



Univerzitet u Novom Sadu
Prirodno-matematički fakultet
Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu
životne sredine



Jasmina Anojčić

Voltametrijske metode zasnovane na primeni jednostavnih i savremenih elektroda/senzora na bazi ugljeničnih materijala za određivanje vodonik-peroksida u odabranim uzorcima

- doktorska disertacija -

Novi Sad, 2018.

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je rađena u Laboratoriji za instrumentalnu analizu Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.

Posebnu i neizmernu zahvalnost želim da iskažem svom mentoru, prof. dr Valeriji Gužvanj (dr Valéria Guzsvány), redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, što me je prihvatila za studenta doktorskih studija i omogućila da doktorsku disertaciju izradim pod njenim rukovodstvom, zatim na predloženoj temi doktorske disertacije, brojnim idejama, sugestijama, korisnim savetima, kao i zbog izuzetne ukazane pomoći tokom eksperimentalnog rada i pisanja disertacije. Iskreno joj se zahvaljujem na uloženom trudu, zalaganju i prenesenom znanju iz analitičke hemije, a pre svega instrumentalne analize i senzorike.

Prof. dr Biljani Abramović, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, se zahvaljujem na iskazanom interesovanju, kao i na svim savetima i sugestijama vezanim za ovu doktorsku disertaciju.

Prof. dr Boži Dalmaciji i prof. dr Jasmini Agbabi, redovnim profesorima Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, se zahvaljujem na uzorcima podzemne vode tretirane Fentonovim i Fentonu-sličnim reagensima i što su ove uzorke ustupili prof. dr Valeriji Gužvanj za dalju analizu u okvirima ARSENICPLATFORM IPA projekta. Prof. dr Jasmini Agbabi se takođe zahvaljujem na savetima, sugestijama i interesovanju za ovaj rad.

Želela bih da se zahvalim redovnom prof. Dr Zoltanu Konji (Dr Zoltán Kónya) sa Univerziteta u Segedinu, Mađarska, na višezidnim ugljeničnim nanocevima i višezidnim ugljeničnim nanocevima modifikovanim nanočesticama platine, paladijuma i mangan(IV)-oksida sintetisanim i okarakterisanim u njegovoj laboratoriji na osnovu molbe prof. dr Valerije Gužvanj u okvirima MATCROSS IPA projekta i što je sintetisane materijale ustupio prof. dr Valeriji Gužvanj za dalju primenu, kao i na svim savetima, sugestijama i pokazanom interesovanju za ovu doktorsku disertaciju.

Takođe, zahvaljujem se vanrednom prof. dr Kurtu Kalheru (dr Kurt Kalcher) sa Univerziteta u Gracu, Austrija, i dr Valeriji Gužvanj na nemodifikovanim i modifikovanim štampanim ugljeničnim elektrodama pripremljenim u okvirima njihove saradnje putem CEEPUSIII network projekta. Prof. dr Kurtu Kalheru se zahvaljum što je prof. dr Valeriji Gužvanj ustupio enzim glukoza oksidazu, kao i na prenesenom znanju iz oblasti senzora i biosenzora, na savetima, sugestijama i pokazanom interesovanju za ovu doktorsku disertaciju.

Veliku zahvalnost zelim da iskažem prof. dr Valeriji Gužvanj i dr Olgi Vajdle na pomoći prilikom izvođenja eksperimenata vezanim za pripremu i analizu uzorka mleka. Takođe, prof. dr Valeriji Gužvanj, dr Olgi Vajdle i studentu hemije Emilu Raduloviću se zahvaljum na ukazanoj pomoći u

toku eksperimenata pripreme i optimizacije glukoznog biosenzora, kao i merenja glukoze u uzorku meda.

Zahvaljujem se stručnom saradniku za elektronsku mikroskopiju Milošu Bokorovu sa Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i MSc Danijelu Madarasu (MSc Dániel Madarász) sa Univerziteta u Segedinu, Mađarska, za izvođenje SEM/EDS merenja.

Kolegama dr Olgi Vajdle, MSc Sandri Petrović i MSc Ani Tasić hvala na iskazanoj kolegijalnosti.

Zahvalnost dugujem projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije OI 172012 i 172059, IPA projektima-ARSENICPLATFORM (HUSRB/1002/121/075) i MATCROSS (HUSRB 1002/214/188), jednogodišnjem projektu Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj (AP Vojvodina) pod brojem 114-451-4418/2013, kao i CEEPUS III (CZ-0212-09-1516) projektu koji su omogućili realizaciju ove doktorske disertacije.

Na kraju, zahvaljum se svojim najdražima, članovima svoje porodice, što su me podržavali tokom svih ovih godina i što predstavljaju moj najjači oslonac u životu.

Autor

LISTA SKRAĆENICA

A – apsorbancija

ACT – acetamiprid

Ag/AgCl – srebro/srebro-hloridna referentna elektroda

AOPs – napredni oksidacioni procesi (advanced oxidation processes)

b – dužina optičkog puta

CV – ciklična voltametrij

c – koncentracija ciljnog analita

CPE – elektroda od ugljenične paste (carbon paste electrode)

D – difuzioni koeficijent

DAD – detektor na bazi niza diode (diode array detector)

DPV – diferencijalno pulsna voltametrij

DPP – diferencijalno pulsna polarografija

DOC – rastvoreni organski ugljenik (dissolved organic carbon)

DWCNT – dvozidne ugljenične nanocevi (doublewalled carbon nanotubes)

ϵ – molarni apsorpcioni koeficijent

E – potencijal

E^0 – standardni redoks potencijal

E_{λ} – unapred definisana vrednost potencijala

$E_{p,k}$ – potencijal katodnog pika

$E_{p,a}$ – potencijal anodnog pika

ΔE_p – razlika potencijala pikova

ΔE – pulsevi konstantne amplitude

EDS – energetsko-disperzioni spektrometrijski detektor

FIA – protočna injekciona analiza (flow injection analysis)

GCE – elektroda od staklastog ugljenika (glassy carbon electrode)

GD – granica detekcije

GO – granica određivanja

GOx – glukoza oksidaza

GOx/SPCE – štampana ugljenična elektroda površinski modifikovana enzimom glukoza oksidazom

GOx/Pd-MWCNT-SPCE – štampana ugljenična elektroda zapreminski modifikovana kompozitom na bazi paladijuma i višezidnih ugljeničnih nanocevi i površinski modifikovana enzimom glukoza oksidazom

GOx/Pd-MWCNT/SPCE – štampana ugljenična elektroda površinski modifikovana kompozitom na bazi paladijuma i višezidnih ugljeničnih nanocevi i enzimom glukoza oksidazom

GOx/Pt-MWCNT-SPCE – štampana ugljenična elektroda zapreminski modifikovana kompozitom na bazi platine i višezidnih ugljeničnih nanocevi i površinski modifikovana enzimom glukoza oksidazom

HPLC – tečna hromatografija visoke efikasnosti

I – intenzitet struje (strujnog signala)

$i_{p,k}$ – struja katodnog pika

$i_{p,a}$ – struja anodnog pika

i_p – struja pika

KŽE – kapljuća živina elektroda

λ – talasna dužina

LC – tečna hromatografija

MnO₂-CPE – elektroda od ugljenične paste zapreminski modifikovana mangan(IV)-oksidom

MnO₂-MWCNT – kompozit na bazi mangan(IV)-oksida i višezidnih ugljeničnih nanocevi

MnO₂-MWCNT/CPE – elektroda od ugljenične paste površinski modifikovana kompozitom na bazi mangan(IV)-oksida i višezidnih ugljeničnih nanocevi

MnO₂-SPCE – štampana ugljenična elektroda zapreminski modifikovana mangan(IV)-oksidom

MWCNT – višezidne ugljenične nanocevi (multiwalled carbon nanotubes)

MWCNT/CPE – elektroda od ugljenične paste površinski modifikovana sa višezidnim ugljeničnim nanocevima

MWCNT-SPCE – štampana ugljenična elektroda zapreminski modifikovana sa višezidnim ugljeničnim nanocevima

n – broj elektrona uključenih u polu-reakciji

P – intenzitet propuštenog zračenja

P₀ – intenzitet upadnog zračenja

Pd-MWCNT – kompozit na bazi paladijuma i višezidnih ugljeničnih nanocevi

Pd-MWCNT-SPCE – štampana ugljenična elektroda zapreminski modifikovana kompozitom na bazi paladijuma i višezidnih ugljeničnih nanocevi

Pd-MWCNT/SPCE – štampana ugljenična elektroda površinski modifikovana kompozitom na bazi paladijuma i višezidnih ugljeničnih nanocevi

POM – prirodne organske materije

Pt-C – platina na grafitizovanom ugljeniku Vulkan XC72

Pt-C/CPE – elektroda od ugljenične paste površinski modifikovana kompozitom na bazi nanočestica platine i grafitizovanog ugljenika Vulkan XC72

Pt-MWCNT – kompozit na bazi platine i višezidnih ugljeničnih nanocevi

Pt-MWCNT/CPE – elektroda od ugljenične paste površinski modifikovana kompozitom na bazi platine i višezidnih ugljeničnih nanocevi

Pt-MWCNT-SPCE – štampana ugljenična elektroda zapreminski modifikovana kompozitom na bazi platine i višezidnih ugljeničnih nanocevi

r – koeficijent korelacije

ROS – reaktivne kiseonične vrste (reactive oxygen species)

RSD – relativna standardna devijacija

S – površina elektrode

sd – standardna devijacija

SEM – skenirajući elektronski mikroskop

SPCE – štampana ugljenična elektroda (screen printed carbon electrode)

SWCNT – jednozidne ugljenične nanocevi (singlewalled carbon nanotubes)

t – vreme

T – transparentcija

TOC – ukupni organski ugljenik (total organic carbon)

UV/Vis – ultraljubičasta/vidljiva oblast zračenja

v – brzina skeniranja

ZKE – zasićena kalomelova elektroda

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO.....	3
2.1. Vodonik-peroksid.....	3
2.1.1. Osnovne fizičke i hemijske osobine	3
2.1.2. H ₂ O ₂ u biološkim sistemima	6
2.1.3. Primena H ₂ O ₂	7
2.1.4. Fentonov proces.....	8
2.1.5. Određivanje.....	10
2.2. Voltometrija.....	11
2.2.1. Osnovni pojmovi	11
2.2.2. Ciklična voltometrija	13
2.2.3. Diferencijalno pulsna voltometrija	14
2.2.4. Amperometrija/hidrodinamička hronoamperometrija	15
2.2.5. Voltometrijski senzori/radne elektrode u voltometriji	16
2.3. Heterogene ugljenične elektrode.....	18
2.3.1. Elektrode od ugljenične paste	18
2.3.1.1. Istorijat.....	18
2.3.1.2. Definicija, klasifikacija i tipovi	19
2.3.1.3. Sastavne komponente	20
2.3.1.4. Priprema	22
2.3.1.5. Opšte karakteristike	23
2.3.2. Štampane ugljenične elektrode	25
2.3.2.1. Postupak štampanja elektroda	25
2.3.2.2. Ugljenična mastila	27
2.3.2.3. Dizajn	27
2.3.2.4. Osnovne karakteristike, prednosti i nedostaci	28
2.3.3. Modifikacija heterogenih ugljeničnih elektroda.....	29
2.3.4. Primena heterogenih ugljeničnih elektroda	31

2.4. Biosenzori.....	31
2.4.1. Opšti pojmovi.....	32
2.4.2. Glukozni biosenzori	33
2.5. Ugljenične nanocevi.....	35
2.5.1. Istorijat ugljeničnih nanocevi.....	35
2.5.2. Struktura i tipovi	35
2.5.3. Osnovne osobine.....	38
2.5.4. Primena	39
2.5.5. Modifikacija metalima i oksidima metala.....	40
2.6. Elektroanalitičke metode određivanja H₂O₂ i glukoze.....	41
2.7. Paralelne i uporedne merne tehnike u eksperimentalnom radu.....	47
2.7.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija	47
2.7.2. Tečna hromatografija visoke efikasnosti	49
2.7.3. Spektrofotometrija	51
2.8. Predmet i cilj istraživanja.....	54
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	55
3.1. Hemikalije i rastvori	55
3.2. Instrumenti	57
3.3. Postupci	61
3.3.1. Priprema radnih elektroda.....	61
3.3.2. Priprema uzoraka	64
3.3.3. SEM-EDS merenja.....	67
3.3.4. Voltametrijska merenja.....	67
3.3.4.1. Diferencijalno pulsna voltametrijska merenja u model sistemima.....	67
3.3.4.2. Ciklična voltametrijska merenja u model sistemima.....	68
3.3.4.3. Amperometrijska merenja u model sistemima i analiza uzoraka	68
3.3.5. HPLC-DAD merenja	72
3.3.6. Spektrofotometrijska merenja.....	72
3.3.7. Komparativna merenja glukoze primenom komercijalno dostupnog aparata	75
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	76

4.1. Amperometrijsko određivanje H₂O₂ primenom MnO₂ modifikovane elektrode od ugljenične paste u uzorcima podzemne vode tretiranim Fentonovim i Fentonu-sličnim reagensima	76
4.1.1. Poređenje elektroda od ugljenične paste – nemodifikovane i zapreminski modifikovanih sa različitim količinama MnO ₂	76
4.1.2. Eksperimentalni model sistemi za tretman uzoraka vode.....	82
4.1.3. Analiza realnih uzoraka – tretiranih podzemnih voda.....	84
4.2. Amperometrijsko određivanje H₂O₂ primenom MnO₂ modifikovane štampane ugljenične elektrode u toku Fentonovog i foto-Fentonovog procesa uklanjanja acetamiprida iz vodene sredine	88
4.2.1. Karakterizacija MnO ₂ modifikovane štampane ugljenične elektrode	90
4.2.2. Optimizacija analitičkog postupka	92
4.2.3. Određivanje i praćenje sadržaja H ₂ O ₂ u toku Fentonovog i vidljivom svetlošću potpomognutog foto-Fentonovog procesa uklanjanja acetamiprida	97
4.3. Amperometrijsko određivanje H₂O₂ primenom elektrode od ugljenične paste površinski modifikovane kompozitom na bazi Pt nanočestica i grafitizovanog ugljenika..	104
4.3.1. Poređenje elektroda od ugljenične paste – nemodifikovane i površinski modifikovane kompozitom Pt-grafitizovani ugljenik.....	106
4.3.2. Optimizacija amperometrijske i spektrofotometrijske metode.....	108
4.3.3. Analiza proizvoda za ličnu negu.....	115
4.4. Amperometrijsko određivanje H₂O₂ primenom elektrode od ugljenične paste površinski modifikovane višezidnim ugljeničnim nanocevima dekorisanim česticama Pt ili MnO₂	122
4.4.1. Karakterizacija elektroda od ugljenične paste – nemodifikovane i površinski modifikovanih višezidnim ugljeničnim nanocevima i njihovim kompozitima.....	123
4.4.2. Analitičke metode zasnovane na elektrodi od ugljenične paste površinski modifikovanoj kompozitom od višezidnih ugljeničnih nanocevi i čestica Pt ili MnO ₂	127
4.4.3. Analiza vodonik-peroksidom obogaćenog uzorka mleka.....	133
4.5. Štampani ugljenični hemijski senzori/biosenzori zasnovani na kompozitu od višezidnih ugljeničnih nanocevi i čestica na bazi Pd ili Pt za određivanje H₂O₂/glukoze ...	138
4.5.1. Amperometrijsko određivanje glukoze primenom štampanog ugljeničnog biosenzora zasnovanog na kompozitu od višezidnih ugljeničnih nanocevi i čestica na bazi Pd	141
4.5.1.1. Karakterizacija štampane ugljenične elektrode modifikovane kompozitom od višezidnih ugljeničnih nanocevi i čestica na bazi Pd.....	141

4.5.1.2.	Analitičke metode određivanja H ₂ O ₂	143
4.5.1.3.	Analitičke metode određivanja glukoze	146
4.5.1.4.	Određivanje glukoze u uzorku meda	149
4.5.2.	Amperometrijsko određivanje glukoze primenom štampanog ugljeničnog biosenzora zasnovanog na kompozitu od višezidnih ugljeničnih nanocevi i čestica na bazi Pt	150
4.5.2.1.	Karakterizacija radnih elektroda – supstrat elektrode i biosenzora	150
4.5.2.2.	Razvoj analitičkih metoda određivanja H ₂ O ₂ i glukoze	152
4.5.2.3.	Određivanje glukoze u uzorku belog grožđa	158
4.5.2.4.	Određivanje glukoze u uzorku komprimata/tableta	160
5.	ZAKLJUČAK	162
6.	CONCLUSION	168
7.	LITERATURA	174
	BIOGRAFIJA	194
	SPISAK NAUČNIH RADOVA	196
	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	198
	KEYWORDS DOCUMENTATION	203

1. UVOD

U današnje vreme, detekcija i određivanje vodonik-peroksida (H_2O_2) je sveprisutan analitički zadatak imajući u vidu njegovu široku primenu. H_2O_2 je molekul značajan sa aspekta tehnologije zaštite životne sredine (u procesima prečišćavanja voda i uklanjanja materija/polutanata organskog porekla, kao što su npr. prirodne organske materije ili pesticidi). Sa druge strane, H_2O_2 je proizvod brojnih enzimatskih reakcija, pa se putem njegovog određivanja mogu odrediti indirektno i druga jedinjenja poput glukoze. Takođe, H_2O_2 ima ulogu konzervansa u industriji hrane. Aktivni je sastojak brojnih komercijalno dostupnih proizvoda za ličnu negu i kućnu upotrebu za higijenu domaćinstva. Stoga je njegovo određivanje veoma značajno u brojnim oblastima i postoji velika potreba za razvojem jednostavnih i osetljivih analitičkih metoda, kao što su voltametrijske, za praćenje koncentracije H_2O_2 u odabranim uzorcima.

Iako je veliki broj klasičnih metoda dostupno za kvantifikaciju ovog ciljnog analita, elektroanalitičke metode, među kojima se posebno ističu voltametrijske i amperometrijske, se često primenjuju zbog niza prednosti kao što su jednostavna instrumentacija, niska cena i prenosivost opreme, brz odziv, visoka osetljivost i selektivnost primenjenih senzora. Takođe, dizajniranje elektrohemijskih senzora se sve više razvija zahvaljujući nanotehnologiji koja omogućava sintezu i primenu novih nanomaterijala.

Odabir pogodne radne elektrode je u voltametriji jedan od ključnih koraka. Ugljenične elektrode, nastale kao alternativa živinim elektrodama, mogu predstavljati pravi izbor kada je u pitanju određivanje H_2O_2 . Elektrode od ugljenične paste (CPE) i štampane ugljenične elektrode (SPCE) se ubrajaju među najviše primenjivanim, imajući u vidu njihove jedinstvene osobine uključujući vrlo jednostavnu pripremu i širok spektar mogućnosti njihove modifikacije. Kao modifikatori ovih elektroda u današnje vreme posebno se ističu materijali/medijatori/katalizatori nanodimenzija, poput ugljeničnih nanocevi u nativnom obliku ili u obliku kompozita gde u kombinaciji sa različitim česticama, najčešće metalalima, utiču na poboljšanje karakteristika analitičkih metoda.

Ova doktorska disertacija sadrži tri osnovne celine: *Teorijski deo*, *Eksperimentalni deo* i *Rezultati i diskusija*.

U *Teorijskom delu* je dat kratak literaturni pregled o ciljnom analitu – H_2O_2 , zatim je opisana voltametrija kao glavna merna tehnika sa posebnim osvrtom na cikličnu voltametriju,

diferencijalno pulsnu voltametriju i amperometriju/hidrodinamičku hronoamperometriju. U narednim poglavljima su date osnovne karakteristike primenjenih radnih elektroda – elektrode od ugljenične paste i štampane ugljenične elektrode, opisani su biosenzori pri čemu je posebna pažnja posvećena glukoznim biosenzorima, zatim je dat kratak literaturni pregled o ugljeničnim nanocevima i njihovim kompozitima, neki od primera elektroanalitičkih metoda određivanja H_2O_2 i glukoze, kao i osnovni princip na kojima se zasnivaju paralelne i uporedne merne tehnike primenjene u okviru ove doktorske disertacije (skenirajuća elektronska mikroskopija, tečna hromatografija i spektrofotometrija). Na kraju ove oblasti je opisan predmet i cilj istraživanja.

U *Eksperimentalnom delu* su navedene osnovne primenjene hemikalije i rastvori, instrumenti, kao i postupci eksperimentalnog rada.

U poglavlju *Rezultati i diskusija* su prikazani i prodiskutovani dobijeni rezultati optimizacije i razvoja jednostavnih i pouzdanih voltametrijskih metoda zasnovanih na primeni različitih ugljeničnih elektroda modifikovanih sa odabranim modifikatorima (mikro i nano dimenzioniranim medijatorima) za određivanje H_2O_2 kao ciljnog analita, kako u model sistemima, tako i u odabranim realnim uzorcima. Takođe, prikazani su i rezultati paralelnih tečno hromatografskih i uporednih spektrofotometrijskih merenja.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Vodonik-peroksid

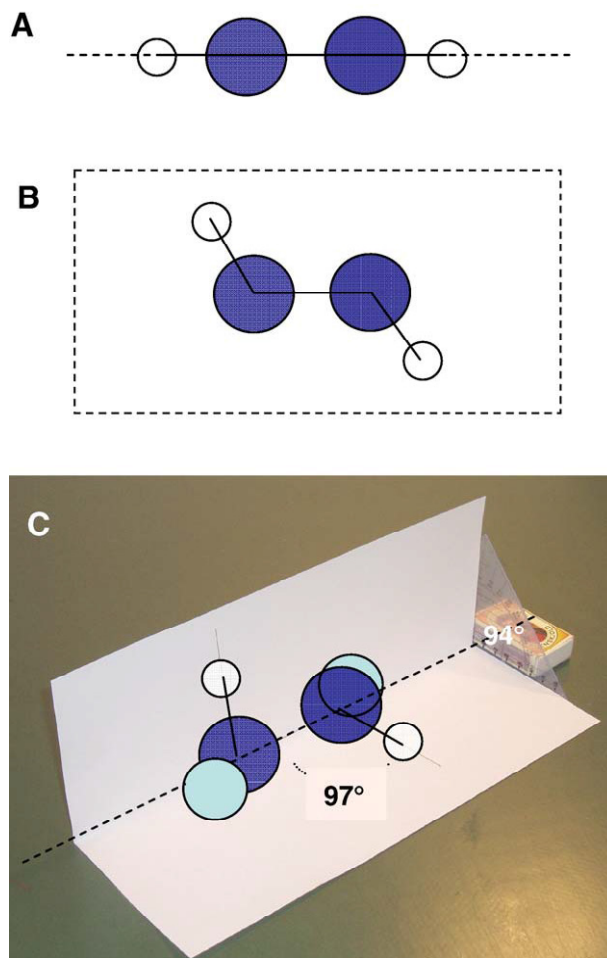
Iako veoma jednostavan molekul po prirodi, vodonik-peroksid (H_2O_2) je od velikog značaja i široko se primenjuje u mnogim oblastima uključujući hemijsku, farmaceutsku, tekstilnu, prehrambenu industriju, zaštitu životne sredine, medicinu, itd. Stoga je u ovom poglavlju dat pregled osnovnih fizičko-hemijskih osobina H_2O_2 , opisana je uloga H_2O_2 u biološkim sistemima, navedene su osnovne oblasti njegove primene, kao i do sada primenjene tehnike određivanja ovog ciljnog analita.

2.1.1. Osnovne fizičke i hemijske osobine

Na osnovu termodinamike, moglo bi se očekivati da se H_2O_2 nalazi u linearnoj ili *trans*-planarnoj konformaciji (slika 1A, B). Na ovaj način, dva atoma vodonika bi bila maksimalno međusobno udaljena što bi kao rezultat imalo simetričnu raspodelu naelektrisanja i samim tim nepolarne osobine H_2O_2 . Međutim, istraživanja su pokazala da H_2O_2 ima permanentni dipolni moment, koji čak ima veću vrednost u odnosu na vodu, pa se može pretpostaviti da se nalazi u iskošenoj *cis* konformaciji u kojoj su atomi vodonika orijentisani sa iste strane u odnosu na O–O vezu, a slobodni elektronski parovi su orijentisani u suprotnom smeru od atoma vodonika (slika 1C). Slobodni elektronski parovi ne dozvoljavaju slobodnu rotaciju oko O–O veze, što za rezultat ima nastanak permanentnog dipola. Obe O–H veze se nalaze pod uglom od 97° u odnosu na O–O vezu, dok su dva atoma vodonika raspoređena u dve različite ravni orijentisane međusobno pod uglom od 94° [1].

H_2O_2 je bistra, bezbojna tečnost koja je u potpunosti mešljiva sa vodom. Obično se primenjuje u vidu vodenih rastvora. H_2O_2 i njegovi visokokonzentrovani vodeni rastvori ($> 65\%$ m/m) su rastvorni u nekim organskim rastvaračima, kakvi su npr. estri karboksilnih kiselina. Sa vodom ne formira azeotropnu smešu i može biti odvojen potpuno od nje destilacijom. Čist H_2O_2 je stabilan. Takođe, njegovi čisti vodeni rastvori su relativno stabilni ako se skladište na odgovarajući način. Komercijalni rastvori se moraju stabilizovati dodatkom aditiva kako bi se sprečila eventualna razgradnja H_2O_2 usled prisustva nečistoća koje mogu delovati kao katalizator ili izlaganja povišenim temperaturama i pritiscima. H_2O_2 nije zapaljiv. Međutim, postoji opasnost od

požara ukoliko H_2O_2 reaguje sa zapaljivim materijama [2, 3]. Neke od važnijih fizičkih osobina H_2O_2 su prikazane u tabeli 1.



Slika 1. Tri moguće konformacije H_2O_2 : linearna (A), trans-planarna (B) i iskošena cis konformacija (C). Atomi vodonika su označeni belom bojom, atomi kiseonika plavom, a slobodni elektronski parovi svetlo plavom bojom [1].

H_2O_2 lako disusuje na vodu i molekul kiseonika, što je jedno od njegovih karakterističnih svojstava, koje može biti izuzetno korisno u nekim slučajevima, dok u nekim čak i nepoželjno. H_2O_2 može da disusuje na različite načine, ali u suštini svi oni su opisani sledećom reakcijom [4]:

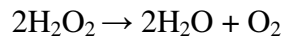


Tabela 1. Važnije fizičke osobine H_2O_2 [2].

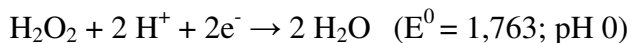
Fizička osobina / parametar	Vrednost
Tačka topljenja [°C]	-0,43
Tačka ključanja [°C]	150,2
Toplota topljenja [$J g^{-1}$]	368
Toplota isparavanja [$J g^{-1}K^{-1}$]	
25 °C	1519
Specifična toplota [$J g^{-1}K^{-1}$]	
tečnost na 25 °C	2,629
gas na 25 °C	1,352
Gustina [$g mL^{-1}$]	
0 °C	1,4700
20 °C	1,4500
25 °C	1,4425
Viskoznost [mPa s]	
0 °C	1,819
20 °C	1,249
Kritična temperatura [°C]	457
Kritični pritisak [MPa]	20,99
Indeks refrakcije [η_D^{20}]	1,4084

H_2O_2 ima vrednost pKa 11,6, tako da je pri fiziološkom pH većinom bez naelektrisanja. Anjon (HOO^-) je jak nukleofil, ali njegove reakcije su limitirane usled visoke vrednosti pKa. Usled polarizabilnosti O–O veze, H_2O_2 može da se ponaša i kao elektrofil. Takođe, O–O veza je relativno slaba i podležna homolizi kada je H_2O_2 izložen visokim temperaturama, radiolizi, fotolizi ili dejstvu prelaznih metala, usled čega mogu nastati hidroksilni radikali, ili u nekim slučajevima metali prelaze u više oksidaciono stanje. Ovi sekundarni produkti su odgovorni za jake oksidacione (ili dezinfekcione) sposobnosti H_2O_2 [5].

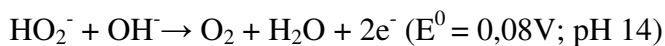
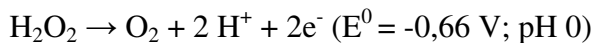
H_2O_2 je snažniji oksidans od hlora i permanganata. Razgradnjom daje proizvode koji ne zagađuju okolinu, što je svakako dodatna prednost njegove primene [6]. Dostupnost, lakoća

rukovanja, i kombinacija oksidacionih i redukcionih svojstava, čine H₂O₂ primenljivim u raznim oblastima. H₂O₂ poseduje jedinstvenu višestruku reaktivnost zbog dualne prirode u redoks procesima [4]. Stoga, može da se ponaša kao oksidaciono ili kao redukciono sredstvo, što je prikazano sledećim reakcijama (pored svake reakcije su date vrednosti standardnog redoks potencijala, E⁰, pri odgovarajućoj pH vrednosti) [3, 7]:

Oksidaciono sredstvo:



Redukciono sredstvo:



Kod ljudi, u kontaktu sa kožom dovodi do iritacije i izbeljivanja, a intenzitet oštećenja kože zavisi od koncentracije rastvora H₂O₂. Duži kontakt ili visoke koncentracije mogu da dovedu do stvaranja teških opekotina. U kontaktu sa očima, nastaju ozbiljne povrede. Pare ili aerosol H₂O₂ izazivaju oštećenje gornjeg respiratornog trakta i pluća. Ukoliko se proguta, nastaju simptomi poput bola u grudima, pojave pene u ustima, gubljenja svesti, nervnih poremećaja, groznice, itd [2, 8, 9].

2.1.2. H₂O₂ u biološkim sistemima

Reaktivne kiseonične vrste (reactive oxygen species, ROS) su grupa molekula koja nastaje u ćeliji kroz metabolizam kiseonika. H₂O₂ pripada ne-radikalnoj grupi ROS i može biti preveden u reaktivnije ROS na različite načine uključujući enzimatske reakcije. Povišena koncentracija H₂O₂ može da dovede do oksidativnog stresa i oštećenja ćelija, a u nekim slučajevima čak i do potpunog uništenja ćelija. Sa druge strane, H₂O₂ ima ulogu i signalnog molekula u regulaciji različitih ćelijskih procesa kod biljaka i sisara. Stoga, H₂O₂ ima kako pozitivne tako i negativne efekte u zavisnosti od koncentracije i tipa ćelije [1, 5, 10, 11]. U biološkim sistemima, uglavnom nastaje spontanom ili katalitičkom razgradnjom superoksidnog anjona (O²⁻) koji nastaje delimičnom redukcijom kiseonika u toku aerobnog disanja i izlaganja ćelija raznim fizičkim, hemijskim i biološkim agensima [10].

U ljudskom organizmu, H_2O_2 je široko poznat kao citotoksični agens čija koncentracija mora biti minimizovana dejstvom enzima antioksidativnog odbrambenog sistema. U principu, H_2O_2 je slabo reaktivan u odsustvu jona prelaznih metala. Izlaganje određenih ljudskih tkiva ovom molekulu može biti veće nego što se može pretpostaviti. Naime, znatne količine H_2O_2 mogu biti prisutne u pićima (zeleni i crni čaj, instant kafe) i njihovim konzumiranjem H_2O_2 brzo difunduje u ćelije usne duplje i gornjeg dela gastrointestinalnog trakta. Zatim H_2O_2 se može naći u svežim uzorcima ljudskog urina i u izdahnutom vazduhu. Nivo H_2O_2 u ljudskom telu se može držati pod kontrolom ne samo katabolizmom, već i izlučivanjem, i H_2O_2 može imati ulogu u regulaciji funkcije bubrega i kao antibakterijski agens u urinu. Urinarne koncentracije su posledica ishrane, ali pod određenim uslovima mogu biti biomarker tzv. oksidativnog stresa [12].

H_2O_2 je takođe sporedni produkt klasičnih biohemijjskih reakcija katalizovanih enzimima iz grupe oksidaza kao što su glukoza oksidaza, alkohol oksidaza, laktat oksidaza, holesterol oksidaza, glutamat oksidaza, lizin oksidaza, oksalat oksidaza, itd [13].

2.1.3. Primena H_2O_2

H_2O_2 se široko primenjuje u industriji kao sredstvo za beljenje celuloze, papira i tekstila kao alternativa sredstvima na bazi hlora. Pored toga što eliminiše boju i fleke, može da dovede i do razgradnje celuloze [14].

Sa druge strane, intenzivno se koristi kao biocid, posebno kod primena gde je razgradnja H_2O_2 u netoksične produkte (vodu i kiseonik) veoma bitna [15]. U domaćinstvu je najviše zastupljen u proizvodima za beljenje, dezinfekciju i čišćenje. Sastavni je deo sredstava za beljenje i bojenje kose. Razvijač boje u farbama za kosu može da sadrži od 3 do 12% H_2O_2 [3]. Aktivni je sastojak pojedinih rastvora za dezinfekciju i čišćenje kontaktnih sočiva dostupnih na tržištu, kod kojih deluje tako što uklanja bakterije, gljivice i viruse sa njihove površine. Međutim, s obzirom da koncentracija H_2O_2 neophodna za dezinfekciju kontaktnih sočiva izaziva iritaciju oka, H_2O_2 se mora neutralisati ili razgraditi pre njihove ponovne upotrebe [16, 17]. Dugi niz godina se primenjuje u stomatologiji za izbeljivanje zuba, a u poslednje vreme i za redovno održavanje higijene usta i zuba prvenstveno u kombinaciji sa natrijum-bikarbonatom (sodom bikarbonom). Takođe, postoje zubne paste koje sadrže ili generišu H_2O_2 [18]. U medicini osnovna njegova primena je za dezinfekciju i čišćenje rana, kao i za sterilizaciju oftamoloških i endoskopskih instrumenata [9].

U organskim sintezama ima ulogu oksidansa. H_2O_2 i njegovi derivati učestvuju u reakcijama epoksidacije alkena, hidroksilacije alkena, halogenacije, oksidacije alkohola, raskidanja dvostruke veze, karbonilne oksidacije, organo-sumporne i organo-azotne oksidacije, itd. Iako je, sa ekonomske tačke gledišta, H_2O_2 skuplji oksidans od kiseonika, u velikom broju slučajeva ima prednost nad njim zbog jednostavnosti rukovanja [2].

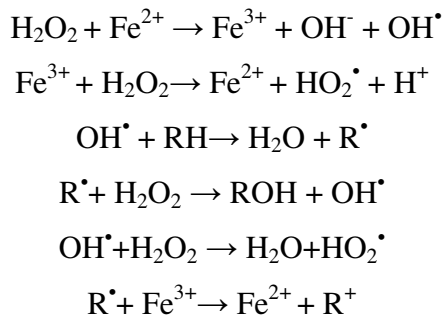
H_2O_2 se primenjuje u prehrambenoj industriji kao konzervans u hrani ili sredstvo za beljenje i sterilizaciju pakovanja. Sprečava širenje bakterija (mikroba) u hrani, kao što su proizvodi na bazi soje, riblji proizvodi, testenine, sveže isečeno voće i mlečni proizvodi [19]. Zadovoljavajuća sterilizacija sirovog mleka se može postići pri 0,1% udelu H_2O_2 , koji se lako razgrađuje delovanjem enzima katalaze prisutnog u mleku. Međutim, dodavanje H_2O_2 mleku se mora pažljivo kontrolisati jer veće koncentracije H_2O_2 utiču na njegov kvalitet [20, 21]. Takođe, može se naći i u pojedinim aseptično pakovanim pićima usled njihove sterilizacije sa H_2O_2 u toku procesa proizvodnje [22].

H_2O_2 je veoma značajan molekul i sa aspekta zaštite životne sredine. Koristi se u tretmanu komunalnih otpadnih voda za uklanjanje vodonik sulfida koji se formira u cevima u smislu kontrole mirisa i takođe sprečava sulfidnu koroziju odvodnih cevi. Najznačajniju primenu ima u tretmanu raznovrsnog industrijskog otpada. Cijanidi, tiocijanati, nitriti, hloridi, hipohloriti i organske materije mogu efikasno biti uklonjeni tretiranjem sa H_2O_2 . Može da se koristi za prečišćavanje otpadnih gasova i kao izvor kiseonika prilikom bioremedijacije zemljišta i biološkog tretmana mulja. Kao izvor hidroksilnih radikala ima važnu ulogu u naprednim oksidacionim procesima [6, 23], kao što je Fentonov proces o kome će više biti reči u poglavlju 2.1.4.

2.1.4. Fentonov proces

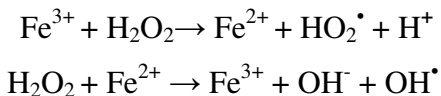
Fentonov proces u svom osnovnom obliku kao i u mnogim drugim oblicima zajedno sa foto-Fentonovim i Fentonu-sličnim procesima pripada grupi naprednih oksidacionih procesa (advanced oxidation processes (AOPs)). Široko se primenjuju u celom svetu zbog svoje zadovoljavajuće efikasnosti u smislu uklanjanja različitih organskih jedinjenja a sa druge strane ovi procesi podrazumevaju upotrebu lako dostupnih i jeftinih hemikalija koje su pritom jednostavne za rukovanje [24-34]. Različita organska jedinjenja poput fenola [26, 35-37], humskih kiselina [25], pesticida [38-41, 30], industrijskih organskih boja [42, 43] i lekova [38, 44] se primenom ovih procesa razgrađuju i uklanjaju najčešće u cilju prečišćavanja prirodnih voda ili otpadnih voda poreklom iz industrije i poljoprivrede.

U osnovi, Fentonov proces podrazumeva aktivaciju/razgradnju H_2O_2 odgovarajućim solima Fe^{2+} što dovodi do stvaranja hidroksilnih radikala, OH^\bullet (radikala sa visokim redoks potencijalom čija vrednost iznosi 2,8 V u odnosu na standardnu vodoničnu elektrodu) [36, 37, 41, 43]. Nastali OH^\bullet imaju sposobnost da oksiduju različita organska jedinjenja (RH) pri čemu lančanom reakcijom dolazi do stvaranja stabilnih intermedijera ili do potpune mineralizacije, što je u većini slučajeva više poželjno. Fentonov proces može biti opisan sledećim kompleksnim mehanizmom [31]:



Efikasnost Fentonovog procesa zavisi od nekoliko faktora kao što su koncentracija Fe^{2+} i H_2O_2 , pH, temperatura, reakciono vreme, sadržaja organskih i neorganskih materija u vodi, kao i prisustva hvatača OH^\bullet kao što je npr. HO_2^\bullet [25, 26, 31, 34]. Pored toga što je H_2O_2 izvor OH^\bullet , pri određenim uslovima može biti i hvatač OH^\bullet što može imati negativan uticaj na efikasnost samog procesa [42, 44]. Prednosti Fentonovog procesa su primenljivost na sobnoj temperaturi, niska cena, jednostavnost i netoksičnost prema životnoj sredini, dok su nedostaci postupka potreba za podešavanjem pH vrednosti (primenljivost u kiseljoj sredini), moguća pojava različitih interferencija i neizbežna proizvodnja taloga gvožđa, čije uklanjanje predstavlja dodatni korak u finalnom procesu koji se sastoji u koagulaciji i sakupljanju taloga primenom filtracije [39].

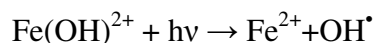
Proces u kome su Fe^{2+} zamenjeni sa Fe^{3+} je poznat pod nazivom Fentonu-sličan proces [27]. On podrazumeva u prvom koraku formiranje HO_2^\bullet i Fe^{2+} , a zatim u narednom koraku i formiranje OH^\bullet , što je prikazano sledećim reakcijama:



Nedavne studije koje su imale za cilj detaljniji uvid u Fentonov i Fentonu-sličnim procesima prilikom tretmana voda su pokazale da neki intermedijeri koji nastaju prilikom razgradnje aromatičnih jedinjenja mogu da utiču na interkonverziju $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, i na taj način utiču na brzinu i

tok ovih reakcija. Stoga sa tačke gledišta $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ interkonverzije, Fentonu-sličan proces neizbežno uključuje klasičnu Fentonovu reakciju, i Fentonova reakcija takođe može da sadrži Fentonu-sličan reakcioni korak [27].

U slučaju foto-Fentonovog procesa, elektromagnetno zračenje odgovarajuće energije (u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti) dodatno utiče na regeneraciju Fe^{2+} iz Fe^{3+} što dovodi do poboljšanja generisanja aktivnih radikalskih vrsta prema sledećoj reakciji [25, 26, 35-37, 41, 43, 44]:



Na osnovu pomenutih činjenica, H_2O_2 se može smatrati analitom od velikog značaja za praćenje Fentonovog i sličnih procesa. Stoga postoji potreba za razvijanjem brze, jednostavne i pouzdane analitičke metode za određivanje H_2O_2 , koja ujedno nije štetna po životnu sredinu.

2.1.5. Određivanje

Imajući u vidu široku primenu H_2O_2 , njegovo određivanje pouzdanom, brzom i ekonomičnom metodom je od velikog značaja za mnoge procese. Nekoliko konvencionalnih analitičkih tehnika je primenjeno za njegovo određivanje. Redoks titracije poput permanganometrijske i jodometrijske titracije su među tradicionalnijim metodama određivanja H_2O_2 [45, 46]. Kolorimetrijske i spektrofotometrijske metode se zasnivaju na primeni različitih reagenasa kao što su npr. titanijum-sulfat [47-49] ili kalijum titanijum-oksalat [50], metavanadat [51], binuklearni gvožđe (III)-kompleks [52] koji u reakciji sa H_2O_2 daju obojena jedinjenja sa apsorpcionim maksimumom u vidljivoj oblasti spektra. Nadalje, metode zasnovane na hemiluminescenciji [53, 54], fluorimetriji [55, 56], kao i hromatografske metode [57] takođe pružaju mogućnost određivanja H_2O_2 . Većina navedenih metoda je kompleksna, zahteva dugo vreme analize i skupe reagense, a takođe određivanje H_2O_2 ometa i prisustvo interferencija [58].

S obzirom da je H_2O_2 elektroaktivan molekul, elektroanalitičke metode su se pokazale veoma pogodnim za njegovo određivanje. U poređenju sa drugim metodama, one su jednostavne, brze, osetljive, isplative i omogućavaju postizanje niskih granica detekcije. Određivanje se zasniva na direktnoj redukciji ili oksidaciji H_2O_2 , pri čemu elektrodna reakcija zahteva visoke nadnapone, što dovodi do smanjenja osetljivosti i pojave interferencija od strane drugih elektroaktivnih supstanci prisutnih u realnim uzorcima. Stoga su istraživanja u današnje vreme fokusirana na

modifikaciji elektroda u cilju smanjenja nadnapona i poboljšanja kinetike transfera elektrona. Kao modifikatori pokazale su se pogodnim supstance koje imaju katalitičku aktivnost tj. ponašaju se kao medijatori. Među njima se posebno izdvajaju prelazni metali, njihovi oksidi i kompleksi, a u današnje vreme sve više se primenjuju nanomaterijali [13, 58]. Neke od elektroanalitičkih metoda za određivanje H_2O_2 su detaljnije opisane u poglavlju 2.6.

2.2. Voltometrija

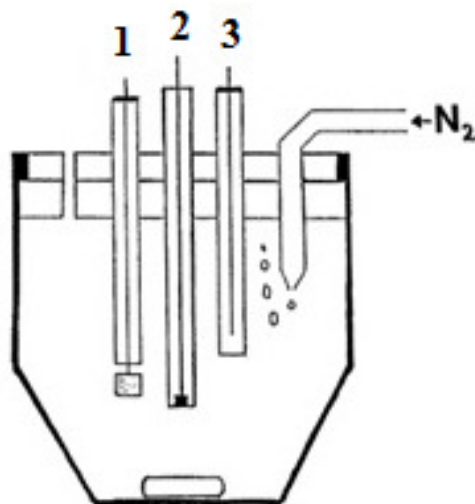
S obzirom da je glavna merna tehnika u okvirima ove doktorske disertacije voltametrijska tehnika, u ovom poglavlju je pored osnovnih pojmova u voltametriji, opisan i osnovni princip primenjenih tipova voltametrije (ciklična i diferencijalno pulsna voltametrija), kao i amperometrije/hidrodinamičke hronoamperometrije. Kako je odabir radne elektrode od velikog značaja za analizu željenog analita, na kraju poglavlja dat je kratak pregled osnovnih radnih elektroda u voltametriji/amperometriji.

2.2.1. Osnovni pojmovi

Voltometrija je elektrohemijska i elektroanalitička tehnika koja se zasniva na merenju struje u funkciji primenjenog potencijala. Savremena elektrohemijska ćelija u kojoj se vrše voltametrijska merenja, se sastoji od troelektrodnog sistema (radne, referentne i pomoćne elektrode) koji je uronjen u rastvor analita i pomoćnog elektrolita (slika 2). Radna elektroda je elektroda na kojoj se analit oksiduje ili redukuje, njen potencijal se menja u toku vremena i meri u odnosu na referentnu elektrodu koja ima konstantan potencijal. Sva struja u ćeliji prolazi između radne i pomoćne elektrode. Analizirani rastvor u elektrohemijskoj ćeliji se može po potrebi prodivavati inertnim gasom (npr. sa N_2 ili He) u cilju uklanjanja rastvorenog O_2 koji se može redukovati i ometati detekciju/određivanje ciljnog analita. Elektrohemijska ćelija je povezana sa potenciostatom koji kontroliše potencijal zadat radnoj elektrodi. Kao rezultat voltametrijskih merenja dobija se kriva zavisnosti struje od potencijala tzv. voltamogram [59-62].

Ukupna struja koja prolazi kroz radnu elektrodu predstavlja sumu faradejske i nefaradejske struje. Faradejska struja nastaje usled direktnog transfera elektrona na granici faza, između elektrode i rastvora, što dovodi do elektrohemijske reakcije (oksidacije ili redukcije). Drugi tip struje, nefaradejska struja, se javlja zbog prisustva elektrohemijskog dvostrukog sloja. Dodatno, ova struja može nastati i usled procesa adsorpcije ili desorpcije kako elektroaktivnih, tako i

neelektroaktivnih specija. U ovom slučaju ne dolazi do hemijske reakcije i transfera elektrona. Faradejska struja je ona koja je od interesa, stoga su razvijene mnoge elektroanalitičke tehnike koje umanjuju ili eliminišu doprinos nefaradejske struje ukupnoj struji [63].



Slika 2. Shematski prikaz elektrohemijske ćelije za voltametrijska merenja: pomoćna (1), radna (2) i referentna elektroda (3) [61].

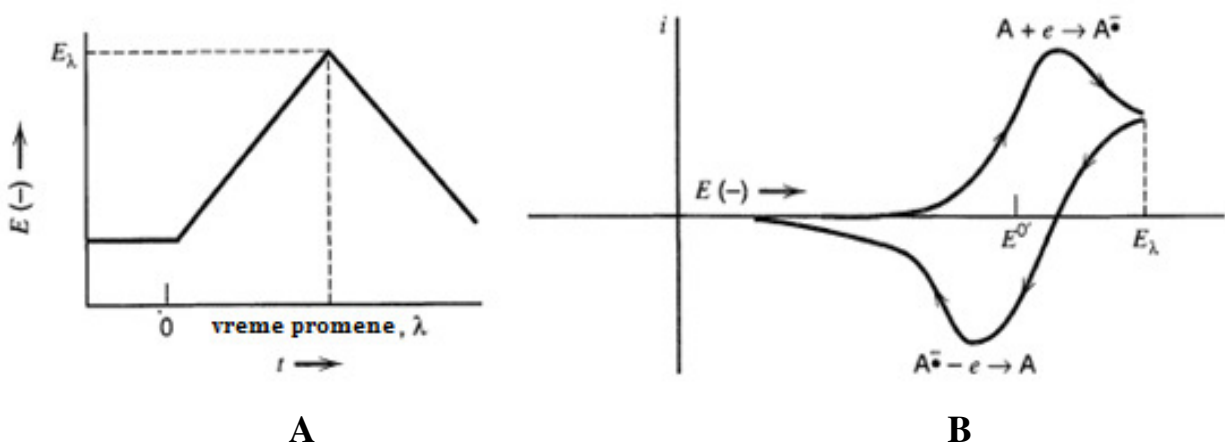
Postoje različiti tipovi voltametrijskih tehnika, među kojima su polarografija (voltametrijska tehnika u kojoj se kapljuća živina elektroda primenjuje kao radna elektroda), ciklična voltametrija, zatim u cilju poboljšanja osetljivosti i selektivnosti analitičkih metoda razvijene su pulsne voltametrijske tehnike (normalna pulsna, diferencijalno pulsna i voltametrija sa pravougaonim talasima) i inverzne voltametrijske tehnike (anodna, katodna i adsorptivna inverzna voltametrija) [59-62].

Prednosti voltametrijskih tehnika su izuzetna osetljivost i širok linearni opseg koncentracija kako za organske tako i za neorganske analite, kratko vreme trajanja analize, veliki izbor rastvarača i elektrolita koji se mogu koristiti prilikom merenja, mogućnost simultanog određivanja nekoliko različitih analita bez potrebe za njihovim prethodnim odvajanjem, itd. Veoma niske granice detekcije se mogu postići (pikomolarnog nivoa) koristeći savremenu instrumentaciju i prekoncentraciju analita na površini radne elektrode [60, 64].

2.2.2. Ciklična voltametrija

Ciklična voltametrija (CV) je možda najpraktičnija elektroanalitička tehnika za proučavanje elektroaktivnih jedinjenja. Intenzivno se primenjuje u oblasti elektrohemije, neorganske hemije, organske hemije i biohemije. Ciklična voltametrijska merenja najčešće predstavljaju prvi korak prilikom elektrohemijskih proučavanja jedinjenja, biološkog materijala ili površine elektrode. Efikasnost CV se ogleda u mogućnosti brzog dobijanja informacija o redoks ponašanju ciljnog analita u širokom opsegu potencijala, termodinamici redoks procesa, kinetici heterogene reakcije prenosa elektrona, kuplovanim hemijskim reakcijama ili procesima adsorpcije [61, 65].

CV se zasniva na linearnoj promeni potencijala radne elektrode od početne vrednosti potencijala do unapred definisane vrednosti, E_λ , a zatim se potencijal menja istom brzinom u obrnutom smeru do početne ili neke druge unapred zadate vrednosti [66]. Na slici 3 je prikazan profil promene potencijala u toku vremena (A) kao i rezultujući ciklični voltamogram (B). Često je veoma mala razlika između prvog ciklusa i narednih uzastopnih ciklusa. Međutim, promene koje se mogu uočiti u toku snimanja više uzastopnih cikličnih voltamograma pružaju veoma važne informacije o reakcionim mehanizmima [67].



Slika 3. Profil promene potencijala u toku vremena kod ciklične voltametrije (A) i rezultujući ciklični voltamogram (B) [66].

Važni parametri na cikličnom voltamogramu su potencijal katodnog pika ($E_{p,k}$), potencijal anodnog pika ($E_{p,a}$), struja katodnog pika ($i_{p,k}$) i struja anodnog pika ($i_{p,a}$). U slučaju reverzibilne reakcije, $i_{p,k}$ i $i_{p,a}$ su približno jednake po apsolutnoj vrednosti, ali su suprotnog znaka, dok razlika potencijala pikova (ΔE_p) pri temperaturi od 25°C iznosi:

$$\Delta E_p = |E_{p,a} - E_{p,k}| = 0,059/n$$

gde je n broj elektrona uključenih u polu-reakciji. Kod ireverzibilnih procesa nastalih usled spore kinetike transfera elektrona, vrednost ΔE_p je veća od očekivane vrednosti kod reverzibilnih procesa [59]. Struja pika za reverzibilni proces se može izračunati prema *Randles-Sevcik* jednačini, koja za temperaturu od 25°C ima oblik:

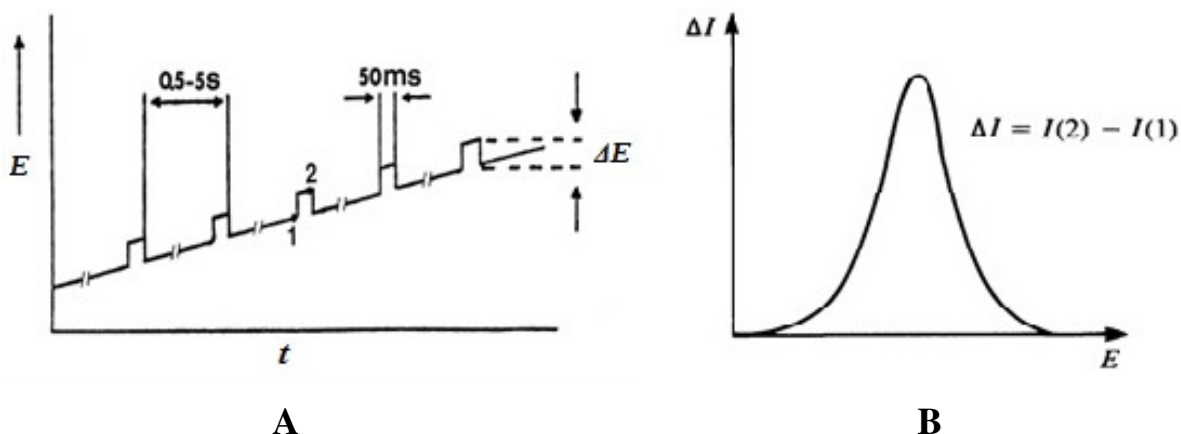
$$i_p = 2,686 \cdot 10^5 n^{3/2} S c D^{1/2} \nu^{1/2}$$

gde su: i_p —struja pika (A), n —broj elektrona, S —površina elektrode (cm^2), D —difuzioni koeficijent ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), c —koncentracija (mol mL^{-1}), ν —brzina skeniranja (V s^{-1}). CV pruža mogućnost određivanja D ukoliko su poznati c , S i ν [59].

2.2.3. Diferencijalno pulsna voltometrija

Pulsna voltometrija je prvobitno bila predviđena za primenu kapljuće živine elektrode (KŽE) kao radne elektrode, pa se stoga nazivala pulsnom polarografijom, dok se u današnje vreme odnosi uglavnom na druge, alternativne radne elektrode. Primena potencijalskog pulsa elektrodi dovodi u većini eksperimenata do znatnog poboljšanja (povećanja) odnosa faradejske i nefaradejske struje, jer faradejska struja obično opada sporije u toku vremena (proporcionalno sa $1/t^{1/2}$) u odnosu na nefaradejsku struju (struju punjenja električnog dvostrukog sloja) koja opada mnogo brže, što omogućava postizanje nižih granica detekcije [68].

Diferencijalno pulsna voltometrija/polarografija (DPV/DPP) je izuzetno korisna tehnika za merenje tragova organskih i neorganskih analita. U konkretnom slučaju (radna elektroda KŽE), pulsevi konstantne amplitude (ΔE) superponirani na linearnu promenu potencijala, su primenjeni na radnu elektrodu u momentu neposredno pre otkidanja kapi žive (slika 4A). Sa slike 4A se može videti da se struja uzorkuje dva puta, i to pre primene pulsa (1) i u toku trajanja pulsa (2, nakon približno 40 ms, kada je struja punjenja električnog dvostrukog sloja neznatna). Razlika ove dve struje se registruje u funkciji primenjenog potencijala (slika 4B), pri čemu se kao rezultat dobija odgovarajući pik na voltamogramu čija je visina direktno proporcionalna koncentraciji merenog analita [61, 69].

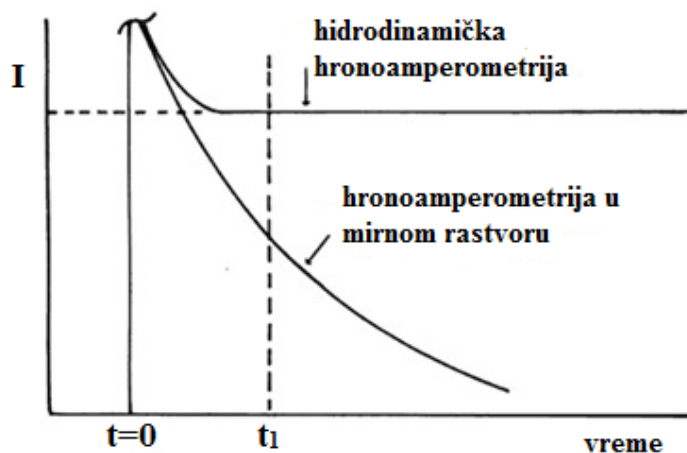


Slika 4. Pobudni signal kod diferencijalno pulsne voltametrije (A) i izgled rezultujućeg voltamograma (B) [61, 69].

2.2.4. Amperometrija/hidrodinamička hronoamperometrija

Amperometrija je elektroanalitička tehnika za koju se može smatrati da je razvijena iz voltametrije. U voltametriji se potencijal menja u toku vremena, dok je u amperometriji on konstantan i obično je podešen na onu vrednost pri kojoj je postignuta granična difuziona struja bar jedne komponente tj. ciljnog analita u ispitivanom rastvoru [70].

Tehnika zasnovana na praćenju promene struje sa vremenom pri konstantnom potencijalu se naziva hronoamperometrija. Merenja se mogu vršiti u mirnom (nemešanom) rastvoru ili uz mešanje rastvora. Ukoliko se merenja vrše pri hidrodinamičkim uslovima (u mešanom rastvoru) onda se takav tip amperetrije naziva hidrodinamička hronoamperometrija. Na slici 5 je prikazan strujni odziv radne elektrode u funkciji vremena pri potenciostatskim uslovima kako u mirnom, tako i u mešanom rastvoru. U početnom trenutku, u oba slučaja se uočava porast struje kada se primeni odgovarajuća vrednost elektrodnog potencijala, dok se u toku vremena strujni odziv znatno razlikuje. U mešanom rastvoru struja se ustaljuje na konstantnu vrednost dok u mirnom rastvoru struja opada proporcionalno sa $t^{-1/2}$. Ova razlika u ponašanju se javlja zbog različitog mehanizama kojim se molekuli transportuju do površine elektrode [71].



Slika 5. Strujni odziv radne elektrode u funkciji vremena pri potenciostatskim uslovima rada u mirnom i mešanom rastvoru [71].

2.2.5. Voltametrijski senzori/radne elektrode u voltametriji

Voltametrijski senzori predstavljaju podgrupu elektrohemijjskih senzora. Svaki hemijski senzor se sastoji od transduktora (pretvaračkog elementa) koji je prekriven hemijskim ili biološkim slojem za prepoznavanje. Ovaj sloj interaguje sa ciljnim analitom i fizičke, hemijske, elektrohemijske ili biohemijske promene nastale usled ove interakcije se pomoću transduktora prevode u električni signal. Kod elektrohemijjskih senzora se elektroda primenjuje kao transduktor [61, 72].

U principu neke nemodifikovane elektrode mogu biti već klasifikovane kao senzori, jer pokazuju selektivnost prema određenom analitu u zavisnosti od primenjenog potencijala, ali one se obično smatraju transduktorima. Selektivnost u najvećem broju slučajeva zavisi od modifikacije elektroda, gde elektrohemijski reaktivne grupe dovode do interakcije samo sa željenim analitom [70]. U voltametrijske i amperometrijske senzore se mogu uvrstiti oni senzori bazirani na hemijski inertnim elektrodama, hemijski aktivnim elektrodama i modifikovanim elektrodama. Takođe, ova grupa podrazumeva i senzore sa ili bez (galvanski senzori) spoljašnjeg izvora struje [72].

Prvi amperometrijski senzor je bio Klarkov kiseonični senzor, koji se široko primenjuje u kliničkim laboratorijama za određivanje rastvorenog kiseonika u krvi i drugim telesnim tečnostima [73]. Rad voltametrijskih/amperometrijskih senzora umnogome zavisi od izbora elektrodnog

materijala, pa su stoga veliki naponi uloženi u dizajn i proizvodnju elektroda. Razvoj ovih senzora se pretežno zasniva na upotrebi žive, ugljeničnih materijala i plemenitih metala kao osnovnih komponenata radnih elektroda, a u današnje vreme i nanomaterijala. Nove mogućnosti za dizajn elektroda, uključujući inkorporaciju mikroelektroda, mikroelektrodnih nizova i hemijski modificovanih elektroda u visokoosetljive senzorske sisteme, doprineli su porastu interesovanja za njihovu primenu u industriji i medicini [74, 75].

Postoji nekoliko tipova živinih elektroda, među kojima su najčešće primenjivane KŽE, elektroda sa visećom kapi žive i elektrode na bazi filma od žive. Živine elektrode su se nekada veoma koristile u voltometriji, pre svega zbog širokog potencijalskog prozora u negativnoj oblasti potencijala (do oko -2,5 V) i mogućnosti formiranja amalgama sa mnogim metalima, kao i mogućnosti jednostavne obnove elektrodne površine formiranjem nove živine kapi. Međutim, glavni nedostaci ovih elektroda su toksičnost žive kao i ograničena primena u pozitivnoj oblasti potencijala usled oksidacije žive (na oko 0,4 V), zbog čega postoji tendencija da se živa zameni alternativnim elektrodnim materijalima [59, 76]. Kao pogodne alternative su se pokazale elektrode na bazi filma od bizmuta [77, 78] ili antimona [79, 80], kao i različiti tipovi amalgamskih elektroda, kakva je npr. obnovljiva srebro-amalgam film elektroda [81].

Elektrode od plemenitih metala, kakvi su pre svega platina i zlato, omogućavaju postizanje veoma povoljne kinetike transfera elektrona i poseduju širok potencijalski prozor u pozitivnoj oblasti potencijala. Nizak nadnapon izdvajanja vodonika na ovim elektrodama ograničava njihovu upotrebu u negativnoj oblasti potencijala (katodni limit se nalazi u intervalu od -0,2 V do -0,5 V u zavisnosti od pH). Takođe, veliki problem predstavljaju visoke pozadinske struje koje su posledica formiranja oksida na površini elektrode ili adsorbovanja vodonika [61].

Pored klasičnih ugljeničnih materijala, poput grafita i staklastog ugljenika, za izradu radnih elektroda se primenjuju i noviji ugljenični materijali, kao što su fulereni, ugljenična vlakna, ugljenične nanocevi, borom doponovani dijamant, itd. Raznolikost ugljenika kao elektrodnog materijala u velikoj meri proizilazi iz njegovog strukturnog polimorfizma, hemijske stabilnosti, bogate hemije površine, i jake C-C veze prisutne kako u unutrašnjosti, tako i između ugljeničnog materijala i površinskog modifikatora. Najveće prednosti ugljeničnih elektroda su niska cena, širok potencijalski prozor, relativna elektrohemijska inertnost i elektrokatalitička aktivnost u raznim redoks reakcijama [82].

Mnoga elektrohemijska dostignuća u oblasti senzorike su postignuta zahvaljujući pojavi heterogenih ugljениčnih elektroda. Elektrode od ugljениčne paste i štampane ugljениčne elektrode predstavljaju u današnje vreme najvrednije komponente elektrohemijskih senzora i biosenzora [70]. Kako je u okvirima ove doktorske disertacije upravo primenjen ovaj tip elektroda, njihov detaljan opis je dat u narednom poglavlju.

2.3. Heterogene ugljениčne elektrode

Heterogene ugljениčne elektrode poput elektrode od ugljениčne paste (carbon paste electrode, CPE) i štampane ugljениčne elektrode (screen printed carbon electrode, SPCE) se veoma primenjuju u elektrohemiji. U poslednje vreme, minijaturizacija čvrstih elektroda je postala veoma popularna zbog niza prednosti kao što su znatno smanjenje zapremine uzorka, prenosivost i isplativost. Tradicionalne CPE se smatraju pretečama SPCE. U ovom poglavlju će biti detaljno opisana oba tipa heterogenih ugljениčnih elektroda, sa posebnim osvrtom na njihovu primenu i modifikaciju.

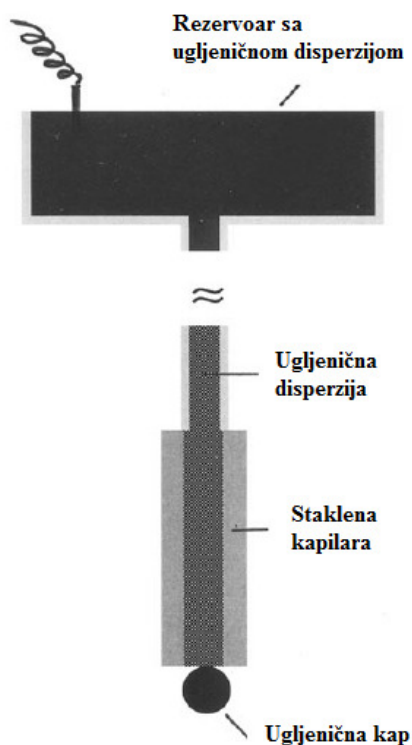
2.3.1. Elektrode od ugljениčne paste

2.3.1.1. Istorijat

Elektroda od ugljениčne paste (carbon paste electrode, CPE) je nastala krajem pedesetih godina 20. veka kao alternativa KŽE. Njen izumitelj je profesor Ralph Norman Adams sa Univerziteta u Kansasu, koji je 1958. godine objavio rad pod nazivom „Carbon Paste Electrodes” u kome je zvanično i predstavio ovaj tip elektrode [83].

Prvobitna ideja Adamsa i njegovih saradnika je bila da se konstruiše kapljuća ugljениčna elektroda koja bi za razliku od KŽE mogla da se primeni u pozitivnoj oblasti potencijala za anodna određivanja organskih jedinjenja [84]. Ova elektroda se sastojala od fino spraćenog ugljениčnog praha i inertne organske tečnosti pomešanih tako da se dobije smeša dovoljno tečna da može da prođe kroz tanku kapilaru. Njena moguća konstrukcija je prikazana na slici 6. Međutim, zamišljena elektroda je imala određene nedostatke, kao što je npr. razdvajanje ugljениčnih čestica od organske tečnosti pri proticanju kroz kapilaru, što je dovodilo do prekida električnog kontakta. Iako je koncept o kapljućoj ugljениčnoj elektrodi tokom pedesetih godina prošlog veka bio neuspešan i nije nikada bio objavljen, ovi eksperimenti su doveli do formiranja novog elektrodnog materijala –

ugljenične paste, gušće konzistencije i vrlo sličnih osobina kapljućoj ugljeničnoj elektrodi [85]. Ipak, treba napomenuti i to da je nakon više desetina godina od pojave CPE dizajnirana prva kapljuća ugljenična elektroda od strane *Tatsumi i saradnika* koja je uspešno primenjena za polarografska merenja [86, 87].



Slika 6. Moguća konstrukcija kapljuće ugljenične elektrode [84].

Tokom proteklih decenija ugljenična pasta je postala jedan od najpopularnijih elektrodnih materijala, naročito nakon osamdesetih godina prošloga veka, kada počinje nagla ekspanzija primene CPE kako u oblasti senzora i biosenzora, tako i u elektroanalizi uopšte, zahvaljujući njenim fizičkim, hemijskim i elektrohemijskim osobinama. Od njenog nastanka, do danas, objavljeno je više hiljada naučnih radova iz oblasti CPE.

2.3.1.2. Definicija, klasifikacija i tipovi

Postoje različite definicije ugljenične paste. Tradicionalno gledano, ugljenična pasta predstavlja mešavinu dve faze, ugljeničnog (najčešće grafitnog) praha i odgovarajuće vezivne organske tečnosti. Prema ovoj definiciji pripada grupi heterogenih ugljeničnih materijala [85, 88].

CPE se mogu klasifikovati prema različitim kriterijumima, ali najčešće primenjivana podela je na osnovu modifikovanosti. Ukoliko se u obzir uzme ovaj kriterijum, CPE se mogu podeliti u dve osnovne kategorije [84]:

- Nemodifikovane (smeše dve osnovne komponente, ugljeničnog praha i vezivne tečnosti);
- Modifikovane (dobijaju se kada se originalnim binarnim smešama doda jedna ili više komponenti koje imaju ulogu modifikatora).

Prema konzistenciji, CPE se razlikuju po odnosu ugljeničnog praha i vezivnog sredstva u smeši i mogu biti suve i vlažne [85].

Pored klasičnih CPE koje sadrže inertnu organsku vezivnu tečnost tj. elektroneaktivne i hemijski inertne organske supstance kao što su parafinsko ili silikonsko ulje, postoje i specifični tipovi CPE. Neki od njih su [85]:

- CPE sa elektroaktivnom vezivnom tečnošću (vezivna tečnost je jak neorganski elektrolit kao što su koncentrovani rastvori mineralnih kiselina ili alkalnih hidroksida);
- Čvrste CPE (vezivno sredstvo je lako topljiva supstanca, kao što je silikonska guma, kaučuk, polivinilhlorid, polipropilen, fenantrenski ili parafinski vosak);
- Porozne pseudo CPE (tečna komponenta je zamenjena polimerom, npr. nastaju mešanjem grafitnog praha, pirola i mikrosfera polistirena kao templatata. Nakon polimerizacije uklanjaju se mikrosfere polistirena, pri čemu se dobija porozna struktura).

2.3.1.3. Sastavne komponente

Kao što je ranije pomenuto, dve osnovne komponente ugljenične paste su ugljenični prah i vezivna tečnost. Optimalna selekcija kako ugljeničnog praha, tako i vezivne tečnosti, predstavlja jedan od najvažnijih faktora koji utiču na osobine rezultujuće ugljenične paste [89].

Ugljenični materijali

Spektroskopski (spektralni) grafit se u većini slučajeva primenjuje za pripremu CPE. Najčešće se dobija sintetičkim putem i to termičkom razgradnjom odgovarajućih ugljovodoničnih jedinjenja. Komercijalno je dostupan preko velikih kompanija (npr. Aldrich, Fluka, Merck, Sigma) ili lokalnih proizvođača (npr. grafitni prah sa oznakama „RW-B“ i „RW-C“ dostupan u Nemačkoj i Austriji). Grafitni prah, treba da ispunjava sledeće kriterijume [84, 85, 90]:

- Veličina čestica (u intervalu od nekoliko do par desetina mikrometara);

- Uniformna raspodela čestica (poželjno je da čestice imaju identičnu veličinu ili su raspoređene uniformno u uskom opsegu od nekoliko μm);
- Niska adsorptivna moć (usled povećanog sadržaja kiseonika koji je zaostao u porama grafita ili se adsorbovao u toku pripreme ugljenične paste može doći do porasta pozadinske struje u negativnoj oblasti potencijala u toku merenja, što se može sprečiti odgovarajućim pretretmanom);
- Hemijska otpornost (samo ekstremni uslovi i/ili jako agresivni reagensi mogu transformisati elementarni ugljenik u oksidacione produkte);
- Visoka hemijska čistoća (ne sme da sadrži elektroaktivne nečistoće jer pri merenju veoma niskih vrednosti struje čak i najmanje nečistoće (tragovi) mogu dati značajne signale);
- Odlična provodljivost.

Pored grafitnog praha za pripremu CPE se mogu primeniti i alternativni ugljenični materijali, kao što su acetilen crno, koloidni grafit, čađ, aktivni ugalj, koks, prirodni ugalj, dijamantski prah [90].

Pojava i primena novo sintetisanih alotropskih modifikacija ugljenika je potpuno promenila elektrohemiju zasnovanu na CPE i otvorila novu eru u ovoj oblasti. „Novi oblici ugljenika“ se izdvajaju po specifičnoj mikrostrukturi. Većina njih su u potpunosti sintetički i poseduju pogodne fizičko-hemijske i elektro-hemijske osobine kao što su izrazite katalitičke osobine, poboljšana provodljivost ili specifični transfer mase/naelektrisanja. Zbog svojih osobina neki od ovih materijala se pored grafitnog praha dodaju prilikom pripreme CPE i imaju ulogu modifikatora. Tipični predstavnici ove grupe materijala su: prah staklastog ugljenika, fuleren, ugljenične nanocevi, porozne ugljenične mikrosfere, ugljenična nanovlakna i grafen [90, 91].

Vezivne tečnosti

Tradicionalne CPE sadrže organsku vezivnu tečnost koja prvenstveno ima ulogu da mehanički veže ugljenične čestice u uniformnu (kompaktnu) masu. Pored ove glavne funkcije, vezivna tečnost kao druga glavna komponenta ugljenične paste utiče na njene rezultujuće osobine pre svega konzistenciju, hidrofobnost, kao i elektro-hemijsko ponašanje usled određenih specifičnih fizičko-hemijskih osobina, uključujući i hemijsku strukturu vezivnog sredstva [90]. Prilikom odabira vezivne tečnosti, poželjno je da ona poseduje sledeće karakteristike [84]:

- Hemijska inertnost i elektroinaktivnost;
- Visoka viskoznost;
- Niska isparljivost;
- Minimalna rastvorljivost u vodi i vodenim rastvorima;
- Nemešljivost sa organskim rastvaračima.

Iako nijedna vezivna tečnost ne poseduje karakteristike idealne vezivne tečnosti, postoji širok izbor organskih jedinjenja i smeša koje se mogu primeniti za pripremu CPE zadovoljavajućeg kvaliteta. Neke od njih su [85, 90]:

- Parafinska (mineralna) ulja – najčešće primenjivana vezivna tečnost za pripremu ugljenične paste. Najpopularniji proizvodi ove vrste su komercijalno dostupni pod nazivom „Nujol“ i „Uvasol“ i predstavljaju smeše tečnih alifatičnih ugljovodonika;
- Silikonska ulja i masti – obično su to polimerizovani siloksani koji imaju veliku molarnu masu, i u odnosu na parafinska ulja formiraju stabilnije ugljenične paste sa manje izraženim efektom starenja i većom otpornošću prema nekim organskim rastvaračima;
- Alifatični, aromatični i halogenovani ugljovodonici;
- Organski etri i estri (npr. trikrezil fosfat, dioktil ftalat, difenil etar);
- Prirodna i sintetička ulja ili masti (npr. ricinusovo ulje, vazelin);
- Jonske tečnosti – postale su popularne u novije vreme, pored toga što se mogu primeniti kao vezivna tečnost mogu predstavljati i dodatnu komponentu (modifikator) u ugljeničnoj pasti.

2.3.1.4. Priprema

Ugljenična pasta se jednostavno priprema mešanjem i homogenizacijom ugljeničnog praha i vezivne tečnosti u avanu sa tučkom. U većini slučajeva dovoljno je koristiti klasičan porcelanski avan, iako postoji sumnja da može doći do kontaminacije paste česticama porcelana. Međutim, smatra se da je važniji način homogenizacije ugljenične paste od same opreme koja se koristi za njenu pripremu [85, 89].

Homogenizacija se vrši na taj način što se prvo komponente ugljenične paste pažljivo pomešaju u avanu, a zatim intenzivno mute uz pomoć tučka. Nakon nekoliko minuta, naizgled kompaktna pasta se sastruže špatulom sa zidova avana i homogenizacija se odmah intenzivno nastavlja. Ovaj postupak treba ponoviti nekoliko puta kako bi homogenizacija ugljenične paste bila

što uspješnija [89]. Manuelna priprema ugljениčne paste svakako zahteva određenu veštinu i iskustvo eksperimentatora kako bi se dobile CPE reproduktivnih karakteristika.

Na ovaj način pripremljenom ugljениčnom pastom se zatim puni elektrodno telo i to u malim porcijama. Postoje različite konstrukcije elektrodnih tela, koja su obično dizajnirana od strane samih eksperimentatora. Mogu se koristiti plastične ili staklene cevčice (npr. plastični nastavak za mikropipetu sa postavljenom odgovarajućom žicom kao električnim kontaktom) čija je prednost jednostavnost i varijabilnost u veličini, ali je obnova površine elektrode i potpuna zamena ugljениčne paste otežana. Stoga su izumljeni teflonska elektrodna tela sa zavrtnjem, kod kojih se lako može istisnuti odgovarajuća količina ugljениčne paste i na taj način vrlo jednostavno obnoviti površina elektrode [84]. Takođe, u današnje vreme postoji mogućnost nanošenja ugljениčne paste na specijalnom tipu papira kao podlozi [92].

Nije preporučljivo da se sveže pripremljena CPE odmah primeni za merenja zbog nereproduktivnog ponašanja. Poželjno je da pripremljena CPE odstoji određen period (12 do 24 h) kako bi se homogenizacija finalizovala [89].

Prilikom pripreme CPE, pored odabira ugljениčnog praha i vezivnog sredstva, veoma je bitan odnos ove dve komponente u ugljениčnoj pasti. Ovaj odnos obično varira u intervalu grafitnog praha od 1,0 g : vezivne tečnosti od 0,4–1,0 mL [85], iako je prva ugljениčna pasta napravljena od 1,0 g ugljениčnog praha i 7,0 mL bromoforma [83].

Na osnovu svega navedenog, očigledno je da svaka ugljениčna pasta predstavlja jedinstveni i veoma specifični elektrodni materijal u pogledu svojih fizičko-hemijskih i elektro-hemijskih osobina.

