika 40. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH=6,1). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzine promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 10 mV/s do 100 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.

4.3 Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom, laktat oksidazom i kitozonom

Na radnu elektrodu oslojenu berlinskim modrilom nanesen je sloj enzima laktat oksidaze koji je potom zaštićen slojem kitozana, kao što je prethodno opisano u eksperimentalnom dijelu rada. U eksperimentalnom dijelu rada također je navedeno da se za karakterizaciju GC elektrode koristio čisti, nemodificirani kitozan kako bi se utvrdilo njegovo zadržavanje na elektrodoj površini. Nakon sušenja slojeva, provedena je ciklička voltometrija u 10 ciklusa u 0,1 M KCl, što je prikazano na **Slici 41**.



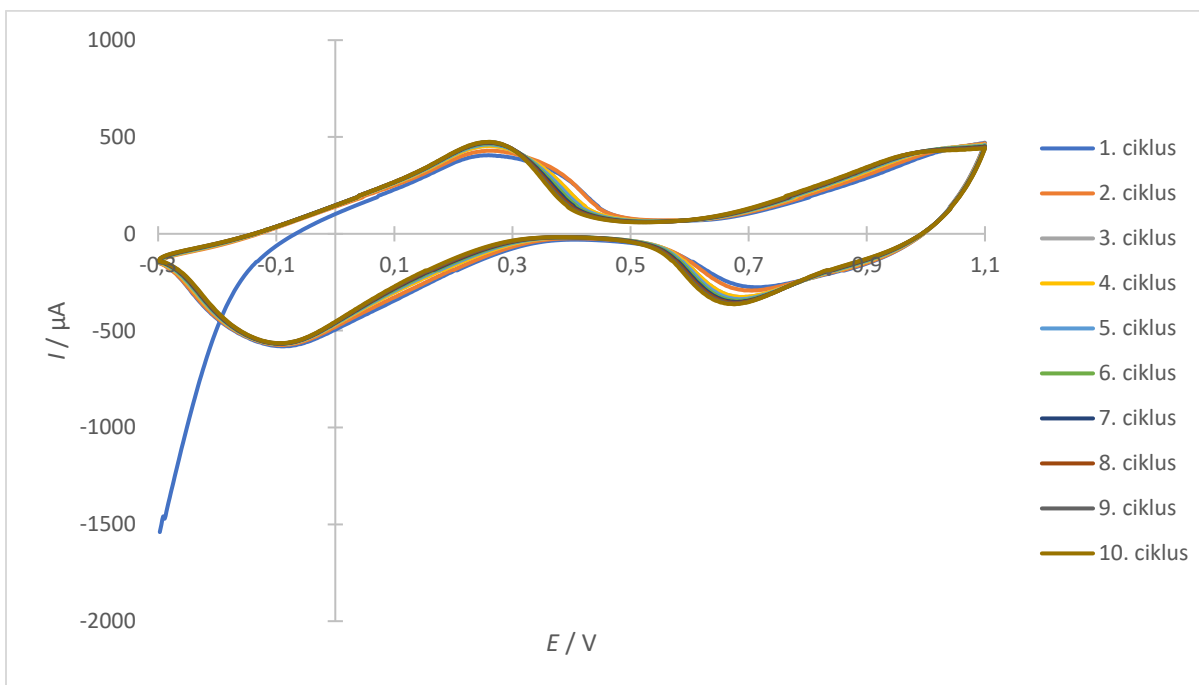
Slika 41. Odziv GC elektrode oslojene s PB, laktat oksidazom i kitozonom u osnovnom elektrolitu (0,1 M KCl). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode uz brzinu promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.

Nakon aktivacije sloja, ali i netom nakon uranjanja elektrode u otopinu, primijećeno je kako je veliki dio nanesenog sloja enzima zajedno s kitozonom skliznuo s površine zbog njegove vrlo loše adhezije. Sukladno navedenome, rezultati dobiveni oslojavanjem elektrode nemodificiranim kitozonom nisu dalje razmatrani.

4.4 Karakterizacija plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21, Micrux Fluidic slojem berlinskog modrila

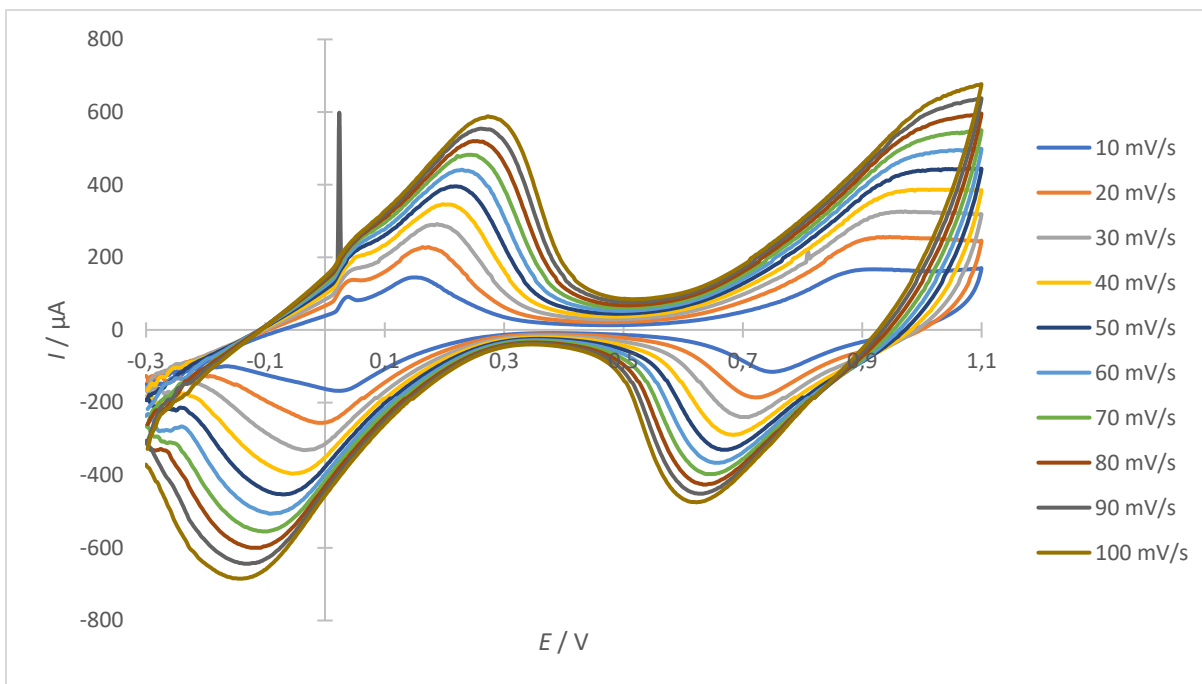
Referentna elektrokemijska elektroda ED-S1PE-C21 okarakterizirana je slojem berlinskog modrila na identičan način kao i GC radna elektroda, a postupak oslojavanja naveden je u eksperimentalnom dijelu rada.

Na čistu elektrodu nanesen je sloj berlinskog modrila te je elektroda sušena standardnom procedurom. Nakon sušenja sloja, provedeno je 10 ciklusa cikličke voltametrije u 0,1M KCl kako bi se aktivirao sloj berlinskog modrila, što je grafički prikazano na **Slici 42**. Elektroda oslojena berlinskim modrilom pokazuje gotovo identično ponašanje kao GC elektroda. Ono što se može zamijetiti je da ova elektroda, u odnosu na GC elektrodu, pokazuje znatno veće strujne oksidacijske i redukcijske vrhove u istom elektrolitu što se pripisuje njezinoj većoj specifičnoj površini.



