

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra fyzikální chemie**



**Amperometrické senzory pro stanovení
peroxidu vodíku na bázi mezoporézních vrstev
kovů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Studijní obor:

Vedoucí diplomové práce:

Bc. Gabriela Valášková

Materiálová chemie

doc. RNDr. Jan Hrbáč, Ph.D.

Olomouc 2009

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....

Gabriela Valášková

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu doc. RNDr. Janu Hrbáčovi, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Vladimíru Halouzkovi za všestrannou pomoc, odborné vedení a cenné připomínky, které mi poskytly při vypracování diplomové práce.

OBSAH

1	ÚVOD	3
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	4
2.1	Elektroanalytické metody	4
2.1.1	Voltametrie	4
2.1.2	Cyklická voltametrie.....	6
2.1.3	Amperometrie	8
2.1.4	Elektrodový děj a elektrokatalýza	9
2.2	Typy pracovních elektrod.....	11
2.2.1	Rtuťové elektrody.....	12
2.2.2	Elektrody z tuhých materiálů.....	12
2.2.3	Chemicky modifikované elektrody	16
2.2.4	Mikroelektrody	18
2.3	Stanovení peroxidu vodíku elektrochemicky	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3.1	Používané chemikálie	25
3.2	Používané roztoky	25
3.3	Přístrojové vybavení.....	26
3.4	Vývoj senzorů.....	26
3.4.1	Konstrukce mikroelektrody	27
3.4.2	Očištění elektrody.....	28
3.4.3	Elektrochemické depozice.....	29
3.5	Testování senzorů	33
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	34
4.1.1	Amperometrické stanovení peroxidu vodíku	34
4.1.2	Časová stabilita odezvy senzoru.....	38
4.1.3	pH závislost odezvy senzoru	39
4.1.4	Selektivita a detekční limity senzoru.....	42
5	ZÁVĚR	44
6	SUMMARY	45
7	LITERATURA.....	48

8	PŘÍLOHY.....	56
----------	---------------------	-----------

1 Úvod

Rychlé, přesné a spolehlivé stanovení peroxidu vodíku má velký význam ve zdravotnictví, průmyslu, farmacii, potravinářství a dále v oblasti životního prostředí. Vývoj vysoce citlivých a selektivních metod pro stanovení peroxidu vodíku je atraktivní v oblasti fyzikální i analytické chemie, ale také i v jiných vědních disciplínách např. v medicíně, biologii nebo fyzice. Zvláštní důraz je kladen na vývoj biosenzorů pro látky, u kterých je peroxid vodíku jedním z hlavních produktů jejich enzymatických reakcí.

Ke stanovení peroxidu vodíku se používá mnoho metod, např. fluorescence, spektrofotometrie, titrační metody nebo chemiluminiscence. Atraktivní alternativou těchto metod se stále častěji stávají elektrochemické metody, a to především pro svoji jednoduchost, rychlost, přesnost, spolehlivost a relativně nízkou cenu.

Předložená diplomová práce se zabývá stanovením peroxidu vodíku prostřednictvím elektrochemické metody amperometrie v míchaném roztoku. Cílem této práce byl vývoj citlivého a přesného mikroelektrodového senzoru ke stanovení peroxidu vodíku. Základem takového senzoru byly uhlíkové mikroelektrody elektrochemicky modifikované mezoporézními vrstvami kovů (platina, stříbro). Vytvořené senzory byly testovány na přídavky peroxidu vodíku. Hodnocena byla jednak linearita odezvy senzorů, dále pak citlivost, selektivita, stabilita a vliv pH prostředí na funkci senzorů.

2 Teoretická část

2.1 Elektroanalytické metody

Elektroanalytické metody jsou založené na vztazích mezi neelektrickými veličinami (látkové množství, koncentrace, hmotnost, objem, čas, povrchové napětí) a elektrickými veličinami (proud, elektrodový potenciál, odpor, vodivost, specifický odpor, specifická vodivost, molární hmotnost, kapacita, relativní permitivita), spojenými s procesy, které souvisejí buď s elektrickými vlastnostmi roztoku nebo elektrochemickými reakcemi probíhajícími na fázovém rozhraní elektroda/roztok ve vhodně sestaveném elektrochemickém článku.

V následujících kapitolách je zahrnutý stručný přehled a jednotlivé principy z vybraných elektrochemických metod pro vývoj senzorů (voltametrie, cyklická voltametrie a amperometrie).

2.1.1 Voltametrie

Pojmem *voltametrie* [1, 2, 3, 4, 5] se označuje soubor elektroanalytických metod, které popisují závislost elektrického proudu na měnícím se potenciálu pracovní elektrody v analyzovaném roztoku. Závislostí proudu protékající pracovní elektrodou na potenciálu je tzv. polarizační křivka. Velikost proudu protékající elektrodou při vhodném potenciálu v přítomnosti analytu jem možné využít jako analytický signál. U voltametrie se potenciál vkládaný na pracovní elektrodu lineárně mění s časem (roste či klesá). V případě, že v roztoku u pracovní elektrody není látka, která by se redukovala či oxidovala, je elektroda polarizována, protéká jí jen *kapacitní proud*, který je nutný ke změně jejího potenciálu. Je-li u elektrody přítomna elektroaktivní látka, která se při určitém potenciálu redukuje či oxiduje (tzv. depolarizátor), dochází k depolarizaci elektrody a protéká jí tzv. *faradayický proud*. Velikost katodického či anodického faradayického proudu je mírou koncentrace depolarizátoru.

Voltametrická měření mohou probíhat ve stacionárním (např. měření s kapající Hg elektrodou v případě polarografie, s rotující diskovou elektrodou, s mikroelektrodami), nebo nestacionárním režimu (měření s pevnými elektrodami v případě cyklické

voltametrie). Voltametrická vlna je pro stacionární režim charakterizována jednak velikostí limitního difúzního proudu I_{lim} (rovnice č. 1), jedná se o údaj kvantitativní a hodnotou půlvlnového potenciálu $E_{1/2}$ (potenciál v polovině výšky vlny). Půlvlnový potenciál je údajem kvalitativním. Při vložení dostatečného potenciálu na elektrodu se elektrochemicky přeměňuje (oxiduje nebo redukuje) látka v roztoku, proud narůstá, až dosáhne hodnoty limitního proudu odpovídající koncentraci látky.

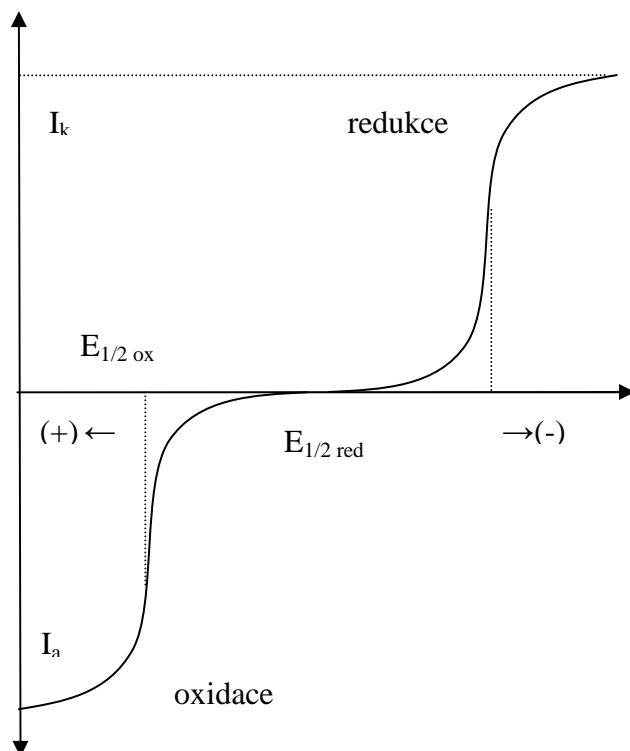
$$I_{\text{lim}} = \frac{nFAD}{\delta} c(A) = Kc(a) \quad (1)$$

n - počet vyměněných elektronů, F - Faradayova konstanta ($96\,485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$), A [cm^2] - geometrická plocha elektrody, D [cm^2s^{-1}] - difúzní koeficient látky A, δ [cm] - Nernstova difúzní vrstva.

Limitní difúzní proud protékající elektrodou je přímo úměrný koncentraci elektroaktivní látky v roztoku. Hodnota limitního proudu je ve voltametrickém signále. Konstanta K závisí na typu použité pracovní elektrody.

Voltametrické techniky se označují jako katodické či anodické dle charakteru probíhajícího procesu (oxidace, redukce). Je-li v roztoku přítomna jen oxidovaná forma elektroaktivní látky, může se redukovat na katodě za podmínky dostatečně velkého negativního potenciálu, jedná se o tzv. katodické křivky. Anodický proud má opačný směr, probíhá oxidace a proud se navyšuje s potenciálem elektrody rostoucím do pozitivnějších hodnot. Jsou-li v roztoku přítomny obě redoxní formy, může polarizovaná elektroda být katodou i anodou podle toho, jaký je na ni vložen potenciál. V grafu lze zaznamenat anodickou-katodickou vlnu (obr. č. 1). V případě, že oxidace a redukce na elektrodě probíhá stejnou rychlostí $E(k)_{1/2} = E(a)_{1/2}$, katodická a anodická křivka na sebe navazují a redoxní forma tvoří reverzibilní systém. Probíhá-li jeden z dějů, rozdílnou rychlostí $E(k)_{1/2} \neq E(a)_{1/2}$, křivky se od sebe oddělují, každá vlna má svůj půlvlnový potenciál, což ukazuje na irreverzibilitu děje.

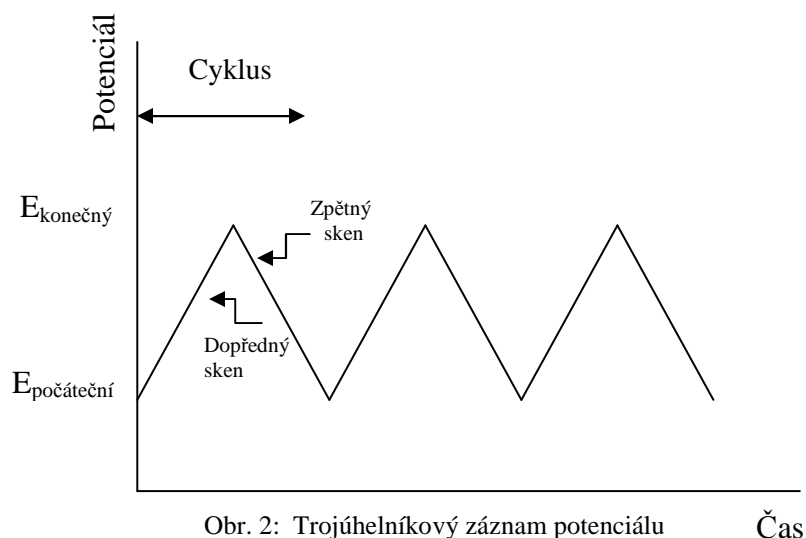
Voltametrií lze stanovit najednou i více látek v roztoku, pokud jsou odlišné hodnotami půlvlnového potenciálu.



Obr. 1: Redoxní voltametrická křivka. V grafu je závislost proudu na vloženém potenciálu.