2.3.1.5. Opšte karakteristike

Ugljениčna pasta, a samim tim i rezultujuća CPE, poseduju niz fizičko-hemijskih i elektro-hemijskih karakteristika, po kojima se izdvajaju od ostalih elektrodnih materijala. Opšte karakteristike su:

- Konzistencija – zavisi od odnosa ugljениčnog praha i vezivne tečnosti, kao i od osobina samih komponenata. Tipične smeše su materijali u obliku pasti čija se konzistencija može uporediti sa „puterom od kikirikija“. Ukoliko je ugljениčna pasta suviše „suva“ ili „vlažna“ otežano je manipulisanje i obnova površine elektrode sa ovako pripremljenom pastom je obično nereproduktivna [89];

- Mikrostruktura – ugljenična pasta može da se opiše kao čvrsta disperzija grafitnih čestica u tečnom vezivnom sredstvu. Tipičnu morfologiju površine CPE čine nasumično raspoređene ugljenične čestice povezane vezivnom tečnošću čiji molekuli formiraju tanak film nm-dimenzija koji prekriva skoro svaku čvrstu česticu u smeši. Međutim, treba imati u vidu, da površinska morfologija CPE zavisi od tipa ugljeničnog materijala koji se primenjuje za pripremu ugljenične paste [90];
- Omski otpor – ugljenična pasta, a samim tim i rezultujuća CPE, poseduje veoma nizak omski otpor, obično vrednost otpora iznosi ispod 10Ω [90, 93]. Ukoliko se uzme u obzir da je otpor elektrodnog tela zanemarljiv, visok otpor CPE može da ukaže na to da grafitni prah ili vezivna tečnost nisu odgovarajući i da ih treba zameniti nekim ekvivalentom, ili pak da ugljenična pasta nije dovoljno dobro homogenizovana i da punjenje elektrodnog tela pastom nije uspešno odrađeno [89];
- Efekat „starenja“ – uglavnom zavisi od isparljivosti vezivne tečnosti i načina čuvanja ugljenične paste. Ukoliko je vezivna tečnost npr. organski estar, takve CPE se mogu koristiti nekoliko nedelja, dok su ugljenične paste na bazi parafinskog ili silikonskog ulja stabilne i po više meseci, pa čak i nekoliko godina [84];
- Obnova površine elektrode – brza i jednostavna obnova površina elektrode je jedna od najvećih prednosti kako nemodifikovanih tako i modifikovanih CPE, u poređenju sa drugim čvrstim elektrodama [84];
- Ograničena primenljivost u rastvorima koji sadrže organske rastvarače – usled prisustva nepolarne vezivne supstance u ugljeničnoj pasti i njene mešljivosti sa organskim rastvaračima, primena CPE u takvoj sredini ili u vodenim rastvorima koji sadrže organske rastvarače je ograničena, jer može doći do rastvaranja (destrukcije) ugljenične paste [90];
- Potencijalski prozor – zavisi od kvaliteta i odnosa komponenata ugljenične paste, kao i od sredine (tipa pomoćnog elektrolita i pH vrednosti) u kojoj se merenja vrše. U kiseljoj sredini, opseg potencijala u kome se CPE može primeniti varira između -1,0 V i 1,5 V, u neutralnoj sredini između -1,3 V i 1,4 V, dok u baznoj sredini između -1,2 V i 1,2 V, ukoliko se potencijali izraze u odnosu na Ag/AgCl referentnu elektrodu. U određenim slučajevima ovi opsezi se mogu proširiti [89];

- Pozadinska (rezidualna) struja – zavisi od sastava ugljenične paste i od tipa merenja i obično iznosi ispod 1 μA kako za nemodifikovane, tako i za modifikovane CPE [84];
- Hidrofobni karakter ugljenične paste sa uticajem na kinetiku elektrodnih reakcija – lipofilnost elektrodnog materijala dovodi do usporene/umerene kinetike brojnih elektrodnih procesa, što za rezultat ima delimično ili totalno ireverzibilno ponašanje odgovarajućih redoks-sistema [90]. Nepoželjna ireverzibilnost može biti otklonjena površinskom hidrofilizacijom CPE što se postiže primenom intenzivne elektrolize ili hemijskim tretmanom, erozijom uz pomoć surfaktanata *in situ*, ili upotrebom određenih modifikatora [84];
- Interakcije na površini i u unutrašnjosti CPE – podrazumevaju elektrolitičke redoks transformacije, kao i adsorpciju na površini CPE, zatim ekstrakciju/prodiranje u unutrašnjost CPE, jonsku izmenu i formiranje jonskih parova, elektrokatalizu, itd [90].

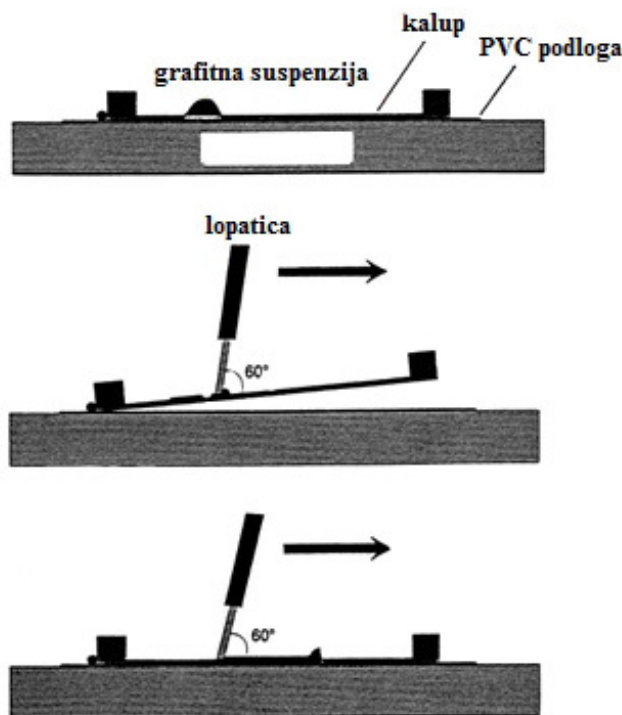
2.3.2. Štampane ugljenične elektrode

2.3.2.1. Postupak štampanja elektroda

„*Screen printing*” tehnologija se široko primenjuje za masovnu proizvodnju elektrohemijskih senzora za jednokratnu upotrebu. Proces proizvodnje štampanih elektroda je brz i jednostavan. Osnovni korak jeste nanošenje odgovarajućeg mastila na ravnu podlogu (mastilo se utiskuje na podlogu kroz kalup prevlačenjem lopatice pod pritiskom), što je praćeno sušenjem pri određenoj temperaturi [94-96]. Na slici 7 je prikazan postupak štampanja SPCE [61].

Temperatura sušenja ima uticaja na fizičke i elektrohemijske karakteristike ugljeničnog materijala koji je sastavna komponenta mastila. Na temperaturi od 80°C formiraju se aktivne grafitne ivice, dok na temperaturama višim od 120°C se formiraju pukotine (šupljine) u ugljeničnoj pasti što dovodi do veće efektivne površine i poboljšanja performansi rezultujuće SPCE [97].

Supstrati (podloge) koje se najčešće primenjuju prilikom štampanja elektroda su napravljeni od keramike ili plastike. Keramičke podloge mogu podneti više temperature sušenja mastila od onih baziranih na plastičnim materijalima [98]. Prednost plastičnih podloga je niža cena i bolje prijanjanje ugljeničnog mastila za podlogu [95].



Slika 7. Postupak štampanja elektroda [61].

Tipična debljina elektrodnog sloja je u opsegu od nekoliko μm do $100 \mu\text{m}$, pa se zbog toga senzori proizvedeni „*screen printing*” tehnologijom nazivaju elektrodama sa debelim filmom (tzv. thick-film electrodes). Debljina filma se lako može kontrolisati debljinom kalupa [88, 95].

„*Screen printing*” proces ima brojne prednosti u odnosu na ostale metode proizvodnje elektroda [88, 99, 100]:

- Cela elektrohemijska ćelija može biti inkorporirana na jednoj senzorskoj traci (radna elektroda, referentna elektroda, pomoćna elektroda, sloj za prepoznavanje, izolacioni sloj mogu biti štampani na istoj podlozi);
- Omogućava masovnu proizvodnju senzora za jednokratnu upotrebu;
- Elektrodna površina, debljina i sastav se lako mogu kontrolisati;
- Statistička validacija rezultata eksperimenata je omogućena postojanjem više elektroda istog tipa;
- Katalizatori se mogu jednostavno inkorporirati njihovim dodavanjem u mastilo (pastu).

Osnovni nedostatak „*screen printing*” procesa je ograničenost na primenu ravnih substrata.

2.3.2.2. Ugljениčna mastila

Osnovna komponenta SPCE jeste ugljениčno mastilo. Komercijalno dostupna ugljениčna mastila se uglavnom sastoje od grafitnih čestica, polimernog vezivnog sredstva (vinil ili epoksi-polimera) i rastvarača. Grafitne čestice su elektrohemijski aktivna komponenta ugljениčnog mastila, polimerno vezivno sredstvo ima ulogu da poveća afinitet mastila ka podlozi, odnosno da poboljša adhezijska svojstva i mehaničku čvrstoću, dok je uloga rastvarača da poveća viskoznost mastila za proces štampanja [98]. Skoro sve vrste ugljenika se mogu primeniti za štampanje, ali se grafit, čađ i aktivni ugalj najviše primenjuju. Takođe, u žiži interesovanja su svakako i drugi oblici ugljenika, kao što su ugljениčne nanocevi, ugljениčna nanovlakna i grafen. S obzirom da finalni produkt štampanja može neizbežno biti kontaminiran nekim komponentama rastvarača, osnovno pravilo je da mastilo sadrži elektrohemijski neaktivan rastvarač u širokom opsegu elektrodnog potencijala. Takođe, rastvarač ne sme da sadrži neisparljive nečistoće i poželjno je da bude netoksičan [100].

Informaciju o tačnom sastavu ugljениčnog mastila poseduju jedino njihovi proizvođači. Male razlike u sastavu mastila (npr. razlike u tipu i veličini grafitnih čestica), kao i različiti uslovi u toku samog procesa štampanja elektroda (pritisak, temperatura), mogu znatno uticati na elektrohemijsko ponašanje i analitičke performanse rezultujućih ugljениčnih senzora [61, 94, 99]. Osetljivost i selektivnost štampane elektrode, a samim tim i tip analize, zavise od sastava mastila [101]. Neki od naziva komercijalno dostupnih ugljениčnih mastila su Acheson (SAD), Gwent (UK), Dupont (SAD) i Ercon (SAD) [94].

2.3.2.3. Dizajn

„*Screen printing*” tehnologija pruža mogućnost masovne proizvodnje štampanih elektroda različitog oblika i veličina. Obično se proizvode u obliku malih traka koje imaju dimenzije u opsegu od 30 do 61 mm u dužinu, do 15 mm u širinu i do 1 mm u visinu. Već je pomenuto da na jednoj traci pored radne elektrode, mogu biti inkorporirane i referentna i pomoćna elektroda. Raspored elektroda i oblik mogu da variraju u zavisnosti od postupka štampanja. Radna elektroda najčešće ima pravougaoni ili kružni oblik. Štampane elektrode su komercijalno dostupne preko kompanija kao što su npr. Pine Instrument Company (SAD), Dropsens (Španija), BVT Technologies (Češka), Zensor R&D (Tajvan), itd. Takođe, mnoge istraživačke laboratorije poseduju mogućnost za sopstvenu proizvodnju štampanih elektroda [102].

U današnje vreme pored klasičnih štampanih elektroda, trend predstavlja štampanje mikroelektroda i elektrodnih nizova što pruža mogućnost vršenje više različitih analiza istovremeno. Poseban izazov predstavlja štampanje elektroda na neravnim podlogama, s obzirom da je „*screen printing*” tehnologija ograničena na primenu ravnih substrata [103]. Jedan ovakav primer predstavlja štampanje ugljeničnih elektroda na tekstu [104].

2.3.2.4. Osnovne karakteristike, prednosti i nedostaci

Prednost SPCE je njihova heterogena priroda, po čemu su slične sa CPE, ali poseduju i karakteristike čvrstih elektroda [105].

SPCE se smatraju elektrodama za jednokratnu upotrebu, što je prihvatljivo s obzirom na njihovu masovnu proizvodnju po niskoj ceni. Imajući u vidu njihove male dimenzije, štampane elektrode su prenosivi senzori, pa se mogu lako primeniti i na terenu [102]. Takođe, veoma su pogodne za *in situ* analize zbog niza osobina kao što su brz odziv, visoka osetljivost, sposobnost rada na sobnoj temperaturi, itd [103]. Iako su dizajnirane prvenstveno za jednokratnu upotrebu, SPCE se mogu pod određenim uslovima koristiti više puta, pri čemu je reproduktivnost merenja zadovoljavajuća [102].

Količina uzorka potrebnog za analizu je veoma mala i u zavisnosti od konfiguracije i dizajna SPCE može biti reda veličine kapi [88].

Širok potencijalski prozor i niska pozadinska struja su takođe bitne karakteristike SPCE. Pozadinska struja je obično nešto viša u odnosu na CPE. Ova struja je posledica nekoliko efekata, kao što je adsorbovani i rastvoreni kiseonik u mastilu ili prisustvo kiseoničnih grupa na površini ugljeničnih čestica. Specijalni pretretmani, npr. primena vakuuma ili negativna polarizacija („prekatodizacija”), mogu smanjiti ali ne i eliminisati ove efekte [88].

Neelektroaktivne komponente (nečistoće) u mastilu, uključujući polimerno vezivno sredstvo, blokiraju elektrohemijski aktivne grafitne čestice što dovodi do usporavanja kinetike transfera elektrona heterogenih reakcija i utiču na reverzibilnost elektrohemijskih reakcija koje se odigravaju na SPCE. Obično su ove reakcije kvazi-reverzibilne ili ireverzibilne [103, 106].

Elektrohemijske osobine štampanih elektroda se mogu poboljšati modifikovanjem elektrode ili određenim pretretmanima površine elektrode. Neki od ovih pretretmana podrazumevaju elektrohemijski tretman („preanodizaciju”), zatim hemijski tretman pre elektrohemijskog, izlaganje UV svetlosti ili tretman pod dejstvom kiseonične plazme. Svi oni imaju

za cilj povećanje gustine kiseoničnih grupa na površini elektrode ili povećanje izloženosti elektroaktivnih grafitnih čestica [106].

Ukoliko su organski rastvarači prisutni u osnovnom elektrolitu ili u mobilnoj fazi (u slučaju protočnih sistema), primena SPCE je ograničena, što predstavlja njen glavni nedostatak. Organski rastvarači mogu uticati na rastvaranje komponenata mastila što za posledicu ima smanjenje osetljivosti same metode [102].

2.3.3. Modifikacija heterogenih ugljeničnih elektroda

Velika prednost heterogenih ugljeničnih elektroda jeste mogućnost njihove jednostavne modifikacije usled kompozitne prirode elektrodnog materijala. Neki od glavnih ciljeva zbog kojih se elektrode modifikuju su [88]:

- Smanjenje granice detekcije (GD) akumuliranjem analita na površini elektrode;
- Generisanje ili povećanje elektrohemijskih signala i/ili smanjenje nadnapona primenom medijatora/elektrokatalizatora;
- Pomeranje i razdvajanje signala koji se preklapaju;
- Poboljšanje opštih analitičkih uslova.

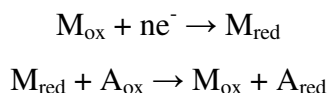
CPE i SPCE se mogu modifikovati na različite načine, npr. hemisorpcijom, formiranjem kovalentne veze između specifičnih funkcionalnih grupa na površini elektrode i reagensa, prevlačenjem elektrode polimernim filmom (uključujući elektropolimerizaciju monomera) i formiranjem heterogenih slojeva (npr. mešanjem modifikatora sa ugljeničnom pastom ili ugljeničnim mastilom). Metoda direktnog dodavanja modifikatora u ugljeničnu pastu ili ugljenično mastilo (tzv. zapreminska modifikacija) je najjednostavnija i najčešće primenjivana metoda modifikacije, i predstavlja razlog zbog koga su ovi senzori stekli veliku popularnost u elektrohemijskim istraživanjima [88, 107]. Obično sadržaj medijatora/elektrokatalizatora u ugljeničnoj pasti iznosi u intervalu od 1 do 5% [84].

Najčešće primenjivani modifikatori CPE i/ili SPCE su metali, oksidi metala, kompleksi metala, jonski izmenjivači, surfaktanti, sorbenti, jonske tečnosti, a u današnje vreme posebno se izdvajaju nanomaterijali. Svi oni na određeni način intereaguju sa analitom. Pa tako oksidi i kompleksi metala se ponašaju kao elektrokatalizatori (medijatori) usled mogućnosti promene njihovog valentnog stanja, jonski izmenjivači olakšavaju akumuliranje jona, surfaktanti

poboljšavaju površinske karakteristike elektrode, sorbenti omogućavaju (ad)sorpciju jona zasnovanu na jonskoj izmeni ili veličini čestica, nanomaterijali se ponašaju kao katalizatori i povećavaju aktivnu površinu elektrode, itd [91].

Heterogene ugljениčne elektrode su se pokazale pogodnim supstratima za izdvajanje metalnih filmova kao što su film od žive [108], bizmuta [109], antimona [110], zlata [111]. Prednost u odnosu na čvrste elektrode su te što CPE i SPCE ne moraju da se poliraju pre izdvajanja filma. Osim toga, elektrode već mogu da sadrže prekursor za izdvajanje filma koji je dodat elektrodnom materijalu u toku same pripreme elektroda, pa stoga nije neophodno dodavati soli metala u analizirani rastvor. Nedostatak je što prisustvo izolatora (vezivnog sredstva) na površini CPE i SPCE može da dovede do komplikacija prilikom formiranja filma [88].

Primena modifikatora koji se ponašaju kao medijatori je takođe vrlo česta, ukoliko je željena reakcija na nemodifikovanoj elektrodi okarakterisana sporom kinetikom transfera elektrona i samim tim se odigrava zadovoljavajućom brzinom tek na znatno višim potencijalima od njenog termodinamičkog redoks potencijala. Uloga medijatora je da olakša transfer naelektrisanja između analita i elektrode. U većini slučajeva reakcija (za proces redukcije) može biti opisana na sledeći način:



pri čemu M predstavlja medijator i A je analit. Stoga se transfer elektrona odigrava između elektrode i medijatora, a ne direktno između elektrode i analita. Aktivana forma katalizatora se elektrohemijski regeneriše, a kao rezultat ovog procesa dolazi do smanjenja nadnapona željene reakcije i porasta strujnog signala [61].

Neki od primera modifikatora ugljениčnih elektroda, koji se ponašaju kao katalizatori/medijatori su:

- jednostavni oksidi metala koji su osetljivi na kiseline i baze – MnO_2 , Fe_3O_4 , FeO , SnO_2 , CuO , Fe_2O_3 [58, 107, 112-118];
- oksidi koji pripadaju grupi platine i čija je cena viša ali je potrošnja mala – PtO_2 , PdO , OsO_2 , IrO_2 , RuO_2 , RhO_2 [118-121];
- kompleksi – Prusko Plavo i kompleksi bakra, nikla, gvožđa i hroma [13, 122-126];
- nanomaterijali, prvenstveno ugljениčne nanocevi i nanokompozitni materijali [13].

Pored hemijski modifikovanih, postoje i biohemijski modifikovane CPE i SPCE tzv. biosenzori (opširnije o biosenzorima u poglavlju 2.4.). Kod ovog tipa elektroda, modifikatori su materijali biološkog porekla, najčešće enzimi ili tkiva koja sadrže enzime.

2.3.4. Primena heterogenih ugljeničnih elektroda

Heterogene ugljenične elektrode se široko primenjuju kao elektrohemijske radne elektrode ili u kombinaciji sa hemijskim i biohemijskim elementom za prepoznavanje kao senzori i biosenzori u toku poslednjih nekoliko decenija. One predstavljaju idealan izbor kako za istraživanja tako i za komercijalnu primenu, pre svega zbog svoje niske cene, jednostavne pripreme i modifikacije, lake obnove elektrodne površine i reproduktivnosti u slučaju CPE i masovne proizvodnje u slučaju SPCE [88, 107].

CPE i SPCE, u nemodifikovanom i češće u modifikovanom obliku, se mogu primeniti za određivanje [84, 88, 127]:

- Neorganskih jona, kompleksa i molekula;
- Organskih supstanci i polutanata životne sredine;
- Farmaceutskih formulacija i narkotika;
- Biološki značajnih jedinjenja.

Tipovi uzoraka za određivanje neorganskih i organskih analita mogu biti različiti, i obično su to uzorci iz životne sredine, industrijski proizvodi, životne namirnice, kao i biološki uzorci. Među njima kao najčešće analizirani uzorak se izdvaja voda (rečna, morska, podzemna voda, otpadne vode, voda za piće...), zatim kao primeri uzoraka se mogu navesti i zemljište, sedimenti, farmaceutski i kozmetički proizvodi, alkoholna i bezalkoholna pića, namirnice životinjskog i biljnog porekla, krv, serum, urin, itd [84, 88, 127].

2.4. Biosenzori

Monitoring i zaštita životne sredine, industrija hrane, kliničke analize su samo neke od oblasti u kojima su biosenzori našli svoju primenu u današnje vreme. U ovom poglavlju data je definicija biosenzora, njihova klasifikacija i opšte karakteristike, pri čemu su posebno opisani glukozni biosenzori s obzirom da su oni najviše primenjivani i najzastupljeniji na tržištu.

2.4.1. Opšti pojmovi

Biosenzor je hemijski senzor kod koga se prepoznavanje ciljnog analita zasniva na biohemijskom mehanizmu. Elektrohemijski biosenzor se može definisati kao integrisani uređaj koji omogućava dobijanje specifičnih kvantitativnih ili semi-kvantitativnih analitičkih informacija koristeći biološki element za prepoznavanje (biohemijski receptor) koji se nalazi u direktnom kontaktu sa elektrohemijskim pretvaračkim elementom – transduktorom [128].

Na osnovu opšte definicije može se zaključiti da su dva osnovna elementa biosenzora [129-131]:

- Bioreceptor – imobilizovani biološki element koji ima ulogu da prepozna ciljni analit, odnosno da specifično intereaguje sa njim;
- Transduktor – konvertuje biohemijski signal, koji je nastao kao rezultat interakcije analita i bioreceptora, u električni signal. Intenzitet generisanog signala je direktno ili obrnuto proporcionalan koncentraciji analita.

Kao bioreceptor mogu se primeniti enzimi, antitela, nukleinske kiseline, receptori, ćelije ili tkiva. Pretvarački sistem može biti elektrohemijski, optički, piezoelektrični, termometrijski, magnetni, akustični. Stoga se klasifikacija biosenzora obično vrši ili na osnovu prirode biokomponente ili tipa pretvaračkog elementa [72, 129, 132-134].

Većina bioloških molekula poput enzima, receptora, ćelija, antitela, itd. ima veoma kratak vek trajanja u rastvoru. Kako bi rad biosenzora bio pouzdan, biološka komponenta mora biti imobilizovana na odgovarajući način, odnosno mora se prevesti u nerastvornu formu inkorporiranjem u inertni materijal ili sa druge strane hemijskim ili fizičkim vezivanjem za površinu transduktora. Aktivnost imobilizovanih molekula zavisi od veličine površine, poroznosti, hidrofилnog karaktera matriksa za imobilizaciju, reakcionih uslova, kao i od same metode imobilizacije. Neke od najčešće primenjivanih metoda imobilizacije biomolekula su fizička ili hemijska adsorpcija, unakrsno vezivanje, mikroenkapsulacija pomoću semipermeabilne membrane, imobilizacija pomoću gela i kovalentno vezivanje [129, 131, 133].

Biosenzori se mogu primeniti za različite tipove uzoraka uključujući telesne tečnosti, hranu, ćelijske kulture, kao i za analizu uzoraka iz životne sredine [135].

Nije iznenađujuća činjenica da se heterogeni ugljeni materijali široko primenjuju prilikom dizajniranja biosenzora. Kompozitna priroda materijala (paste ili mastila) čini ih veoma

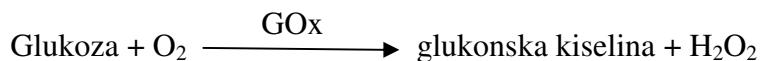
pogodnim za modifikaciju, čak i u slučaju kada se kao modifikatori koriste kompleksni biološki sistemi kakvi su enzimi, proteini, nukleinske kiseline, tkiva, itd. SPCE su u današnje vreme jedini relevantni komercijalni elektrohemijski biosenzori. CPE se često koriste za istraživanje i/ili optimizaciju dizajna i eksperimentalnih parametara, dok se SPCE senzori uglavnom primenjuju u komercijalne i naučne svrhe [88].

2.4.2. Glukozni biosenzori

Određivanje glukoze je neophodno usled njenog kliničkog i industrijskog značaja. Brzo određivanje šećera u krvi je veoma važno za lečenje i kontrolu dijabetesa. Sa druge strane, glukozni biosenzori se primenjuju za praćenje bioprocasa, kao i za analizu hrane i pića. Stoga su mnogi naponi uloženi za razvijanje glukoznih biosenzora koji omogućavaju brzo i pouzdano dobijanje informacija o sadržaju glukoze u odabranim uzorcima [136, 137].

Uopšteno, merenje glukoze se zasniva na primeni jednog od tri enzima: heksokinaze, glukoza oksidaze (GOx) ili glukoza-1-dehidrogenaze. GOx se najčešće primenjuje prilikom dizajniranja biosenzora jer je lako dostupna, jeftina, i može da izdrži veće ekstreme pH, jonske jačine i temperature u poređenju sa mnogim drugim enzimima, što zahteva manje striktno uslove proizvodnje i skladištenja [138].

Prvi glukozni biosenzor je predstavljen od strane Klarka i Lionsa 1962. godine [139], koji su imobilizovali enzim GOx na površinu amperometrijske kiseonične elektrode pomoću semipermeabilne membrane za dijalizu u cilju određivanja koncentracije glukoze u uzorku. Merenje se zasnivalo na praćenju potrošnje kiseonika u reakciji katalizovanoj enzimom [136]:



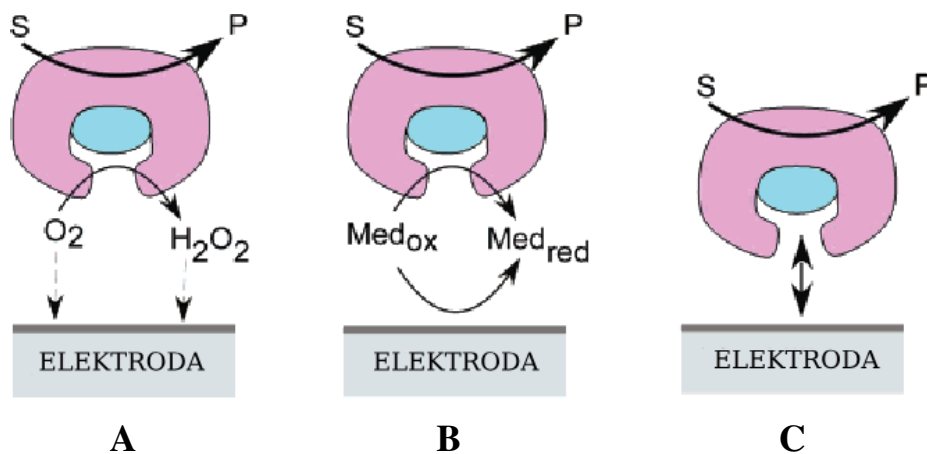
Na osnovu prikazane reakcije, može se uočiti da kao proizvod reakcije pored glukonske kiseline nastaje i elektroaktivni proizvod – H₂O₂ u ekvimolarnom odnosu prema glukozi. Stoga se glukoza može odrediti indirektno i preko praćenja koncentracije nastalog H₂O₂ [136, 140].

Postoji nekoliko „generacija“ glukoznih biosenzora (slika 8) [136, 138, 141, 142]:

- „Prva generacija“ – zasniva se na primeni prirodnog kiseoničnog substrata i na detekciji nastalog H₂O₂ u enzimatskoj reakciji. Merenje H₂O₂ je jednostavno, što svakako predstavlja prednost ovog tipa biosenzora, pogotovu ako se u obzir uzmu minijaturizovani uređaji. Amperometrijsko (anodno) određivanje H₂O₂ primenom klasičnih/nemodifikovanih

elektroda zahteva relativno visoki radni potencijal pri kome su supstance poput askorbinske i mokraćne kiseline, kao i nekih lekova (npr. acetaminofen) takođe elektroaktivne. Interferencije koje potiču od ovih supstanci i drugih konstituenata bioloških tečnosti mogu znatno uticati na selektivnost, a time i na tačnost merenja, što predstavlja glavni nedostatak „prve generacije“ glukoznih biosenzora. Još jedan nedostatak je ograničena rastvorljivost kiseonika u biološkim tečnostima što dovodi do tzv. kiseoničnog deficita i promene u odzivu senzora.

- „Druga generacija“ – podrazumeva zamenu kiseonika nefiziološkim (sintetičkim) elektron akceptorima koji se nazivaju redoks medijatori i koji imaju sposobnost da prenose elektrone od redoks centra enzima do površine radne elektrode. Redukovani medijator je formiran umesto H_2O_2 . Zatim se medijator reoksiduje na elektrodi, pri čemu dolazi do pojave amperometrijskog signala proporcionalnog koncentraciji glukoze i regeneracije oksidovane forme medijatora.
- „Treća generacija“ – zasniva se na direktnom transferu elektrona između aktivnog centra enzima i elektrode. Odsustvo medijatora je njihova glavna prednost, a zahvaljujući niskim vrednostima radnih potencijala selektivnost ove grupe biosenzora je visoka.



Slika 8. Tri generacije amperometrijskih enzimatskih elektroda za glukozu bazirane na primeni prirodnog kiseoničnog kofaktora (A), veštačkog redoks medijatora (B) ili direktnom transferu elektrona između GOx i elektrode (C) [136].

Glukozni biosenzori bazirani na enzimu GOx predstavljaju idealne modele za fabrikaciju raznovrsnih biosenzorskih uređaja. Međutim, i dalje postoje brojni izazovi, među kojima su primena

novih materijala, razvoj minijaturizovanih implantabilnih amperometrijskih biosenzora, proučavanje povezanosti katalitičke funkcije enzima sa njegovom konformacijom, itd [143].

2.5. Ugljenične nanocevi

Imajući u vidu značaj nanomaterijala kao sastavnih komponenata voltametrijskih/amperometrijskih senzora i biosenzora, u ovom poglavlju su opisane ugljenične nanocevi, njihovo otkriće, struktura, tipovi, osobine, primena i modifikacija.

2.5.1. Istorijat ugljeničnih nanocevi

Od trenutka njihovog otkrića, ugljenične nanocevi su privukle pažnju mnogih naučnika u oblasti fizike, hemije i nauke o materijalima zbog svoje jedinstvene strukture, mehaničkih i električnih osobina. Godinom detaljnog opisa ugljeničnih nanocevi se smatra 1991. godina, kada je Sumio Iijima predstavio rezultate dobijene transmissionom elektronskom mikroskopijom (slika 9) na osnovu kojih je eksperimentalno potvrđeno postojanje izduženih mikrocevi organizovanih u vidu koncentričnih slojeva i sačinjenih od ugljenikovih atoma, za koje se do tada uglavnom smatralo da su ugljenična vlakna [144, 145]. Ove strukture su kasnije dobile naziv višezidne ugljenične nanocevi (multiwalled carbon nanotubes, MWCNT). Dve godine nakon otkrića MWCNT, Iijima i Bethune sa svojim saradnicima su istovremeno i nezavisno jedan od drugog opisali jednozidne ugljenične nanocevi (singlewalled carbon nanotubes, SWCNT) [146, 147]. Ovo otkriće je naročito bilo od velikog značaja jer su SWCNT predstavljale osnovu za mnoge teorijske studije i pretpostavke koje su prethodile njihovom eksperimentalnom proučavanju [148].

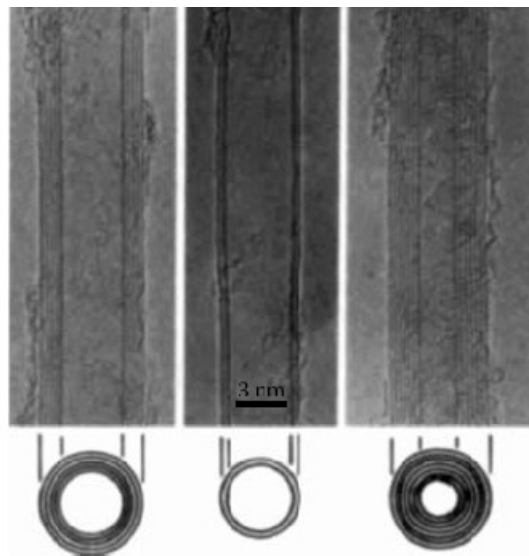
Iako se otkriće ugljeničnih nanocevi zvanično prepisuje Iijimi, pretpostavlja se da su one bile otkrivene tridesetak godina ranije kada je Bacon proučavao osobine ugljeničnih vlakana. On je ispitivao topljenje grafita pri visokim temperaturama i pritiscima i verovatno pronašao ugljenične nanocevi u svojim uzorcima [149].

2.5.2. Struktura i tipovi

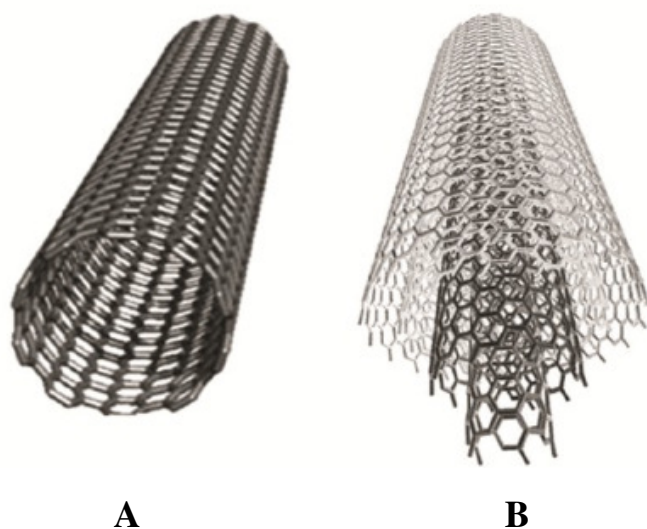
Struktura ugljeničnih nanocevi je ranije bila proučavana primenom transmisione elektronske mikroskopije i skenirajuće tunelirajuće mikroskopije, čime je direktno potvrđeno da su nanocevi cilindrične strukture dobijene uvijanjem grafenskih ploča. Grafenska ploča predstavlja sloj sp^2

hibridizovanih ugljenikovitih atoma povezanih tako da grade dvodimenzionalnu heksagonalnu rešetku koja ima oblik saća [148, 150].

U zavisnosti od broja koncentrično uvijenih grafenskih ploča, ugljenične nanocevi se mogu klasifikovati na SWCNT i MWCNT kao što je prikazano na slici 10. Dvozdne ugljenične nanocevi (doublewalled carbon nanotubes, DWCNT) se smatraju specijalnim tipom MWCNT gde su dve grafenske ploče koncentrično uvijene [150].

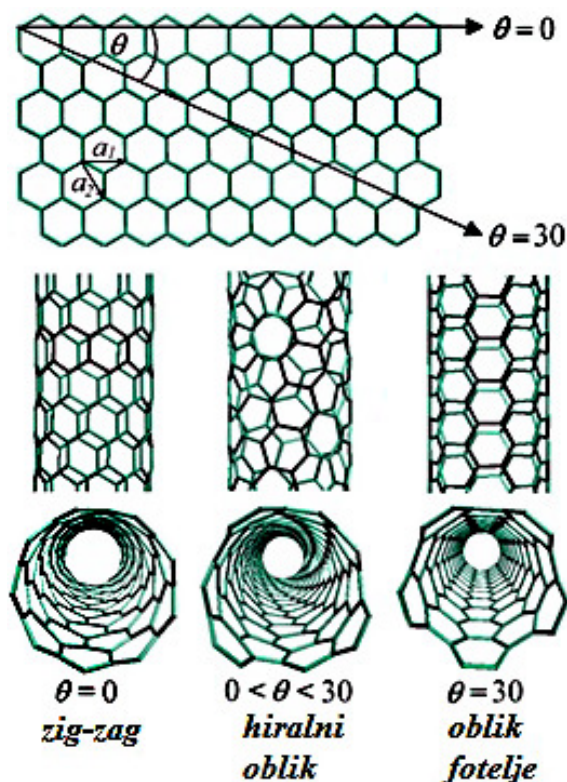


Slika 9. Transmisioni elektronski mikrograf MWCNT [144].



Slika 10. Prikaz strukture jednozidnih (A) i višezidnih (B) ugljeničnih nanocevi [151].

Način uvijanja grafenske ploče određuje osobine ugljeničnih nanocevi, i na osnovu ovog kriterijuma SWCNT se mogu javiti u tri različita oblika: „zig-zag“, fotelja („armchair“) i hiralni oblik (slika 11) [148-150]. Struktura MWCNT se može opisati pomoću dva modela. Kod modela „ruske lutke“ ploče grafena su raspoređene tako da čine koncentrične krugove odnosno ugljenična nanocev većeg prečnika sadrži u unutrašnjosti ugljenične nanocevi manjeg prečnika. Ukoliko je jedna ploča grafena umotana oko same sebe mnogo puta nalik umotanom papiru, reč je o modelu „pergament“ [150, 152].



Slika 11. Tipovi jednozidnih ugljeničnih nanocevi [153].

U zavisnosti od broja slojeva, unutrašnji prečnik MWCNT iznosi od 0,4 nm do nekoliko nanometara, dok spoljašnji prečnik obično varira u intervalu od 2 nm do 20–30 nm, dok im dužina iznosi od 1 μm do nekoliko cm. Na oba kraja MWCNT nalaze se polovine molekula fullerena (tzv. pentagonalni defekti), čija je uloga da omoguće zatvaranje cevi na dva kraja. Rastojanje između susednih slojeva kod MWCNT iznosi od 0,34 do 0,39 nm. Sa druge strane, prečnik SWCNT iznosi od 0,4 nm do 2–3 nm, a njihova dužina je obično u mikrometerskoj oblasti [152]. Međutim,

materijali koji se koriste u elektrohemiji generalno se sastoje od snopova nanocevi različitih dimenzija [82].

Postoje tri osnovne metode za sintezu ugljeničnih nanocevi: metoda lučnog pražnjenja, metoda laserskog isparavanja i metoda hemijske depozicije iz parne faze [154]. Nakon sinteze, sledi proces prečišćavanja ugljeničnih nanocevi što podrazumeva odvajanje nanocevi od nečistoća prisutnih u sirovom proizvodu ili od nanocevi sa neželjenim brojem zidova (slojeva). Metode prečišćavanja ugljeničnih nanocevi mogu biti hemijske (oksidacija), fizičke (centrifugiranje, filtracija, elektroforeza...) ili se može primeniti njihova kombinacija [155].

2.5.3. Osnovne osobine

Zahvaljujući svojoj strukturi, ugljenične nanocevi poseduju jedinstvene električne, termičke i mehaničke osobine.

Nanodimenzije ugljeničnih nanocevi, zajedno sa jedinstvenom elektronskom strukturom grafenske ploče, čine električne osobine ovih jednodimenzionih struktura krajnje neobičnim. Električna provodljivost je veoma bitna osobina za primenu nanocevi u elektrohemiji. MWCNT se ponašaju kao metalni provodnici, dok SWCNT mogu imati osobine metalnih provodnika ili poluprovodnika u zavisnosti od njihovog prečnika i hiralnosti odnosno od načina uvijanja grafenske ploče. Pa tako SWCNT koje se ponašaju kao metalni provodnici se nalaze u konfiguraciji „fotelje“, dok je za one koje imaju osobine poluprovodnika karakteristična „zig-zag“ i hiralna konfiguracija [156].

Svaki atom ugljenika u grafenskoj ploči je povezana jakom hemijskom vezom za susedna tri atoma ugljenika. Stoga, ugljenične nanocevi imaju jaku osnovnu ravan i samim tim visoku čvrstoću. Elastični modul SWCNT je mnogo veći od čelika, što ih čini visoko otpornim materijalima. Iako vršenje pritiska na vrh nanocevi izaziva njihovo savijanje, po prestanku dejstva sile nanocevi se vraćaju u prvobitno stanje. Ova osobina ih čini veoma pogodnim za primenu kao sonde odnosno senzorskog dela u skenirajućoj probnoj mikroskopiji (scanning probe microscopy) [150].

Termičke osobine ugljeničnih nanocevi nisu u velikoj meri ispitivane kao električne i mehaničke osobine, ali utvrđeno je da one pokazuju širok spektar ponašanja koja su posledica njihove jedinstvene strukture i male veličine. Termička provodljivost ugljeničnih nanocevi je visoka i može se uporediti sa grafitom i dijamantom koji imaju najvišu 3D termičku provodljivost [157].

Ugljenične nanocevi imaju adsorpciona svojstva, usled njihove porozne i šuplje strukture, velike specifične površine, male gustine, pa se primenjuju za uklanjanje različitih polutanata. Adsorpcija je moguća kako u unutrašnjosti, tako i na spoljašnjem zidu nanocevi. Adsorpcioni kapacitet ugljeničnih nanocevi zavisi od više faktora, među kojima su gustina adsorpcionih mesta, udeo otvorenih nanocevi, veličina površine, prisustvo funkcionalnih grupa na površini, čistoća, poroznost, itd [158].

2.5.4. Primena

Ugljenične nanocevi se mogu primeniti u mnogim oblastima zbog svojih jedinstvenih osobina. Našle su primenu u elektronici (komponente prilikom izrade električnih uređaja), zatim se mogu primeniti za skladištenje energije, kao punioci u polimernim i keramičkim kompozitima, sonde u mikroskopiji atomskih sila i skenirajućoj tunelirajućoj mikroskopiji, senzori, templati u sintezama nanostrukture, nosači katalizatora, itd [159].

U današnje vreme ugljenične nanocevi se proizvode u velikim količinama, što je omogućilo njihovu komercijalnu primenu. Pa tako dodatkom ugljeničnih nanocevi plastičnim materijalima u maloj količini, poboljšava se provodljivost i mehaničke osobine materijala, što je iskorišćeno u automobilske industriji, mikroelektronici (izrada tranzistora) i za izradu sportskih rekvizita. Takođe, mogu se primeniti kao dodatak prilikom izrade prevlaka za zaštitu od korozije i boja koje su alternativa hazardnim bojama koje sadrže biocidna sredstva. Zatim, našle su primenu kao komponente litijum jonskih baterija, superkondenzatora i filtera za prečišćavanje voda [160].

Usled pogodnih električnih osobina, ugljenične nanocevi imaju sposobnost da posreduju u reakciji prenosa elektrona sa elektroaktivnim specijama u rastvoru kada se primene kao elektrodni materijal. Stoga elektrode bazirane na ugljeničnim nanocevima su našle primenu u oblasti elektrohemijskih senzora. Kao elektrodni materijal, ugljenične nanocevi pokazuju bolje elektrohemijsko ponašanje u odnosu na tradicionalne ugljenične elektrode, uključujući dobru provodljivost i visoku hemijsku stabilnost [161]. Takođe, elektrohemijski biosenzori bazirani na ugljeničnim nanocevima su doveli do poboljšanja performansi amperometrijskih enzimatskih elektroda, imunosenzora i DNK-biosenzora. Njihova elektrokatalitička aktivnost prema H_2O_2 i NADH omogućila je amperometrijsko određivanje brojnih analita pri niskim radnim potencijalima [162].

2.5.5. Modifikacija metalima i oksidima metala

Kombinacija metala ili oksida metala sa ugljениčnim nanocevima dovodi do stvaranja novih kompozitnih materijala koji poseduju osobine svake komponente pojedinačno ili se čak javlja sinergistički efekat, što je svakako od velikog značaja za primenu u elektroanalizi [163].

U cilju poboljšanja osetljivosti i selektivnosti senzora, ugljениčne nanocevi se modifikuju česticama metala (npr. Pt, Pd, Au, Ag, Ru) [164-169] ili oksida metala (npr. MnO₂, TiO₂, CuO, ZnO) [163, 170-173], koje su obično nanodimenzija. Ovako dekorisane ugljениčne nanocevi se kao medijatori često inkorporiraju prilikom dizajna novih tipova elektroda za određivanje H₂O₂ ili drugih ciljnih analita.

Postoje različite metode depozicije nanočestica metala na ugljениčnim nanocevima i za svaku od njih je karakteristična veličina i raspored nanočestica duž nanocevi. Uopšteno, ove metode se mogu podeliti u dve grupe [164]:

- Elektrohemijske metode – veoma su brze i jednostavne. Variranjem potencijala i vremena depozicije, kao i odabirom pogodnog substrata, može se kontrolisati veličina i distribucija metalnih nanočestica.
- Fizičke i hemijske metode – omogućavaju proizvodnju modifikovanih ugljениčnih nanocevi u većim količinama. Kao primeri mogu se navesti: depozicija metala iz parne faze, adsorpcija soli metala na površinu ugljениčnih nanocevi a potom redukcija soli do metala pri visokim temperaturama u atmosferi H₂ ili Ar, zatim metode koje se zasnivaju na hidrofobnim interakcijama i vodoničnoj vezi, neelektrično taloženje (ne zahteva primenu potencijala, već hemijske vrste čiji je redoks potencijal niži od redoks potencijala metala se redukuju što predstavlja pokretačku silu za reakciju), itd.

Treba imati na umu da sintetizovane ugljениčne nanocevi ne poseduju veliki broj funkcionalnih grupa na svojoj površini i uglavnom se defekti na površini mogu smatrati mestima za koja se vezuju čestice metala. Stoga se primenjuju hemijski ili termički tretmani kako bi se broj funkcionalnih grupa povećao ili kako bi se njihova priroda promenila. Među različitim tehnikama koje se primenjuju za oksidaciju površine nanocevi, tretman sa HNO₃ je najčešći i njime se kiseonične grupe, kao što je npr. karboksilna grupa, uvode na površinske i unutrašnje zidove ugljениčnih nanocevi [174].

2.6. Elektroanalitičke metode određivanja H₂O₂ i glukoze

Elektroanalitičke metode za određivanje H₂O₂, kao i za indirektno određivanje glukoze praćenjem koncentracije H₂O₂, su veoma raznovrsne i brojne, i najčešće su to voltametrijske i amperometrijske metode. U ovom poglavlju su dati odabrani primeri elektroanalitičkih metoda za određivanje ovog ciljnog analita, uglavnom zasnovane na elektrodama/senzorima modifikovanim sa česticama na bazi MnO₂, Pt i Pd.

Taha i Wang su pripremili modifikovanu elektrodu uranjanjem staklastog ugljenika u rastvor 0,027 mol L⁻¹ MnCl₂/1,4 mol L⁻¹ NaOH i cikliranjem u opsegu potencijala između -0,5 i 0,4 V (u odnosu na Ag/AgCl). Primenom ove elektrode znatno se redukuje nadnapon potreban za oksidaciju raznih hidrazina i H₂O₂. Elektrokatalitička površina olakšava detekciju ovih jedinjenja u protočnom sistemu. Uticaj pH, brzine protoka, radnog potencijala, debljine filma, koncentracije i drugih parametara na katalitički odziv je ispitan. Elektroodziv je veoma stabilan. GD su bile u femto- i pikomolarnoj oblasti i postignuta je relativna standardna devijacija (RSD) manja od 1,3% [112].

Schachl i dr. su zapreminski modifikovali CPE sa MnO₂ i ispitali mogućnost njene primene za amperometrijsku detekciju H₂O₂ u protočnoj injekcionoj analizi (FIA). Pri radnom potencijalu od 0,46 V u odnosu na Ag/AgCl, u prisustvu H₂O₂ dolazi do stvaranja katalitičke oksidacione struje koja se može iskoristiti za kvantitativnu analizu. Faktori koji utiču na analitičke performanse elektrode, kao što su sastav paste i pH, su proučavani i za šaržnu voltametriju i za FIA. Amperometrijski signali su linearno proporcionalni koncentraciji H₂O₂ u opsegu 0,5–350 mg L⁻¹, dok je GD iznosila 45 μg L⁻¹[58].

Schachl i dr. su pripremili CPE modifikovanu MnO₂ filmom i primenili je kao amperometrijski senzor za određivanje H₂O₂ u amonijačnim vodenim rastvorima. Elektroda je pokazala stabilan odziv prema H₂O₂ nakon elektrohemijske aktivacije. Efekat brzine protoka, radnog potencijala, koncentracije, injekcione zapremine i interferencija je ispitan. Linearnost je postignuta u opsegu koncentracija H₂O₂ od 5 μg L⁻¹ to 450 mg L⁻¹, a GD je iznosila 4,7 μg L⁻¹. Metoda je primenjena za određivanje H₂O₂ u uzorcima kišnice [175].

Turkušić i dr. su ispitali mogućnost primene jednostavnog biosenzora, pripremljenog zapreminskom modifikacijom ugljeničnog mastila sa MnO₂ kao medijatorom i GOx kao biokomponentom, za amperometrijsku detekciju glukoze u hidrodinamičkom i FIA modu. Senzor se može primeniti pri potencijalu 0,48 V i fiziološkim uslovima (0,1 mol L⁻¹ fosfatni pufer, pH 7,5) i

poseduje izuzetnu reproduktivnost i stabilnost. Amperometrijski signal linearno raste sa koncentracijom D-glukoze u opsegu od 2 do 2500 mg L⁻¹ i postignuta je GD od 0,085 mg L⁻¹. Usled znatne stabilnosti, pripremljen biosenzor može da se koristi kontinualno više od četiri nedelje ili više od 1000 injektovanja uzorka. Nije primećena promena u visini signala u periodu od 12 h. Senzor je primenjen za FIA-amperometrijsko određivanje glukoze u pivu i vinu [113].

Schachl i dr. su razvili jednostavan glukozni biosenzor zapreminskom modifikacijom CPE sa MnO₂ kao medijatorom i GOx kao biokomponentom. Senzor je primenjen kao amperometrijski detektor u protočnom-injekcionom sistemu pri temperaturi od 21°C u 0,2 mol L⁻¹ fosfatnom puferu (pH 7,5). Pri radnom potencijalu od 0,48 V u odnosu na Ag/AgCl i brzini protoka od 0,2 mL min⁻¹, senzor poseduje dobru reproduktivnost amperometrijskog odziva prema glukozi. Linearnost je postignuta u opsegu koncentracija glukoze od 20 do 500 mg L⁻¹ sa GD od 10,5 mg L⁻¹ glukoze. Senzor se može kontinualno primeniti u toku 12 h bez ikakvog gubitka u visini signala i koristiti za određivanje glukoze u uzorcima belog vina [176].

Turkušić i dr. su ispitali mogućnost primene štampanog amperometrijskog biosenzora baziranog na duploj zapreminskoj modifikaciji ugljeničnog mastila sa MnO₂ kao medijatorom i GOx kao biokomponentom za određivanje vezane glukoze u različitim jedinjenjima poput celobioze, saharoze, (-)-4-nitrofenil-β-D-glukopiranozida, kao i u uzorcima piva u FIA modu. Biosenzor se može primeniti pri fiziološkim uslovima (0,1 mol L⁻¹ fosfatni pufer, pH 7,5) i poseduje dobru reproduktivnost i stabilnost. Vezana glukoza je oslobođena primenom glukozidaze u rastvor, i slobodna glukoza je u sva tri slučaja detektovana modifikovanom SPCE. Linearni opseg biosenzora pri brzini protoka 0,2 mL min⁻¹, injekcionoj zapremini 0,25 mL, radnom potencijalu 0,48 V u odnosu na Ag/AgCl je postignut u opsegu koncentracija od 11 do 13900 μmol L⁻¹ glukoze u slobodnoj formi. GD je iznosila 1 μmol L⁻¹ glukoze. RSD pri koncentraciji od 100 μmol L⁻¹ i računata za 5 injektovanja je iznosila oko 7%. Vezana glukoza može biti istom metodom određena u uzorcima piva pri čemu su dobijeni rezultati u saglasnosti sa referentnom metodom [114].

Schachl i dr. su razvili metodu za određivanje H₂O₂ u protočnom sistemu zasnovanu na primeni SPCE modifikovane MnO₂-filmom. Pri radnom potencijalu 0,48 V u odnosu na Ag/AgCl katalitička oksidacija analita je iskorišćena za amperometrijsko određivanje. Eksperimentalni parametri, kao što su pH rastvora nosača, radni potencijal, brzina protoka i injekciona zapremina su optimizovani. Amperometrijski signali su bili u linearnoj proporcionalnosti sa koncentracijom H₂O₂

u opsegu od 0,005 do 10 mg L⁻¹, dok je GD iznosila 2,3 µg L⁻¹. Metoda je primenjena za određivanje H₂O₂ u kišnici i za kvantifikaciju glukoze u ljudskoj plazmi [115].

Zheng i Guo su primenili potenciometrijski senzor napravljen od CPE doponovane sa MnO₂ za određivanje H₂O₂. Pri optimalnim uslovima, elektroda se ponaša u skladu sa Nernstovim izrazom u opsegu koncentracija H₂O₂ od 3,00·10⁻⁷ do 3,63·10⁻⁴ mol L⁻¹, sa nagibom 21–19,4 mV/pH₂O₂ i GD od 1,2·10⁻⁷ mol L⁻¹ H₂O₂. Pripremljeni senzor poseduje zadovoljavajuće analitičke karakteristike u pogledu osetljivosti, reproduktivnosti i jednostavnog postupka pripreme. Efekti obe komponente elektrode i drugi parametri koji utiču na potencijalski odziv senzora, kao i mogući mehanizam reakcije su opisani i diskutovani [177].

Xu i dr. su pripremili veoma osetljivi amperometrijski senzor na bazi vertikalno postavljenih MWCNT koje su modifikovane sa MnO₂ metodom elektrodepozicije. Ova elektroda je primenjena za određivanje koncentracije H₂O₂. Radi proučavanja elektrohemijskih osobina nanokompozitne elektrode, primenjene su ciklička voltametrija, hronoamperometrija i elektrohemijska impedansna spektroskopija. U boratnom puferu pH 7,8 postignuta je linearnost u opsegu koncentracija H₂O₂ od 1,2·10⁻⁶ mol L⁻¹ do 1,8·10⁻³ mol L⁻¹. GD je iznosila 8,0·10⁻⁷ mol L⁻¹. Interferencije koje potiču od većine neorganskih soli i nekih biomolekula kao što su sirćetna kiselina, mokraćna kiselina, D-(+)-glukoza, su zanemarljive. Pripremljena elektroda je primenjena za određivanje tragova H₂O₂ u mleku sa velikom tačnošću, demonstrirajući njen potencijal za praktičnu primenu [163].

Langley i dr. su modifikovali ugljenični prah sa MnO₂ metodom vlažne impregnacije. U ovom procesu se ugljenični prah zasiti sa mangan(II)-nitratom, a zatim se termički tretira na temperaturi od 773 K nakon čega dolazi do formiranja MnO₂ na površini ugljeničnog praha. Konstrukcija kompozitne elektrode na bazi MnO₂ modifikovanog ugljeničnog praha i epoksidne smole je takođe opisana, uključujući i optimizaciju udela modifikovanog ugljeničnog praha. Ove kompozitne elektrode su se pokazale pogodnim za elektrohemijsku detekciju H₂O₂, askorbinske kiseline i nitritnih jona pri čemu su postignute GD uporedive sa onima postignutim drugim analitičkim tehnikama. Dobijeni rezultati, jednostavan dizajn kompozitnih elektroda, kao i niska cena otvaraju mogućnost primene pri dizajniranju biosenzora [178].

Zhang i dr. su površinski modifikovali elektrodu od staklastog ugljenika (glassy carbon electrode, GCE) sa mikrosferama MnO₂ i Nafionom. Elektroda se pokazala pogodnom za određivanje H₂O₂ koje se zasniva na njegovoj elektrokatalitičkoj oksidaciji u fosfatnom puferu. Pri potencijalu od 0,8 V, amperometrijski odziv elektrode je bio brz, a osetljivost visoka. Pri

optimalnim uslovima, linearni opseg prilikom određivanja H_2O_2 je bio od $10,0 \cdot 10^{-6}$ do $15,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a GD je iznosila $2,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Osim toga, dugoročna stabilnost i dobra reproduktivnost čini ovu elektrodu pogodnom za dalju primenu [179].

Ye i dr. su dizajnirali neenzimatski senzor za H_2O_2 koristeći grafen, ugljenične nanocevi i hibrid MnO_2 kao senzorski materijal. Hibrid je sintetizovan hemijskom metodom. Dobijeni senzor poseduje izuzetno visoku elektrokatalitičku aktivnost prema oksidaciji H_2O_2 . Pri optimalnim uslovima, senzor se može primeniti za kvantifikaciju H_2O_2 sa postignutim širokim linearnim opsegom koncentracija od 1 do $1030 \mu\text{mol L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ i niskom GD čija vrednost iznosi $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Razvijena metoda je primenjena za određivanje H_2O_2 u mleku [170].

Han i dr. su sintetizovali nanokompozitnu strukturu koja se sastoji od nanočestica Ag izdvojenih na MnO_2 modifikovanim MWCNT i primenili je za fabrikaciju neenzimatskog H_2O_2 senzora. Morfologija i sastav nanokompozita je proučavana primenom transmisionog elektronskog mikroskopa, difrakcije X-zraka, energetsko-disperzivnog spektra X-zraka i Furijeove transformacije. U deaerisanom rastvoru pufera, senzor se može primeniti za određivanje H_2O_2 u opsegu koncentracija od $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ do $10,4 \text{ mmol L}^{-1}$ sa koeficijentom korelacije (r) 0,9993 i GD $1,7 \mu\text{mol L}^{-1}$. Nadalje, senzor poseduje dugoročnu stabilnost, dobru reproduktivnost i otpornost prema interferencijama [180].

Kotzian i dr. su razvili metodu koja se zasniva na modifikaciji ugljenične paste ili ugljeničnog mastila sa oksidima četiri različita platinska metala (PdO , OsO_2 , IrO_2 i PtO_2), radi proučavanja njihovih katalitičkih svojstva u toku oksidacije ili redukcije H_2O_2 , koji je proizvod biokatalitičkih reakcija u kojima učestvuju enzimi iz grupe oksidaza. U drugom koraku je enzim GOx imobilizovan pomoću filma Nafiona na površinu SPCE, u cilju određivanja glukoze primenom FIA. Od izabranih oksida metala, IrO_2 se pokazao najboljim, jer primena ovog oksida omogućava rad na niskim potencijalima (oko $-0,2 \text{ V}$) pri kojima su nepoželjni efekti usled prisustva askorbinske i mokraćne kiseline znatno eliminisani [121].

Tay i dr. su pripremili modifikovanu elektrodu elektrodpozicijom Pt čestica u filmu Nafiona koji je prekrivao GCE. Elektroda je primenjena za određivanje H_2O_2 u protočnom sistemu. Upoređene su elektrohemijske osobine Pt-Nafion-GCE sa elektrohemijskim osobinama tri različite elektrode: elektrode od Pt, GCE i GCE modifikovane samo sa platinom (Pt-GCE). Pokazalo se da je Pt-Nafion-GCE znatno stabilnija od Pt-GCE i da je Pt-Nafion-GCE pogodnija za određivanje H_2O_2 [181].

Wang i dr. su opisali pripremu CPEs modifikovanih sa Pt, Pd i Ru. Elektrode su pripremljene mešanjem organske vezivne tečnosti sa metalizovanim grafitnim prahom. Prikazana je mogućnost njihove primene da katalizuju spore elektrodne reakcije H_2O_2 ili organskih peroksida, askorbinske kiseline, hidrazina i dihidronikotinamin adenin dinukleotida. Pripremljene elektrode pokazuju različitu elektrokatalitičku aktivnost, pozadinsku struju, a samim tim i različite analitičke performanse [182].

Miao i dr. su pripremili senzor za H_2O_2 koristeći platinsku elektrodu modifikovanu sa MWCNTs/Pt nanohibridima. Pt nanočestice su generisane *in situ* u vodenom rastvoru kalijum hloroplatinata u prisustvu MWCNTs. Za karakterizaciju MWCNTs/Pt nanohibrida je primenjena transmisiona elektronska mikroskopija, dok su redoks osobine pripremljene elektrode proučavane putem elektrohemijskih merenja. Razvijena metoda omogućava određivanje H_2O_2 u opsegu koncentracija $0,01\text{--}2\text{ mmol L}^{-1}$ pri čemu GD ima vrednost $0,3\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Osetljivost elektrode prema H_2O_2 je iznosila $205,80\text{ }\mu\text{A mmol}^{-1}\text{ L cm}^{-2}$ pri radnom potencijalu od 0 mV . Takođe, pripremljena elektroda se može primenjivati više puta i pokazuje stabilnost u toku dužeg perioda, pri čemu su interferencije koje potiču od askorbinske kiseline, mokraćne kiseline i acetaminofena neznatne [166].

Shi i dr. su vršili određivanje H_2O_2 primenom elektrode na bazi ugljeničnog voska modifikovane sa nanokompozitom na bazi ugljeničnih nanocevi i Pt. Pt dekorisane ugljenične nanocevi su pripremljene metodom hemijske redukcije. Ovaj nanokompozit je primenjen za površinsku modifikaciju elektrode. Pripremljena modifikovana elektroda je pokazala odličnu elektroanalitičku aktivnost i selektivnost za proces oksidacije i redukcije H_2O_2 . Strujni odziv modifikovane elektrode za H_2O_2 je bio veoma brz, a GD u amperometriji su bile $2,5\cdot 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$ pri potencijalu redukcije i $4,8\cdot 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$ pri potencijalu oksidacije. Ova modifikovana elektroda se pokazala pogodnom za dodatnu modifikaciju sa enzimom radi dobijanja odgovarajućeg biosenzora [167].

Fang i dr. su opisali pripremu senzora za određivanje H_2O_2 . Pt nanonočestice su elektrodeponovane na MWCNTs koje su prethodno rastvorene (solubilizovane) u poli(vinil alkoholu) (PVA). PVA-rastvorene MWCNT omogućavaju formiranje uniformnog filma na površini GCE, koji se pokazao kao dobra podloga za elektrodepoziciju metalnih čestica. Pripremljena elektroda je pokazala izuzetnu elektrokatalitičku aktivnost i omogućila značajno smanjenje nadnapona za redukciju H_2O_2 , što je rezultat sinergističkog efekta Pt nanočestica i MWCNTs.

Postignut je širok linearni opseg ($0,002\text{--}3,8\text{ mmol L}^{-1}\text{ H}_2\text{O}_2$), osetljivost je iznosila $122,63\text{ }\mu\text{A mmol}^{-1}\text{ L cm}^{-2}$ pri potencijalu od 0 mV , a GD $0,7\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Elektroda je pokazala dobru reproduktivnost, dugoročnu stabilnost i otpornost prema interferencijama [168].

Karthik i dr. su predložili jednostavnu i brzu sintezu nanočestica Pt na etil-celulozi, i ovim kompozitnim materijalom modifikovali GCE u cilju određivanja H_2O_2 . Pri radnom potencijalu od $0,19\text{ V}$, linearnost je postignuta u opsegu koncentracija H_2O_2 od $0,05\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ do $2,22\text{ mmol L}^{-1}$, dok je GD iznosila $0,01\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Elektroda je primenjena za određivanje H_2O_2 u rastvoru za kontaktna sočiva i uzorcima ljudskog krvnog seruma [183].

You i dr. su opisali primenu MWCNTs modifikovanih sa nanočesticama Pd za elektrokatalitičku redukciju H_2O_2 . Razvijen je i okarakterisan senzor za H_2O_2 koji se sastoji od GCE modifikovane sa Nafionom i MWCNTs-Pd nanokompozitom. Priprema ove elektrode je brza i jednostavna i njenom primenom se povećava osetljivost određivanja H_2O_2 . Karakterizacija MWCNTs-Pd filma je vršena primenom transmisione elektronske mikroskopije, Ramana i fotoelektronske spektroskopije X-zraka. Ciklična voltametrijska i amperometrijska merenja (pri potencijalu od $-0,2\text{ V}$) su vršena radi optimizacije metode. Linearnost je postignuta u opsegu koncentracija H_2O_2 od $1,0\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ do 10 mmol L^{-1} , a GD je bila $0,3\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ [184].

Liu i dr. su primenili mikroelektrodu na bazi vlakana ugljeničih nanocevi modifikovanu nanočesticama Pd za elektrohemijsko određivanje H_2O_2 . Velika površina vlakana ugljeničih nanocevi i visoka elektrokatalitička aktivnost nanočestica Pd doveli su do nastanka visoko osetljivog i selektivnog mikrosenzora za H_2O_2 čijom primenom je postignuta GD od $2\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ i linearnost u opsegu koncentracija od $2\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ do $1,3\text{ mmol L}^{-1}$ pri čemu je koeficijent korelacije iznosio $0,9994$ [185].

Xu i dr. su primenili elektrodu na bazi vertikalno postavljenih ugljeničnih nanocevi kao supstrat za elektrodepoziciju nanočestica Pd. Rezultujući nanokompozit je pokazao visoku katalitičku aktivnost prema H_2O_2 . Joni Pd(IV) su prvo kovalentno vezani za ugljenične nanocevi, a zatim su elektrohemijski redukovani do Pd nanočestica. Nakon modifikovanja sa GOx, elektroda je primenjena za detekciju glukoze. Rezultati su pokazali da prisustvo Pd nanočestica povećava osetljivost glukoznog biosenzora, pri čemu je vreme odziva elektrode kratko ($< 5\text{ s}$) a primenjeni oksidacioni potencijal manji od $0,4\text{ V}$ kada se detektuje H_2O_2 oslobođen u enzimatskoj reakciji između GOx i glukoze [186].

2.7. Paralelne i uporedne merne tehnike u eksperimentalnom radu

Pored voltmetrije i amperometrije kao glavnih mernih tehnika u eksperimentalnom radu ove doktorske disertacije, primenjene su i određene paralelne i uporedne merne tehnike. Stoga su u ovom poglavlju ukratko opisani instrumentacija i osnovni principi na kojima se zasnivaju skenirajuća elektronska mikroskopija, tečna hromatografija visoke efikasnosti i spektrofotometrija.

2.7.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) je jedan od najpraktičnijih instrumenata dostupnih za proučavanje i karakterizaciju morfologije kako organskih tako i neorganskih materijala na nanometarskoj i mikrometarskoj skali. SEM takođe može biti primenjen za dobijanje informacija o kompletnom elementarnom sastavu mikrolokaliteta uzorka zahvaljujući karakterističnim X-zracima koji nastaju usled interakcije snopa elektrona i atoma iz uzorka [187, 188].

Osnovni princip rada SEM se može opisati na sledeći način: izvor elektrona (elektronski top – najčešće katoda od volframovog vlakna) emituje snop elektrona koji se ubrzavaju određenim naponom ka anodi tako da se energija elektrona obično nalazi u intervalu od 1 do 30 keV. Dva ili tri elektromagnetna kondenzatorska sočiva zatim umanjuju širinu elektroskog snopa tako da kada on padne na uzorak može da ima prečnik veličine od samo 2 do 10 nm. Elektronski snop skenira površinu uzorka duž x i y ose pomoću sistema kalema i interakcija elektronskog snopa sa uzorkom dovodi do stvaranja sekundarnih, reflektovanih (*backscattered*) i *Auger* elektrona, fotona, kao i X-zraka, i svaki od njih se može detektovati primenom odgovarajućeg detektora, pri čemu kao rezultat nastaje slika koja se prikazuje na monitoru [187, 189, 190]. Osnovni delovi SEM su prikazana na slici 12.

Većina nanomaterijala kao što su npr. ugljenične nanocevi, nanočestice, nanostrukturni materijali mogu biti direktno proučavani ovom tehnikom postavljanjem na ugljenu traku, što čini pripremu ovakvih uzoraka vrlo jednostavnim. Sa druge strane, neprovodni materijali zahtevaju prevlačenje metalom i postupak pripreme ovakvih uzoraka je znatno složeniji [187].

U ovoj doktorskoj disertaciji primenom SEM je vršeno proučavanje površinske morfologije sintetizovanih kompozitnih nanomaterijala, kao i pojedinih primenjenih ugljeničnih radnih elektroda kako u nemodifikovanom tako i u modifikovanom obliku. S obzirom da ovakva

proučavanja predstavljaju jedan od osnovnih koraka karakterizacije materijala, veliki je broj literaturnih podataka koji potvrđuju uspešnu primenu SEM u ovoj oblasti.



Slika 12. Šema skenirajućeg elektronskog mikroskopa [191].

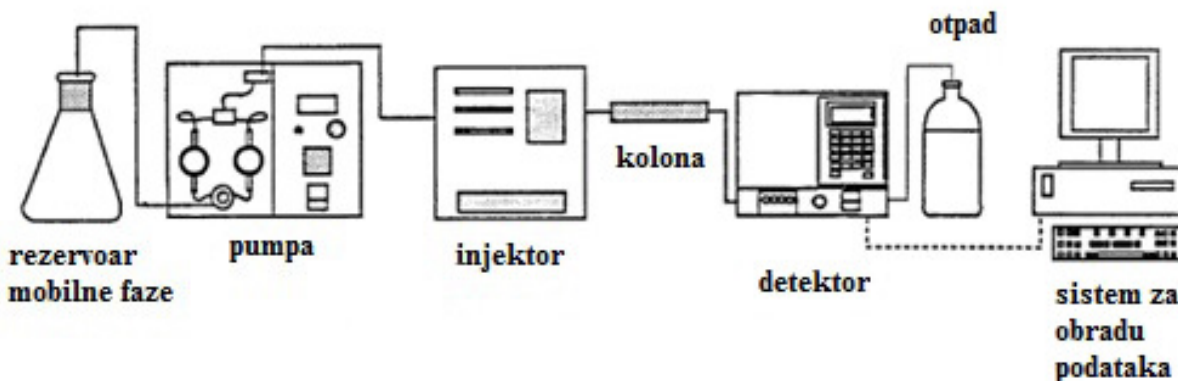
Primeru radi, *Xu i dr.* su proučavali morfologiju vertikalno postavljenih ugljeničnih nanocevi u nativnom obliku, kao i modifikovanom obliku sa MnO_2 . Na osnovu dobijenih skenirajućih elektronskih mikrografa utvrđeno je da ugljenične nanocevi imaju prosečan prečnik 150 nm i dužinu od 5 μm i da nakon modifikacije sa MnO_2 , one postaju deblje, pogotovo na vrhovima [163]. *Chang i dr.* su primenom SEM dokazali da su Pt nanočestice rasute na površini MWCNT što je ukazalo na to da MWCNT predstavljaju pogodan supstrat za Pt katalizator formiran u procesu redukcije PtCl_6^{2-} femtosekundim laserom u vodenom rastvoru [192]. *Zou i dr.* su na osnovu dobijenih SEM slika pokazali da su MWCNT ravnomerno raspoređene na površini GCE i da se većina nanocevi nalazi u obliku malih snopova ili pojedinačnom obliku. Tako formiran porozni MWCNT film je imao veliku površinu i predstavljao je idealan matriks za izdvajanje Pt nanočestica za koje je na osnovu SEM proučavanja utvrđeno da su veličine oko 30-40 nm [193]. *Cardiel i dr.* su verifikovali imobilizaciju GOx u strukturi od nanogela primenom SEM, pri čemu se na dobijenim SEM slikama prepoznaju GOx agregati (prečnika od 100-300 nm) unutar micelarne mreže [194]. *Liu i dr.* su proučavali morfologiju mikroelektrode na bazi vlakana ugljeničnih nanocevi i primenom SEM utvrdili da se elektroda sastoji od snopa MWCNT prečnika 10-30 nm. Ova elektroda je poslužila kao supstrat za izdvajanje nanočestica Pd primenom potencijalske pulsne tehnike, pri

čemu su SEM slike pokazale da su ravnomerno raspoređene Pd nanočestice prečnika oko 15 nm dobijene pri broju pulseva 10, dok se čestice većih dimenzija kao i njihovi agregati dobijaju pri upotrebi većeg broja pulseva [185].

2.7.2. Tečna hromatografija visoke efikasnosti

Hromatografija je analitička tehnika koja se zasniva na razdvajanju komponenata uzorka njihovom raspodelom između dve faze od kojih je jedna stacionarna, a druga mobilna. Ukoliko je mobilna faza tečna, onda se takva hromatografija naziva tečna hromatografija (LC) [195]. Sa razvojem LC uočeno je da se bolja efikasnost razdvajanja komponenata postiže upotrebom malih čestica stacionarne faze, što takođe iziskuje i primenu visokog pritiska. Ova nova tehnika je dobila naziv tečna hromatografija visoke efikasnosti (HPLC) [196]. HPLC tehnika se može primeniti za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Naime, svaka komponenta smeše ima karakteristično retenciono vreme (period od trenutka injektovanja uzorka do pojave maksimuma pika) pri određenim eksperimentalnim uslovima, dok je visina ili površina svakog signala (pika) na hromatogramu proporcionalna koncentraciji injektovanog jedinjenja [197].

Osnovne komponente HPLC uređaja su prikazane na slici 13. To su rezervoar za rastvarače (mobilnu fazu), sistem za prenos mobilne faze (pumpa), sistem za unošenje uzorka (injektor) koji može biti manuelni ili automatski, kolona na kojoj se vrši razdvajanje komponenata smeše, detektor i sistem za obradu podataka [195]. U zavisnosti od primene, postoje različiti tipovi HPLC detektora: detektor na bazi niza dioda (DAD), fluorescentni detektor, detektor na bazi indeksa refrakcije, elektrohemijski detektor, maseni spektrometrijski detektor, itd [198].



Slika 13. Komponente HPLC uređaja [195].

HPLC kolona sadrži čestice stacionarne faze veličine od 3 do 10 μm . S obzirom na ograničeni radni pritisak kod HPLC-a (400 bara), prednosti redukovanja veličine čestica stacionarne faze ne mogu potpuno biti iskorišćene. Kao posledica toga, sa smanjenjem veličine čestica smanjena je i dužina kolone kako bi se razdvajanje vršilo bez ograničavanja u vrednostima pritiska, što je svakako dovelo do poboljšanja efikasnosti razdvajanja. U današnje vreme, mogu se primeniti pritisci i od 1000 bar kod novih komercijalnih HPLC sistema [196].

Pored razdvajanja, identifikacije i kvantifikacije komponente smeše, HPLC se može primeniti i u preparativne svrhe, za prečišćavanje ili izolaciju jedinjenja iz uzorka. HPLC je našla primenu u mnogim oblastima uključujući farmaceutsku i kliničku analizu, analizu hrane i pića, forenziku, zaštitu životne sredine, itd [199].

S obzirom da je HPLC jedna od glavnih mernih tehnika za detekciju i određivanje pesticida, u okvirima ove doktorske disertacije je upravo ona primenjena za praćenja koncentracije test organskog polutanta acetamiprida u toku Fentonovog i foto-Fentonovog procesa njegovog uklanjanja iz vodene sredine.

Obana i dr. su razvili HPLC metodu za određivanje tri neonikotinoidna insekticida: nitenpirama, imidakloprida i acetamiprida. Ekstrakcija insekticida iz uzoraka voća i povrća je vršena sa acetonitrilom. Nakon odgovarajuće pripreme i prečišćavanja uzoraka, insekticidi su određivani primenom HPLC sa C-18 kolonom i DA-detektorom, pri čemu je radna talasna dužina detektora u slučaju acetamiprida bila 245 nm. Prinosa imidakloprida i acetamiprida je bio oko 90% na nivou spajkovanih koncentracija od 0,2 i 2 mg kg^{-1} u krastavcu, krompiru, paradajzu, patlidžanu, rotkvici i grožđu. Prinosa nitenpirama je bio između 64-80%. RSD su bile manje od 10% u svim slučajevima [200].

Guzsvány i dr. su razvili metodu za određivanje tragova neonikotinoida primenom LC kuplovane sa optotermičkim detektorom (TLS). Eluiranje je vršeno pri izokratskim uslovima, a mobilna faza je bila voda (0,2% fosforna kiselina) : acetonitril (7/3, v/v). Insekticidi tiametoksam, imidaklopid, acetamiprid i tiaklopid su detektovani na retencionim vremenima 4,4; 5,7; 6,5 i 8,5 minuta, dok su vrednosti za GO bile 50, 89, 10 i 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, redom. Paralelna merenja su vršena na HPLC-DAD sistemu radi upoređivanja osetljivosti metoda. GO za imidaklopid je bila ista primenom oba tipa detektora, dok su vrednosti GO za acetamiprid, tiametoksam i tiaklopid bile 8,5 puta niže u slučaju primene TLS. Primenljivost razvijene metode je ispitana na spajkovanim uzorcima rečne vode i krompira [201].

Lazić i dr. su razvili brzu i jednostavnu metodu za simultano određivanje acetamiprida i njegovog metabolita 6-hlornikotinske kiseline u uzorcima trešanja. HPLC metoda se zasniva na reverzno faznom razdvajanju na C-18 koloni pri uslovima gradijentnog eluiranja. Za detekciju i određivanje ciljnih analita je primenjen HPLC u kombinaciji sa DAD, pri čemu su hromatogrami snimani pri talasnoj dužini od 230 nm. Ekstrakcija acetamiprida i 6-hlornikotinske kiseline iz uzoraka trešanja je vršena smešom acetonitril/0,1N amonijum-hlorid (8/2, v/v). Prosečna vrednost prinosa je bila 95-101% za acetamiprid i 73-83% za 6-hlornikotinsku kiselinu sa RSD manjom od 5% u svim slučajevima. GO je bila $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ i $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ za acetamiprid i 6-hlornikotinsku kiselinu, redom. Razvijena HPLC-DAD metoda se pokazala brzom, osetljivom i može naći primenu u analizi realnih uzoraka trešanja kontaminiranim ovim insekticidima [202].

Jovanov i dr. su primenili LC metodu za istovremeno određivanje odabranih neonikotinoidnih insekticida u medu koja se zasniva na optimizovanoj tečno-tečnoj mikroekstarkciji u kombinaciji sa reverzno faznim hromatografskim razdvajanjem na C-18 koloni i izokratskim eluiranjem, dok je kao detektor korišćen tandemski maseni spektrometrijski detektor (MS/MS). LC-MS/MS parametri su optimizovani u cilju postizanja zadovoljavajućeg hromatografskog razdvajanja, niskih GD ($0,5\text{--}1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) i GO ($1,5\text{--}2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$) za acetamiprid, klotianidin, tiametoksam, imidakloprid, dinotefuran, tiakloprid i nitenpram u uzorcima meda. Kao mobilna faza je korišćena smeša acetonitrila i vode (0,1% mravlja kiselina) u zapreminskom odnosu 20:80. Razvijena metoda se pokazala brzom (retenciona vremena 1,5–9,9 min), osetljivom i pogodnom za pouzdanu, rutinsku laboratorijsku analizu sedam neonikotinoida u uzorcima meda [203].