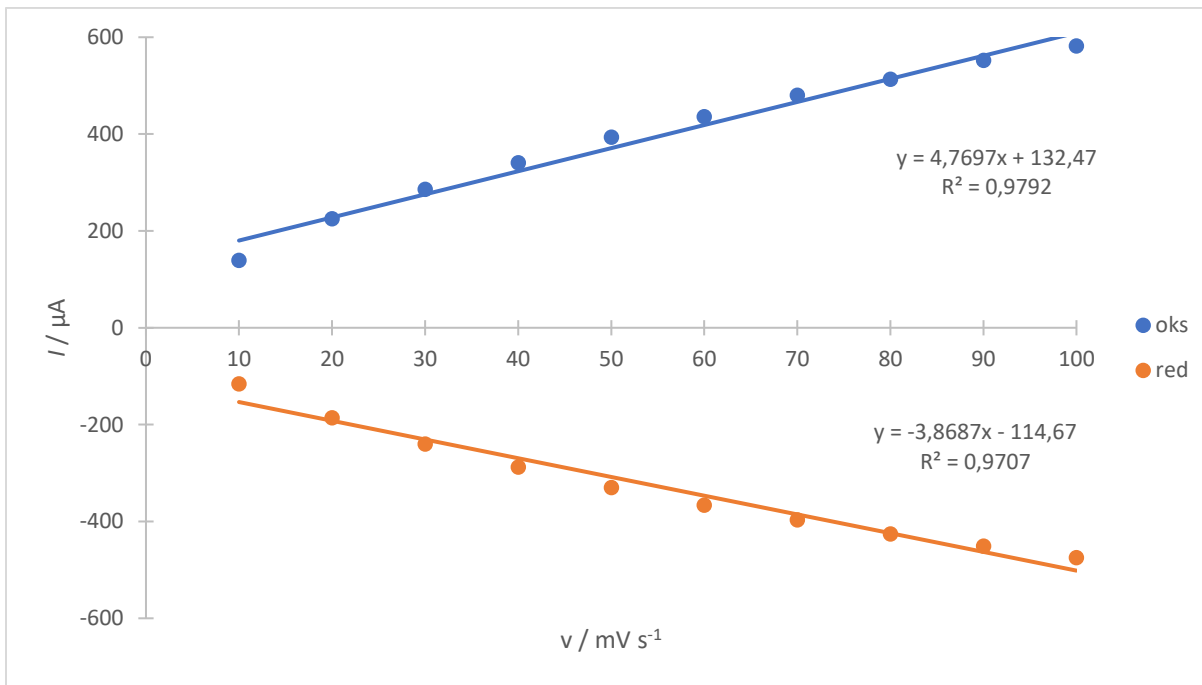
Slika 42. Odziv plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21 oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (0,1 M KCl), uz brzinu promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1V.

Nakon aktivacije sloja, ponovno je provedena metoda cikličke voltametrije no ovoga puta pri različitim brzinama promjene potencijala od 10 mV/s do 100 mV/s što je prikazano na **Slici 43**. Ovaj grafički prikaz potvrđuje već prethodno objašnjeno ponašanje kod GC elektrode odnosno da porastom brzine promjene potencijala rastu i vrijednosti anodnih i katodnih strujnih vrhova zbog bržeg oslobađanja odnosno prihvaćanja elektrona na površini elektrode. Porastom vrijednosti brzine promjene potencijala osim vidljivog porasta strujnog maksimuma vidljiv je i pomak vrha anodnog vala prema većim vrijednostima potencijala, odnosno pomak vrha katodnog vala prema nižim vrijednostima potencijala. Pomak vrha potencijala prema pozitivnijim odnosno negativnijim vrijednostima potencijala ukazuje na pH ovisan proces oksidacije/redukcije berlinskog modrila. Također, s obzirom na to da su pomaci vrhova simetrični i proporcionalni s povećanjem brzine promjene potencijala, možemo ponovno zaključiti da je promatrani proces reverzibilan.

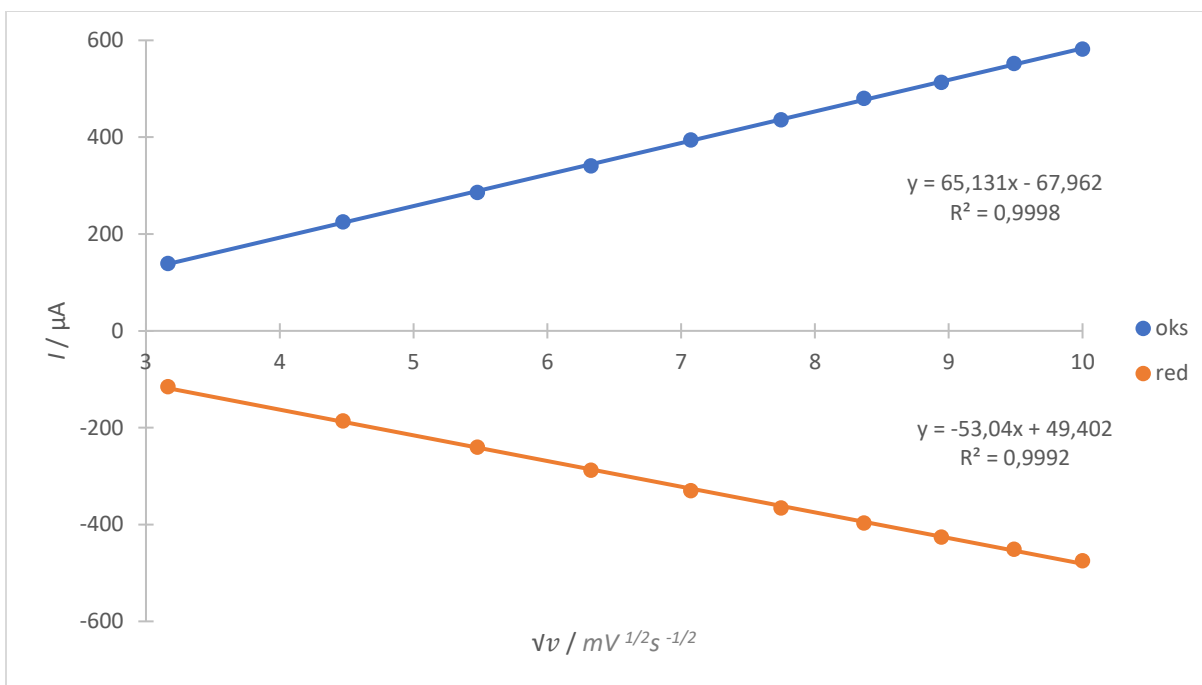


Slika 43. Odziv plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21 oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (0,1 M KCl), uz različite brzine promjene potencijala (engl. *scan rate*) od 10 mV/s do 100 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1V.