2.1.2 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (CV) [1, 5, 6, 7] se stala velmi populární technikou pro studium nových elektrochemických systémů a ukázala se velmi užitečnou při získávání kvalitativních informací i v případech poměrně komplikovaných elektrodových dějů. Cyklická voltametrie poskytuje značné množství informací o termodynamice redoxních procesů, heterogenní kinetice přenosu elektronu, o chemických reakcích navázaných na redox procesy a o adsorpčních procesech. Cyklická voltametrie bývá často první metodou užitou v elektroanalytických studiích neznámých systémů. Je jednou z mnoha metod odvozených od polarografie. Výsledkem CV experimentu je tzv. cyklický voltamogram, jedná se o závislost protékajícího proudu soustavou na vkládaném napětí.



Obr. 2: Trojúhelníkový záznam potenciálu

Čas

Potenciál je lineárně zvyšován od počátečního k „zlomovému” potenciálu, tzv. dopředný sken, dále je potenciál snižován ke konečnému (zpětný sken). Počáteční potenciál je většinou shodný s konečným, dopředný a zpětný sken tvoří jeden cyklus (obr. č. 2). Dle potřeby se provádí i více scanů. Přístroje pro měření voltamogramů (potenciostaty) používají dvou- či tříelektrodové zapojení.

V klasickém tříelektrodovém zapojení je třeba těchto elektrod:

- pracovní (např. skelný uhlík, uhlíkové vlákno, uhlíková pasta, Au, Pt, Hg apod.)
- referentní (argentochloridová a kalomelová elektroda)
- pomocné (Pt plíšek či drátek)

Základní funkcí potenciostatu je kontrola nastaveného potenciálu a měření proudu mezi pracovní a referentní elektrodou. Pomocná elektroda se používá k nastavení potenciálu tak, aby mezi referentní a pracovní elektrodou byl žádaný potenciálový rozdíl.

Roztok vhodný pro voltametrické měření musí obsahovat mimo zkoumané látky nadbytek pomocného elektrolytu, při měření ve vodném prostředí se přidává nejčastěji vhodná sůl (KCl) popřípadě pufr. Před experimentem s pevnými elektrodami je jednou z možností materiál elektrody před každým měřením vyleštit např. pomocí aluminy nebo diamantové pasty. V některých případech stačí na elektrodu vložit dostatečně velký potenciál, který desorbuje z povrchu elektrody nečistoty (tzv. elektrochemické očištění elektrody).

Z jednoho roztoku můžeme získat velký počet voltamogramů. Potenciál vložený na elektrodu způsobuje oxidaci, či redukci přítomných látek v roztoku. Analyt je na voltamogramu indikován proudovým píkem charakteristického tvaru. Látka je charakterizována kvalitativně podle pozice píků. Výška (proud) píku je přímo úměrná koncentraci látky v roztoku.

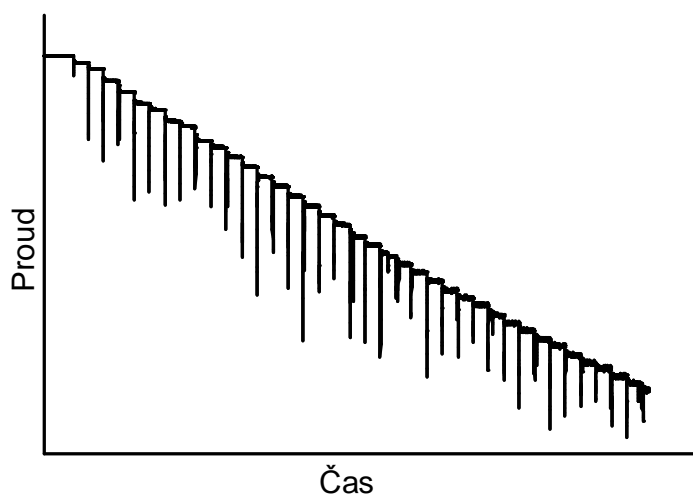
Při zpětném scanu je možné znovu reoxidovat či zredukovat produkt vzniklý během dopředného scanu. Ze separace píků, z jejich tvarů, poměrů výšek, nebo ze změn těchto parametrů v závislosti na rychlosti scanu lze získat informace o kinetice přenosu náboje a mechanismu elektrodoových přeměn.

Cyklická voltametrie je základní metodou studia mechanismů elektrodoových reakcí.

2.1.3 Amperometrie

Proudová odezva amperometrických senzorů je úměrná koncentraci analytu. Proud se měří při konstantním potenciálu procházejícím pracovní elektrodou.

Amperometrická měření jsou prováděna v míchaném či nemíchaném roztoku, ve dvou- či tříelektrodovém zapojení. Pro dvouelektrodové uspořádání se napětí pracovní elektrody nastavuje proti elektrodě referentní. V tříelektrodovém uspořádání se používá navíc elektroda třetí-pomocná [8]. Se dvěma elektrodami lze pracovat snadno, pokud jimi prochází jen malý proud (asi pod $10\mu\text{A}$ -mikroelektrody). Tříelektrodový systém pracuje univerzálně, vyžaduje však potenciostat. Potenciostat, jak již bylo uvedeno, udržuje konstantní potenciál na pracovní elektrodě, vůči referentní.



Obr. 3: Ukázka záznamu měření proudové odezvy při konstantním potenciálu. Měření bylo prováděno v tříelektrodeovém zapojení v míchaném roztoku při konstantních přídavcích analytu (peroxidu vodíku).

2.1.4 Elektroodový děj a elektrokatalýza

Z polohy píků a hodnoty proudu v píku lze charakterizovat elektrochemicky přeměněnou látku a usuzovat na samotný elektroodový děj. Podrobnou interpretací získaných dat je možné zjistit např. reverzibilitu elektroodové reakce. Na voltametrické křivce každé elektroodové reakci přísluší jeden proudový pík. V reakčním mechanismu lze z množství píků usoudit na počet jednotlivých kroků.

E mechanismus:	$A + ne^- \rightarrow B$
EE mechanismus:	$A + ne^- \rightarrow B, B + ne^- \rightarrow A$
EEE mechanismus:	$A + ne^- \rightarrow B, B + ne^- \rightarrow A, C + ne^- \rightarrow D$
EC mechanismus:	$A + ne^- \rightarrow B, B \leftrightarrow C$
CE mechanismus:	$A \leftrightarrow B, A + ne^- \rightarrow B$
ECE mechanismus:	$A + ne^- \rightarrow B, B \leftrightarrow C, C + ne^- \rightarrow D$
EE disp.mechanismus:	$A + ne^- \rightarrow B, B \leftrightarrow C, 2B \rightarrow A + C$

Reakční rychlost se během chemické reakce může měnit za přítomnosti určitých látek, jedná se o tzv. *katalytickou reakci*. Látky ovlivňující průběh chemické reakce se označují jako *katalyzátory*. Při katalytické reakci se katalyzátor vyskytuje ve stejné nebo rozdílné fázi jako reagující látky, katalýzu lze rozdělit na dvě skupiny. Jedná

se o *homogenní katalýzu*, kdy katalyzátor je ve stejné fázi jako reaktant nebo *heterogenní katalýzu*, kdy katalyzátor je zpravidla v pevné fázi a reaktanty jsou kapalné či plynné. Homogenně katalyzovaných reakcí existuje mnoho, nejčastějším typem jsou reakce katalyzovány kyselinami a zásadami. Speciálním případem je *biokatalýza*, katalyzátorem je zde enzym. Enzymy (bílkoviny) spadají svými rozměry mezi částice o průměru 10-100 nm, enzymová katalýza je tedy něco mezi katalýzou homogenní a heterogenní. Enzymy specificky katalyzují určitou reakci v živých organismech.

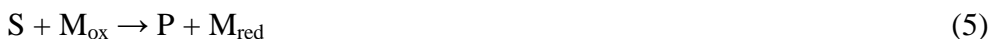
Katalyzátor je každá látka, která ovlivňuje svojí přítomností mechanismus a tím i její rychlost. Katalyzátor se reakcí nespotebovává, ale vystupuje v nezměněné formě. Katalyzátor může být složen z jedné, ale i více složek. Vliv katalyzátoru na průběh chemické reakce může být urychlující, zpomalující a usměrňující. Po určité době již katalyzátor neovlivňuje průběh reakce. Katalyzátor má omezenou životnost v reagujícím systému. Během katalytické reakce katalyzátor vytváří z výchozí látky meziprodukt (1), poté reaguje s druhou látkou za vzniku reakčního produktu, kdy v konečných produktech se přítomný katalyzátor již nevyskytuje (2).



Heterogenní přenos elektronů je možné urychlit pomocí mediátoru přenosu náboje. Katalyzátor přítomný může být přítomný v roztoku nebo imobilizovaný na povrchu elektrody. Elektrokatalytickou přeměnu substrátu S (analytu) na produkt P pomocí mediátoru M lze znázornit schématem:



a nebo



Substrát difunduje k povrchu modifikované elektrody z objemu roztoku a dochází k chemické reakci s mediátorem (rovnice 3 a 4). Následně se za dostatečně vysokého potenciálu elektrody regeneruje redoxní stav mediátoru (rovnice 5 a 6) [3, 9, 10].

K modifikaci povrchu elektrody se velmi často využívají komplexotvorné látky a redox mediátory ve formě komplexních sloučenin kovů. Ve vrstvě modifikátoru lze dosáhnout chemickou akumulací analytu nejen vysoké citlivosti (stanovení koncentrací v 10^{-7} až 10^{-10} mol/l), ale i vysoké selektivity senzorů vůči sledované látce. U chemicky modifikovaných elektrod právě jejich princip, dovoluje obměnou chemického modifikátoru získat mnoho konstrukčně podobných senzorů s rozdílným koncentračním detekčním oknem pro daný analyt.

Mezi nejpoužívanější modifikátory patří např. kyanokomplexy železa - Berlínská modř PB (Prussian blue) [11, 12, 13], které jsou nejčastěji používány jako zprostředkovatel přenosu náboje pro amperometrické biosenzory. Dalším z nejpoužívanějších materiálů pro modifikaci je HRP (Horseradish peroxidase) [14, 15, 17]. Významnou skupinu dále tvoří oxidy přechodných kovů (Cu_2O , CuO) [18, 19], magnetit (Fe_3O_4) [20], aj.

2.2 Typy pracovních elektrod

Pro citlivost, přesnost, správnost metody je rozhodující správný výběr pracovní elektrody [1, 7, 8]. Pracovní elektroda by měla poskytnout vysoký poměr signál-šum, stejně jako reprodukovatelné reakce. Tedy výběr závisí především na dvou faktorech: redox chování cílového analytu a na pozadí. Další důležitou vlastností pro výběr pracovní elektrody je její elektrochemická stabilita v širokém rozmezí potenciálů, elektrická vodivost, povrchová reprodukovatelnost, mechanická stabilita, její cena, dostupnost a netoxicity.

Pracovní elektrody lze rozdělit podle velikosti. Proud je přímo úměrný velikosti elektrody. Pokud je povrch elektrody větší než $100 \mu\text{m}^2$, jde o tzv. *makroelektrody*. Těmi prochází proud v rozsahu mikro- až miliamperů. *Mikroelektrody* mají velikost pod $100 \mu\text{m}^2$, protéká jimi proud v rozmezí nano- až do pikoamperů.

Makroelektrody se používají v míchaném (často je zajišťováno přímo rotací, vibrační elektrody) i nemíchaném roztoku. Mikroelektrody a jejich soubory se používají pro speciální elektroanalytické měření.

Jednotlivé typy používaných pracovních elektrod je možné klasifikovat do dvou skupin, a to na *rtuťové* a *tuhé*, dále elektrody dělíme na *chemicky modifikované* či *nemodifikované*.