2.7.3. Spektrofotometrija

Merenja zasnovana na svetlosti i drugim formama elektromagnetnog zračenja se široko primenjuju u analitičkoj hemiji. Interakcije zračenja i materije proučava spektroskopija. Spektroskopske analitičke metode se zasnivaju na merenju količine zračenja proizvedene ili apsorbovane od strane atoma i molekula od interesa, i mogu se klasifikovati na osnovu dela elektromagnetnog spektra koji se proučava u toku merenja [59].

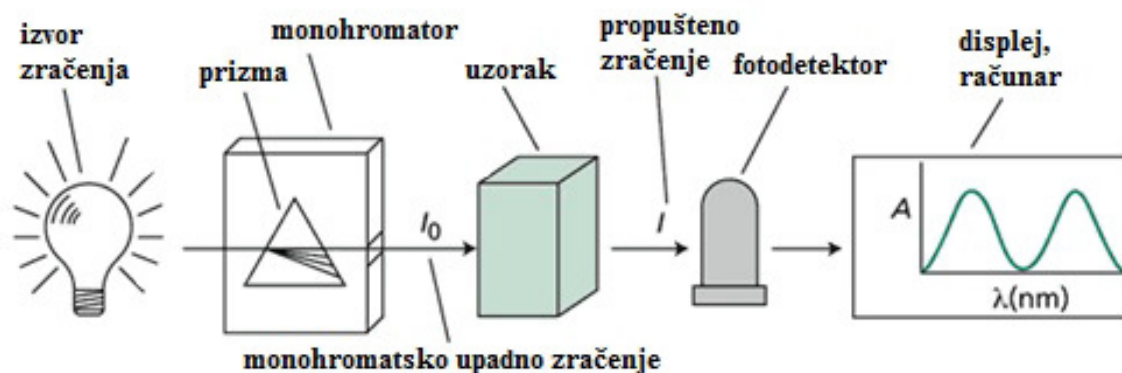
Ultraljubičasta (UV) i vidljiva (Vis) oblast zračenja čini samo jedan mali deo elektromagnetnog spektra (200–800 nm). Međutim, ovaj opseg talasnih dužina je od velikog značaja s obzirom da je energija fotona u UV/Vis oblasti dovoljna da dovode do prelaza elektrona između različitih elektronskih nivoa u pojedinim atomima i molekulima [204].

Apsorpcija zračenja od strane uzorka se kvantitativno može opisati Lamber-Berovim zakonom, koji se može izraziti sledećom jednačinom:

$$A = \log (P_0/P) = \log (1/T) = \epsilon bc$$

gde je: A – apsorpcija, P_0 – intenzitet upadnog zračenja, P – intenzitet propuštenog zračenja, T – transparentija, ϵ – molarni apsorpcioni koeficijent ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), b – dužina optičkog puta (cm), c – koncentracija molekula koji apsorbuje zračenje (mol L^{-1}). Lamber-Berov zakon važi samo za monohromatsko zračenje. Takođe, vrednost apsorpcije nije uvek proporcionalna koncentraciji analita. Do odstupanja od linearnosti dolazi ukoliko je koncentracija analita veća od $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, zatim u slučaju reakcije jedinjenja (npr. hemijske degradacije) ili ukoliko rastvor sadrži čestice koje rasipaju svetlost [205].

Spektrofotometar je instrument koji meri transparentiju ili apsorpciju u funkciji talasne dužine. Može biti jednozračni i dvozračni. Opšta šema jednozračnog spektrofotometra je prikazana na slici 14. Osnovne komponente spektrofotometra su: izvor zračenja (volframova ili deuterijumova lampa), monohromator, kivete za uzorak i/ili referentni rastvor, detektor, sistem za obradu i prikaz dobijenih rezultata [206]. UV/Vis spektrometrija se primenjuje za identifikaciju organskih i neorganskih molekula i jona, kao i funkcionalnih grupa u organskim molekulima, kvantitativnu analizu različitih analita kao i njihovih smeša, određivanje konstante ravnoteže, stehiometrije hemijskih reakcija, itd [207].



Slika 14. Šema jednozračnog spektrofotometra [208].

S obzirom da H_2O_2 u prisustvu određenih reagenasa daje obojena jedinjenja, njegovo određivanje je moguće i primenom spektrofotometrije, pa je stoga ova tehnika u pojedinim

slučajevima u okvirima ove doktorske disertacije primenjena kao komparativna. Pored kolorimetrijskih metoda [47, 48] koje se zasnivaju na merenju intenziteta žute boje pertitanske kiseline nastale u reakciji između H_2O_2 i reagensa titanijum sulfata, razvijene su i različite spektrofotometrijske metode za određivanje ovog ciljnog analita.

Clapp i dr. su razvili spektrofotometrijsku metodu za određivanje H_2O_2 koja se zasniva na ekstrakciji H_2O_2 ($1 \cdot 10^{-5}$ – $3 \cdot 10^{-3}$ mol L^{-1}) iz vodenog rastvora sa etil acetatom i ponovnom ekstrakcijom sa rastvorom titanijum(IV)-sulfata, pri čemu je apsorbanca merena na talasnoj dužini od 407 nm. Ovaj postupak može biti primenjen u prisustvu različitih interferirajućih supstanci, kao i u slučaju obojenih uzoraka [49].

Sellers je opisao brzu metodu za spektrofotometrijsko određivanje H_2O_2 koristeći kalijum titanijum(IV)-oksalat kao reagens. Metoda se može primeniti za merenje koncentracije peroksida do oko 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0,3 mg kg^{-1}) pri najpovoljnijim uslovima. Različiti kompleksujući i redukcionni agensi, kao i katalizatori dekompozicije H_2O_2 , za koje je poznato da ometaju određivanje H_2O_2 alternativnom jodidnom metodom, nisu imali nikakvog efekta. Utvrđeno je da fluorid ometa određivanje H_2O_2 razvijenom spektrofotometrijskom metodom [50].

Nogueira i dr. su predložili spektrofotometrijsku metodu za određivanje H_2O_2 u toku reakcija fotodegradacije. Metoda se zasniva na reakciji H_2O_2 i amonijum-metavanadata u kiseljoj sredini, pri čemu nastaje creveno-narandžasti peroksovanadijum katjon, sa maksimumom apsorpcije na 450 nm. Pri koncentraciji vanadata od 6,2 mmol L^{-1} , GD je iznosila 143 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 . Produkt reakcije se pokazao veoma stabilnim (u toku 180 h na sobnoj temperaturi) za koncentracije H_2O_2 do 3 mmol L^{-1} . Interferencije koje mogu da potiču od Cl^- , NO_3^- , Fe^{3+} i 2,4-dihlorfenola su takođe ispitane. Metoda je primenjena za evaluaciju potrošnje H_2O_2 u toku foto-Fentonove degradacije 2,4-dihlorfenola [51].

Harms i dr. su opisali selektivnu metodu za određivanje H_2O_2 koja se zasniva na formiranju obojenog proizvoda u reakciji binuklearnog gvožđe(III)-kompleksa sa H_2O_2 . Reakcioni produkt je detektovan na talasnim dužinama između 570 i 600 nm. GD je iznosila 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, dok je linearnost postignuta u opsegu koncentracija H_2O_2 od 9 do 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Opisana metoda se pokazala pogodnom za analizu realnih uzoraka, kao što su različiti proizvodi za domaćinstvo [52].

2.8. Predmet i cilj istraživanja

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje primenljivosti jednostavnih i savremenih voltametrijskih senzora za određivanje H_2O_2 u odabranim uzorcima. S obzirom na navedene činjenice, postoji velika potreba za razvojem jednostavnih, osetljivih i savremenih analitičkih metoda, kao što su voltametrijske, za praćenje koncentracije H_2O_2 u različitim odabranim uzorcima, što je ujedno i osnovni cilj istraživanja. Od posebnog interesa su elektrode na bazi ugljeničnih materijala, prvenstveno CPE zapreminski ili površinski modifikovane odabranim modifikatorima (mikro i nano dimenzioniranim medijatorima), kao i SPCE takođe u modifikovanom i nemodifikovanom obliku. Primenjene su različite voltametrijske tehnike kao što su CV, DPV, kao i amperometrija. Optimizovane i razvijene voltametrijske metode na bazi pomenutih radnih elektroda su primenjene za određivanje H_2O_2 u različitim uzorcima, kao što su npr. podzemna voda bogata prirodnim organskim materijama tretirana Fentonovim i Fentonu-sličnim reagensima, vodeni rastvor odabranog neonikotinoidnog insekticida tretiran Fentonovim i foto-Fentonovim procesima, mleko, kao i komercijalno dostupni proizvodi za ličnu negu. Takođe, nakon optimizacije pripreme glukoznog biosenzora i amperometrijskih metoda, sadržaj glukoze je određen u odabranim realnim uzorcima (medu, grožđu, komprimatima/tabletama). Proučavanje morfologije ugljeničnih materijala i površine pripremljenih radnih elektroda je vršeno primenom SEM, dok je za paralelna i uporedna merenja primenjena tečna hromatografija i spektrofotometrija, redom.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Hemikalije i rastvori

Sve primenjene hemikalije su bile analitičke čistoće i svi rastvori su pripremani u bidestilovanoj vodi. H_2O_2 (30%, p.a., NRK Inženjering, Srbija) je standardizovan permanganometrijskom titracijom i razblaženi rastvor je pripreman svakodnevno. Rastvor acetamiprida (ACT, čistoća 99,9%, Sigma-Aldrich, Nemačka, PESTANAL[®]) koncentracije $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ je pripremljen rastvaranjem odgovarajuće količine čvrste supstance u bidestilovanoj vodi. $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ i $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (POCH SA) i HCl (Lach-Ner) su primenjeni za tretiranje uzoraka podzemne vode Fentonovim (Fe^{2+} i H_2O_2) i Fentonu-sličnim (Fe^{3+} i H_2O_2) procesima. $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (p.a., Kemika, Hrvatska) i H_2SO_4 (p.a., Fisher Chemical, Velika Britanija) su korišćeni u Fentonovom i foto-Fentonovom procesu uklanjanja ACT. Acetonitril (čistoće 99,9%, CHROMOSOLV[®] za HPLC, Sigma-Aldrich) je primenjen za hromatografska merenja. Osnovni rastvor glukoze koncentracije $1000,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ je pripremljen rastvaranjem odgovarajuće količine glukoza-monohidrata (Merck, Nemačka) u bidestilovanoj vodi, pre upotrebe rastvor je ostavljen da odstoji u toku noći zbog α - β mutarotacije i čuvan u frižideru na 4°C kada nije bio u upotrebi. Za pripremu biosenzora, primenjeni su glukoza oksidaza (iz *Aspergillus Niger*, 100–250 kU g^{-1} , Sigma-Aldrich) i Nafion[®] (Fluka).

MWCNT i MWCNT modifikovane sa česticama MnO_2 , Pt ili Pd koje su primenjene u svojstvu modifikatora CPE ili SPCE, su sintetizovane i okarakterisane u laboratoriji prof. Dr Zoltana Konje (Zoltán Kónya) na Univerzitetu u Segedinu, Mađarska, u okvirima MATCROSS projekta na osnovu molbe prof. dr Valerije Gužvanj i ustupljene prof. dr Valeriji Gužvanj za proučavanje primenljivosti ovih materijala. Pored pomenutih materijala za površinsku modifikaciju CPE je primenjena i komercijalno dostupna Pt na grafitizovanom ugljeniku (Pt-C, Vulkan XC72 sa 10% m:m Pt, veličina Pt čestica $< 5 \text{ nm}$, Sigma-Aldrich). Apsolutni etanol (Carlo Erba, Italija) je korišćen za pripremu suspenzija pomenutih kompozita neophodnih za površinsku modifikaciju primenjenih ugljeničnih radnih elektroda.

Fosfatni pufer pH 7,50 je pripremljen mešanjem odgovarajućih zapremina $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ NaH_2PO_4 (p.a., Sigma-Aldrich) i $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ Na_2HPO_4 (p.a., Sigma-Aldrich) ili mešanjem rastvora $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ KH_2PO_4 (p.a., Sineks Laboratory, Srbija) i $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ Na_2HPO_4 (Centrohem, Srbija). U

nekim slučajevima ovako pripremljen pufer je razblažen tako da se dobije $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ rastvor. Acetatni pufer ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,50) je pripremljen mešanjem određenih zapremina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ CH_3COOH (p.a., Lachema, Češka) i $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ CH_3COONa (p.a., Zorka Pharma, Srbija). Boratni pufer pH 9,18 je pripremljen rastvaranjem odgovarajuće količine $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ u bidestilovanoj vodi.

Uzorak sirove podzemne vode iz centralnog Banata (Vojvodina, Srbija) je tretiran Fentonovim i Fentonu-sličnim reagensima u Laboratoriji za tehnologiju i zaštitu životne sredine, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, pod rukovodstvom prof. dr Bože Dalmacije i ustupljeni prof. dr Valeriji Gužvanj za voltametrijska merenja. Detalji o osnovnim karakteristikama ove podzemne vode sa visokim sadržajem prirodnih organskih materija (POM), zajedno sa Fentonovim tretmanom su prethodno objavljeni [28, 29], dok su u tabeli 2 sumirani samo osnovni parametri kvaliteta vode pre i nakon najefikasnijeg postupka uklanjanja POM.

Tabela 2. Osnovni parametri kvaliteta ispitivane podzemne vode pre i nakon Fentonovog tretmana.

Parametar	Srednja vrednost \pm sd ^a	
	Pre tretmana/sirova voda	Nakon Fentonovog procesa ($0,25 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$ i $1:5 \text{ H}_2\text{O}_2$)
pH	$7,48 \pm 0,20$	$7,0 \pm 0,20$
Turbiditet [NTU]	$0,52 \pm 0,03$	Nije detektovano
DOC [mg L^{-1}]	$10,4 \pm 0,6$	$4,77 \pm 0,23$
TOC [mg L^{-1}]	$11,7 \pm 1,1$	$5,07 \pm 0,86$
$\text{UV}_{254} [\text{cm}^{-1}]$	$0,507 \pm 0,050$	Nije mereno zbog H_2O_2 interferencija

^asd-standardna devijacija na bazi 10 merenja

Rastvor za dezinfekciju (stabilizovani, Meilab, Srbija) je kupljen u lokalnoj apoteci, dok je rastvor za čišćenja kontaktnih sočiva (AOSep[®] Plus, Alcon Laboratories, SAD) kupljen u lokalnoj optičkoj radnji. Uzorci mleka i meda su kupljeni u lokalnim marketima/pijaci u Novom Sadu od registrovanog farmera, odnosno uzgajivača pčela. Belo grožđe (sorta Viktorija) je kupljeno na

pijaci, a komprimati (tablete) sa aromom jagode (Traubenzucker-bonbons Erdbeere, Sanotact GmbH, Nemačka) su kupljene u lokalnoj prodavnici.

3.2. Instrumenti

Diferencijalno pulsna (DPV), ciklična voltametrijska (CV) i amperometrijska merenja su rađena na uređajima AUTOLAB PGSTAT 12 (slika 15A, Ecochemie, Holandija) uz primenu softvera GPES 4,9 i PalmSens (slika 15B) uz primenu softvera PSTrace 4,2. Referentna elektroda je bila zasićena kalomelova elektroda (ZKE), pomoćna elektroda je bila platinska elektroda (Amel, Italija), dok je radna elektroda bila jedna od sledećih elektroda:

- nemodifikovana CPE;
- CPE zapreminski modifikovana sa MnO_2 (5,0%, 7,5% ili 10,0%, m:m, odnosno skraćeno 5%- MnO_2 -CPE, 7,5%- MnO_2 -CPE ili 10%- MnO_2 -CPE);
- nemodifikovana SPCE;
- SPCE zapreminski modifikovana sa MnO_2 (5,0%, m:m, MnO_2 -SPCE);
- CPE površinski modifikovana kompozitom na bazi nanočestica Pt i grafitizovanog ugljenika (Pt-C/CPE);
- CPE površinski modifikovana sa MWCNT (MWCNT/CPE);
- CPE površinski modifikovana kompozitom na bazi Pt i MWCNT (Pt-MWCNT/CPE);
- CPE površinski modifikovana kompozitom na bazi MnO_2 i MWCNT (MnO_2 -MWCNT/CPE);
- SPCE zapreminski modifikovana sa MWCNT (MWCNT-SPCE);
- SPCE zapreminski modifikovana kompozitom na bazi Pd i MWCNT (Pd-MWCNT-SPCE);
- SPCE površinski modifikovana kompozitom na bazi Pd i MWCNT (Pd-MWCNT/SPCE);
- SPCE površinski modifikovana enzimom GOx (GOx/SPCE);
- SPCE površinski modifikovana kompozitom na bazi Pd i MWCNT i enzimom GOx (GOx/Pd-MWCNT/SPCE);
- SPCE zapreminski modifikovana kompozitom na bazi Pd i MWCNT i površinski modifikovana enzimom GOx (GOx/Pd-MWCNT-SPCE).
- SPCE zapreminski modifikovana kompozitom na bazi Pt i MWCNT (Pt-MWCNT-SPCE);

- SPCE zapreminski modifikovana kompozitom na bazi Pt i MWCNT i površinski modifikovana enzimom GOx (GOx/Pt-MWCNT-SPCE).

Svi potencijali su mereni u odnosu na ZKE.



A



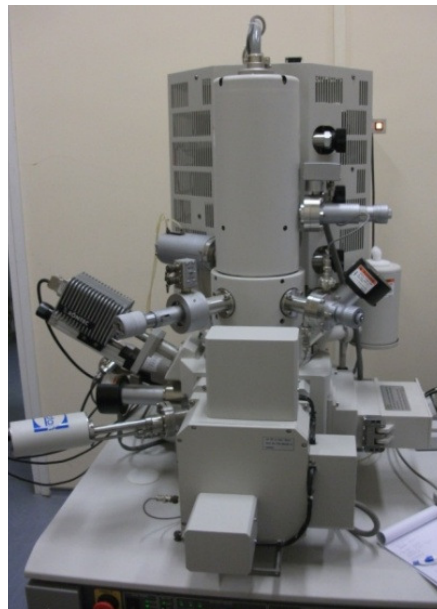
B

Slika 15. Voltametrijski uređaji AUTOLAB PGSTAT 12 (A) i PalmSens (B).

Skenirajući elektronski mikrografi površine CPE, MnO₂-CPE (5,0%, 7,5% i 10,0% MnO₂, m:m), MnO₂-SPCE i Pt-C/CPE su dobijeni primenom skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM, JSM-6460LV, Japan Electron Optics Laboratory, Japan, slika 16A), dok je lokalna mikroanaliza vršena primenom energetsko-disperzionog spektrometrijskog detektora (EDS, INCA, Oxford Instruments, Velika Britanija) na Univerzitetu u Novom Sadu. Površinska morfologija i semi-kvantitativna hemijska analiza kompozitnih materijala MnO₂-MWCNT, Pt-MWCNT i Pd-MWCNT, kao i SPCE, MWCNT-SPCE, Pt-MWCNT-SPCE i GOx/Pt-MWCNT-SPCE je vršena primenom SEM (Hitachi S-4700 Type II cold field emission, slika 16B) i EDS detektora (Röntec QX2) u laboratoriji prof. Dr Zoltana Konje (Zoltán Kónya) na Univerzitetu u Segedinu, Mađarska.

Za sva merenja pH vrednosti primenjen je digitalni pH-metar (Radiometar, Danska) i kombinovana staklena elektroda (Jenway, Velika Britanija).

HPLC merenja su vršena primenom Agilent 1290 Infinity tečnog hromatografa (Agilent Technologies Inc., SAD, slika 17), Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 mm×50 mm, 1,8 μm) hromatografske kolone (Agilent) i detektora na bazi niza dioda (DAD, Agilent 1290).

**A****B**

Slika 16. Skenirajući elektronski mikroskopi JSM-6460LV na Univerzitetu u Novom Sadu (A) i Hitachi S-4700 na Univerzitetu u Segedinu (B).



Slika 17. Tečni hromatograf Agilent 1290 Infinity.

Sva centrifugiranja su vršena primenom laboratorijske centrifuge (Železniki LC.45, slika 18).



Slika 18. Laboratorijska centrifuga Železniki LC.45.

Spektrofotometrijska merenja su rađena primenom T 80+ UV/VIS spektrofotometra (PG instruments Ltd, Velika Britanija, slika 19).



Slika 19. T 80+ UV/VIS spektrofotometar.

Uporedna merenja koncentracije glukoze u uzoku livadskog meda, belog grožđa i glukoznih tableta su vršena primenom komercijalno dostupne Accu-Chek Active opreme (slika 20).

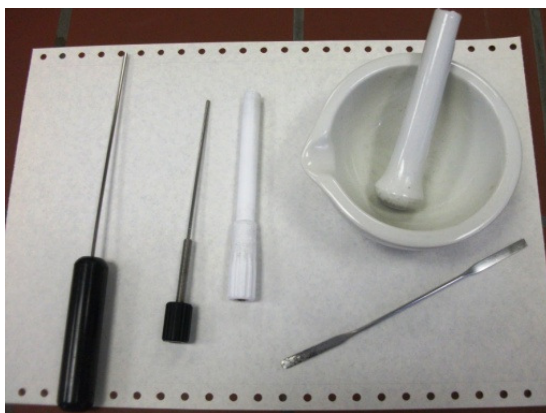


Slika 20. Aparat za merenje glukoze Accu-Chek Active.

3.3. Postupci

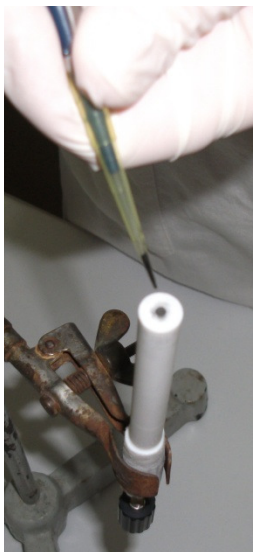
3.3.1. Priprema radnih elektroda

Nemodifikovane CPE su pripremljene ručnim mešanjem 0,5 g grafitnog praha (RW-C, Ringsdorff-Werke GMBH Bonn-Bad Godesberg, Nemačka ili < 20 μm , sintetički, Sigma Aldrich) sa 0,2 mL parafinskog ulja (Kemika, Zagreb, Hrvatska). MnO_2 -CPE sa različitim masenim udelom MnO_2 (5,0%, 7,5% i 10,0%) su pripremljene mešanjem odgovarajuće količine MnO_2 praha (p.a., Fluka) sa osnovnim sastojcima ugljenične paste. Nakon intenzivne homogenizacije u avanu sa tučkom u toku 30 min, teflonski kalupi prečnika 2 mm [209] su napunjeni pripremljenim ugljeničnim pastama. Pribor za pripremu CPE, ugljenična pasta u avanu sa tučkom i izgled teflonskog kalupa su prikazani na slici 21.

**A****B****C**

Slika 21. Pribor za pripremu CPE (A), ugljenična pasta u avanu sa tučkom (B) i izgled teflonskog kalupa (C).

Suspenzije za površinsku modifikaciju CPE su pripremljene na sledeći način: 1,5 mg (optimum za MWCNT, Pt-MWCNT i Pt-C) ili 3,0 mg (optimum za MnO₂-MWCNT) odgovarajućeg nanomaterijala je suspendovano u 1,0 mL etanola i sonificirano na ultrazvučnom kupatilu u toku 20 min (Bandelin). 5,0 µL ovako rezultujućih suspenzija je naneto na sveže obnovljenu površinu CPE jednostavnom metodom nanošenja kapi (slika 22) i modifikovane elektrode su ostavljene na sobnoj temperaturi da se osuše.



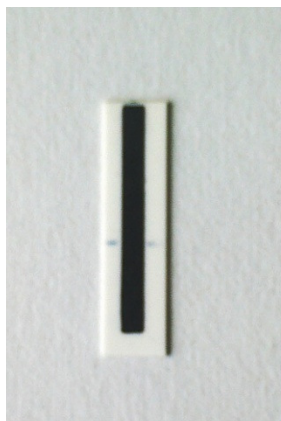
Slika 22. Površinska modifikacija CPE metodom nanošenja kapi.

SPCE, MnO₂-SPCE, MWCNT-SPCE, Pd-MWCNT-SPCE i Pt-MWCNT-SPCE su pripremljene „*screen printing*” postupkom zajedno sa prof. dr Kurtom Kalherom (dr Kurt Kalcher) u njegovoj laboratoriji na Karl Franzens Univerzitetu u Gracu, Austrija, u okvirima saradnje prof. dr Valerije Gužvanj i prof. dr Kurta Kalhera putem CEEPUS III projekta i ustupljene prof. dr Valeriji Gužvanj za voltametrijska merenja. Ugljenično mastilo (C2030519P4, Gwent Group, Torfaen, Velika Britanija) je pomešano sa 5,0% (m:m) MnO₂, 5,0% (m:m) MWCNT, 4,0% (m:m) Pd-MWCNT ili Pt-MWCNT i štampanje je vršeno na pretretiranim laserom (40×10 mm) sinterovanim aluminijumskim podlogama (115×165 mm, CoorsTek, Golden, SAD) koristeći metalni kalup debljine 100 µm. U svim slučajevima štampana površina elektroda je iznosila 35×3 mm, dok je u toku merenja senzorska geometrijska površina bila 18,3×3 mm, odnosno 0,55 cm². Ploče sa elektrodama su ostavljene na sobnoj temperaturi u toku noći radi sušenja i onda su slomljene u

individualne senzore. Mašina za štampanje elektroda je prikazana na slici 23, dok je prikaz jedne SPCE dat na slici 24.



Slika 23. Mašina za štampanje elektroda „screen printing” postupkom, Karl Franzens Univerzitet u Gracu, Austrija, laboratorija prof. dr Kurt Kalhera.



Slika 24. Štampana ugljenična elektroda.

Za pripremu biosenzora, supstrat elektrode SPCE i Pd-MWCNT-SPCE, su površinski modifikovane metodom nanošenja kapi sa 10,0 μL , 15,0 μL i 20,0 μL biokoktela koji sadrži 40,0 μL neutralizovanog rastvora Nafion[®]-a (5% m:m), 40,0 μL enzima GOx (3 mg mL^{-1} u 0,1 mol L^{-1} fosfatnom puferu pH 7,50), 80,0 μL etanola i 80,0 μL bidestilovane vode i koji je bio sonificiran u

toku 5 min pre primene slično kao što je opisano u ranije objavljenim postupcima [210, 211]. Za pripremu GOx/Pd-MWCNT/SPCE, 1,5 mg Pd-MWCNT je suspendovano u 1,0 mL etanola primenom ultrazvučnog kupatila i 20,0 μL suspenzije je naneto metodom nanošenja kapi na površinu SPCE. Nakon sušenja površine elektrode na sobnoj temperaturi, 20,0 μL gore pomenutog biokoktela je pažljivo naneto na površinu Pd-MWCNT/SPCE.

Za pripremu GOx/Pt-MWCNT-SPCE, na površinu Pt-MWCNT-SPCE je naneto 15,0 μL biokoktela koji sadrži 40,0 μL neutralizovanog rastvora Nafion[®]-a (5% m:m), 40,0 μL enzima GOx (7,2 mg mL⁻¹ u 0,1 mol L⁻¹ fosfatnom puferu pH 7,50), 80,0 μL etanola i 80,0 μL bidestilovane vode.

3.3.2. Priprema uzoraka

Podzemna voda je tretirana Fentonovim reagensom pri pH 5,5, pri čemu su korišćeni različiti molarni odnosi Fe²⁺ i H₂O₂ (1:5; 1:10 i 1:20) i tri različite početne koncentracije Fe²⁺ (0,10; 0,25 i 0,50 mmol L⁻¹). Isti uslovi su bili i u Fentonu-sličnim eksperimentima sa upotrebom Fe³⁺ umesto Fe²⁺. Uzorci su pripremljeni u Laboratoriji za tehnologiju i zaštitu životne sredine, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, pod rukovodstvom prof. dr Bože Dalmacije i ustupljeni prof. dr Valeriji Gužvanj za voltametrijska merenja.

Model-uzorci rastvora ACT (0,31 mmol L⁻¹ (70,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$)) tretirani Fentonovim i foto-Fentonovim reagensima su pripremljeni sa početnim koncentracijama Fe²⁺ i H₂O₂ odabranim na osnovu ranije publikovanog odnosa Fe²⁺ i H₂O₂ primenjenog za tretman imidakloprida [30, 212]: 2,0 i 3,0 mmol L⁻¹ (111,7 i 102,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), redom. pH sistema je podešena na 2,8 dodatkom H₂SO₄. U foto-Fentonovim eksperimentima rastvori su osvetljeni OSRAM 50 W halogenom lampom, dok su Fentonovi eksperimenti vršeni u mraku. Svi eksperimenti su postavljeni u hemijskom reaktoru prikazanom na slici 25 (ukupna zapremina uzorka 100,0 mL) pri kontrolisanoj temperaturi (25 °C) i konstantnom mešanju rastvora (300 rpm). Alikvoti uzorka za analizu (10,0 mL) su uzeti u određenim vremenskim intervalima, kraćim u slučaju foto-Fentona (0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 10,0 min). Za amperometrijska i hromatografska merenja, pH vrednost svakog alikvota je podešena na 7,5 sa definisanom zapreminom fosfatnog pufera pH 7,5 (direktnim dodavanjem 10,0 mL alikvota uzorka u 3,0 mL pufera neposredno nakon uzorkovanja) radi zaustavljanja (ili maksimalnog usporavanja) oksidacionog procesa. Zatim je vršeno filtriranje uzoraka primenom

membranskih filtera (Millipore 0,22 μm , Milex) kako bi se uklonile istaložene čestice na bazi gvožđa i uzorci su zamrznuti. Amperometrijska merenja primenom MnO_2 -SPCE kao radne elektrode i hromatografska merenja su vršena odmah nakon odmrzavanja uzoraka.



Slika 25. Izgled hemijskog reaktora postavljenog na mešalicu i osvetljenog OSRAM 50 W halogenom lampom za izvođenje foto-Fentonovog eksperimenta.

0,250 mL rastvora za dezinfekciju (slika 26) ili AOSept[®] Plus rastvora za čišćenje kontaktnih sočiva je razblaženo bidestilovanom vodom u odmernom sudu (25,0 mL) i u ovom obliku primenjeni su za dalju amperometrijsku i uporednu spektrofotometrijsku analizu. Neutralizacija/degradacija H_2O_2 u rastvoru za kontaktna sočiva sa komercijalno dostupnim AOSept[®] platinskim diskom postavljenim na dnu držača kontaktnih sočiva je takođe ispitana u definisanim vremenskim intervalima. AOSept[®] Plus sistem je prikazan na slici 27. Naime, AOSept[®] rastvor je sipan u posudu do oznake, nakon određenog vremenskog intervala neutralizacije sa AOSept[®] platinskim diskom (0, 2, 5, 10, 30, 60, 120, 240 i 360 min) reakcija je prekinuta uklanjanjem Pt-diska iz rastvora i uzorci su zamrznuti. Eksperimenti su vršeni bez prisustva kontaktnih sočiva u sistemu, na sobnoj temperaturi (25 ± 1 °C) i mračnom mestu. Amperometrijska i komparativna spektrofotometrijska merenja su vršena neposredno nakon odmrzavanja uzoraka.



Slika 26. Rastvor za dezinfekciju.



Slika 27. AOSept® Plus sistem za čišćenje kontaktnih sočiva.

Uzorak surutke je dobijen mešanjem 6,0 mL 0,1 mol L⁻¹ acetatnog pufera pH 4,50 sa 6,0 mL mleka ohlađenog na 4 °C i centrifugiranjem na sobnoj temperaturi u toku 6 min (3300 rpm). Supernatant je dalje analiziran primenom amperometrijske metode i Pt-MWCNT/CPE.

Za određivanje glukoze primenom biosenzora GOx/Pd-MWCNT-SPCE uzorak meda je pripremljen na sledeći način: odmerena je odgovarajuća masa meda (174 mg) u čašu, med je rastvoren u toploj bidestilovanoj vodi i kvantitativno prenet u odmerni sud (50,0 mL). Uzorak je ostavljen da odstoji u toku noći.

Belo grožđe je oprano sa bidestilovanom vodom i osušeno na sobnoj temperaturi. Reprezentativni deo grožđa (m=128,3 g) je proceden u konvencionalnom sokovniku (Braun,

Multipress automatic MP80, Češka Republika) i ostavljen u frižideru da odstoji preko noći. 1,60 mL dobijenog soka grožđa je razblaženo do 100,0 mL sa bidestilovanom vodom. Pre merenja, uzorak je profiltriran kroz mikromembranski filter (0,22 μm , Millex).

Za pripremu uzorka komprimata (glukoznih tableta), odmerene su tri tablete (ukupna masa 6,9710 g) i sprasene u avanu sa tučkom. Od toga je odmereno 0,3404 g i rastvoreno u bidestilovanoj vodi, a zatim je uzorak kvantitativno prenet u odmerni sud od 250,0 mL. Uzorak je ostavljen u frižideru da odstoji u toku noći. Neposredno pre merenja uzorak je profiltriran kroz mikromembranski filter (0,22 μm).

3.3.3. SEM-EDS merenja

Površinska morfologija CPE, MnO_2 -CPE, Pt-C/CPE i MnO_2 -SPCE je proučavana primenom SEM sa naponom ubrzanja od 20,00 kV pri različitim uvećanjima u režimu niskog vakuuma. EDS merenja su izvedena na različitim reprezentativnim lokalitetima pripremljenih elektroda.

Pt-MWCNT, MnO_2 -MWCNT i Pd-MWCNT kompoziti su analizirani pri naponu ubrzanja od 10,0 kV u slučaju SEM proučavanja, dok su EDS merenja rađena na različitim lokalitetima kompozitnih materijala sa ubrzanjem 20,0 kV.

3.3.4. Voltametrijska merenja

3.3.4.1. Diferencijalno pulsna voltametrijska merenja u model sistemima

DPV merenja primenom 5%- MnO_2 -CPE kao radne elektrode su rađena pri negativnom smeru polarizacije (od 0,80 do -1,40 V) u sledećim model sistemima: fosfatni pufer pH 7,50 + Fe^{2+} ili Fe^{3+} ; fosfatni pufer pH 7,50 + H_2O_2 ; i fosfatni pufer pH 7,50 + H_2O_2 + Fe^{2+} ili Fe^{3+} . Koncentracije dodatih hemikalija su bile 82 i 87 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za H_2O_2 i/ili 46 i 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za čestice gvožđa. Pri promeni potencijala u pozitivnom smeru od 0,03 do 0,55 V DP voltamogrami su snimani pre i nakon uzastopnog dodatka Fe^{2+} i H_2O_2 u pomoćni elektrolit (krajnje koncentracije su bile 2 i 3 mmol L^{-1} (111,7 i 102,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) za Fe^{2+} i H_2O_2 , redom). Parametri DPV merenja su bili sledeći: amplituda pulsa 50 mV, potencijal koraka 5 mV i vreme modulacije 50 ms.

DPV merenja pri navedenim parametrima su rađena i primenom MnO_2 -SPCE u različitim model rastvorima: pomoćni elektrolit; pomoćni elektrolit + Fe^{2+} ; pomoćni elektrolit + ACT; pomoćni elektrolit + ACT + H_2O_2 ; i pomoćni elektrolit + ACT + H_2O_2 + Fe^{2+} . Pomoćni elektrolit je

bio fosfatni pufer ($0,06 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,50). Sistem koji sadrži pomoćni elektrolit pH 2,8 + H_2O_2 + ACT u prisustvu i odsustvu Fe^{2+} je takođe ispitivan. Koncentracije ACT, H_2O_2 i Fe^{2+} su bile 0,31; 3,0 i $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (70,0; 102,1 i $111,7 \mu\text{g mL}^{-1}$), redom.

3.3.4.2. Ciklična voltametrijska merenja u model sistemima

Ciklični voltamogrami su snimani u pomoćnom elektrolitu (10,0 mL) bez i u prisustvu H_2O_2 kao ciljnog analita pri promeni potencijala u negativnom smeru počevši od 1,0 V do -1,0 V i pri brzini polarizacije od 50 mV s^{-1} primenom CPE, MWCNT/CPE, Pt-MWCNT/CPE, MnO_2 -MWCNT/CPE, SPCE, MnO_2 -SPCE, MWCNT-SPCE, Pd-MWCNT-SPCE, Pd-MWCNT/SPCE i Pt-MWCNT-SPCE. U slučaju CPE i Pt-C/CPE merenja su rađena i pri brzini polarizacije od 25 mV s^{-1} . U zavisnosti od tipa radne elektrode kao pomoćni elektrolit korišćeni su fosfatni pufer pH 7,50, acetatni pufer pH 4,50 i boratni pufer pH 9,18.

3.3.4.3. Amperometrijska merenja u model sistemima i analiza uzoraka

Amperometrijska merenja primenom CPE i MnO_2 -CPE u model sistemima i određivanje H_2O_2 u uzorcima podzemne vode tretiranim Fentonovim i Fentonu-sličnim reagensima

Amperometrijski odzivi četiri radne elektrode: nemodifikovane CPE i tri zapreminski modifikovane CPE sa različitim masenim udelom MnO_2 (5,0%, 7,5% i 10,0%) su upoređeni pri različitim radnim potencijalima između 0,10 V i 0,70 V, dok je koncentracija H_2O_2 bila u opsegu od 47 do $232 \mu\text{g mL}^{-1}$ za nemodifikovanu CPE i od 18 do $87 \mu\text{g mL}^{-1}$ za MnO_2 -CPE. Za analitičke svrhe 5%- MnO_2 -CPE je polarizovana pri radnom potencijalu od 0,40 V i koncentracioni opseg H_2O_2 je bio između 5 i $65 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sva merenja primenom ovih radnih elektroda su rađena u fosfatnom puferu pH 7,50 kao pomoćnom elektrolitu. Naime, nakon snimanja bazne linije u toku 60 s (ili 40 s), alikvoti H_2O_2 su dodavani mikropipetom svakih 30 s (ili 20 s) uz konstantno mešanje rastvora.

Amperometrijska metoda zasnovana na 5%- MnO_2 -CPE i radnom potencijalu od 0,40 V je primenjena za određivanje H_2O_2 u uzorcima podzemne vode tretiranim Fentonovim i Fentonu-sličnim reagensima. U oba slučaja merenja su vršena nakon filtriranja uzoraka kroz filter od staklenih vlakana ($0,6 \mu\text{m}$) i mikromembranski filter ($0,22 \mu\text{m}$). Nakon snimanja bazne linije (10,0 mL fosfatnog pufera pH 7,50), 1,0 mL uzorka je dodat u voltametrijsku ćeliju uz mešanje rastvora, a potom i tri standardna dodatka H_2O_2 . Sva merenja su rađena u tri ponavljanja.

Amperometrijska merenja primenom SPCE i MnO₂-SPCE u model sistemima i određivanje H₂O₂ u model uzorcima ACT tretiranim Fentonovim i foto-Fentonovim reagensima

U model sistemima sa 0,2 mol L⁻¹ fosfatnim puferom pH 7,50 kao pomoćnim elektrolitom i primenom SPCE i MnO₂-SPCE, alikvoti H₂O₂ su dodati u koncentracionom opsegu od 0,75 do 5,05 mmol L⁻¹ (od 25,4 do 171,8 µg mL⁻¹) pri uslovima konstantnog mešanja, dok su elektrode polarizovane pri konstatnom potencijalu (ispitivani opseg od 0,20 do 0,70 V). Za analitičke svrhe MnO₂-SPCE je polarizovana pri radnom potencijalu od 0,40 V i koncentracioni opseg H₂O₂ je bio između 0,13 i 1,24 mmol L⁻¹ (od 4,3 do 42,2 µg mL⁻¹). Koncentracija H₂O₂ u model uzorcima ACT tretiranim Fentonovim i foto-Fentonovim procesom je određena odmah nakon odmrzavanja uzoraka pri analognim amperometrijskim uslovima i primenom metode standardnog dodatka.

Amperometrijska merenja primenom CPE i Pt-C/CPE u model sistemima i određivanje H₂O₂ u rastvoru za dezinfekciju i rastvoru za čišćenje kontaktnih sočiva

U slučaju Pt-C/CPE, alikvoti H₂O₂ su dodati u 10,0 mL fosfatnog pufera (0,1 mol L⁻¹, pH 7,50) pri konstantnom mešanju u opsegu koncentracija H₂O₂: 1,17–11,59 µg mL⁻¹ (radni potencijal od -0,10 do 0,50 V), 0,15–1,45 µg mL⁻¹ (radni potencijal od 0,15 do 0,50 V), 8,49–83,38 µg mL⁻¹ (-0,20 V) i 16,94–163,56 µg mL⁻¹ (radni potencijal od -0,30 do -0,70 V). Amperogrami su takođe snimani u acetatnom puferu (0,1 mol L⁻¹, pH 4,50) kao pomoćnom elektrolitu pri radnim potencijalima 0,50 i 0,60 V, pri čemu je koncentracija H₂O₂ bila u opsegu 0,15–1,45 µg mL⁻¹. Takođe, merenja su sprovedena i primenom nemodifikovane CPE na odabranim radnim potencijalima.

Za analizu rastvora za dezinfekciju, 0,010 mL razblaženog uzorka (videti poglavlje 3.3.2) je dodato u 10,0 mL fosfatnog pufera (0,1 mol L⁻¹, pH 7,50) u toku amperometrijskih merenja (pri radnom potencijalu 0,20 V), a zatim su dodata još četiri standardna dodatka H₂O₂. U slučaju analize rastvora za kontaktna sočiva, nakon stabilizacije bazne linije 0,010 mL razblaženog uzorka je dodato u 10,0 mL acetatnog pufera (0,1 mol L⁻¹, pH 4,50) i četiri standardna dodatka H₂O₂ pri radnom potencijalu 0,50 V. Takođe, koncentracija H₂O₂ je metodom standardnog dodatka određena i u uzorcima rastvora kontaktnih sočiva koji su dobijeni neutralizacijom/degradacijom H₂O₂ primenom AOSept® Pt-diska nakon njihovog odgovarajućeg razblaženja. Naime, odgovarajuće zapremine uzoraka (tabela 3) u njihovoj razblaženoj (0,25 mL uzorka razblaženo bidestilovanom

vodom u odmernom sudu od 25,0 mL) ili nerazblaženoj formi su dodate u 10,0 mL acetatnog pufera (0,1 mol L⁻¹, pH 4,50) pri radnom potencijalu 0,50 V. U svim slučajevima dodata su četiri standardna dodatka H₂O₂ pri čemu su krajnje koncentracije dodatih inkremenata H₂O₂ u voltametrijskoj ćeliji iznosile: 0,15, 0,29, 0,44 i 0,58 μg mL⁻¹.

Tabela 3. Zapremine uzoraka rastvora kontaktnih sočiva dobijenih neutralizacijom/degradacijom H₂O₂ pomoću AOSept[®] Pt-diska u određenim vremenskim intervalima koje su primenjene za amperometrijsku analizu.

Vremenski interval [min]	Zapremina uzorka [mL]
	Razblaženi uzorak
0	0,010
2	0,010
5	0,010
10	0,020
30	0,10
	Nerazblaženi uzorak
60	0,010
120	0,020
240	0,080
360	0,10

Svi eksperimenti su vršeni u tri ponavljanja.

Amperometrijska merenja primenom MWCNT/CPE, Pt-MWCNT/CPE i MnO₂-MWCNT/CPE u model sistemima i određivanje H₂O₂ u spajkovanom uzorku mleka

Radne elektrode MWCNT/CPE, Pt-MWCNT/CPE i MnO₂-MWCNT/CPE su primenjene za amperometrijska merenja H₂O₂ u model sistemima, i to u prisustvu acetatnog (pH 4,50), fosfatnog (pH 7,50) i boratnog (pH 9,18) pufera kao pomoćnog elektrolita. Alikvoti H₂O₂ su dodati u koncentracionom opsegu od 25,4 do 171,8 μg mL⁻¹ pri uslovima konstantnog mešanja rastvora, dok su radne elektrode polarizovane pri konstantnom potencijalu (ispitivani opseg od 0,20 do 0,70 V i od 0,00 do -0,80 V). Za detaljnija analitička istraživanja, Pt-MWCNT/CPE je polarizovana pri

potencijalu od -0,10 V i 0,40 V u sva tri tipa pufera, i koncentracioni opseg H_2O_2 je u ovom slučaju bio između 4,25 i 33,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dok je MnO_2 -MWCNT/CPE testirana u baznoj sredini pri potencijalu 0,40 V. Dodatno, odziv Pt-MWCNT/CPE je detaljno ispitan u acetatnom puferu za određivanje H_2O_2 u opsegu koncentracija od 23,5 do 139,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pri radnom potencijalu od -0,75 V.

U toku optimizacije amperometrijske metode dva tipa uzorka su analizirana: sveže sirovo kravlje mleko i supernatant-surutka dobijena zakišeljavanjem mleka i njegovim centrifugiranjem (u prisustvu i odsustvu H_2O_2). Obično, alikvot uzorka zapremine 1,0 ili 0,10 mL je direktno dodat u 10,0 mL pomoćnog elektrolita (fosfatnog pufera, pH 7,50 ili acetatnog pufera, pH 4,50) pri amperometrijskim uslovima. Pri optimizovanim uslovima, amperometrijska merenja su vršena primenom Pt-MWCNT/CPE kao radne elektrode, pri radnom potencijalu -0,75 V u acetatnom puferu (pH 4,50; 0,1 mol L^{-1}). Za kvantifikaciju primenjena je metoda standardnog dodatka dodavanjem 1,0 mL surutke (bez ili spajkovane sa H_2O_2) u 10,0 mL pomoćnog elektrolita i potom sukcesivnim dodavanjem nekoliko jednakih zapremina standardnog H_2O_2 rastvora pri stalnom mešanju. Eksperimenti su vršeni u tri ponavljanja.

Amperometrijska merenja primenom SPCE, MWCNT-SPCE, Pd-MWCNT-SPCE, Pd-MWCNT/SPCE, GOx/SPCE, GOx/Pd-MWCNT/SPCE i GOx/Pd-MWCNT-SPCE u model sistemima i određivanje glukoze u uzorku meda

Odgovarajući alikvoti H_2O_2 su dodati u 10,0 mL fosfatnog pufera (0,1 mol L^{-1} , pH 7,50), pri čemu su ispitivane koncentracije H_2O_2 bile u opsegu 0,76–4,53 mmol L^{-1} (25,9–154,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) za SPCE, 0,76–3,79 mmol L^{-1} (25,8–128,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) ili 0,76–3,06 mmol L^{-1} (25,8–104,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) za MWCNT-SPCE, 0,41–4,12 mmol L^{-1} (14,2–140,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) za Pd-MWCNT-SPCE i Pd-MWCNT/SPCE. Radni potencijali su bili u opsegu od 0,50 V do -0,50 V u slučaju Pd-MWCNT-SPCE i Pd-MWCNT/SPCE, dok je širi opseg primenjen u slučaju drugih elektroda. Amperometrijska merenja glukoze su sprovedena primenom biosenzora GOx/SPCE, GOx/Pd-MWCNT-SPCE i GOx/Pd-MWCNT/SPCE pri radnom potencijalu -0,20 V. Koncentracija glukoze u medu je određena primenom GOx/Pd-MWCNT-SPCE metodom standardnog dodatka pri optimizovanim amperometrijskim uslovima (radni potencijal -0,40 V). Alikvot prethodno pripremljenog uzorka zapremine 0,700 mL je dodat u 10,0 mL 0,1 mol L^{-1} fosfatnog pufera pH 7,50, a potom i dva standardna dodatka rastvora glukoze.

Amperometrijska merenja primenom Pt-MWCNT-SPCE i GOx/Pt-MWCNT-SPCE u model sistemima i određivanje glukoze u uzorku belog grožđa i komprimata/tableta

U slučaju Pt-MWCNT-SPCE, alikvoti H_2O_2 su dodati u 10,0 mL fosfatnog pufera ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,50) pri konstantnom mešanju u opsegu koncentracija H_2O_2 : 4,4–43,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (radni potencijal od 0,70 do -0,30 V), 13,1–127,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (radni potencijal od -0,20 do -0,40 V), 26,2–248,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (radni potencijal od -0,50 do -0,80 V). Amperometrijska merenja glukoze su vršena primenom GOx/Pt-MWCNT-SPCE pri radnom potencijalu -0,50 V u opsegu koncentracija glukoze 65,8–260,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sadržaj glukoze u uzorku belog grožđa određen je primenom GOx/Pt-MWCNT-SPCE i metode standardnog dodatka pri optimizovanim amperometrijskim uslovima (radni potencijal -0,50 V). Alikvot prethodno pripremljenog uzorka (0,700 mL) je dodat u 10,0 mL $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatnog pufera pH 7,50, a zatim su dodata tri standardna dodatka rastvora glukoze. Koncentracija glukoze u tabletama sa aromom jagode je određena takođe primenom GOx/Pt-MWCNT-SPCE na -0,50 V. 0,700 mL prethodno pripremljenog uzorka je dodato u 10,0 mL $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatnog pufera pH 7,50, a potom i tri standardna dodatka rastvora glukoze. U oba slučaja, merenja su vršena u tri ponavljanja.

Granica detekcije (GD) i granica određivanja (GO) u slučaju svih amperometrijskih merenja su računane na osnovu odnosa signala ciljnog analita i šuma bazne linije koji iznosi 3 puta, odnosno 10 puta.

3.3.5. HPLC-DAD merenja

Paralelna reverzno fazna hromatografska merenja za merenje koncentracije ACT u Fentonovim i foto-Fentonovim model uzorcima su rađena pri sledećim uslovima: mobilna faza je bila smeša vode i acetonitrila (80:20, v/v), brzina protoka $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, injektovana zapremina uzorka $5,0 \mu\text{L}$, temperatura kolone $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i radna talasna dužina DA-detektora 242 nm sa referentnom talasnom dužinom 500 nm.

3.3.6. Spektrofotometrijska merenja

Uporedna spektrofotometrijska merenja su vršena radi određivanja sadržaja H_2O_2 u rastvoru za dezinfekciju i uzorcima rastvora za kontaktna sočiva. Titanijum-sulfat test reagens je pripremljen na osnovu procedure koju je opisao Eisenberg [47]. Ukratko: 1 g anhidrovanog TiO_2 (Merck) je

digestovano sa 100 mL cc. H_2SO_4 (p.a. 95-97%, Zorka Pharma, Srbija) u toku 16 h na peščanom kupatilu pri temperaturi 150 °C. Smeša je ohlađena, razblažena sa 4 zapreminska dela bidestilovanom vodom i nakon 12 h sedimentacije vršeno je centrifugiranje u staklenim kivetama na sobnoj temperaturi u toku 15 min (3400 rpm), umesto filtracije kroz azbestni filter kako je navedeno u originalnom postupku [47]. Na slici 28 je prikazan izgled reagensa pre (A) i nakon centrifugiranja (B).



Slika 28. Izgled titanijum-sulfat reagensa pre (A) i nakon centrifugiranja (B).

Komparativna spektrofotometrijska merenja se zasnivaju na stvaranju žuto obojene pertitanske kiseline u reakciji između H_2O_2 i titanijum-sulfat test reagensa (Ti(IV)) u kiseljoj vodenoj sredini. Odnos titanijum-sulfat reagensa i rastvora H_2O_2 ($731,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) je optimizovan u cilju dobijanja osetljive analitičke metode. Izvedena su četiri seta eksperimenata merenjem alikvota standardnog rastvora H_2O_2 u opsegu zapremina od 0,020 mL do 0,18 mL koji su razbleženi bidestilovanom vodom do zapremine 3,0 mL. Različite zapremine titanijum-sulfat reagensa su dodate u slučaju razblaženih rastvora H_2O_2 kao što sledi: I) $9,74\text{--}43,86 \mu\text{g mL}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 0,10 \text{ mL}$ reagensa, II) $9,74\text{--}43,86 \mu\text{g mL}^{-1} + 0,15 \text{ mL}$, III) $9,74\text{--}38,99 \mu\text{g mL}^{-1} + 0,20 \text{ mL}$ i IV) $4,87\text{--}19,49 \mu\text{g mL}^{-1} + 0,30 \text{ mL}$. Apsorbanca je određena na talasnoj dužini 407 nm i optimalna analitička metoda je dobijena poređenjem parametara kalibracionih krivi koje su dobijene korelacijom koncentracija H_2O_2 i odgovarajućih apsorbanci.

Merenja uzoraka su vršena u tri ponavljanja metodom standardnog dodatka nakon njihovog odgovarajućeg razblaženja. 0,25 mL rastvora za dezinfekciju ili AOSep[®] Plus rastvora za

kontaktna sočiva je razblaženo bidestilovanom vodom u odmernom sudu zapremine 25,0 mL na isti način kao u slučaju pripreme uzoraka za amperometrijska merenja. 0,080 mL tako pripremljenog uzorka je pomešano sa 2,92 mL bidestilovane vode i 0,30 mL reagensa. Nakon snimljenog spektra uzorka dodata su četiri standardna dodatka H_2O_2 (krajnje koncentracije dodataka H_2O_2 u spektrofotometrijskoj kivetu su bile: 2,21, 4,40, 6,59 i 8,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$) i koncentracija H_2O_2 je određena u oba komercijalno dostupna proizvoda. U slučaju AOSept[®] uzorka neutralizacija/degradacija H_2O_2 je ispitana takođe primenom spektrofotometrije. Odgovarajuće zapremine uzoraka (tabela 4) u njihovoj razblaženoj (0,25 mL uzorka razblaženo bidestilovanom vodom u odmernom sudu od 25,0 mL) ili nerazblaženoj formi su pomešane sa bidestilovanom vodom do krajnje zapremine 3,0 mL nakon čega je u svim slučajevima dodato 0,30 mL titanijum-sulfat reagensa. Nakon snimanja spektra uzorka primenjena je metoda standardnog dodatka, i sadržaj H_2O_2 je određen za sve vremenske intervale tretmana rastvora za kontaktna sočiva. Za vremenske inkremente 240 i 360 min testirane zapremine uzorka su pokazale različite spektralne karakteristike i nisu se mogle primeniti za analitičke svrhe.

Tabela 4. Zapremine uzoraka rastvora kontaktnih sočiva dobijenih neutralizacijom/degradacijom H_2O_2 pomoću AOSept[®] Pt-diska u određenim vremenskim intervalima koje su primenjene za spektrofotometrijsku analizu.

Vremenski interval [min]	Zapremina uzorka [mL]
	Razblaženi uzorak
0	0,080
2	0,090
5	0,12
10	0,20
30	0,90
	Nerazblaženi uzorak
60	0,070
120	0,16
240	0,90
360	1,0

3.3.7. Komparativna merenja glukoze primenom komercijalno dostupnog aparata

Optimizovana zapremina (3,0 μL) prethodno pripremljenog uzorka livadskog meda, uzorka belog grožđa ili uzorka tableta (videti poglavlje 3.3.2.) je direktno naneto na test-traku, i rezultat je očitavan sa displeja Accu-Chek Active aparata. Meranja su vršena u tri ponavljanja.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

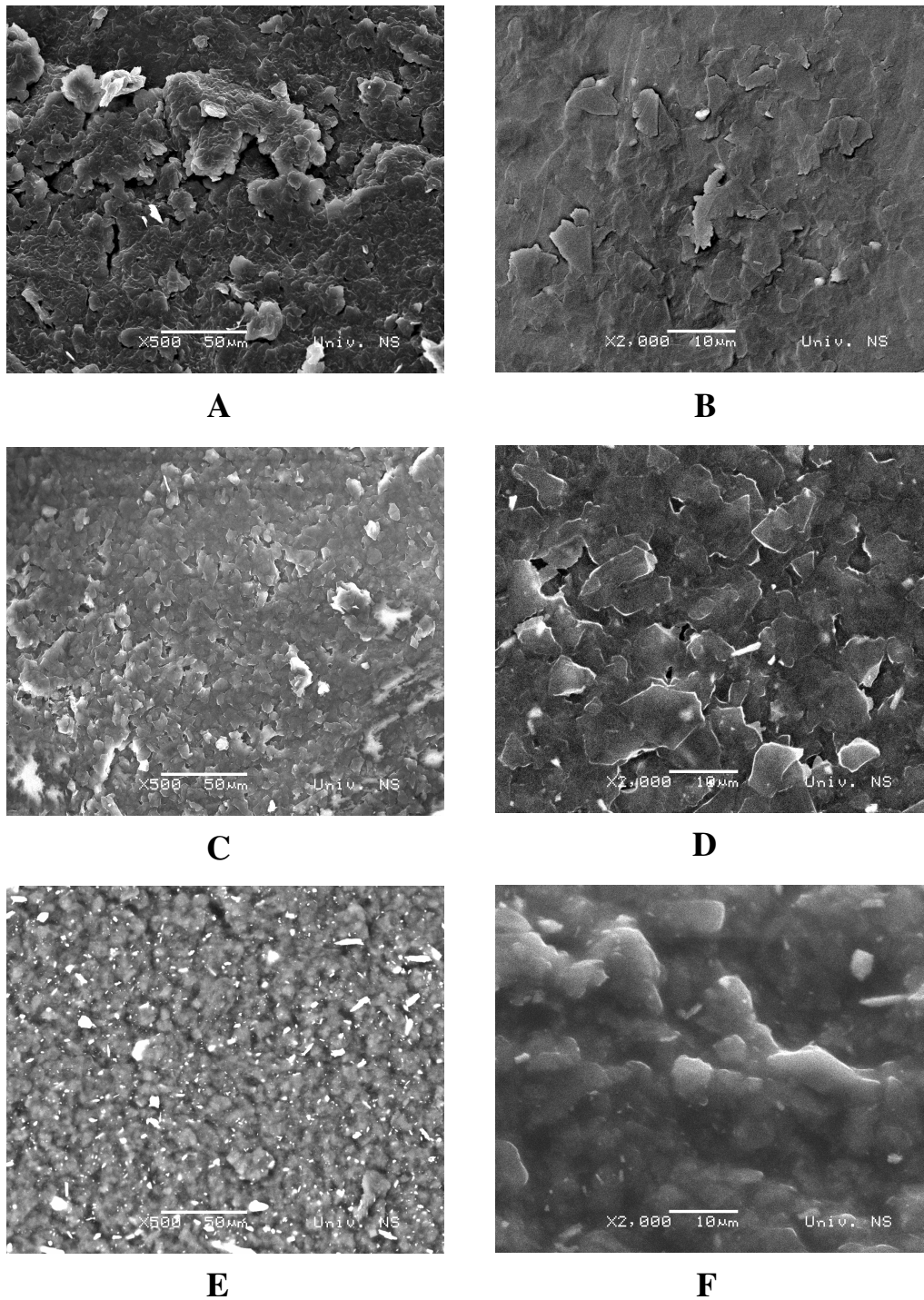
4.1. Amperometrijsko određivanje H_2O_2 primenom MnO_2 modifikovane elektrode od ugljenične paste u uzorcima podzemne vode tretiranim Fentonovim i Fentonu-sličnim reagensima [213]

Osnovni cilj ovog istraživanja je bio optimizacija amperometrijske metode zasnovane na jednostavnoj, klasičnoj elektrodi od ugljenične paste zapreminski modifikovanoj sa MnO_2 (MnO_2 -CPE) za određivanje H_2O_2 u procesu uklanjanja visokog sadržaja prirodnih organskih materija (POM) iz uzorka podzemne vode primenom Fentonove i Fentonu-slične reakcije. Fokus je bio na ispitivanju mogućnosti određivanja potrošnje H_2O_2 pri različitim početnim koncentracionim odnosima specija Fe i H_2O_2 .

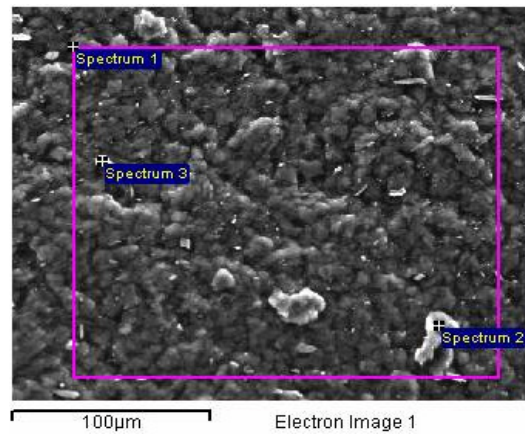
4.1.1. Poređenje elektroda od ugljenične paste – nemodifikovane i zapreminski modifikovanih sa različitim količinama MnO_2

MnO_2 je primenjen u svojstvu zapreminskog modifikatora ugljenične paste. Kao prvo, reprezentativne površine CPE sa masenim udelom MnO_2 od 5% (slika 29A, B), 7,5% (slika 29C, D) i 10% (slika 29E, F) su okarakterisane primenom SEM. Na svim površinama se uočavaju dva karakteristična regiona: relativno homogen matriks i svetle čestice nepravilnog oblika koje su uglavnom uronjene u matriks. Matriks ugljenične paste se sastoji od parafinskog ulja i čestica grafitnog praha uniformne veličine što ga čini relativno kompaktnom osnovnom masom. Mikrodimenzione svetle čestice predstavljaju modifikator i nasumično su raspoređene na površinama sva tri tipa elektroda, pri čemu se njihova najveća zastupljenost uočava kod 10%- MnO_2 -CPE.

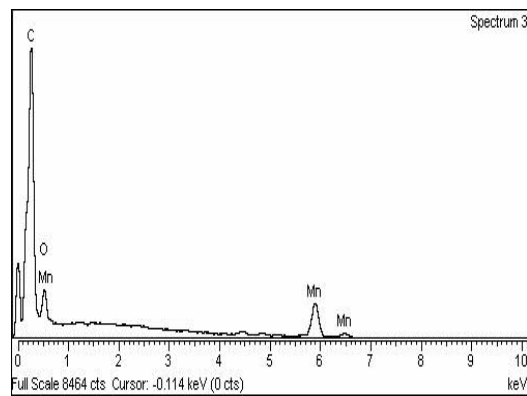
EDS merenja su izvršena na različitim lokacijama reprezentativne površine 10%- MnO_2 -CPE (slika 30), izabranim tako da sadrže pomenute svetle čestice (slika 30A spektar 3, B) i matriks (slika 30A spektar 1, C). Ova merenja su potvrdila da površina elektrode zaista sadrži MnO_2 i ugljenični matriks.



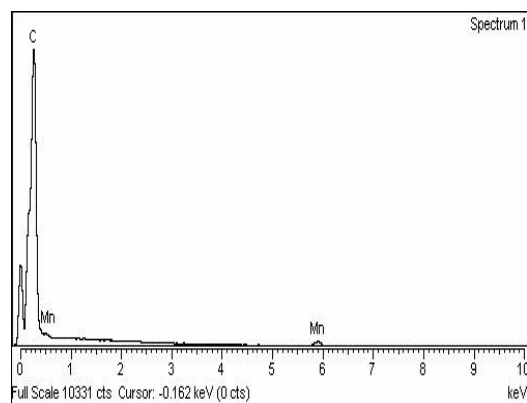
Slika 29. SEM prikaz površine 5%-MnO₂-CPE (A, B), 7,5%-MnO₂-CPE (C, D) i 10%-MnO₂-CPE (E, F) pri uvećanju 500 (A, C, E) i 2000 (B, D, F) puta.



A



B

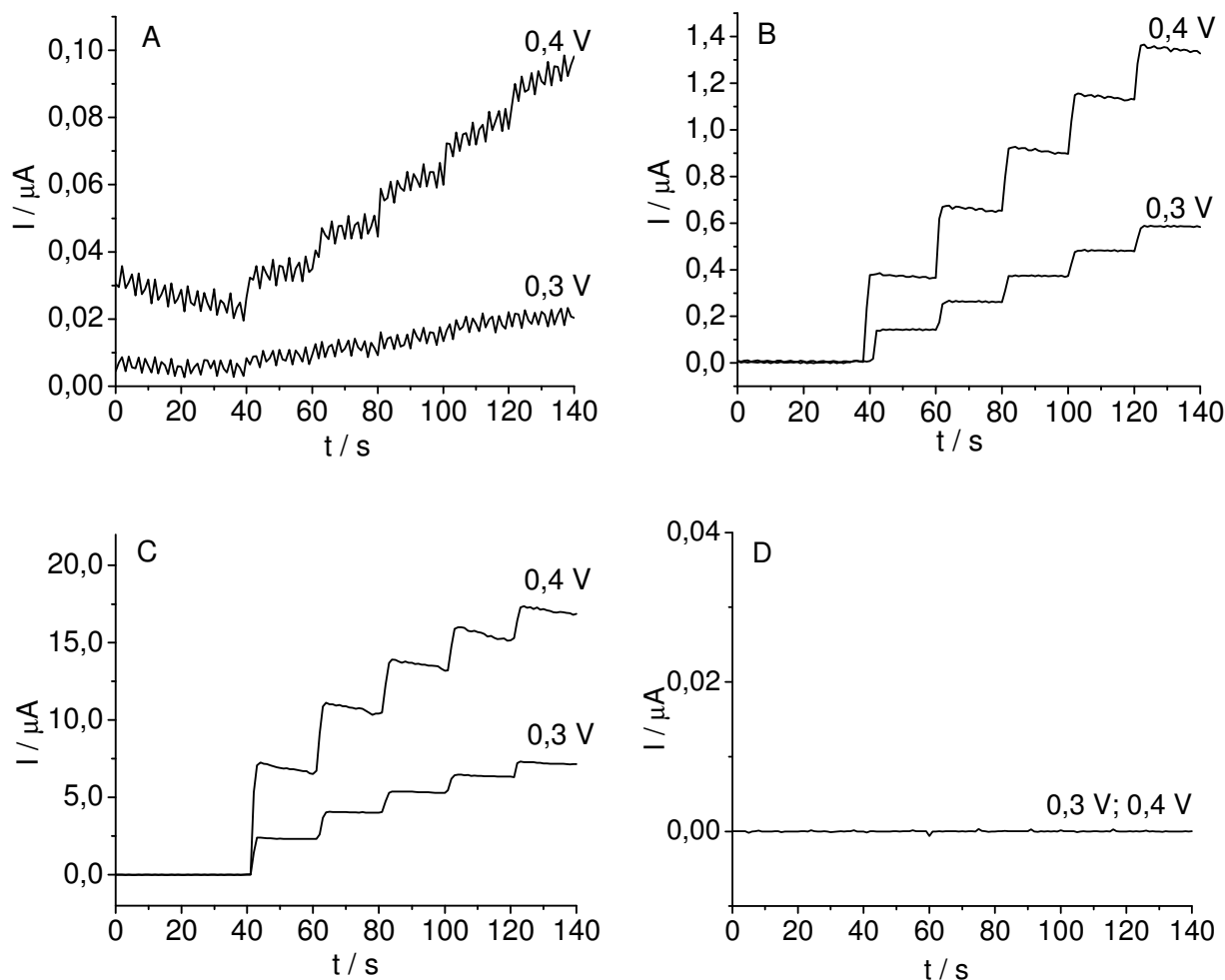


C

Slika 30. Prikaz reprezentativnog dela površine 10%-MnO₂-CPE (A) i spektri EDS mikroanalize čestica MnO₂ (B) inkorporiranih u ugljenični matriks (C).

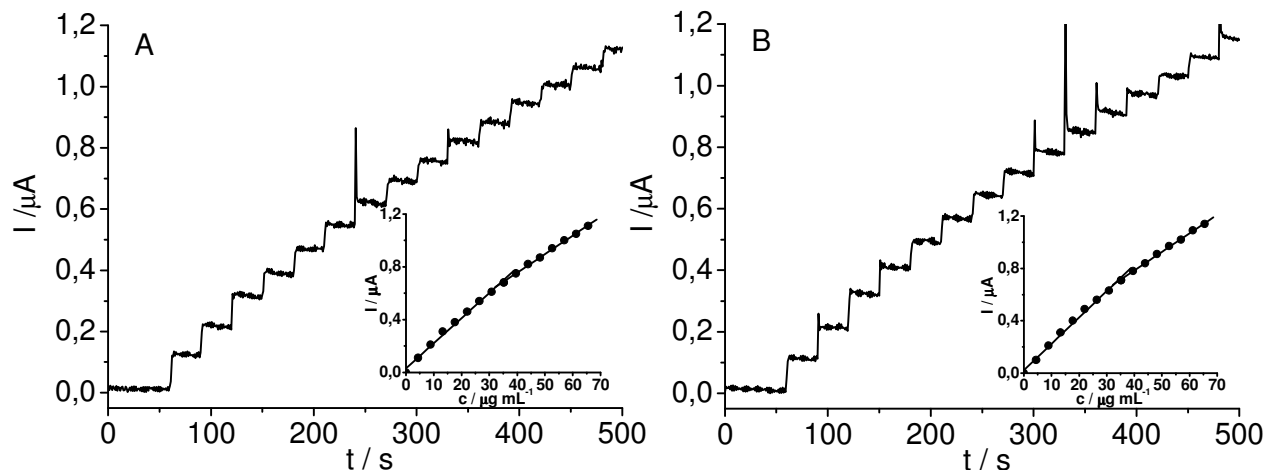
U cilju odabira pogodne radne elektrode i potencijala za određivanje koncentracije H_2O_2 u uzorcima tretiranim Fentonovim i Fentonu-sličnim reagensima, primenljivost nemodifikovane CPE, 5%- MnO_2 -CPE, 7,5%- MnO_2 -CPE i 10%- MnO_2 -CPE je detaljno ispitana poređenjem njihovih amperometrijskih odziva pri istim eksperimentalnim uslovima. Na osnovu ranijih istraživanja [58, 107, 113, 175, 176], utvrđeno je da se primenom MnO_2 modifikatora/medijatora postiže katalitički efekat i samim tim znatno poboljšanje u intenzitetu signala H_2O_2 . Na slici 31 su prikazane odabrane reprezentativne amperometrijske krive dobijene u toku optimizacije analitičke metode za određivanje H_2O_2 u model sistemima pri radnom potencijalu 0,30 i 0,40 V i može se uočiti da samo prisustvo kao i količina MnO_2 imaju znatan uticaj na odziv radne elektrode. Naime, dok su amperometrijske krive dobijene primenom 5%- MnO_2 -CPE (slika 31B) i 7,5%- MnO_2 -CPE (slika 31C) očekivanog oblika, CPE daje teško vidljive stepeničaste signale H_2O_2 (slika 31A). U suprotnosti sa svima njima, amperometrijske krive H_2O_2 dobijene primenom 10%- MnO_2 -CPE se podudaraju sa baznom linijom pri svim radnim potencijalima između 0,10 i 0,70 V. Stoga je ova radna elektroda bila isključena iz daljih eksperimenata. Uočeno ponašanje 10%- MnO_2 -CPE je u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima istraživanja vezanim za ispitivanje uticaja količine modifikatora MnO_2 na kvalitet odziva pri potenciometrijskom određivanju H_2O_2 [177]. U slučaju nemodifikovane CPE moguće je dobijanje linearne kalibracione krive na 0,40 V kao i na višim radnim potencijalima, iako signali H_2O_2 daleko zaostaju u pogledu intenziteta u odnosu na modifikovane elektrode i na potencijalu npr. 0,40 V obiluju i igličastim šumovima (tabela 5). 7,5%- MnO_2 -CPE daje strujne signale oko 10 puta intenzivnije u odnosu na 5%- MnO_2 -CPE. Međutim, 5%- MnO_2 -CPE je pogodnija za primenu zbog bolje reproduktivnosti stepeničastih signala, odnosno daje proporcionalniji porast analitičkog signala u zavisnosti od dodate količine ciljnog analita, naročito pri 0,30 i 0,40 V.

Detaljnija analiza odziva 5%- MnO_2 -CPE je sprovedena dodatkom nižih koncentracija H_2O_2 pri radnom potencijalu 0,40 V. Na slici 32A i B su prikazana dva ponovljena merenja sa istom senzorskom površinom. Uočava se da I-c (pri čemu je I intenzitet strujnog signala a c je koncentracija ciljnog analita) kalibracione krive u opsegu koncentracija H_2O_2 od 5 do 65 $\mu\text{g mL}^{-1}$ imaju blagu konveksnost i mogu se aproksimirati na dva linearna opsega (umetak na slici 32A, B, tabela 5). U toku ovog istraživanja, utvrđeno je da vrednost GO za 5%- MnO_2 -CPE iznosi 1,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ H_2O_2 .



Slika 31. Amperometrijski odzivi CPE (A), 5%-MnO₂-CPE (B), 7,5%-MnO₂-CPE (C) i 10%-MnO₂-CPE (D) pri radnom potencijalu 0,30 i 0,40 V; opseg koncentracija H₂O₂: od 47 do 232 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (A) i od 18 do 87 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (B-D); pomoćni elektrolit fosfatni pufer pH 7,50.

Proučavanje reproduktivnosti odziva 5%-MnO₂-CPE je izvršeno u cilju provjere stabilnosti amperometrijskih signala H₂O₂ i mogućih promena u njihovom obliku zbog potencijalnog efekta gubitka MnO₂ iz ugljenične paste [58, 107, 113, 117, 175, 176]. Merenja su izvedena dodavanjem pet puta iste zapremine H₂O₂ u pomoćni elektrolit, i sve to je ponovljeno šest puta. RSD je računata za svaki stepeničasti signal i njena vrednost je bila između 0,8 i 2,5%, pri čemu je najviša vrednost dobijena za poslednji dodatak H₂O₂.



Slika 32. Amperometrijske krive H_2O_2 (A, B) snimljene uzastopno primenom 5%- MnO_2 -CPE i odgovarajuće kalibracione krive sa dva linearna opsega; radni potencijal 0,40 V, fosfatni pufer pH 7,50; H_2O_2 koncentracije između 5 i 65 $\mu g mL^{-1}$.

Tabela 5. Analitički parametri određivanja H_2O_2 primenom nemodifikovane CPE i 5%- MnO_2 -CPE u fosfatnom puferu pH 7,50 pri radnom potencijalu 0,40 V.

Parametar	CPE	5%- MnO_2 -CPE
Linearni opseg [$\mu g mL^{-1}$]	25-232	1,4-35
Nagib [$\mu A mL \mu g^{-1}$]	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Odsečak [μA]	-0,003	0,02
Koeficijent korelacije	0,997	0,996
GD [$\mu g mL^{-1}$]	8	0,4
GO [$\mu g mL^{-1}$]	25,0	1,4
RSD [%]	2,9	0,8

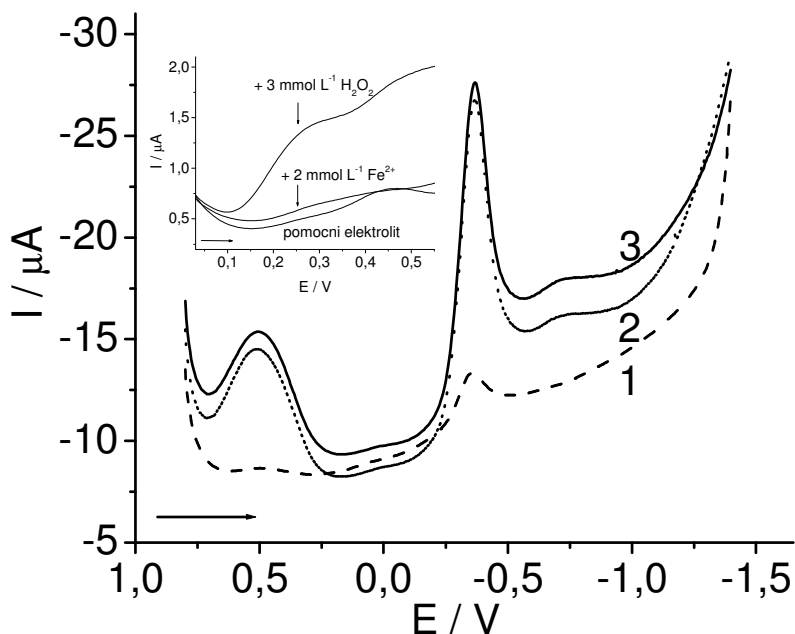
Na osnovu dobijenih rezultata, 5%- MnO_2 -CPE i radni potencijal 0,40 V su odabrani za analitička merenja H_2O_2 u uzorcima. Takođe, treba imati u vidu da mehanička obnova površine elektrode zahteva ponovnu kalibraciju zbog nasumične raspodele MnO_2 čestica u ugljeničnom matriksu.

4.1.2. Eksperimentalni model sistemi za tretman uzoraka vode

U cilju detaljnijeg uvida u osnovne procese koji utiču na određivanje H_2O_2 , dva tipa model sistema su ispitana primenom 5%- MnO_2 -CPE.