Na temelju prethodno prikazanog grafa, očitane su vrijednosti vršnih oksidacijskih i redukcijskih struja te su prikazane u ovisnosti o brzini promjene potencijala te o korijenu brzine promjene potencijala, što je prikazano na **Slici 44.** i **Slici 45.**

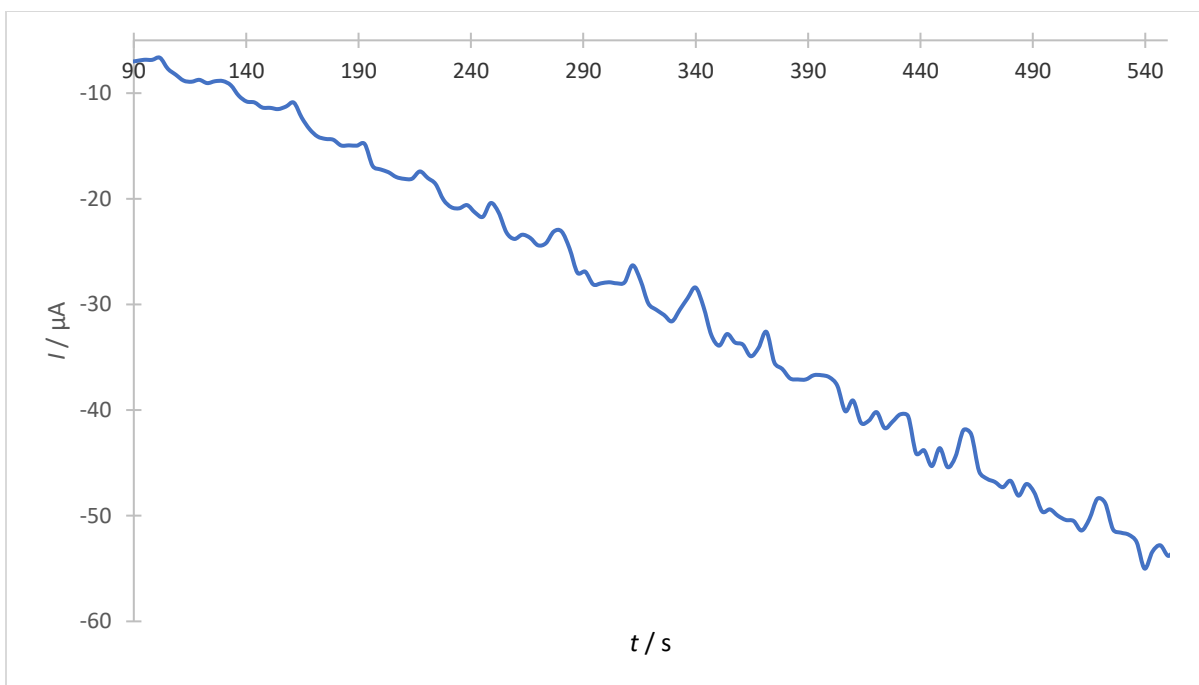


Slika 44. Ovisnost oksidacijskih i redukcijskih strujnih maksimuma o brzini promjene potencijala.



Slika 45. Ovisnost oksidacijskih i redukcijskih strujnih maksimuma o korijenu brzine promjene potencijala.

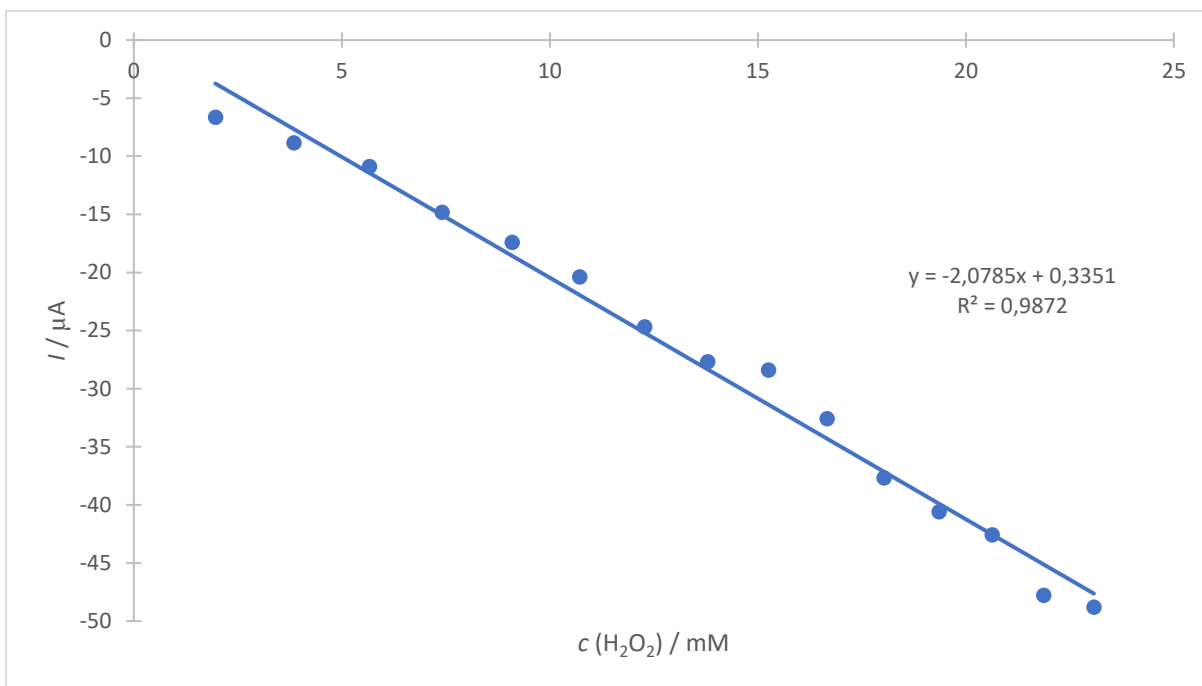
Na temelju prethodnih grafičkih prikaza vidljivo je da je linearnost izraženija u ovisnosti struje o korijenu brzine promjene potencijala na što ukazuje vrijednost R^2 koja je vrlo blizu 1. Gotovo isti odziv bio je vidljiv i kod GC elektrode. Prema tome, možemo smatrati da je $I_{p,k} / I_{p,a} \approx 1$ što potvrđuje da je navedeni proces reverzibilan. Naposljetku, kronoamperometrijski odziv elektrode ispitan je i uz dodatak 0,1 M H_2O_2 uz prisutno miješanje na laganoj brzini, a prikazan je na **Slici 46.**



Slika 46. Odziv plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21 oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 6,5), uz dodavanje 20 μL 0,1 M H_2O_2 svakih 20 sekundi, pri vrijednosti potencijala od -0,1 V.

Na temelju dobivenog prikaza, očitane su vršne vrijednosti struje i izračunata koncentracija vodikova peroksida u ćeliji te je iz dobivenih podataka napravljen grafički prikaz na **Slici 47**. Ono što je vidljivo je to da porastom koncentracije vodikova peroksida u ćeliji rastu i vrijednosti redukcijske struje, gotovo isto kao i kod GC elektrode. I u ovom slučaju točke slijede pravac čemu svjedoči R^2 vrijednost koja se približava 1. Usporedimo li dobivenu linearnost od 0,9872 pri pH = 6,5 s linearnošću dobivenom mjerenjima na GC elektrodi koja je pri pH = 6,1 iznosila 0,9913, a pri pH = 5,5 0,96, možemo zaključiti da u sva tri slučaja imamo visoku linearnost pri čemu je ona najizraženija kod GC elektrode pri pH = 6,1. Ako promatramo osjetljivost sustava ona je također najizraženija za GC elektrodu pri pH 6,1, gdje je nagib najveći (-3,881 $\mu\text{A}/\text{mM}$), što znači da se u ovom slučaju struja najviše mijenja s promjenom koncentracije H_2O_2 . Nadalje, može se primijetiti da je u slučaju plošne tiskane ugljikove elektrode linearan odziv u većem koncentracijskom rasponu vodikovog peroksida (2-24 mM) što predstavlja značajan napredak u odnosu na GC elektrodu čiji je linearni odziv u koncentracijskom rasponu vodikovog peroksida od 0,2 do 1,2 mM. Šire linearno područje u slučaju plošne tiskane ugljikove elektrode ukazuje na to da se može

detektirati veći raspon koncentracija vodikovog peroksida sa sličnom osjetljivošću (-2,0785 $\mu\text{A}/\text{mM}$).