2.2.1 Rtuťové elektrody

Rtuť je častou volbou materiálu elektrody, má významné přednosti oproti tuhým elektrodám z hlediska elektrochemické analýzy. Má vysoké hodnoty přepětí vodíku, které značně rozšiřuje katodové potenciálové okno (ve srovnání s tuhými materiály elektrod), má vysoce reprodukovatelný, snadno obnovitelný a hladký povrch. Nevýhodou používání rtuti je její omezená anodická oblast (vzhledem k oxidaci rtuti) a její toxicita.

Existuje několik typů rtuťových elektrod. Nejjednodušším typem je stacionární rtuťová kapková elektroda. Nejčastějším uspořádáním je vertikální kapilára, kapka „visí“ na rtuťovém sloupci. Je také možné mít kapiláru vzhůru tzv. „ležící kapka“, ležící kapka má určité výhody např. lepší stabilitu a možné použití kapiláry s menším vnitřním průměrem, čímž se potlačí zpětná difúze kovu do kapiláry.

Nejčastěji používaným typem rtuťové elektrody je filmová rtuťová elektroda. Zpravidla se připravuje elektrolytickým vyloučením nepatrného množství rtuti z roztoku jejich solí na povrchu tuhé elektrody (např. ušlechtilé kovy, uhlíkové). Dosáhne se tak větší citlivosti při měření, elektrody mají mnohem větší poměr aktivního povrchu k objemu rtuti.

Při práci se stacionárními rtuťovými elektrodami reprodukovatelnost výsledků závisí na reprodukovatelnosti velikosti kapky.

2.2.2 Elektrody z tuhých materiálů

Tuhé elektrody jsou významné v elektroanalytické chemii po téměř pět desetiletí.

Elektroda z tuhého materiálu, musí splňovat několik vlastností:

- dobrá elektrická vodivost
- chemická a elektrochemická stabilita v širokém rozmezí podmínek
- rychlý přenos elektronů pro širokou škálu redox systémů
- reprodukovatelné elektrické a chemické vlastnosti

V podstatě všechny elektrody jiné než rtuťové jsou tuhými elektrodami. Narozdíl od rtuťových elektrod je povrch elektrody z tuhých materiálů více či méně nehomogenní. V průběhu elektrolýzy se často vytvářejí filmy látek adsorbovaných z roztoku nebo látek vytvářejících se elektrodovými reakcemi (samotný materiál elektrody se může redukovat či oxidovat). Povrch tuhé elektrody se během měření neobnovuje, což vede k tomu, že po sobě registrované cyklické polarizační křivky se od sebe liší a při kontinuálních nebo opakovaných měřeních se mění proud tekoucí elektrodou i v roztocích o konstantní koncentraci analytu. Je zřejmé, že na vlastnostech tuhých elektrod má vliv nejen použitý materiál, z něž jsou připraveny elektrody, ale i charakter předcházejících dějů, ke kterým došlo na elektrodě. Voltametrie s tuhými elektrodami je náročnější po experimentální stránce než voltametrie (polarografie) s elektrodami rtuťovými.

Význam elektrod z tuhých materiálů pro voltametrickou analýzu:

- narozdíl od rtuti s nimi lze pracovat při pozitivních potenciálech a stanovovat látky oxidací.
- jejich tvar lze přizpůsobit konstrukci detektoru (např. pro detekci v mikroseparačních metodách).
- lze je použít k stanovování látek v biologických objektech či živých organismech ve formě mikroelektrod.
- na jejich povrch lze navázat různé látky, zpravidla za účelem zvýšení selektivity, specifity stanovení nebo citlivosti tzv. chemicky modifikované elektrody.

Nejběžnějšími tuhými elektrodovými materiály jsou zlato, platina a různé formy uhlíku. Zlato je kov s menšími elektrokalytickými účinky. Platina se vyznačuje výraznými elektrokatalytickými účinky. Elektrody z jiných kovů se spíše používají pro speciální účely, kdy se využívají specifické vlastnosti materiálu, např. stříbra, mědi, atd.

K přípravě tuhých elektrod je používán materiál na bázi uhlíku, z nichž řada má nebo může mít zajímavé vlastnosti z hlediska jejich využití. Elektrody uhlíkové ve srovnání s elektrodami kovovými se vyznačují zbytkovým proudem, nejsou tolik náchylné k oxidaci povrchu a jsou levnější.

2.2.2.1 Uhlíkové elektrody

Pevné uhlíkové elektrody nacházejí v současné době široké využití v elektroanalýze, zejména z důvodu jejich širokého potenciálového okna, nízkého pozadí proudu, chemické netečnosti a nízkých cen. Jsou vhodné pro různé aplikace snímání a detekce. Typ uhlíkové elektrody, jakož i způsob „pretreatmentu“, má zásadní vliv na analytický výkon. Nejoblíbenější uhlíkové elektrody jsou skelný uhlík, uhlíková pasta, uhlíkové vlákno, uhlíkové filmy nebo jiné uhlíkové kompozity, (např. grafit epoxidové pryskyřice). Vlastnosti různých druhů uhlíkových elektrod jsou popsány níže.

- Uhlíková pastová elektroda

Uhlíková pasta CPE (*carbon paste electrode*) je neobyčejně užitečným typem tuhé elektrody. Snadnou obnovou povrchu výměnou pasty je zajištěno poměrně jednoduché obnovování aktivního povrchu elektrody a dodržení dostatečné reprodukovatelnosti (jako se vytlačuje rtuťová kapka u rtuťových elektrod.)

Na přípravu uhlíkové pasty se používá směs uhlíkového prášku a vhodného pojiva (pastová kapalina). Kapalina použitelná pro uhlíkovou pastovou elektrodu musí splňovat následující požadavky:

- malá těkavost, vysoká viskozita
- chemická netečnost
- nemísitelnost s organickými rozpouštědly
- nízká rozpustnost ve vodě

Kapalina, která by splňovala všechny požadavky je např. směs vyšších uhlovodíků, minerální oleje (nejoblíbenějším zástupcem této skupiny je Nujol[®]), silikonové oleje, uplatnění nacházejí i halogenové uhlovodíky (1- bromnaftalen) a organické estery.

Uhlíkovou pastovou elektrodu lze použít i jako pracovní elektrodu v kapalinové chromatografii s elektrochemickou detekcí.

- Skelný uhlík

Skelný uhlík GC (*glassy carbon*) je velmi populární díky svým vynikajícím mechanickým a elektrickým vlastnostem, široký potenciálový interval, chemická netečnost a relativně reprodukovatelné výsledky. Materiál se připravuje z polymerních fenol -

formaldehydových pryskyřic zahříváním v inertní atmosféře. Proces karbonizace probíhá velmi pomalu v rozmezí 300-1200° C, přičemž se odstraní zbytky kyslíku, dusíku a vodíku. Zůstane pouze struktura skelného uhlíku, kdy jednotlivé vrstvy připomínají grafit. Vzhledem k jeho vysoké hustotě a malé velikosti pórů, nevyžaduje impregnační postup. Před měřením se zpravidla čistí pomocí suspenze Al_2O_3 , čímž dojde k vytvoření aktivní a reprodukovatelné skelné uhlíkové elektrody a zvýší se jeho analytická výkonnost.

- **Sít'ovaný skelný uhlík**

Sít'ovaný skelný uhlík zvaný RVC (*reticulated vitreous carbon*) nachází uplatnění ve spektroelektrochemii a v průtokové analýze. Díky vysoké pórovitosti má veliký povrch. RVC klade velmi malý odpor vůči protékající kapalině, 90 – 97% objemu tohoto materiálu představuje tzv. prázdný objem.

- **Elektrody z uhlíkových vláken**

Rostoucí zájem o mikroelektrody vedl k rozsáhlému použití uhlíkových vláken v elektrochemii. Zlepšené výkonnosti přenosu elektronů může být dosaženo především pomocí elektrochemické aktivace, nebo tepelným zpracováním. Většina elektroanalytických aplikací spoléhá na vlákna o průměru 5-30 μm , které zajišťují požadovanou radiální difúzi. Taková vlákna jsou přilepena k měděnému drátku pomocí vodivého lepidla a protáhnuta skleněnou kapilárou. Hlavní výhodou mikrosenzorů uhlíkových vláken je jejich malá velikost (5-20 μm pro komerčně dostupná vlákna), který je dělá velmi atraktivní pro anodická měření v různém mikroprostředí - např. zjišťování neurodegenerativních onemocnění [21, 22].

- **Diamantové elektrody dopované borem BDD** (*boron doped diamond electrodes*) [23]. V poslední době se jako perspektivní elektrodový materiál testuje film uhlíku se strukturou diamantu, který je dopovaný borem pro zavedení elektrické vodivosti. Významnou výhodou borem dopovaných diamantových elektrod je jejich mechanická a chemická stabilita při značně pozitivních potenciálech s nízkým zbytkovým proudem a vysokým přepětím pro vylučování kyslíku, což poskytuje nové možnosti v oblasti stanovení anodicky oxidovatelných látek. Dostatečně široké potenciálové okno je i v oblasti katodické.

2.2.2.2 Kovové elektrody

K dispozici je široký výběr ušlechtilých kovů, platina a zlato patří k nejrozšířenějším kovovým elektrodám. Některé kovové elektrody mohou nabídnout velký anodický potenciálový rozsah. Nevýhodou je vysoké pozadí proudu spojené s tvorbou oxidů nebo adsorbovaných vrstev vodíku na povrchu. Takové filmy mohou také výrazně změnit kinetiku elektrodových reakcí. Povrchové vrstvy jsou méně závažný problém v nevodném prostředí, kde jsou ušlechtilé kovy často ideální volbou. Ostatní kovy jako měď, nikl, stříbro byly použity jako elektrodový materiál v souvislosti s konkrétními aplikacemi, jako je například detekce aminokyselin [24], sacharidů [25, 26] v alkalickém prostředí (měď a nikl), kyanidu [27] nebo sirných sloučenin [28] (zlatá, stříbrná elektroda). Narozdíl od platinové nebo zlaté elektrody, měděné elektrody nabízejí stabilní reakci na sacharidy při konstantním potenciálu.

2.2.3 Chemicky modifikované elektrody

Chemicky modifikované elektrody - CME (*chemically modified electrodes*). V oblasti chemických senzorů je hlavním záměrem modifikace povrchu elektrody zrychlení elektrodového děje, snadnější akumulace látky na povrchu elektrody, snadný přístup analytu nebo naopak znesnadnění přístupu interferujících látek k aktivní ploše elektrody, a tím zlepšení selektivity, citlivosti elektroanalytického měření. Důležitým znakem CME, kterým se liší od běžných pracovních elektrod, je tenká vrstva vybrané chemické látky (modifikátoru) vázané nebo vyloučené na elektrodovém povrchu s cílem dodat elektrodě vhodné elektrické, chemické, elektrochemické či transportní vlastnosti. CME je vyrobena z polovodivého nebo z vodivého materiálu, který je pokryt vybraným polymerním, monomolekulárním či vícemolekulárním filmem chemického modifikátoru.

CME se používají jako potenciometrické, voltametrické elektrody, nejčastěji však jako amperometrické senzory. Odezva CME obsahuje dvě složky: elektrochemickou, řízenou elektrickým potenciálem a speciální chemickou danou reaktivitou navázaného modifikátoru.