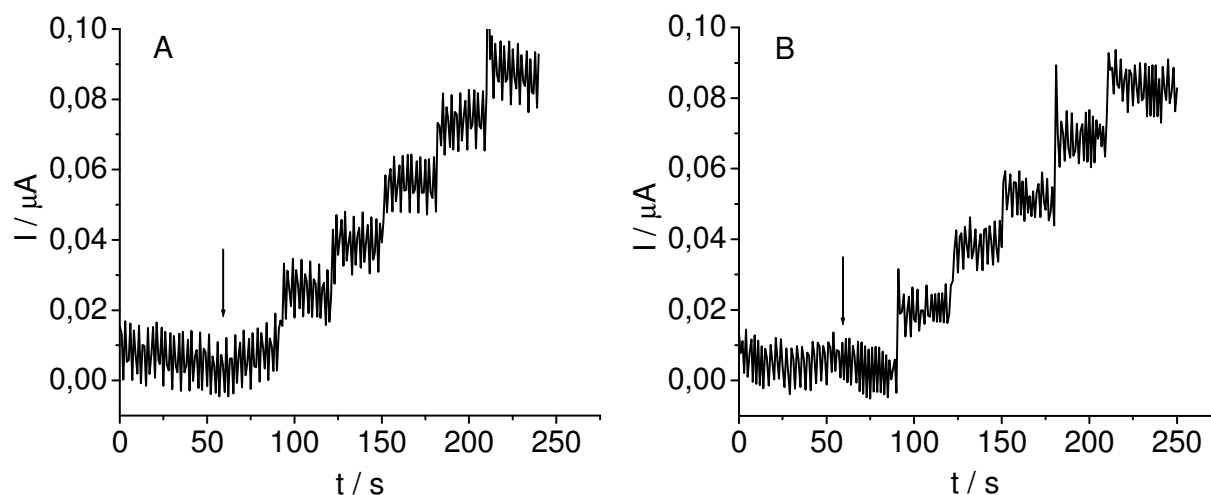
Kao prvo, DPV merenja su vršena u opsegu potencijala od 0,80 do -1,40 V u tri različita rastvora koji su služili za karakterizaciju voltametrijskog ponašanja Fentonovog reagensa (Fe^{2+} i H_2O_2) u fosfatnom puferu pH 7,50 (slika 33). U prvom slučaju, rastvor Fe^{2+} je dodat odmah pre merenja (krajnja koncentracija $46 \mu\text{g mL}^{-1}$, slika 33, kriva 1), u drugom, dodat je samo H_2O_2 (krajnja koncentracija $87 \mu\text{g mL}^{-1}$, slika 33, kriva 2), dok su u trećem slučaju dodati i Fe^{2+} i H_2O_2 (slika 33, kriva 3) u rastvor pomoćnog elektrolita. Važno je napomenuti da je dodatak Fe^{2+} , naročito u prisustvu H_2O_2 , praćen brzom precipitacijom hidroksida gvožđa, usled hidrolize prisutnih Fe čestica u blago alkalnoj sredini [214]. Međutim, DPV merenja su rađena bez prethodnog filtriranja rastvora. U prvom slučaju, uočava se jedan pik sa maksimumom na -0,45 V, koji se može smatrati osnovnim signalom 5%- MnO_2 -CPE, što je u saglasnosti sa ranije objavljenim karakteristikama CPE modifikovanim sa MnO_2 [58, 107, 113, 117, 175, 176]. U slučaju drugog model rastvora, javljaju se tri pika, već pomenuti pik sa maksimumom na -0,45 V ali znatno većeg intenziteta i dva nova signala sa maksimumima na 0,50 V i -0,73 V. Pik na 0,50 V se može pripisati redoks reakciji H_2O_2 , dok su dva pika u negativnoj oblasti potencijala povezana sa katalitičkim efektom MnO_2 prema H_2O_2 , što je u saglasnosti sa ranije sprovedenim istraživanjima iz ove oblasti [58, 107, 113, 117, 175, 176]. U slučaju trećeg model rastvora, koji sadrži H_2O_2 i kome je znatna količina Fe^{2+} dodata neposredno pre merenja, uočeni pikovi su ostali praktično isti kao i za drugi model sistem.

Ukoliko se potencijal menja u pozitivnom smeru od 0,03 do 0,55 V (umetak, slika 33), uočeno je da se signal pomoćnog elektrolita preklapa između 0,40 i 0,50 V sa DPV krivom snimljenom odmah nakon dodatka rastvora Fe^{2+} (krajnja koncentracija 2 mmol L^{-1} ($111,7 \mu\text{g mL}^{-1}$)). Kada se u takav sistem zatim doda i H_2O_2 (krajnja koncentracija 3 mmol L^{-1} ($102,1 \mu\text{g mL}^{-1}$)), zapažen oksidacioni signal H_2O_2 se javlja u opsegu od 0,15 do 0,55 V, što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima [58, 107, 113, 117, 175, 176]. Analogni DPV eksperimenti u opsegu 0,03 do 0,55 V su izvršeni i u prisustvu Fe^{3+} umesto Fe^{2+} i zaključak je sličan kao i u opisanom slučaju.



Slika 33. Kvalitativni diferencijalno pulsni voltamogrami dobijeni primenom 5%-MnO₂-CPE u fosfatnom puferu pH 7,50. Promena potencijala u negativnom smeru od 0,80 do -1,40 V: Fe²⁺ (46 μg mL⁻¹) (1); H₂O₂ (87 μg mL⁻¹) (2); Fe²⁺ (45 μg mL⁻¹) i H₂O₂ (82 μg mL⁻¹) (3). Umetak: DPV krive snimljene pri promeni potencijala u pozitivnom smeru od 0,03 do 0,55 V pre i nakon uzastopnog dodavanja Fe²⁺ i H₂O₂ u rastvor pomoćnog elektrolita, krajnje koncentracije označene na krivama.

U narednom koraku, snimljene su kvalitativne amperometrijske krive pri radnom potencijalu podešenom na 0,40 V kako bi se ispitalo ponašanje H₂O₂ signala u pomoćnom elektrolitu (10,0 mL) kome je dodat 1,0 mL netretirane podzemne vode (slika 34A) ili 1,0 mL bidestilovane vode (slika 34B). U toku izvođenja oba eksperimenta, bazna linija je snimana prvih 60 s, onda je dodat 1,0 mL netretirane podzemne vode ili bidestilovane vode, a zatim na svakih 30 s alikvoti H₂O₂ zapremine 10,0 μL uzastopno pet puta, pri čemu je porast koncentracije H₂O₂ iznosio 0,5 μg mL⁻¹ sa svakim dodatkom. Uočava se da su amperometrijske krive praktično ostale nepromenjene u odnosu na baznu liniju dodatkom vode. Takođe, stepeničasti signali koji potiču od dodataka H₂O₂ su sličnog intenziteta u oba slučaja, na osnovu čega se može zaključiti da ispitivani matriks podzemne vode ne utiče signifikantno na H₂O₂ signale.

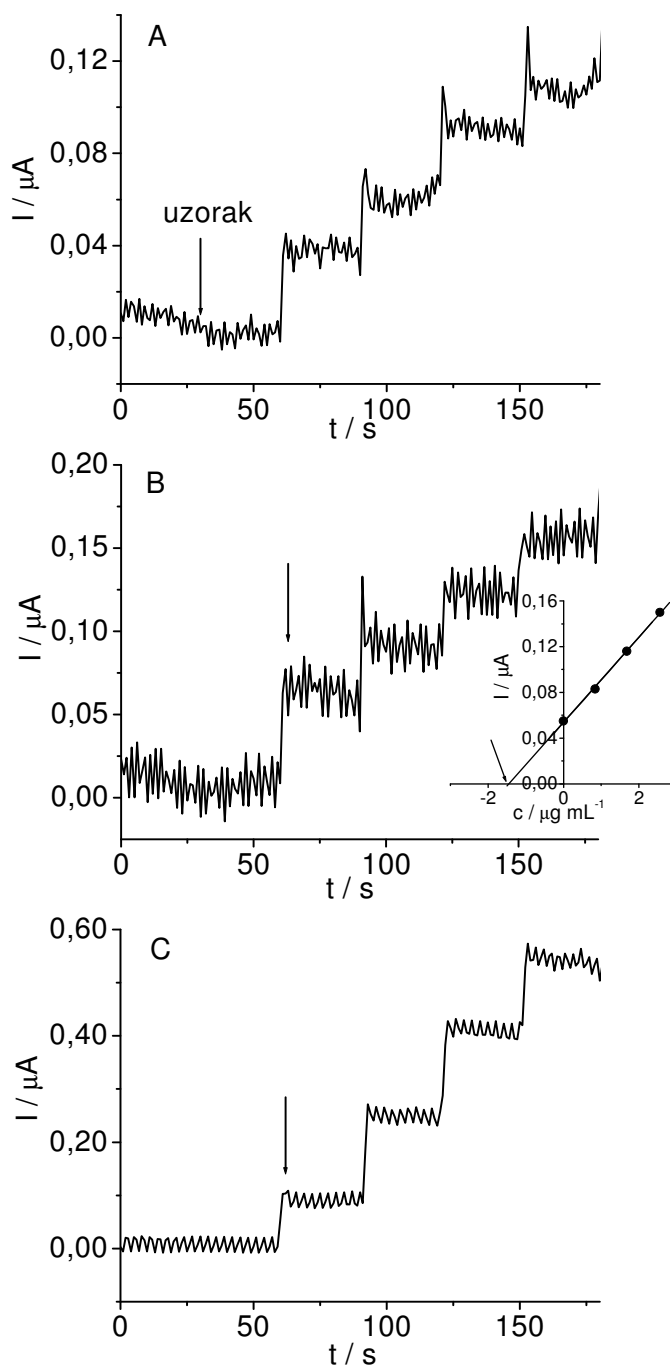


Slika 34. Kvalitativni amperometrijski signali H_2O_2 (inkrementi po $0,5 \mu g mL^{-1}$) dobijeni primenom 5%- MnO_2 -CPE na $0,40 V$ u fosfatnom puferu $pH 7,50$ nakon dodatka (označeno strelicom) $1,0 mL$ netretirane podzemne vode (A) i bidestilovane vode (B).

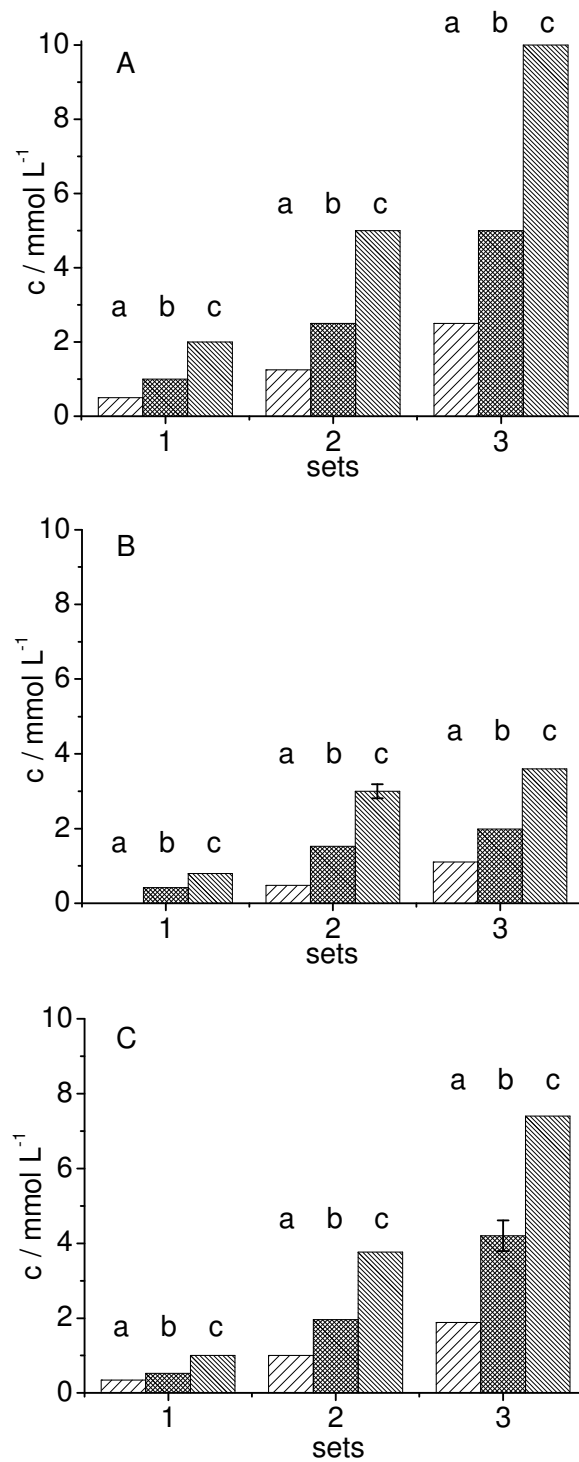
4.1.3. Analiza realnih uzoraka – tretiranih podzemnih voda

Podzemna voda iz Centralnog Banatskog regiona (Autonomna Pokrajina Vojvodina, Srbija) je tretirana Fentonovim i Fentonu-sličnim reagensima u cilju uklanjanja POM. Korišćeni su različiti odnosi koncentracija Fe^{2+} i H_2O_2 , kao i Fe^{3+} i H_2O_2 , kako bi se pronašle optimalne doze pomenutih hemikalija za tretman vode. Uzorci podzemne vode tretirani na odgovarajući način su analizirani primenom optimizovane amperometrijske metode radi dobijanja informacija o sadržaju H_2O_2 nakon izvršenog tretmana. Odabrane ilustrativne amperometrijske krive su prikazane na slici 35, dok je potrošnja H_2O_2 prikazana u vidu histograma na slici 36.

Kao što se može videti na slici 35, u slučaju najniže koncentracije Fe^{2+} ($0,1 mmol L^{-1}$), tri različite početne koncentracije H_2O_2 su primenjene ($0,5, 1,0$ i $2,0 mmol L^{-1}$) i uzorci nakon Fentonovog tretmana daju različite strujne intenzitete u smislu dobijenih amperometrijskih signala. Pri najnižoj početnoj koncentraciji H_2O_2 , dodatak $1,0 mL$ uzorka vode u voltometrijsku ćeliju ne utiče na signal bazne linije, što znači da je koncentracija H_2O_2 bila ispod GD predložene amperometrijske metode (slika 35A). Tri uzastopna dodatka rastvora H_2O_2 istom sistemu pokazuju da oksidacioni signali H_2O_2 nisu bili potisnuti pod uticajem matriksa. Dodatna merenja su izvedena sa $5,0 mL$ pomoćnog elektrolita i $25,0 mL$ istog uzorka, i dobijeni su isti rezultati, odnosno signal H_2O_2 nije bio merljiv, dok visok sadržaj matriksa nije uticao na signale standardnih dodataka H_2O_2 .



Slika 35. Amperometrijske krive dobijene primenom 5%- MnO_2 -CPE pri radnom potencijalu 0,40 V u fosfatnom puferu pH 7,50 za uzorke sa nepoznatom koncentracijom H_2O_2 nakon njihovog tretmana Fentonovim procesom (strelice označavaju vreme injektovanja uzorka). Početni sistemi sadrže $0,1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$ i tri inicijalne koncentracije H_2O_2 (mmol L^{-1}): 0,5 (A); 1,0 (B); 2,0 (C).

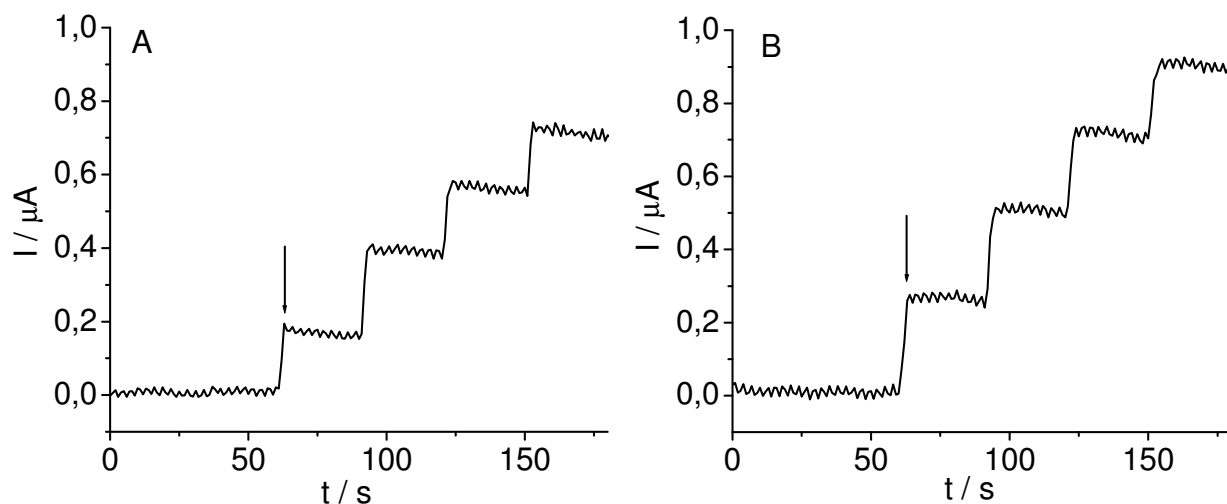


Slika 36. Sadržaj H_2O_2 u sirovoj podzemnoj vodi pre (A) i nakon Fentonovog (B) i Fentonu-sličnog (C) tretmana sa tri početne koncentracije čestica gvožđa: 0,1 (1); 0,25 (2) i 0,5 (3) $mmol L^{-1}$ i tri različita H_2O_2 odnosa (1:5 (a); 1:10 (b) i 1:20 (c)).

Imajući u vidu GD metode, može se zaključiti da u slučaju rastvora koji sadrži $0,1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$ i $0,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ cela količina H_2O_2 je izreagovala u Fentonovom procesu i na osnovu komparativnih proučavanja [29] postignuta je niska efikasnost u uklanjanju POM (14%). Primenom viših početnih koncentracija H_2O_2 ($1,0$ i $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$), nakon tretmana podzemne vode, dobijaju se merljivi amperometrijski signali (slika 35B, C) pri čemu je preostala koncentracija H_2O_2 u sistemu iznosila $0,4$ i $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$, redom. Umetak na slici 35B prikazuje odgovarajuću analitičku pravu konstruisanu na osnovu analize signala uzorka i tri uzastopna standardna dodatka H_2O_2 . Svi dobijeni amperometrijski signali su analizirani na isti način i rezultati su prikazani u formi histograma na slici 36B. Koeficijenti korelacije analitičkih pravi su bili u intervalu od $0,999$ do $0,984$, dok RSD određivanja H_2O_2 u tri ponovljena merenja nije prelazila 10% . Na osnovu histograma prikazanih na slici 36, može se uočiti da je u jednom sistemu (slika 35A) H_2O_2 totalno potrošen, dok u ostalim slučajevima tretmana podzemne vode Fentonovim i Fentonu-sličnim reagensima različite količine H_2O_2 su ostale neiskorišćene u toku oba procesa.

Takođe, treba napomenuti da je u toku Fentonu-sličnog tretmana znatno veća količina H_2O_2 ostala u sistemu, što se može objasniti osnovnim razlikama u mehanizmima Fentonovog i Fentonu-sličnog procesa. Kao primer različite aktivnosti Fe^{2+} i Fe^{3+} , na slici 37 su prikazani reprezentativni amperogrami dobijeni za uzorak tretiran istom početnom koncentracijom čestica Fe i H_2O_2 . Stoga, Fentonov proces se pokazao efikasnijim u smislu uklanjanja POM, jer je maksimalna redukcija DOC iznosila 55% u poređenju sa 33% koliko je postignuto u Fentonu-sličnom procesu.

Postignuti rezultati pokazuju da razvijena amperometrijska metoda omogućava praćenje sadržaja H_2O_2 u Fentonovim i Fentonu-sličnim sistemima uklanjanja POM iz podzemne vode. Iako na odgovarajućim tehnološkim šemama postoji deo za uklanjanje čestica gvožđa i viška H_2O_2 kao i potencijalnih degradacionih intermedijera, informacija o potrošnji H_2O_2 je još uvek značajan faktor za efikasan proces uklanjanja POM. Razvijena analitička metoda je jednostavna, ekonomski pristupačna, ekološki prihvatljiva i pogodna za *in situ* merenja. Sa druge strane, pruža dobijanje brzih odziva u pouzdanom intervalu poverenja, i stoga može služiti za praćenje H_2O_2 u takvim tipovima uzoraka. Prednost senzora se ogleda i u činjenici da se sastoji od jednostavnih i lako dostupnih komponenata.



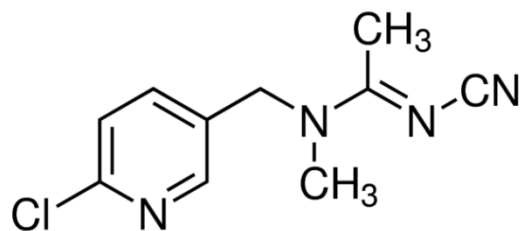
Slika 37. Poređenje amperometrijskih signala za uzorke sa nepoznatom koncentracijom H_2O_2 (strelice označavaju vreme injektovanja uzorka) i tri standardna dodatka H_2O_2 dobijenih primenom 5%- MnO_2 -CPE pri radnom potencijalu 0,40 V u fosfatnom puferu pH 7,50 pri koncentraciji Fe^{2+} (A) i Fe^{3+} (B) od $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ i istoj početnoj koncentraciji H_2O_2 ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$).

Iako sadržaj POM u podzemnoj vodi može znatno da varira, jednostavni model sistemi (I-E krive ili amperogrami) mogu ukazati na postojanje potencijalnih interferencija i drugih efekata kompleksnog matriksa. Ovi efekti mogu biti minimizovani odabirom pogodnog elektrodnog potencijala, pH podešavanjem i/ili uvođenjem dodatnog analitičkog koraka prečišćavanja ciljnog uzorka.

4.2. Amperometrijsko određivanje H_2O_2 primenom MnO_2 modifikovane štampane ugljenične elektrode u toku Fentonovog i foto-Fentonovog procesa uklanjanja acetamiprida iz vodene sredine [215]

Kao nastavak prethodnog istraživanja, u ovom poglavlju su dati rezultati ispitivanja primenljivosti štampane ugljenične elektrode zapreminski modifikovane sa MnO_2 (MnO_2 -SPCE) za amperometrijsko određivanje/praćenje sadržaja H_2O_2 u toku Fentonovog i znatno bržeg foto-Fentonovog procesa uklanjanja acetamiprida (ACT), reprezentativnog test organskog polutanta. Na slici 38 je ilustrativno prikazana shema postupka rada.

ACT, pripada grupi piridinskih insekticida – neonikotinoida, čiji se predstavnici primenjuju u više od 120 zemalja širom sveta. Struktura ACT je prikazana na slici 39. Do sada, neonikotinoidi su jedna od najvažnijih klasa insekticida predstavljeni na svetskom tržištu od pojave sintetičkih piretroida. Oni deluju sistemski kao sredstva za zaštitu useva od različitih štetočina kao što su lisne vaši, krompirova zlatica, trips, i druge. Kao snažni antagonisti nikotin acetilholinskih receptora oni deluju na nivou neurotransmisije insekata blokirajući receptore na postsinaptčkoj membrani što dovodi do paralize i konačno do smrti insekata [216-218]. Međutim, neadekvatna primena ovih insekticida i njihova tendancija da se akumuliraju u životnoj sredini (u zemljištu, sedimentima, podzemnim i površinskim vodama, tretiranoj i netretiranoj vegetaciji) može dovesti do kontaminacije okoline i izloženosti neciljnih organizama [219]. Stoga postoji potreba za razvijanjem metoda u cilju njihovog određivanja, kao i uklanjanja. Paralelna HPLC-DAD merenja su vršena radi praćenja razgradnje ACT.

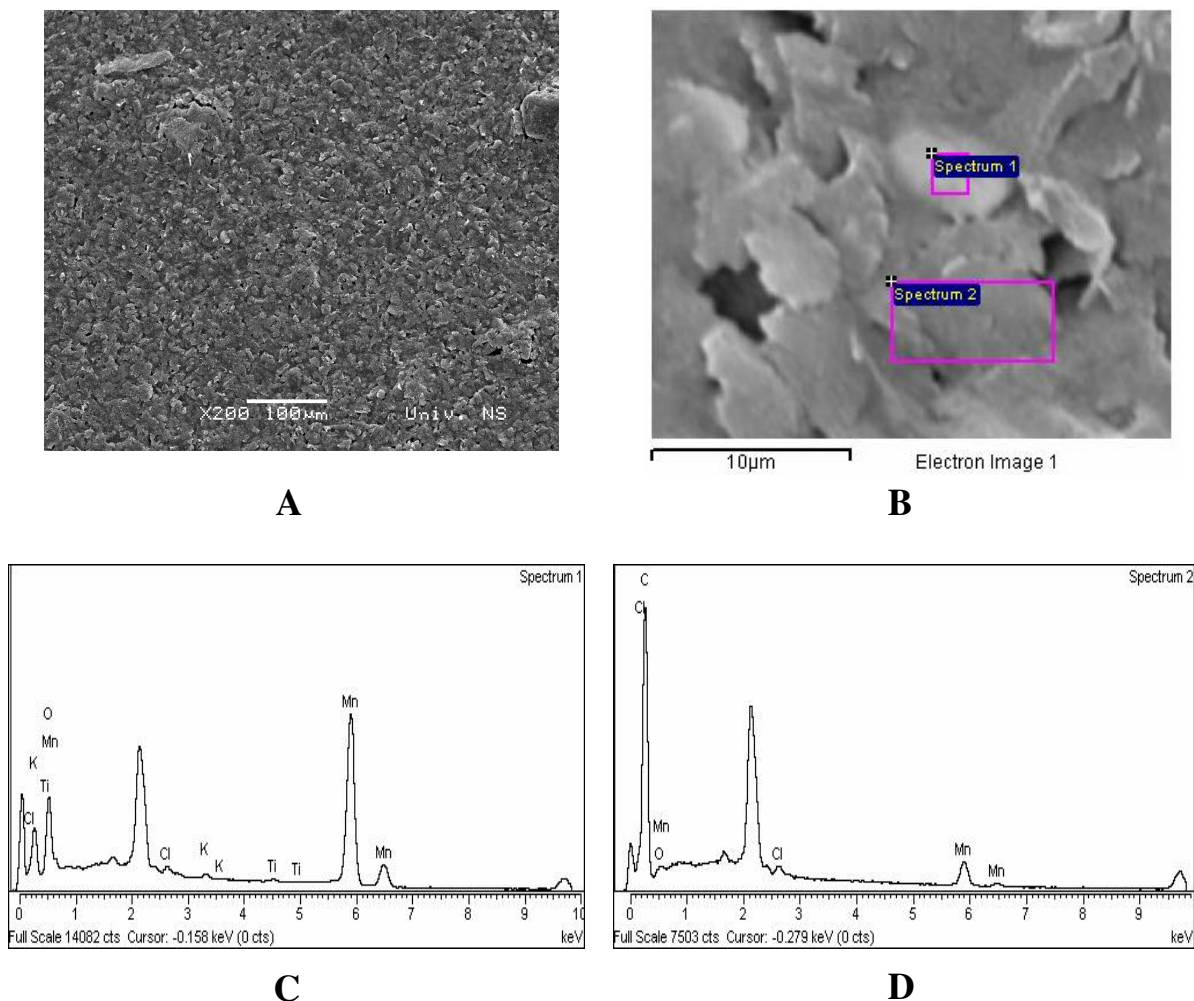


Slika 39. Struktura test organskog jedinjenja acetamiprida [220].

4.2.1. Karakterizacija MnO₂ modifikovane štampane ugljenične elektrode

Morfologija površine MnO₂-štampanog ugljeničnog senzora je proučavana primenom SEM (slika 40A), dok su odabrani reprezentativni delovi površine analizirani primenom EDS (slika 40B-D). Može se uočiti da površina MnO₂-SPCE sadrži gusto zbijene ugljenične čestice relativno uniformne veličine (oko 5–25 μm). U takvom matriksu se prepoznaju nasumično raspoređene svetle čestice (prečnika oko 5–10 μm) koje su delimično ili kompletno uronjene u ugljenični matriks. EDS merenja sprovedena na različitim lokacijama na elektrodnoj površini (slika 40B), odabranim tako da jedna od njih sadrži jasno vidljive svetle čestice, su pokazala da su ovi nehomogeniteti zapravo MnO₂ čestice (slika 40C, spektar 1), dok je analizom drugog dela elektrodne površine pokazano da ugljenični matriks u nekim slučajevima delimično prekriva MnO₂ čestice i stoga je signal koji potiče od ugljenika iz matriksa intenzivniji (slika 40D, spektar 2). Takođe, postoje oblasti na

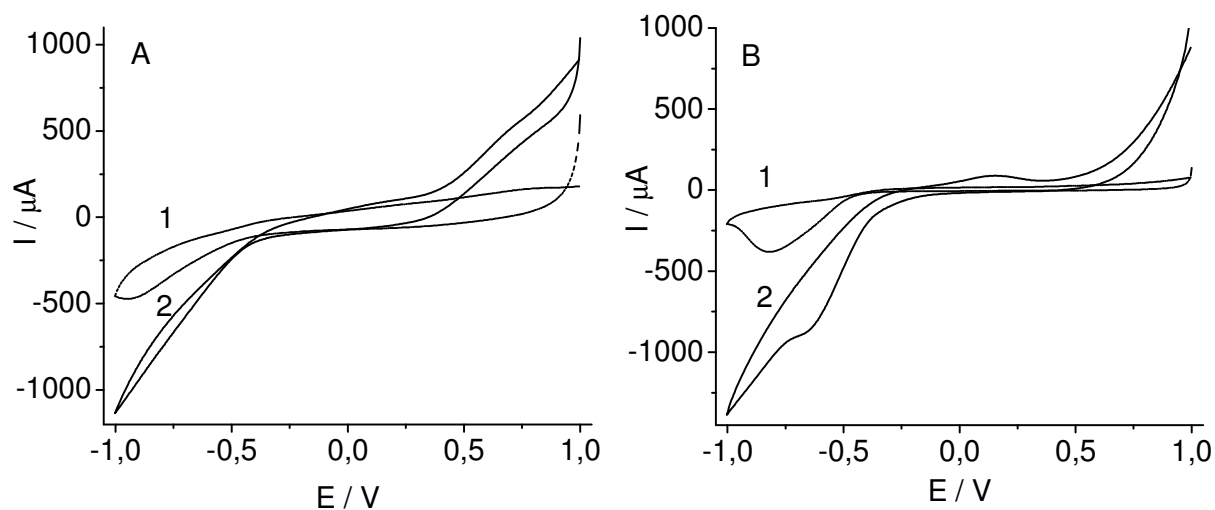
površini elektrode kod kojih je EDS signal ugljenika prisutan, dok se signali MnO_2 ne uočavaju, što potvrđuje i postojanje oblasti bez prisustva medijatora.



Slika 40. SEM prikaz reprezentativnih delova površine MnO_2 -SPCE (A, B) i spektri EDS mikroanalize čestica MnO_2 u ugljeničnom matriksu (C) ili skoro potpuno prekrivenih ugljeničnim matriksom (D).

Voltametrijsko ponašanje H_2O_2 na MnO_2 -SPCE je okarakterisano primenom ciklične voltametrije (slika 41A) i upoređeno sa ponašanjem na nemodifikovanoj SPCE (slika 41B). Bazne linije su snimljene za obe elektrode u fosfatnom puferu pH 7,50 u opsegu potencijala od 1,0 do -1,0 V, pri čemu je potencijal menjan u negativnom smeru (krive 1). Krive 2 prikazuju odziv elektroda u prisustvu H_2O_2 . Primenom modifikovane elektrode dobijena CV kriva u prisustvu H_2O_2

je praktično identična baznoj liniji pomoćnog elektrolita u opsegu potencijala od oko 0,20 do -0,40 V. U ovom slučaju evidentno je da se katalitička elektrohemijska oksidacija H_2O_2 odigrava na potencijalima pozitivnijim od 0,20 V, dok se proces redukcije odigrava na potencijalima negativnijim od -0,40 V. U slučaju nemodifikovane SPCE na baznoj liniji se uočava ireverzibilni redukcionni pik sa maksimumom na -0,81 V bez prisustva odgovarajućeg para u pozitivnom delu ciklusa. U prisustvu H_2O_2 redukcionni signal se javlja na -0,60 V, dok se u pozitivnom delu ciklusa uočava jedan mali pik sa maksimumom na 0,20 V. Značajnija oksidaciona struja se javlja na potencijalima pozitivnijim od 0,50 V koja je posledica direktne elektrohemijske oksidacije H_2O_2 . Na osnovu navedenog, modifikovana elektroda daje otprilike dva puta intenzivnije H_2O_2 strujne odzive na istim radnim potencijalima u odnosu na nemodifikovanu SPCE, naročito na potencijalima između 0,30 i 0,70 V. Kao što je poznato od ranije, prisustvo MnO_2 prouzrokuje smanjenje nadnapona za oksidaciju H_2O_2 na senzorskoj površini i povećanje intenziteta analitičkog signala usled elektrokatalitičkog efekta [58, 107, 112-115, 213]. Ovo je bio razlog zbog koga je MnO_2 -SPCE primenjena u daljem radu.



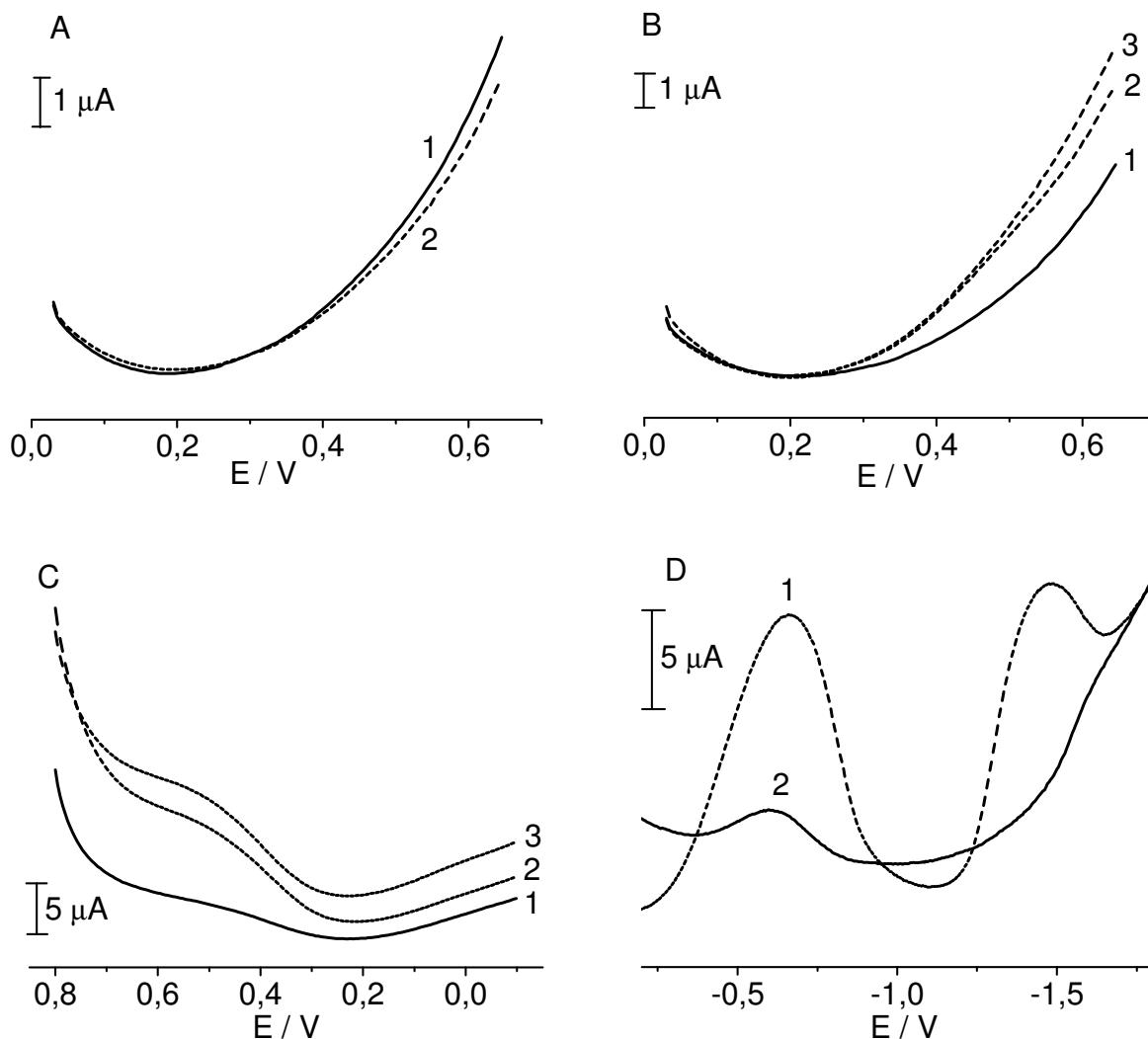
Slika 41. Ciklični voltamogrami snimljeni primenom MnO_2 -SPCE (A) i SPCE (B) u fosfatnom puferu pH 7,50 (krive 1) i u prisustvu 21 mmol L^{-1} (714 μg mL^{-1}) H_2O_2 (krive 2).

4.2.2. Optimizacija analitičkog postupka

Pre samog postupka praćenja koncentracije H_2O_2 u toku Fentonovog i foto-Fentonovog procesa različiti model sistemi su ispitani u cilju pronalaženja optimalnih uslova za pouzdano određivanje H_2O_2 primenom amperometrije.

DPV merenja su vršena kako bi se ispitalo voltametrijsko ponašanje Fentonovog reagensa na modifikovanoj elektrodi bez i u prisustvu ACT pri optimizovanim voltametrijskim uslovima u fosfatnom puferu pH 7,50 (slika 42A-C), kao i u slučaju kada je Fentonov (i foto-Fentonov) proces modelovan pri pH vrednosti 2,8 (slika 42D). Na slici 42A su prikazani rezultati DPV merenja pre (kriva 1) i nakon (kriva 2) dodatka Fe^{2+} rastvoru. Brza hidroliza Fe^{2+} je uočena usled blago alkalne sredine, ali slično kao i u prethodnim istraživanjima [213] za kvalitativna proučavanja rastvor nije filtriran pre merenja. Može se videti da je uticaj Fe^{2+} neznatan na potencijalima između 0,20 i 0,40 V. Na slici 42B je prikazan uticaj H_2O_2 (kriva 2) pri čemu se znatna oksidaciona struja javlja između 0,30 i 0,70 V, koja je uglavnom rezultat katalitičke oksidacije H_2O_2 . Dodatno prisustvo Fe^{2+} u sistemu (kriva 3) daje praktično nepromenjene rezultate kao u slučaju kada je samo H_2O_2 prisutan u opsegu potencijala između 0,05 i 0,45 V (kriva 2), što potvrđuje da joni ovog metala, pri navedenim eksperimentalnim uslovima, ne ometaju u većoj meri detekciju H_2O_2 . Opisan sistem je ispitan takođe pri polarizaciji u katodnom smeru između 0,80 i -0,10 V (slika 42C). U prisustvu H_2O_2 (kriva 2) dolazi do pojave pika između 0,70 i 0,30 V sa maksimumom na 0,45 V, dok Fe^{2+} (kriva 3) ima mali uticaj na oblik i intenzitet signala H_2O_2 . Naime, vrednosti površina pikova (krive 2 i 3) su međusobno u dobroj saglasnosti sa razlikom manjom od 5%. Takođe, treba napomenuti da prisustvo ACT u takvom sistemu nema direktnog uticaja na oblik signala H_2O_2 jer se samo jedan redukcionni pik ACT javlja na mnogo negativnijem potencijalu, odnosno na oko -1,50 V, i to samo u kiseloj sredini (slika 42D). Slika 42D prikazuje situaciju u kiseloj sredini (pH 2,8). Kriva 1 je rezultat DPV merenja pri promeni potencijala u katodnom smeru od -0,20 do -1,80 V, pri čemu rastvor sadrži ACT i H_2O_2 , dok kriva 2 predstavlja odziv istog sistema nakon dodatka Fe^{2+} . U pozitivnom opsegu potencijala između 0,20 i 0,70 V signali nisu detaljno razmatrani usled njihovog nezadovoljavajućeg oblika sa visokom pozadinskom strujom koja je dostigla vrednost oko 20 μA . U negativnoj oblasti potencijala uočena su dva pika. Kao i u slučaju ranijih istraživanja vezanih za proučavanje DPV ponašanja H_2O_2 na 5%- MnO_2 -CPE u fosfatnom puferu pH 7,50, intenzivan pik se javlja između -0,20 i -1,0 V sa maksimumom na -0,55 V u kiseloj sredini. Ovaj signal može biti posledica specifične interakcije između H_2O_2 i površine MnO_2 -SPCE. Na osnovu ranije publikovanih radova ukupna redukcija MnO_2 do oksida sa nižim oksidacionim stanjem mangana u kombinaciji sa redukcijom H_2O_2 mogu se smatrati mogućim razlogom pojave ovog signala [58]. Drugi pik koji se javlja između -1,20 i -1,70 V sa maksimumom na -1,50 V se može prepisati redukciji ACT, što je u saglasnosti sa elektrohemijjskim proučavanjima ACT na GCE [221].

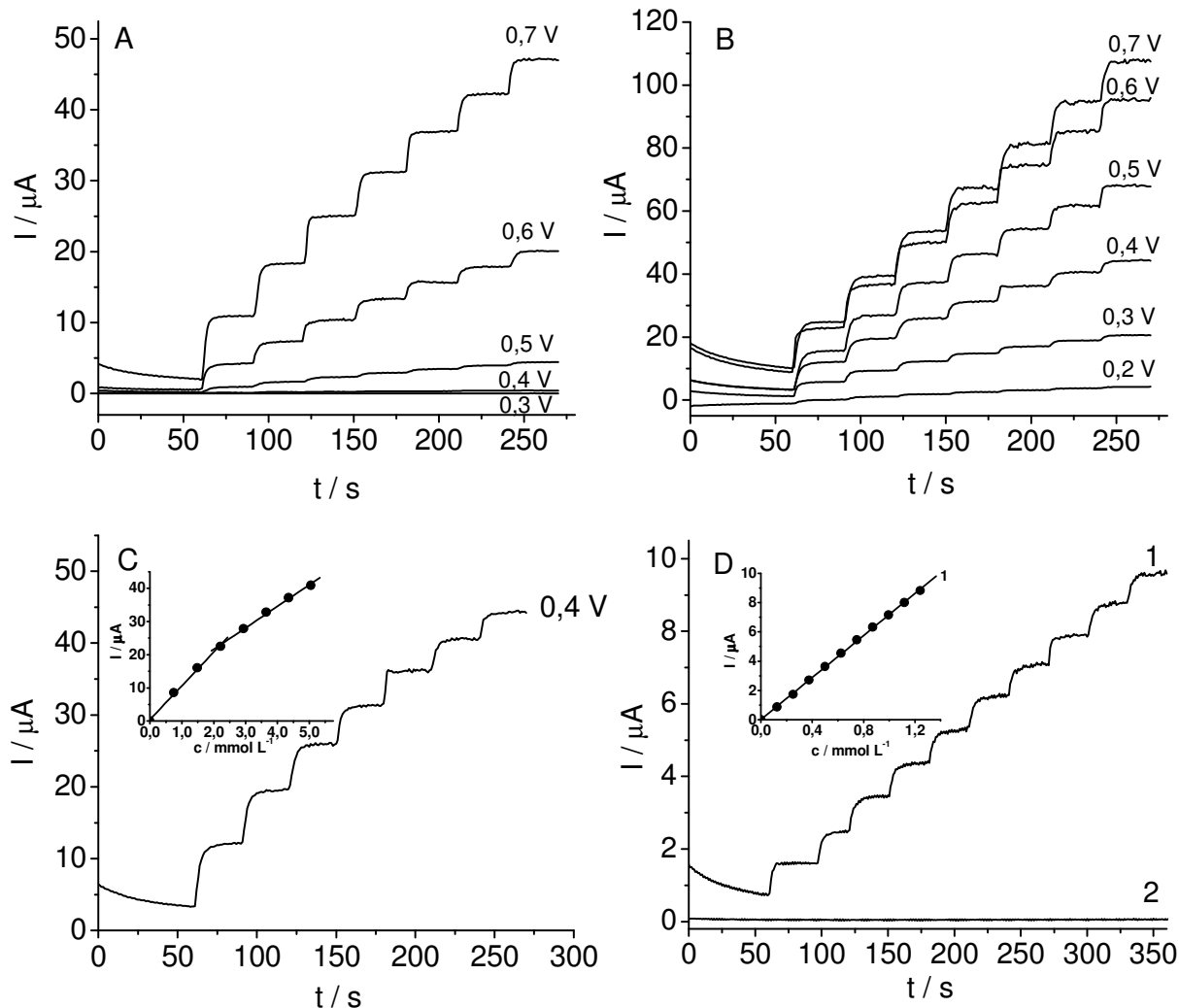
Dodavanjem Fe^{2+} u takav sistem, oba redukciona pika su znatno smanjena što ukazuje na to da je u toku razgradnja ACT i potrošnja H_2O_2 .



Slika 42. Kvalitativni diferencijalno pulsni voltamogrami model sistema: bazna linija – fosfatni pufer pH 7,50 (A-C, kriva 1); A) fosfatni pufer pH 7,50+ Fe^{2+} (kriva 2), B) fosfatni pufer pH 7,50+ H_2O_2 (kriva 2), fosfatni pufer pH 7,50+ H_2O_2 + Fe^{2+} (kriva 3), C) fosfatni pufer pH 7,50+ H_2O_2 (kriva 2), fosfatni pufer pH 7,50+ H_2O_2 + Fe^{2+} (kriva 3) i D) H_2O_2 +ACT (kriva 1) i H_2O_2 +ACT+ Fe^{2+} (kriva 2). pH pomoćnog elektrolita: A–C) 7,50 i D) 2,8. Koncentracije: 0,31; 2,0 i 3,0 mmol L^{-1} (70,0; 111,7 i 102,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) za ACT, Fe^{2+} i H_2O_2 , redom.

Dublje razmatranje i optimizacija eksperimentalnih uslova mogu otvoriti mogućnost *on-line* kontrolisanja takvih sistema. Nadalje, uočeno je da negativnija polarizacija MnO₂-SPCE (na oko -1,0 V i nižim potencijalima) dovodi do nepovoljnih ireverzibilnih promena u odzivu elektrode, što se može objasniti promenom oksidacionog stanja modifikatora [58, 222]. Usled ovog efekta elektroda gubi svoje osnovne karakteristike i dolazi do promene ili čak deaktivacije senzorske površine.

Pored DPV merenja, vršena su i amperometrijska merenja u model sistemu na pozitivnim radnim potencijalima između 0,20 i 0,70 V pri čemu je ciljani analit bio H₂O₂, a radna elektroda MnO₂-SPCE u skladu sa ranijim publikacijama o modifikovanim tipovima ugljeničnih elektroda poput SPCE i CPE [58, 107, 112-115, 213]. Signali H₂O₂, u opsegu koncentracija od 0,75 do 5,05 mmol L⁻¹ (od 25,4 do 171,8 μg mL⁻¹), snimljeni primenom nemodifikovane SPCE i MnO₂-SPCE (slika 43), su karakterističnog stepeničastog oblika, pri čemu su signali dobijeni primenom MnO₂-SPCE (slika 43B) znatno intenzivniji u poređenju sa signalima dobijenim primenom SPCE (slika 43A). Kao što je i bilo očekivano na osnovu prethodno snimljenih cikličnih voltamograma, promenom radnog potencijala ka pozitivnijim vrednostima dobijaju se intenzivniji signali H₂O₂. Nakon snimanja amperograma H₂O₂, konstruisane su odgovarajuće kalibracione krive. Detaljnije razmatranje amperometrijskih odziva MnO₂-SPCE (slika 43C) je ukazalo da je kalibraciona kriva konstruisana za radni potencijal 0,40 V, u opsegu koncentracija H₂O₂ od 0,75 do 5,05 mmol L⁻¹ (od 25,4 do 171,8 μg mL⁻¹), blago konveksna i može se aproksimirati na dva linearna opsega (umetak na slici 43C, tabela 6), slično kao i u slučaju odgovarajuće MnO₂-CPE [213]. Na slici 43D je prikazana amperometrijska kriva H₂O₂ dobijena primenom MnO₂-SPCE u nižem opsegu koncentracija od 0,13 do 1,24 mmol L⁻¹ (od 4,3 do 42,2 μg mL⁻¹). Procenjene vrednosti GD i GO za elektrodu MnO₂-SPCE iznose 0,003 i 0,010 mmol L⁻¹ (0,10 i 0,34 μg mL⁻¹), redom. Dobijanje linearnih kalibracionih kriva je bilo moguće čak i pri potencijalu 0,20 V, kao i pri potencijalima višim od 0,40 V. Međutim, radni potencijali viši od 0,45 V nisu od interesa za praktičnu primenu u slučaju ovakvih tipova uzoraka iz životne okoline usled rizika od oksidacije drugih supstanci što možda može da dovede do pozitivne greške/interferencija u toku određivanja H₂O₂. U slučaju nemodifikovane SPCE, stepeničasti signali su znatno manjeg intenziteta na potencijalima između 0,20 i 0,40 V. Osnovne karakteristike metoda su sumirane u tabeli 6.



Slika 43. Amperometrijski signali H_2O_2 dobijeni primenom nemodifikovane SPCE (A, D - kriva 2) i MnO_2 -SPCE (B, C, D - kriva 1) pri radnom potencijalu u opsegu od 0,30 do 0,70 V (A), 0,20 do 0,70 V (B) i 0,40 V (C, D) u fosfatnom puferu pH 7,50; opseg koncentracija H_2O_2 od 0,75 do 5,05 $mmol L^{-1}$ (od 25,4 do 171,8 $\mu g mL^{-1}$) (A, B, C) i od 0,13 do 1,24 $mmol L^{-1}$ (od 4,3 do 42,2 $\mu g mL^{-1}$) (D); umetci (C, D) prikazuju odgovarajuće kalibracione krive.

Reproduktivnost odziva MnO_2 -SPCE kao jedan od ključnih parametara kada se ima u vidu mogući gubitak modifikatora sa senzorske površine [58, 107, 112-115] je takođe ispitana dodavanjem uzastopno pet puta iste količine H_2O_2 i ponavljanjem merenja šest puta. RSD je

evaluirana za svaki stepeničasti signal H_2O_2 posebno i njena maksimalna vrednost je iznosila 4,2% u slučaju analitičke metode i 5,1% u slučaju šireg koncentracionog opsega H_2O_2 (videti tabelu 6).

Tabela 6. Osnovni parametri amperometrijskog određivanja H_2O_2 primenom nemodifikovane SPCE i MnO_2 -SPCE u fosfatnom puferu pH 7,50 pri radnom potencijalu 0,40 V.

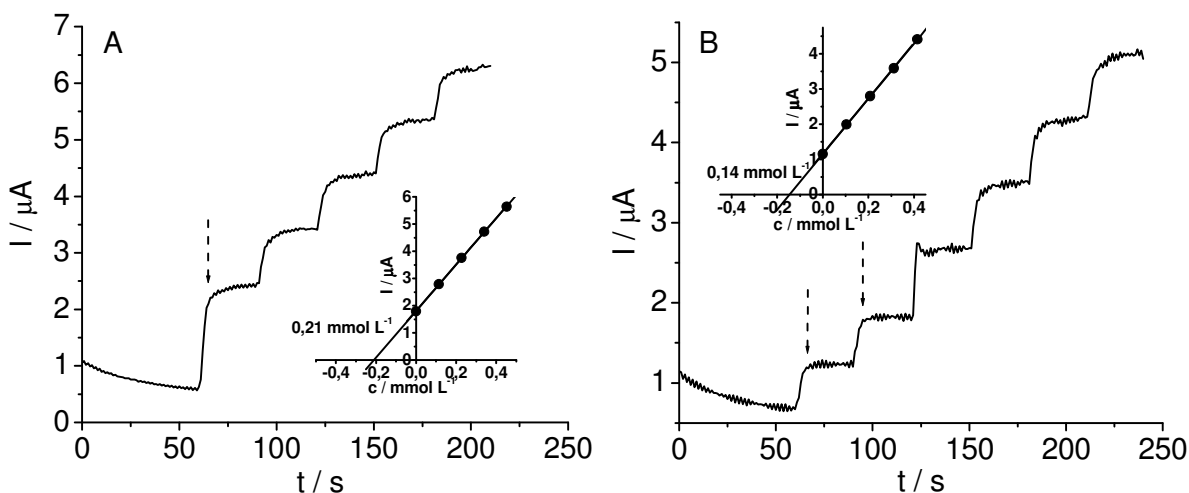
Parametar	SPCE	MnO_2 -SPCE	MnO_2 -SPCE	
Ispitivani opseg koncentracija [mmol L ⁻¹]	0,75-5,05	0,13-1,24	0,75-2,22	2,22-5,05
Nagib [$\mu A L mmol^{-1}$]	0,072	7,180	10,17	6,49
Odsečak [μA]	0,016	0,010	0,460	8,59
Koeficijent korelacije	0,997	0,999	0,998	0,998
GD [mmol L ⁻¹]	0,23	0,003	0,09	-
GO [mmol L ⁻¹]	0,75	0,010	0,30	2,22
RSD [%]	3,9	4,2	3,5	5,1

U narednim koracima istraživanja niži opseg koncentracija H_2O_2 je uzet u obzir za analitičke svrhe.

4.2.3. Određivanje i praćenje sadržaja H_2O_2 u toku Fentonovog i vidljivom svetlošću potpomognutog foto-Fentonovog procesa uklanjanja acetamiprida

Optimizovana amperometrijska metoda je testirana za određivanje i *off-line* monitoring koncentracije H_2O_2 u toku Fentonovog i foto-Fentonovog uklanjanja ACT. Kao najpogodniji radni potencijal u oba slučaja je odabran potencijal od 0,40 V. Na slici 44 je prikazan ilustrativni primer amperometrijskog određivanja H_2O_2 u toku foto-Fentonovog procesa. Može se uočiti da se strujni odzivi koji potiču od alikvota uzorka uzetih u različitim vremenskim intervalima (0 i 1,0 min) u toku foto-Fentonovog eksperimenta razlikuju u pogledu intenziteta usled potrošnje/reakcije H_2O_2 u toku procesa. U slučaju uzorka uzetog na početku eksperimenta, 1,0 mL prethodno pripremljenog uzorka je dodat u pomoćni elektrolit (slika 44A), dok je u drugom slučaju uzorak dodat dva puta uzastopno (označeno strelicama, slika 44B), a zatim su dodata i četiri standardna dodatka H_2O_2 . Ponovno dodavanje uzorka (dva ili više puta) u toku jednog merenja je naročito važno kod dužih vremenskih intervala oksidacionog tretmana ACT, kada je sadržaj H_2O_2 u uzorku nizak, ali merljiv.

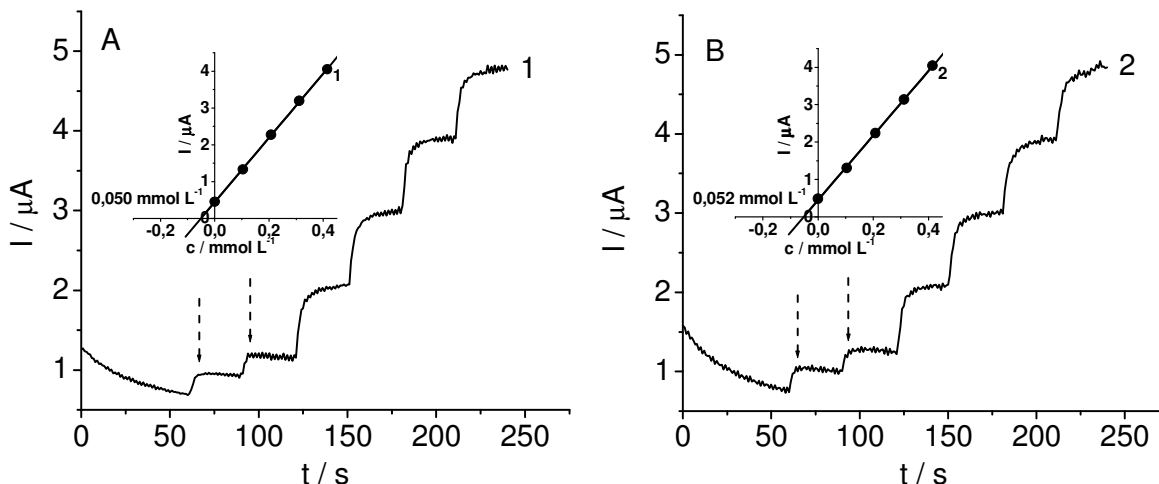
Osetljivost određivanja H_2O_2 može biti takođe poboljšana promenom zapreminskog odnosa pomoćnog elektrolita i uzorka. Na osnovu analitičkih signala dobijenih u svim ispitivanim uzorcima, potvrđeno je da koncentracija H_2O_2 brzo opada u toku foto-Fentonovog procesa. Stepeničasti amperometrijski signali koji potiču od standardnih dodataka H_2O_2 ukazuju na to da su njihovi intenziteti u skladu sa odgovarajućom kalibracionom krivom. Međutim, za svaki slučaj, koncentracije H_2O_2 u uzorcima su određene metodom standardnog dodatka analizom odgovarajućih analitičkih pravi (umetak, slika 44A, B). Analogni eksperimenti su vršeni sa Fentonovim reagensom takođe i u tom slučaju potrošnja H_2O_2 je bila sporija.



Slika 44. Amperometrijsko određivanje H_2O_2 primenom MnO_2 -SPCE na 0,40 V u foto-Fentonovim uzorcima metodom standardnog dodatka (strelice označavaju dodatak uzorka u pomoćni elektrolit-fosfatni pufer pH 7,50); alikvoti uzorka uzeti na početku eksperimenta (A) i nakon 1,0 min (B). Umetci: odgovarajuće analitičke prave.

Reproduktivnost merenja uzorka primenom istog senzora je ispitana i vrednost RSD je bila ispod ili jednaka 8,5% u svim slučajevima određivanja H_2O_2 . U toku razmatranog vremenskog perioda od 20 min (mereno od trenutka odmrzavanja uzorka, pri čemu su uzorci čuvani u mraku pri sobnoj temperaturi) uzorci nisu pokazali značajniju razgradnju H_2O_2 . Dva ponovljena merenja fotokatalitičkog uzorka dobijenog nakon 3 min foto-Fentonovog procesa i tretiranog kako je opisano u Eksperimentalnom delu su prikazana na slici 45. Na osnovu prikazanih amperometrijskih signala (slika 45A, B) i odgovarajućih analitičkih prava (umetci, slika 45A, B), može se zaključiti

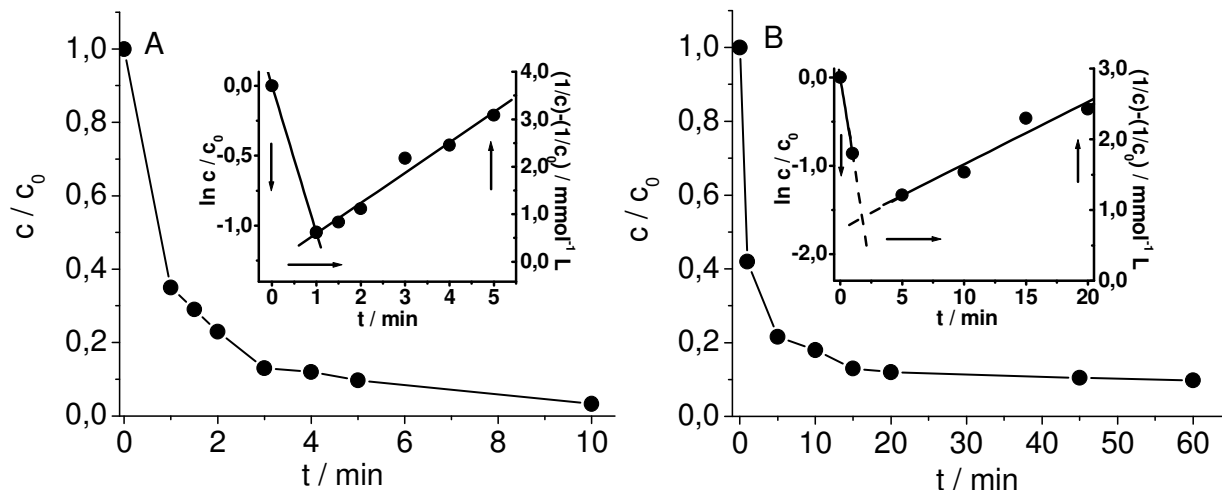
da u toku razmatranog vremenskog perioda, uzorak nije pokazao signifikantne promene u svom osnovnom ponašanju.



Slika 45. Amperometrijske krive snimljene uzastopno sa $\text{MnO}_2\text{-SPCE}$ na $0,40\text{ V}$ u fosfatnom puferu $\text{pH } 7,50$ za foto-Fentonov uzorak koji sadrži nepoznatu koncentraciju H_2O_2 uzet nakon $3,0\text{ min}$ tretmana (strelice označavaju vreme dodatka uzorka): prvo merenje (A, kriva 1), drugo merenja (B, kriva 2). Umetci: odgovarajuće analitičke prave.

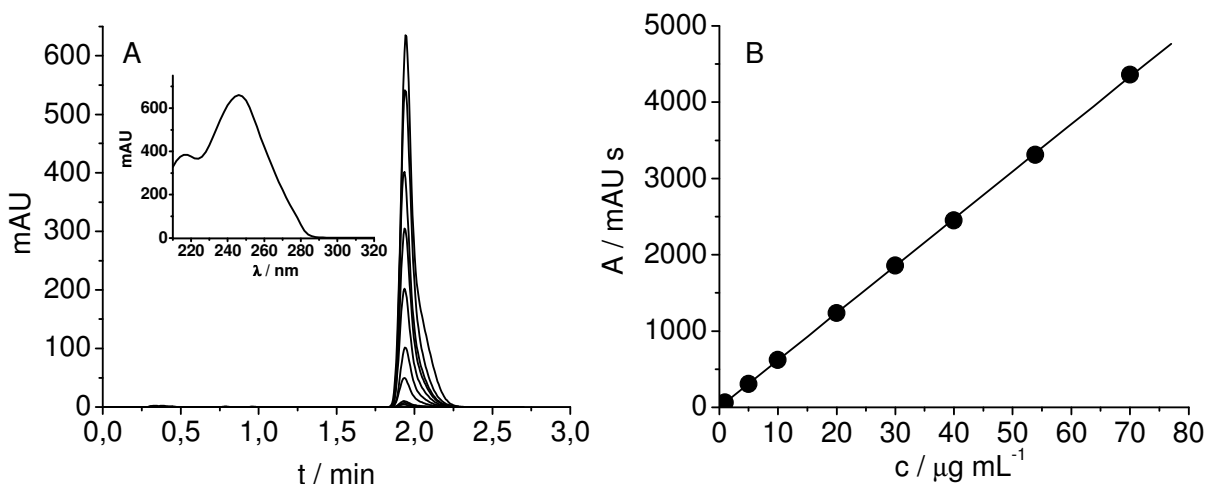
Dinamika potrošnje H_2O_2 u toku uklanjanja ACT iz vodene sredine primenom Fentonovog i foto-Fentonovog procesa zajedno sa odgovarajućim krivama je prikazana na slici 46, dok su predložene moguće karakteristike procesa sumirane u tabeli 7. Znatno brža potrošnja H_2O_2 se uočava u slučaju foto-Fentonovog procesa degradacije, što se može objasniti katalitičkom prirodom procesa regeneracije Fe^{3+} u Fe^{2+} [25, 26, 35-37, 41, 43, 44] i samim tim dolazi do brže potrošnje H_2O_2 odnosno stvaranja OH radikala. Takođe, kratak period inicijacije se uočava u smislu potrošnje H_2O_2 ; za foto-Fentonov proces to je prvi minut, kada koncentracija H_2O_2 brzo opada za više od 60% (slika 46A). U slučaju Fentonovog procesa (slika 46B) ovaj period inicijacije traje duže, ali kraće od oko 2 min. Nakon toga, sledi period sporije potrošnje H_2O_2 , koji za foto-Fentonov proces traje do 5. min, a za Fentonov proces između 2. i 20. min. U poslednjoj etapi foto-Fentonovog procesa (od 5. do 10. min) potrošnja H_2O_2 je znatno usporena i nakon 10 min može se smatrati da je H_2O_2 potpuno utrošen. U Fentonovom procesu, više koncentracije H_2O_2 su određene u toku procesa i oko

10% H_2O_2 ostaje u sistemu nakon 20 min, a nakon perioda od 60 min H_2O_2 još uvek nije potpuno utrošen.



Slika 46. Dinamika potrošnje H_2O_2 u toku foto-Fentonovog (A) i Fentonovog (B) uklanjanja ACT iz vodene sredine; umetci: ilustrativni prikaz moguće kinetike degradacije; eksperimentalni uslovi: fosfatni pufer pH 7,50, elektroda MnO_2 -SPCE, radni potencijal 0,40 V. Početne koncentracije: 0,31; 2,0 i 3,0 mmol L^{-1} (70,0; 111,7 i 102,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) za ACT, Fe^{2+} i H_2O_2 , redom.

Paralelna HPLC-DAD merenja [201] su vršena u cilju praćenja koncentracije ACT u toku foto-Fentonovog i Fentonovog procesa. Prvi korak je bio priprema serije standardnih rastvora ACT u opsegu koncentracija od 0,1 do 70,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i snimanje pripadajućih hromatograma (slika 47A) pri uslovima opisanim u Eksperimentalnom delu. Može se uočiti da se ACT eluira sa kolone na retencionom vremenu oko 1,95 min. UV spektar koji se odnosi na standardni rastvor ACT koncentracije 70,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ je prikazan na slici 47A (umetak). Položaj apsorpcionog maksimuma ukazuje na to da je odabrana radna talasna dužina DA-detektora od 242 nm pogodna za detekciju i određivanje ACT. Na osnovu izmerenih površina pikova (A) za različite koncentracije ACT konstruisana je odgovarajuća kalibraciona kriva prikazana na slici 47B. Kalibraciona kriva je opisana jednačinom $A = 61,9 [(m\text{AU s})/(\mu\text{g mL}^{-1})] c - 3,4 (m\text{AU s})$, pri čemu koeficijent korelacije iznosi 0,999 što ukazuje na postojanje linearne zavisnosti u ispitivanoj oblasti koncentracija.

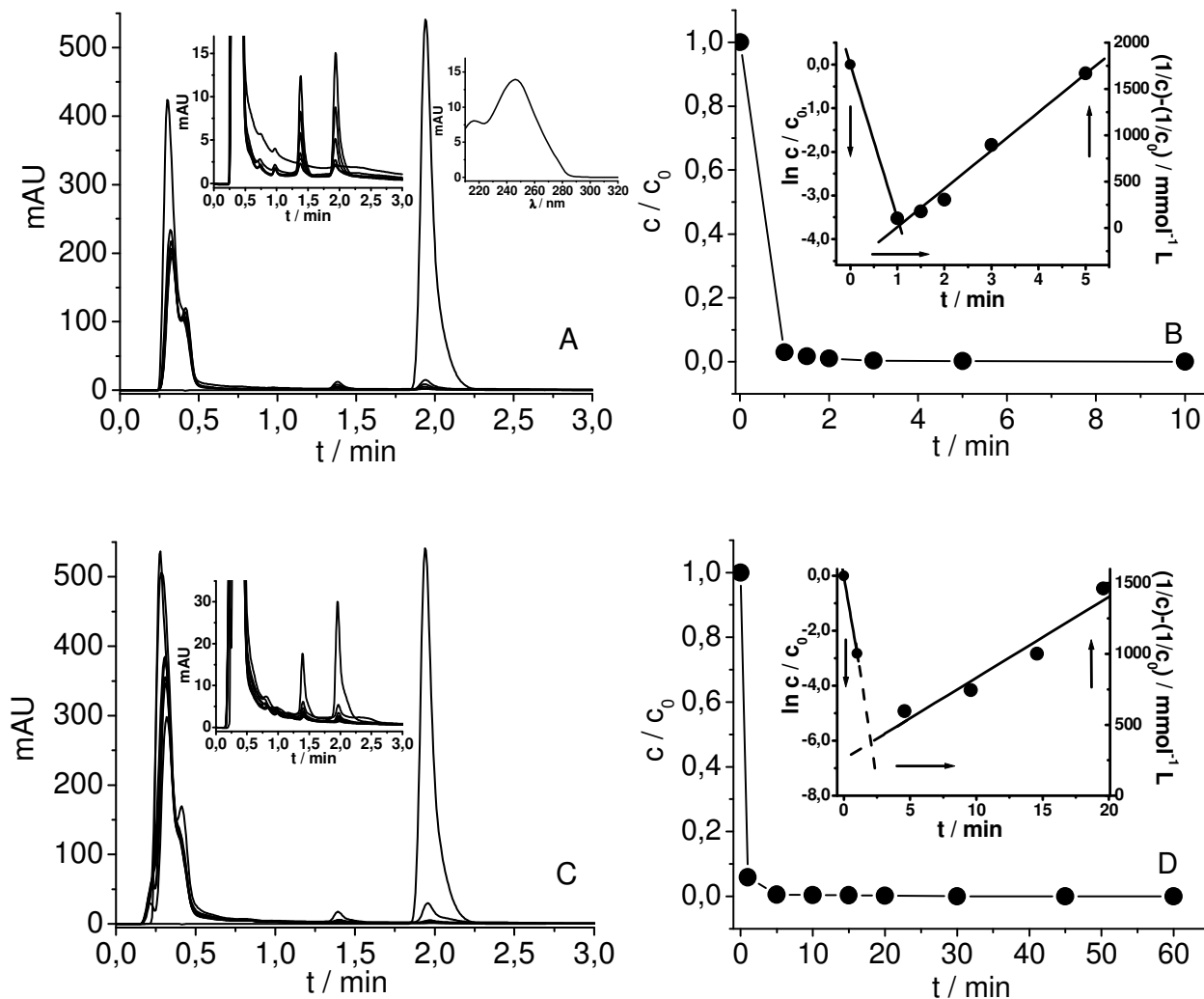


Slika 47. Hromatogrami standardnih rastvora ACT (A) zajedno sa pripadajućom kalibracionom krivom (B). Umetak (A): UV spektrar standarda ACT koncentracije 70,0 µg mL⁻¹.

U narednom koraku, vršena su HPLC-DAD merenja koncentracije ACT u toku foto-Fentonovog (slika 48A, B) i Fentonovog (slika 48C, D) procesa razgradnje ovog ciljnog pesticida. Umetci sa leve strane na slici 48A i C prikazuju tok uklanjanja ACT nakon 1 min u oba slučaja, dok umetak sa desne strane predstavlja UV spektrar ACT koji služi za dodatnu potvrdu pika ACT u toku procesa uklanjanja. U foto-Fentonovom eksperimentu, nakon prvog minuta 3% ACT ostaje u sistemu (videti umetak sa leve strane), a nakon 5 min može se smatrati da je ACT razgrađen. Degradacioni intermedijeri koji se pojavljuju u toku procesa razgradnje i koji se na hromatogramima prepoznaju kao jedinjenja polarnija od ACT na retencionim vremenim 0,70; 0,97 i 1,39 min su nakon 10 min praktično uklonjeni. Međutim, treba napomenuti da neki degradacioni intermedijeri mnogo veće polarnosti [223] pri pomenutim eksperimentalnim uslovima mogu još uvek ostati u sistemu. Fentonov proces je sporiji ukoliko se uzme u obzir uklanjanje ACT (nakon 20 min tretmana se može smatrati da je ACT razgrađen).

U slučaju Fentonovog i foto-Fentonovog procesa degradacije, kinetičke krive pokazuju da postoji složeni mehanizam ACT i H₂O₂ razgradnje/potrošnje, koji se ne može sa lakoćom opisati preko jednog jednostavnog kinetičkog modela, naročito u slučaju ACT. U skladu sa ranije publikovanim rezultatima vezanim za Fentonov i Fentonu-sličan proces uklanjanja ACT [39], za oksidacione tretmane zasnovane na Fentonovoj reakciji, prvih 20 min reakcije uklanjanja ACT se ne može precizno opisati kinetikom pseudo-prvog reda ($r = -0,807$), dok kinetika pseudo-drugog reda daje bolji opis kinetičkog modela ($(1/c) - (1/c_0) = 69,2 [\text{min}^{-1} \text{mmol}^{-1} \text{L}] t + 54,0 [\text{mmol}^{-1} \text{L}]$)

($r = 0,982$)) ali ne u potpuno egzaktnom obliku naročito za proces koji se odigrava između 0 i 2 min.



Slika 48. HPLC-DAD praćenje foto-Fentonovog (A, B) i Fentonovog (C, D) uklanjanja ACT: hromatogrami (A, C, levi umetci: ispitivani procesi nakon 1 min tretmana, desni umetak: UV spektar ACT), odgovarajuće krive uklanjanja ACT (B, D, umetci: ilustrativni prikaz moguće kinetike uklanjanja ACT). Početne koncentracije: 0,31; 2,0 i 3,0 mmol L⁻¹ (70,0; 111,7 i 102,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) za ACT, Fe²⁺ i H₂O₂, redom.

U skladu sa ranijim istraživanjima Mitsike i dr. [39], ovaj sistem se može opisati sa dve glavne parcijalne jednačine, i to prvi vremenski period preko reakcije pseudo-prvog reda, a drugi preko reakcije pseudo-drugog reda (videti tabelu 7 i umetak na slici 48). U toku prva 2 min Fe²⁺ inicira

stvaranje OH radikala iz H_2O_2 , ali takođe dolazi do oksidacije Fe^{2+} u Fe^{3+} , pri čemu nastali Fe^{3+} nemaju istu redoks aktivnost kao Fe^{2+} što se može odraziti na promenu kinetike reakcije. Stoga, na početku koncentracija Fe^{2+} određuje mehanizam procesa, ali nakon toga koncentracije i Fe^{2+} i H_2O_2 mogu da utiču na brzinu razgradnje ACT, u saglasnosti sa ranijim razmatranjima [39]. U slučaju foto-Fentonovog procesa, vidljiva svetlost pokreće regeneraciju Fe^{2+} iz Fe^{3+} , što dodatno može uticati na proces zbog veće brzine stvaranja OH radikala i uklanjanja ACT (u poređenju sa Fentonovim procesom). Međutim, reakcija ne može tačno biti opisana preko jednačine reakcije pseudo-prvog reda ($r = -0,876$) u celom ispitivanom vremenskom intervalu u trajanju od 5 min. Jednačina pseudo-drugog reda $(1/c) - (1/c_0) = 358,0 [\text{min}^{-1} \text{mmol}^{-1} \text{L}] t - 220,1 [\text{mmol}^{-1} \text{L}]$ daje bolju linearnost ($r = 0,971$), ali pogodniji slučaj je kada se reakcija samo u periodu između 1 i 5 min razmatra kao reakcija pseudo-drugog reda (tabela 7).

Tabela 7. *Mogući kinetički parametri Fentonovog i foto-Fentonovog procesa uklanjanja ACT.*

Moguća kinetika			
	Razmatrani vremenski interval	H_2O_2 (Amperometrijska metoda)	Acetamidrid (HPLC metoda)
Fenton	0-2 ^a	$\ln(c/c_0) = -0,86 [\text{min}^{-1}] t$ ($r = -1$)	$\ln(c/c_0) = -2,83 [\text{min}^{-1}] t$ ($r = -1$)
	2-20 ^b	$(1/c) - (1/c_0) = 0,09 [\text{min}^{-1} \text{mmol}^{-1} \text{L}] t + 0,76 [\text{mmol}^{-1} \text{L}]$ ($r = 0,967$)	$(1/c) - (1/c_0) = 57,1 [\text{min}^{-1} \text{mmol}^{-1} \text{L}] t + 236,4 [\text{mmol}^{-1} \text{L}]$ ($r = 0,971$)
foto-Fenton	0-1 ^a	$\ln(c/c_0) = -1,05 [\text{min}^{-1}] t$ ($r = -1$)	$\ln(c/c_0) = -3,52 [\text{min}^{-1}] t$ ($r = -1$)
	1-5 ^b	$(1/c) - (1/c_0) = 0,64 [\text{min}^{-1} \text{mmol}^{-1} \text{L}] t - 0,04 [\text{mmol}^{-1} \text{L}]$ ($r = 0,988$)	$(1/c) - (1/c_0) = 413,0 [\text{min}^{-1} \text{mmol}^{-1} \text{L}] t - 401,7 [\text{mmol}^{-1} \text{L}]$ ($r = 0,992$)

Koeficijent korelacije (r) je prikazan u zagradama.

t , min

c_0 , mmol L^{-1}

c , mmol L^{-1}

^a kinetika pseudo-prvog reda

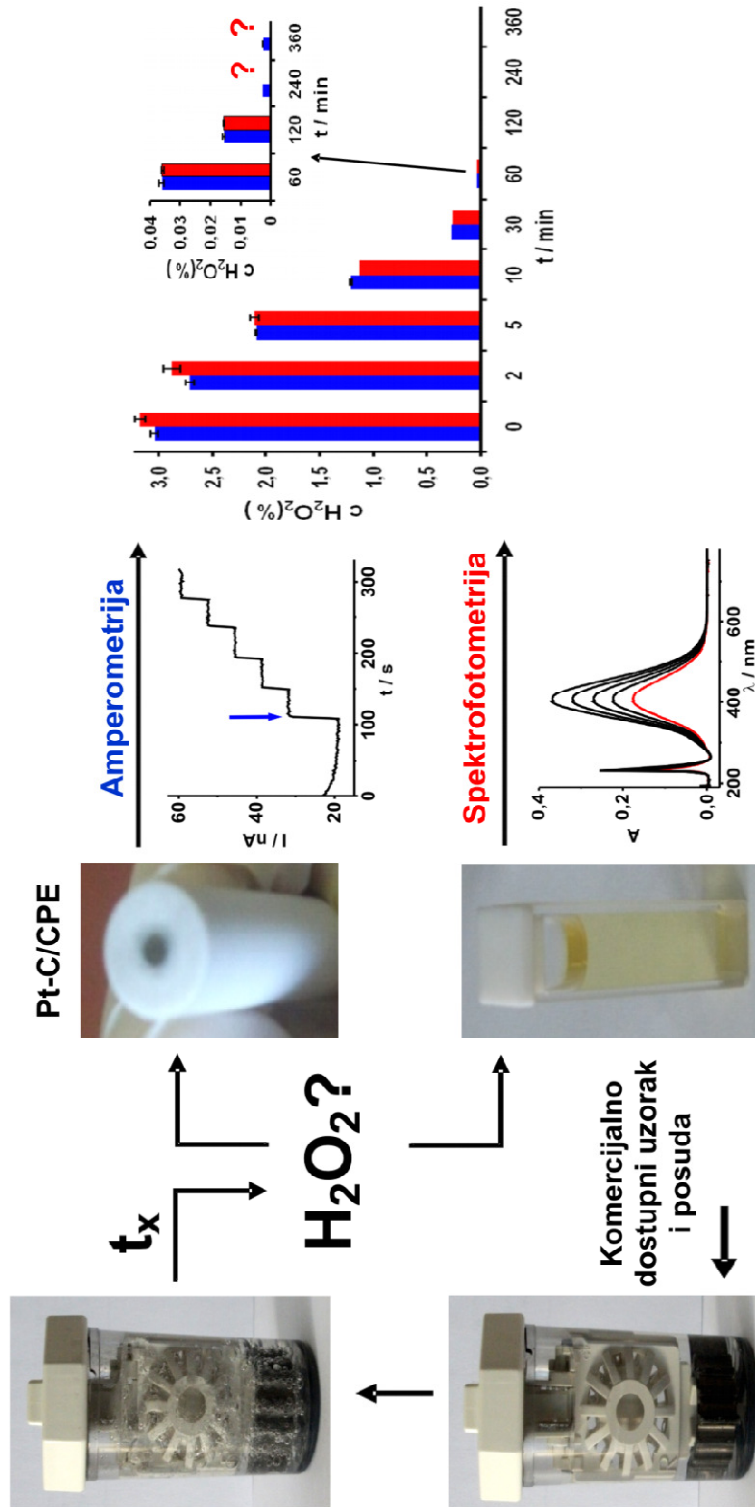
^b kinetika pseudo-drugog reda

Kinetika potrošnje H_2O_2 uglavnom prati trend uklanjanja ACT (tabela 7), ali važno je napomenuti da u slučaju foto-Fentonovog procesa vremenski interval između 0 i 5 min takođe može biti razmatran kinetikom pseudo-drugog reda na osnovu jednačine $(1/c) - (1/c_0) = 0,63 [\text{min}^{-1} \text{mmol}^{-1} \text{L}] t - 0,02 [\text{mmol}^{-1} \text{L}]$, ($r = 0,992$). Za detaljniju analizu kinetike reakcije jedno od mogućih rešenja može biti povećanje broja uzorkovanja u kritičnom vremenskom intervalu, naročito između 0 i 1 min i to u slučaju foto-Fentonovog procesa. Drugo rešenje možda može biti *on-line* praćenje.