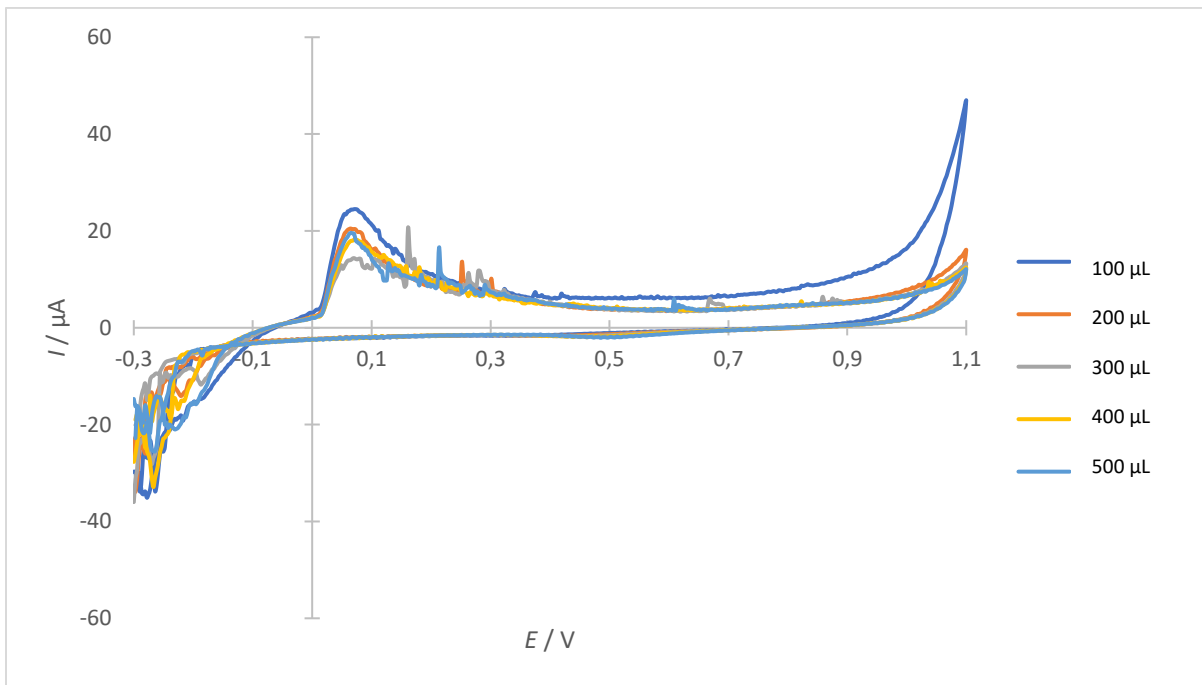


Slika 47. Ovisnost struje o koncentraciji vodikovog peroksida u elektrokemijskoj ćeliji u PBS, $\text{pH} = 6,5$.

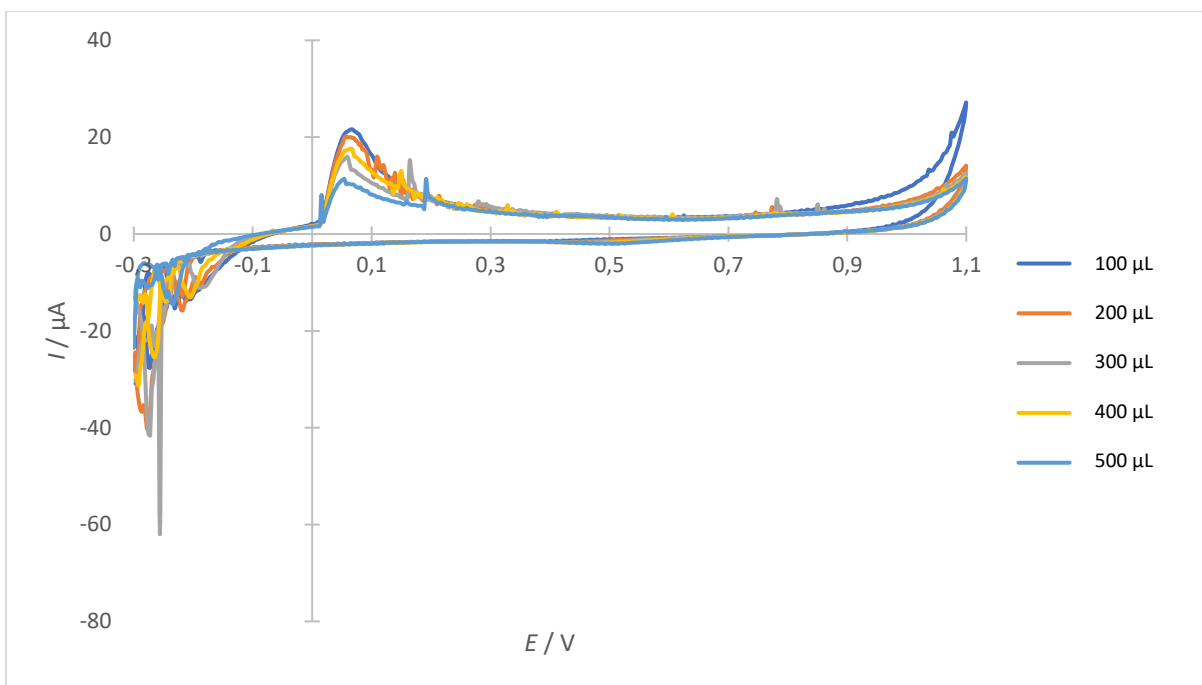
4.5 Karakterizacija plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21, Micrux Fluidic slojem berlinskog modrila, enzimom laktat oksidazom i kitozanom

Nakon karakterizacije elektrode oslojene berlinskim modrilom, na takav sloj nanoseni su sloj enzima i kitozana prema postupku opisanom u eksperimentalnom dijelu rada. Kao što je prethodno navedeno, za slučaj plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21, kitozan je modificiran uz dodatak $4,7 \mu\text{L}$ 1 M NaOH, za razliku od GC elektrode gdje je on na elektrodu nanošen sam za sebe. Pokazalo se da se kitozan sam po sebi ne zadržava na elektrodoj površini te mu je zbog njegove loše adhezije i kiselog karaktera, dodano $4,7 \mu\text{L}$ 1 M otopine NaOH kako bi se pripravio hidrogel koji je imao bolja mehanička svojstva i propusnost za laktat. Nakon potpunog oslojavanja, elektroda je uronjena u 10 mL PBS, $\text{pH} = 6,5$ pri čemu je njezin odziv ispitivan uz dodatak po $100 \mu\text{L}$ mliječne kiseline koja je dodana u ukupno 5 obroka. Za svaki dodani obrok mliječne kiseline

snimljena su po dva ciklusa cikličke voltametrije pri čemu su svi prvi ciklusi za 5 dodataka prikazani na **Slici 48**. dok su svi drugi ciklusi za 5 dodataka mliječne kiseline prikazani na **Slici 49**.