Mikrostruktura vrstvy modifikátoru může povrchu elektrody přidat nové mikroprostorové vlastnosti. Způsob navázání modifikátoru ovlivňuje termodynamiku,

kinetiku reakcí, dále transport látky a určuje funkční a skladovací životnost senzoru. Povrch tuhých elektrod se musí před chemickou modifikací očistit a aktivovat. Pro zavedení samotného modifikátoru se využívají omezený počet postupů.

- zabudování vhodného modifikátoru do polymerního filmu pokrývajícího elektrodu
- elektropolymerací v přítomnosti rozpuštěného monomeru
- kovalentní (chemické) navázání modifikátoru na povrch elektrody (zde je důležitá volba vhodné funkční skupiny použitého modifikátoru)
- fyzikální adsorpce, či chemisorpce modifikátoru
- přimícháním modifikátoru do celého objemu materiálu elektrody (tento způsob se uplatňuje především u pastových a kompozitních elektrod)

Při stanovení kovů [29, 30, 31, 32] na CME, ale i při použití katalytických a biokatalytických senzorů se využívají modifikátory s permeabilními vlastnostmi. Permeabilní membrána je propustná rozpouštědlu, složkám analytu, produktům chemické reakce, zamezuje přístupu interferujících látek. Permeabilita se řídí termodynamikou anebo rychlostí difúze. Speciálním případem membrány je membrána permselektivní, která je jen pro ionty určitého náboje anebo velikosti.

Mezi nejčastěji používané polymery k pokrytí elektrody patří polyanionový perfluorosulfonový ionomer Nafion, který se zavedl do praxe se souvislostí se rtuťovou filmovou elektrodou pro analýzu vzorků se složitou maticí (tělní tekutiny). Pracuje jako iontoměnič akumulující kationty a odpuzující anionty. Akumulace kationtů je využitelná pro zcitlivění amperometrického měření. Látky zachycené v Nafionové vrstvě se naráz oxidují pulzem potenciálu, dosáhne se tak zesílené odezvy. Díky účinku záporného náboje a vysoké hustoty polymeru lze využít výborných bariérových účinků Nafionu.

Elektrodu můžeme modifikovat kovy na bázi uhlíkové pasty či skelného uhlíku [33] nebo mikroelektrod [34], lze využít také modifikace pomocí povrchově aktivních látek [35] a fullerenu [36]. Chemicky modifikované elektrody lze využít např. v rozpouštěcí analýze [37].

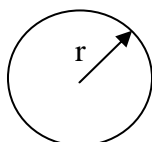
2.2.4 Mikroelektrody

Termín „mikroelektrody”, je zde vyhrazen pro elektrody s rozměrem řádu jednotek až desítek μm . Takové rozměry nabízejí jisté analytické výhody, např. zkoumání mikroskopických domén, měření lokálních koncentračních profilů, detekce v mikroprůtoku a ve velmi úzkých elektroforézních kapilárách nebo analýzu velmi malých objemů vzorků (mikrolitry).

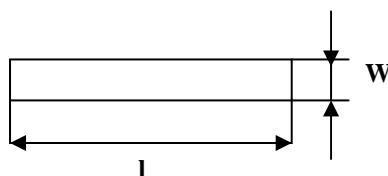
V elektroanalytické chemii jsou využívány pro své malé rozměry, které do jisté míry ovlivňují charakteristický transport látek. Mikroelektrody mohou být různých tvarů. Nejběžnější jsou plošné (z rovin izolantu nevyčnívají do roztoku), diskové, páskové, prostorové (z více stran obklopené roztokem), válcové, sférické mikroelektrody (kulové, polokulové). Mikroelektrody lze používat izolovaně, nebo sdružené o různém počtu do jednoho souboru (řádově od jednotek až po několik tisíc elektrod). Soubory elektrod mohou být uspořádané nebo náhodné [38].

Základní typy mikroelektrod:

rovinné

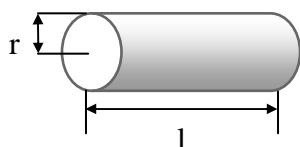


disk

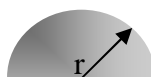


pásek

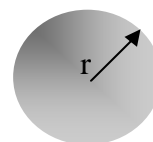
prostorové



válec (vlákno)



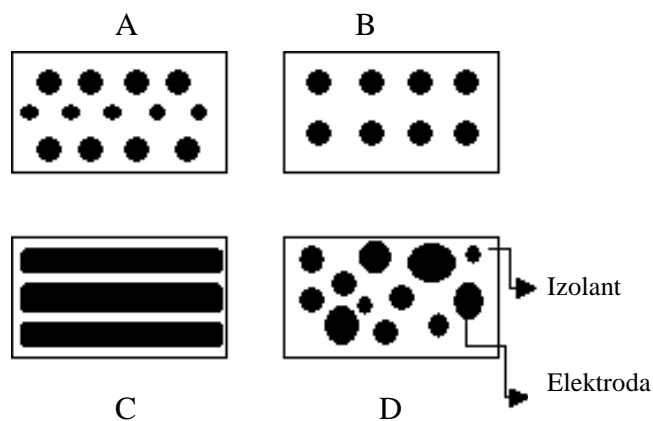
hemisféra



koule

Soubory mikroelektrod:

Základní typy souborů mikroelektrod:



- periodické soubory tvořené diskovými (A, B)
- páskovými (C) elektrodami stejných rozměrů
- náhodné soubory tvořené diskovými elektrodami různých rozměrů (D)

Mikroelektrody vykazují některé důležité vlastnosti, které rozšířily možnosti elektrochemie:

- detekce i v mikroprostoru, kde nejsou přístupné makroskopické elektrody (využití v mikroseparačních metodách).
- možné měření i v málo vodivých prostředích (viskózní roztoky, gely, organická rozpouštědla, živé tkáně atd.)
- s klesajícím rozměrem elektrody roste podíl signál/šum.
- lze rychle měnit potenciál mikroelektrody
- proud procházející mikroelektrodou je vždy větší, než odpovídající proud v daném čase pro planární elektrodu o stejné geometrické ploše za podmínek lineární difúze.
- proud tekoucí souborem mikroelektrod je větší než suma proudů tekoucí izolovanými jednotlivými elektrodami tvořícím systémem

Mikroelektrody a jejich soubory lze připravit mnoha postupy. Prostorové (vláknové) se připravují zatavením či ztmelením (epoxidovou pryskyřicí) vláken z vhodného materiálu (platina, uhlík, zlato, wolfram) do skleněné kapiláry. Ze skla vyčnívá

pouze požadovaná délka vlákna. Pokud se vyčnívající vlákno zároveň odřízne s koncem kapiláry a vyleští se sklo se zataveným vláknem, vznikne izolovaná disková elektroda. Plošné mikroelektrody o různém tvaru, především jejich soubory, jsou vyrobeny metodami vakuového napařování daného materiálu. Soubor plošných mikroelektrod náhodné velikosti a tvaru vzniká dispersí drobných částic vodivého materiálu (uhlíku) v inertním pojidle, jedná se o uhlíkovou pastovou elektrodu. Většina mikroelektrod je z tuhých materiálů, mohou být ale i rtuťové, které se vytváří použitím speciálně upravených polarografických kapilár.

2.3 Stanovení peroxidu vodíku elektrochemicky

Stanovení peroxidu vodíku je důležité v oblasti potravinářství, průmyslu, biologií, farmacii a ve výzkumu životního prostředí [39]. Peroxid vodíku je také často jeden z hlavních produktů enzymatických reakcí [40], jehož detekce je velmi důležitá při vývoji biosenzorů, např. glukosových sensorů, které využívají přeměny glukosy pomocí enzymu glukosoxidasy na peroxid vodíku [41, 42]. První významné dílo o enzymatických modifikovaných elektrodách bylo publikováno v roce 1967 v Nature [43]. V posledních letech počet sensorů pro měření peroxidu vodíku značně vzrostl. Nejvíce používanou metodou pro monitoring peroxidu vodíku je amperometrická detekce na platinové elektrodě [44, 45]. Nanočástice platiny jsou použity i v práci L. Yuana [46] pro vývoj elektrochemických sensorů založených na uhlíkových nanotrubičkách. Po modifikaci glukosaoxidasou výsledný biosenzor umožňoval selektivní stanovení glukózy s vysokou citlivostí $4,49 \mu\text{A m M}^{-1}$, rychlou odezvou 2 s a s nízkým detekčním limitem $0,5 \mu\text{M}$. Shimomur a kol. [47] se zabývali amperometrickým stanovením cholinu s užitím hybridní mesoporézní membrány pro efektivní imobilizaci enzymu cholinoxidasy.

Mezi konvenční metody pro stanovení peroxidu vodíku patří např. fluorescence [48], spektrofotometrie [49], titrační metody [50, 51] a chemiluminiscence [52, 53, 54], které jsou obecně časově náročné. Elektrochemická metoda [55] patří mezi perspektivní, vzhledem k její relativní jednoduchosti, rychlé detekci, nízké spotřebě činidel, vysoké selektivitě a citlivosti.

Ke stanovování peroxidu vodíku může docházet v oblasti anodické či katodické. V anodické oblasti jsou často používány senzory s platinovou elektrodou. Katodický režim

je zejména vhodný pro stanovení peroxidu vodíku v biologických matricích, v této potenciálové oblasti stanovení obvykle probíhá bez rušivých interferencí, způsobených např. askorbátem nebo kyselinou močovou, které jsou přítomné ve vysokých koncentracích např. v tělních tekutinách, buněčných lyzátech apod.

Jako elektrodový materiál pro pracovní elektrody se mohou použít různé formy uhlíku. Elektrodová kinetika na těchto pevných elektrodách je pomalá, ke zvýšení rychlosti reakce je potřeba povrch elektrody namodifikovat, např. použitím oxidu železitého [13]. V práci, kterou publikoval R. C. Peña a kol. [56] je uvedena amperometrická detekce peroxidu vodíku s využitím skelné uhlíkové elektrody modifikované hexakynoželeznatanem ruthenitým, kdežto Razmi a kol. [57] modifikuje uhlíkovou elektrodu olovem a zabývá se interferencí dopaminu, kyseliny močové a askorbové při stanovení peroxidu vodíku. Senzor vykazuje v této práci výbornou reprodukovatelnost a dobrou stabilitu. Další publikována práce zabývající se amperometrickým stanovením peroxidu vodíku je práce Somasundruma a kol. [15] s využitím modifikovaného měděného senzoru při potenciálu $-0,8 - 0,3V$ vs. SCE. Le Wen-Zhi a kol. [16] ve své práci také použili mědí modifikovaný elektrochemický senzor pro stanovení peroxidu vodíku, nano-oxid mědnatý byl depozicí nanesen na skelnou uhlíkovou elektrodu z roztoku $CuCl_2$ při konstantním potenciálu $-0,4 V$. Mechanismus tvorby měděného filmu na povrchu senzoru a faktory ovlivňující elektrochemické činnosti byly zkoumány pomocí cyklické voltametrie, elektrochemické spektroskopie a skenovací elektronové mikroskopie. Senzor byl úspěšně použit k měření peroxidu vodíku ve vodě, kdy vykazoval vysoké analytické citlivosti a reprodukovatelnost.