Na osnovu svega navedenog, razvijena metoda zasnovana na MnO_2 -SPCE, zajedno sa odgovarajućom jednostavnom pripremom uzorka, je ekonomski i ekološki pristupačna analitička metoda za određivanje H_2O_2 u različitim etapama nekih naprednih oksidacionih procesa.

4.3. Amperometrijsko određivanje H_2O_2 primenom elektrode od ugljeniće paste površinski modifikovane kompozitom na bazi Pt nanočestica i grafitizovanog ugljenika [224]

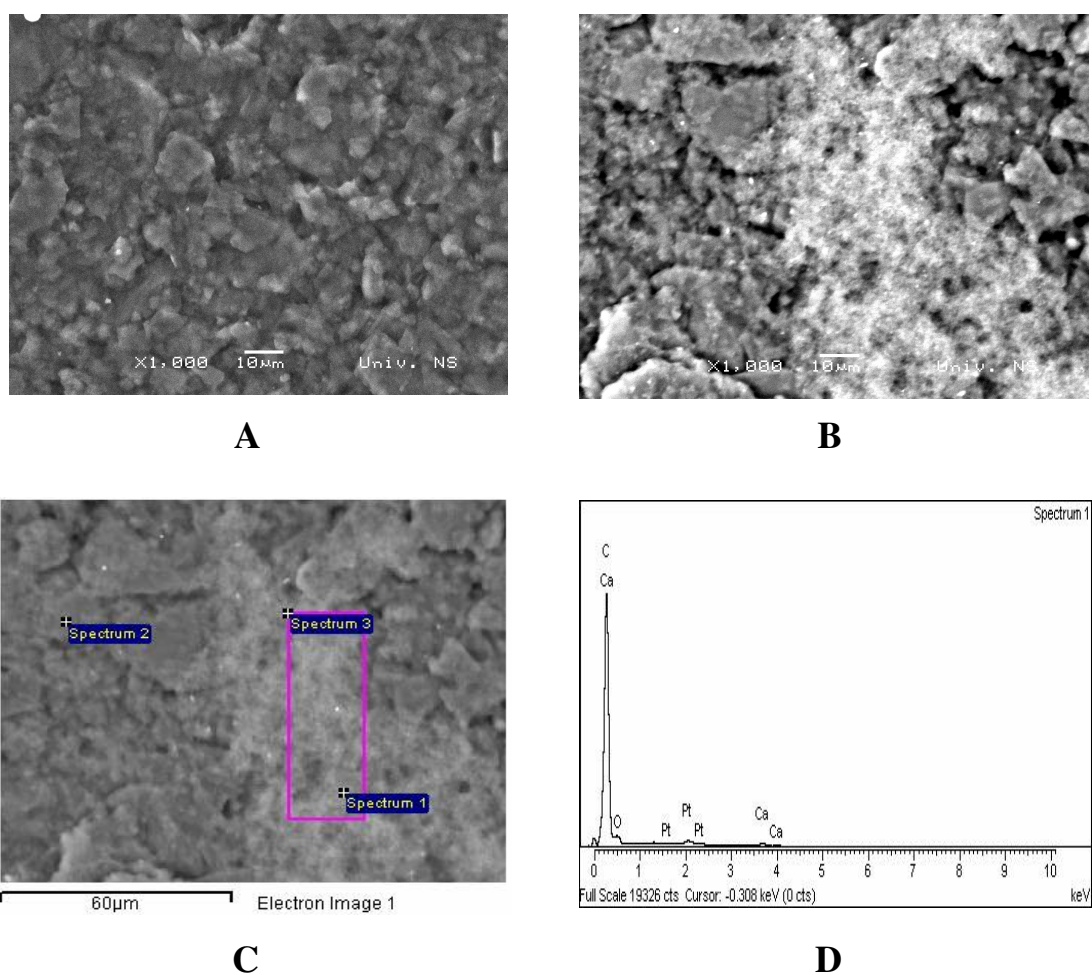
CPE (napravljena od grafitnog praha i parafinskog ulja) je površinski modifikovana sa Pt na grafitizovanom ugljeniku – Vulkanu XC72 (Pt-C/CPE) jednostavnom metodom nanošenja kapi. Rezultujući senzor je testiran za amperometrijsko određivanje H_2O_2 u dva komercijalno dostupna proizvoda koji sadrže H_2O_2 kao aktivni sastojak: rastvor za dezinfekciju i rastvor za čišćenje kontaktnih sočiva, kao i za praćenje sadržaja H_2O_2 u rastvoru za kontakna sočiva tokom procesa njegove neutralizacije/razgradnje. Komparativna merenja su vršena primenom spektrofotometrijske metode na bazi titanijum-sulfata kao test reagensa. Ilustrativni shematski prikaz postupka rada je dat na slici 49.



Slika 49. Shematski prikaz postupka praćenja H₂O₂ u rastvoru za kontaktna sočiva tokom procesa njegove neutralizacije/razgradnje primenom komercijalno dostupnog AOSept® Plus sistema [224].

4.3.1. Poređenje elektroda od ugljenične paste – nemodifikovane i površinski modifikovane kompozitom Pt-grafitizovani ugljenik

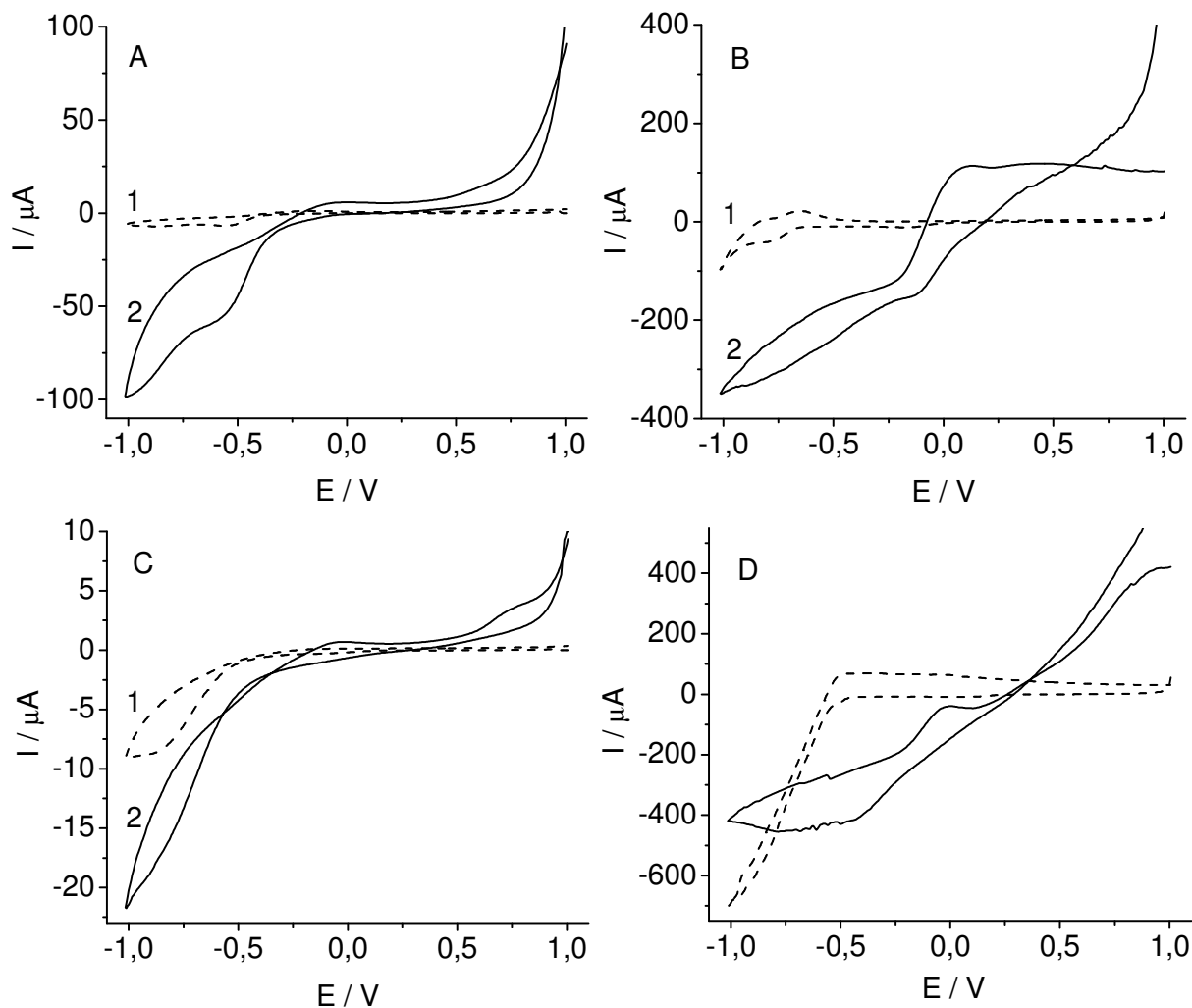
Površinska morfologija nemodifikovane CPE i Pt-C/CPE je proučavana primenom SEM (slika 50). Može se uočiti da obe elektrode sadrže prepoznatljivi matriks ugljenične paste koja je pripremljena mešanjem parafinskog ulja i čestica grafitnog praha veličine 5-20 μm pri čemu nastaje relativno kompaktna osnovna masa. Na slici 50B je dat SEM prikaz reprezentativne površine CPE koja je površinski modifikovana sa Pt-C jednostavnom metodom nanošenja kapi etanolne suspenzije ovog kompozitnog materijala.



Slika 50. SEM prikaz površine nemodifikovane CPE (A) i Pt-C/CPE (B) pri uvećanju 1000 puta, i reprezentativni deo površine Pt-C/CPE (C) sa odgovarajućim EDS spektrom mikroanalize Pt-C modifikatora (D) na površini CPE. Režim detekcije: sekundarni elektroni (A) i reflektovani elektroni (B).

Na osnovu stabilnosti pripremljenog senzora i reproduktivnosti razvijene analitičke metode, može se reći da modifikator pokazuje visoki afinitet prema osnovnom ugljeničnom supstratu bez dodatka bilo kakve dodatne komponente (adheziva), slično kao u slučaju supstrat elektrode istog tipa modifikovane sa Pt-MWCNT kompozitom [225]. Oblasti sa modifikatorom na bazi Pt se prepoznaju kao svetli delovi na ispitivanoj površini elektrode jer primenjeni režim detekcije reflektovanih elektrona daje dobar kontrast elemenata sa visokim atomskim brojem (u ovom slučaju: Pt) u poređenju sa elementima sa niskim atomskim brojem (C, O) [226]. EDS merenja su vršena na različitim delovima reprezentativne Pt-C/CPE površine (slika 50C). Dobijeni rezultati su potvrdili da je modifikator prisutan na površini (slika 50D, spektar 1), ali da postoje i regioni bez modifikatora, što znači da površina CPE nije kompletno prekrivena Pt-C materijalom u obliku filma.

Elektrohemijsko ponašanje H_2O_2 je ispitano na nemodifikovanoj CPE i Pt-C/CPE primenom CV i blago alkalnoj ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatni pufer, pH 7,50) i kiseloj sredini ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatni pufer, pH 4,50). Na slici 51 su prikazani CV odzivi obe elektrode bez i u prisustvu H_2O_2 u opsegu potencijala od 1,0 do -1,0 V. Nemodifikovana CPE ispoljava neznatne elektrokatalitičke osobine prema oksidaciji ili redukciji H_2O_2 pri obe pH vrednosti naročito na potencijalima između 0,50 i -0,50 V što je u saglasnosti sa ishodima naših ranijih istraživanja [225]. Primenom Pt-C/CPE se uočava porast u intenzitetu pozadinske struje verovatno zbog porasta elektrodne površine usled prisustva ugljenične komponente kompozita Vulkana XC72. U prisustvu H_2O_2 , dobijeni CV odzivi pokazuju izrazito povećanje strujnog intenziteta u anodnom kao i u katodnom delu ciklusa. Redukcija H_2O_2 na Pt-C/CPE je dominantan proces, sa zapaženim redukcionim signalima H_2O_2 koji se javljaju na -0,10 V i -0,45 V u fosfatnom puferu pH 7,50 i acetatnom puferu pH 4,50, redom. Oksidacija analita je jasno uspostavljena na oko 0,0 V pri pH 7,50, a na nešto višim vrednostima potencijala pri pH 4,50. Pt-C/CPE takođe pokazuje zadovoljavajuće performanse u pozitivnom opsegu polarizacije. Dodatno, na osnovu snimljenih cikličnih voltamograma, može se očekivati da je Pt-C/CPE primenljiva za određivanje H_2O_2 na radnim potencijalima bliskim 0,0 V u obe sredine usled očiglednih elektrokatalitičkih karakteristika Pt nanočestica.

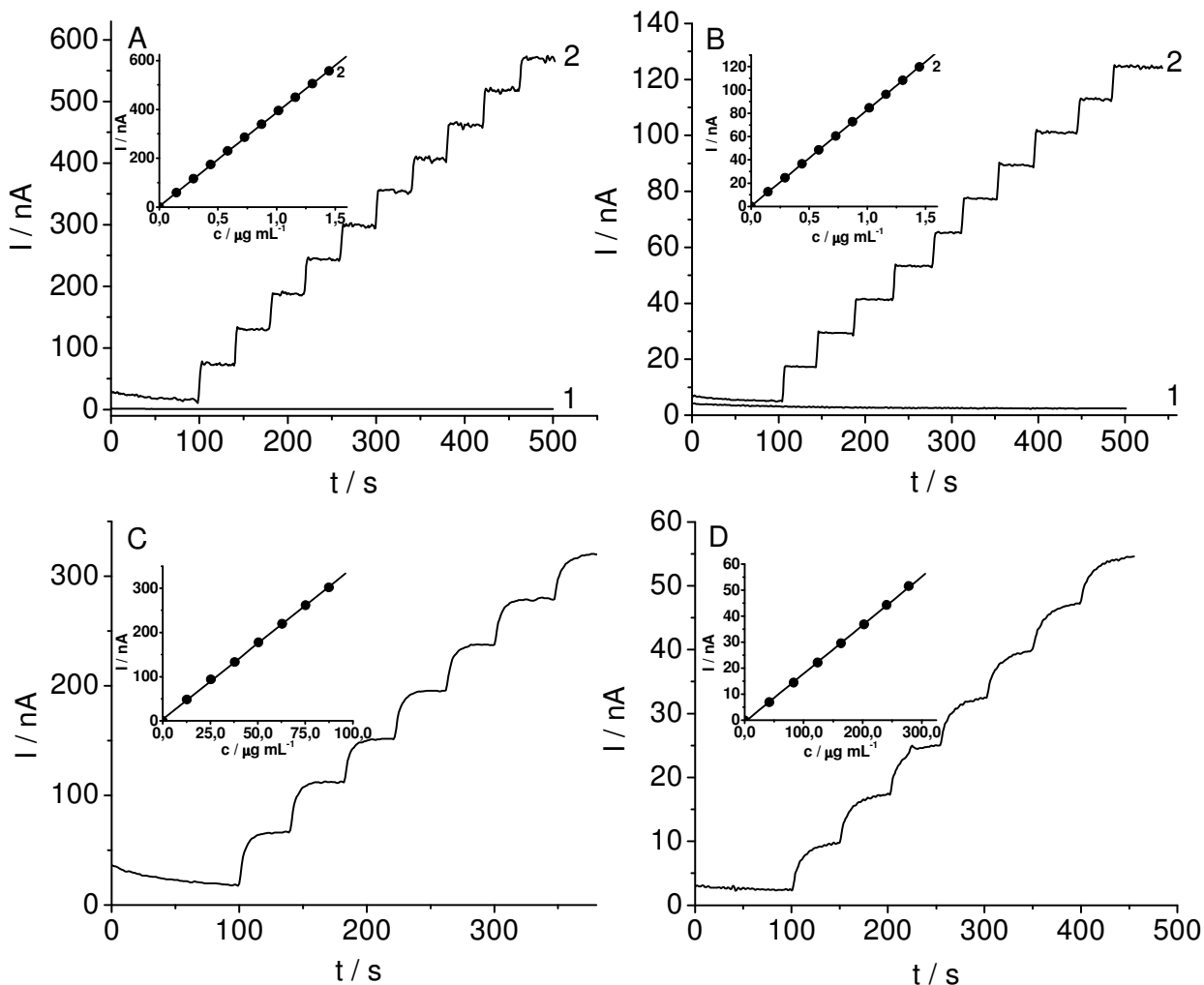


Slika 51. Ciklični voltamogrami snimljeni primenom nemodifikovane CPE (A, C) i Pt-C/CPE (B, D) bez (krive 1) i u prisustvu $1,1 \text{ mg mL}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ (krive 2) pri brzini polarizacije 25 mV s^{-1} . Pomoćni elektrolit: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatni pufer pH 7,50 (A, B) i $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatni pufer pH 4,50 (C, D).

4.3.2. Optimizacija amperometrijske i spektrofotometrijske metode

Nakon CV karakterizacije, koja može da pomogne prilikom odabira odgovarajućeg radnog potencijala za razvoj analitičke metode određivanja H_2O_2 , amperometrijska merenja su vršena u fosfatnom ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,50), kao i u acetatnom ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,50) puferu. U zavisnosti od kompleksnosti i tipa uzorka, jedan od ključnih parametara je svakako odabir pogodnog radnog potencijala, ali pH vrednost pomoćnog elektrolita takođe može imati znatnog uticaja u toku optimizacije analitičke metode za analizu realnih uzoraka. Zbog pomenute činjenice, primenljivost Pt-C/CPE za amperometrijsko određivanje ciljnog analita, H_2O_2 , je detaljno ispitana na negativnim

kao i pozitivnim vrednostima radnog potencijala. Na slici 52 su prikazani reprezentativni amperogrami H_2O_2 na odabranim radnim potencijalima dobijeni primenom CPE i Pt-C/CPE.



Slika 52. Amperogrami H_2O_2 snimljeni u opsegu koncentracija $0,15\text{--}1,45 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A, B), $12,7\text{--}87,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (C) i $42,1\text{--}278,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (D) primenom CPE (krive 1A, 1B, C, D) i Pt-C/CPE (krive 2A, 2B). Pomoćni elektrolit: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatni pufer pH 7,50 (A, C), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatni pufer pH 4,50 (B, D). Radni potencijal: $0,20 \text{ V}$ (A), $0,50 \text{ V}$ (B, C, D). Umetci: pripadajuće kalibracione krive.

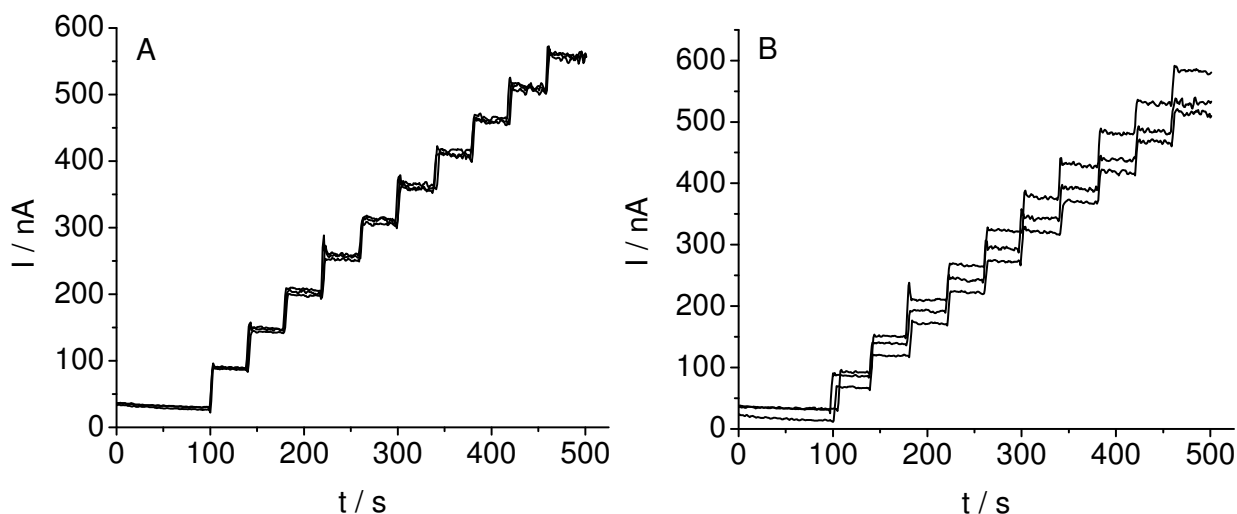
Primera radi, Pt-C/CPE pri pH 7,50 daje karakteristične stepeničaste signale uzastopnim dodavanjem inkremenata H_2O_2 pri svim ispitivanim radnim potencijalima između $0,50$ i $-0,70 \text{ V}$. Na potencijalima ispod $0,05 \text{ V}$, detektovani su redukcionni signali H_2O_2 čiji intenzitet raste sa promenom potencijala ka negativnijim vrednostima, ali u tom slučaju odnos signala i šuma opada

istovremeno pogoršavajući GD i GO metode. Amperometrijski oksidacioni signali H_2O_2 se javljaju na oko 0,10 V, i intenzitet signala takođe raste sa promenom potencijala ka pozitivnijim vrednostima. Na pH 4,50 osetljivost metode postignuta primenom Pt-C/CPE pri radnom potencijalu 0,50 V je niža nego u slučaju pH 7,50. Bez obzira na to, Pt-C/CPE pokazuje zadovoljavajuće performanse i u kiseloj sredini na određenim pozitivnim i negativnim radnim potencijalima, što je izuzetno važno imajući u vidu da analiza nekih realnih uzoraka zahteva kiselu sredinu. Na slici 52 su prikazani reprezentativni amperometrijski signali H_2O_2 (zajedno sa pripadajućim kalibracionim krivama) dobijeni primenom CPE (A, B - krive 1) i Pt-C/CPE (A, B - krive 2) sukcesivnim dodavanjem H_2O_2 u rastvor fosfatnog pufera pH 7,50 pri radnom potencijalu 0,20 V (A) i acetatnog pufera pH 4,50 pri radnom potencijalu 0,50 V (B). Radi poređenja amperometrijski signali H_2O_2 su snimljeni sa nemodifikovanom CPE (slika 52C, D), ali su bile potrebne znatno više koncentracije H_2O_2 da bi se dobili uporedivi signali u oba pomoćna elektrolita pri radnom potencijalu 0,50 V. Kao što se može videti na slici 52A i B, nemodifikovana elektroda ne pokazuje ikakav odziv uzastopnim dodavanjem H_2O_2 u oba elektrolita u ispitivanom opsegu koncentracija od 0,15 do 1,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ što potvrđuje potrebu za odgovarajućom modifikacijom CPE kako bi se mogle detektovati niske koncentracije analita. Karakteristični analitički parametri za obe elektrode pri odabranim radnim potencijalima su sumirani u tabeli 8.

Tabela 8. Analitički parametri amperometrijskog određivanja H_2O_2 primenom CPE i Pt-C/CPE.

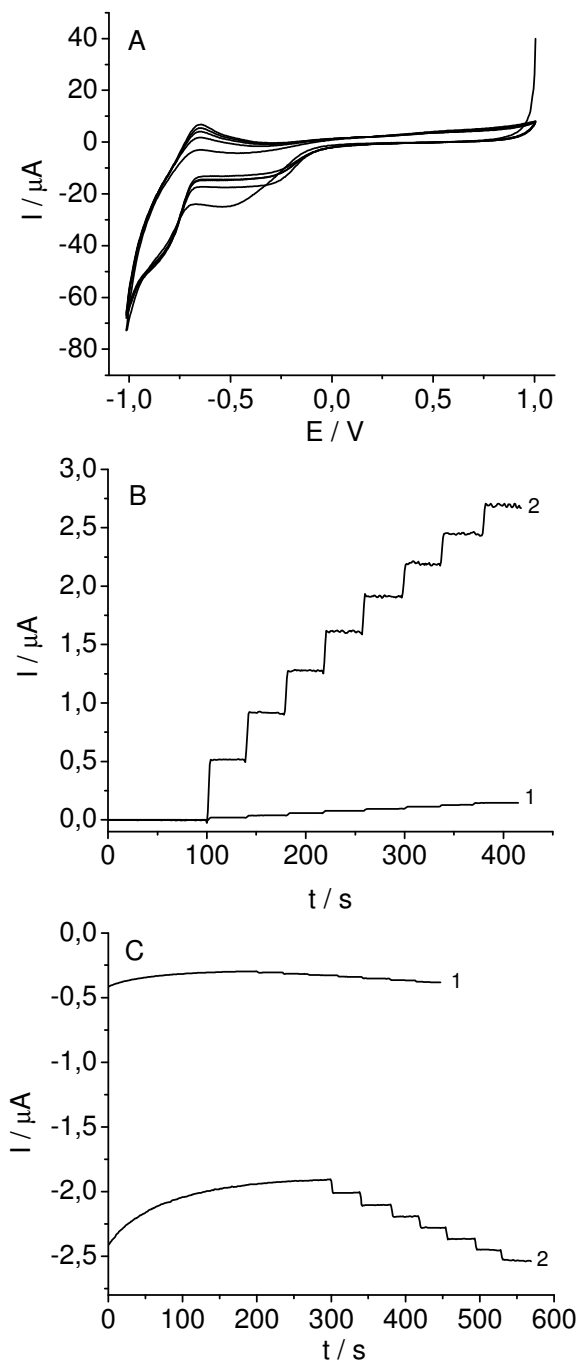
Parametri	Elektroda					
	CPE		Pt-C/CPE			
pH	7,50	4,50	7,50	7,50	4,50	
Radni potencijal [V]	0,50	0,50	0,20	0,50	0,50	
Ispitivani opseg koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	12,7–87,5	42,1–278,2	0,15–1,45	0,15–1,45	0,15–1,45	
Koeficijent korelacije	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	
Nagib [$\text{nA mL } \mu\text{g}^{-1}$]	3,43	0,186	384,2	828,9	82,60	
Odsečak [nA]	3,58	-0,701	3,56	-3,59	0,33	
GD [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	2,4	8,4	0,018	0,012	0,03	
GO [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	8,0	28,0	0,06	0,04	0,10	

U narednom koraku ispitana je reproduktivnost signala H_2O_2 u opsegu koncentracija od 0,15 do 1,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ H_2O_2 na osnovu tri ponovljena merenja sa istom senzorskom površinom (slika 53A), kao i sa tri različite površine Pt-C/CPE (slika 53B). Merenja su vršena dodavanjem deset puta iste zapremine rastvora H_2O_2 u rastvor pomoćnog elektrolita u tri ponavljanja, i RSD je izračunata za svaki stepeničasti signal. Vrednost RSD nije prelazila 2,0% za istu senzorsku površinu, i 7,0% za tri različite senzorske površine.



Slika 53. Reproductivnost H_2O_2 signala u opsegu koncentracija od 0,15 do 1,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ primenom amperometrijske metode u 0,1 mol L^{-1} fosfatnom puferu pH 7,50 pri radnom potencijalu 0,20 V sa istom (A) i tri različite (B) površine Pt-C/CPE.

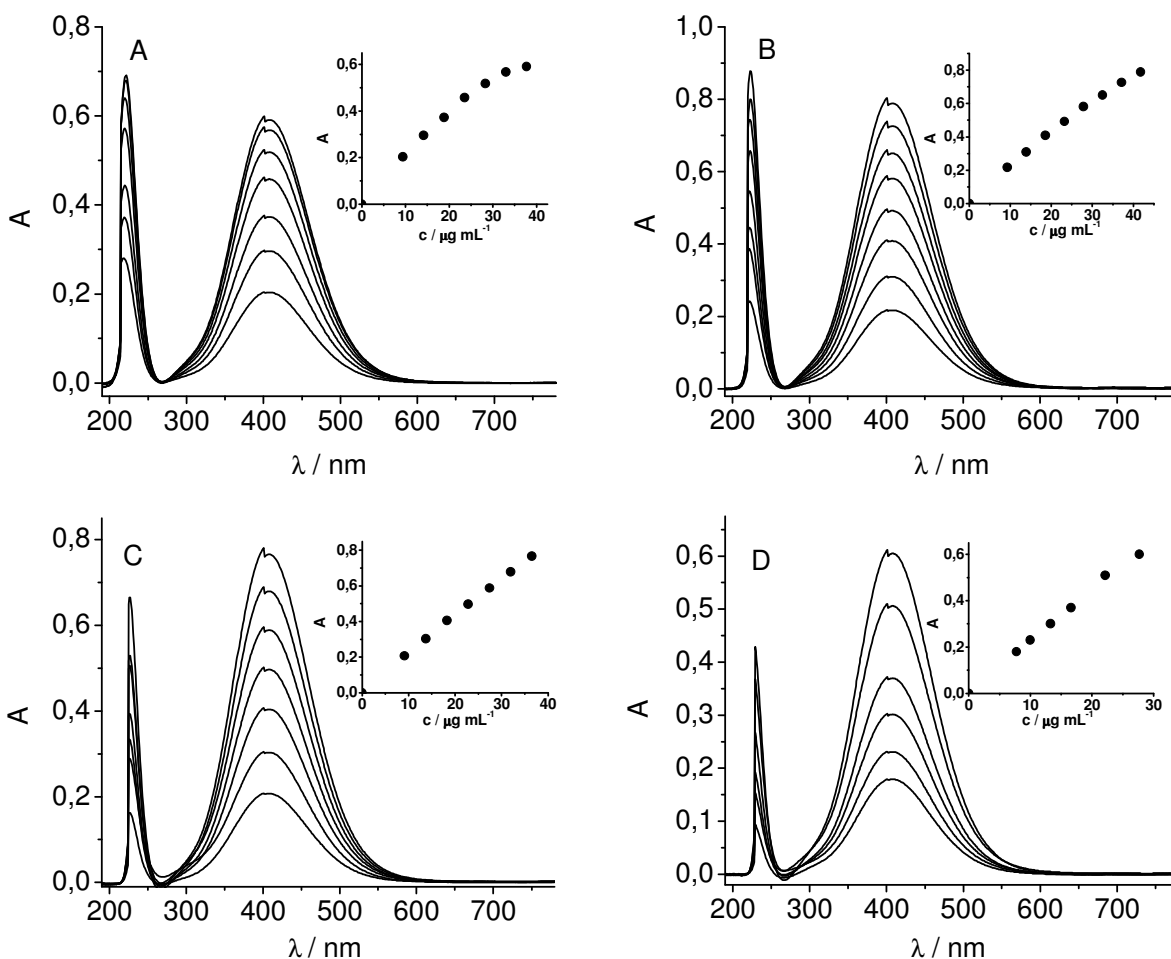
Slično kao i u slučaju Pd-MWCNT-SPCE [227] pre seta amperometrijskih merenja, svaka elektrodna površina je elektrohemijski aktivirana cikliranjem u opsegu potencijala od 1,0 do -1,0 V (u negativnom smeru polarizacije) u fosfatnom (slika 54A) ili acetatnom puferu. Broj ciklusa je bio pet, dok je brzina polarizacije bila 100 mV s^{-1} (slika 54A). Na slici 54B i C su prikazani amperometrijski signali H_2O_2 dobijeni u ispitivanom opsegu koncentracija H_2O_2 pri radnom potencijalu od 0,20 V i -0,10 V, redom. Ukoliko se uporede amperometrijske krive snimljene bez prethodne aktivacije elektrodne površine (slika 54B, C, krive 1) i nakon aktivacije cikliranjem (slika 54B, C, krive 2) može se uočiti da je osetljivost metoda znatno poboljšana na ovaj način.



Slika 54. Cikliranje površine Pt-C/CPE u pomoćnom elektrolitu u opsegu potencijala od 1,0 do -1,0 V, pri brzini polarizacije 100 mV s^{-1} , 5 ciklusa (A) i amperogrami snimljeni primenom Pt-C/CPE (B, C) bez prethodne aktivacije (krive 1) i nakon cikliranja elektrodne površine (krive 2). Radni potencijal: 0,20 V (B), -0,10 V (C). Pomoćni elektrolit: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatni pufer pH 7,50. Opseg koncentracija H_2O_2 : 1,17–9,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (B), 2,33–16,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (C).

Na osnovu dobijenih ishoda za reproduktivnost merenja, može se zaključiti da površina Pt-C/CPE poseduje dobre karakteriske u slučaju tri ponovljena amperometrijska merenja. Naime, ne dolazi do signifikantnih efekata gubitka modifikatora ili pasivacije senzorske površine što se može pretpostaviti na osnovu dobijenih vrednosti za RSD (od 0,4 do 2,0%). Nadalje, metoda nanošenja kapi je sprovedena na zadovoljavajući način jer je za tri različite površine Pt-C/CPE koje su pripravljene nezavisno ponavljanjem optimizovane metode nanošenja kapi, vrednost RSD bila ispod 10% (u intervalu od 3,8 do 6,2%).

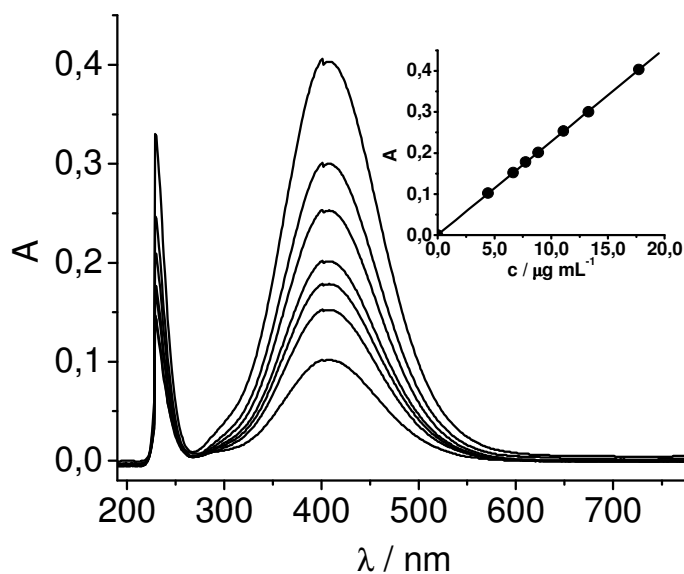
Što se tiče komparativne metode, radi optimizacije spektrofotometrijske titanijum-sulfat reagens metode, UV/Vis spektri žuto obojenih rastvora pertitanske kiseline su snimljeni za različite odnose test reagensa i rastvora standardizovanog H_2O_2 (slika 55).



Slika 55. UV/Vis spektri generisane pertitanske kiseline pri različitim dodatim zapreminama reagensa: 0,10 mL (A), 0,15 mL (B), 0,20 mL (C), 0,30 mL (D). Umetci: odgovarajuće A-c zavisnosti.

Na osnovu apsorpcionih maksimuma na 407 nm za svaki set eksperimenata sa sličnim koncentracijama H_2O_2 u nižem $\mu\text{g mL}^{-1}$ koncentracionom opsegu sa ukupnom zapreminom svakog rastvora 3,0 mL i različitim zapreminama titanijum-sulfat reagensa za svaki odnos je konstruisana odgovarajuća zavisnost apsorbanca (A) i koncentracije analita (c). U slučaju zapremine reagensa 0,15 mL (slika 55B) i naročito 0,10 mL (slika 55A) zasićenje kalibracione krive se uočava već pri koncentraciji H_2O_2 oko $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Za 0,20 mL (slika 55C) i 0,30 mL (slika 55D) dodatog reagensa postignut linearni opseg koncentracija analitičke metode je bio skoro dva puta širi.

Na osnovu rezultata ove optimizacije, najbolja linearnost kalibracione krive je dobijena za test reagens i ciljani analit u opsegu koncentracija H_2O_2 od 4,43 do $17,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ (kada je na 3,0 mL takvog rastvora dodato 0,30 mL titanijum-sulfat reagensa), što je izraženo sledećom jednačinom: $A = 0,023 \text{ (rel. jed/}\mu\text{g mL}^{-1}) c + 9,51 \cdot 10^{-4} \text{ (rel. jed)}$, $r = 0,999$ (slika 56). U slučaju spektrofotometrijske metode pri optimizovanim eksperimentalnim uslovima, GD i GO su iznosile $1,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $4,43 \mu\text{g mL}^{-1}$, redom. RSD metode za ovaj model sistem je bila 1,5%.



Slika 56. UV/Vis spektri generisane pertitanske kiseline pri dodatoj zapremini titanijum-sulfat test reagensa 0,30 mL u opsegu koncentracija H_2O_2 od 4,43 do $17,72 \mu\text{g mL}^{-1}$. Umetak: pripadajuća kalibraciona kriva.

Imajući u vidu sve navedeno, obe optimizovane metode, amperometrijska i spektrofotometrijska, se mogu primeniti u analitičke svrhe za određivanje H_2O_2 , pri čemu skoro 40 puta niže koncentracije H_2O_2 se mogu odrediti primenom amperometrijske metode zasnovane na Pt-

C/CPE u poređenju sa optičkom metodom. Nadalje, elektroanalitička metoda pruža mogućnost rada u slabo baznoj i umereno kiseloj sredini, dok klasična spektrofotometrijska metoda zasnovana na generisanju pertitanske kiseline zahteva rad u jako kiseloj sredini, kao i pripremu reagensa koja iziskuje puno vremena.

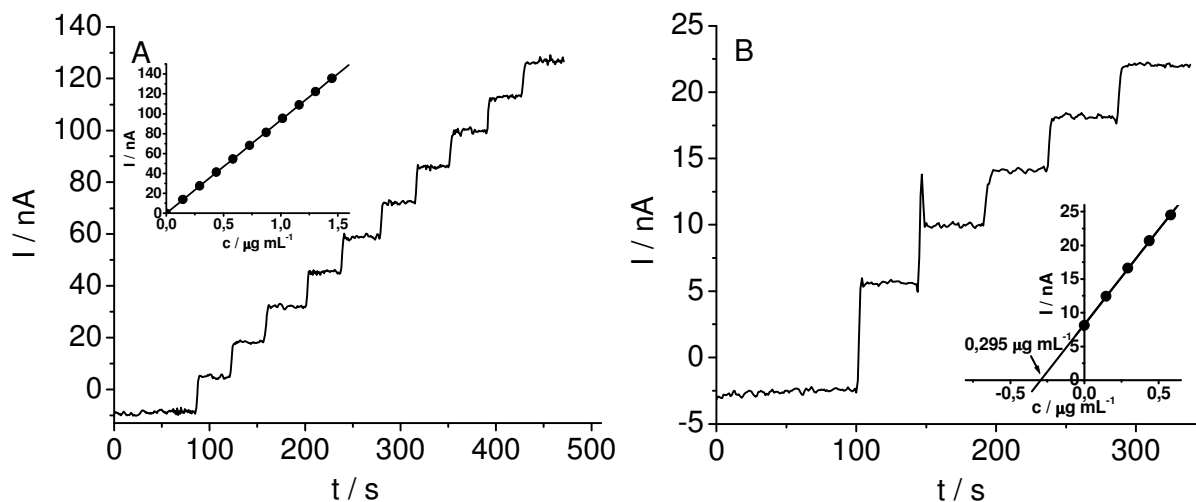
4.3.3. Analiza proizvoda za ličnu negu

U cilju ispitivanja primenljivosti Pt-C/CPE za kontrolu kvaliteta proizvoda za ličnu negu u pogledu sadržaja njihove aktivne komponente H_2O_2 , dva komercijalno dostupna proizvoda su odabrana sa deklarisanim sadržajem H_2O_2 od 3%: rastvor za dezinfekciju i rastvor za čišćenje kontaktnih sočiva. Oba proizvoda su analizirana radi određivanja sadržaja H_2O_2 . Proces neutralizacije/razgradnje H_2O_2 je takođe ispitan u rastvoru za kontaktna sočiva, pri čemu je za ovaj proces primenjen platinski disk (AOSept[®]) koji je isporučen od strane kompanije u pakovanju zajedno sa rastvorom za čišćenje kontaktnih sočiva. Za sve uzorke, pored amperometrijskih merenja, vršena su i komparativna spektrofotometrijska merenja. Metoda standardnog dodatka je primenjena u slučaju obe analitičke metode kako bi se izbegli mogući efekti matriksa.

Rastvor za dezinfekciju

Kao prvo, sadržaj H_2O_2 je određen u rastvoru koji se uglavnom koristi za dezinfekciju rana. Na osnovu deklaracije proizvođača, ovaj rastvor takođe sadrži i natrijum benzoat kao stabilizator. Na osnovu literaturnih podataka, oksidacija benzoata na platinskoj elektrodi se može očekivati na vrednostima potencijala iznad 0,4 V u odnosu na ZKE [228]. Stoga su početni eksperimenti rađeni primenom Pt-C/CPE u rastvoru fosfatnog pufera (0,1 mol L⁻¹, pH 7,50) pri radnom potencijalu 0,15 V, čime je omogućeno određivanje H_2O_2 a u isto vreme je izbegnut mogući uticaj benzoata. Snimljeni su amperometrijski signali H_2O_2 (slika 57A) na osnovu čijih intenziteta je konstruisana odgovarajuća kalibraciona kriva (umetak, slika 57A). Kalibraciona kriva za ispitivani opseg koncentracija H_2O_2 od 0,15 do 1,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se može opisati jednačinom: $I [\text{nA}] = 93,63 [\text{nA mL } \mu\text{g}^{-1}] c + 0,022 [\text{nA}]$, $r = 0,999$. Nakon toga vršeno je amperometrijsko određivanje H_2O_2 u rastvoru za dezinfekciju, pri čemu je prvo u pomoćni elektrolit dodat alikvot uzorka, a potom i četiri standardna dodatka H_2O_2 (slika 57B). Može se uočiti da iako se radna elektroda polarizuje na pozitivnom potencijalu od 0,15 V, bazna linija u slučaju oba prikazana amperograma ima negativnu vrednost struje, što je najverovatnije u prirodi samog kompozitnog materijala kojim

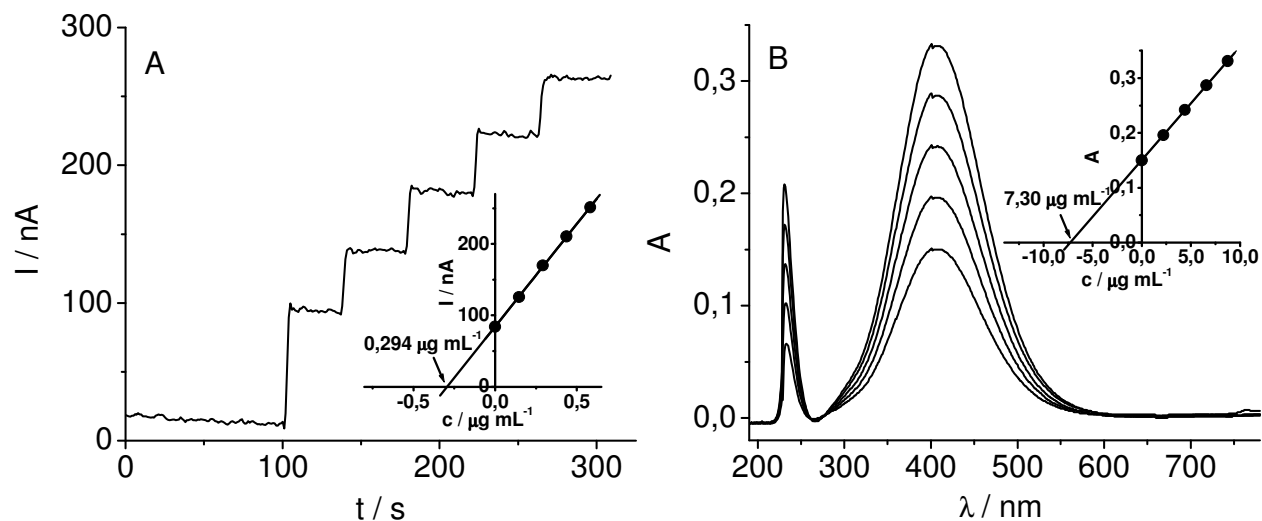
je elektroda modifikovana. S obzirom da se promenom radnog potencijala na 0,20 V ne uočava ova pojava i da se dobijaju signali H_2O_2 znatno većeg intenziteta pri čemu je uticaj benzoata i dalje neznan, eksperimenti su nastavljeni primenom ovog radnog potencijala.



Slika 57. Amperogrami H_2O_2 snimljeni primenom Pt-C/CPE u opsegu koncentracija 0,15–1,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (A) i prilikom određivanja H_2O_2 u rastvoru za dezinfekciju (B). Pomoćni elektrolit: 0,1 mol L^{-1} fosfatni pufer pH 7,50. Radni potencijal: 0,15 V. Umetci: pripadajuća kalibraciona kriva (A) i analitička prava sa četiri standardna dodatka H_2O_2 (B).

Na slici 58 je prikazan ilustrativni amperogram snimljen pri potencijalu 0,20 V (A) i UV/Vis spektri (B) određivanja H_2O_2 u rastvoru za dezinfekciju. Sa amperograma prikazanog na slici 58A se može uočiti da su signali H_2O_2 manjeg intenziteta u poređenju sa strujnim odzivima rastvora standardizovanog H_2O_2 dobijenih prilikom snimanja kalibracione krive, što se može prepisati mogućoj adsorpciji benzoata na uvećanoj ugljeničnoj površini elektrode. Metodom standardnog dodatka u kombinaciji sa adekvatnim razblaženjem uzorka se prevazilaze problemi vezani za supresiju signala. U slučaju spektrofotometrijskih merenja (slika 58B), prvo je snimljen spektar razblaženog uzorka i onda su uzastopno dodata četiri standardna dodatka H_2O_2 . Koncentracija H_2O_2 u uzorku je evaluirana sa odgovarajućih analitičkih pravi u slučaju obe primenjenije metode (umetci, slika 58A, B). Eksperimenti su vršeni u tri ponavljanja i na osnovu dobijenih rezultata srednja vrednost za sadržaj H_2O_2 u rastvoru za dezinfekciju je iznosila 2,91% (izračunato iz: 2,93%, 2,91% i 2,89%) sa RSD jednakoj 0,69% na osnovu amperometrijske metode i 2,94% (izračunato iz: 2,92%,

2,92% i 2,98%) sa RSD 1,18% koliko je dobijeno primenom spektrofotometrijske metode. Postignuti rezultati su u dobroj saglasnosti sa deklarisanom vrednošću za sadržaj H_2O_2 koja iznosi 3%.

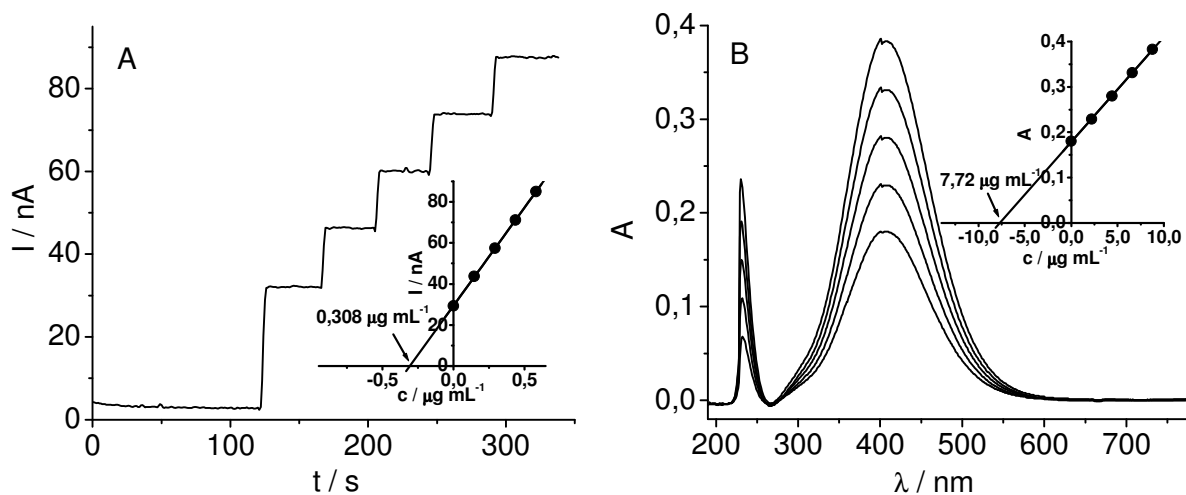


Slika 58. Amperogram dobijen primenom Pt-C/CPE u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatnom puferu pH 7,50 pri radnom potencijalu 0,20 V (A) i UV/Vis spektri (B) prilikom određivanja H_2O_2 u rastvoru za dezinfekciju. Umetci: pripadajuće analitičke prave sa četiri standardna dodatka H_2O_2 .

Rastvor za čišćenje kontaktnih sočiva

Primenljivost predloženog Pt-C/CPE amperometrijskog senzora za određivanje H_2O_2 u AOSept[®] Plus rastvoru za kontaktna sočiva je takođe ispitana. Početni eksperimenti su vršeni u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatnom puferu pH 7,50 kao pomoćnom elektrolitu, ali dobijeni rezultati su bili sa pozitivnom greškom koja je bila između 11 i 16% u poređenju sa deklarisanom vrednošću za sadržaj H_2O_2 . Pretpostavlja se da je do ovakvih ishoda došlo verovatno zbog uticaja jona Cl^- (koje sadrži AOSept[®] Plus rastvor na osnovu deklaracije proizvođača) na Pt-C modifikator. U skadu sa ranijim istraživanjima i objavljenom analitičkom metodom za amperometrijsko određivanje glukoze u uzorku infuzije primenom GOx/Pt-MWCNT/CPE u takvim situacijama menjanje pH vrednosti pomoćnog elektrolita na 4,50 i odabir odgovarajućeg radnog potencijala (od 0,45 do 0,60 V) može pomoći da se prevaziđu slični problemi [225]. Dosledno tome, amperometrijska merenja su vršena sa Pt-C/CPE u acetatnom puferu ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,50) pri radnom potencijalu 0,50 V, ali utvrđeno

je da se primenom radnog potencijala od 0,60 V takođe dobijaju rezultati koji su u zadovoljavajućoj saglasnosti sa deklarisanom vrednošću. Na slici 59 su prikazani reprezentativni rezultati amperometrijskog (A) i spektrofotometrijskog (B) određivanja H_2O_2 u rastvoru za čišćenje kontaktnih sočiva zajedno sa odgovarajućim analitičkim pravama (umetci). Pronađena količine H_2O_2 u AOSept® Plus rastvoru su bile 3,05%, 3,06%, 3,00% (srednja vrednost 3,04%) primenom amperometrijske metode i 3,14%, 3,23%, 3,15% (srednja vrednost 3,17%) primenom spektrofotometrijske metode, što je u dobroj saglasnosti sa nominalnom vrednošću deklarisanom od strane proizvođača (3%). Vrednost RSD je bila nešto viša u slučaju spektrofotometrijske metode (1,56%), dok je za amperometrijsku metodu ona iznosila 1,06%.



Slika 59. Amperogram dobijen primenom Pt-C/CPE u 0,1 mol L⁻¹ acetatnom puferu pH 4,50 pri radnom potencijalu 0,50 V (A) i UV/Vis spektri (B) prilikom određivanja H_2O_2 u AOSept® Plus rastvoru za kontaktna sočiva. Umetci: pripadajuće analitičke prave sa četiri standardna dodatka H_2O_2 .

Koncentracija H_2O_2 potrebna za dezinfekciju i čišćenje kontaktnih sočiva izaziva iritaciju očiju, što znači da H_2O_2 mora biti neutralizovan ili razgrađen pre nego što se kontaktna sočiva ponovo upotrebe [17]. Stoga je u narednom koraku, proces neutralizacije/razgradnje H_2O_2 u rastvoru AOSept® Plus upotrebom AOSept® platinskog diska praćen primenom razvijenih analitičkih metoda. U toku procesa dezinfekcije/čišćenja, platinski disk, koji se nalazi u AOSept® pakovanju zajedno sa rastvorom za čišćenje kontaktnih sočiva, simulatano konvertuje H_2O_2 u izotonični rastvor soli bez konzervansa i preostala koncentracija H_2O_2 nakon neutralizacije je

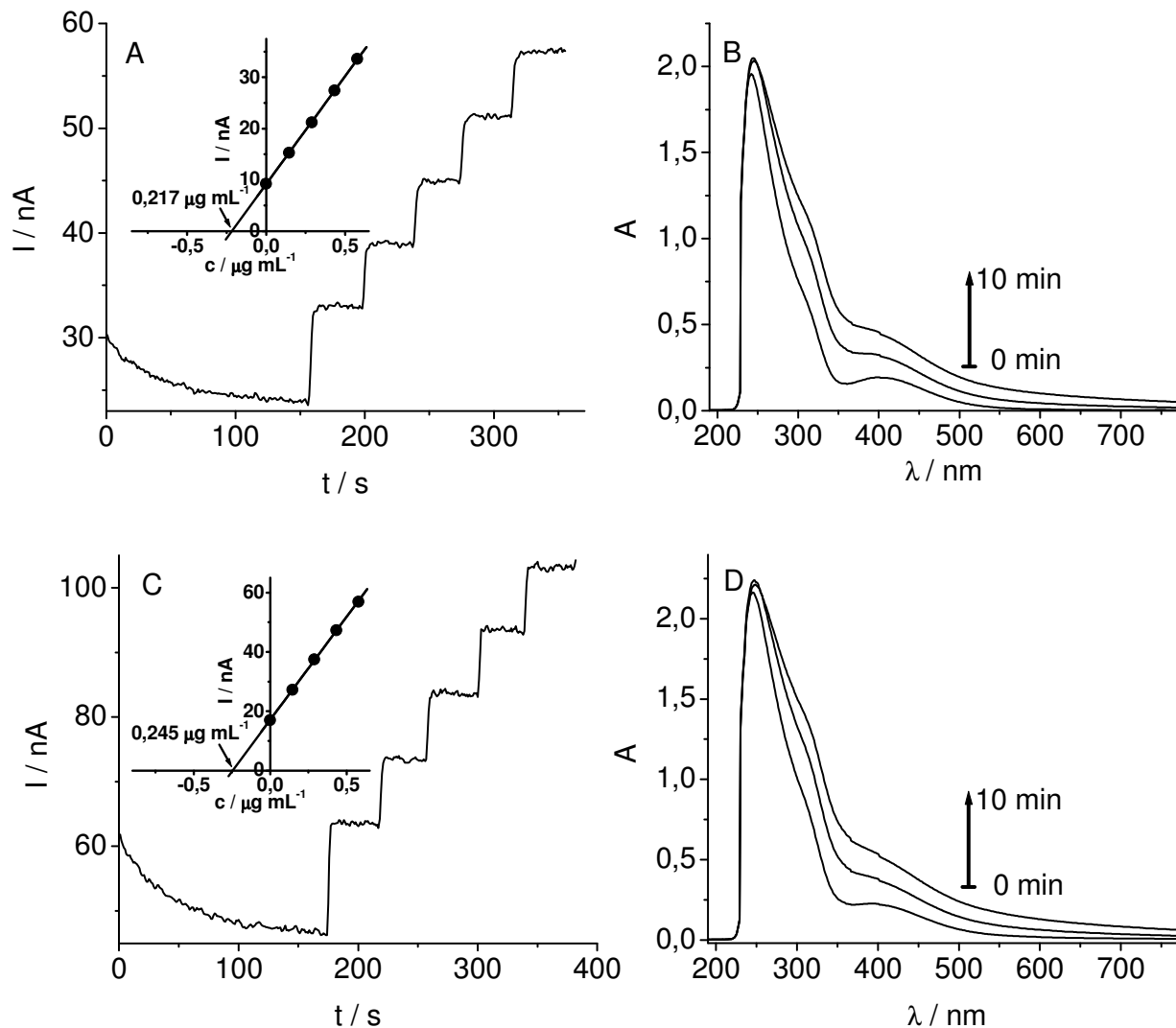
obično manja od 50 do 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$, što je ispod praga iritacije oka [229]. U tabeli 9 su prikazani rezultati koji se odnose na preostale/određene koncentracije H_2O_2 u AOSept® Plus rastvoru nakon različitih vremenskih intervala u toku procesa neutralizacije/razgradnje dobijeni primenom amperometrijske metode bazirane na Pt-C/CPE i komparativne spektrofotometrijske metode, koje su u dobroj saglasnosti na osnovu rezultata merenja dobijenih za kontaktno vreme rastvora analita i čvrstog katalizatora između 0 h i 4 h. U svim razmatranim vremenskim intervalima sadržaj H_2O_2 je određen metodom standardnog dodatka u slučaju obe primenjene merne tehnike.

Tabela 9. Preostale koncentracije H_2O_2 u AOSept® Plus rastvoru nakon različitog kontaktnog vremena u toku procesa neutralizacije/razgradnje postignutim tretiranjem rastvora za kontaktna sočiva sa AOSept® Plus platinskim diskom pri režimu rada u mraku. Rezultati dobijeni primenom amperometrijske i spektrofotometrijske metode zajedno sa odgovarajućim vrednostima RSD na osnovu tri ponovljena merenja u jednom setu eksperimenata.

Kontaktno vreme [min]	Amperometrija, c (H_2O_2) [%]	RSD [%]	Spektrofotometrija, c (H_2O_2) [%]	RSD [%]
0	3,04	1,06	3,17	1,56
2	2,71	1,49	2,88	2,76
5	2,09	0,28	2,11	1,91
10	1,21	0,95	1,13	0,10
30	0,27	0,22	0,27	0,22
60	0,036	2,19	0,036	1,12
120	0,016	2,58	0,016	0,74
240	0,0027	2,06	nije primenljiva	nije primenljiva
360	0,0024	3,70	nije primenljiva	nije primenljiva

Važno je napomenuti da primenom spektrofotometrijske metode nije bilo moguće odrediti sadržaj H_2O_2 u uzorcima koji se odnose na 4 h i 6 h neutralizacije/razgradnje. Naime, kao što je prikazano na slici 60, određene promene u obliku UV/Vis spektara uključujući i analitičku spektralnu traku se uočavaju tokom tri uzastopna merenja/snimanja samo u slučaju H_2O_2 uzoraka uzetih nakon 4 h (B) i 6 h (D) procesa neutralizacije. Stoga u ovim uzorcima nije bilo moguće

odrediti sadržaj H_2O_2 sa zadovoljavajućom pouzdanošću primenom optičke metode. U slučaju amperometrijske metode (slika 60A, C) ovakvi otežavajući efekti nisu bili zapaženi.



Slika 60. Amperogrami dobijeni primenom Pt-C/CPE u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ acetatnom puferu pH 4,50 pri radnom potencijalu $0,50 \text{ V}$ (A, C) i UV/Vis spektri (B, D) AOSepi[®] Plus rastvora za kontaktna sočiva tretiranog 4 h (A, B) i 6 h (C, D) čvrstim platinskim katalizatorom u mraku. Umetci (A i C): pripadajuće analitičke prave sa četiri standardna dodatka H_2O_2 . U slučaju B i D, spektri su snimljeni uzastopno tri puta u vremenskom intervalu od ukupno 10 min prikazujući promenljive karakteristike ispitivanih uzoraka.

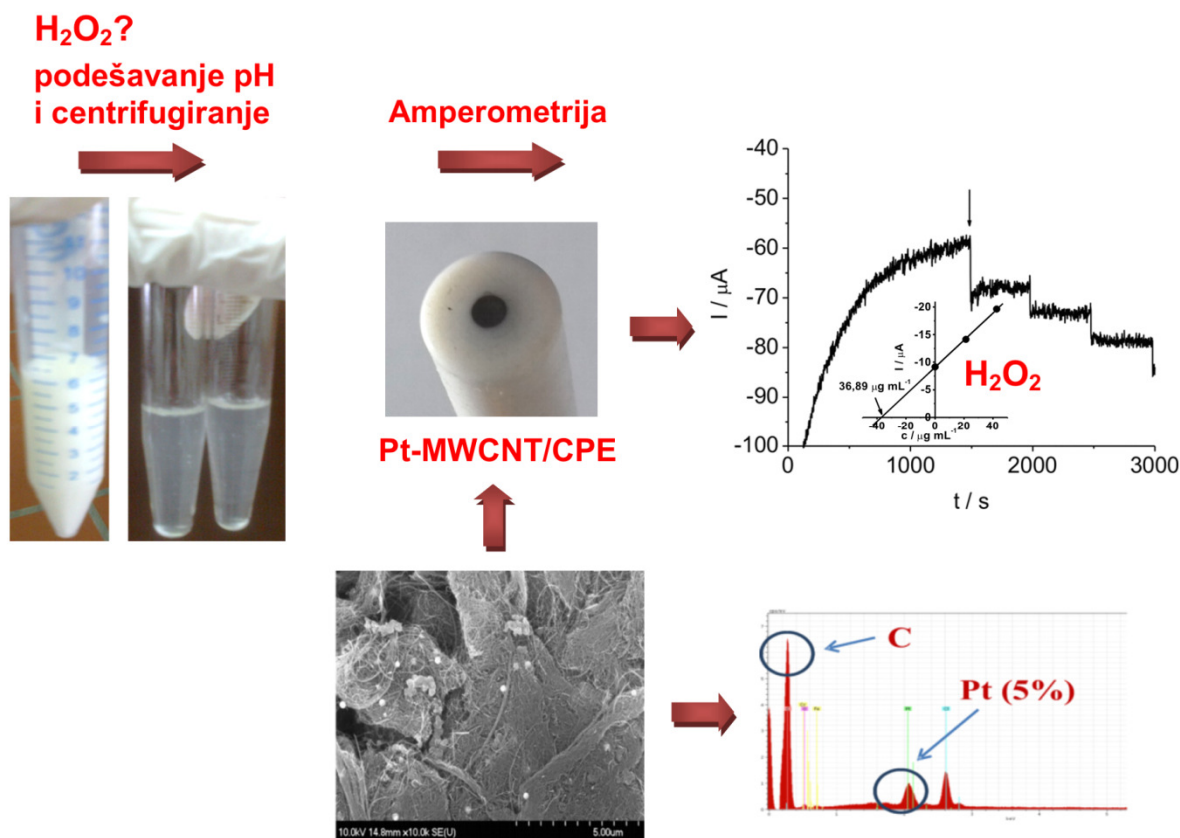
Sva merenja su vršena u tri ponavljanja i RSD izmerenih vrednosti koncentracije H₂O₂ za obe metode nije prelazila 2,8%, osim u slučaju uzorka uzetog nakon 6 h neutralizacije gde je RSD iznosila 3,7%. Nadalje, ponovljivost eksperimenata na odabranim vremenskim intervalima (10 min i 4 h) je takođe ispitana. Na osnovu tri ponovljena eksperimenata za uzorak koji se odnosi na 10 min neutralizacije H₂O₂ izračunata vrednost RSD je iznosila 7,2%, dok je za uzorak koji se odnosi na vremenski interval od 4 h RSD bila blizu 20%. Iz tabele 9 se takođe može videti da u toku prvih 10 min više od 60% H₂O₂ je neutralisano/razgrađeno. Nakon 4 h, koncentracija H₂O₂ u ispitivanom rastvoru je ispod praga iritacije oka i ne menja se signifikantno do kraja 6 h neutralizacije. Na osnovu preporuke proizvođača, vreme dezinfekcije kontaktnih sočiva primenom AOSep[®] Plus sistema je 6 h. Nakon perioda od 6 h, u ovom radu, pronađena koncentracija H₂O₂ primenom amperometrijske metode je bila 0,00244% (24,68 μg mL⁻¹), i imajući u vidu da je proces neutralizacije postignut bez kontaktnih sočiva u sistemu, bezbednost upotrebe može biti potvrđena sa visokom verovatnoćom pri pomenutim uslovima.

Životni vek Pt-C/CPE je duži od tri dana ukoliko je umerena primena i površina elektrode tretirana na odgovarajući način. Kao što je već pomenuto, elektrohemijsko cikliranje radne elektrode u adekvatnoj sredini i opsegu potencijala dovodi do stabilizacije površine radne elektrode, amperometrijskih signala i značajno produžava vreme trajanja elektrode.

Pt-C/CPE u kombinaciji sa optimizovanom amperometrijskom metodom je pogodno analitičko sredstvo sa brzim odzivom i pouzdanim karakteristikama, pa se stoga može primeniti za analizu H₂O₂ u različitim proizvodima za ličnu negu sa različitim tipovima matriksa, kao što su rastvor za dezinfekciju sa natrijum benzoatom kao stabilizatorom, zatim rastvor za čišćenje kontaktnih sočiva u kombinaciji sa fiziološkom izotoničnom sredinom, kao i uzorci rastvora za čišćenje kontaktnih sočiva uzeti u toku procesa dezinfekcije/čišćenja nakon različitih kontaktnih vremena sa platinskim diskom pri režimu rada u mraku. Primenljivost i efikasnost pomenutih proizvoda za ličnu negu je predodređena koncentracijom aktivnog sastojka, tj. H₂O₂, usled čega je njegovo određivanje analitički zadatak, koji među ostalim parametrima, potvrđuje kvalitet ispitivanih proizvoda. Sa druge strane, predložene amperometrijske metode su zasnovane na visoko osetljivoj elektrodi napravljenoj od komercijalno dostupnih komponenti, što ih dodatno čini jednostavnim za primenu i takođe skraćuje vreme trajanja analize.

4.4. Amperometrijsko određivanje H_2O_2 primenom elektrode od ugljenične paste površinski modifikovane višezidnim ugljeničnim nanocevima dekorisanim česticama Pt ili MnO_2

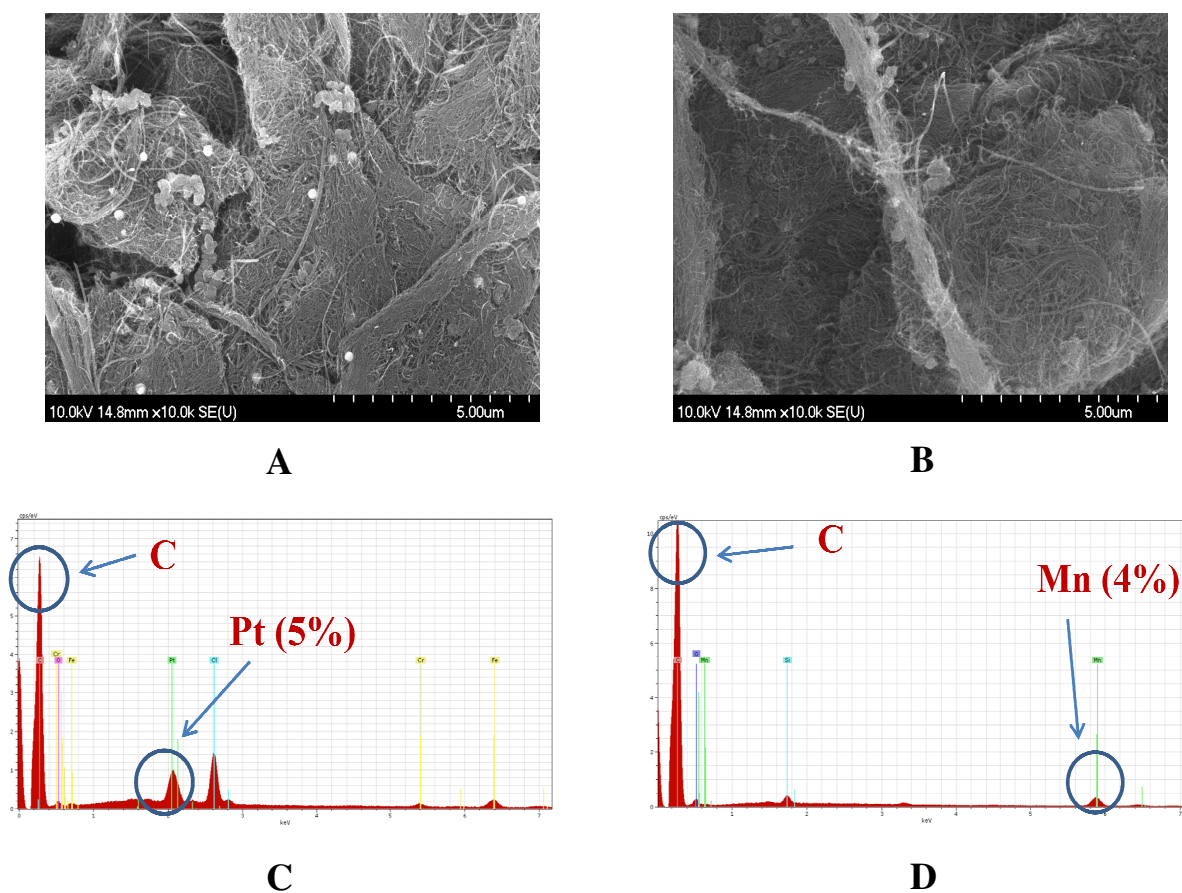
U okvirima ovog istraživanja je CPE površinski modifikovana sa različitim nanomaterijalima: višezidnim ugljeničnim nanocevima (MWCNT/CPE), kompozitom na bazi platine i višezidnih ugljeničnih nanocevi (Pt-MWCNT/CPE) ili kompozitom na bazi mangan(IV)-oksida i višezidnih ugljeničnih nanocevi (MnO_2 -MWCNT/CPE), primenom jednostavne metode nanošenja kapi. Osnovne elektrohemijske karakteristike radnih elektroda su upoređene primenom CV, dok je određivanje H_2O_2 vršeno primenom amperometrije. MnO_2 -MWCNT/CPE i Pt-MWCNT/CPE su testirane za određivanje H_2O_2 u obogaćenom uzorku mleka. Na slici 61 je ilustrativno, shematski, prikazan postupak rada.



Slika 61. Shematski prikaz postupka određivanja H_2O_2 u obogaćenom uzorku mleka primenom Pt-MWCNT/CPE (na osnovu [225]).

4.4.1. Karakterizacija elektroda od ugljenične paste – nemodifikovane i površinski modifikovanih višezidnim ugljeničnim nanocevima i njihovim kompozitima

Kompozitni materijali Pt-MWCNT i MnO₂-MWCNT su okarakterisani primenom SEM/EDS u cilju ispitivanja njihove morfologije i sastava. Sa slike 62 se može uočiti da MWCNT u oba kompozita ostaju u nepromenjenom obliku nakon procesa pripreme. U slučaju Pt-MWCNT (slika 62A), Pt-čestice se prepoznaju kao svetle, uglavnom čestice sfernog oblika, koje u kompozitu mogu biti prisutne u formi pojedinačnih nanočestica ili manjih agregata. U nekim slučajevima MWCNT okružuju ove agregate. U kompozitu MnO₂-MWCNT, čestice MnO₂ su veoma sličnih dimenzija, i one takođe mogu biti zastupljene u pojedinačnoj formi ili u obliku agregata (slika 62B). Lokalna mikroanaliza Pt-MWCNT i MnO₂-MWCNT kompozita je takođe izvršena, i dobijeni EDS rezultati su pokazali da se oko 5% (m:m) modifikatora može identifikovati kao Pt, i malo manje kao Mn (slika 62C, D).

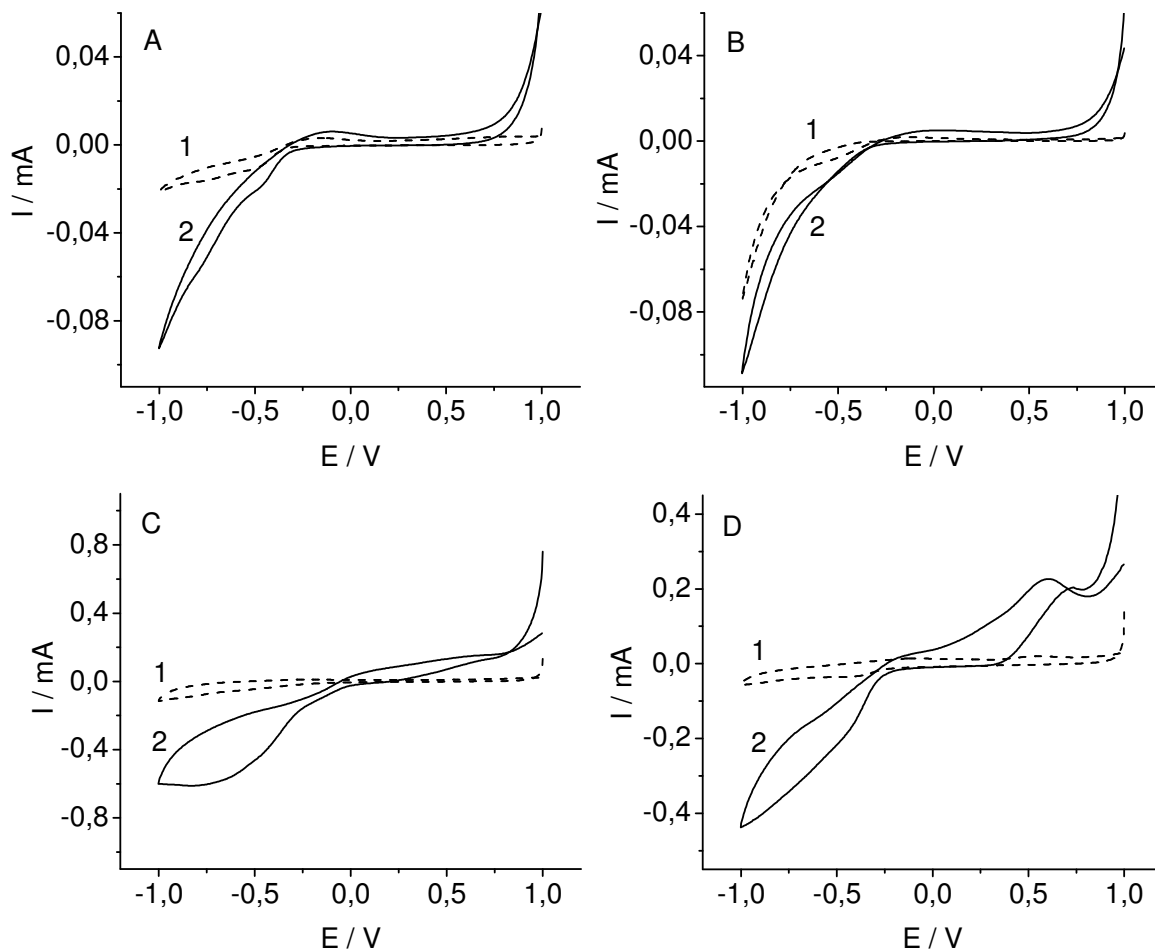


Slika 62. SEM prikaz kompozita: Pt-MWCNT (A) i MnO₂-MWCNT (B), i rezultati EDS lokalne mikroanalize Pt-MWCNT (C) i MnO₂-MWCNT (D).

Ovi materijali, zajedno sa nativnim MWCNT, su poslužili kao površinski modifikatori CPE, pri čemu je modifikacija izvršena jednostavnom metodom nanošenja kapi suspenzije napravljene od optimizovane količine nanomaterijala i etanola. Imajući u vidu da je opisana CPE zasnovana na parafinskom ulju i grafitnom prahu, pokazala zadovoljavajući afinitet prema kompozitnim materijalima u pogledu mehaničke stabilnosti pripremljenih senzorskih površina, ova veoma jednostavna, jeftina i lako izvodljiva metoda je primenjena za modifikacije CPE.