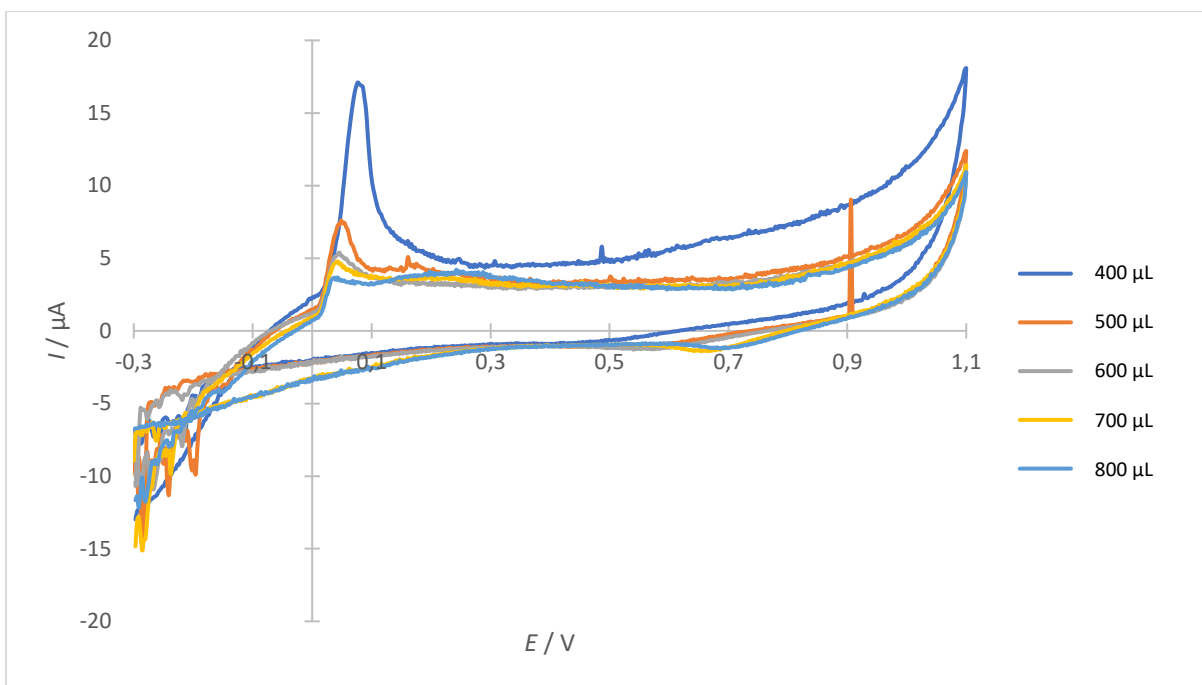


Slika 48. Odziv pet prvih ciklusa plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21 oslojene berlinskim modrilom, laktat oksidazom i kitozonom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 6,5) uz dodatak 100 μL mliječne kiseline u ukupno 5 obroka, pri brzini promjene potencijala od 50 mV/s i u rasponu potencijala od -0,3 V do 1,1 V.



Slika 49. Odziv svih drugih ciklusa plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21 oslojene berlinskim modrilom, laktat oksidazom i kitozonom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 6,5) uz dodatak 100 μL mliječne kiseline u ukupno 5 obroka, pri brzini promjene potencijala od 50 mV / s, u rasponu potencijala od -0,3 V do 1,1 V.

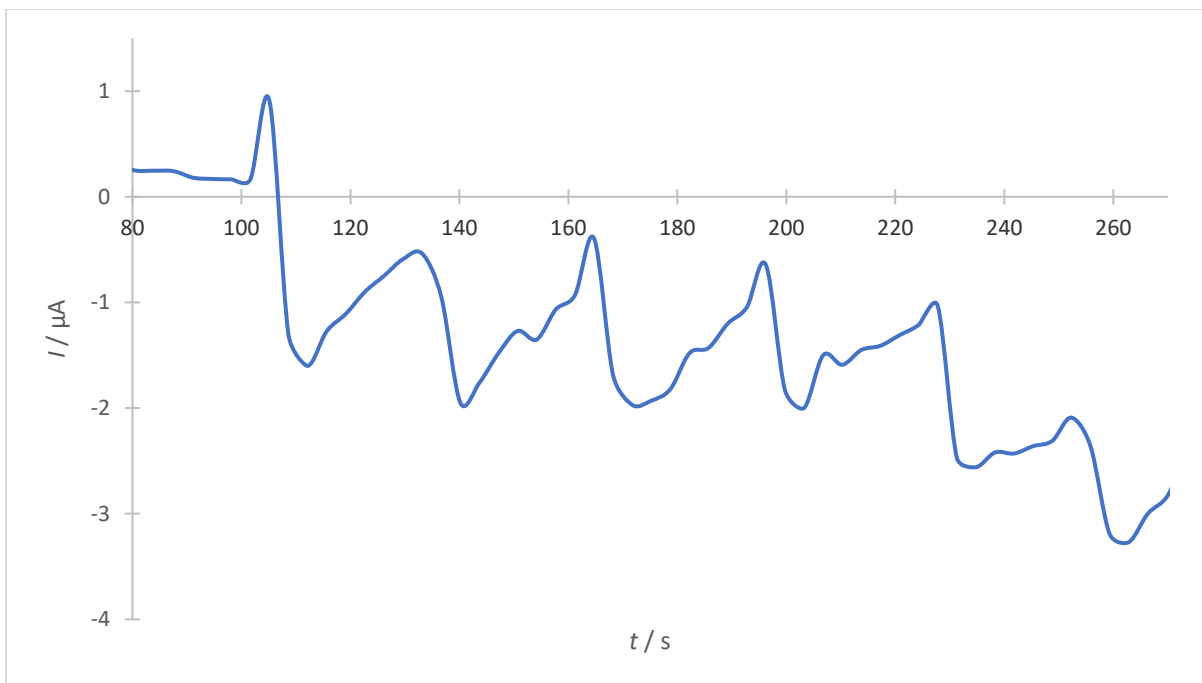
Elektroda je ponovno oslojena svim potrebnim slojevima te je ispitana uz dodatak veće količine mliječne kiseline u elektrokemijsku ćeliju, počevši s 400 μL te potom dodavanjem po 100 μL u četiri obroka. Odziv elektrode prikazan je na **Slici 50**.



Slika 50. Odziv plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21 oslojene berlinskim modrilom, laktat oksidazom i kitozanom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 6,5) uz dodatak 400 μL mliječne kiseline te potom 100 μL u ukupno 4 obroka, pri brzini promjene potencijala od 50 mV / s, u rasponu potencijala od -0,3 V do 1,1 V.