Často používanou metodou monitorování peroxidu vodíku je amperometrická detekce na modifikované platinové elektrodě, kterou využíval ve své práci např. Zambonin a kol. [58], kde jsou využity kinetické studie pro detekci peroxidu vodíku v reakční směsi, ve velmi nízkých koncentracích (mikromolární), k detekci peroxidu vodíku dochází během několika sekund při potenciálu $0,7 V$ vs. $Ag/AgCl$. Dále je uváděn vliv askorbátu na citlivost elektrody. Mikroelektroda nadeponovaná platinou je také zmíněná i v práci S. A. G. Evanse a kol. [59]. Díky této platinové mezoporézní vrstvě je elektroda vynikajícím amperometrickým senzorem pro detekci peroxidu vodíku v širokém rozsahu koncentrací. Elektroda díky získání velkého povrchu depozicí kovů vykazuje značné zvýšení katalytické činnosti. Studie katalytických vrstev platiny na uhlíkových elektrodách metodou cyklické voltametrie jsou popsány Vanýskem a kol. [60], vytvořená platinová

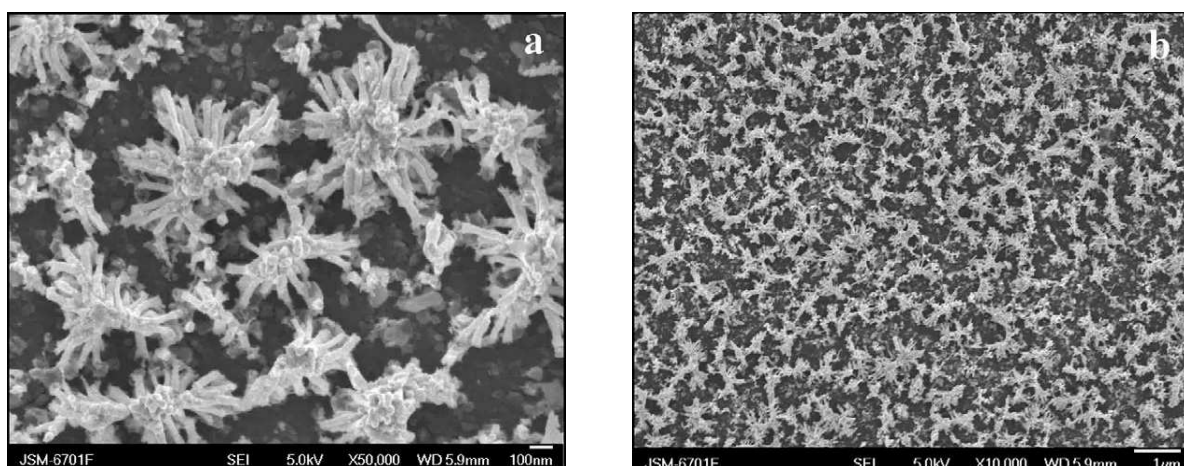
plocha je zde velmi aktivní a taková elektroda je výborný kandidát pro výzkum činnosti palivových článků.

Velice zajímavou práci uveřejnil v roce 2007 A. R. Layson a M. R. Columbia [61], kteří se zabývali nanášením platiny na povrch elektrody. Depozice platiny byla provedena z roztoků K_2PtCl_6 a $Pb(C_2H_3O_2)_2$. K podrobnému studiu morfologie platinových filmů byla použita skenovací elektronová mikroskopie a skenovací tunelová mikroskopie. Podobná studie byla od A. C. Hilla a kol. [62], kteří zkoumali vliv olova na morfologii platiny. Platinové filmy byly připraveny elektrochemicky z 10 mM H_2PtCl_6 a následně podrobeny mikroskopické analýze pomocí skenovací elektronové mikroskopie a skenovací tunelové mikroskopie. Povrch elektrody byl deponován při potenciálu -250 a -1000 mV (vs. Ag/AgCl) z roztoků obsahující tři různé koncentrace roztoku olova $Pb(C_2H_3O_2)_2$ 0; 0,05 a 0,4 mM. Přítomnost olova má vliv na morfologii platiny potlačováním agregace. Olovo působí proti zvýšené povrchové difúzi atomů platiny vyplývající z interakce mezi nimi a chloridovými ionty na rozhraní elektroda/roztok.

Stříbrné elektrody v poslední době získaly obrovský význam jako senzory pro stanovení peroxidu vodíku v amperometrické katodové oblasti. Nanočástice stříbra nanesená přímo na uhlíkovou elektrodu, nebo stříbrné částice obsažené v různých maticích byly použity jako aktivní součást většiny senzorů. Welch a kol. [63] publikovali práci, kde nanočástice stříbra byla chemickou depozicí nanesena na skelnou uhlíkovou elektrodu. Detekční limit této modifikované stříbrné mikroelektrody byl $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ve fosfátovém pufru (pH 7,4). Citlivost elektrody k redukci peroxidu vodíku byla prokázána řadou cyklických voltamogramů peroxidu vodíku v milimolárních koncentracích. Práce A. Safavi a kol. [64] poskytuje informace o elektrochemickém stanovení peroxidu vodíku na elektrodě s nanočásticemi stříbra. Hlavním cílem této práce bylo modifikovat elektrodu nanočásticemi stříbra pro přímou detekci peroxidu vodíku. Elektrokatalytické vlastnosti nanočástic stříbra závisí na jejich rozměru a morfologii. Upravená elektroda měla nízký detekční limit, dobrý lineární rozsah a výbornou reprodukovatelnost. Yang a kol. [65] uvádí možnost konstrukce vysoce citlivého senzoru peroxidu vodíku, s kombinací elektrokatalytických účinků nanočástic stříbra a uhlíkových nanotrubiček. Ve studii Wanga a kol. [66] bylo testováno použití stabilizátoru s nanočásticemi stříbra v pórech mezoporezního křemíku. Výsledný modifikovaný senzor je vhodný pro detekci peroxidu vodíku a další aplikace. Práce P. Yuana a kol. [67] je ukázkovým příkladem stříbrných nanočástic a HRP. Výsledný senzor získaný

adsorpcí HRP vykazuje dobré katalytické schopnosti. Lian a kol. [68] použili zdrsnění stříbrné elektrody při potenciálu 0,3 a -0,3 V vs. Ag/AgCl v roztoku KCl a demonstrovali elektrokatalytickou činnost k přidavkům peroxidu vodíku.

Dosažení požadovaných nanostruktur na povrchu elektrody je zajišťováno elektrodepozicí [69] z roztoků solí v přítomnosti kapalně povrchově aktivní látky. Povrchově aktivní látka vytváří hexagonální kapalně krystalickou fázi. Tato technika byla nejprve popsána Evansem a kol. [59], který připravil platinové elektrody z vodného roztoku obsahujícího hexachloroplaticitou kyselinu a oktaethylen glykol monohexadecyl éter. Použitá povrchově aktivní látka tvořila hexagonálně kapalnou krystalickou strukturu na povrchu elektrody. Platina byla vylučována v prostoru mezi jednotlivými hexagony. Podobné výsledky získal a Park a kol. [70], kdy byl oktaethylen glykol monohexadecyl éter nahrazen dostupnější chemikálií Tritonem X-100.



Obr.4: SEM snímky povrchu elektrody modifikované mezoporézní platinou [71]

Surfaktant Triton X-100, byl použit např. v pracích V. Ganeshe a kol. [72], L. Coppoly a kol. [73]. Triton X-100 byl použit také v práci, kterou uveřejnili X. Liu a kol. [74]. Mezi další často užívané povrchově aktivní látky můžeme zařadit Pluronic F127, kterého ve svých pracích využívali např. autoři B. C. Anderson [75], A. K. Sahu [76].

Elektrody pro stanovení peroxidu vodíku byly chráněné vrstvou Nafionu, které byly publikovány ve studiích Hsu a kol. [77]. Nafionem modifikované paladiové elektrody dosáhly stabilní reakce odezvy. Interference na kyselinu askorbovou byly pomocí Nafionové vrstvy výrazně sníženy. M. Liu a kol. [78] zmiňují ve své práci zlatou elektrodu ochráněnou vrstvou Nafionu pro stanovení serotoninu v přítomnosti vysoké koncentrace

dopaminu, kyseliny askorbové a kyseliny močové. Elektrokatalýza serotoninu na Nafionu byla prokázána pomocí cyklické voltametrie v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,4). Vyvinutá metoda byla úspěšně aplikována na stanovení serotoninu v krevních destičkách a v mozku myši. Bidkorbeh a kol. [79] použili skelnou uhlíkovou elektrodu s vrstvou Nafionu pro elektrochemické stanovení naltrexonu. Byl vyvinut elektrochemický senzor pro detekci naltrexonu v lékové formě a v lidské plazmě. Naltrexon je opiod, který je běžně používán pro léčbu závislosti omamných látek a závislosti na alkoholu.

Nejpoužívanějším modifikátorem pro detekci peroxidu vodíku je Berlínská modř. Autoři práce z roku 2009 [12] zkonstruovali senzor pro stanovení peroxidu vodíku založený na modifikaci Berlínskou modří, který poskytuje efektivní přístup k řízení citlivosti amperometrických biosenzorů. Vhodným modifikátorem pro vývoj amperometrického senzoru je také HRP jak uvádí H. Kim a kol [80].

3 Experimentální část

3.1 Používané chemikálie

- AgNO_3 (Sigma – Aldrich)
- K_2PtCl_6 (Sigma – Aldrich)
- 3% H_2O_2 (Sigma – Aldrich)
- NaCl (Sigma – Aldrich)
- Nafion[®] 117 (Fluka)
- Pluronic F127 (Sigma – Aldrich)
- Triton X 100 (Sigma – Aldrich)
- Kys. askorbová (Sigma – Aldrich)
- Kys. močová (Sigma – Aldrich)
- N-(4-hydroxyfenyl)acetamid
(paracetamol, acetaminophen) (Sigma – Aldrich)
- Epoxidová pryskyřice (CHS Epoxy 1200, Sindat, Plzeň, ČR)
- Vodivé epoxidové lepidlo (Epotek H20E, Polytec, Německo)
- Uhlíkové vlákno 7 μm (Ten Cate Advanced Composites, Amsterdam, Holandsko)

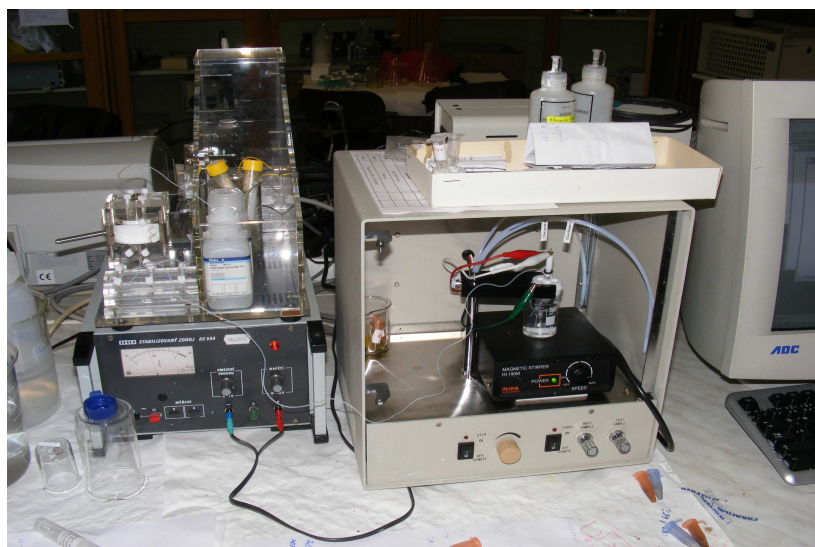
Všechny použité chemikálie byly v kvalitě p.a.