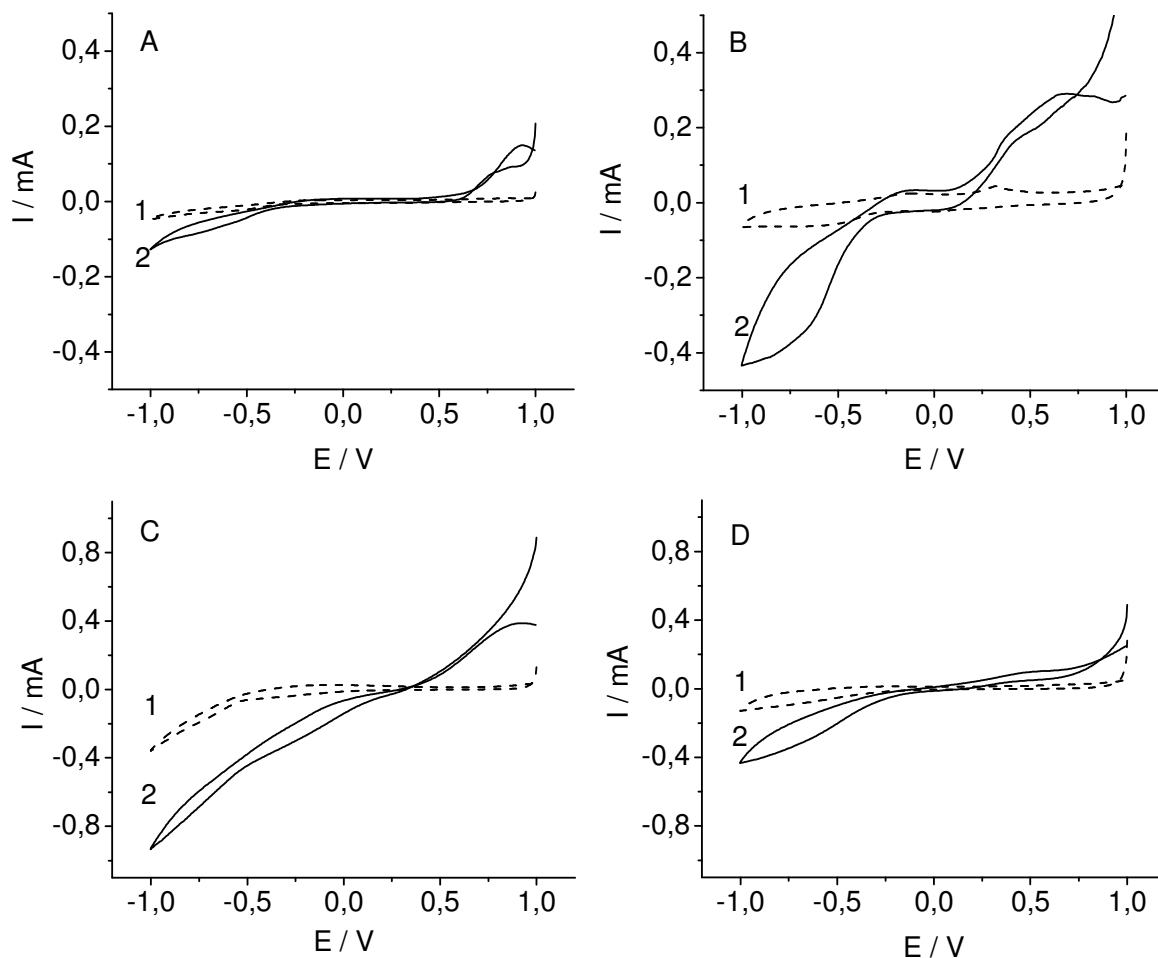
U slučaju amperometrijskih merenja, posebno u složenim matriksima, odgovarajući odabir radne elektrode, radnog potencijala i pH vrednosti pomoćnog elektrolita može da dovede do znatnog poboljšanja osetljivosti i/ili selektivnosti metode. Stoga je, kao prvi korak, voltametrijsko ponašanje H_2O_2 na četiri elektrode, nemodifikovanoj CPE, MWCNT/CPE, Pt-MWCNT/CPE i MnO_2 -MWCNT/CPE proučavano primenom CV u prisustvu tri različita pomoćna elektrolita, acetatnom (pH 4,50, 0,1 mol L^{-1}), fosfatnom (pH 7,50, 0,1 mol L^{-1}) i boratnom (pH 9,18) puferu. Osnovni cilj je bio da se definišu uslovi merenja pri kojima CV signali H_2O_2 ciljnog analita pokazuju različite oblike u odnosu na signale bazne linije snimljene sa istom elektrodnom površinom u odgovarajućem pomoćnom elektrolitu. Na slici 63 su prikazani rezultati CV merenja u blago alkalnoj sredini, bazne linije su snimljene u fosfatnom puferu pH 7,50 (krive 1) primenom sve četiri radne elektrode u opsegu potencijala od 1,0 do -1,0 V (polarizacija u smeru negativnih potencijala). Krive 2 na slici 63 označavaju ciklične voltamograme snimljene u prisustvu H_2O_2 u fosfatnom puferu.

U blago alkalnoj sredini, MWCNT/CPE (slika 63B) pokazuje znatno poboljšanje intenziteta redukcionog signala H_2O_2 u poređenju sa nemodifikovanom CPE (kod koje se direktna redukcija i oksidacija H_2O_2 odigrava u prilično negativnoj i pozitivnoj oblasti potencijala, slika 63A) naročito na potencijalima nižim od -0,60 V u odnosu na ZKE. U slučaju Pt-MWCNT/CPE (slika 63C), efekat je mnogo izraženiji počevši od -0,05 V i na nižim potencijalima, ali ova elektroda pokazuje zapažene signale i na 0,10 V, kao i višim vrednostima potencijala u pozitivnom delu ciklusa, pri čemu pri izraženoj pozitivnoj polarizaciji verovatno formirani oksidi Pt mogu uticati na oksidacione signale H_2O_2 . Što se tiče MnO_2 -MWCNT/CPE (slika 63D), usled prisustva medijatora u kompozitu, pri pozitivnim potencijalima počevši od 0,30 V i višim, oksidacioni signali H_2O_2 su signifikantni, ali ova elektroda takođe pokazuje odzive prema H_2O_2 pri negativnoj polarizaciji od -0,50 V do blizu -0,90 V.



Slika 63. Ciklični voltamogrami snimljeni primenom nemodifikovane CPE (A), MWCNT/CPE (B), Pt-MWCNT/CPE (C), MnO₂-MWCNT/CPE (D) u fosfatnom puferu pH 7,50 (isprekidane linije, krive 1) i u istom pomoćnom elektrolitu u prisustvu 680,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ H₂O₂ (pune linije, krive 2). Brzina polarizacije u svim slučajevima: 50 mV s^{-1} .

Dodatne izražene razlike između elektroda modifikovanim sa kompozitima $\text{MnO}_2\text{-MWCNT}$ i Pt-MWCNT se uočavaju njihovom primenom u acetatnom i boratnom puferu (slika 64).



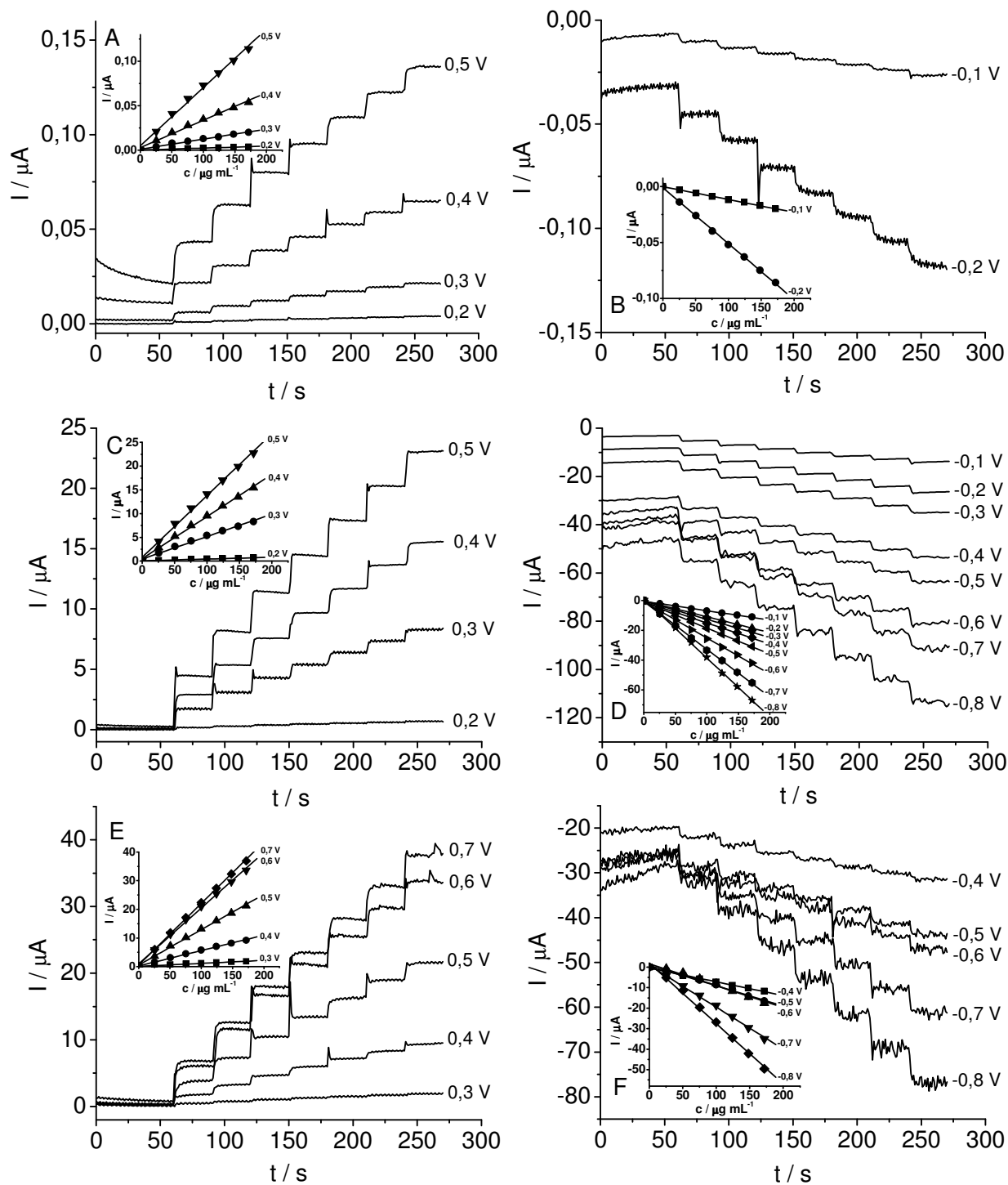
Slika 64. Ciklični voltamogrami snimljeni primenom $\text{MnO}_2\text{-MWCNT/CPE}$ (A, B) i Pt-MWCNT/CPE (C, D) u acetatnom puferu pH 4,50 (A, C) i boratnom puferu pH 9,18 (B, D) u odsustvu (isprekidane linije, krive 1) i prisustvu $680,4 \mu\text{g mL}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ (pune linije, krive 2). Brzina polarizacije u svim slučajevima: 50 mV s^{-1} .

U kiselj sredini ponašanje $\text{MnO}_2\text{-MWCNT/CPE}$ nije bilo zadovoljavajuće, naročito u opsegu potencijala od oko -0,50 do 0,60 V jer CV signal H_2O_2 pokazuje lošu reproduktivnost i preklapanje sa cikličnim voltamogramima pomoćnog elektrolita (slika 64A). U baznoj sredini $\text{MnO}_2\text{-MWCNT/CPE}$ je pokazala obećavajuće karakteristike (posebno pri pozitivnoj polarizaciji, slika 64B), dok su u slučaju Pt-MWCNT/CPE signali H_2O_2 izraženiji u kiselj sredini (slika 64C), a pri pH 9,18 je mogućnost primene ove elektrode ograničena (slika 64D).

4.4.2. Analitičke metode zasnovane na elektrodi od ugljenične paste površinski modifikovanoj kompozitom od višezidnih ugljeničnih nanocevi i čestica Pt ili MnO₂

Kao što je već navedeno, informacije dobijene primenom CV mogu pomoći u toku optimizacije analitičkih metoda i to prilikom odabira radnog potencijala za amperometrijska merenja u različitim pomoćnim elektrolitima što je od velikog značaja za direktno određivanje H₂O₂ u različitim tipovima uzoraka.

Široki spektar mogućih radnih potencijala je ispitan na osnovu snimljenih cikličnih voltamograma kako bi se pronašli odgovarajući uslovi merenja za razvijanje amperometrijskih metoda određivanja H₂O₂. Na slici 65 su prikazani amperogrami H₂O₂ snimljeni pri različitim radnim potencijalima primenom MWCNT/CPE (A), Pt-MWCNT/CPE i MnO₂-MWCNT/CPE (C) u fosfatnom puferu pH 7,50 kao pomoćnom elektrolitu, zajedno sa pripadajućim I-c zavisnostima. Intenzitet signala H₂O₂ zavisi od tipa primenjene elektrode kao i od radnog potencijala. Nadalje, kao što se može očekivati na osnovu snimljenih cikličnih voltamograma, promenom radnog potencijala ka pozitivnijim ili negativnijim vrednostima dobijaju se intenzivniji signali H₂O₂. Sa druge strane, pri određenim negativnim vrednostima potencijala dolazi do pojave šumova. Stoga je neophodno za svaku radnu elektrodu izvršiti optimizaciju metode u pogledu radnog potencijala, koncentracionog opsega ciljnog analita, kao i pH vrednosti pomoćnog elektrolita. U tabelama 10, 11 i 12 su sumirani odabrani analitički parametri koji se odnose na konstruisane I-c zavisnosti, odnosno na razvoj analitičkih metoda za određivanje H₂O₂ u fosfatnom puferu pH 7,50 zasnovanih na primeni MWCNT/CPE, Pt-MWCNT/CPE i MnO₂-MWCNT/CPE, redom.



Slika 65. Amperogrami H_2O_2 snimljeni u opsegu koncentracija od 25,4 do 171,8 $\mu g mL^{-1}$ u fosfatnom puferu pH 7,50 pri različitim radnim potencijalima primenom MWCNT/CPE (A, B), Pt-MWCNT/CPE (C, D) i MnO_2 -MWCNT/CPE (E, F). Umeci: pripadajuće I-c zavisnosti.

Tabela 10. Odabrani analitički parametri amperometrijskog određivanja H_2O_2 primenom MWCNT/CPE pri različitim radnim potencijalima u fosfatnom puferu pH 7,50. Ispitivani opseg koncentracija H_2O_2 : 25,4–171,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Radni potencijal [V]	Odsečak [μA]	Nagib [$\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$]	Koeficijent korelacije
0,50	0,005	$6,6 \cdot 10^{-4}$	0,997
0,40	0,003	$3,1 \cdot 10^{-4}$	0,996
0,30	0,001	$1,1 \cdot 10^{-4}$	0,995
0,20	$2,8 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-5}$	0,993
-0,10	$-1,3 \cdot 10^{-4}$	$-1,1 \cdot 10^{-4}$	-0,999
-0,20	-0,001	$-5,0 \cdot 10^{-4}$	-0,999

Tabela 11. Odabrani analitički parametri amperometrijskog određivanja H_2O_2 primenom Pt-MWCNT/CPE pri različitim radnim potencijalima u fosfatnom puferu pH 7,50. Ispitivani opseg koncentracija H_2O_2 : 25,4–171,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

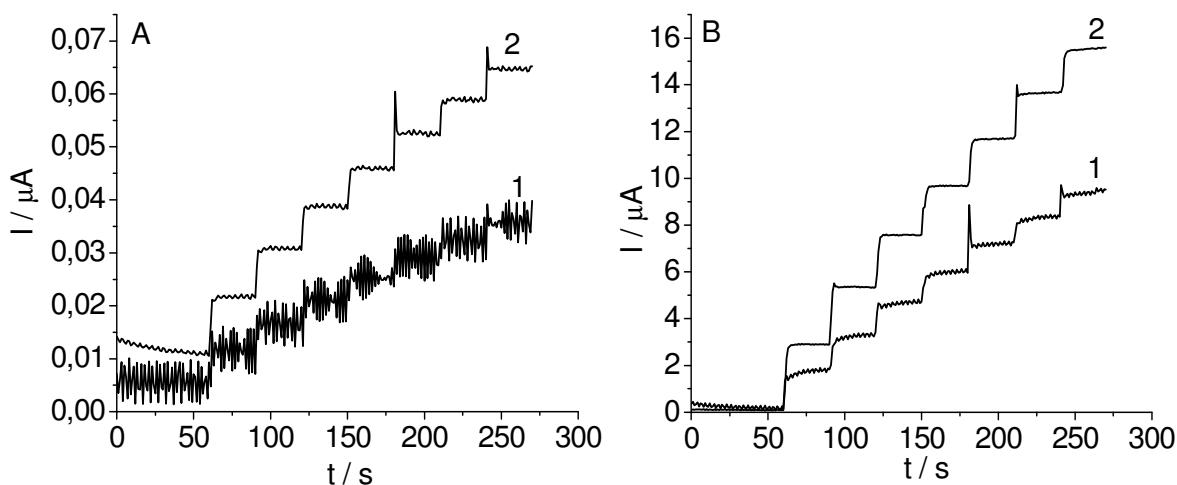
Radni potencijal [V]	Odsečak [μA]	Nagib [$\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$]	Koeficijent korelacije
0,50	0,803	0,130	0,998
0,40	0,512	0,089	0,999
0,30	0,447	0,047	0,996
0,20	0,057	0,004	0,991
-0,10	-0,465	-0,063	-0,997
-0,20	-0,103	-0,107	-0,999
-0,30	-0,331	-0,122	-0,999
-0,40	-0,812	-0,142	-0,999
-0,50	-0,821	-0,176	-0,999
-0,60	-0,762	-0,242	-0,999
-0,70	-0,571	-0,321	-0,999
-0,80	1,073	-0,396	-0,999

Tabela 12. Odabrani analitički parametri amperometrijskog određivanja H_2O_2 primenom MnO_2 -MWCNT/CPE pri različitim radnim potencijalima u fosfatnom puferu pH 7,50. Ispitivani opseg koncentracija H_2O_2 : 25,4–171,8 $\mu g mL^{-1}$.

Radni potencijal [V]	Odsečak [μA]	Nagib [$\mu A mL \mu g^{-1}$]	Koeficijent korelacije
0,70	0,609	0,214	0,999
0,60	1,006	0,195	0,998
0,50	0,590	0,123	0,999
0,40	0,268	0,054	0,998
0,30	0,106	0,010	0,994
-0,40	-0,412	-0,067	-0,998
-0,50	0,783	-0,098	-0,997
-0,60	1,712	-0,107	-0,989
-0,70	0,929	-0,204	-0,999
-0,80	2,011	-0,295	-0,998

Radi lakšeg poređenja, na slici 66 su prikazane izdvojene ilustrativne amperometrijske krive H_2O_2 dobijene pri potencijalu 0,40 V primenom CPE, MWCNT/CPE, MnO_2 -MWCNT/CPE i Pt-MWCNT/CPE, pri čemu se u svim slučajevima mogu prepoznati stepeničasti signali H_2O_2 . Može se uočiti da CPE modifikovane kompozitima daju signifikantno intenzivnije signale H_2O_2 u poređenju sa nemodifikovanom CPE i MWCNT/CPE što je u saglasnosti sa CV eksperimentima izvedenim pri pH 7,50. Takođe, treba napomenuti da je Pt-MWCNT/CPE primenljiva za amperometrijsko određivanje H_2O_2 na pozitivnim potencijalima kako u fosfatnom tako i u acetatnom puferu. Nasuprot Pt-MWCNT/CPE, MnO_2 -MWCNT/CPE u kiseloj sredini nema zadovoljavajući učinak, ali u baznoj sredini pri pH 9,18 daje signale H_2O_2 većeg intenziteta.

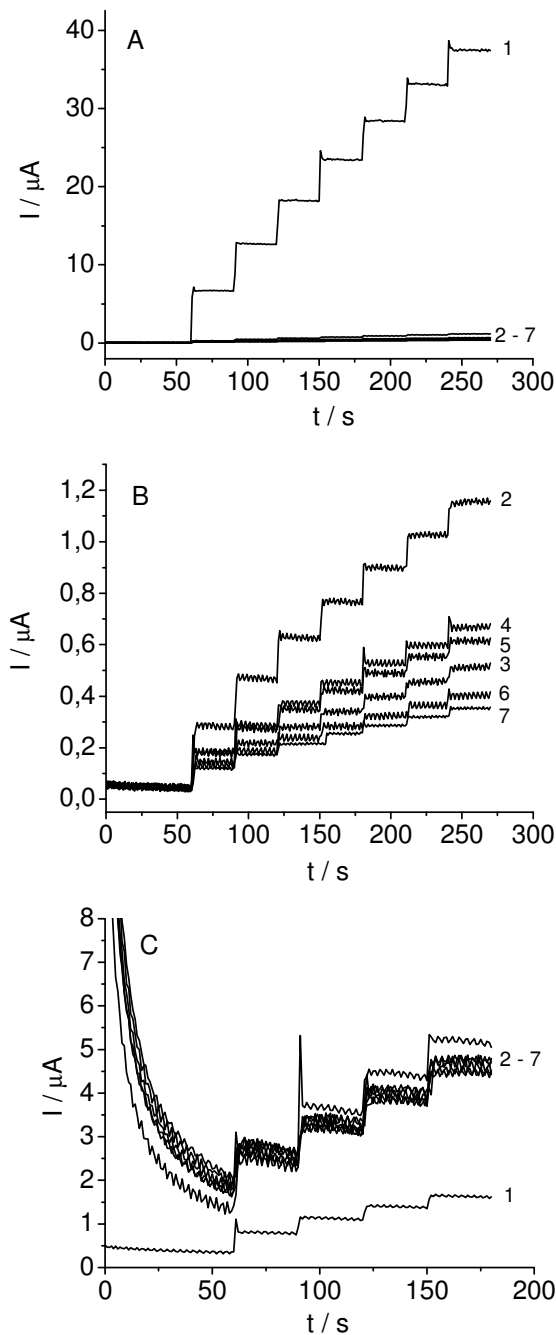
Ponovljivost odziva Pt-MWCNT/CPE i MnO_2 -MWCNT/CPE kao jedan od ključnih parametara za dobijanje pouzdanih analitičkih metoda, je ispitana dodavanjem četiri puta iste količine H_2O_2 u pomoćni elektrolit i ponavljanjem merenja tri puta. RSD je izračunata za svaki stepeničasti signal i njena vrednost je bila ispod 2,4% za Pt-MWCNT/CPE u slučaju fosfatnog pufera pH 7,50 i radnog potencijala 0,40 V.



Slika 66. Poređenje amperograma H_2O_2 snimljenih u opsegu koncentracija od 25,4 do 171,8 $\mu g mL^{-1}$ u fosfatnom puferu pH 7,50 na 0,40 V primenom: CPE (A, kriva 1), MWCNT/CPE (A, kriva 2), MnO_2 -MWCNT/CPE (B, kriva 1) i Pt-MWCNT/CPE (B, kriva 2).

U slučaju MnO_2 -MWCNT/CPE, pri istim eksperimentalnim uslovima, porast broja merenja u jednom setu eksperimenata dovodi do znatnog opadanja signala H_2O_2 (slika 67A, B). Optimizovanim procesom kondicioniranja koji se zasniva na polarizaciji (minimum 120 s, na -0,60 V) MnO_2 -MWCNT/CPE u fosfatnom puferu (pH 7,50), signali H_2O_2 dobijeni pri 0,40 V se mogu stabilizovati, iako se oblik ovako dobijenih amperometrijskih signala razlikuje od osnovnog oblika amperometrijskih krivi snimljenih sa MnO_2 -MWCNT/CPE koja nije prethodno kondicionirana (slika 67C). Različiti eksperimentalni uslovi (naročito pH pomoćnog elektrolita i radni potencijal svih primenjenih radnih elektroda) rezultuju u različitim vrednostima RSD, koje su obično u intervalu između 2 i 5%, a u specifičnim slučajevima RSD može da ima vrednost i do 8%, uglavnom zbog opadanje odnosa signala i šuma. Ukoliko je uticaj matriksa neznatan, ovakve metode pružaju mogućnost amperometrijskog određivanja H_2O_2 .

Vrednosti nagiba kalibracionih krivi dobijenih primenom Pt-MWCNT/CPE i MnO_2 -MWCNT/CPE pri odabranim radnim potencijalima (-0,10 V za Pt-MWCNT/CPE i 0,40 V za MnO_2 -MWCNT/CPE) su dati u tabeli 13. U ovom slučaju, primenom Pt-MWCNT/CPE postiže se slična osetljivost pri pH 4,50 i pH 7,50, dok je osetljivost najmanja pri pH 9,18. MnO_2 -MWCNT/CPE na prikazanom radnom potencijalu (0,40 V) pokazuje suprotno ponašanje, gde je osetljivost više od četiri puta veća pri pH 9,18 nego pri pH 7,50.



Slika 67. Amperogrami H_2O_2 snimljeni primenom MnO_2 -MWCNT/CPE u fosfatnom puferu pH 7,50 na 0,40 V: 7 uzastopnih merenja (A, krive 1-7A), uvećani prikaz krivi dobijenih nakon prvog merenja (B, krive 2-7B) i prikaz stabilizacije signala optimizovanim procesom kondicioniranja (C): kriva snimljena bez prethodnog kondicioniranja (kriva 1C) i 6 uzastopnih merenja sa prethodnim kondicioniranjem elektrode (-0.60 V, 120 s, krive 2-7C). Opseg koncentracija H_2O_2 : 25,4–171,8 $\mu g mL^{-1}$ (A, B), 25,4–99,9 $\mu g mL^{-1}$ (C).

Ostali analitički parametri za metode zasnovane na primeni Pt-MWCNT/CPE i MnO₂-MWCNT/CPE su takođe sumirani u tabeli 13.

Tabela 13. Karakteristični parametri amperometrijskog određivanja H₂O₂ sa Pt-MWCNT/CPE na -0,10 V i MnO₂-MWCNT/CPE na 0,40 V u tri različita rastvora pufera (pH 4,50; 7,50 i 9,18).

Parametar	Pt-MWCNT/CPE, -0,10 V			MnO ₂ -MWCNT/CPE, 0,40 V		
	4,50	7,50	9,18	4,50	7,50	9,18
pH	4,50	7,50	9,18	4,50	7,50	9,18
Ispitivani opseg	25,4-	25,4-	25,4-	-	25,4-	25,4-
koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	171,8	171,8	171,8		171,8	171,8
Nagib [$\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$]	-0,063	-0,063	-0,0093	-	0,054	0,22
Odsečak [μA]	-0,188	-0,465	-0,0641	-	0,268	0,115
Koeficijent korelacije	-0,999	-0,997	-0,996	-	0,998	0,999
GD [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	1,5	1,8	6,0	-	2,4	0,6
GO [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	5,0	6,0	20,0	-	8,0	2,0

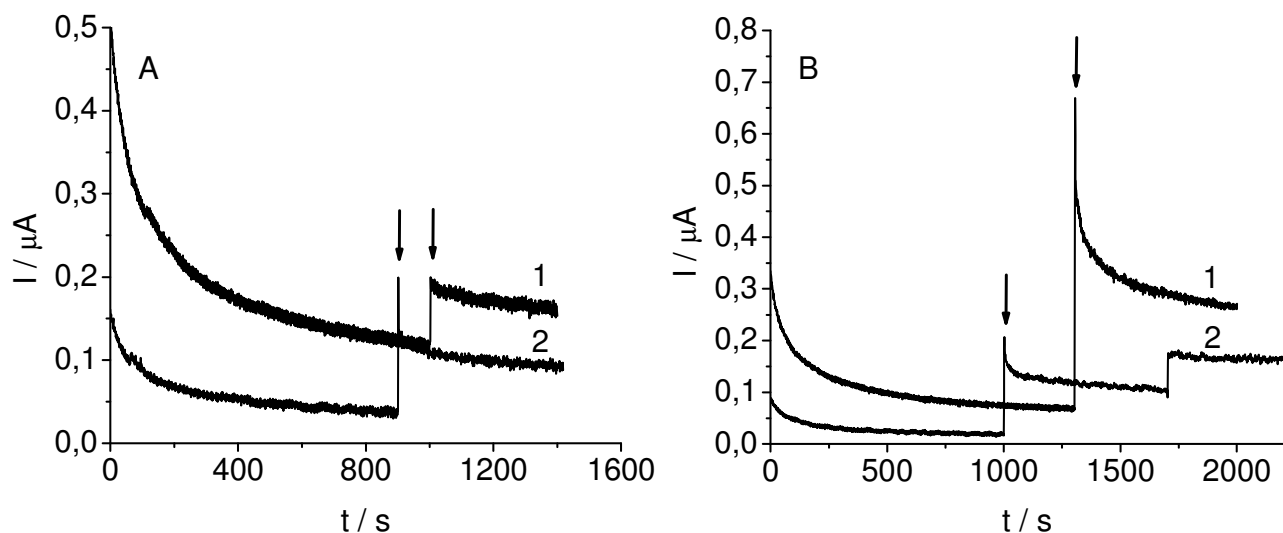
Imajući u vidu da MWCNT kao i kompoziti na bazi MWCNT menjaju, a pre svega poboljšavaju osnovne karakteristike native CPE, ovakve elektrode jednostavne za pripremu i upotrebu, posebno Pt-MWCNT/CPE i MnO₂-MWCNT/CPE imaju širok spektar mogućih primena.

4.4.3. Analiza vodonik-peroksidom obogaćenog uzorka mleka

Pt-MWCNT/CPE i MnO₂-MWCNT/CPE su testirane za određivanje H₂O₂ u uzorku mleka obogaćenim sa H₂O₂ kao mogućim konzervansom ove namirnice.

Za analizu uzorka mleka, početni eksperimenti su vršeni u fosfatnom puferu pH 7,50 kao pomoćnom elektrolitu i radni potencijal je bio 0,40 V za obe elektrode. Odmah nakon dodatka 1,0 mL sirovog, netretiranog, uzorka mleka u 10,0 mL pomoćnog elektrolita, MnO₂-MWCNT/CPE i Pt-MWCNT/CPE su pokazale porast intenziteta signala u odnosu na baznu liniju koji je verovatno prouzrokovan oksidacijom nekih konstituenata mleka. Menjanjem radnog potencijala između -0,80 i 0,70 V, primenom obe elektrode registrovan je signifikantan signal matriksa mleka. Smanjenje zapremine dodatog uzorka od 1,0 do 0,10 mL dovelo je do pojave manje intenzivnih signala matriksa, ali su oni još uvek znatno bili prisutni (slika 68A). Ovakvi signali mogu da dovedu do pozitivnih grešaka prilikom određivanja H₂O₂ u spajkovanom uzorku mleka. Stoga su vršeni

eksperimenti optimizacije koji se odnose na tretman uzorka, parametre amperometrijskih merenja i odabir odgovarajuće pH vrednosti pomoćnog elektrolita kako bi se nepoželjni efekti umanjili. S obzirom da je izoelektrična tačka denaturacije kazeina iz mleka između pH 4,0 i 4,8 [230], 0,1 mol L⁻¹ acetatni pufer pH 4,50 je testiran u cilju denaturacije mleka i supernatant (surutka) je analiziran nakon centrifugiranja. Pt-MWCNT/CPE je pokazala slično ponašanje prilikom analize surutke pri pH 7,50 i na potencijalu 0,40 V kao i sa sirovim mlekom, ali signali matriksa su bili nešto manjeg intenziteta. Ukoliko se kao pomoćni elektrolit primeni acetatni pufer pH 4,50 umesto fosfatnog pufera pH 7,50 signal matriksa je signifikantno smanjen. Kao što je prikazano na slici 68B, u slučaju supernatanta surutke opadanje intenziteta signala matriksa se uočava pri radnom potencijalu 0,40 V sa zapreminom uzorka 1,0 mL.

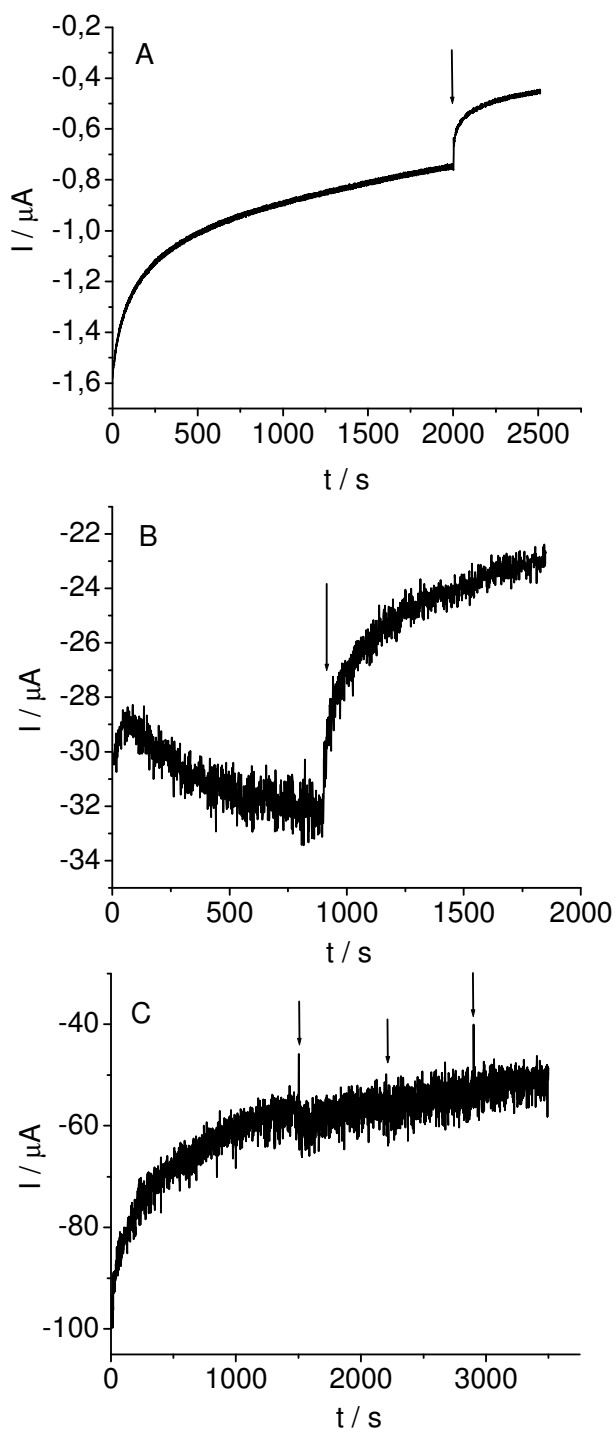


Slika 68. Amperometrijske krive sirovog mleka (A) i supernatanta surutke (B) snimljene primenom MnO_2 -MWCNT/CPE (kriva 1A) i Pt-MWCNT/CPE (krive 2A, 1B i 2B) na 0,40 V; zapremina uzorka: 0,10 mL sirovog mleka (A), 1,0 mL supernatanta surutke (B); pomoćni elektroliti: fosfatni pufer pH 7,50 (A i kriva 1B) i acetatni pufer pH 4,50 (kriva 2B).

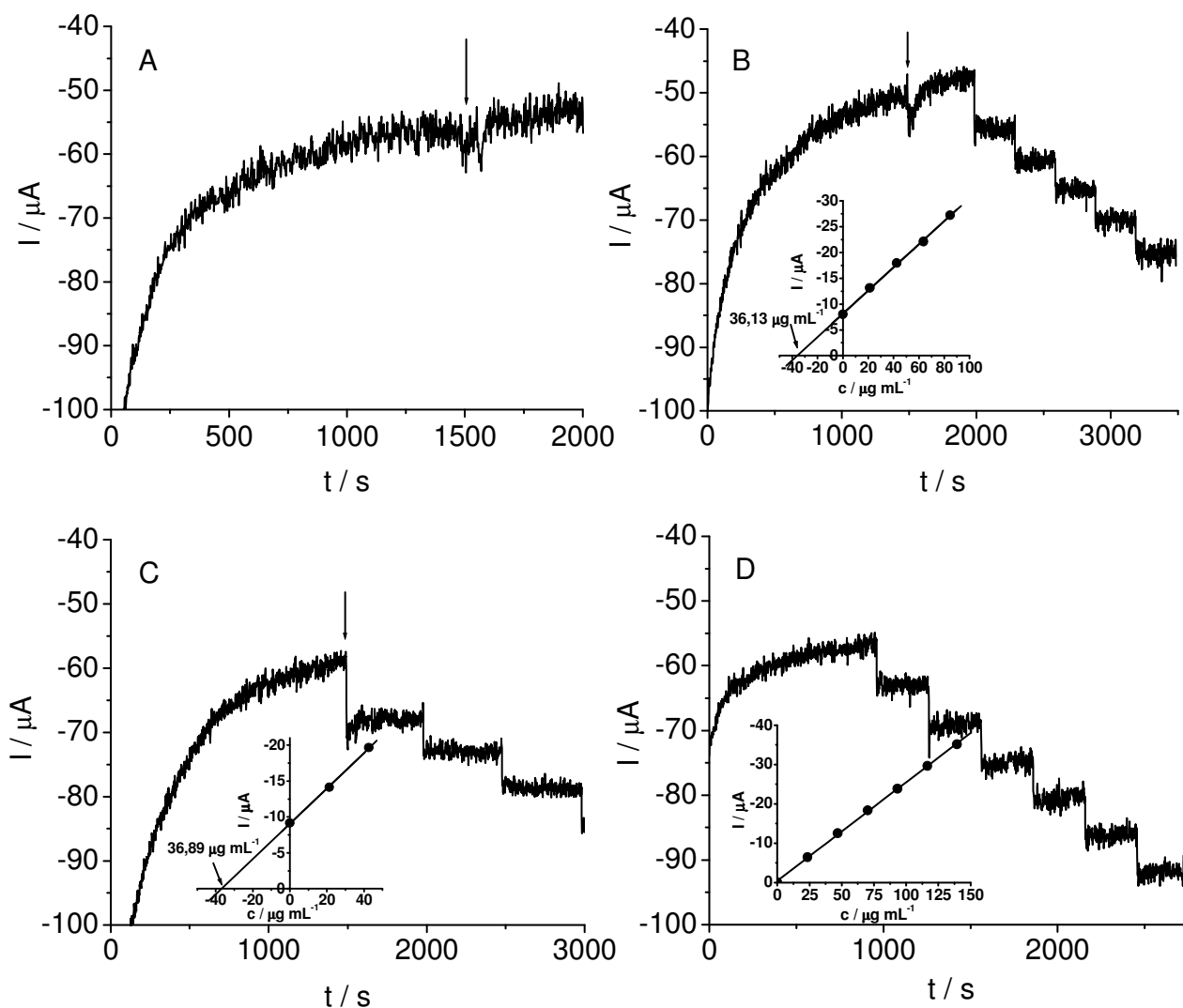
Različiti radni potencijali su primenjeni, i kao što se na ilustrativnim primerima prikazanim na slici 69 može videti signal matriksa surutke se javlja pri potencijalu 0,00 V (A), kao i na -0,40 V (B) dok je pri potencijalu od -0,70 V (C) ovaj signal nesignifikantan. Optimizacija radnog potencijala je pokazala da potencijal -0,75 V može biti pogodan za određivanje H₂O₂ bez ikakvog izraženog signala matriksa u toku amperometrijskih merenja. Na pozitivnijim radnim potencijalima

od -0,70 V signali matriksa su signifikantni, dok se na potencijalima nižim od -0,75 V dobijaju amperometrijski signali sa visokim šumom. Uzrok pojave šumova može biti izdvajanje vodonika na kompozitnom modifikatoru što negativno utiče na osetljivost metode.

U slučaju optimizovane metode, na slici 70A se može videti da kada se doda 1,0 mL supernatanta surutke u 10,0 mL acetatnog pufera kao pomoćnog elektrolita, dolazi do blagog porasta signala koji se za veoma kratko vreme vraća na nivo bazne linije u toku disperzije rastvora uzorka. Ponavljanjem ovog postupka stabilizacija bazne linije se uočava i na slici 70B. Dodatak alikvota H_2O_2 ($37,3 \mu\text{g mL}^{-1}$) ovakvom sistemu, u cilju ispitivanja mogućeg uticaja matriksa na signal analita, u kombinaciji sa daljim dodatkom četiri uzastopna alikvota H_2O_2 rezultuje u nastanku amperometrijskih signala kao što je prikazano na slici 70B između 2000 i 3500 s. Ukoliko se prvi alikvot H_2O_2 smatra uzorkom sa određenim sadržajem H_2O_2 , a naredna četiri alikvota standardnim dodacima, uticaj matriksa surutke može biti procenjen. Prinos u ovom slučaju je bio 94,4% na osnovu tri merenja (36,1 (slika 70B); 35,3; 34,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Vrednost RSD ovih ponovljenih merenja je iznosila 2,6%. Uticaj matriksa je minimizovan metodom standardnog dodatka. Na kraju, netretirano mleko je obogaćeno sa koncentracijom H_2O_2 koja odgovara stvarnoj količini za konzervaciju (50,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ preračunato na koncentraciju u voltometrijskoj ćeliji i 1107,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ spajkovano u sirovo mleko) i nakon već opisanog tretmana uzorak je analiziran. Pronađene količine H_2O_2 u voltometrijskoj ćeliji su bile 36,9; 36,0 i 35,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (kao što je prikazano na slici 70C), što odgovara sledećim pronađenim koncentracijama H_2O_2 u obogaćenom uzorku mleka: 811,6; 792,2 i 771,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. RSD na osnovu tri ponovljena merenja je iznosila 2,5%, dok je prinos metode bio nešto viši od 71%. Dobijeni prinos ukazuje na to da u toku pripreme uzorka (podešavanje pH vrednosti i centrifugiranje) dolazi do gubitka ciljnog analita, ali na osnovu vrednosti RSD može se zaključiti da je metoda reproduktivna u prihvatljivim granicama za prinos. Dodatno, ilustrativni stepeničasti amperometrijski signali snimljeni za model rastvor u acetatnom puferu na -0,75 V primenom Pt-MWCNT/CPE i na osnovu njih konstruisana kalibraciona kriva su prikazani na slici 70D. U slučaju model rastvora vrednosti GD i GO su bile 5,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 18,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dok su u slučaju uzorka surutke ove vrednosti malo više i iznose 6,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, redom. Jednačina kalibracione krive u model rastvoru je bila: $I = -0,25 (\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}) c - 0,47 \mu\text{A}$, $r = 0,999$.



Slika 69. Amperometrijske krive supernatanta surutke snimljene primenom Pt-MWCNT/CPE na 0,00 V (A), -0,40 V (B) i -0,70 V (C); zapremina uzorka: 1,0 mL (A, B), 0,8 mL (C); pomoćni elektrolit: acetatni pufer pH 4,50. Strelice označavaju vreme injektovanja uzorka.



Slika 70. Amperometrijsko određivanje H_2O_2 u uzorku mleka primenom Pt-MWCNT/CPE: supernatant surutke dodat u acetatni pufer pH 4,50 (A), kao A + dodatak $37,3 \mu\text{g mL}^{-1} H_2O_2$ i četiri standardna dodatka H_2O_2 (B), obogaćen supernatant mleka nakon pripreme uzorka i dva standardna dodatka H_2O_2 (C), amperometrijska kriva H_2O_2 u model sistemu sa pripadajućom kalibracionom krivom (D). Radni potencijal u svim slučajevima: $-0,75 \text{ V}$.

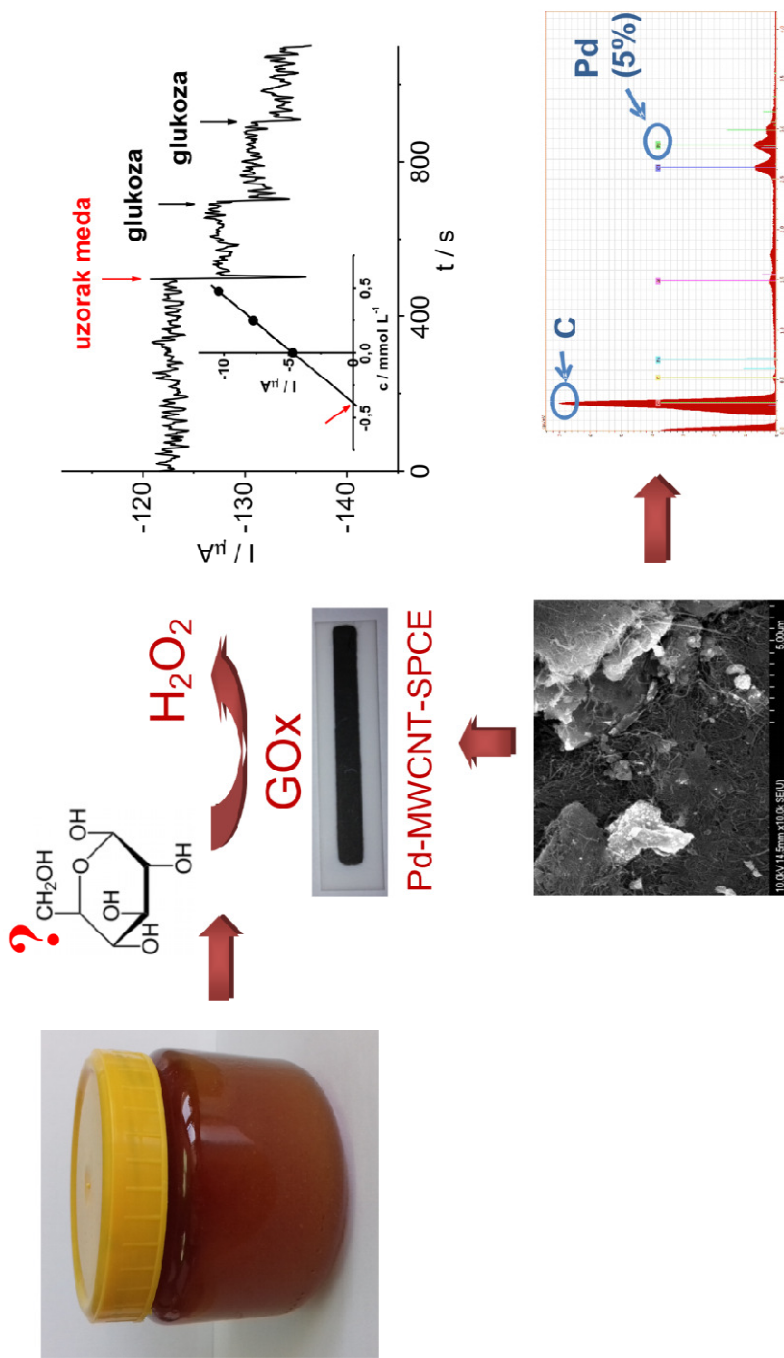
Razvijena metoda je jednostavna za primenu i pruža mogućnost dobijanja prvih informacija o sadržaju ciljnog analita u uzorku. MWCNT i MnO_2 -MWCNT, a naročito Pt-MWCNT omogućavaju fino podešavanje osetljivosti i selektivnosti metode odabirom pH vrednosti pomoćnog elektrolita i pogodnog radnog potencijala. Svakako tip ciljnog analita, efekat matriksa i priroda

modifikatora u MWCNT kompozitu su ključni faktori koji određuju glavne karakteristike analitičke metode.

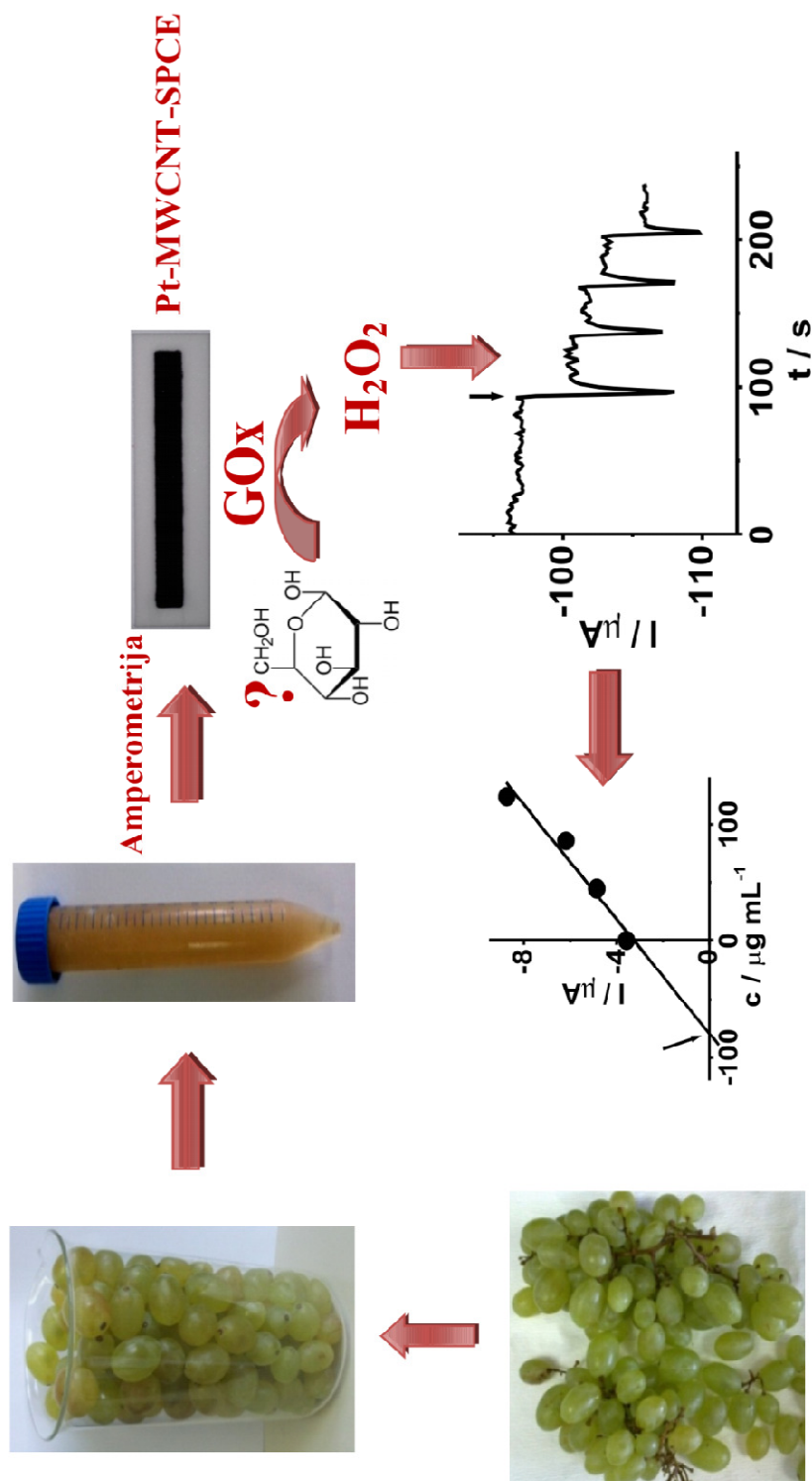
Rezultati prikazani u ovom poglavlju predstavljaju jedan deo nedavno publikovanih rezultata [225].

4.5. Štampani ugljenični hemijski senzori/biosenzori zasnovani na kompozitu od višezidnih ugljeničnih nanocevi i čestica na bazi Pd ili Pt za određivanje H_2O_2 /glukoze

U ovom poglavlju su dati rezultati ispitivanja primenljivosti MWCNT i kompozita na bazi Pd i MWCNT ili Pt i MWCNT u svojstvu modifikatora SPCE bilo zapreminskog (MWCNT-SPCE, Pd-MWCNT-SPCE, Pt-MWCNT-SPCE) ili površinskog (Pd-MWCNT/SPCE). Pripremljene radne elektrode su testirane za amperometrijsko određivanje H_2O_2 , a u kombinaciji sa enzimom GOx (GOx/SPCE, GOx/Pd-MWCNT-SPCE, GOx/Pd-MWCNT/SPCE, GOx/Pt-MWCNT-SPCE) za određivanje glukoze koje se zasniva na određivanju produkta (H_2O_2) nastalog u njenoj reakciji sa enzimom. Glukoza je primenom GOx/Pd-MWCNT-SPCE određena u uzorku meda (postupak je shematski prikazan na slici 71), a primenom GOx/Pt-MWCNT-SPCE u uzorcima belog grožđa (postupak je shematski prikazan na slici 72) i komprimata (tableta) sa aromom jagode.



Slika 71. Shematski prikaz postupka amperometrijskog određivanja glukoze u uzorku livadskog meda primenom GOx/Pd-MWCNT-SPCE (na osnovu [227]).



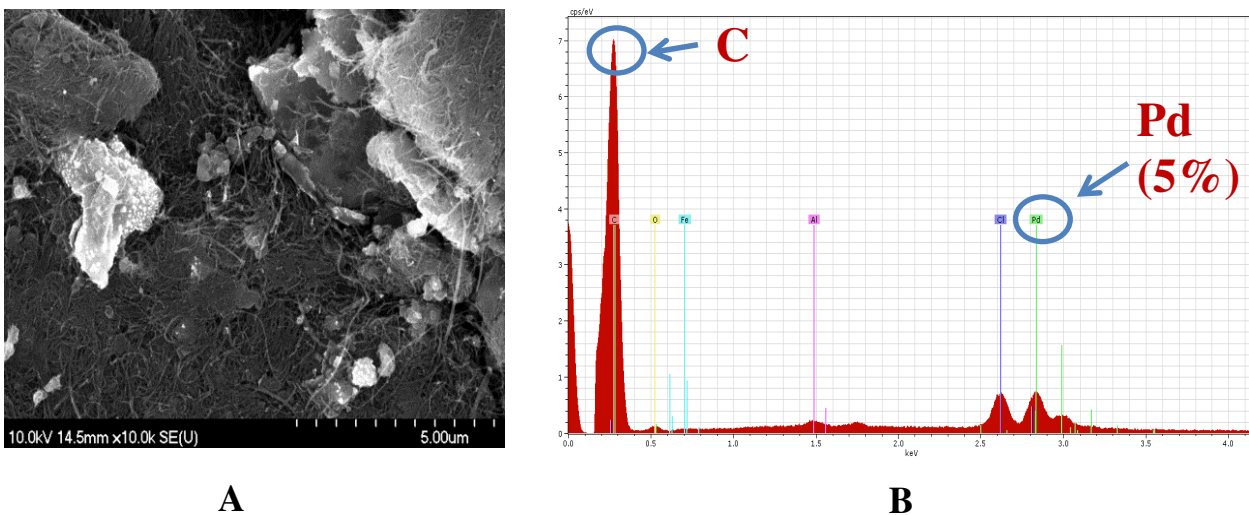
Slika 72. Shematski prikaz postupka amperometrijskog određivanja glukoze u uzorku belog grožđa primenom $GOx/Pt-MWCNT-SPCE$.

4.5.1. Amperometrijsko određivanje glukoze primenom štampanog ugljeničnog biosenzora zasnovanog na kompozitu od višezidnih ugljeničnih nanocevi i čestica na bazi Pd

4.5.1.1. Karakterizacija štampane ugljenične elektrode modifikovane kompozitom od višezidnih ugljeničnih nanocevi i čestica na bazi Pd

U cilju osnovne karakterizacije Pd-MWCNT kompozita vršena su SEM/EDS merenja (slika 73). Proučavanje morfologije ovog kompozita (slika 73A) je pokazalo da MWCNT i nakon procesa njihove modifikacije sa česticama na bazi Pd ostaju u nepromenjenom obliku. Čestice na bazi Pd, uglavnom prečnika između 50 i 200 nm, se prepoznaju kao nasumično raspoređene pojedinačne čestice ili manji agregati, pri čemu su osnovne jedinice predominantno sfernog oblika. Ove čestice su okružene ugljeničnim nanocevima.

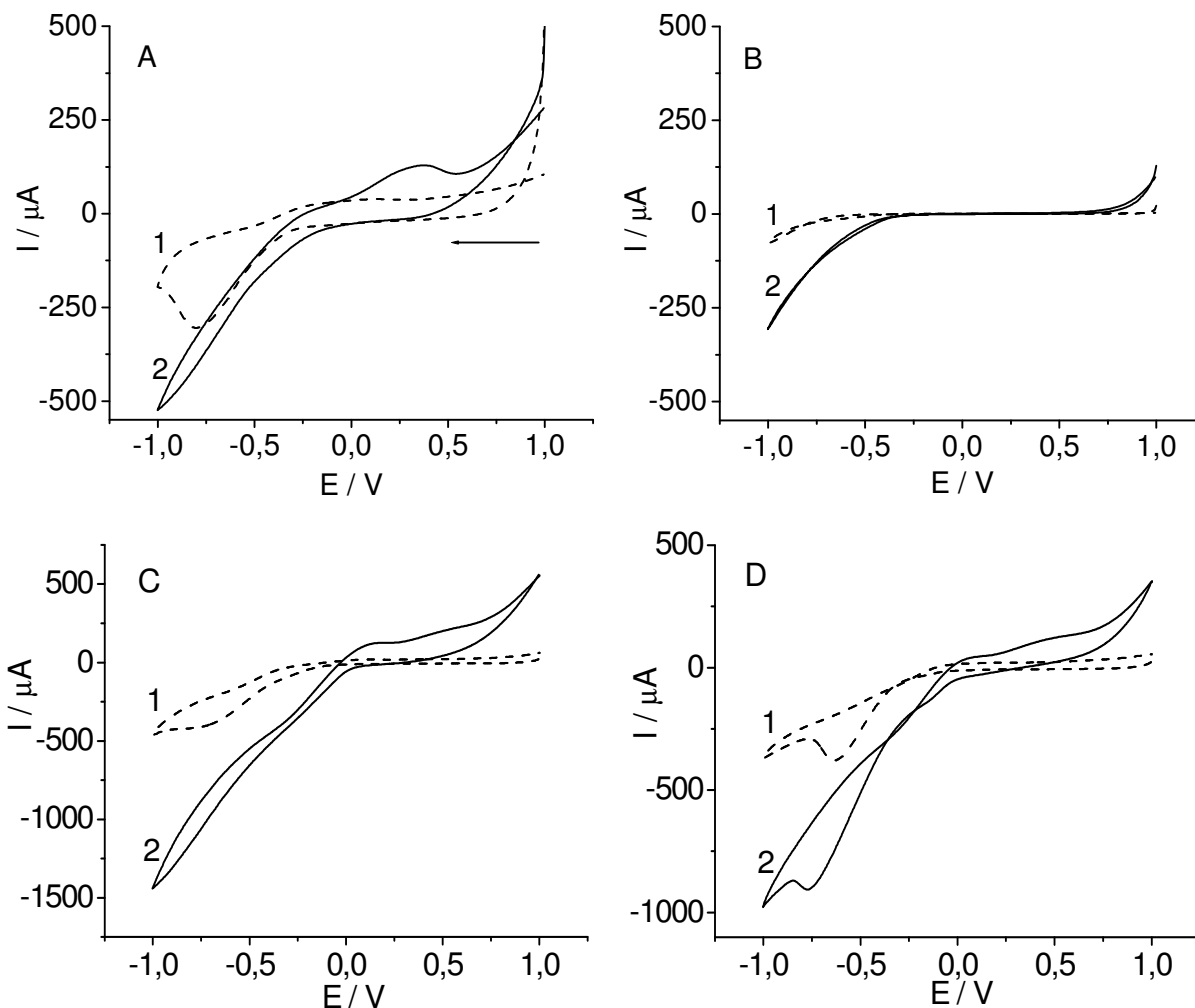
Lokalna mikroanaliza primenom EDS (slika 73B) je potvrdila da ispitivani kompozit sadrži oko 5% (m:m) modifikatora na bazi Pd, izraženo kao sadržaj Pd. Ovaj kompozitni materijal je primenjen kao modifikator SPCE na dva načina: kao površinski modifikator SPCE i to jednostavnom metodom nanošenja kapi suspenzije napravljene od odgovarajuće količine kompozita u etanolu, i kao zapreminski modifikator SPCE pri čemu je kompozit pomešan sa ugljeničnim mastilom pre procesa štampanja.



Slika 73. SEM prikaz Pd-MWCNT kompozita (A) i rezultati EDS lokalne mikroanalize (B).

Na slici 74 su prikazani rezultati voltametrijske karakterizacije SPCE (A), MWCNT-SPCE (B), Pd-MWCNT/SPCE (C) i Pd-MWCNT-SPCE (D) primenom CV u fosfatnom puferu pH

7,50 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) kao pomoćnom elektrolitu bez dodatog H_2O_2 (krive 1) i u prisustvu 22 mmol L^{-1} ($748 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) H_2O_2 (krive 2) kao ciljnog analita.



Slika 74. Ciklični voltamogrami snimljeni primenom nemodifikovane SPCE (A), MWCNT-SPCE (B), Pd-MWCNT/SPCE (C) i Pd-MWCNT-SPCE (D) u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatnom puferu pH 7,50 (isprekidane linije, krive 1) i u istom pomoćnom elektrolitu u prisustvu 22 mmol L^{-1} ($748 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) H_2O_2 (pune linije, krive 2). Brzina polarizacije u svim slučajevima: 50 mV s^{-1} .

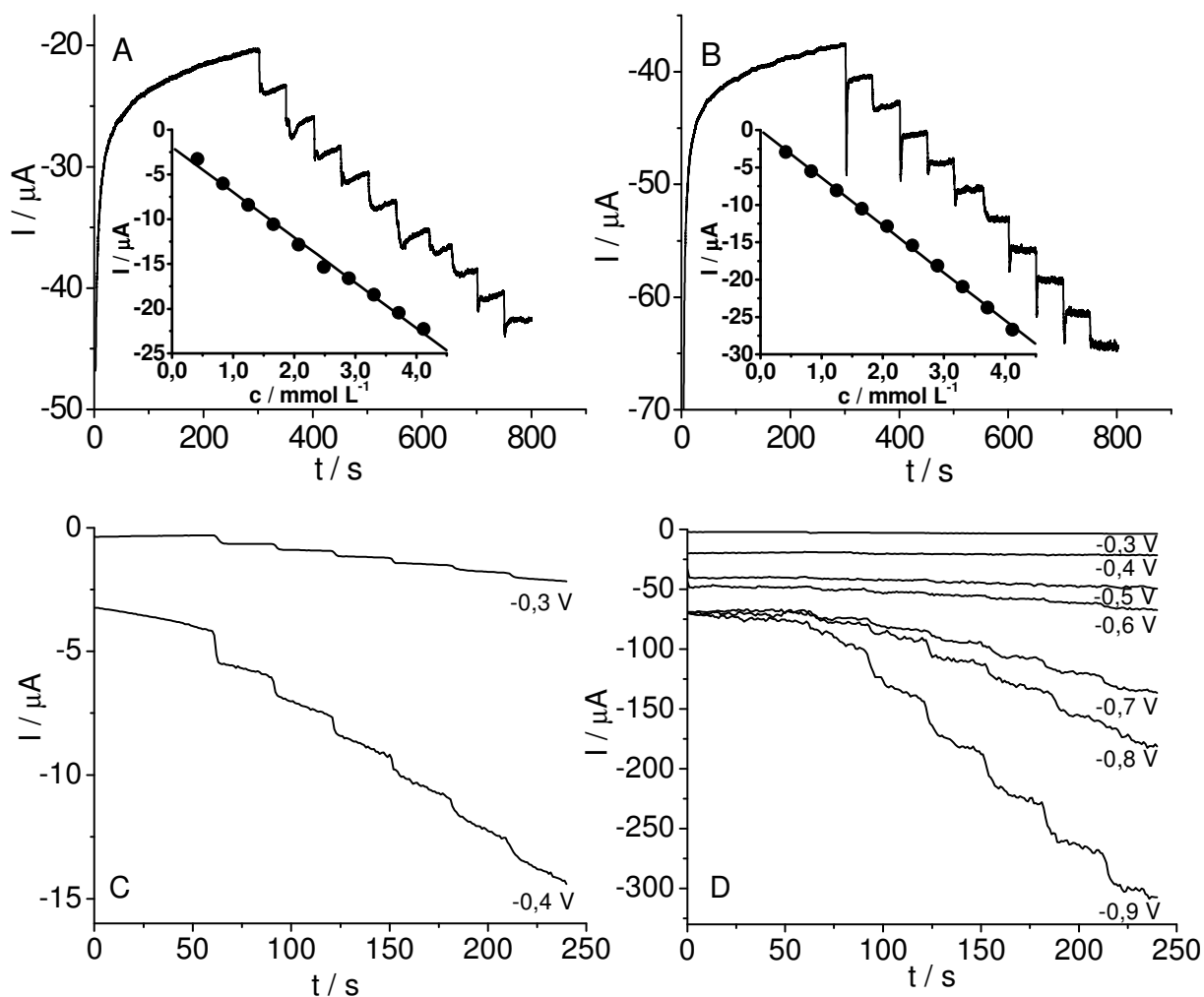
Na svim ispitivanim radnim elektrodama dolazi do oksidacije analita u pozitivnom i redukcije u negativnom opsegu polarizacije. Ovaj efekat je najizraženiji kod Pd-MWCNT/SPCE i Pd-MWCNT-SPCE. Nadalje, u poređenju sa nemodifikovanom SPCE, modifikovane elektrode pokazuju zapažene razlike u pogledu intenziteta i oblika redukcionog signala H_2O_2 . U slučaju

MWCNT-SPCE proces redukcije H_2O_2 je signifikantan na potencijalima nižim od $-0,50$ V. Što se tiče oba tipa radnih elektroda modifikovanim kompozitom ovaj efekat se uočava već na $0,00$ V i znatno se povećava na nižim vrednostima potencijala. Dodatno, ove elektrode daju oksidacione signale H_2O_2 na $0,05$ V i višim vrednostima potencijala u pozitivnom delu polarizacionog ciklusa, pri čemu se oblik ovih oksidacionih signala razlikuje od onih dobijenih primenom SPCE ili MWCNT-SPCE.

Ukoliko se uporede CV odzivi zapreminski (slika 74D, kriva 2) i površinski (slika 74C, kriva 2) modifikovane SPCE, može se uočiti da se primenom Pd-MWCNT/SPCE dobijaju nešto izraženiji redukcionni signali H_2O_2 verovatno usled prisustva veće količine katalitički aktivnog kompozita na površini elektrode.

4.5.1.2. Analitičke metode određivanja H_2O_2

Nakon osnovne voltametrijske karakterizacije radnih elektroda primenom CV, vršena su amperometrijska merenja H_2O_2 i glukoze u model sistemima. Amperometrijske krive H_2O_2 su snimljene na odabranim radnim potencijalima primenom Pd-MWCNT/SPCE (slika 75A), Pd-MWCNT-SPCE (slika 75B), SPCE (slika 75C) i MWCNT-SPCE (slika 75D), dok su osnovni analitički parametri sumirani u tabeli 14. Na osnovu intenziteta dobijenih stepeničastih signala H_2O_2 u ispitivanom opsegu koncentracija konstruisane su odgovarajuće kalibracione krive (umetci, slika 75A, B). U svim slučajevima prikazanim u tabeli 14 vrednost koeficijenta korelacije je bila jednaka ili veća od $0,991$. SPCE modifikovane kompozitom Pd-MWCNT daju signifikantno intenzivnije signale H_2O_2 u poređenju sa nemodifikovanom SPCE i MWCNT-SPCE pri radnom potencijalu $-0,20$ V što je u saglasnosti sa prethodno snimljenim cikličnim voltamogramima. U slučaju nemodifikovane SPCE i MWCNT-SPCE promena radnog potencijala na nešto pozitivnije ($E > 0,40$ V) i negativnije ($E < -0,50$ V) vrednosti može pomoći da se prevaziđe nezadovoljavajuće ponašanje ovih elektroda u pogledu određivanja H_2O_2 , ali treba imati u vidu da odnos signala i šuma takođe opada što se dalje može odraziti na GD i RSD metode. Ipak, čak i pod tim eksperimentalnim uslovima, signali H_2O_2 su skoro jedan red veličine manji od istovetnih signala dobijenih primenom oba tipa Pd-MWCNT modifikovanih SPCE. Očigledno je da prisustvo čestica na bazi Pd pretežno određuje elektroanalitičko ponašanje Pd-MWCNT/SPCE i Pd-MWCNT-SPCE za analizu H_2O_2 .



Slika 75. Amperogrami H_2O_2 snimljeni primenom Pd-MWCNT/SPCE (A), Pd-MWCNT-SPCE (B), SPCE (C) i MWCNT-SPCE (D) u fosfatnom puferu pH 7,50 u opsegu koncentracija H_2O_2 od 0,41 do 4,12 $mmol L^{-1}$ (od 14,2 do 140,1 $\mu g mL^{-1}$) (A, B) i od 0,76 do 4,53 $mmol L^{-1}$ (od 25,9 do 154,0 $\mu g mL^{-1}$) (C, D); radni potencijal: -0,20 V (A, B) ili kao što je označeno (C, D). Umetci A, B: pripadajuće kalibracione krive.

Poređenje analitičkog ponašanja dva tipa SPCE modifikovanih Pd-MWCNT kompozitom pokazuje da u slučaju zapreminski modifikovane elektrode reproduktivnost pripreme elektrode je 2,5 puta bolja u odnosu na pripremu površinski modifikovane elektrode. Takođe, ukoliko se uporede vrednosti za odsečak kalibracionih krivi (umetci, slika 75A, B, tabela 14) uočava se značajna razlika. Naime, odsečak kalibracione krive koja se odnosi na Pd-MWCNT-SPCE je skoro

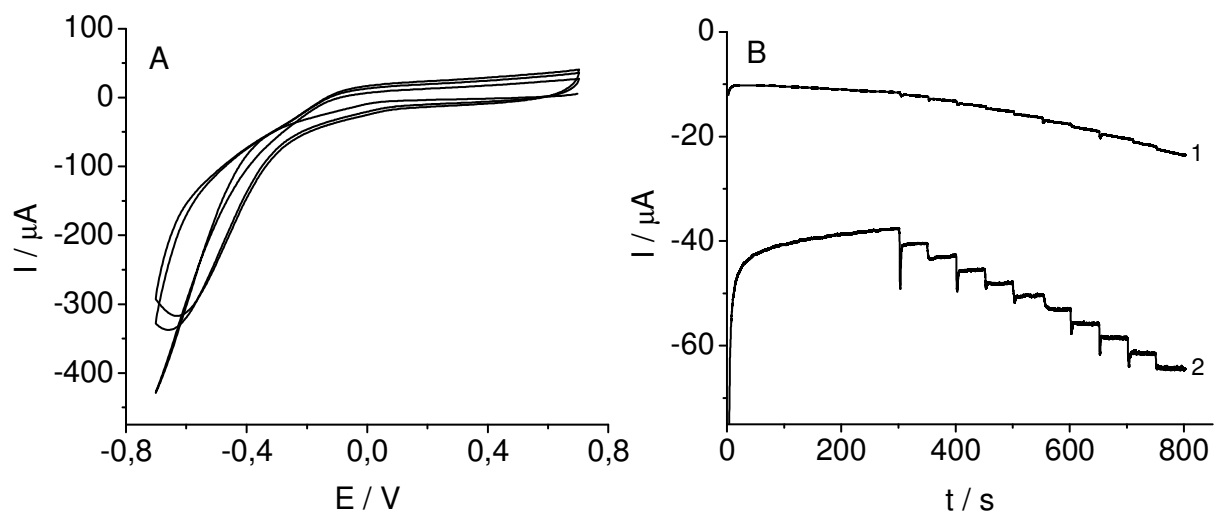
50 puta bliži nuli nego vrednost odsečka za površinski modifikovanu Pd-MWCNT/SPCE zbog čega površinski modifikovana elektroda nije sasvim adekvatna za primenu kod metode standardnog dodatka. RSD metode nije prelazila 2,5% na osnovu tri ponovljena merenja sa istom Pd-MWCNT-SPCE. Na osnovu svih navedenih činjenica zapreminski modifikovana elektroda je odabrana za dizajniranje biosenzora.

Uzimajući u obzir širi opseg polarizacije Pd-MWCNT-SPCE od 0,00 do -0,50 V evidentno je da je ova elektroda primenljiva za određivanje H_2O_2 i pri 0,00 V, ali sa istovremenim smanjenjem osetljivosti blizu 2,5 puta. Na -0,40 V signali H_2O_2 su znatno poboljšani u pogledu intenziteta u poređenju sa ispitivanim pozitivnijim vrednostima radnih potencijala, ali količina šumova takođe malo raste. Na negativnijim potencijalima ovaj nepovoljan efekat je još izraženiji.

Tabela 14. Analitički parametri amperometrijskog određivanja H_2O_2 primenom SPCE, MWCNT-SPCE, Pd-MWCNT/SPCE i Pd-MWCNT-SPCE u rastvoru fosfatnog pufera (pH 7,50, 0,1 mol L⁻¹).

Parametar	Elektroda					
	SPCE		MWCNT-SPCE		Pd-MWCNT/SPCE	Pd-MWCNT-SPCE
Radni potencijal [V]	-0,40	0,40	-0,60	0,40	-0,20	-0,20
Ispitivani opseg koncentracija [mmol L ⁻¹]	-	0,76-4,53	0,76-3,79	0,76-3,06	0,41-4,12	0,41-4,12
Koeficijent korelacije	-	0,996	-0,997	0,991	-0,997	-0,999
Nagib [$\mu A L mmol^{-1}$]	-	0,015	-3,61	0,11	-5,05	-6,36
Odsečak [μA]	-	-0,0036	0,735	0,058	-1,942	-0,039
GD [mmol L ⁻¹]	-	0,23	0,23	0,18	0,14	0,02
GO [mmol L ⁻¹]	-	0,76	0,76	0,59	0,41	0,06

Važno je napomenuti da u slučaju svih amperometrijskih eksperimenata elektrode su elektrohemijski aktivirane i kondicionirane pre početka amperometrijskih merenja, cikliranjem (3 ciklusa) u opsegu potencijala od 0,70 do -0,70 V u negativnom smeru polarizacije, pri brzini polarizacije 100 mV s^{-1} u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatnom puferu pH 7,50 (slika 76A). Ovakav predtretman obično stabilizuje amperometrijske bazne linije i poboljšava reproduktivnost metode. Ovo je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima vezanim za postupak aktivacije Pd i CNT-dispergovanih ugljeničnih elektroda [231]. Na slici 76B su prikazani amperometrijski signali H_2O_2 dobijeni primenom Pd-MWCNT-SPCE u ispitivanom opsegu koncentracija H_2O_2 pri radnom potencijalu od -0,20 V bez prethodne aktivacije elektrodne površine (kriva 1) i nakon aktivacije cikliranjem (kriva 2).

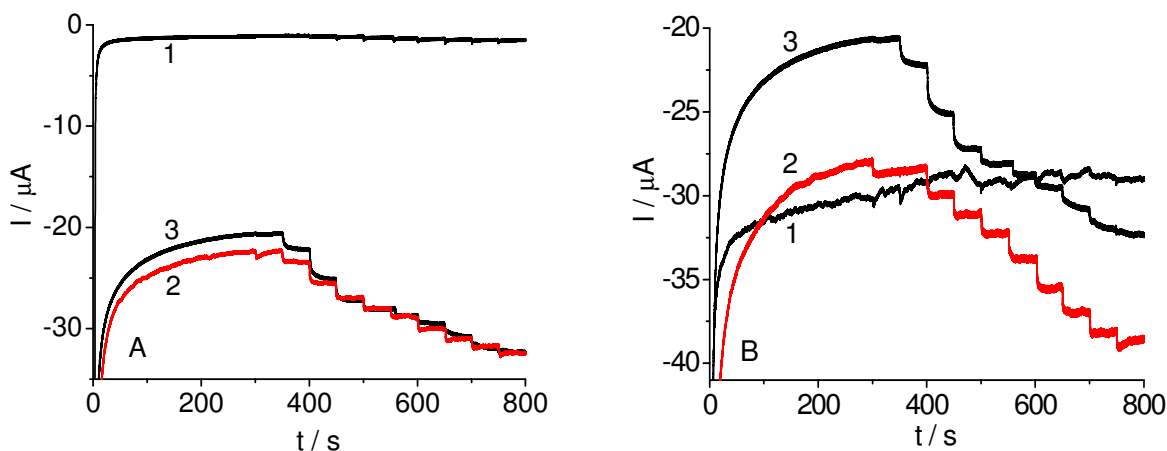


Slika 76. Cikliranje površine Pd-MWCNT-SPCE u pomoćnom elektrolitu u opsegu potencijala od 0,7 do -0,7 V, pri brzini polarizacije 100 mV s^{-1} , 3 ciklusa (A) i amperogrami H_2O_2 snimljeni primenom Pd-MWCNT-SPCE na -0,20 V (B) bez prethodne aktivacije (kriva 1B) i nakon cikliranja elektrodne površine (kriva 2B). Pomoćni elektrolit: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatni pufer pH 7,50. Opseg koncentracija H_2O_2 : $0,41\text{--}4,12 \text{ mmol L}^{-1}$ ($14,2\text{--}140,1 \text{ μg mL}^{-1}$).

4.5.1.3. Analitičke metode određivanja glukoze

Glukozni biosenzori su pripremljeni sa tri različite supstrat elektrode, SPCE, Pd-MWCNT/SPCE i Pd-MWCNT-SPCE, površinskom modifikacijom pomoću metode nanošenja kapi biokoktela GOx i Nafiona[®] pri čemu dolazi do formiranja biofilma na površini elektrode. Amperometrijski signali su snimljeni uzastopnim dodavanjem jednakih količina glukoze u fosfatni

pufer pH 7,50. Za sva tri pripremljena biosenzora primenjeni radni potencijal je bio $-0,20$ V. Kao što se može videti na slici 77A karakteristični stepeničasti signali se dobijaju primenom GOx/Pd-MWCNT-SPCE (kriva 2) i GOx/Pd-MWCNT/SPCE (kriva 3) dok GOx/SPCE (kriva 1) daje signifikantno niže, skoro zanemarljive signale. Nadalje, amperometrijski signali su različitog oblika i intenziteta za GOx/Pd-MWCNT/SPCE i GOx/Pd-MWCNT-SPCE pri istim koncentracijama glukoze. Preliminarni eksperimenti su pokazali da se širi linearni opseg koncentracija postiže primenom GOx/Pd-MWCNT-SPCE i zavisnost intenziteta struje i odgovarajućih koncentracija analita može biti izražena sledećom jednačinom: $I [\mu\text{A}] = -5,98 [\mu\text{A L mmol}^{-1}] c + 1,87 [\mu\text{A}]$, $r = -0,997$ za koncentraciju glukoze između $0,32$ i $2,02 \text{ mmol L}^{-1}$ ($56,8$ i $363,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). Radi poređenja, GOx/Pd-MWCNT/SPCE u nekim slučajevima pokazuje linearnost u opsegu koncentracija glukoze od $0,15$ do $0,27 \text{ mmol L}^{-1}$ (od $26,7$ do $48,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), ali signali nisu zadovoljavajuće reproduktivnosti. Stoga, GOx/Pd-MWCNT-SPCE je odabrana za dalju optimizaciju i u optimizovanom obliku za dalji rad.