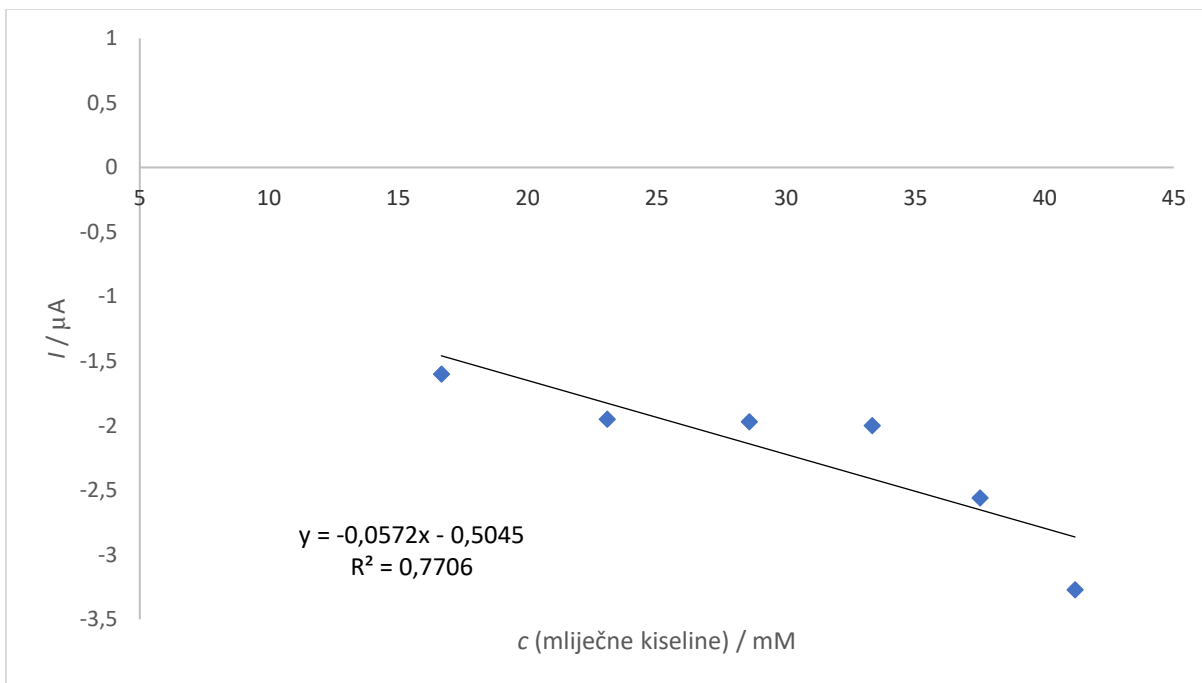
Iz prethodno priloženih grafičkih prikaza vidljivo je da se oksidacijska struja smanjuje s povećanjem volumena mliječne kiseline što je suprotno od očekivanja. Prema tome, ni u jednom slučaju nije dobiven smislen odziv elektrode u ovisnosti o promjeni koncentracije laktata. Ono što je uočljivo su promjene strujnih vrijednosti pri 0,06 V nakon dodavanja mliječne kiseline što upućuje na uspješnu detekciju laktata putem nastajanja H_2O_2 i njegove naknadnog elektrokemijskog odziva odnosno oksidacije.

Za potpuno oslojenu elektrodu snimljen je i kronoamperometrijski odziv uz dodatak 100 μL mliječne kiseline svakih 30 sekundi uz miješanje magnetskom mješalicom. Odziv elektrode prikazan je na **Slici 51**. Vrijednost potencijala pri kojoj je provođeno mjerenje je 0,06 V jer pri navedenoj vrijednosti očekujemo oksidaciju H_2O_2 nastalog kao produkt reakcije laktat oksidaze s mliječnom kiselinom.



Slika 51. Odziv plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21 oslojene berlinskim modrilom, laktat oksidazom i kitozanom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 6,5), uz dodavanje 100 μL 0,1 M mliječne kiseline (MK) svakih 30 sekundi. Pri vrijednosti potencijala od 0,06 V.

Uz prisutnost konstantnog miješanja, odmah nakon dodatka mliječne kiseline dolazi do nastajanja H_2O_2 što je vidljivo po izraženom skoku redukcijske struje. S vremenom, redukcijska struja se smanjuje zbog smanjene koncentracije H_2O_2 uslijed njegove redukcije. Na temelju prethodnog grafičkog prikaza, očitane su vrijednosti najviših katodnih strujnih vrhova te su izračunate koncentracije mliječne kiseline u elektrokemijskoj ćeliji za pojedini dodatak. Iz dobivenih podataka prikazana je ovisnost katodne struje o koncentraciji mliječne kiseline u elektrokemijskoj ćeliji, što je prikazano na **Slici 52**.



Slika 52. Ovisnost struje o koncentraciji mliječne kiseline (MK) u PBS, pH = 6,5.

Na temelju grafičkog ovisnosti vršne struje o koncentraciji mliječne kiseline vidljivo je da je dobiven odziv na mliječnu kiselinu u koncentracijskom rasponu od 17 mM do 41 mM no dobiveni odziv pokazuje vrlo lošu linearnost ($R^2 = 0,7706$) koja značajno odstupa od 1. Također, ako promatramo nagib pravca koji nam govori o osjetljivosti ($-0,0572 \mu\text{A}/\text{mM}$) jasno je da se vrijednost struje ne mijenja značajno s promjenom koncentracije mliječne kiseline odnosno ovakav sustav pokazuje lošu osjetljivost.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih eksperimenata u kojima je metodama cikličke voltametrije i kronoamperometrije ispitivan odziv GC (engl. Glassy Carbon) i plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21, Micrux Fluidic oslojenih slojevima berlinskog modrila, laktat oksidazom te kitozonom, može se zaključiti slijedeće:

Obje neoslojene elektrode pokazale su se pogodnima za provođenje metode cikličke voltametrije u korištenim osnovnim elektrolitima te su kao takve davale prihvatljive strujne odzive koji su se kretali u području nule u rasponu potencijala od -0,3 V do 1,1 V koji je odabran s obzirom na oksidaciju odnosno redukciju vode.

Obje elektrode oslojavane su na identičan način slojem berlinskog modrila te je odziv ovog sloja pokazao isto ponašanje na obje elektrode. Jasnije rečeno berlinsko modrilo dalo je očekivane strujne odzive na obje elektrode, a veće vrijednosti strujnih vrhova dobivene u slučaju plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21 pripisuju se njezinoj većoj specifičnoj površini. Također, sloj berlinskog modrila pokazao se uspješnim za redukciju vodikovog peroksida te je kronoamperometrijskim odzivom utvrđeno da povećanjem njegove koncentracije u elektrokemijskoj ćeliji vrijednost redukcijske struje linearno pada. Naposljetku, reakcija vodikovog peroksida pokazala se kao ireverzibilna.

Oslojavanje GC elektrode slojem laktat oksidaze i kitozana, bez modifikacije kitozana 1 M NaOH, pokazalo se bezuspješnim jer je već prilikom uranjanja oslojene elektrode u ispitivanu otopinu dio nanesenog sloja skliznuo s površine zbog njegove vrlo loše adhezije. Oslojavanje plošne tiskane ugljikove elektrode, ED-S1PE-C21, Micrux Fluidic slojem laktat oksidaze i kitozana uz navedenu modifikaciju rezultiralo je uspješnom detekcijom mliječne kiseline. Možemo zaključiti da je dodatak 1 M NaOH ključan za zadržavanje kitozana na elektroodnoj površini zbog njegovog kiselog karaktera jer se na taj način formira hidrogel koji pospješuje njegovu adheziju i poboljšava mehanička svojstva.