3.2 Používané roztoky

- 0,1M Britton – Robinsonův pufr o pH 2 až 12 (universální pufr obsahuje směs 0,04 M H_3PO_4 , 0,04 M H_3BO_3 , 0,04 M CH_3COOH , jehož hodnota pH je upravována pomocí 0,2 M NaOH)

3.3 Přístrojové vybavení

- CH Instruments elektrochemická pracovní stanice Model 660- C
- Potenciostat vlastní výroby řízený převodníkovou kartou National Instruments PCI 6251- E se softwarem Labview
- Pomocná platinová elektroda
- Referentní Ag/AgCl elektroda (MF-2052, Bioanalytical Systems, USA)
- Automatický dávkovač (autosampler)
- Scanovací elektronový mikroskop (SEM) Hitachi SU – 6600



Obr. 5: Elektrochemická pracovní stanice CH Instruments Model 660- C. Připojen je automatický dávkovač.

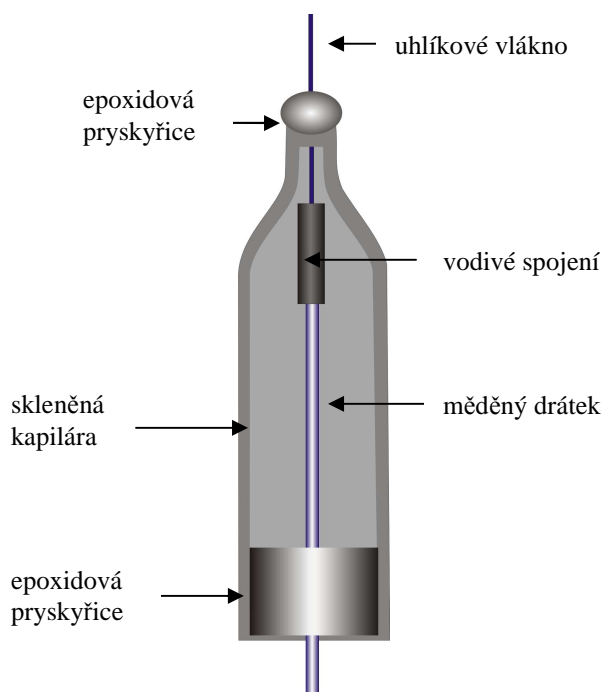
3.4 Vývoj senzorů

Vývoj amperometrického senzoru pro detekci peroxidu vodíku zahrnuje několik kroků:

- konstrukce mikroelektrody
- očištění vlákna mikroelektrody
- nanášení mezoporézních vrstev kovů pomocí elektrochemické depozice
- stabilizace a ochrana elektrody – nanesení ochranných vrstev Nafionu

3.4.1 Konstrukce mikroelektrody

Uhlíkové vlákno o průměru 7 μm bylo pomocí vodivého epoxidového lepidla (H20E, Epotek, USA) přilepeno k měděnému drátku, který byl předtím očištěn zahřátím v plameni lihového kahanu a následným ponořením do ethanolu. Spoj uhlíkového vlákna a drátku byl vytvrzen při 170° C po dobu 10-15 minut. Drátek s vláknem byl vložen do připravené skleněné kapiláry, tak aby uhlíkové vlákno vyčnívalo cca 5 mm z kapiláry. Oba konce kapiláry byly zakápnuty epoxidovou pryskyřicí. Elektroda byla pozvolna sušena za pokojové teploty v bezprašném prostředí do druhého dne.



Obr. 6: Uhlíková mikroelektroda

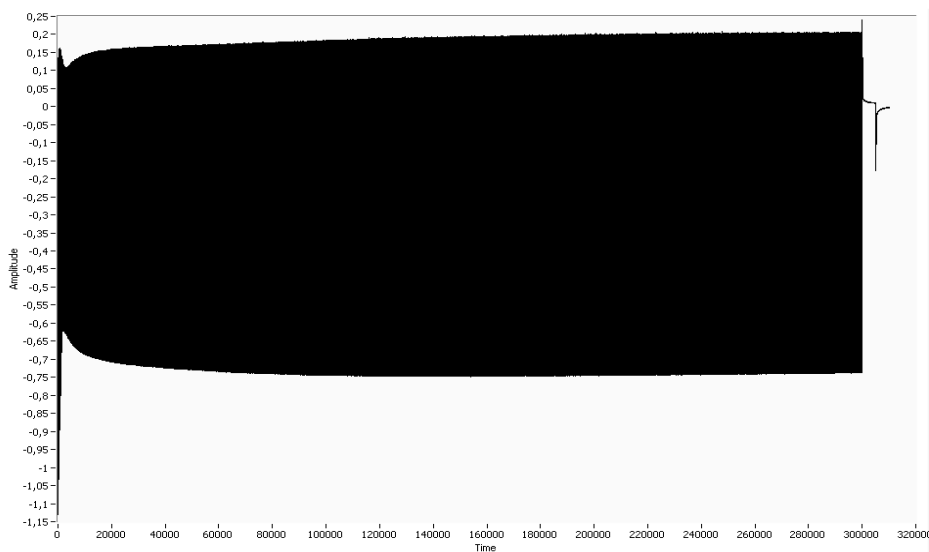
3.4.2 Očištění elektrody

Před použitím mikroelektrody je nutné její odmaštění a očištění, které je realizováno 10 sekundovou sonifikací v dichlormethanu, při níž se zbavíme hrubých mechanických nečistot a mastnoty na povrchu uhlíkového vlákna. U vybraných elektrod bylo použito i elektrochemického očištění pomocí tzv. „pretreatmentu“.

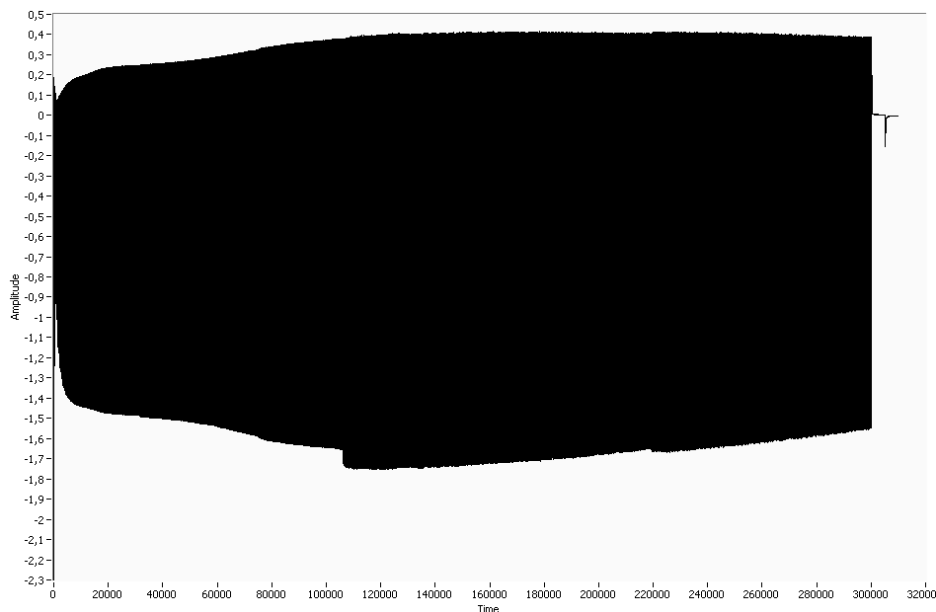
Pretreatment je elektrochemická metoda úpravy uhlíkového vlákna, která spočívá v aktivaci elektrody a v úpravě jejího povrchu. Účelem pretreatmentu je jednak zbavení se nečistot absorbovaných na povrchu uhlíkového vlákna elektrody, dále zvýšení její citlivosti, selektivity a stability. Pretreatment je kombinovaný děj elektrooxidační a elektroredukční [81].

Pro provedení pretreatmentu bylo využíváno aparatury složené z elektrochemické cely, Faradayovy klece a potenciostatu ovládaný počítačem. Očištění mikroelektrody bylo prováděno vložením elektrody do 1 % roztoku NaCl, kdy spolu s referentní elektrodou Ag/AgCl a platinovou pomocnou elektrodou byly připojeny k potenciostatu. Byl vkládán potenciálový program s proměnným potenciálem 50 Hz a cyklováním mezi 0 – 2,9 V po dobu 20 sekund, poté byl vložen konstantní potenciál – 0,8V po dobu 5 s a 1,5 V, také 5 s.

V grafu 7, 8 jsou uvedeny hodnoty závislosti proudu na čase při aktivaci uhlíkového vlákna elektrody v roztoku 1% NaCl proti Ag/AgCl (0 – 2,9 V po dobu 30 sekund).



Obr. 7: Záznam pretreatmentu funkční elektrody



Obr. 8: Záznam pretreatmentu nefunkční elektrody

3.4.3 Elektrochemické depozice

Samotná elektrochemická depozice a následné testování senzorů bylo prováděno při konstantním potenciálu za použití potenciostatu v klasickém tříelektrodevém zapojení - argentochloridová referenční elektroda, platinová pomocná elektroda a pracovní uhlíková vláknová elektroda. Soustava elektrod byla po dobu elektrodepozice ponořena do depoziční lázně a na elektrody byl vložen depoziční potenciál. Elektrochemická depozice kovů ze samotného roztoku jejich solí nepřinášela dobré výsledky z hlediska citlivosti senzoru na peroxid vodíku. Pro zvýšení citlivosti senzorů byly zkoušeny různé povrchově aktivní látky (Tween 20, 40, 60, 80, Triton X-100, Pluronic F127).

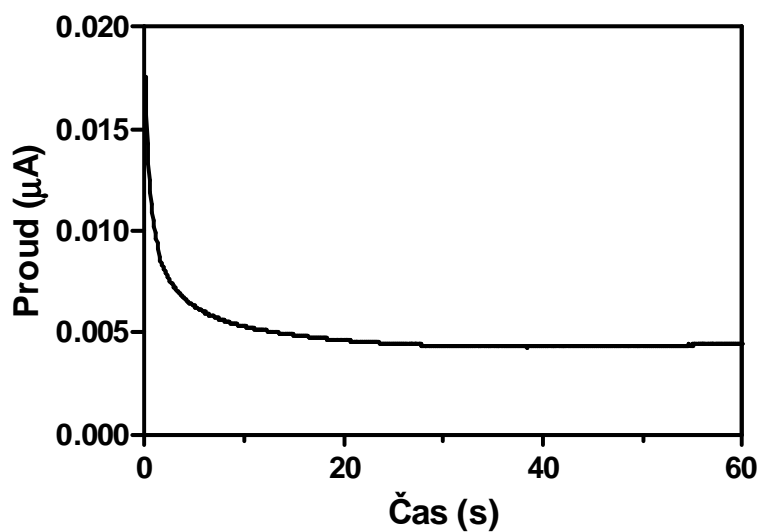
Jakmile byl požadovaný kov nadeponován na uhlíkové vlákno mikrosenzoru následovalo vymytí povrchově aktivní látky dostatečným množstvím destilované vody, po vysušení bylo uhlíkové vlákno pokryto ochrannou vrstvou 5% roztoku Nafionu.