Slika 77. Amperogrami glukoze dobijeni primenom GOx/SPCE (kriva 1A), GOx/Pd-MWCNT-SPCE (kriva 2A) i GOx/Pd-MWCNT/SPCE (kriva 3A) i u toku optimizacije sadržaja GOx i Nafion[®]-a na površini Pd-MWCNT-SPCE: bez biofilma (kriva 1B), sa $15,0 \mu\text{L}$ (kriva 2B) i sa $20,0 \mu\text{L}$ (kriva 3B) biokoktela. Uslovi merenja: fosfatni pufer pH 7,50, radni potencijal $-0,20$ V, testirani opseg koncentracija glukoze $0,32$ – $2,02 \text{ mmol L}^{-1}$ ($56,8$ – $363,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) (krive 1A, 2A, 1B, 2B i 3B) i $0,08$ – $0,51 \text{ mmol L}^{-1}$ ($14,2$ – $90,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) (kriva 3A).

Količina biofilma je optimizovana na površini Pd-MWCNT-SPCE supstrat elektrode. Tri različite zapremine rastvora enzima za modifikaciju ($10,0 \mu\text{L}$, $15,0 \mu\text{L}$ i $20,0 \mu\text{L}$) su nanete na

površinu Pd-MWCNT-SPCE i odzivi dobijenih biosenzora su uporađeni sa odzivima Pd-MWCNT-SPCE (slika 77B). Kao što se može videti Pd-MWCNT-SPCE bez prisustva biofilma daje veoma loše, nemerljive signale za glukozu (slika 77B, kriva 1). GOx/Pd-MWCNT-SPCE, koja je pripremljena nanošenjem 10,0 μL biokoktela na površinu elektrode, daje izraženije signale glukoze od nemodifikovane Pd-MWCNT-SPCE ali tipični stepeničasti signali su još uvek malog intenziteta, dok nanošenje 15,0 μL biokoktela na površinu elektrode rezultuje u stvaranju uobičajenog strujnog odziva tj. stepeničastih signala (slika 77B, kriva 2). Nanošenjem još veće količine biokoktela (20,0 μL) na površinu Pd-MWCNT-SPCE dobija se glukozni biosenzor čiji su strujni odzivi koji pripadaju početnim dodacima glukoze viši nego u slučaju biosenzora sa 15,0 μL biokoktela, ali linearni dinamički opseg je znatno uži i ograničen na koncentracije između 0,59 i 1,06 mmol L^{-1} (106,8 i 191,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Na osnovu svega navedenog, dalji eksperimenti su vršeni sa elektrodom koja je modifikovana sa 15,0 μL biokoktela.

Odabir pogodnog radnog potencijala je presudan korak u toku optimizacije amperometrijske metode posebno u slučaju analize uzorka kod koga priroda matriksa može imati značajan uticaj na izbor radnog potencijala. U model sistemu (0,1 mol L^{-1} fosfatni pufer pH 7,50), pogodni radni potencijali za GOx/Pd-MWCNT-SPCE su bili u opsegu od -0,15 do -0,40 V, dok su negativniji radni potencijali rezultovali u porastu signala zajedno sa već prepoznatljivim rastom šumova. Osnovni analitički parametri metode pri radnom potencijalu -0,40 V su dati u tabeli 15.

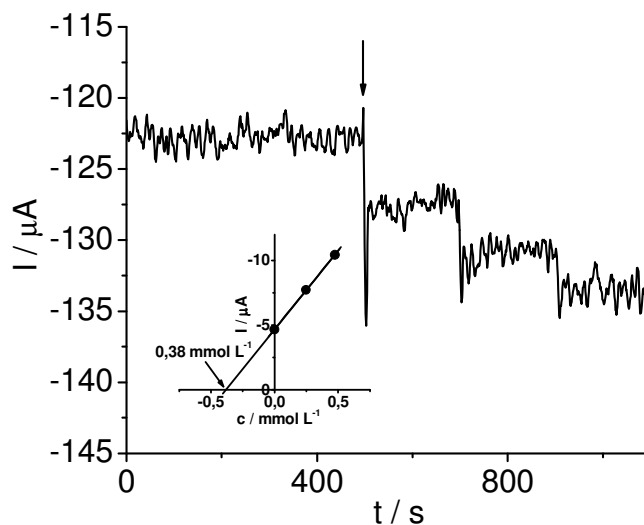
Tabela 15. Analitički parametri amperometrijskog određivanja glukoze primenom GOx/Pd-MWCNT-SPCE u fosfatnom puferu pH 7,50, pri radnom potencijalu -0,40 V.

Parametar	
Ispitivani opseg koncentracija [mmol L^{-1}]	0,16-0,97
Koeficijent korelacije	-0,998
Nagib [$\mu\text{A L mmol}^{-1}$]	-19,3
Odsečak [μA]	-0,43
GD [mmol L^{-1}]	0,04
GO [mmol L^{-1}]	0,14

RSD metode nije prelazila 2,7%. Životni vek GOx/Pd-MWCNT-SPCE je blizu tri dana ukoliko se čuva pri adekvatnim uslovima (u frižideru, na 4 °C).

4.5.1.4. Određivanje glukoze u uzorku meda

Uzorak meda je analiziran primenom GOx/Pd-MWCNT-SPCE pri radnom potencijalu -0,40 V u fosfatnom puferu pH 7,50. Ilustrativni amperogram određivanja glukoze u medu je prikazan na slici 78. Sadržaj glukoze u medu je određen metodom standardnog dodatka zbog prepoznatljivog efekta matriksa. Amperometrijska merenja su vršena tako da je nakon stabilizacije bazne linije u rastvor pomoćnog elektrolita dodat alikvot pripremljenog uzorka meda a potom i dva standardna dodatka glukoze. Dobijeni rezultati za sadržaj glukoze u uzorku livadskog meda su bili sledeći: 30,2%, 30,4% i 31,5%. Rezultati komparativnih merenja dobijeni primenom komercijalno dostupnog glukometra su bili: 29,0%, 29,6% i 29,6%. Na osnovu amperometrijskih merenja 30,7% (m:m) glukoze, izraženo preko srednje vrednosti, je pronađeno u medu u poređenju sa 29,4% što je srednja vrednost rezultata komparativne metode. RSD je iznosila 2,3% za amperometrijsko određivanje glukoze, dok je za komparativnu Accu-Chek metodu ova vrednost bila nešto niža i iznosila je 1,2%.



Slika 78. Amperogram određivanja glukoze u livadskom medu metodom standardnog dodatka i primenom GOx/Pd-MWCNT-SPCE pri radnom potencijalu -0,40 V u fosfatnom puferu pH 7,50; dodatak uzorka meda označen strelicom. Umetak: pripadajuća analitička prava.

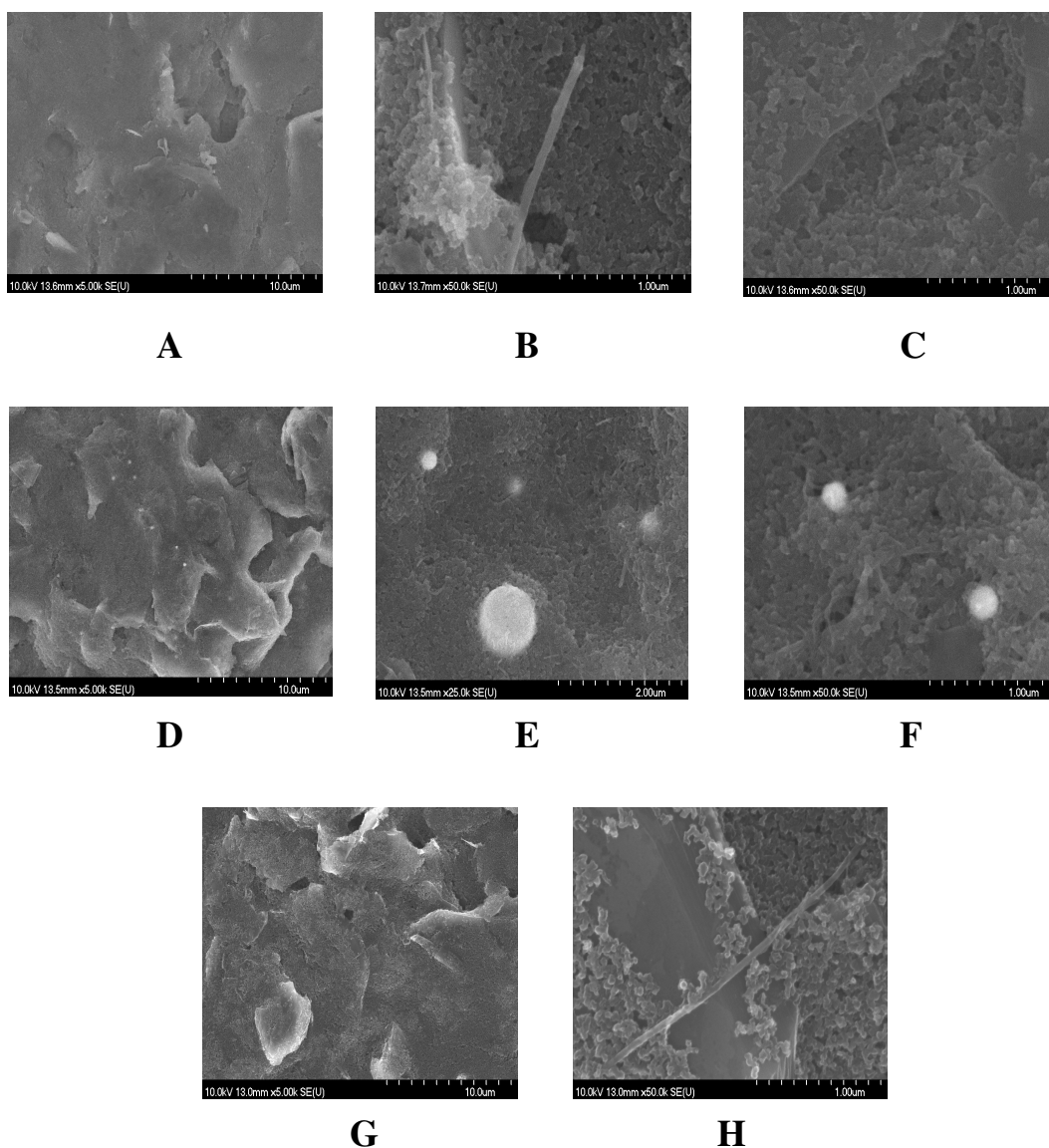
Može se zaključiti da amperometrijska metoda zasnovana na optimizovanoj analitičkoj proceduri u kombinaciji sa adekvatno pripremljenom GOx/Pd-MWCNT-SPCE je pogodna za brza merenja koja se odnose na određivanje glukoze u uzorku livadskog meda.

Rezultati prikazani u ovom poglavlju predstavljaju jedan deo nedavno publikovanih rezultata [227].

4.5.2. Amperometrijsko određivanje glukoze primenom štampanog ugljeničnog biosenzora zasnovanog na kompozitu od višezidnih ugljeničnih nanocevi i čestica na bazi Pt

4.5.2.1. Karakterizacija radnih elektroda – supstrat elektrode i biosenzora

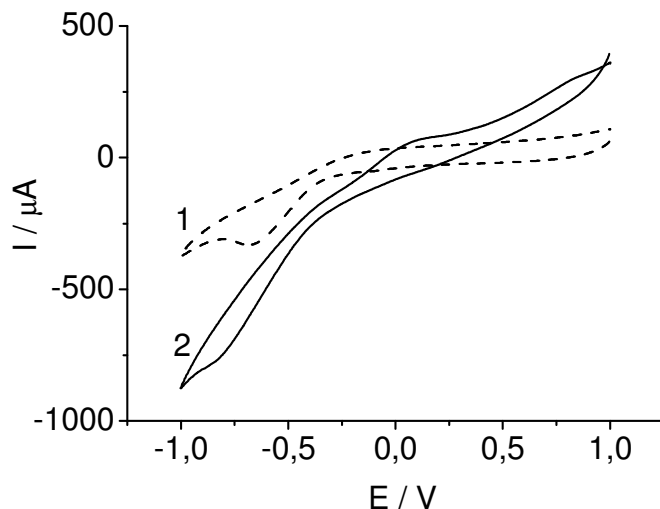
Kao prvo, površinske morfologije SPCE, MWCNT-SPCE, Pt-MWCNT-SPCE i GOx/Pt-MWCNT-SPCE su ispitane primenom SEM (slika 79). Sve elektrode sadrže matriks ugljeničnog mastila napravljen od čestica prečnika između 5-25 μm koje čine relativno kompaktnu osnovnu masu. Pri većim uvećanjima može se videti da su čestice napravljene od manjih podjedinica prečnika uglavnom između 100 i 200 nm. Pored toga, na slici 79B je prikazana reprezentativna površina MWCNT-SPCE i na slici 79C površina Pt-MWCNT-SPCE, gde se pored kompleksne strukture ugljeničnog matriksa prepoznaju i MWCNT kao nasumično orijentisani sastavni elektrodni elementi koji povezuju čestice ugljeničnog matriksa dajući strukturu koja je različita od nemodifikovane SPCE. Pored ugljeničnog matriksa i ugrađenih MWCNT struktura, površina GOx/Pt-MWCNT-SPCE sadrži i svetle čestice uglavnom sfernog oblika, koje su imobilisane, nasumično orijentisane i prisutne na celoj površini. Pri različitim uvećanjima površine počevši od 5000 preko 25000 i 50000 puta mogu se prepoznati dve glavne frakcije njihovih prečnika. Pri manjem uvećanju prepoznaju se samo sfere prečnika do 1000 nm, dok se kod većih uvećanja vide i sfere prečnika blizu 200 nm. Kod ovakvih uvećanja može se zaključiti da su sfere manjeg prečnika mnogo gušće raspoređene, više od tri puta, na površini supstrat elektrode. Paralelna proučavanja površine Pt-MWCNT-SPCE modifikovane koktelom pripremljenim na isti način kao rastvor biofilma samo bez dodatka GOx, potvrdila su da na tako pripremljenoj elektrodi nisu prisutne sferne jedinice iz biofilma imobilisane na supstrat elektrodi (slika 79G i H). U skladu sa gore navedenim i sa ranije elaboriranim rezultatima [194, 232], svetle čestice mogu se smatrati aktivnom GOx komponentom iz biosloja imobilisanom od strane Nafion[®]-a na površini Pt-MWCNT-SPCE.



Slika 79. Skenirajući elektronski mikrogrami površine SPCE (A), MWCNT-SPCE (B), Pt-MWCNT-SPCE (C), GOx/Pt-MWCNT-SPCE (D-F) i Pt-MWCNT-SPCE modificovane koktelom bez prisustva GOx (G, H) dobijeni pri uvećanjima od 5000 (A, D, G), 25000 (E) i 50000 (B, C, F, H) puta.

Proučavanje osnovnog voltametrijskog ponašanja H_2O_2 na Pt-MWCNT-SPCE i voltametrijska karakterizacija radne elektrode je vršena primenom CV u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatnom puferu pH 7,50 bez i u prisustvu određene koncentracije H_2O_2 , u opsegu potencijala od 1,0 do -1,0 V (slika 80) na isti način kao u slučaju prethodno opisanih radnih elektroda sličnog tipa (videti sliku 74). Može se uočiti da se primenom Pt-MWCNT kao zapreminskog modifikatora SPCE

postigne znatno smanjenje nadnapona elektrohemijske reakcije H_2O_2 i intenzivniji strujni odzivi u poređenju sa nemodifikovanom SPCE i MWCNT-SPCE usled osobine Pt-MWCNT kompozita da se ponaša kao medijator/elektrokatalizator. Takođe, redukcija H_2O_2 je dominantan proces na Pt-MWCNT-SPCE, što se može reći na osnovu strujnih intenziteta cikličnih voltamograma prikazanih na slici 80.



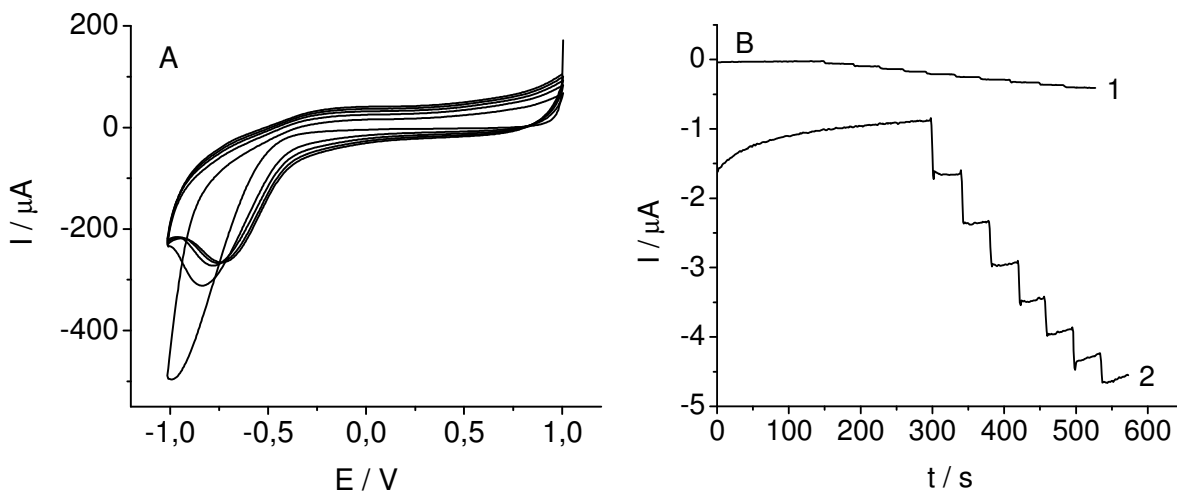
Slika 80. Ciklični voltamogrami snimljeni primenom Pt-MWCNT-SPCE u 0,1 mol L⁻¹ fosfatnom puferu pH 7,50 (isprekidana linija, kriva 1) i u istom pomoćnom elektrolitu u prisustvu 22 mmol L⁻¹ (748 $\mu\text{g mL}^{-1}$) H_2O_2 (puna linija, kriva 2). Brzina polarizacije: 50 mV s⁻¹.

4.5.2.2. Razvoj analitičkih metoda određivanja H_2O_2 i glukoze

U narednom koraku, nakon CV karakterizacije radne elektrode, vršena su amperometrijska merenja u model sistemima primenom Pt-MWCNT-SPCE kako bi se pronašli adekvatni eksperimentalni uslovi za određivanje H_2O_2 i nakon dodatne modifikacije elektrode enzimom GOx za određivanje glukoze.

Ispitan je uticaj aktivacije elektrodne površine Pt-MWCNT-SPCE cikliranjem na intenzitet i oblik amperometrijskih signala H_2O_2 . Prvo je snimljen amperogram u ispitivanom opsegu koncentracija H_2O_2 pri radnom potencijalu 0,00 V (slika 81B, kriva 1). Zatim je vršeno cikliranje u opsegu potencijala od 1,0 do -1,0 V (u negativnom smeru polarizacije) u 0,1 mol L⁻¹ fosfatnom puferu pH 7,50, 5 ciklusa, sa brzinom polarizacije 100 mV s⁻¹ (slika 81A) i ponovo je snimljen amperogram H_2O_2 pri istom radnom potencijalu (slika 81B, kriva 2). Uočava se da se nakon

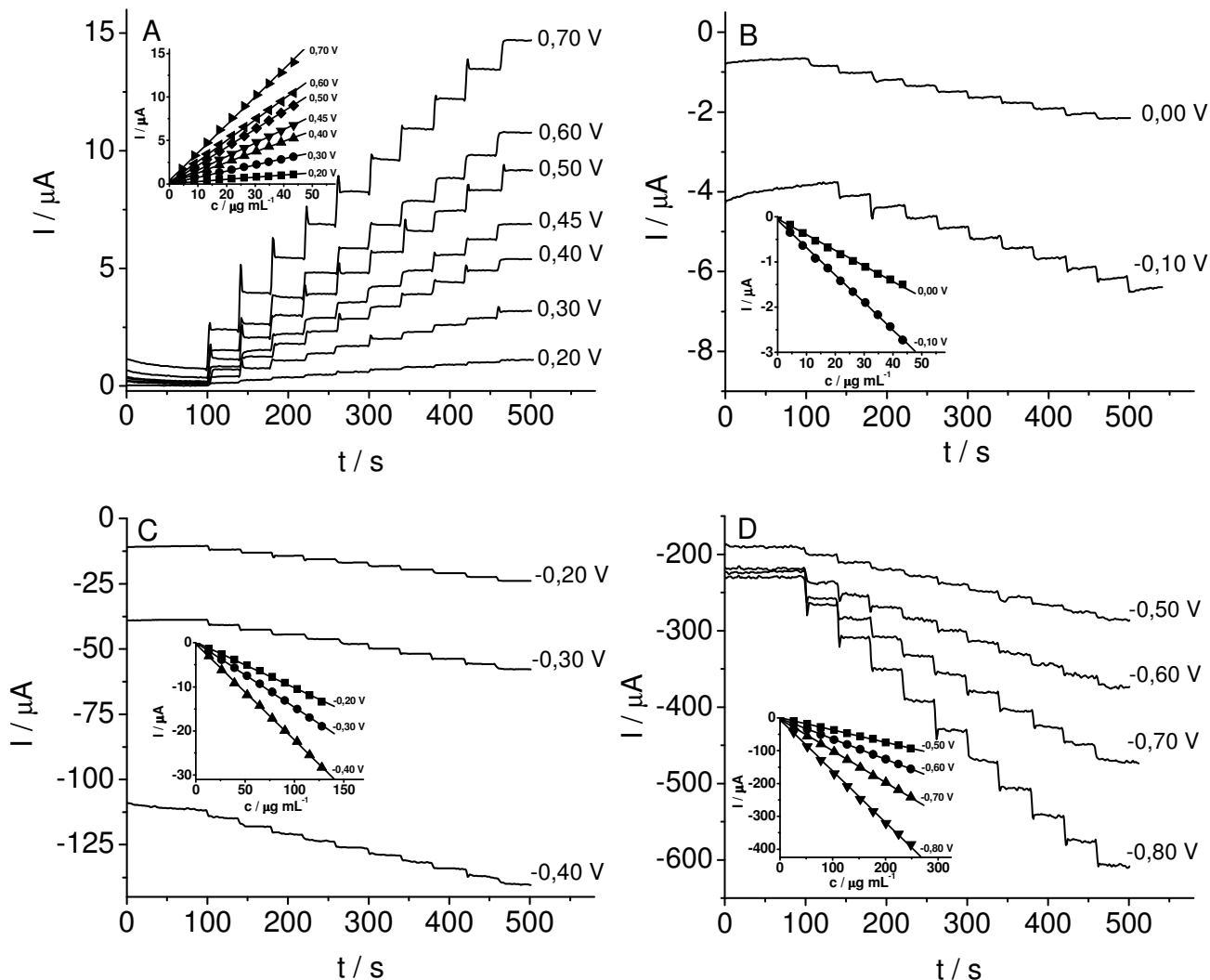
aktivacije elektrode dobijaju signali H_2O_2 znatno većeg intenziteta, stoga je pre svakog seta amperometrijskih merenja vršeno cikliranje elektrode na prethodno opisan način.



Slika 81. Cikliranje površine Pt-MWCNT-SPCE u pomoćnom elektrolitu u opsegu potencijala od 1,0 do -1,0 V, pri brzini polarizacije 100 mV s^{-1} , 5 ciklusa (A) i amperogrami H_2O_2 snimljeni primenom Pt-MWCNT-SPCE na 0,00 V (B) bez prethodne aktivacije (kriva 1B) i nakon cikliranja elektrodne površine (kriva 2B). Pomoćni elektrolit: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatni pufer pH 7,50. Opseg koncentracija H_2O_2 : $13,1\text{--}127,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (kriva 1B), $13,1\text{--}90,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (kriva 2B).

Različiti pozitivni i negativni radni potencijali (u opsegu od 0,70 do -0,80 V) su primenjeni za amperometrijsko merenje H_2O_2 u fosfatnom puferu pH 7,50 kao pomoćnom elektrolitu, kao što je prikazano na slici 82. Na osnovu intenziteta signala konstruisane su odgovarajuće kalibracione krive (umetci, slika 82). Pt-MWCNT-SPCE se može primeniti za određivanje H_2O_2 pri svim ispitivanim radnim potencijalima uz optimizaciju koncentracionog opsega H_2O_2 , kako bi se dobile kalibracione krive zadovoljavajuće linearnosti. Osetljivost metode u velikoj meri zavisi od primenjenog radnog potencijala. Oksidacioni signali H_2O_2 su dobijeni počevši od 0,15 V i daljim menjanjem potencijala ka pozitivnijim vrednostima. Sa druge strane može se uočiti da su redukcioni signali većeg intenziteta u odnosu na oksidacione signale, što je u skladu sa prethodno snimljenim cikličnim voltamogramima. Međutim, treba imati u vidu da odnos signal-šum opada sa promenom potencijala ka negativnijim vrednostima, što se dodatno može odraziti na GO analitičke metode. Odabrani analitički parametri su sumirani u tabeli 16.

Dodatno, Pt-MWCNT-SPCE je modifikovana enzimom GOx i testirana je mogućnost primene pripremljenog biosenzora za određivanje glukoze preko produkta nastalog u enzimatskoj reakciji – H_2O_2 .

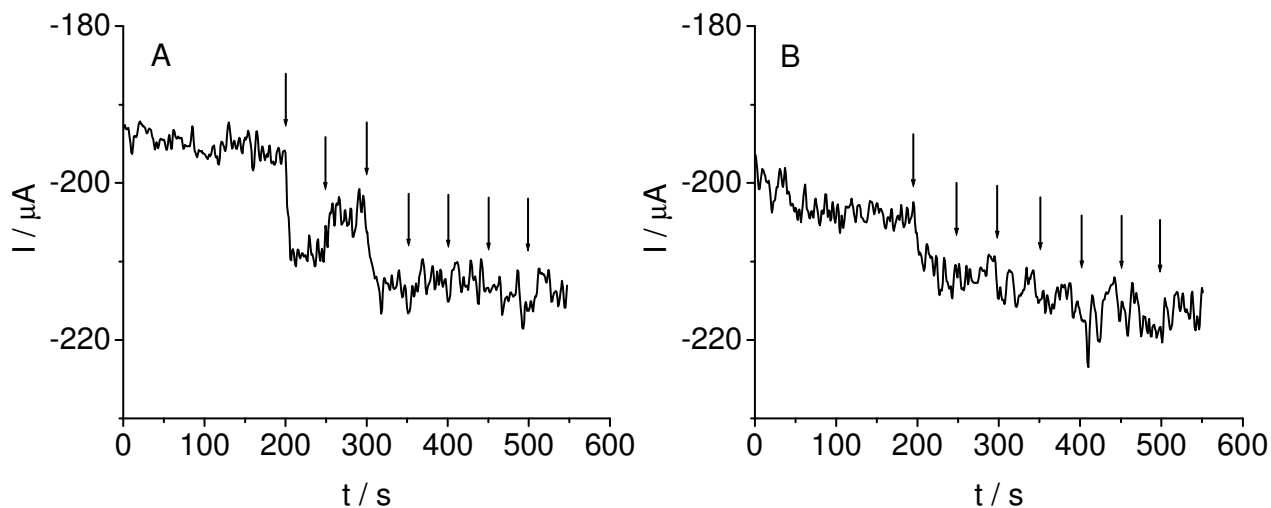


Slika 82. Amperogrami H_2O_2 snimljeni primenom Pt-MWCNT-SPCE u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatnom puferu pH 7,50 pri različitim radnim potencijalima: od 0,20 do 0,70 V (A), 0,00 i -0,10 V (B), od -0,20 do -0,40 V (C) i od -0,50 do -0,80 V (D). Opseg koncentracija H_2O_2 : $4,4\text{--}43,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A, B), $13,1\text{--}127,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (C), $26,2\text{--}248,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (D). Umetci: pripadajuće kalibracione krive.

Tabela 16. Odabrani analitički parametri amperometrijskog određivanja H_2O_2 primenom Pt-MWCNT-SPCE pri različitim radnim potencijalima u fosfatnom puferu pH 7,50.

Radni potencijal [V]	Ispitivani opseg koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Odsečak [μA]	Nagib [$\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$]	Koeficijent korelacije
0,70	4,4–43,4	0,393	0,320	0,999
0,60	4,4–43,4	0,199	0,239	0,999
0,50	4,4–43,4	0,075	0,207	0,999
0,45	4,4–43,4	0,034	0,156	0,999
0,40	4,4–43,4	0,049	0,121	0,999
0,30	4,4–43,4	0,045	0,071	0,999
0,20	4,4–43,4	0,019	0,025	0,999
0,00	4,4–43,4	-0,050	-0,034	-0,998
-0,10	4,4–43,4	-0,072	-0,061	-0,999
-0,20	13,1–127,8	0,157	-0,104	-0,999
-0,30	13,1–127,8	0,064	-0,147	-0,999
-0,40	13,1–127,8	-0,250	-0,218	-0,999
-0,50	26,2–248,3	0,705	-0,375	-0,999
-0,60	26,2–248,3	-1,958	-0,620	-0,999
-0,70	26,2–248,3	-3,540	-0,964	-0,999
-0,80	26,2–248,3	-5,582	-1,562	-0,999

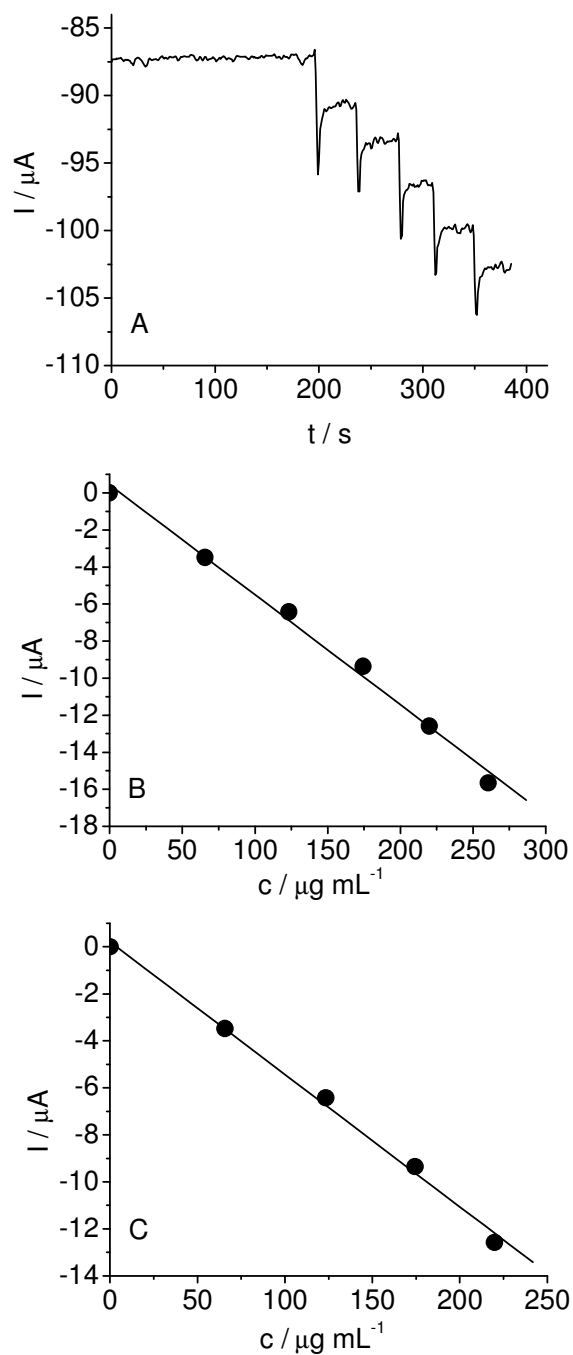
Pre nanošenja biofilma na površinu elektrode, vršena su amperometrijska merenja glukoze, pri čemu dobijeni rezultati pri radnom potencijalu -0,50 V (slika 83) pokazuju da u dva različita ispitivana koncentraciona opsega glukoze (aliquoti osnovnog rastvora glukoze koncentracije $1005 \mu\text{g mL}^{-1}$ od po $500,0 \mu\text{L}$ (A) i $700,0 \mu\text{L}$ (B)) ne dolazi do pojave karakterističnih stepeničastih signala. S obzirom da signali glukoze nisu bili merljivi, ukazano je na potrebu da se elektroda dodatno mora modifikovati enzimom GOx, kao i u slučaju ranije opisane Pd-MWCNT-SPCE.



Slika 83. Amperogrami glukoze snimljeni primenom Pt-MWCNT-SPCE u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatnom puferu pH 7,50 na $-0,50 \text{ V}$. Opseg koncentracija glukoze: $47,9\text{--}260,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A), $65,8\text{--}330,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (B). Strelice označavaju vreme injektovanja rastvora glukoze.

U narednom koraku, na površinu Pt-MWCNT-SPCE je naneto $15,0 \mu\text{L}$ biokoktela kako je opisano u Eksperimentalnom delu. Za amperometrijska merenja glukoze primenom GOx/Pt-MWCNT-SPCE testirani su različiti radni potencijali, pri čemu se u nizu ispitivanih radnih potencijala od $-0,20$ do $-0,70 \text{ V}$ kao najpogodniji potencijal za analitičke svrhe pokazao $-0,50 \text{ V}$ na osnovu intenziteta i oblika dobijenih amperometrijskih signala. Na slici 84 je prikazana amperometrijska kriva glukoze snimljena na $-0,50 \text{ V}$ (A) zajedno sa kalibracionim krivama konstruisanim za dva različita opsega koncentracija glukoze (B, C). Osnovni analitički parametri za oba koncentraciona opsega glukoze su dati u tabeli 17.

Reproduktivnost amperometrijskih signala glukoze je ispitana dodavanjem četiri puta iste količine glukoze u pomoćni elektrolit i ponavljanjem merenja šest puta sa istim biosenzorom. RSD je izračunata za svaki stepeničasti signal i njena vrednost nije prelazila $5,5\%$ za GOx/Pt-MWCNT-SPCE u slučaju fosfatnog pufera pH 7,50, radnog potencijala $-0,50 \text{ V}$ i koncentracionog opsega glukoze od $65,8$ do $219,8 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Slika 84. Amperogram glukoze snimljen primenom GOx/Pt-MWCNT-SPCE u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatnom puferu pH 7,50 pri radnom potencijalu $-0,50 \text{ V}$ u opsegu koncentracija $65,8\text{--}260,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A) i pripadajuće kalibracione krive konstruisane za opseg koncentracija glukoze: $65,8\text{--}260,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (B) i $65,8\text{--}219,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (C).

Tabela 17. Analitički parametri amperometrijskog određivanja glukoze primenom GOx/Pt-MWCNT-SPCE u fosfatnom puferu pH 7,50, pri radnom potencijalu -0,50 V.

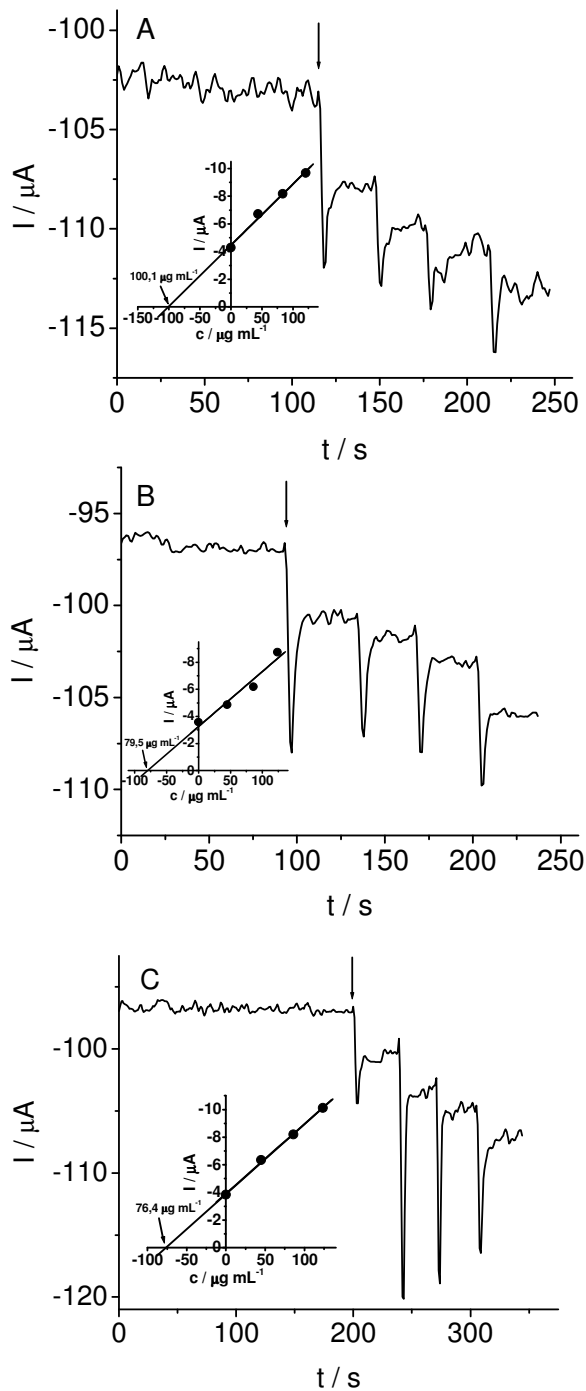
Parametar		
Ispitivani opseg koncentracija [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	65,8–260,6	65,8–219,8
Koeficijent korelacije	-0,997	-0,998
Nagib [$\mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$]	-0,059	-0,056
Odsečak [μA]	0,43	0,21
GD [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	11	11
GO [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	35	35

Životni vek GOx/Pt-MWCNT-SPCE može biti duži od tri dana ako je primena umerena i ako se čuva pri adekvatnim uslovima (u frižideru, na 4 °C).

4.5.2.3. Određivanje glukoze u uzorku belog grožđa

Merenje sadržaja glukoze u voću je važan parametar koji obezbeđuje njegov kvalitet. Grožđe je poznato kao voće sa visokim sadržajem glukoze. Što se tiče sadržaja šećera, glukoza i fruktoza su prisutni u sličnim količinama u fazi zrenja, dok je udeo saharoze manji od 1%, a koncentracija skroba je praktično zanemarljiva [233]. GOx/Pt-MWCNT-SPCE je testirana za određivanje sadržaja glukoze u belom grožđu sorte Viktorija nakon odgovarajuće pripreme uzorka i primenom optimizovane amperometrijske metode (radni potencijal -0,50 V, 0,1 mol L⁻¹ fosfatni pufer pH 7,50). Slika 85 prikazuje amperograme određivanja glukoze u pripremljenom uzorku grožđa korišćenjem metode standardnog dodatka kako bi se izbegle eventualne interferencije matriksa grožđa koje mogu uticati na tačnost određivanje glukoze.

Pored odabira odgovarajućeg radnog potencijala, zapremina uzorka je još jedan važan parametar imajući u vidu optimizovani analitički protokol. Različite zapremine uzorka su testirane (1,50, 1,00, 0,700 i 0,500 mL) njihovim direktnim dodavanjem u voltometrijsku ćeliju u prisustvu 10,0 mL fosfatnog pufera pH 7,50 (0,1 mol L⁻¹) pri konstantnom mešanju.



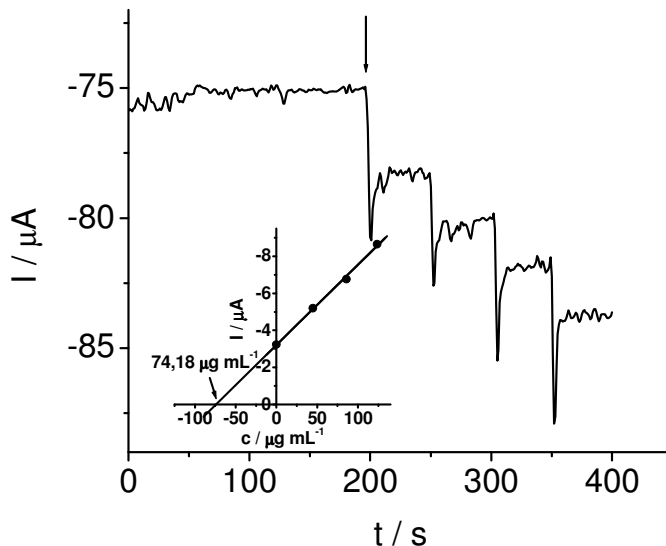
Slika 85. Amperogrami određivanja glukoze u uzorku grožđa metodom standardnog dodavanja i upotrebom GOx/Pt-MWCNT-SPCE pri radnom potencijalu od -0,50 V u fosfatnom puferu pH 7,50; dodatak uzorka je označen strelicom. Umetci: odgovarajuće analitičke prave. Zapremine uzorka: 1,00 mL (A) i 0,700 mL (B, C).

Najveća zapremina uzorka stvara suviše mali odnos signala i šuma. 1,00 mL uzorka (slika 85A) je primenljiva zapremina za merenja, ali 0,700 mL (slika 85B i C) nudi pogodne uslove za merenje, posebno kada se uzmu u obzir parametri kao što su odnos signal-šum i stabilnost odziva. Kao što se može uočiti, signal-šum odnos je skoro 3 puta veći u slučaju prikazanom na slici 85B i C, gde je primenjena zapremina uzorka bila 0,700 mL. Ponavljanjem merenja sa dodatkom od 1,00 mL uzorka, pored promena na baznoj liniji, intenzitet signala je opao kako za uzorak tako i za standardne dodatke. U ovom slučaju, verovatno, neke komponente iz matriksa su potiskivale generisanje signala. Usled ovog efekta potiskivanja signala matriksom, kao i nepovoljnog signal-šum odnosa, odgovarajuća zapremina uzorka belog grožđa je bila između 0,800 i 0,600 mL, sa optimalnom zapreminom 0,700 mL. Merenja su vršena u tri ponavljanja, i koncentracije glukoze evaluirane sa odgovarajućih analitičkih prava su iznosile 76,4 (slika 85C, umetak), 74,7 i 79,5 (slika 85B, umetak) $\mu\text{g mL}^{-1}$ (srednja vrednost $76,9 \mu\text{g mL}^{-1}$), dok su koncentracije glukoze preračunate na dobijeni sok od grožđa nakon njegovog ceđenja bile 73,0, 71,4 i 76,0 g L^{-1} (srednja vrednost $73,5 \text{g L}^{-1}$). RSD metode je bila 3,2%. Na osnovu rezultata tri ponovljena merenja primenom Accu-Chek opreme, pronađen sadržaj glukoze u soku od grožđa je bio 70,9, 70,9 i 72,0 g L^{-1} ($71,3 \text{g L}^{-1}$ izraženo preko srednje vrednosti) sa RSD od 0,9%. Dve metode su međusobno u dobroj saglasnosti sa relativnom greškom manjom od 3,2%.

4.5.2.4. Određivanje glukoze u uzorku komprimata/tableta

Uzorak komprimata (tableta) sa aromom jagode je analiziran primenom GOx/Pt-MWCNT-SPCE pri radnom potencijalu $-0,50 \text{ V}$ u $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ fosfatnom puferu pH 7,50. Nakon odgovarajuće pripreme uzorka, sadržaj glukoze u uzorku tableta je određen metodom standardnog dodatka, kao što je prikazano na ilustrativnom amperogramu (slika 86). U rastvor pomoćnog elektrolita je nakon stabilizacije bazne linije dodat alikvot pripremljenog uzorka tableta a potom i tri standardna dodatka glukoze. Koncentracija glukoze je očitana sa konstruisane analitičke prave (slika 86, umetak). Merenja su rađena u tri ponavljanja, pri čemu su dobijeni rezultati za sadržaj glukoze u uzorku tableta bili sledeći: 83,5%, 83,3% i 84,0% (srednja vrednost 83,6%), a vrednost RSD je iznosila 0,4% za amperometrijsku metodu. Komparativna merenja sa Accu-Chek su dala slične vrednosti za koncentraciju glukoze u poređenju sa amperometrijskom metodom: 82,0%, 84,6% i 82,0% (srednja vrednost 82,9%) sa RSD od 1,8%. Sadržaj glukoze u tabletama deklarisan od strane proizvođača je

bio 89,4%, ukazujući da su rezultati dobijeni primenom obe metode u saglasnosti sa deklarisanom vrednošću.



Slika 86. Amperogram određivanja glukoze u uzorku tableta sa aromom jagode metodom standardnog dodatka i primenom GOx/Pt-MWCNT-SPCE pri radnom potencijalu -0,50 V u fosfatnom puferu pH 7,50; dodatak uzorka tableta označen strelicom. Umetak: pripadajuća analitička prava.

Može se zaključiti da amperometrijska metoda zasnovana na optimizovanoj analitičkoj proceduri u kombinaciji sa adekvatno pripremljenom GOx/Pt-MWCNT-SPCE je pogodna za brza i jednostavna merenja koja se odnose na određivanje glukoze u uzorcima belog grožđa i komprimata (tableta).

5. ZAKLJUČAK

Fizičke i hemijske osobine vodonik-peroksida (H_2O_2) su takve da omogućavaju raznoliku primenu ovog jednostavnog molekula u mnogim oblastima. Određivanje H_2O_2 je od velikog značaja za industriju, farmaciju, biološke procese, kao i zaštitu životne sredine. Stoga je cilj ove doktorske disertacije bio razvoj brzih i pouzdanih voltametrijskih metoda zasnovanih na pripremi i primeni jednostavnih i savremenih elektroda/senzora na bazi ugljeničnih materijala (ugljenične paste napravljene od grafitnog praha i parafinskog ulja, kao i štampanih ugljeničnih elektroda) za određivanje H_2O_2 u odabranim složenim model i realnim uzorcima.

1. Ispitana je primenljivost jednostavne amperometrijske metode zasnovane na upotrebi nemodifikovane elektrode od ugljenične paste (CPE) i zapreminski modifikovane CPE sa različitim sadržajem MnO_2 za određivanje H_2O_2 . Kao najpogodnija elektroda pokazala se CPE sa masenim udelom 5% MnO_2 . Pri optimizovanim uslovima i pri radnom potencijalu od 0,40 V u odnosu na zasićenu kalomelovu elektrodu (ZKE) u fosfatnom puferu pH 7,50 kao pomoćnom elektrolitu, metoda je omogućila kvantifikaciju H_2O_2 u opsegu koncentracija od 1,4 do 65 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sa relativnom standardnom devijacijom (RSD) manjom od 10%. Optimizovana metoda zasnovana na 5%- MnO_2 -CPE je primenjena za određivanje sadržaja H_2O_2 u uzorcima podzemne vode iz centralnog Banata (Pokrajina Vojvodina, Srbija) tretirane Fentonovim (Fe^{2+} i H_2O_2) i Fentonu-sličnim (Fe^{3+} i H_2O_2) reagensima u cilju uklanjanja prirodnih organskih materija (POM) pri čemu su korišćene različite početne koncentracije gvožđa i različiti odnosi molarnih koncentracija gvožđa i H_2O_2 . U ovom postupku, jedini korak pripreme uzorka je bila filtracija u cilju uklanjanja hidroksida gvožđa nastalih nakon stopiranja reakcije oksidacije. Koncentracija H_2O_2 u uzorcima je određena metodom standardnog dodatka. Utvrđeno je da oksidaciono stanje gvožđe (Fe^{2+} ili Fe^{3+}) i molarni odnos jona Fe i H_2O_2 utiču na stepen potrošnje/razgradnje H_2O_2 u podzemnoj vodi sa visokim sadržajem POM. Takođe, u slučaju Fentonu-sličnog procesa, za sve početne koncentracije Fe^{3+} i H_2O_2 , signifikantna količina H_2O_2 ostaje neiskorišćena, što ukazuje na nižu efikasnost ovakvog sistema u poređenju sa Fentonovim procesom.
2. Štampana ugljenična elektroda (SPCE) zapreminski modifikovana sa MnO_2 kao medijatorom je primenjena za amperometrijsko određivanje sadržaja H_2O_2 u toku

Fentonovog (Fe^{2+} , H_2O_2) i vidljivom svetlošću potpomognutog foto-Fentonovog (Fe^{2+} , H_2O_2 , $h\nu$) procesa uklanjanja odabranog organskog polutanta, neonikotinoidnog insekticida acetamiprida (ACT) koji ima piridinski prsten i cijano-iminsku grupu u svojoj osnovnoj strukturi. Ciklična voltametrijska (CV) i diferencijalno pulsna voltametrijska (DPV) merenja su pokazala da se modifikacijom SPCE sa MnO_2 postiže visoka osetljivost u pogledu određivanja H_2O_2 kao ciljnog analita. Pri optimizovanim uslovima (radni potencijal 0,40 V u odnosu na ZKE, fosfatni pufer pH 7,50 kao pomoćni elektrolit) elektrokatalitičkog amperometrijskog određivanja H_2O_2 , postignuta je linearnost u opsegu koncentracija 0,01–1,24 mmol L⁻¹ (0,34–42,2 µg mL⁻¹) i vrednost RSD nije prelazila 4,2%. U ispitivanim uzorcima (nakon odgovarajućeg podešavanja pH vrednosti od 2,8 do 7,5 odmah nakon uzorkovanja radi stopiranja ili maksimalnog usporavanja procesa oksidacije, filtriranja, zamrzavanja i odmrzavanja neposredno pre merenja) sadržaj H_2O_2 je određen metodom standardnog dodatka analiziranjem odgovarajućih amperometrijskih krivi. Paralelna HPLC-DAD merenja su vršena u cilju praćenja koncentracije/uklanjanja ACT. U slučaju foto-Fentonovog procesa (početne koncentracije 0,31; 2,0 i 3,0 mmol L⁻¹ (70,0; 111,7 i 102,1 µg mL⁻¹) za ACT, Fe^{2+} i H_2O_2 , redom) nakon 10 min H_2O_2 je izreagovao, a može se smatrati da je ACT uklonjen nakon 5 min. U toku Fentonovog procesa ACT je uklonjen nakon 20 min tretmana i oko 10% početne koncentracije H_2O_2 je ostalo u sistemu neiskorišćeno. Na osnovu dobijenih rezultata, u oba slučaja, početne koncentracije Fe^{2+} i H_2O_2 su bile odgovarajuće za uklanjanje ACT u vodenoj sredini Fentonovim i foto-Fentonovim procesom na mmol L⁻¹ koncentracionom nivou (ali neki degradacioni intermedijeri veće polarnosti mogu ostati u sistemu). Informacija o potrošnji H_2O_2 još uvek predstavlja značajan faktor u procesima uklanjanja/prečišćavanja jer nestanak H_2O_2 ili neadekvatan odnos koncentracija Fe^{2+} i H_2O_2 može zaustaviti procese oksidacije ili promeniti reakcioni put. Iako priroda i koncentracija organskih polutanata može znatno da varira, jednostavni i brzi eksperimenti u model sistemima mogu da ukažu na postojanje potencijalnih interferencija i drugih efekata koji potiču od uzoraka, što se može minimizovati optimizacijom metode i odgovarajućom pripremom uzorka.

3. Pripremljen je jednostavan, osetljiv i pouzdan H_2O_2 senzor napravljen od CPE površinski modifikovane kompozitom na bazi nanočestica Pt (< 5 nm) i grafitizovanog ugljenika (Pt-C,

10% Pt na Vulkanu XC72) metodom nanošenja kapi. Obe elektrode, nemodifikovana CPE i modifikovana (Pt-C/CPE) su okarakterisane primenom SEM/EDS i CV merenja. Pt-C/CPE je pokazala izuzetne elektrokatalitičke osobine u pogledu elektrohemijske redoks reakcije H_2O_2 u poređenju sa nemodifikovanom CPE u fosfatnom puferu ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,50), a takođe i u acetatnom puferu ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,50) kao pomoćnom elektrolitu, naročito na potencijalima blizu 0,0 V. Prilikom amperometrijskog određivanja H_2O_2 primenom Pt-C/CPE u model sistemima, zadovoljavajuća linearnost je postignuta u koncentracionom opsegu H_2O_2 od 0,15 do $1,45 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, dok su vrednosti GO iznosile $0,06 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (pH 7,50, radni potencijal 0,20 V) i $0,10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (pH 4,50, radni potencijal 0,50 V). Optimizovane analitičke metode su primenjene za određivanje sadržaja H_2O_2 u komercijalno dostupnim proizvodima za ličnu negu: rastvoru za dezinfekciju (pH 7,50) i rastvoru za čišćenje kontaktnih sočiva (pH 4,50). Pt-C/CPE je takođe testirana za praćenje koncentracije H_2O_2 u rastvoru za kontaktna sočiva u toku procesa njegove neutralizacije/razgradnje. Amperometrijski dobijeni rezultati su u dobrom slaganju sa rezultatima dobijenim primenom tradicionalne spektrofotometrijske metode bazirane na titanijum-sulfatu kao reagensu sa određenim koncentracijama 2,91% i 2,94% za dezinfekcioni rastvor i 3,04% i 3,17% za rastvor za kontaktna sočiva, redom. RSD je bila manja od 2%. Postignuti rezultati su u dobrom slaganju sa sadržajem H_2O_2 deklaranim od strane proizvođača (3%) u oba ispitivana uzorka. Koncentracija H_2O_2 tokom njegove razgradnje u rastvoru za kontaktna sočiva je uspešno određena primenom obe metode sve do kontaktnog vremenskog intervala rastvora H_2O_2 i čvrstog katalizatora između 4 h i 6 h, kada se uočava signifikantna promena u obliku apsorpcionog spektra što je onemogućilo primenu spektrofotometrijske metode. Amperometrijska metoda je bila primenljiva u ovom vremenskom intervalu sa nešto većim vrednostima RSD. Nakon 6 h procesa neutralizacije, $24,68 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ je bila određena koncentracija H_2O_2 , što je skoro polovina dozvoljene H_2O_2 koncentracije u rastvoru za kontaktna sočiva imajući u vidu granicu koja izaziva iritaciju oka (između 50 i $60 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$).

4. Tradicionalna CPE (napravljena od grafitnog praha i parafinskog ulja) je površinski modifikovana višezidnim ugljeničnim nanocevima (MWCNT) i kompozitima MnO_2 -MWCNT ili Pt-MWCNT metodom nanošenja kapi radi pripreme jednostavnih, osetljivih i pouzdanih voltometrijskih senzora za određivanje H_2O_2 u odabranom uzorku. Rezultati

SEM/EDS analize kompozitnih materijala su potvrdili da su medijatori, čestice MnO_2 i Pt, nasumično raspoređeni na površini MWCNT i zastupljeni sa blizu 5% (m:m) u kompozitu izraženo preko Mn i Pt. CV merenja su vršena sa pripremljenim radnim elektrodama u acetatnom (pH 4,50), fosfatnom (pH 7,50) i boratnom (pH 9,18) puferu kako bi se okarakterisalo osnovno elektrohemijsko ponašanje H_2O_2 i odabrali pogodni radni potencijali za amperometrijsko određivanje ovog ciljnog analita. Dobijeni CV odzivi su pokazali da u blago alkalnoj sredini sve ispitivane radne elektrode (nemodifikovana CPE, MWCNT/CPE, MnO_2 -MWCNT/CPE i Pt-MWCNT/CPE) su prihvatljive za određivanje H_2O_2 ali sa različitom efikasnošću pri različitim potencijalima. MWCNT/CPE daje poboljšane redukcijske signale H_2O_2 u poređenju sa CPE, naročito na potencijalima nižim od -0,60 V u odnosu na ZKE. U slučaju Pt-MWCNT/CPE ovaj efekat je izražen na -0,05 V i nižim potencijalima, ali ova elektroda daje značajne oksidacione signale H_2O_2 i na potencijalima iznad 0,10 V. Pt-MWCNT/CPE je primenljiva za rad i u acetatnom puferu pH 4,50 V kako pri negativnim tako i pri pozitivnim radnim potencijalima. U slučaju MnO_2 -MWCNT/CPE, na potencijalu 0,30 V i višim vrednostima, oksidacioni signali H_2O_2 su signifikantni. Pri pH 4,50 MnO_2 -MWCNT/CPE pokazuje nezadovoljavajuće ponašanje zbog veoma niskih intenziteta H_2O_2 signala u opsegu potencijala od -0,50 do 0,60 V, ali pri pH 9,18 ova elektroda ima prihvatljive performanse. Razmatrajući reproduktivnost signala H_2O_2 , primenom Pt-MWCNT/CPE su uglavnom dobijene vrednosti RSD ispod 2,5%, dok se u slučaju MnO_2 -MWCNT/CPE nezadovoljavajuća reproduktivnost može poboljšati dodatnim elektrohemijskim predtretmanom (kondicioniranjem) pre amperometrijskih merenja. GO analitičkih metoda su u $\mu\text{g mL}^{-1}$ oblasti. H_2O_2 je određen u spajkovanom uzorku mleka metodom standardnog dodatka nakon odgovarajuće pripreme uzorka (pH podešavanje i centrifugiranje) i primenom optimizovane amperometrijske procedure (acetatni pufer pH 4,50, radni potencijal -0,75 V) koristeći Pt-MWCNT/CPE kao radnu elektrodu. RSD za tri ponovljena merenja je iznosila 2,5%, dok je prinos metode bio nešto veći od 71%.

5. Kompozitni materijali koji se sastoje od MWCNT i čestica na bazi Pd (Pd-MWCNT) ili Pt (Pt-MWCNT) su primenjeni za pripremu zapreminski modifikovanih SPCE (Pd-MWCNT-SPCE i Pt-MWCNT-SPCE) i površinski modifikovane SPCE (Pd-MWCNT/SPCE). Ove elektrode, kao i nemodifikovana SPCE i MWCNT-SPCE, su okarakterisane primenom CV i

amperometrije u fosfatnom puferu pH 7,50 radi određivanja H_2O_2 . Kompozit Pd-MWCNT u obliku kako zapreminskog tako i površinskog modifikatora, je pogodan za određivanje H_2O_2 na radnim potencijalima između -0,50 i 0,50 V. Pt-MWCNT-SPCE se takođe pokazala pogodnom za određivanje H_2O_2 u ispitivanom opsegu radnih potencijala od -0,80 do 0,70 V. Pd-MWCNT-SPCE, Pd-MWCNT/SPCE i Pt-MWCNT-SPCE su zatim modifikovane enzimom glukoza oksidazom (GOx) metodom nanošenja kapi rastvora GOx i Nafion[®]-a na njihovu površinu. Glukoza se može odrediti primenom dobijenih biosenzora preko nastalog H_2O_2 u enzimatskoj reakciji. GOx/Pd-MWCNT-SPCE je pokazala bolju reproduktivnost i prihvatljivije analitičke performanse za određivanje glukoze pri radnim potencijalima između -0,20 i -0,50 V u poređenju sa GOx/Pd-MWCNT/SPCE. Kao optimalan radni potencijal GOx/Pd-MWCNT-SPCE je odabrana vrednost potencijala -0,40 V u odnosu na ZKE, sa zadovoljavajućom linearnošću u ispitivanom opsegu koncentracija glukoze od 0,16 do 0,97 mmol L⁻¹ (od 29,1 do 174 µg mL⁻¹), dok je GO iznosila 0,14 mmol L⁻¹ (25 µg mL⁻¹). Optimizovana metoda zasnovana na GOx/Pd-MWCNT-SPCE je uspešno primenjena za određivanje glukoze u uzorku livadskog meda. Dobijeni rezultati su u dobroj saglasnosti sa onima dobijenim primenom komercijalno dostupnog aparata za merenje glukoze. Pogodan radni potencijal za GOx/Pt-MWCNT-SPCE je bio -0,50 V u odnosu na ZKE, pri čemu je zadovoljavajuća linearnost postignuta u ispitivanom opsegu koncentracija glukoze od 65,8 do 260,6 µg mL⁻¹, sa GO 35 µg mL⁻¹. Optimizovana metoda zasnovana na GOx/Pt-MWCNT-SPCE je uspešno primenjena za određivanje glukoze u uzorku belog grožđa i uzorku tableta (Traubenzucker-bonbons), pri čemu su dobijeni rezultati u dobroj saglasnosti sa rezultatima dobijenim primenom Accu-Chek aparata.

Razvijene amperometrijske metode u okvirima ove doktorske disertacije su jednostavne, pouzdane i pogodne za dobijanje brzih informacija o sadržaju H_2O_2 u različitim tipovima uzoraka. Svakako odabir pogodne radne elektrode, kao i optimizacija eksperimentalnih uslova su ključni faktori za uspešno određivanje H_2O_2 . Elektrode poput 5%-MnO₂-CPE ili MnO₂-SPCE se mogu primeniti za dobijanje informacija o potrošnji H_2O_2 u Fentonovim, Fentonu-sličnim i foto-Fentonovim sistemima, pri čemu se može pretpostaviti da postoji mogućnost njihove primene za merenje H_2O_2 *in situ* ili čak u pilot postrojenjima. Kontrolu kvaliteta različitih komercijalno dostupnih proizvoda za ličnu negu je moguće izvršiti primenom metoda zasnovanih na Pt-C/CPE,

pri čemu se pretpostavlja da se ovakve analize mogu sprovesti i u decentralizovanim laboratorijskim uslovima kao i na terenu. Sa druge strane, dobijeni rezultati pokazuju da se Pt-MWCNT/CPE može primeniti za merenje H_2O_2 u uzorku mleka nakon adekvatne pripreme uzorka, dok Pd-MWCNT-SPCE i Pt-MWCNT-SPCE nakon njihove dodatne modifikacije enzimom GOx mogu poslužiti za određivanje glukoze u različitim uzorcima kao što su med, grožđe ili glukozne tablete. Može se zaključiti da su razvijene metode zasnovane na visoko osetljivim elektrodama koje su ekološki i ekonomski prihvatljive.

6. CONCLUSION

The physical and chemical properties of hydrogen-peroxide (H_2O_2) are such that they enable various application of this simple molecule in many areas. Determination of H_2O_2 is of great importance for industry, pharmacy, biological processes, and environmental protection. Therefore, the aim of this doctoral dissertation was the development of fast and reliable voltammetric methods based on the preparation and application of simple and contemporary electrodes/sensors based on carbonaceous materials (carbon paste made of graphite powder and paraffin oil, as well as screen printed carbon electrodes) for the determination of H_2O_2 in the selected complex model and real samples.

1. A simple amperometric method based on the application of an unmodified carbon paste electrode (CPE) and bulk-modified with different contents of MnO_2 was investigated for the determination of H_2O_2 . As the most suitable electrode, CPE with a mass fraction of 5% MnO_2 was found. Under optimized conditions, with a working potential of 0.40 V vs. the saturated calomel electrode (SCE) and a phosphate buffer solution (pH 7.50) as supporting electrolyte, the method enabled the quantitation of H_2O_2 in the concentration interval from 1.4 to 65 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with a relative standard deviation (RSD) of less than 10%. The optimized method involving the 5%- MnO_2 -CPE was applied for the determination of the H_2O_2 consumption in samples of groundwater from the Central Banat region (Province of Vojvodina, Serbia) treated by the Fenton (Fe^{2+} and H_2O_2) and Fenton-like (Fe^{3+} and H_2O_2) reagents to remove natural organic matter (NOM) at different initial concentrations of iron species, and of their molar ratios to the initial concentration of H_2O_2 . In this procedure, the only sample pretreatment step was filtration to remove the precipitated Fe hydroxide(s) formed after stopping the oxidation reactions. The concentration of the H_2O_2 in the samples was determined by the standard addition method. It was found that the form of Fe (Fe^{2+} or Fe^{3+}) and the molar ratio to H_2O_2 influenced the degree of the H_2O_2 decomposition in the groundwater with high NOM content. Besides, in the case of the Fenton-like process, for all initial doses of Fe^{3+} and H_2O_2 , a significant amount of H_2O_2 remained unused, which also indicates a lower efficiency of such system compared to the Fenton process.

2. Screen printed carbon electrode (SPCE) bulk-modified with MnO_2 as a mediator was applied for amperometric determination of the H_2O_2 content during the Fenton (Fe^{2+} , H_2O_2) and visible light-assisted, photo-Fenton (Fe^{2+} , H_2O_2 , $h\nu$) based removal of the selected organic pollutant, neonicotinoid insecticide acetamiprid (ACT) which has a pyridine ring and a cyano-imine group in its basic skeleton. Cyclic voltammetric (CV) and differential pulse voltammetric (DPV) measurements showed that modification of SPCE with MnO_2 allowed highly sensitive determination of H_2O_2 as target analyte. Under optimized conditions (working potential of 0.40 V vs. SCE, phosphate buffer pH 7.50 as supporting electrolyte) electrocatalytic amperometric determination of H_2O_2 showed a linear dynamic range from 0.01 to 1.24 mmol L^{-1} (from 0.34 to 42.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and the RSD did not exceed 4.2%. In the investigated samples (after appropriate pH adjustment from 2.8 to 7.5 instantly after the sampling to stop or maximum decelerate the oxidation processes, filtering, and storage of the deep-frozen sample with defrosting immediately before the measurements) the H_2O_2 contents were determined by the standard addition method by analyzing the corresponding amperometric curves. Parallel HPLC-DAD measurements were performed to monitor the concentration/removal of ACT. In the case of the photo-Fenton process (initial concentrations: 0.31; 2.0 and 3.0 mmol L^{-1} (70.0; 111.7 and 102.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of ACT, Fe^{2+} and H_2O_2 , respectively) after 10 min of irradiation H_2O_2 was consumed and it can be considered that ACT was removed after 5 min. During the Fenton process ACT was removed after 20 min of treatment and around 10% of the initial concentration of the H_2O_2 remained still unused. Based on the obtained results, in both cases the initial concentration of the Fe^{2+} and H_2O_2 was appropriate to cover the requirements of Fenton and photo-Fenton degradation of ACT in water media at milimolar concentration level (but some of the degradation intermediates with high polarity can still stay in the system). The information concerning the consumption of H_2O_2 is still a significant factor for the removal/cleaning processes because its disappearance or a non-appropriate concentration ratio of Fe^{2+} and H_2O_2 can stop the oxidation processes or change the reaction pathway. Although the nature and concentration of the organic pollutant(s) can greatly vary, the simple and rapid experiments in the model systems can readily indicate potential interferences and other effects from the samples which can be minimized by optimization of the method and appropriate sample preparation.

3. A simple, sensitive and reliable H_2O_2 sensor made from CPE surface modified with a composite of Pt nanoparticles (< 5 nm) on graphitized carbon (Pt-C, 10% Pt on Vulcan XC72) was prepared by simply drop coating. Both, the unmodified CPE and the modified one (Pt-C/CPE) were characterized by SEM/EDS and CV measurements. The Pt-C/CPE showed remarkable electrocatalytic properties toward the electrochemical redox reaction of H_2O_2 compared to unmodified CPE in phosphate buffer (0.1 mol L^{-1} ; pH 7.50), as well in acetate buffer (0.1 mol L^{-1} ; pH 4.50) supporting electrolytes, especially at potentials close to 0.0 V. Amperometry of H_2O_2 in the concentration range from 0.15 to $1.45 \mu\text{g mL}^{-1}$ with the Pt-C/CPE showed acceptable linearity, while the obtained values of LOQs were $0.06 \mu\text{g mL}^{-1}$ (pH 7.50, working potential 0.20 V) and $0.10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (pH 4.50, working potential 0.50 V). The proposed analytical methods were applied to the determination of the H_2O_2 content in commercially available personal care products; i.e., disinfection (pH 7.50) and contact lens cleaning solutions (pH 4.50). The Pt-C/CPE was also tested for monitoring of the H_2O_2 residual concentration in contact lens solution during its neutralization/decomposition process. The obtained amperometric results are in good agreement with those measured by traditional titanium sulfate reagent based spectrophotometric method with determined concentrations as 2.91% and 2.94% for the disinfection product, and 3.04% and 3.17% for the contact lens solution, respectively. RSD was lower than 2%. The obtained results are in a good agreement with the amounts of the H_2O_2 declared by producers (3%) in the both investigated samples. The decomposition of the H_2O_2 in the contact lens solution was successfully determined by both methods till the contact time interval between 4 h and 6 h of the H_2O_2 solution and solid catalyst, when a significant change on the analytical absorption band was observed preventing the application of the spectrophotometric method. The amperometric method was applicable in this time interval with a bit higher RSD; at 6 h of neutralization treatment $24.68 \mu\text{g mL}^{-1}$ of the H_2O_2 was determined which is almost half of the allowed H_2O_2 concentration in the case of the contact lens solution concerning the limit of eye irritation (between 50 and $60 \mu\text{g mL}^{-1}$).
4. Traditional CPE (based on paraffin oil and graphite powder) was surface modified with multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) and with composites of MnO_2 -MWCNT or Pt-MWCNT by drop coating method to prepare simply, sensitive and reliable voltammetric

sensors for the determination of H_2O_2 in selected sample. The results of the SEM/EDS analysis of composite materials have confirmed that the mediators, MnO_2 and Pt particles, are randomly distributed on the surface of MWCNT and represent nearly 5% (m:m) of the composite expressed as Mn and Pt. CV measurements were performed with prepared electrodes in acetate (pH 4.50), phosphate (pH 7.50) and borate (pH 9.18) buffers to characterize the basic electrochemical behavior of H_2O_2 and to select the working potentials suitable for amperometric determination of this target analyte. The CV responses showed that in slightly alkaline media all investigated electrodes (unmodified CPE, MWCNT/CPE, MnO_2 -MWCNT/CPE and Pt-MWCNT/CPE) are acceptable for H_2O_2 determination, but with different efficiency at different potentials. MWCNT/CPE shows a significant improvement of the H_2O_2 reduction signal in comparison to the bare CPE, especially at potentials lower than -0.60 V vs. SCE. In the case of Pt-MWCNT/CPE this effect is much more pronounced at -0.05 V and at below, but the electrode shows remarkable oxidation signals upwards 0.10 V as well. The Pt-MWCNT/CPE performs well in acetate buffer solution pH 4.50 in the negative as well as in the positive polarization range. In the case of MnO_2 -MWCNT/CPE at 0.30 V and above the H_2O_2 oxidation signal is remarkable. At pH 4.50 the MnO_2 -MWCNT/CPE shows poor behavior because of very low H_2O_2 signal intensities in the potential range from -0.50 V to 0.60 V, but in the case of pH 9.18 this electrode offered acceptable performance. Concerning the signal reproducibility, the Pt-MWCNT/CPE showed RSD mainly lower than 2.5%, while in the case of MnO_2 -MWCNT/CPE additional electrochemical pretreatment (conditioning) is recommended before amperometric measurements to improve the reproducibility. The LOQs of the analytical methods are in the $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration range. H_2O_2 was determined in a spiked milk sample by standard addition method after appropriate sample preparation (pH adjustment and centrifugation) and using optimized amperometric procedure (acetate buffer pH 4.50, working potential -0.75 V) by Pt-MWCNT/CPE as a working electrode. RSD for three repeated measurements was 2.5%, while the recovery of the method was a bit higher than 71%.

5. Composite materials consisting of MWCNT and Pd (Pd-MWCNT) or Pt containing particles (Pt-MWCNT) were applied to the preparation of bulk-modified SPCEs (Pd-MWCNT-SPCE

and Pt-MWCNT-SPCE) and surface modified SPCE (Pd-MWCNT/SPCE). These electrodes, as well as unmodified SPCE and MWCNT-SPCE, were characterized by CV and amperometry in phosphate buffer solution of pH 7.50 for the H_2O_2 determination. The composite Pd-MWCNT in both investigated forms either as surface or bulk modifier is convenient for the determination of H_2O_2 at working potentials from -0.50 to 0.50 V. Pt-MWCNT-SPCE has also been shown to be suitable for determination of H_2O_2 in the investigated range of working potentials from -0.80 to 0.70 V. Pd-MWCNT-SPCE, Pd-MWCNT/SPCE and Pt-MWCNT-SPCE were then modified with glucose oxidase (GOx) by drop coating a solution of GOx and Nafion[®] on their surface. Glucose can be determined by prepared biosensors via enzymatically formed H_2O_2 . GOx/Pd-MWCNT-SPCE showed higher reproducibility and better analytical performance for glucose determination at working potentials between -0.20 and -0.50 V in comparison with GOx/Pd-MWCNT/SPCE. The optimal working potential for GOx/Pd-MWCNT-SPCE was -0.40 V vs. SCE and satisfactory linearity was obtained in the investigated glucose concentration range from 0.16 to 0.97 mmol L⁻¹ (from 29.1 to 174 $\mu\text{g mL}^{-1}$), while the LOQ was 0.14 mmol L⁻¹ (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The optimized method based on GOx/Pd-MWCNT-SPCE was successfully applied to the determination of glucose in multifloral honey sample. The results are in a good agreement with those obtained by commercially available equipment for determination of glucose. Optimal working potential for GOx/Pt-MWCNT-SPCE was -0.50 V vs. SCE, and the satisfactory linearity was obtained in the investigated concentration range of glucose from 65.8 to 260.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with LOQ of 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The optimized method based on GOx/Pt-MWCNT-SPCE was successfully applied for determination of glucose in white grape and glucose tablets (Traubenzucker-bonbons) samples, whereby the results were in a good agreement with the results obtained by Accu-Chek device.

The developed amperometric methods in this doctoral dissertation are simple, reliable and suitable for obtaining fast information about the content of H_2O_2 in different types of samples. Certainly the selection of a suitable working electrode, as well as the optimization of experimental conditions are key factors for the successful determination of H_2O_2 . Electrodes such as 5%- MnO_2 -CPE or MnO_2 -SPCE can be used for obtaining information concerning the H_2O_2 consumption in the Fenton, Fenton-like and photo-Fenton systems and it can be supposed that there is a possibility of

using them to measure H_2O_2 *in situ* or even on mobile pilot platforms. Quality control of different commercially available personal care products can be carried out with methods based on Pt-C/CPE and it is supposed that such analysis could be performed in the decentralized laboratories and in field working conditions as well. On the other hand, obtained results showed that Pt-MWCNT/CPE can be used for H_2O_2 determination in milk sample after appropriate preparation of the sample, while Pd-MWCNT-SPCE and Pt-MWCNT-SPCE after their additional modification with enzyme GOx can serve for determination of glucose in different samples such as honey, grapes or glucose tablets. It can be concluded that developed methods are based on highly sensitive electrodes which are environmentally and economically acceptable.

7. LITERATURA

1. G.P. Bienert, J.K. Schjoerring, T.P. Jahn, Membrane transport of hydrogen peroxide, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 994–1003.
2. C.W. Jones, Applications of hydrogen peroxide and derivatives, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999, p. 14, 32, 33, 79.
3. S.J. Munn, R. Allanou, K. Aschberger, F. Berthault, J. de Bruijn, C. Musset, S. O'Connor, S. Pakalin, A. Paya-Perez, G. Pellegrini, S. Scheer, S. Vegro, European Union risk assessment report hydrogen peroxide, European Communities, Ispra, 2003, p. 8, 14, 83.
4. T.M. Nagiev, Coherent synchronized oxidation reactions by hydrogen peroxide, Elsevier, Amsterdam, 2007, p. 91, 92.
5. C.C. Winterbourn, The biological chemistry of hydrogen peroxide, in: *Methods in enzymology* (eds. E. Cadenas, L. Packer), Academic Press, Burlington, 2013, pp. 3–25.
6. A.J. Guwy, F.R. Hawkes, S.R. Martin, D.L. Hawkes, P. Cunnah, A technique for monitoring hydrogen peroxide concentration off-line and on-line, *Water Res.* 34 (2000) 2191–2198.
7. J.O'M. Bockris, L.F. Oldfield, The oxidation-reduction reactions of hydrogen peroxide at inert metal electrodes and mercury cathodes, *Trans. Faraday Soc.* 51 (1955) 249–259.
8. T. Oppenländer, Photochemical purification of water and air: Advanced Oxidation Processes (AOPs) - principles, reaction mechanisms, reactor concepts, Wiley-VCH, Weinheim, 2003, p. 156.
9. B.E. Watt, A.T. Proudfoot, J.A. Vale, Hydrogen peroxide poisoning, *Toxicol. Rev.* 23 (2004) 51–57.
10. E.A. Veal, AM. Day, B.A. Morgan, Hydrogen peroxide sensing and signaling, *Mol. Cell* 26 (2007) 1–14.
11. D.R. Gough, T.G. Cotter, Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule, *Cell Death Dis.* 2 (2011) 1–8.
12. B. Halliwell, M.V. Clement, L.H. Long, Hydrogen peroxide in the human body, *FEBS Lett.* 486 (2000) 10–13.
13. W. Chen, S. Cai, Q.-Q. Ren, W. Wen, Y.-D. Zhao, Recent advances in electrochemical sensing for hydrogen peroxide: a review, *Analyst* 137 (2012) 49–58.