U potpunosti oslojena plošna tiskana ugljikova elektroda, ED-S1PE-C21, Micrux Fluidic, ni u jednom slučaju tijekom snimanja cikličke voltametrije nije dala smislen odziv u ovisnosti o promjeni koncentracije laktata. Provedbom kronoamperometrije pokazala je uspješan odziv na laktat u koncentracijskom rasponu od 17 mM do 41 mM. Usprkos navedenome, ovakav odziv

pokazuje vrlo lošu linearnost ($R^2 = 0,7706$) koja značajno odstupa od 1 i nisku osjetljivost koja iznosi ($-0,0572 \mu\text{A}/\text{mM}$), što znači da se vrijednost struje ne mijenja značajno s promjenom koncentracije mliječne kiseline.

6. POPIS SIMBOLA I KRATICA

GCE – engl. *Glassy Carbon Electrode*, disk elektroda od staklastog ugljika

LOx – enzim laktat oksidaza

TTF – tetratiafulvalen

MWCNT, engl. *Multi-walled carbon nanotubes*, višeslojne ugljikove nanocjevčice

SWCN, engl. *Single-walled carbon nanotubes*, jednoslojne ugljikove nanocjevčice

A – površina / cm^2

Pt – platinska žica korištena kao protuelektroda

PET – Polietilentereftalat

\varnothing - promjer elektrode

PBS – engl. *Phosphate-buffered saline*, puferska otopina pH $\approx 7,4$

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

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

pH – negativan logaritam koncentracije vodikovih iona

MK – mliječna kiselina

7. LITERATURA

- [1] Piljac, I., *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Media Print, 2010.
- [2] A.Hulanicki, S.Glab, F.Ingman, *Chemical sensors definitions and classification*, *Pure & Appl. Chem*, 1991., 1247-1250.
- [3] A. Karyakin, *Advances of Prussian blue and its analogues in (bio)sensors*, *Current Opinion in Electrochemistry*, 2017., 5(1), 92-98.
- [4] A. Virginia Bounegru, I. Bounegru, *Chitosan-Based Electrochemical Sensors for Pharmaceuticals and Clinical Applications*, *Polymers*, 2023., 15(17), 3539.
- [5] X. Li, Y. Yang, B. Zhang, X. Lin, X. Fu, Y. An, Y. Zou, J. Wang, Z. Wang, T. Yu, *Lactate metabolism in human health and disease*, *Signal Transduct Target Ther.* 2022., 7, 305
- [6] Hoovels, K. van, Xuan, X., Cuartero, M., Gijssels, M., Swaren, M., Crespo, G. A.; *Can wearable sweat lactate sensors contribute to sport physiology?*, *ACS Senosrs*, 2021., 6 (10), 3496 – 3508.
- [7] J. D. Rabinowitz, S.Enerbäck,; *Lactate: the ugly duckling of energy metabolism*, *Nat Metab*, 2020, 2(7), 566–571.
- [8] X. Xuan, C.Pérez-Ràfols, C. Chen, M. Cuartero, G. A. Crespo,; *Lactate Biosensing for Reliable On-Body Sweat Analysis*, 2021., 6(7), 2472-2782.
- [9] A.L. Hart, A.P.F. Turner,; *On the use of screen- and ink-jet printing to produce amperometric enzyme electrodes for lactate*, *Biosensors & Bioelectronics*, 1996., 11(3), 263-270.
- [10] Wang, R., Zhai, Q., An, T., Gong, S., Cheng, W.: *Stretchable gold fiber-based wearable textile electrochemical biosensor for lactate monitoring in sweat*. *Talanta* 2021., 222, 121484.
- [11] Jia, W., Bandodkar, A. J., Valdés-Ramírez, G., Windmiller, J. R., Yang, Z., Ramírez, J., Chan, G., Wang, J. *Electrochemical tattoo biosensors for real-time noninvasive lactate monitoring in human perspiration*. *Anal. Chem.* 2013, 85 (14), 6553– 6560.

- [12] Gao, W.; Emaminejad, S.; Nyein, H. Y. Y.; Challa, S.; Chen, K.; Peck, A.; Fahad, H. M.; Ota, H.; Shiraki, H.; Kiriya, D. *Fully integrated wearable sensor arrays for multiplexed in situ perspiration analysis. Nature*, 2016, 529 (7587), 509– 514.
- [13] S. Ying, C. Chen, J. Wang, C.Lu, T. Liu, Y. Kong, F. Yi, *Synthesis and Applications of Prussian Blue and Its Analogues as Electrochemical Sensors, Chempluschem*, 2021., 86(12), 1608-1622.
- [14] Y. Matos-Peralta, M. Antuch; *Review—Prussian Blue and Its Analogs as Appealing Materials for Electrochemical Sensing and Biosensing, Journal of The Electrochemical Society*, 2020., 167(3).
- [15] De Alvarenga E.S., Pereira de Oliveira C., Roberto Bellato, C.; *An Approach to Understanding the Deacetylation Degree of Chitosan. Carbohydr. Polym.* 2010., 80, 1155–1160.
- [16]https://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/88264/10/10_chapter%201.pdf, (pristupljeno; 20. kolovoz 2023.)
- [17] I. Piljac, *Elektroanalitičke metode*, RMC Zagreb, 1995.
- [18] M.Marie, S. Mandal, O. Manasreh, *An Electrochemical Glucose Sensor Based on Zinc Oxide Nanorods, Sensors*, 2015, 15, 18714-18723.

8.DODACI

8.1 Popis slika

Slika 1. Shematski prikaz kemijskog senzora s njegovim funkcionalnim jedinicama [1].....	3
Slika 5. Kemijska struktura kitozana [4].	9
Slika 2. Raspored komponenti senzora. Adaptirano iz reference [9].	11
Slika 3. Izvedba senzora za laktat temeljenog na zlatnim vlaknima. Adaptirano iz reference [10].	12
Slika 4. Elektrokemijski biosenzor za neinvazivno praćenje laktata u stvarnom vremenu. Adaptirano iz reference [11].	13
Slika 6. Signal odziva u cikličkoj voltametriji za reverzibilni proces. Adaptirano iz reference [1].	15
Slika 7. Ciklički voltamogram za ireverzibilan proces.....	19
Slika 8. Ciklički voltamogram pri različitim vrijednostima standardnih konstanti izmijene naboja (k^0)... 20	
Slika 9. Prikaz primjera amperometrijskog odziva na različite koncentracije glukoze. Preuzeto i adaptirano iz reference [18].	21
Slika 10. a) Korišteni troelektrodni sustav s GC radnom elektrodom	23
Slika 11. Plošna tiskana ugljikova elektroda ED-S1PE-C2, Micrux Fluidic.....	24
Slika 12. Shematski prikaz aparature korištene za karakterizaciju elektrode metodama cikličke voltametrije i kronoamperometrije.....	24
Slika 13. Potencijostat: Potentiostat Model 263A, Princeton Applied Research.	25
Slika 14. pH METER MA5740, Iskra, Slovenija.	25
Slika 15. Analitička vaga: Sartorius Lab Instruments, Njemačka.	25
Slika 16. Sušionik: Instrumentaria ST-01/02, Zagreb.	26
Slika 17. Odziv neoslojene GC elektrode u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 7,2). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. scan rate) od 50 mV/s unutar potencijala od -1 V do 1 V.....	30
Slika 18. Odziv neoslojene GC elektrode u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 7,2). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. scan rate) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.....	31
Slika 19. Odziv neoslojene GC elektrode u osnovnom elektrolitu (0,1 M NaCl). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. scan rate) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,5 V do 1 V.....	32
Slika 20. Odziv neoslojene GC elektrode uz dva dodatka po 50 μ L 0,1 M $K_3[Fe(CN)_6]$ u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 7,2). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. scan rate) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,5 V do 1 V.....	33
Slika 21. Odziv neoslojene GC elektrode uz dva dodatka po 50 μ L 0,1 M $K_3[Fe(CN)_6]$ u osnovnom elektrolitu (0,1 M NaCl). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. scan rate) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,5 V do 1 V.....	34
Slika 22. Usporedba odziva neoslojene GC elektrode uz dodatak od 100 μ L 0,1 M $K_3[Fe(CN)_6]$ u oba elektrolita: PBS, pH = 7,2 i 0,1 M NaCl. Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt	

žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. scan rate) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,5 V do 1 V.....	35
Slika 23. Odziv neoslojene GC elektrode osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 7,2) uz dodatak 2 obroka po 50 μ L 0,1 M mliječne kiseline (MK). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. scan rate) od 50 mV/s unutar potencijala od -1 V do 1 V.....	36
Slika 24. Odziv čiste (nemodificirane, neoslojene) GC elektrode uz dodatak po 10 μ L 0,1 M H ₂ O ₂ u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 7,2). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. scan rate) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.....	37
Slika 25. Odziv čiste (nemodificirane, neoslojene) GC elektrode uz dodatak po 10 μ L 0,1 M H ₂ O ₂ u osnovnom elektrolitu (0,1 M NaCl). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. scan rate) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.....	38
Slika 26. Odziv čiste (nemodificirane, neoslojene) GC elektrode uz dodatak 50 μ L 0,1 M H ₂ O ₂ u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 7,2). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzine promjene potencijala (engl. scan rate) od 20 mV/s do 100 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.....	39
Slika 27. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (0,1 M KCl) Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. scan rate) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.....	40
Slika 28. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (0,1 M KCl). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. scan rate) od 10 mV/s do 100 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.....	41
Slika 29. Ovisnost oksidacijskih i redukcijjskih strujnih maksimuma o brzini promjene potencijala.	42
Slika 30. Ovisnost oksidacijskih i redukcijjskih strujnih maksimuma o korijenu brzine promjene potencijala.....	42
Slika 31. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 6,1). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode uz brzinu promjene potencijala (engl. scan rate) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.....	43
Slika 32. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 6,1) uz dodatak 100 μ L Fe ²⁺ /Fe ³⁺ heksacijanoferata. Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzinu promjene potencijala (engl. scan rate) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.....	44
Slika 33. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 6,1) uz dodavanje 20 μ L 0,1M H ₂ O ₂ svakih 20 sekundi. Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, pri vrijednosti potencijala od -0,1 V.....	45
Slika 34. Ovisnost struje o koncentraciji vodikovog peroksida u elektrokemijskoj ćeliji u PBS, pH = 6,1.	46
Slika 35. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 5,5) uz dodatak 20 μ L H ₂ O ₂ svakih 30 sekundi. Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt	

žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, pri vrijednosti potencijala od -0,1 V.....	47
Slika 36. Ovisnost struje o koncentraciji vodikovog peroksida u elektrokemijskoj ćeliji u PBS, pH = 5,5.	48
Slika 37. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 5,0) uz dodatak 20 μ L H ₂ O ₂ svakih 30 sekundi. Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, pri vrijednosti potencijala od -0,1 V.....	48
Slika 38. Ovisnost struje o koncentraciji vodikovog peroksida u elektrokemijskoj ćeliji u PBS, pH = 5..	49
Slika 39. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 3 - 6,5). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode uz brzinu promjene potencijala (engl. scan rate) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.	50
Slika 40. Odziv GC elektrode oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH=6,1). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode, uz brzine promjene potencijala (engl. scan rate) od 10 mV/s do 100 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.	51
Slika 41. Odziv GC elektrode oslojene s PB, laktat oksidazom i kitozanom u osnovnom elektrolitu (0,1 M KCl). Snimano u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji uz uporabu Pt žice kao pomoćne elektrode i zasićene Ag/AgCl referentne elektrode uz brzinu promjene potencijala (engl. scan rate) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1 V.....	52
Slika 42. Odziv plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21 oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (0,1 M KCl), uz brzinu promjene potencijala (engl. scan rate) od 50 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1V.	53
Slika 43. Odziv plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21 oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (0,1 M KCl), uz različite brzine promjene potencijala (engl. scan rate) od 10 mV/s do 100 mV/s unutar potencijala od -0,3 V do 1,1V.	54
Slika 44. Ovisnost oksidacijskih i redukcijских strujnih maksimuma o brzini promjene potencijala.	55
Slika 45. Ovisnost oksidacijskih i redukcijских strujnih maksimuma o korijenu brzine promjene potencijala.	56
Slika 46. Odziv plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21 oslojene berlinskim modrilom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 6,5), uz dodavanje 20 μ L 0,1 M H ₂ O ₂ svakih 20 sekundi, pri vrijednosti potencijala od -0,1 V.....	57
Slika 47. Ovisnost struje o koncentraciji vodikovog peroksida u elektrokemijskoj ćeliji u PBS, pH = 6,5.	58
Slika 48. Odziv pet prvih ciklusa plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21 oslojene berlinskim modrilom, laktat oksidazom i kitozanom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 6,5) uz dodatak 100 μ L mliječne kiseline u ukupno 5 obroka, pri brzini promjene potencijala od 50 mV/s i u rasponu potencijala od -0,3 V do 1,1 V.	59
Slika 49. Odziv svih drugih ciklusa plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21 oslojene berlinskim modrilom, laktat oksidazom i kitozanom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 6,5) uz dodatak 100 μ L mliječne kiseline u ukupno 5 obroka, pri brzini promjene potencijala od 50 mV / s, u rasponu potencijala od -0,3 V do 1,1 V.	60
Slika 50. Odziv plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21 oslojene berlinskim modrilom, laktat oksidazom i kitozanom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 6,5) uz dodatak 400 μ L mliječne kiseline te	

potom 100 μL u ukupno 4 obroka, pri brzini promjene potencijala od 50 mV / s, u rasponu potencijala od -0,3 V do 1,1 V. 61

Slika 51. Odziv plošne tiskane ugljikove elektrode ED-S1PE-C21 oslojene berlinskim modrilom, laktat oksidazom i kitozanom u osnovnom elektrolitu (PBS, pH = 6,5), uz dodavanje 100 μL 0,1 M mliječne kiseline (MK) svakih 30 sekundi. Pri vrijednosti potencijala od 0,06 V. 62

Slika 52. Ovisnost struje o koncentraciji mliječne kiseline (MK) u PBS, pH = 6,5..... 63

8.2 Popis tablica

Tablica 1. Kemikalije korištene za izradu radnih otopina i oslojavanje radne elektrode..... 22

Tablica 2. Prikaz slojeva berlinskog modrila i njihove izvedbe 27