- **Elektrodepozice platiny na uhlíkovém vláknu**

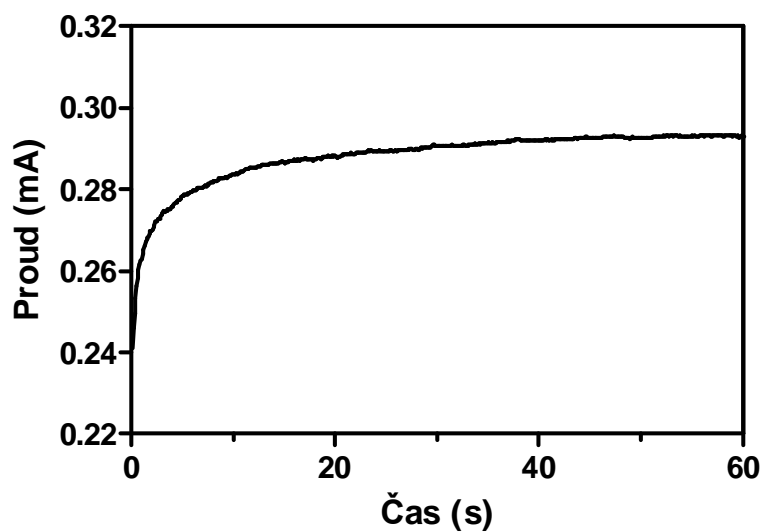
Pro vývoj optimálního složení depoziční lázně bylo testováno několik povrchově aktivních látek (Tween 20, 40, 60, 80, Triton X-100, Pluronic F127) a prostředí (vodné prostředí, prostředí kyselin: kyselina chlorovodíková, kyselina dusičná, kyselina octová) v kombinaci s hexachloroplatičitanem draselným (K_2PtCl_6). Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití lázně o následujícím složení: 0,01 M hexachloroplatičitan draselný s povrchově aktivní látkou Triton X-100, jejíž koncentrace v roztoku činila 25%. Všechny experimenty nanášení mezoporezních struktur platiny na uhlíkové vlákno byly provedeny elektrochemickou depozicí při konstantním potenciálu -200 mV po dobu 60 sec. (vs. Ag/AgCl), viz. graf 1.

- **Elektrodepozice stříbra na uhlíkovém vláknu**

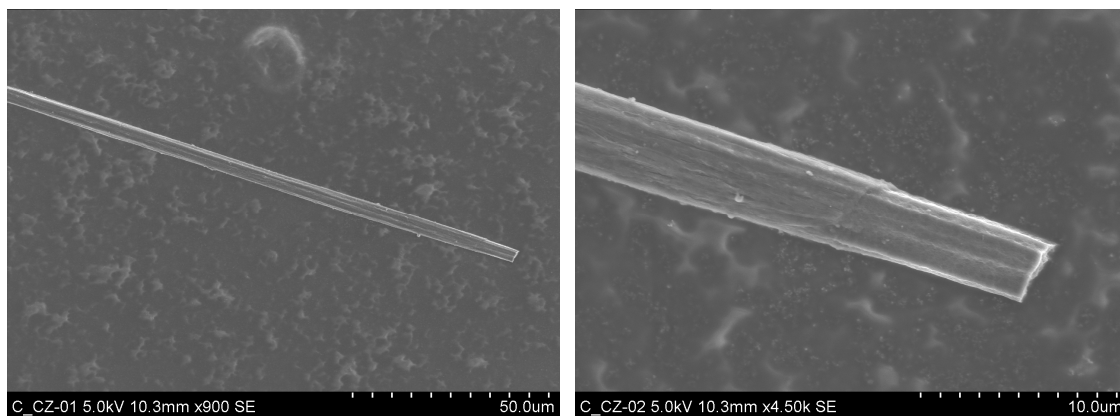
Nejlepších výsledků depozice bylo dosaženo s použitím povrchově aktivní látky Pluronic F127. Ve všech následujících experimentech byla stříbrná vrstva na uhlíkové vlákno mikroelektrody nanášena pomocí elektrochemické depozice v 0,08 M roztoku dusičnanu stříbrného s obsahem povrchově aktivní látky 25% Pluronic F127. Depozice stříbra byla provedena po dobu 60 sec za konstantního potenciálu -300 mV (vs. Ag/AgCl), viz. graf 2. Oba tyto postupy elektrodepozice poskytovaly optimální a dobře reprodukovatelné výsledky. Morfologie kovových povlaků nanášených na uhlíková vlákna byla zkoumána pomocí scanovacího elektronového mikroskopu. Na obr. 9, 10, 11 jsou snímky pořízené scanovacím elektronovým mikroskopem: obr. 9 je ukázka čistého vlákna bez elektrochemické depozice, obr. 10 ukazuje uhlíkové vlákno mikroelektrody pokryté částicemi platiny a obr. 11 uhlíkové vlákno mikroelektrody pokryté částicemi stříbra.



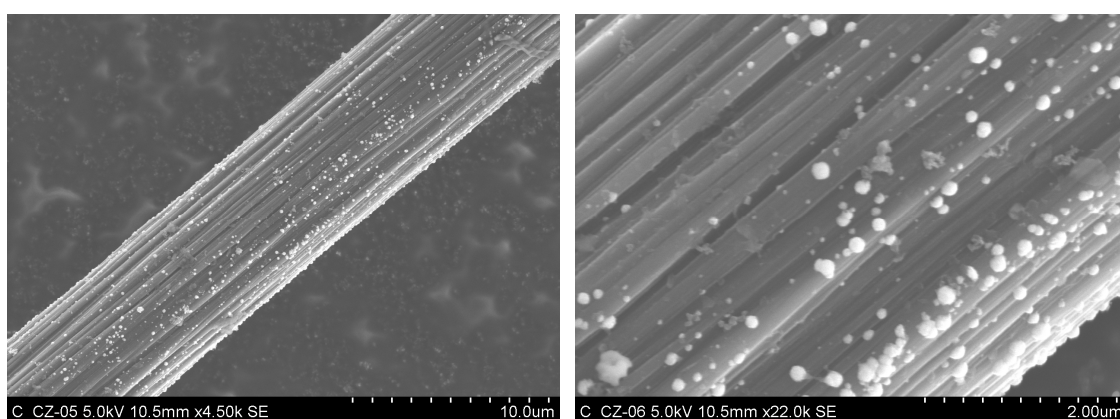
Graf 1: Průběh proudu v závislosti na čase při depozici platiny na uhlíkovou mikroelektrodu („depoziční křivka“) z roztoku 0,01 M K_2PtCl_6 s 25% (w/w) Triton X-100, při potenciálu -200 mV vs. Ag/AgCl po dobu 60 sekund.



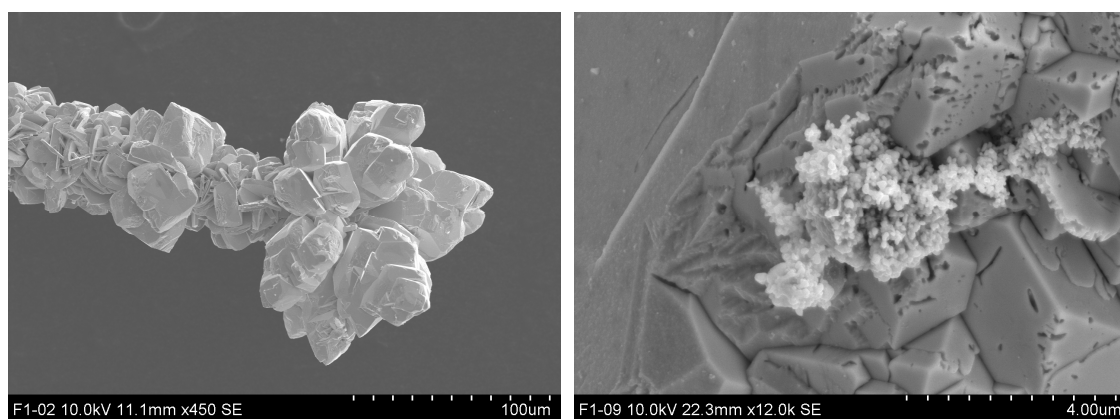
Graf 2 : Průběh proudu v závislosti na čase při depozici stříbra na uhlíkovou mikroelektrodu („depoziční křivka“) z roztoku 0,08 M $AgNO_3$ s 25% (w/w) Pluronic F127, při potenciálu -300 mV vs. Ag/AgCl po dobu 60 sekund.



Obr. 9: SEM snímky uhlíkového vlákna mikroelektrody bez elektrochemické depozice



Obr. 10: SEM snímky uhlíkového vlákna mikroelektrody pokryté platinovými částicemi



Obr. 11: SEM snímky uhlíkového vlákna mikroelektrody pokryté stříbrnými částicemi

3.5 Testování senzorů

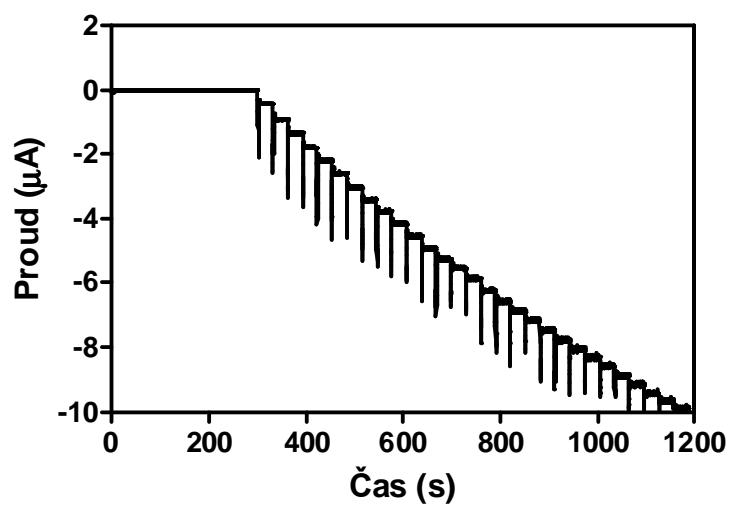
Testování senzorů bylo prováděno za konstantního potenciálu v míchaném roztoku metodou amperometrie. Testované elektrody byly ponořeny do kádinky obsahující 25 ml Britton-Robinsonova pufru. Stabilní hydrodynamické podmínky byly udržovány po celou dobu měření pomocí magnetického míchadla rotujícího cca. 300 ot/min. Všechna měření byla provedena při pokojové teplotě (25° C).

4 Výsledky a diskuse

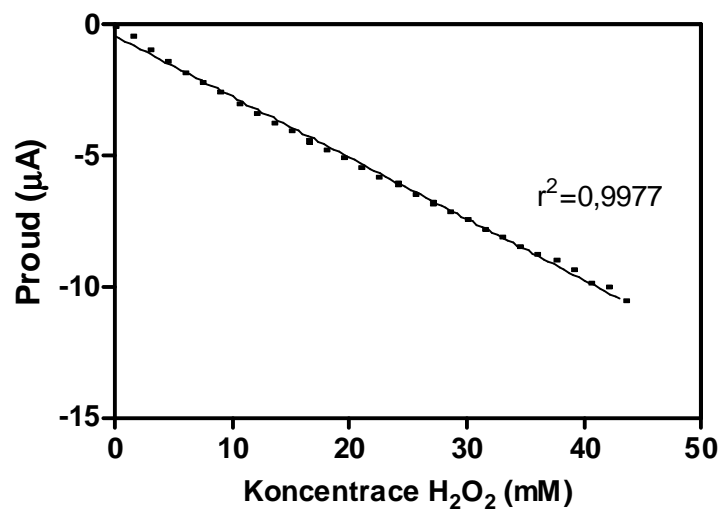
4.1.1 Amperometrické stanovení peroxidu vodíku

Amperometrické měření bylo provedeno v míchaném roztoku Britton-Robinsonova pufru (pH 7). Na platinovou elektrodu byl vložen konstantní potenciál 700 mV vs. Ag/AgCl, na stříbrnou elektrodu konstantní potenciál 0 a dále -400 mV vs. Ag/AgCl. Po ustavení proudové linie byly provedeny nástřiky 25 μ l 3% peroxidu vodíku (tj. 1 přídavek = 1,5 mM) pro platinovou elektrodu, 20 μ l 3% peroxidu vodíku pro stříbrnou elektrodu (tj. 1 přídavek = 1 mM). Počet nástřiků peroxidu vodíku bylo 20 až 80 pomocí automatického dávkovače – autosampleru. Záznam amperometrické křivky pro platinovou a stříbrnou uhlíkovou elektrodu je v grafu 3, 5. Je patrné, že platinová elektroda byla citlivá, s lineární odezvou do vysokých koncentrací peroxidu vodíku, stejně jako stříbrná uhlíková elektroda při potenciálu 0 mV. Kdežto při použití potenciálu -400 mV, stříbrná uhlíková elektroda vykazovala sice značnou citlivost, ale proudová odezva na přídavek peroxidu vodíku nebyla lineární.