14. S.H. Zeronian, M.K. Inglesby, Bleaching of cellulose by hydrogen peroxide, *Cellulose* 2 (1995) 265-272.
15. E. Linley, S.P. Denyer, G. McDonnell, C. Simons, J.-Y. Maillard, Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action, *J. Antimicrob. Chemother.* 67 (2012) 1589–1596.
16. R. Hughes, S. Kilvington, Comparison of hydrogen peroxide contact lens disinfection systems and solutions against *Acanthamoeba polyphaga*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 2038–2043.
17. T.A. Vetter, D.P. Colombo, Kinetics of platinum-catalyzed decomposition of hydrogen peroxide, *J. Chem. Educ.* 80 (2003) 788–789.
18. L.J. Walsh, Safety issues relating to the use of hydrogen peroxide in dentistry, *Aust. Dent. J.* 45 (2000) 257–269.
19. C.-P. Lu, C.-T. Lin, C.-M. Chang, S.-H. Wu, L.-C. Lo, Nitrophenylboronic acids as highly chemoselective probes to detect hydrogen peroxide in foods and agricultural products, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 11403–11406.
20. J. Ping, X. Mao, K. Fan, D. Li, S. Ru, J. Wu, Y. Ying, A Prussian blue-based amperometric sensor for the determination of hydrogen peroxide residues in milk, *Ionics* 16 (2010) 523–527.
21. M.A. Valdés García, P. Tuñón Blanco, A. Ivaska, A poly(o-aminophenol) modified electrode as an amperometric hydrogen peroxide biosensor, *Electrochim. Acta* 43 (1998) 3533–3539.
22. C.-L. Hsu, K.-S. Chang, J.-C. Kuo, Determination of hydrogen peroxide residues in aseptically packaged beverages using an amperometric sensor based on a palladium electrode, *Food Control* 19 (2008) 223–230.
23. J.M. Campos-Martin, G. Blanco-Brieva, J.L.G. Fierro, Hydrogen peroxide synthesis: an outlook beyond the anthraquinone process, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 6962–6984.
24. C. Ciotti, R. Baciocchi, T. Tuhkanen, Influence of the operating conditions on highly oxidative radicals generation in Fenton's systems, *J. Hazard. Mater.* 161 (2009) 402–408.
25. D. Hermosilla, M. Cortijo, C.P. Huang, Optimizing the treatment of landfill leachate by conventional Fenton and photo-Fenton processes, *Sci. Total. Environ.* 407 (2009) 3473–3481.
26. D. Hermosilla, M. Cortijo, C.P. Huang, The role of iron on the degradation and mineralization of organic compounds using conventional Fenton and photo-Fenton processes, *Chem. Eng. J.* 155 (2009) 637–646.

27. C. Jiang, Z. Gao, H. Qu, J. Li, X. Wang, P. Li, H. Liu, A new insight into Fenton and Fenton-like processes for water treatment: Part II. Influence of organic compounds on Fe(III)/Fe(II) interconversion and the course of reactions, *J. Hazard. Mater.* 250–251 (2013) 76–81.
28. J.J. Molnar, J.R. Agbaba, B.D. Dalmacija, S.D. Rončević, S.P. Maletić, M.M. Kragulj, A study on the removal of natural organic matter and disinfection byproducts formation potential from groundwater using Fenton's process, *J. Adv. Oxid. Technol.* 14 (2011) 54–62.
29. J. Molnar, J. Agbaba, M. Watson, A. Tubić, M. Kragulj, S. Maletić, B. Dalmacija, Groundwater treatment using the Fenton process: changes in natural organic matter characteristics and arsenic removal, *Int. J. Environ. Res.* 9 (2015) 467–474.
30. V. Guzsvány, N. Banić, Zs. Papp, F. Gaál, B. Abramović, Comparison of different iron-based catalysts for photocatalytic removal of imidacloprid, *Reac. Kinet. Mech. Cat.* 99 (2010) 225–233.
31. E. Neyens, J. Baeyens, A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique, *J. Hazard Mater.* B98 (2003) 33–50.
32. I. Gulkaya, G.A. Surucu, F.B. Dilek, Importance of $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ ratio in Fenton's treatment of a carpet dyeing wastewater, *J. Hazard. Mater.* B136 (2006) 763–769.
33. R. Maciel, G.L. Sant'Anna Jr., M. Dezotti, Phenol removal from high salinity effluents using Fenton's reagent and photo-Fenton reactions, *Chemosphere* 57 (2004) 711–719.
34. A. Bach, H. Shemer, R. Semiat, Kinetics of phenol mineralization by Fenton-like oxidation, *Desalination* 264 (2010) 188–192.
35. G. Ruppert, R. Bauer, G. Heisler, The photo-Fenton reaction-an effective photochemical wastewater treatment process, *J. Photochem. Photobiol. A* 73 (1993) 75–78.
36. M. Pérez, F. Torrades, J.A. García-Hortal, X. Domènech, J. Peral, Removal of organic contaminants in paper pulp treatment effluents under Fenton and photo-Fenton conditions, *Appl. Catal. B: Environ.* 36 (2002) 63–74.
37. F. Torrades, M. Pérez, H.D. Mansilla, J. Peral, Experimental design of Fenton and photo-Fenton reactions for the treatment of cellulose bleaching effluents, *Chemosphere* 53 (2003) 1211–1220.
38. A. Bernabeu, S. Palacios, R. Vicente, R.F. Vercher, S. Malato, A. Arques, A.M. Amat, Solar photo-Fenton at mild conditions to treat a mixture of six emerging pollutants, *Chem. Eng. J.* 198–199 (2012) 65–72.

39. E.E. Mitsika, C. Christophoridis, K. Fytianos, Fenton and Fenton-like oxidation of pesticide acetamiprid in water samples: Kinetic study of the degradation and optimization using response surface methodology, *Chemosphere* 93 (2013) 1818–1825.
40. W. Gernjak, M. Fuerhacker, P. Fernández-Ibañez, J. Blanco, S. Malato, Solar photo-Fenton treatment-Process parameters and process control, *Appl. Catal. B: Environ.* 64 (2006) 121–130.
41. A. Zapata, T. Velegraki, J.A. Sánchez-Pérez, D. Mantzavinos, M.I. Maldonado, S. Malato, Solar photo-Fenton treatment of pesticides in water: Effect of iron concentration on degradation and assessment of ecotoxicity and biodegradability, *Appl. Catal. B: Environ.* 88 (2009) 448–454.
42. M.S. Lucas, J.A. Peres, Decolorization of the azo dye reactive black 5 by Fenton and photo-Fenton oxidation, *Dyes Pigm.* 71 (2006) 236–244.
43. J. García-Montaña, F. Torrades, J.A. García-Hortal, X. Domènech, J. Peral, Combining photo-Fenton process with aerobic sequencing batch reactor for commercial hetero-bireactive dye removal, *Appl. Catal. B: Environ.* 67 (2006) 86–92.
44. L. Santos-Juanes, J.L. García Sánchez, J.L. Casas López, I. Oller, S. Malato, J.A. Sánchez Pérez, Dissolved oxygen concentration: A key parameter in monitoring the photo-Fenton process, *Appl. Catal. B: Environ.* 104 (2011) 316–323.
45. C.E. Huckaba, F.G. Keyes, The accuracy of estimation of hydrogen peroxide by potassium permanganate titration, *J. Am. Chem. Soc.* 70 (1948) 1640–1644.
46. N.V. Klassen, D. Marchington, H.C.E. McGowan, H_2O_2 determination by the I_3^- method and by KMnO_4 titration, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2921–2925.
47. G. Eisenberg, Colorimetric determination of hydrogen peroxide, *Ind. Eng. Chem.* 15 (1943) 327–328.
48. C.N. Satterfield, A.H. Bonnell, Interferences in titanium sulfate method for hydrogen peroxide, *Anal. Chem.* 27 (1955) 1174–1175.
49. P.A. Clapp, D.F. Evans, T.S.S. Sheriff, Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide after extraction with ethyl acetate, *Anal. Chim. Acta* 218 (1989) 331–334.
50. R.M. Sellers, Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using potassium titanium(IV) oxalate, *Analyst* 105 (1980) 950–954.

51. R.F. Nogueira, M.C. Oliveira, W.C. Paterlini, Simple and fast spectrophotometric determination of H₂O₂ in photo-Fenton reactions using metavanadate, *Talanta* 66 (2005) 86–91.
52. D. Harms, R. Than, U. Pinkernell, M. Schmidt, B. Krebs, U. Karst, Selective determination of hydrogen peroxide in household products using its molecular recognition by a dinuclear iron(III) complex, *Analyst* 123 (1998) 2323–2327.
53. J. Yuan, A.M. Shiller, Determination of subnanomolar levels of hydrogen peroxide in seawater by reagent-injection chemiluminescence detection, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1975–1980.
54. A. Tahirović, A. Čopra, E. Omanović-Miklićanin, K. Kalcher, A chemiluminescence sensor for the determination of hydrogen peroxide, *Talanta* 72 (2007) 1378–1385.
55. A.L. Lazrus, G.L. Kok, S.N. Gitlin, J.A. Lind, S.E. McLaren, Automated fluorimetric method for hydrogen peroxide in atmospheric precipitation, *Anal. Chem.* 57 (1985) 917–922.
56. T. Taniai, A. Sakuragawa, T. Okutani, Fluorometric determination of hydrogen peroxide in natural water samples by flow injection analysis with a reaction column of peroxidase immobilized onto chitosan beads, *Anal. Sci.* 15 (1999) 1077–1082.
57. U. Pinkernell, S. Effkemann, U. Karst, Simultaneous HPLC determination of peroxyacetic acid and hydrogen peroxide, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3623–3627.
58. K. Schachl, H. Alemu, K. Kalcher, J. Ježkova, I. Švancara, K. Vytřas, Amperometric determination of hydrogen peroxide with a manganese dioxide-modified carbon paste electrode using flow injection analysis, *Analyst* 122 (1997) 985–989.
59. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Fundamentals of analytical chemistry*, Brooks/Cole-Thomson Learning, Belmont, 2004, pp. 665–706., 710.
60. S.P. Kounaves, Voltammetric techniques, in: *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry* (ed. F. Settle), Prentice Hall PTR, 1997, pp. 709–725.
61. J. Wang, *Analytical electrochemistry*, Wiley-VCH, New York, 2000, p. 2, 28, 68, 69, 100–102, 117, 121, 171, 172, 196.
62. M.P. Olson, W.R. LaCourse, Voltammetry, in: *Analytical instrumentation handbook* (ed. J. Cazes), CRC Press, Boca Raton, 2004, pp. 529–544.

63. K.B. Oldham, C.G. Zoski, Mass transport to electrodes, in: *Electrode kinetics: principles and methodology* (eds. C.H. Bamford, R.G. Compton), Elsevier science publisher B.V., Amsterdam, 1986, pp. 79–143.
64. C.M.A. Brett, *Electrochemical sensors for environmental monitoring. Strategy and examples*, *Pure Appl. Chem.* 73 (2001) 1969–1977.
65. P.T. Kissinger, W.R. Heineman, *Cyclic voltammetry*, *J. Chem. Educ.* 60 (1983) 702–706.
66. A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods, fundamentals and applications*, John Wiley & Sons, INC, New York, 2001, p. 227, 239.
67. G.A. Mabbail, *An Introduction to cyclic voltammetry*, *J. Chem. Educ.* 60 (1983) 697–702.
68. Z. Stojek, *Pulse voltammetry*, in: *Electroanalytical methods: guide to experiments and applications* (ed. F. Scholz), Springer, Berlin, 2002, pp. 99–110.
69. C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electrochemistry, principles, methods, and applications*, Oxford University Press, New York, 1993, p. 217, 218.
70. K.-H. Lubert, K. Kalcher, *History of electroanalytical methods*, *Electroanalysis* 22 (2010) 1937–1946.
71. P.T. Kissinger, *Electrochemical detectors*, in: *Liquid chromatography detectors* (ed. T.M. Vickrey), Marcel Dekker, Inc., New York, 1983, pp. 125–164.
72. A. Hulanicki, S. Głab, F. Ingman, *Chemical sensors: definitions and classification*, *Pure Appl. Chem.* 63 (1991) 1247–1250.
73. L.C. Clark, *Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions*, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern Organs* 2 (1956) 41–48.
74. N. R. Stradiotto, H. Yamanaka, M.V.B. Zanoni, *Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry*, *J. Braz. Chem. Soc.* 14 (2003) 159–173.
75. A.C. Power, A. Morrin, *Electroanalytical sensor technology*, in: *Electrochemistry* (ed. M.A.A. Khalid), InTech, Rijeka, 2013, pp. 141–178.
76. V. Vyskočil, J. Barek, *Mercury electrodes – possibilities and limitations in environmental electroanalysis*, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39 (2009) 173–188.
77. V. Guzsvány, M. Kadar, F. Gaál, L. Bjelica, K. Toth, *Bismuth film electrode for the cathodic electrochemical determination of thiamethoxam*, *Electroanalysis* 18 (2006) 1363–1371.
78. I. Švancara, C. Prior, S.B. Hočevar, J. Wang, *A decade with bismuth-based electrodes in electroanalysis*, *Electroanalysis* 22 (2010) 1405–1420.

79. S.B. Hočevar, I. Švancara, B. Ogorevc, K. Vytřas, Antimony film electrode for electrochemical stripping analysis, *Anal. Chem.* 79 (2007) 8639–8643.
80. V. Guzsvány, H. Nakajima, N. Soh, K. Nakano, I. Švancara, K. Vytřas, L. Bjelica, T. Imato, Anodic stripping voltammetry combined with sequential injection analysis for measurements of trace metal ions with bismuth- and antimony film electrodes under comparable conditions, *Electroanalysis* 23 (2011) 1593–1601.
81. B. Báš, Z. Kowalski, Preparation of silver surface for mercury film electrode of prolonged analytical application, *Electroanalysis* 14 (2002) 1067–1071.
82. R.L. McCreery, Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2646–2687.
83. R.N. Adams, *Anal. Chem.* 30 (1958) 1576–1576.
84. I. Švancara, K. Vytřas, K. Kalcher, A. Walcarius, J. Wang, Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: a review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis, *Electroanalysis* 21 (2009) 7–28.
85. I. Švancara, K. Kalcher, A. Walcarius, K. Vytras, *Electroanalysis with carbon paste electrodes*, CRC Press, Boca Raton, 2012, p. 1, 11-13, 16-21, 23.
86. H. Tatsumi, M. Shiba, Polarography with a dropping carbon electrode, *Electrochem. Commun.* 20 (2012) 160–162.
87. H. Tatsumi, S. Tanaka, Development of dropping carbon fluid electrodes for polarography, *Electrochim. Acta* 135 (2014) 255–259.
88. K. Kalcher, I. Svancara, M. Buzuk, K. Vytras, A. Walcarius, Electrochemical sensors and biosensors based on heterogeneous carbon materials, *Monatsh. Chem.* 140 (2009) 861–889.
89. I. Švancara, K. Schachl, Testing of unmodified carbon paste electrodes, *Chem. Listy* 93 (1999) 490–499.
90. I. Švancara, T. Mikysek, M. Stočes, J. Ludvík, Graphite powder and related material as the principal components of carbon paste electrodes, in: *Graphite: Properties, Occurrences and Uses* (ed. Q.C. Campbell), Nova Science Publishers, Inc., New York, 2013, pp. 163–188.
91. I. Švancara, K. Kalcher, Carbon paste electrodes, in: *Electrochemistry of carbon electrodes* (eds. R.C. Alkire, P.N. Bartlett, J. Lipkowski), Wiley-VCH, Weinheim, 2015, pp. 379–424.

92. S. Nantaphol, R.B. Channon, T. Kondo, W. Siangproh, O. Chailapakul, C.S. Henry, Boron doped diamond paste electrodes for microfluidic paper-based analytical devices, *Anal. Chem.* 89 (2017) 4100–4107.
93. K. Vytřas, I. Švancara, R. Metelka, Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry, *J. Serb. Chem. Soc.* 74 (2009) 1021–1033.
94. J. Wang, B. Tian, V.B. Nascimento, L. Angnes, Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks, *Electrochim. Acta* 43 (1998) 3459–3465.
95. J.P. Metters, R.O. Kadara, C.E. Banks, New directions in screen printed electroanalytical sensors: an overview of recent developments, *Analyst* 136 (2011) 1067–1076.
96. E. Jubete, O.A. Loaiza, E. Ochoteco, J.A. Pomposo, H. Grande, J. Rodríguez, Nanotechnology: A tool for improved performance on electrochemical screen-printed (bio)sensors, *Journal of Sensors* 2009 (2009) 1–13.
97. S. Patris, J.-M. Kauffmann, Screen-printed electrodes (SPE) for drug compounds determination, in: *Electroanalysis in biomedical and pharmaceutical sciences: Voltammetry, amperometry, biosensors, applications* (eds. S.A. Ozkan, J.-M. Kauffmann, P. Zuman), Springer-Verlag, Berlin, 2015, 119–140.
98. P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, P. José Lamas-Ardisana, A. Martín-Pernía, A. Costa-García, Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes, *Electrochim. Acta* 53 (2008) 3635–3642.
99. A. Hayat, J.L. Marty, Disposable screen printed electrochemical sensors: tools for environmental monitoring, *Sensors* 14 (2014) 10432–10453.
100. S. Fletcher, Screen-printed carbon electrodes, in: *Electrochemistry of carbon electrodes* (eds. R.C. Alkire, P.N. Bartlett, J. Lipkowski), Wiley-VCH, Weinheim, 2015, pp. 425–444.
101. O. Domínguez Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos Martínez, Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications, *Talanta* 73 (2007) 202–219.
102. J. Dědík, M. Janovcová, H. Dejmková, J. Barek, K. Pecková, Utilization of unmodified screen-printed carbon electrodes in electroanalysis of organic compounds (an overview), in: *Sensing in electroanalysis* (eds. K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas), University Press Centre, Pardubice, 2011, pp. 129–138.

103. M. Li, Y.-T. Li, D.-W. Li, Y.-T. Long, Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays—A review, *Anal. Chim. Acta* 734 (2012) 31–44.
104. Y.-L. Yang, M.-C. Chuang, S.-L. Lou, J. Wang, Thick-film textile-based amperometric sensors and biosensors, *Analyst* 135 (2010) 1230–1234.
105. M.P. O'Halloran, M. Pravda, G.G. Guilbault, Prussian Blue bulk modified screen-printed electrodes for H₂O₂ detection and for biosensors, *Talanta* 55 (2001) 605–611.
106. A.P. Washe, P. Lozano-Sánchez, D. Bejarano-Nosas, I. Katakis, Facile and versatile approaches to enhancing electrochemical performance of screen printed electrodes, *Electrochim. Acta* 91 (2013) 166–172.
107. N.W. Beyene, P. Kotzian, K. Schachl, H. Alemu, E. Turkušić, A. Chopra, H. Moderegger, I. Švancara, K. Vytřas, K. Kalcher, (Bio)Sensors based on manganese dioxide-modified carbon substrates: retrospections, further improvements and applications, *Talanta* 64 (2004) 1151–1159.
108. I. Švancara, M. Pravda, M. Hvizdalova, K. Vytřas, K. Kalcher, Voltammetric investigations on carbon paste electrodes as supports for mercury films, *Electroanalysis* 6 (1994) 663–671.
109. A. Krolicka, R. Pauliukaite, I. Švancara, R. Metelka, A. Bobrowski, E. Norkus, K. Kalcher, K. Vytřas, Bismuth-film-plated carbon paste electrodes, *Electrochem. Commun.* 4 (2002) 193–196.
110. E. Tesarova, L. Baldrianova, S.B. Hocevar, I. Svancara, K. Vytras, B. Ogorevc, Anodic stripping voltammetric measurement of trace heavy metals at antimony film carbon paste electrode, *Electrochim. Acta* 54 (2009) 1506–1510.
111. I. Švancara, M. Matoušek, E. Sikora, K. Schachl, K. Kalcher, K. Vytřas, Carbon paste electrodes plated with a gold film for the voltammetric determination of mercury(II), *Electroanalysis* 9 (1997) 827–833.
112. Z. Taha, J. Wang, Electrocatalysis and flow detection at a glassy carbon electrode modified with a thin film of oxymanganese species, *Electroanalysis* 3 (1991) 215–219.
113. E. Turkušić, K. Kalcher, K. Schachl, A. Komersová, M. Bartoš, H. Moderegger, I. Švancara, K. Vytřas, Amperometric determination of glucose with an MnO₂ and glucose oxidase bulk-modified screen-printed carbon ink biosensor, *Anal. Lett.* 34 (2001) 2633–2647.
114. E. Turkusic, J. Kalcher, E. Kahrovic, N.W. Beyene, H. Moderegger, E. Sofic, S. Begic, K. Kalcher, Amperometric determination of bonded glucose with an MnO₂ and glucose oxidase

- bulk-modified screen-printed electrode using flow-injection analysis, *Talanta* 65 (2005) 559–564.
115. K. Schachl, H. Alemu, K. Kalcher, H. Moderegger, I. Svancara, K. Vytras, Amperometric determination of hydrogen peroxide with a manganese dioxide film-modified screen printed carbon electrode, *Fresenius J. Anal. Chem.* 362 (1998) 194–200.
116. E. Turkusic, S. Begic, E. Kahrovic, K. Kalcher, Amperometric determination of hydrogen peroxide with FeO bulk-modified screen-printed carbon ink sensor, *Health Med.* 5 (2011) 949–955.
117. T.T. Waryo, S. Begić, E. Turkušić, K. Vyřas, K. Kalcher, Metal oxide-based carbon amperometric H₂O₂-transducers and oxidase biosensors, in: *Sensing in Electroanalysis* (eds. K. Vyřas, K. Kalcher), University of Pardubice, Pardubice, 2005, pp. 129–144.
118. T. Waryo, P. Kotzian, S. Begić, P. Bradizlova, N. Beyene, P. Baker, B. Kgarebe, E. Turkušić, E. Iwuoha, K. Vyřas, K. Kalcher, Amperometric hydrogen peroxide sensors with multivalent metal oxide-modified electrodes for biomedical analysis, *IFMBE Proc.* 23 (2009) 829–833.
119. P. Kotzian, P. Brázdilová, K. Kalcher, K. Vyřas, Determination of hydrogen peroxide, glucose and hypoxanthine using (bio)sensors based on ruthenium dioxide modified screen printed electrodes, *Anal. Lett.* 38 (2005) 1099–1113.
120. P. Kotzian, P. Brázdilová, S. Rezková, K. Kalcher, K. Vyřas, Amperometric glucose biosensor based on rhodium dioxide-modified carbon ink, *Electroanalysis* 18 (2006) 1499–1504.
121. P. Kotzian, P. Brázdilová, K. Kalcher, K. Handlř, K. Vyřas, Oxides of platinum metal group as potential catalysts in carbonaceous amperometric biosensors based on oxidases, *Sensor. Actuat. B Chem.* 124 (2007) 297–302.
122. A.A. Karyakin, Prussian Blue and its analogues: electrochemistry and analytical applications, *Electroanalysis* 13 (2001) 813–819.
123. R. Koncki, Chemical sensors and biosensors based on Prussian blues, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32 (2002) 79–96.
124. M.S. Lin, T.F. Tseng, W.C. Shih, Chromium(III) hexacyanoferrate(II)-based chemical sensor for the cathodic determination of hydrogen peroxide, *Analyst* 123 (1998) 159–163.

125. J. Lin, D.M. Zhou, S.B. Hocevar, E.T. McAdams, B. Ogorevc, X. Zhang, Nickel hexacyanoferrate modified screen-printed carbon electrode for sensitive detection of ascorbic acid and hydrogen peroxide, *Front. Biosci.* 10 (2005) 483–491.
126. P. Kotzian, T. Janku, K. Kalcher, K. Vytřas, Catalytic activity of iron hexacyanoosmate(II) towards hydrogen peroxide and nicotinamide adenine dinucleotide and its use in amperometric biosensors, *Anal. Chim. Acta* 599 (2007) 287–293.
127. I. Švancara, A. Walcarius, K. Kalcher, K. Vytřas, Carbon paste electrodes in the new millennium, *Cent. Eur. J. Chem.* 7 (2009) 598–656.
128. D.R. Theâvenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Pure Appl. Chem.* 71 (1999) 2333–2348.
129. M. Gerard, A. Chaubey, B.D. Malhotra, Application of conducting polymers to biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 345–359.
130. A. Koyun, E. Ahlatcıođlu, Y. Koca İpek, Biosensors and their principles, in: *A roadmap of biomedical engineers and milestones* (ed. S. Kara), InTech, Rijeka, 2012, pp. 115–142.
131. A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 489–511.
132. R. Monořík, M. Stred'anský, E. Šturdík, Biosensors – classification, characterization and new trends, *Acta Chim. Slov.* 5 (2012) 109–120.
133. E. V. Korotkaya, Biosensors: design, classification, and applications in the food industry, *F&R Materials* 2 (2014) 161–171.
134. R. Vargas-Bernal, E. Rodríguez-Miranda, G. Herrera-Pérez, Evolution and expectations of enzymatic biosensors for pesticides, in: *Pesticides - Advances in chemical and botanical pesticides* (ed. R.P. Soundararajan), InTech, Rijeka, 2012, pp. 329–356.
135. D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, E. Reimhult, Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures, *Sensors* 8 (2008) 1400–1458.
136. J. Wang, Electrochemical glucose biosensors, *Chem. Rev.* 108 (2008) 814–825.
137. F. Arslan, S. Ustabař, H. Arslan, An amperometric biosensor for glucose determination prepared from glucose oxidase immobilized in polyaniline-polyvinylsulfonate film, *Sensors* 11 (2011) 8152–8163.
138. E.-H. Yoo, S.-Y. Lee, Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice, *Sensors* 10 (2010) 4558–4576.

139. L.C. Clark, C. Lyons, Electrode systems for monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. N Y Acad. Sci.* 102 (1962) 29–45.
140. S.B. Hocevar, B. Ogorevc, K. Schachl, K. Kalcher, Glucose microbiosensor based on MnO₂ and glucose oxidase modified carbon fiber microelectrode, *Electroanalysis* 16 (2004) 1711–1716.
141. J. Wang, Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges, *Electroanalysis* 13 (2001) 983–988.
142. K.E. Toghill, R.G. Compton, Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: a perspective and an evaluation, *Int. J. Electrochem. Sci.* 5 (2010) 1246–1301.
143. C. Chen, Q. Xie, D. Yang, H. Xiao, Y. Fu, Y. Tan, S. Yao, Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review, *RSC Adv.* 3 (2013) 4473–4491.
144. S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature* 354 (1991) 56–58.
145. M.H. Rummeli, P. Ayala, T. Pichler, Carbon nanotubes and related structures: Production and formation, in: *Carbon nanotubes and related structures: synthesis, characterization, functionalization and applications* (eds. D.M. Guldi, N. Martín), Wiley-VCH, Weinheim, 2010, pp. 1–21.
146. S. Iijima, T. Ichihashi, Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter, *Nature* 363 (1993) 603–605.
147. D.S. Bethune, C.H. Klang, M.S. de Vries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vazquez, R. Beyers, Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls, *Nature* 363 (1993) 605–607.
148. M.S. Dresselhaus, Ph. Avouris, Introduction to carbon materials research, in: *Carbon nanotubes* (eds. M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, Ph. Avouris), Springer, Berlin, 2001, pp. 1–10.
149. F. Hennrich, C. Chan, V. Moore, M. Rolandi, M. O’Connell, The element carbon, in: *Carbon nanotubes: properties and applications* (ed. M.J. O’Connell), CRC Press, Boca Raton, 2006, pp.1–18.
150. B.K. Kaushik, M.K. Majumder, Carbon nanotube: properties and applications, in: *Carbon nanotube based VLSI interconnects-analysis and design* (eds. B.K. Kaushik, M.K. Majumder), Springer India, New Delhi, 2015, pp. 17–37.

151. <http://www.nanoscience.com/applications/education/overview/cnt-technology-overview/>
(28.08.2017)
152. A. Eatemadi, H. Daraee, H. Karimkhanloo, M. Kouhi, N. Zarghami, A. Akbarzadeh, M. Abasi, Y. Hanifehpour, S.W. Joo, Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications, *Nanoscale Res. Lett.* 9 (2014) 393–406.
153. A. Galano, Carbon nanotubes: promising agents against free radicals, *Nanoscale* 2 (2010) 373–380.
154. A. Merkoçi, M. Pumera, X. Llopis, B. Pérez, M. del Valle, S. Alegret, New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 826–838.
155. P.-X. Hou, C. Liu, H.-M. Cheng, Purification of carbon nanotubes, *Carbon* 46 (2008) 2003–2025.
156. J.J. Gooding, Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing, *Electrochim. Acta* 50 (2005) 3049–3060.
157. M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, J.C. Charlier, E. Hernández, Electronic, thermal and mechanical properties of carbon nanotubes, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 362 (2004) 2065–2098.
158. X. Ren, C. Chen, M. Nagatsu, X. Wang, Carbon nanotubes as adsorbents in environmental pollution management: a review, *Chem. Eng. J.* 170 (2011) 395–410.
159. P.M. Ajayan, O.Z. Zhou, Applications of carbon nanotubes, in: *Carbon nanotubes* (eds. M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, Ph. Avouris), Springer, Berlin, 2001: pp. 401–436.
160. M.F.L. De Volder, S.H. Tawfick, R.H. Baughman, A.J. Hart, Carbon nanotubes: present and future commercial applications, *Science* 339 (2013) 535–539.
161. Q. Zhao, Z. Gan, Q. Zhuang, Electrochemical sensors based on carbon nanotubes, *Electroanalysis* 14 (2002) 1609–1613.
162. J. Wang, Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: a review, *Electroanalysis* 17 (2005) 7–14.
163. B. Xu, M.-L. Ye, Y.-X. Yu, W.-D. Zhang, A highly sensitive hydrogen peroxide amperometric sensor based on MnO₂-modified vertically aligned multiwalled carbon nanotubes, *Anal. Chim. Acta* 674 (2010) 20–26.
164. G.G. Wildgoose, C.E. Banks, R.G. Compton, Metal nanoparticles and related materials supported on carbon nanotubes: methods and applications, *Small* 2 (2006) 182–193.

165. K.N. Han, C.A. Li, M.-P. Ngoc Bui, X.-H. Pham, B.S. Kim, Y.H. Choa, G.H. Seong, Development of Pt/TiO₂ nanohybrids-modified SWCNT electrode for sensitive hydrogen peroxide detection, *Sens. Actuat. B* 174 (2012) 406–413.
166. Z. Miao, D. Zhang, Q. Chen, Non-enzymatic hydrogen peroxide sensors based on multi-wall carbon nanotube/Pt nanoparticle nanohybrids, *Materials* 7 (2014) 2945–2955.
167. Q.-C. Shi, W.-F. Zeng, Y.-N. Zhu, Electrochemical detection of hydrogen peroxide at a waxed graphite electrode modified with platinum-decorated carbon nanotubes, *J. Shanghai. Univ. (Engl. Ed.)* 13 (2009) 63–66.
168. Y. Fang, D. Zhang, X. Qin, Z. Miao, S. Takahashi, J.-I. Anzai, Q. Chen, A non-enzymatic hydrogen peroxide sensor based on poly(vinyl alcohol)–multiwalled carbon nanotubes–platinum nanoparticles hybrids modified glassy carbon electrode, *Electrochim. Acta* 70 (2012) 266–271.
169. B. Xue, P. Chen, Q. Hong, J. Lin, K.L. Tan, Growth of Pd, Pt, Ag and Au nanoparticles on carbon nanotubes, *J. Mater. Chem.* 11 (2001) 2378–2381.
170. D. Ye, H. Li, G. Liang, J. Luo, X. Zhang, S. Zhang, H. Chen, J. Kong, A three-dimensional hybrid of MnO₂/graphene/carbon nanotubes based sensor for determination of hydrogen-peroxide in milk, *Electrochim. Acta* 109 (2013) 195–200.
171. L.-C. Jiang, W.-D. Zhang, Electrodeposition of TiO₂ nanoparticles on multiwalled carbon nanotube arrays for hydrogen peroxide sensing, *Electroanalysis* 21 (2009) 988–993.
172. J.M. Schnorr, T.M. Swager, Emerging applications of carbon nanotubes, *Chem. Mater.* 23 (2011) 646–657.
173. J. Khanderi, R.C. Hoffmann, A. Gurlo, J.J. Schneider, Synthesis and sensoric response of ZnO decorated carbon nanotubes, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 5039–5046.
174. P. Serp, M. Corrias, P. Kalck, Carbon nanotubes and nanofibers in catalysis, *Appl. Catal., A* 253 (2003) 337–358.
175. K. Schachl, H. Alemu, K. Kalcher, J. Ježkova, I. Švancara, K. Vytřas, Flow-injection determination of hydrogen peroxide using a carbon paste electrode modified with a manganese dioxide film, *Anal. Lett.* 30 (1997) 2655–2673.
176. K. Schachl, E. Turkušić, A. Komersová, M. Bartoš, H. Moderegger, I. Švancara, H. Alemu, K. Vytřas, M. Jimenez-Castro, K. Kalcher, Amperometric determination of glucose with a carbon paste biosensor, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 67 (2002) 302–313.

177. X. Zheng, Z. Guo, Potentiometric determination of hydrogen peroxide at MnO₂-doped carbon paste electrode, *Talanta* 50 (2000) 1157–1162.
178. C.E. Langley, B. Šljukić, C.E. Banks, R.G. Compton, Manganese dioxide graphite composite electrodes: application to the electroanalysis of hydrogen peroxide, ascorbic acid and nitrite, *Anal. Sci.* 23 (2007) 165–170.
179. L. Zhang, Z. Fang, Y. Ni, G. Zhao, Direct electrocatalytic oxidation of hydrogen peroxide based on nafion and microspheres MnO₂ modified glass carbon electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.* 4 (2009) 407–413.
180. Y. Han, J. Zheng, S. Dong, A novel nonenzymatic hydrogen peroxide sensor based on Ag–MnO₂–MWCNTs nanocomposites, *Electrochim. Acta* 90 (2013) 35–43.
181. B.-T. Tay, K.-P. Ang, H. Gunasingham, Platinum-dispersed nafion-modified glassy carbon electrode for the determination of hydrogen peroxide in a flow injection system, *Analyst* 113 (1988) 617–620.
182. J. Wang, N. Naser, L. Angnes, H. Wu, L. Chen, Metal-dispersed carbon paste electrodes, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1285–1288.
183. R. Karthik, N. Karikalán, S.-M. Chen, Rapid synthesis of ethyl cellulose supported platinum nanoparticles for the non-enzymatic determination of H₂O₂, *Carbohydr. Polym.* 164 (2017) 102–108.
184. J.-M. You, Y.N. Jeong, M.S. Ahmed, S.K. Kim, H.C. Choi, S. Jeon, Reductive determination of hydrogen peroxide with MWCNTs-Pd nanoparticles on a modified glassy carbon electrode, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 2287–2291.
185. Y. Liu, G. Sun, C. Jiang, X.T. Zheng, L. Zheng, C.M. Li, Highly sensitive detection of hydrogen peroxide at a carbon nanotube fiber microelectrode coated with palladium nanoparticles, *Microchim. Acta* 181 (2014) 63–70.
186. Y. Xu, K. Zhao, X.-Y. Zhang, P.-G. He, Y.-Z. Fang, Amperometric glucose biosensor based on palladium nanoparticles combined aligned carbon nanotubes electrode, *Chem. J. Chinese U.* 31 (2010) 672–678.
187. W. Zhou, R.P. Apkarian, Z.L. Wang, D. Joy, Fundamentals of scanning electron microscopy, in: *Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications* (eds. W. Zhou, Z.L. Wang), Springer Science & Business Media, New York, 2006, pp. 1–40.

188. J. Goldstein, D.E. Newbury, D.C. Joy, C. E. Lyman, P. Echlin, E. Lifshin, L. Sawyer, J.R. Michael, Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis, Springer Science & Business Media, New York, 2007, p. 1.
189. K.D. Vernon-Parry, Scanning electron microscopy: an introduction, *Analysis* 13 (2000) 40–44.
190. P.J. Goodhew, J. Humphreys, R. Beanland, Electron microscopy and analysis, Taylor & Francis, London, 2001, p. 122.
191. <https://www.britannica.com/technology/scanning-electron-microscope> (03.09.2017)
192. H.-W. Chang, Y.-C. Tsai, C.-W. Cheng, C.-Y. Lin, P.-H. Wu, Preparation of platinum/carbon nanotube in aqueous solution by femtosecond laser for non-enzymatic glucose determination, *Sens. Actuat. B* 183 (2013) 34–39.
193. Y. Zou, C. Xiang, L.-X. Sun, F. Xu, Glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto carbon nanotubes and immobilizing enzyme with chitosan-SiO₂ sol–gel, *Biosen. Bioelectron.* 23 (2008) 1010–1016.
194. J.J. Cardiel, Y. Zhao, L. Tonggu, L. Wang, J.-H. Chung, A.Q. Shen, Flow-induced immobilization of glucose oxidase in nonionic micellar nanogels for glucose sensing, *Lab. Chip* 14 (2014) 3912–3916.
195. K. Robards, P.E. Jackson, P.A. Haddad, Principles and practice of modern chromatographic methods, Elsevier, London, 2012, p. 8, 10, 228, 229.
196. T. Fornstedt, P. Forssén, D. Westerlund, Basic HPLC theory and definitions: retention, thermodynamics, selectivity, zone spreading, kinetics, and resolution, in: *Analytical separation science* (eds. J.L. Anderson, A. Berthod, V. Pino Estévez, A.M. Stalcup), Wiley-VCH, Weinheim, 2015, pp. 1–24.
197. V.R. Meyer, Practical high-performance liquid chromatography, Wiley, Weinheim, 2004, p. 20, 21.
198. M. Swartz, HPLC detectors: a brief review, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 33 (2010) 1130–1150.
199. R. Malviya, V. Bansal, O.P. Pal, P.K. Sharma, High performance liquid chromatography: a short review, *JGPT* 2 (2010) 22–26.

200. H. Obana, M. Okihashi, K. Akutsu, Y. Kitagawa, S. Hori, Determination of acetamiprid, imidacloprid, and nitenpyram residues in vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography with diode-array detection, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4464–4467.
201. V. Guzsány, A. Madžgalj, P. Trebše, F. Gaál, M. Franko, Determination of selected neonicotinoid insecticides by liquid chromatography with thermal lens spectrometric detection, *Environ. Chem. Lett.* 5 (2007) 203–208.
202. S. Lazić, D. Šunjka, N. Grahovac, V. Guzsány, F. Bagi, D. Budakov, Application of liquid chromatography with diode-array detector for determination of acetamiprid and 6-chloronicotinic acid residues in sweet cherry samples, *Pestic. Phytomed.* 27 (2012) 321–329.
203. P. Jovanov, V. Guzsány, M. Franko, S. Lazić, M. Sakač, B. Šarić, V. Banjac, Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid pesticides in honey using optimized dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* 111 (2013) 125–133.
204. T. Owen, *Fundamentals of UV-visible spectroscopy: A Primer*, Hewlett-Packard, Böblingen, 1996, pp. 10–12.
205. J. Østergaard, UV/Vis spectrophotometry and UV imaging, in: *Analytical techniques in the pharmaceutical sciences* (eds. A. Müllertz, Y. Perrie, T. Rades), Springer, New York, 2016, pp. 3–27.
206. G.L.D. Krupadanam, D.V. Prasad, K.V. Rao, K.L.N. Reddy, C. Sudhakar, *Analytical chemistry*, Universities Press, Hyderabad, 2001, pp. 135–137.
207. J.A. Howel, Ultraviolet and visible molecular absorption spectrometry, in: *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry* (ed. F. Settle), Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, 1997, pp. 481–506.
208. <http://6e.plantphys.net/topic07.01.html> (05.09.2017)
209. I. Švancara, R. Metelka, K. Vytřas, Piston-driven carbon paste electrode holders for electrochemical measurements, in: *Sensing in electroanalysis* (eds. K. Vytřas, K. Kalcher), University of Pardubice, Pardubice, 2005, pp. 7–18.
210. A. Veseli, A. Hajrizi, T. Arbneshi, K. Kalcher, A new amperometric glucose biosensor based on screen printed carbon electrodes with rhenium (IV)-oxide as mediator, *J. Electrochem. Sci. Eng.* 2 (2012) 199–210.

211. L. Berisha, K. Kalcher, A. Hajrizi, T. Arbneshi, A new biosensor for glucose based on screen printed carbon electrodes modified with tin(IV)-oxide, *AJAC* 4 (2013) 27–35.
212. C. Segura, C. Zaror, H.D. Mansilla, M.A. Mondaca, Imidacloprid oxidation by photo-Fenton reaction, *J. Hazard. Mater.* 150 (2008) 679–686.
213. J. Zbiljić, O. Vajdle, V. Guzsvány, J. Molnar, J. Agbaba, B. Dalmacija, K. Kalcher, Hydrodynamic chronoamperometric method for the determination of H₂O₂ using MnO₂-based carbon paste electrodes in groundwater treated by Fenton and Fenton-like reagents for natural organic matter removal, *J. Hazard. Mater.* 283 (2015) 292–301.
214. S.T. Martin, Precipitation and dissolution of iron and manganese oxides, in: *Environmental catalysis* (ed. V.H. Grassian), CRC Press, Boca Raton, 2005, pp. 61–82.
215. J. Zbiljić, V. Guzsvány, O. Vajdle, B. Prlina, J. Agbaba, B. Dalmacija, Z. Kónya, K. Kalcher, Determination of H₂O₂ by MnO₂ modified screen printed carbon electrode during Fenton and visible light-assisted photo-Fenton based removal of acetamiprid from water, *J. Electroanal. Chem.* 755 (2015) 77–86.
216. P. Jeschke, R. Nauen, Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry, *Pest Manag. Sci.* 64 (2008) 1084–1098.
217. P. Jeschke, R. Nauen, M. Schindler, A. Elbert, Overview of the status and global strategy for neonicotinoids, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 2897–2908.
218. K. Matsuda, S.D. Buckingham, D. Kleier, J.J. Rauh, M. Grauso, D.B. Sattelle, Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors, *Trends Pharmacol. Sci.* 22 (2001) 573–580.
219. J.M. Bonmatin, C. Giorio, V. Girolami, D. Goulson, D.P. Kreutzweiser, C. Krupke, M. Liess, E. Long, M. Marzaro, E.A.D. Mitchell, D.A. Noome, N. Simon-Delso, A. Tapparo, Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 35–67.
220. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/33674?lang=en®ion= SX> (15.09.2017)
221. F. Gaál, V. Guzsvány, L. Bjelica, Determination of various insecticides and pharmaceuticals using differently modified glassy carbon electrodes, *J. Serb. Chem. Soc.* 72 (2007) 1465–1475.
222. G. Farsang, L. Tomcsanyi, Voltammetric behavior of manganese(II) and its determination on a carbon paste electrode, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 52 (1967) 123–132.

223. V. Guzsvány, Lj. Rajić, B. Jović, D. Orčić, J. Csanádi, S. Lazić, B. Abramović, Spectroscopic monitoring of photocatalytic degradation of the insecticide acetamiprid and its degradation product 6-chloronicotinic acid on TiO₂ catalyst, *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 47 (2012) 1919–1929.
224. J. Anojčić, V. Guzsvány, O. Vajdle, Z. Kónya, K. Kalcher, Rapid amperometric determination of H₂O₂ by a Pt nanoparticle/Vulcan XC72 composite-coated carbon paste electrode in disinfection and contact lens solutions, *Monatsh. Chem.*, Accepted manuscript (2018), DOI : 10.1007/s00706-018-2253-4.
225. J. Anojčić, V. Guzsvány, O. Vajdle, D. Madarász, A. Rónavári, Z. Kónya, K. Kalcher, Hydrodynamic chronoamperometric determination of hydrogen peroxide using carbon paste electrodes coated by multiwalled carbon nanotubes decorated with MnO₂ or Pt particles, *Sens. Actuat. B* 233 (2016) 83–92.
226. A. Erlenkötter, M. Kottbus, G.-C. Chemnitz, Flexible amperometric transducers for biosensors based on a screen printed three electrode system, *J. Electroanal. Chem.* 481 (2000) 82–94.
227. V. Guzsvány, J. Anojčić, E. Radulović, O. Vajdle, I. Stanković, D. Madarász, Z. Kónya, K. Kalcher, Screen-printed enzymatic glucose biosensor based on a composite made from multiwalled carbon nanotubes and palladium containing particles, *Microchim. Acta* 184 (2017) 1987–1996.
228. D.S. Corrigan, M.J. Weaver, Adsorption and oxidation of benzoic acid, benzoate, and cyanate at gold and platinum electrodes as probed by potential-difference infrared spectroscopy, *Langmuir* 4 (1988) 599–606.
229. R.E. Weisbarth, B. Henderson, Hydrogel lens care regimens and patient education, in: *Clinical contact lens practice* (eds. E.S. Bennett, B.A. Weissman), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005, p. 392.
230. C.L. Laleye, B. Jobe, A.A. Wasesa, Comparative study on heat stability and functionality of camel and bovine milk whey proteins, *J. Dairy Sci.* 91 (2008) 4527–4534.
231. J. Wang, M. Pedrero, P.V.A. Pamidi, X. Cai, Metal-dispersed screen-printed carbon electrodes, *Electroanalysis* 7 (1995) 1032–1035.

232. T. Garcia-Perez, S.-G. Hong, J. Kimb, S. Ha, Entrapping cross-linked glucose oxidase aggregates within agraphitized mesoporous carbon network for enzymatic biofuel cells, *Enzyme Microb. Technol.* 90 (2016) 26–34.
233. P. Muñoz-Robredo, P. Robledo, D. Manríquez, R. Molina, B.G. Defilippi, Characterization of sugars and organic acids in commercial varieties of table grapes, *Chil. J. Agr. Res.* 71 (2011) 452–458.

BIOGRAFIJA



Jasmina Anojčić (rođ. Zbiljić) je rođena 26.10.1987. godine u Vršcu. 2006. godine je upisala Prirodno–matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine. Osnovne akademske studije hemije je završila 2010. godine sa prosečnom ocenom 10,00 i stekla akademsko zvanje Hemičar. Iste godine je upisala master studije (modul: analitička hemija) na matičnom fakultetu. Sve ispite predviđene planom i programom za master studije je položila sa prosečnom ocenom 10,00, a master rad pod nazivom „Primenljivost bizmut–film elektrode za određivanje insekticida klotianidina” (mentor redovni prof. dr Valerija Gužvanj) je odbranila 2011. godine sa ocenom 10 i stekla akademsko zvanje Master Hemičar. Doktorske akademske studije hemije je upisala 2011. godine na matičnom fakultetu. U zvanje istraživača pripravnika za užu naučnu oblast Analitička hemija je izabrana 06.12.2011. godine. Od 01.02.2012. je zaposlena na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, kao istraživač u okviru realizacije projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije pod nazivom „Pristup održivosti i zelene hemije u razvoju ekološki pogodnih analitičkih metoda i skladištenja energije“, broj projekta 172012. Bila je angažovana i na jednogodišnjem projektu Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj, Autonomna pokrajina Vojvodina, pod nazivom „Razvoj hemijskih metoda analize insekticida acetamiprida“, broj projekta 114-451-4418/2013 i bila je učesnik na Bilateralnom projektu Srbija-Slovenija (2016-2017). U zvanje istraživača saradnika za užu naučnu oblast Analitička hemija je izabrana 01.10.2014. godine, a reizabrana u isto zvanje 16.09.2017. Od školske 2011/2012. godine angažovana je na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, kao asistent na laboratorijskim vežbama (predmeti: Instrumentalna analiza, Bioanalitička hemija i Praktikum iz instrumentalne analize) a od školske 2013/2014. godine i na predmetu Senzori u hemiji. Školske 2013/2014. godine bila je asistent na vežbama iz predmeta Neorganska hemija. Kao CMEPIUS stipendista bila je na jednomesečnoj specijalizaciji (2012) u Novoj Gorici, Slovenija, a u okvirima CEEPUS III network projekta bila je na jednomesečnoj specijalizaciji (2014) u Pardubicama, Češka, kao i na jednomesečnoj specijalizaciji (2014) u Gracu, Austrija. Pohađala je međunarodnu letnju školu u

Novoj Gorici, Slovenija (14-27.06.2012. godine) pod nazivom “Advanced Instrumental Techniques for the Monitoring of Aquatic Environments”. Osvojila je treću nagradu za usmeno izlaganje na 21. Seminaru mladih istraživača iz Analitičke hemije (YISAC 2014), 25-28. juna, 2014, Pardubice, Češka, za prezentaciju pod nazivom "Monitoring of H₂O₂ content by MnO₂ modified screen printed carbon electrode during photo-Fenton and Fenton based removal of acetamiprid" autora: Jasmina Zbiljić, Olga Vajdle, Biljana Prlina, Valéria Guzsvány, Kurt Kalcher. Aktivno je učestvovala na prezentaciji Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine. Oblasti interesovanja su joj analitička hemija, instrumentalna analiza, hemijski senzori, tečna hromatografija. Koautor je 10 naučnih radova u međunarodnim časopisima sa SCI liste (2xM21a, 5xM21, 2xM22, 1xM23) i 25 saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima, kao i jednog poglavlja u knjizi. Član je Srpskog hemijskog društva-Hemijskog društva Vojvodine.

U Novom Sadu,

14.07.2018.

Jasmina Anojčić

SPISAK NAUČNIH RADOVA

Publikacije u međunarodnim časopisima sa SCI liste proistekle na osnovu rezultata istraživanja u okviru ove doktorske disertacije (u celosti):

1. **J. Zbiljić**, O. Vajdle, V. Guzsvány, J. Molnar, J. Agbaba, B. Dalmacija, K. Kalcher, Hydrodynamic chronoamperometric method for the determination of H₂O₂ using MnO₂-based carbon paste electrodes in groundwater treated by Fenton and Fenton-like reagents for natural organic matter removal, *Journal of Hazardous Materials*, 283 (2015) 292-301. **M21a; IF 4,836 (2015)**
2. **J. Zbiljić**, V. Guzsvány, O. Vajdle, B. Prlina, J. Agbaba, B. Dalmacija, Z. Kónya, K. Kalcher, Determination of H₂O₂ by MnO₂ modified screen printed carbon electrode during Fenton and visible light-assisted photo-Fenton based removal of acetamiprid from water, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 755 (2015) 77–86. **M21; IF 2,822 (2015)**
3. **J. Anojčić**, V. Guzsvány, O. Vajdle, Z. Kónya, K. Kalcher, Rapid amperometric determination of H₂O₂ by a Pt nanoparticle/Vulcan XC72 composite-coated carbon paste electrode in disinfection and contact lens solutions, *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, Accepted manuscript (2018), DOI : 10.1007/s00706-018-2253-4. **M23; IF 1,282 (2016)**

Publikacije u međunarodnim časopisima sa SCI liste proistekle na osnovu rezultata istraživanja u okviru ove doktorske disertacije (delimično):

1. **J. Anojčić**, V. Guzsvány, O. Vajdle, D. Madarász, A. Rónavári, Z. Kónya, K. Kalcher, Hydrodynamic chronoamperometric determination of hydrogen peroxide using carbon paste electrodes coated by multiwalled carbon nanotubes decorated with MnO₂ or Pt particles, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 233 (2016) 83–92. **M21a; IF 5,401 (2016)**
2. V. Guzsvány, **J. Anojčić**, E. Radulović, O. Vajdle, I. Stanković, D. Madarász, Z. Kónya, K. Kalcher, Screen-printed enzymatic glucose biosensor based on a composite made from multiwalled carbon nanotubes and palladium containing particles, *Microchimica Acta*, 184 (2017) 1987–1996. **M21; IF 4,580 (2016)**

Ostale publikacije u međunarodnim časopisima sa SCI liste:

1. O. Vajdle, **J. Zbiljić**, B. Tasić, D. Jović, V. Guzsvány, A. Djordjevic, Voltammetric behavior of doxorubicin at a renewable silver-amalgam film electrode and its determination in human urine, *Electrochimica Acta*, 132 (2014) 49–57. **M21; IF 4,504 (2014)**
2. M. Brycht, S. Skrzypek, J. Robak, V. Guzsvány, O. Vajdle, **J. Zbiljić**, A. Nosal-Wiercińska, D. Guziejewski, G. Andrijewski, Ultra trace level determination of fenoxanil by highly sensitive square wave adsorptive stripping voltammetry in real samples with a renewable silver amalgam film electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 738 (2015) 69–76. **M21; IF 2,822 (2015)**
3. O. Vajdle, V. Guzsvány, D. Škorić, **J. Anojčić**, P. Jovanov, M. Avramov-Ivić, J. Csanádi, Z. Kónya, S. Petrović, A. Bobrowski, Voltammetric behavior of erythromycin ethylsuccinate at a renewable silver-amalgam film electrode and its determination in urine and in a pharmaceutical preparation, *Electrochimica Acta*, 191 (2016) 44–54. **M21; IF 4,798 (2016)**
4. V. Guzsvány, Z. Papp, **J. Zbiljić**, O. Vajdle, M. Rodić, Bismuth modified carbon-based electrodes for the determination of selected neonicotinoid insecticides, *Molecules*, 16 (2011) 4451–4466. **M22; IF 2,386 (2011)**
5. M. Brycht, O. Vajdle, **J. Zbiljić**, Z. Papp, V. Guzsvány, S. Skrzypek, Renewable silver-amalgam film electrode for direct cathodic SWV determination of clothianidin, nitenpyram and thiacloprid neonicotinoid insecticides reducible in a fairly negative potential range, *International Journal of Electrochemical Science*, 7 (2012) 10652–10665. **M22; IF 1,956 (2013)**

Poglavlje u istaknutoj monografiji međunarodnog značaja:

1. **J. Zbiljić**, O. Vajdle, V. Guzsvány, Z. Kónya, Á. Kukovecz, B. Dalmacija, K. Kalcher, "Carbon paste electrodes bulk-modified with carbon nanotubes and chemically oxidized carbon nanotubes for the determination of hydrogen peroxide" in K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas (Eds.) "Sensing in Electroanalysis" Vol 8, pp. 195–211, University Press Centre, Pardubice, Czech Republic, 2013/2014, ISBN 978-80-7395-782-7 (print); ISBN 978-80-7395-783-4 (pdf). **M14**

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija

VR

Autor: MSc Jasmina Anojčić

AU

Mentor: Prof. dr Valerija Gužvanj, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

MN

Naslov rada: Voltametrijske metode zasnovane na primeni jednostavnih i savremenih elektroda/senzora na bazi ugljeničnih materijala za određivanje vodonik-peroksida u odabranim uzorcima

NR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)

JP

Jezik izvoda: S/E

JI

Zemlja publikovanja: Republika Srbija

ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2018.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine,
Prirodno-matematički fakultet
Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad

MA

Fizički opis rada: poglavlja 7; strana 207; literaturnih citata 233; tablica 17; slika 86; šema 0
FO

Naučna oblast: Hemija
NO

Naučna disciplina: Analitička hemija
ND

Predmetna odrednica, ključne reči: vodonik-peroksid; određivanje; elektroda od ugljenične paste; štampana ugljenična elektroda; medijator; (nano)kompoziti, višezidne ugljenične nanocevi; mangan(IV)-oksid; platina; paladijum; Vulkan XC72; amperometrija; diferencijalno pulsna voltometrija; ciklična voltometrija; katalitički/medijatorom potpomognuti procesi; glukoza; glukoza oksidaza; Fentonov, Fentonu-sličan i foto-Fentonov proces; uklanjanje acetamiprida; uzorak mleka; uzorak meda; rastvori za dezinfekciju i čišćenje kontaktnih sočiva; uzorak belog grožđa; uzorak glukoznih tableta (Traubenzucker-bonbons).

PO

UDK

Čuva se: U biblioteci Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, PMF, Novi Sad,
Trg Dositeja Obradovića 3

ČU

Važna napomena: Nema
VN

Izvod:

Cilj ove doktorske disertacije je bio razvoj brzih i pouzdanih voltametrijskih metoda zasnovanih na primeni jednostavnih i savremenih elektroda/senzora na bazi ugljениčnih materijala (ugljениčne paste napravljene od grafitnog praha i parafinskog ulja i štampanih ugljениčnih elektroda) za određivanje H_2O_2 u odabranim složenim model i realnim uzorcima. U tu svrhu, ispitana je primenljivost različitih radnih elektroda.

Amperometrijska metoda zasnovana na elektrodi od ugljениčne paste (CPE) zapreminski modifikovane sa 5% (m:m) MnO_2 je, pri optimizovanim uslovima i pri radnom potencijalu od 0,40 V u odnosu na zasićenu kalomelovu elektrodu (ZKE) u fosfatnom puferu pH 7,50 kao pomoćnom elektrolitu, omogućila kvantifikaciju H_2O_2 u opsegu koncentracija od 1,4 do 65 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sa relativnom standardnom devijacijom (RSD) manjom od 10%. Ova metoda je primenjena za određivanje sadržaja H_2O_2 u uzorcima podzemne vode iz centralnog Banata (Pokrajina Vojvodina, Srbija) tretirane Fentonovim (Fe^{2+} i H_2O_2) i Fentonu-sličnim (Fe^{3+} i H_2O_2) reagensima u cilju uklanjanja prirodnih organskih materija (POM) pri čemu su korišćene različite početne koncentracije gvožđa i različiti odnosi molarnih koncentracija gvožđa i H_2O_2 . Utvrđeno je da oksidaciono stanje gvožđe (Fe^{2+} ili Fe^{3+}) i molarni odnos jona Fe i H_2O_2 utiču na stepen potrošnje/razgradnje H_2O_2 u podzemnoj vodi sa visokim sadržajem POM. Takođe, u slučaju Fentonu-sličnog procesa, za sve početne koncentracije Fe^{3+} i H_2O_2 , signifikantna količina H_2O_2 ostaje neiskorišćena, što ukazuje na nižu efikasnost ovakvog sistema u poređenju sa Fentonovim procesom.

Štampana ugljениčna elektroda (SPCE) zapreminski modifikovana sa MnO_2 kao medijatorom je primenjena za određivanje sadržaja H_2O_2 u toku Fentonovog (Fe^{2+} , H_2O_2) i vidljivom svetlošću potpomognutog foto-Fentonovog (Fe^{2+} , H_2O_2 , hv) procesa uklanjanja neonikotinoidnog insekticida acetamiprida (ACT). Pri optimizovanim uslovima (radni potencijal 0,40 V u odnosu na ZKE, fosfatni pufer pH 7,50 kao pomoćni elektrolit) amperometrijskog određivanja H_2O_2 , postignuta je linearnost u opsegu koncentracija 0,01–1,24 mmol L^{-1} (0,34–42,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) i vrednost RSD nije prelazila 4,2%. U ispitivanim uzorcima (nakon odgovarajućeg podešavanja pH vrednosti od 2,8 do 7,5 odmah nakon uzorkovanja radi stopiranja ili maksimalnog usporavanja procesa oksidacije, filtriranja, zamrzavanja i odmrzavanja neposredno pre merenja) sadržaj H_2O_2 je određen metodom standardnog dodatka analiziranjem odgovarajućih amperometrijskih krivi. Paralelna HPLC-DAD merenja su vršena u cilju praćenja koncentracije/uklanjanja ACT. U slučaju foto-Fentonovog procesa (početne koncentracije 0,31; 2,0 i 3,0 mmol L^{-1} (70,0; 111,7 i 102,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) za ACT, Fe^{2+} i H_2O_2 , redom) nakon 10 min H_2O_2 je izreagovao, a može se smatrati da je ACT uklonjen nakon 5 min. U toku Fentonovog procesa ACT je uklonjen nakon 20 min tretmana i oko 10% početne koncentracije H_2O_2 je ostalo u sistemu neiskorišćeno.

CPE je površinski modifikovane kompozitom na bazi nanočestica Pt (< 5 nm) i grafitizovanog ugljenika (Pt-C, 10% Pt na Vulkanu XC72) metodom nanošenja kapi. Nemodifikovana CPE i modifikovana (Pt-C/CPE) su okarakterisane primenom SEM/EDS i CV merenja. Pt-C/CPE je pokazala izuzetne elektrokatalitičke osobine u pogledu elektrohemijske

redoks reakcije H_2O_2 u poređenju sa nemodifikovanom CPE u fosfatnom puferu ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,50), a takođe i u acetatnom puferu ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 4,50) kao pomoćnim elektrolitima. Prilikom amperometrijskog određivanja H_2O_2 primenom Pt-C/CPE u model sistemima, zadovoljavajuća linearnost je postignuta u koncentracionom opsegu H_2O_2 od $0,15$ do $1,45 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, dok su vrednosti GO iznosile $0,06 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (pH 7,50, radni potencijal $0,20 \text{ V}$) i $0,10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (pH 4,50, radni potencijal $0,50 \text{ V}$). Optimizovane analitičke metode su primenjene za određivanje sadržaja H_2O_2 u komercijalno dostupnim proizvodima za ličnu negu: rastvoru za dezinfekciju (pH 7,50) i rastvoru za čišćenje kontaktnih sočiva (pH 4,50). Amperometrijski dobijeni rezultati su u dobrom slaganju sa rezultatima dobijenim primenom tradicionalne spektrofotometrijske metode bazirane na titanijum-sulfatu kao reagensu sa određenim koncentracijama $2,91\%$ i $2,94\%$ za dezinfekcioni rastvor i $3,04\%$ i $3,17\%$ za rastvor za kontaktna sočiva, redom. RSD je bila manja od 2% . Postignuti rezultati su u dobrom slaganju sa sadržajem H_2O_2 deklarisanim od strane proizvođača (3%) u oba ispitivana uzorka. Pt-C/CPE je takođe testirana za praćenje koncentracije H_2O_2 u rastvoru za kontaktna sočiva u toku procesa njegove neutralizacije/razgradnje. Nakon 6 h procesa neutralizacije, $24,68 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ je bila određena koncentracija H_2O_2 , što je ispod dozvoljene H_2O_2 koncentracije u rastvoru za kontaktna sočiva imajući u vidu granicu koja izaziva iritaciju oka.

CPE je površinski modifikovana višezidnim ugljeničnim nanocevima (MWCNT) i kompozitima MnO_2 -MWCNT ili Pt-MWCNT metodom nanošenja kapi radi pripreme jednostavnih, osetljivih i pouzdanih voltametrijskih senzora za određivanje H_2O_2 u odabranom uzorku. Rezultati SEM/EDS analize kompozitnih materijala su potvrdili da su medijatori, čestice MnO_2 i Pt, nasumično raspoređeni na površini MWCNT i zastupljeni sa blizu 5% (m:m) u kompozitu izraženo preko Mn i Pt. CV merenja su vršena sa pripremljenim radnim elektrodama u acetatnom (pH 4,50), fosfatnom (pH 7,50) i boratnom (pH 9,18) puferu kako bi se okarakterisalo osnovno elektrohemijsko ponašanje H_2O_2 i odabrali pogodni radni potencijali za amperometrijsko određivanje ovog ciljnog analita. Pt-MWCNT/CPE je primenljiva za rad kako u fosfatnom puferu pH 7,50 tako i u acetatnom puferu pH 4,50 V kako pri negativnim tako i pri pozitivnim radnim potencijalima, pri čemu su vrednosti RSD uglavnom ispod $2,5\%$. U slučaju MnO_2 -MWCNT/CPE, na potencijalu $0,30 \text{ V}$ i višim vrednostima, oksidacioni signali H_2O_2 su signifikantni u blago alkalnoj sredini (pH 7,50), pri pH 4,50 ova elektroda pokazuje nezadovoljavajuće ponašanje, dok pri pH 9,18 ima prihvatljive performanse. Granice određivanja (GO) su bile u oblasti $\mu\text{g mL}^{-1}$. H_2O_2 je određen u spajkovanom uzorku mleka metodom standardnog dodatka nakon odgovarajuće pripreme uzorka (pH podešavanje i centrifugiranje) i primenom optimizovane amperometrijske procedure (acetatni pufer pH 4,50, radni potencijal $-0,75 \text{ V}$) koristeći Pt-MWCNT/CPE kao radnu elektrodu. RSD za tri ponovljena merenja je iznosila $2,5\%$, dok je prinos metode bio nešto veći od 71% .

Kompozitni materijali koji se sastoje od MWCNT i čestica na bazi Pd (Pd-MWCNT) ili Pt (Pt-MWCNT) su primenjeni za pripremu zapreminski modifikovanih SPCE (Pd-MWCNT-SPCE i Pt-MWCNT-SPCE) i površinski modifikovane SPCE (Pd-MWCNT/SPCE). Ove elektrode, kao i nemodifikovana SPCE i MWCNT-SPCE, su okarakterisane primenom CV i amperometrije u fosfatnom puferu pH 7,50 radi određivanja H_2O_2 . Pd-MWCNT-SPCE i Pd-MWCNT/SPCE su se

pokazale pogodnim za određivanje H_2O_2 na radnim potencijalima između -0,50 i 0,50 V, a Pt-MWCNT-SPCE na ispitivanim radnim potencijalima od -0,80 do 0,70 V. Ove elektrode su zatim modifikovane enzimom glukoza oksidazom (GOx) metodom nanošenja kapi rastvora GOx i Nafion[®]-a na njihovu površinu, pri čemu je optimizovana količina nanetog biofilma. GOx/Pd-MWCNT-SPCE je pokazala bolje analitičke performanse za određivanje glukoze u poređenju sa GOx/Pd-MWCNT/SPCE. Kao optimalan radni potencijal GOx/Pd-MWCNT-SPCE je odabrana vrednost potencijala -0,40 V u odnosu na ZKE, sa zadovoljavajućom linearnošću u ispitivanom opsegu koncentracija glukoze od 0,16 do 0,97 mmol L⁻¹ (od 29,1 do 174 µg mL⁻¹), dok je GO iznosila 0,14 mmol L⁻¹ (25 µg mL⁻¹). Optimizovana metoda zasnovana na GOx/Pd-MWCNT-SPCE je uspešno primenjena za određivanje glukoze u uzorku livadskog meda. Dobijeni rezultati su u dobroj saglasnosti sa onima dobijenim primenom komercijalno dostupnog aparata za merenje glukoze. Pogodan radni potencijal za GOx/Pt-MWCNT-SPCE je bio -0,50 V u odnosu na ZKE, pri čemu je zadovoljavajuća linearnost postignuta u ispitivanom opsegu koncentracija glukoze od 65,8 do 260,6 µg mL⁻¹, sa GO 35 µg mL⁻¹. Optimizovana metoda zasnovana na GOx/Pt-MWCNT-SPCE je uspešno primenjena za određivanje glukoze u u uzorku belog grožđa i uzorku tableta (Traubenzucker-bonbons), pri čemu su dobijeni rezultati u dobroj saglasnosti sa rezultatima dobijenim primenom Accu-Chek aparata.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su razvijene analitičke metode pre svega jednostavne, pouzdane i pogodne za dobijanje brzih informacija o sadržaju H_2O_2 u različitim tipovima uzoraka. Svakako odabir pogodne radne elektrode, kao i optimizacija eksperimentalnih uslova su ključni faktori za uspešno određivanje H_2O_2 .

IZ

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 28.05.2015.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

Predsednik: dr Biljana Abramović, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Mentor: dr Valerija Gužvanj (dr Valéria Guzsvány), redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Član: dr Jasmina Agbaba, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Član: Dr Zoltán Kónya, redovni profesor, Departman za primenjenu hemiju i hemiju okoline, Univerzitet u Segedinu, Mađarska

Član: dr Kurt Kalcher, vanredni profesor, Karl-Franzens Univerzitet, Grac, Austrija

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES

KEYWORDS DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type: Monograph type

DT

Type of record: Printed text

TR

Contents code: PhD thesis

CC

Author: MSc Jasmina Anojčić

AU

Mentor: prof. dr Valerija Gužvanj (dr Valéria Guzsány), Faculty of Sciences, University of Novi Sad

MN

Title: Voltammetric methods based on the application of simple and contemporary carbonaceous materials-based electrodes/sensors for the determination of hydrogen-peroxide in the selected samples

TI

Language of text: Serbian (Latin alphabet)

L

Language of abstract: S/E

LA

Country of publication: Republic of Serbia

CP

Locality of publication: Vojvodina

LP

Publication year: 2018

PY

Publisher: Author's reprint

PU

Pub. Place: Novi Sad, Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection
Faculty of Sciences,
Trg Dositeja Obradovića 3

PP

Physical description: chapters 7; pages 207; literature 233; tables 17; figures 86; shemes 0

PD

Scientific field: Chemistry

SF

Scientific discipline: Analytical Chemistry

SD

Subject, keywords: hydrogen-peroxide; determination; carbon paste electrode; screen printed carbon electrode; mediator; (nano)composites, multiwalled carbon nanotubes; manganese(IV)-oxide; platinum; paladium; Vulcan XC72; amperometry; differential pulse voltammetry; cyclic voltammetry; catalytic/mediator based processes; glucose; glucose oxidase; Fenton, Fenton-like and photo-Fenton process; acetamiprid removal; milk sample; honey sample; disinfection and contact lens cleaning solutions; white grape sample; glucose tablets sample (Traubenzucker-bonbons).

SKW

Holding data: In the library of Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3

HD

Note: None

N

Abstract:

The aim of this doctoral dissertation was the development of fast and reliable voltammetric methods based on the application of simple and contemporary electrodes/sensors based on carbonaceous materials (carbon paste made of graphite powder and paraffin oil and screen printed carbon electrodes) for the determination of H_2O_2 in the selected complex model and real samples. For this purpose, applicability of different working electrodes was investigated.

The amperometric method based on carbon paste electrode (CPE) bulk-modified with 5% (m:m) MnO_2 , under optimized conditions, with a working potential of 0.40 V vs. the saturated calomel electrode (SCE) and a phosphate buffer solution (pH 7.50) as supporting electrolyte, enabled the quantitation of H_2O_2 in the concentration interval from 1.4 to 65 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with a relative standard deviation (RSD) of less than 10%. This method was applied for the determination of the H_2O_2 consumption in samples of groundwater from the Central Banat region (Province of Vojvodina, Serbia) treated by the Fenton (Fe^{2+} and H_2O_2) and Fenton-like (Fe^{3+} and H_2O_2) reagents to remove natural organic matter (NOM) at different initial concentrations of iron species, and of their molar ratios to the initial concentration of H_2O_2 . It was found that the form of Fe (Fe^{2+} or Fe^{3+}) and the molar ratio to H_2O_2 influenced the degree of the H_2O_2 decomposition in the groundwater with high NOM content. Besides, in the case of the Fenton-like process, for all initial doses of Fe^{3+} and H_2O_2 , a significant amount of H_2O_2 remained unused, which also indicates a lower efficiency of such system compared to the Fenton process.

Screen printed carbon electrode (SPCE) bulk-modified with MnO_2 as a mediator was applied for amperometric determination of the H_2O_2 content during the Fenton (Fe^{2+} , H_2O_2) and visible light-assisted, photo-Fenton (Fe^{2+} , H_2O_2 , $h\nu$) based removal of neonicotinoid insecticide acetamiprid (ACT). Under optimized conditions (working potential of 0.40 V vs. SCE, phosphate buffer pH 7.50 as supporting electrolyte) amperometric determination of H_2O_2 showed a linear dynamic range from 0.01 to 1.24 mmol L^{-1} (from 0.34 to 42.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and the RSD did not exceed 4.2%. In the investigated samples (after appropriate pH adjustment from 2.8 to 7.5 instantly after the sampling to stop or maximum decelerate the oxidation processes, filtering, and storage of the deep-frozen sample with defrosting immediately before the measurements) the H_2O_2 contents were determined by the standard addition method by analyzing the corresponding amperometric curves. Parallel HPLC-DAD measurements were performed to monitor the concentration/removal of ACT. In the case of the photo-Fenton process (initial concentrations: 0.31; 2.0 and 3.0 mmol L^{-1} (70.0; 111.7 and 102.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of ACT, Fe^{2+} and H_2O_2 , respectively) after 10 min of irradiation H_2O_2 was consumed and it can be considered that ACT was removed after 5 min. During the Fenton process ACT was removed after 20 min of treatment and around 10% of the initial concentration of the H_2O_2 remained still unused.

CPE was surface modified with a composite of Pt nanoparticles (< 5 nm) on graphitized carbon (Pt-C, 10% Pt on Vulcan XC72) by simply drop coating method. The unmodified CPE and the modified one (Pt-C/CPE) were characterized by SEM/EDS and CV measurements. The Pt-C/CPE showed remarkable electrocatalytic properties toward the electrochemical redox reaction of H_2O_2 compared to unmodified CPE in phosphate buffer (0.1 mol L^{-1} ; pH 7.50), as well in acetate

buffer (0.1 mol L⁻¹; pH 4.50) supporting electrolytes. Amperometry of H₂O₂ in the concentration range from 0.15 to 1.45 µg mL⁻¹ with the Pt-C/CPE showed acceptable linearity, while the obtained values of LOQs were 0.06 µg mL⁻¹ (pH 7.50, working potential 0.20 V) and 0.10 µg mL⁻¹ (pH 4.50, working potential 0.50 V). The proposed analytical methods were applied to the determination of the H₂O₂ content in commercially available personal care products; i.e., disinfection (pH 7.50) and contact lens cleaning solutions (pH 4.50). The obtained amperometric results are in good agreement with those measured by traditional titanium sulfate reagent based spectrophotometric method with determined concentrations as 2.91% and 2.94% for the disinfection product, and 3.04% and 3.17% for the contact lens solution, respectively. RSD was lower than 2%. The obtained results are in a good agreement with the amounts of the H₂O₂ declared by producers (3%) in the both investigated samples. The Pt-C/CPE was also tested for monitoring of the H₂O₂ residual concentration in contact lens solution during its neutralization/decomposition process. At 6 h of neutralization treatment 24.68 µg mL⁻¹ of the H₂O₂ was determined which is almost half of the allowed H₂O₂ concentration in the case of the contact lens solution concerning the limit of eye irritation.

CPE was surface modified with multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) and with composites of MnO₂-MWCNT or Pt-MWCNT by drop coating method to prepare simply, sensitive and reliable voltammetric sensors for the determination of H₂O₂ in selected sample. The results of the SEM/EDS analysis of composite materials have confirmed that the mediators, MnO₂ and Pt particles, are randomly distributed on the surface of MWCNT and represent nearly 5% (m:m) of the composite expressed as Mn and Pt. CV measurements were performed with prepared electrodes in acetate (pH 4.50), phosphate (pH 7.50) and borate (pH 9.18) buffers to characterize the basic electrochemical behavior of H₂O₂ and to select the working potentials suitable for amperometric determination of this target analyte. The Pt-MWCNT/CPE performs well in phosphate buffer pH 7.50 and acetate buffer solution pH 4.50 in the negative as well as in the positive polarization range with RSD mainly lower than 2.5%. In case of MnO₂-MWCNT/CPE at 0.30 V and above the H₂O₂ oxidation signal is remarkable in slightly alkaline media (pH 7.50), at pH 4.50 this electrode showed poor behavior and at pH 9.18 offered acceptable performance. LOQs were in the µg mL⁻¹ concentration range. H₂O₂ was determined in a spiked milk sample by standard addition method after appropriate sample preparation (pH adjustment and centrifugation) and using optimized amperometric procedure (acetate buffer pH 4.50, working potential -0.75 V) by Pt-MWCNT/CPE as a working electrode. RSD for three repeated measurements was 2.5%, while the recovery of the method was a bit higher than 71%.

The composite materials consisting of MWCNT and Pd (Pd-MWCNT) or Pt containing particles (Pt-MWCNT) were applied to the preparation of bulk-modified SPCEs (Pd-MWCNT-SPCE and Pt-MWCNT-SPCE) and surface modified SPCE (Pd-MWCNT/SPCE). These electrodes, as well as unmodified SPCE and MWCNT-SPCE, were characterized by CV and amperometry in phosphate buffer solution of pH 7.50 for the H₂O₂ determination. Pd-MWCNT-SPCE and Pd-MWCNT/SPCE are convenient for the determination of H₂O₂ at working potentials from -0.50 to 0.50 V, and Pt-MWCNT-SPCE at investigated working potentials in the range from -0.80 to 0.70 V. These electrodes were then modified with glucose oxidase (GOx) by drop coating a solution of GOx

and Nafion[®] on their surface, whereby the applied amount of biococktail was optimized. GOx/Pd-MWCNT-SPCE showed better analytical performance for glucose determination in comparison with GOx/Pd-MWCNT/SPCE. The optimal working potential for GOx/Pd-MWCNT-SPCE was -0.40 V vs. SCE and satisfactory linearity was obtained in the investigated glucose concentration range from 0.16 to 0.97 mmol L⁻¹ (from 29.1 to 174 µg mL⁻¹), while the LOQ was 0.14 mmol L⁻¹ (25 µg mL⁻¹). The optimized method based on GOx/Pd-MWCNT-SPCE was successfully applied to the determination of glucose in multifloral honey sample. The results are in a good agreement with those obtained by commercially available equipment for determination of glucose. Optimal working potential for GOx/Pt-MWCNT-SPCE was -0.50 V vs. SCE, and the satisfactory linearity was obtained in the investigated concentration range of glucose from 65.8 to 260.6 µg mL⁻¹, with LOQ of 35 µg mL⁻¹. The optimized method based on GOx/Pt-MWCNT-SPCE was successfully applied for determination of glucose in white grape and glucose tablets (Traubenzucker-bonbons) samples, whereby the obtained results were in a good agreement with the results obtained by Accu-Chek device.

Based on the results, the developed analytical methods are first of all simple, reliable and suitable for obtaining fast information about the content of H₂O₂ in different types of samples. Certainly the selection of a suitable working electrode, as well as the optimization of experimental conditions are key factors for the successful determination of H₂O₂.

AB

Accepted by the Scientific Board on: 28.05.2015.

AC

Defended:

DE

Thesis defend board:

DB

President: dr Biljana Abramović, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Mentor: dr Valéria Guzsvány, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Member: dr Jasmina Agbaba, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Member: Dr Zoltán Kónya, Full Professor, Department of Applied and Environmental Chemistry, University of Szeged, Hungary

Member: dr Kurt Kalcher, Associate Professor, Karl-Franzens University, Graz, Austria