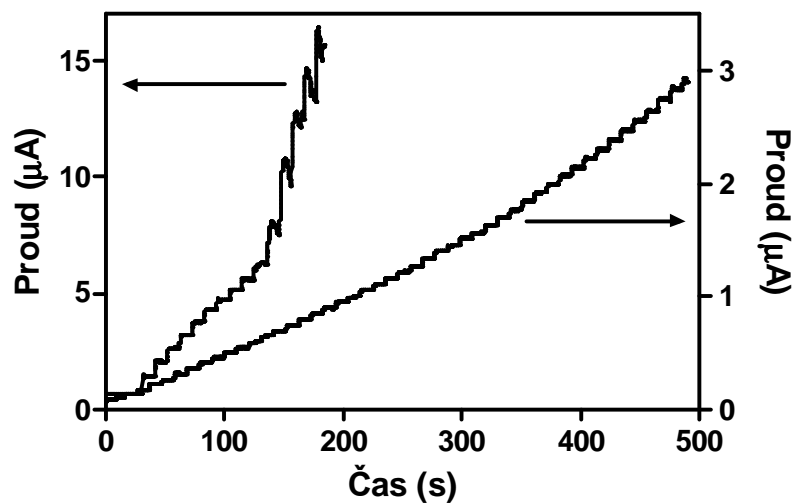
Účinnost senzoru ke stanovení peroxidu vodíku závisela na složení elektrochemické depoziční lázně. Dle typu použité povrchově aktivní látky jsme pozorovali rozdílnou proudovou odezvu senzoru. V grafech 7, 8 je vidět důležitost použití vhodné povrchově aktivní látky pro daný senzor. Pro platinovou elektrodu byla jako nejvhodnější povrchově aktivní látka vybrána Triton X-100, pro stříbrnou elektrodu Pluronic F127.



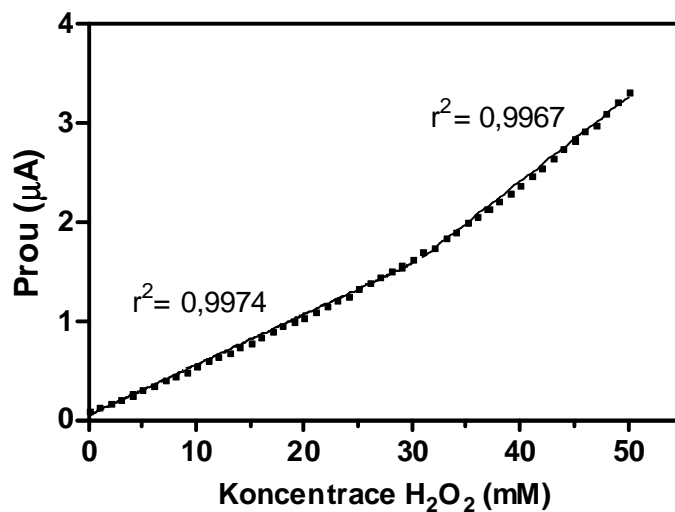
Graf 3: Amperometrické odezvy pro platinovou elektrodu na rostoucí koncentraci peroxidu vodíku. Nástřiky 25 µl 3% peroxidu vodíku (tj. 1 přidavek = zvýšení koncentrace H_2O_2 o 1,5 mM). Měřeno v míchaném Britton-Robinsonově pufru (pH 7), při potenciálu 700 mV vs. Ag/AgCl.



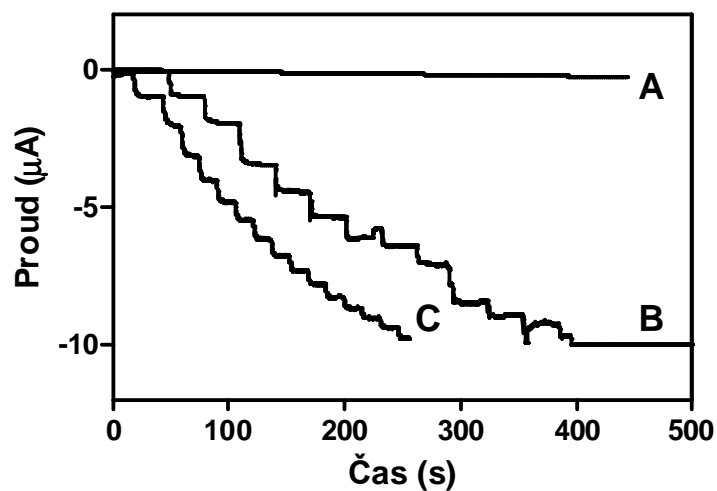
Graf 4: Kalibrační křivka proudové odezvy pro platinovou elektrodu na rostoucí koncentraci peroxidu vodíku. Měřeno v míchaném Britton-Robinsonově pufru (pH 7), při potenciálu 700 mV vs. Ag/AgCl.



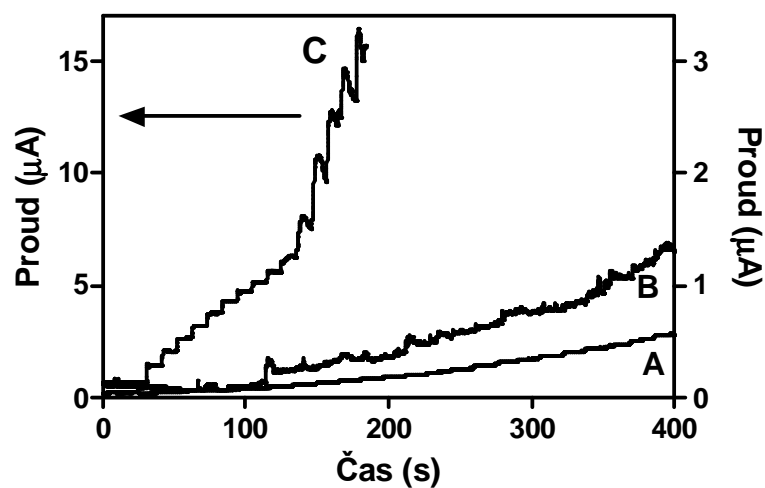
Graf 5: Amperometrické odezvy pro stříbrnou elektrodu na rostoucí koncentraci peroxidu vodíku. Nástřiky 20 μl 3% peroxidu vodíku (tj. 1 přidavek = zvýšení koncentrace H_2O_2 o 1 mM). Měřeno v míchaném Britton-Robinsonově pufru (pH 7), při potenciálu 0 mV (pravá osa Y) a -400 mV vs. Ag/AgCl (levá osa Y).



Graf 6: Kalibrační křivka proudové odezvy pro stříbrnou elektrodu na rostoucí koncentraci peroxidu vodíku. Měřeno v míchaném Britton-Robinsonově pufru (pH 7), při potenciálu 0 mV vs. Ag/AgCl.



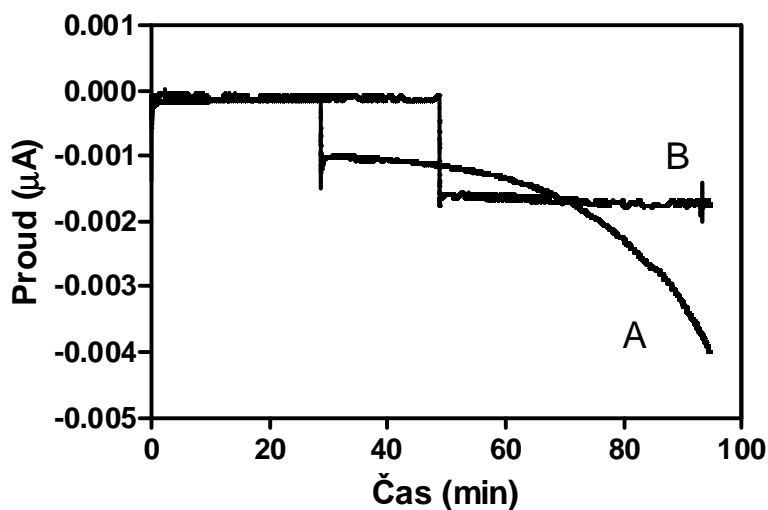
Graf 7: Amperometrické odezvy pro platinovou elektrodu na rostoucí koncentraci peroxidu vodíku. Měřeno v míchaném Britton-Robinsonově pufru (pH 7), při potenciálu 700 mV vs. Ag/AgCl. Rozdílné složení depoziční lázně: bez přítomnosti povrchově aktivní látky (A), s použitím povrchově aktivní látky Pluronic F127 (B), Triton X-100 (C).



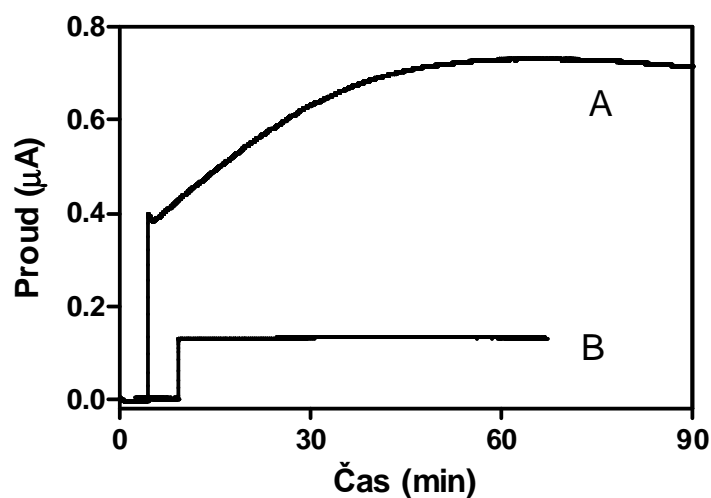
Graf 8: Amperometrické odezvy pro stříbrnou elektrodu na rostoucí koncentraci peroxidu vodíku. Měřeno v míchaném Britton-Robinsonově pufru (pH 7), při potenciálu 0 mV (pravá osa Y) a -400 mV vs. Ag/AgCl (levá osa Y). Rozdílné složení depoziční lázně: bez přítomnosti povrchově aktivní látky (A), s použitím povrchově aktivní látky Triton X-100 (B), Pluronic F127(C).

4.1.2 Časová stabilita odezvy senzoru

Na elektrodu byl vložen konstantní potenciál. Experiment probíhal po dobu několik desítek minut poté, co byl proveden nástřik 200 μl 3 % peroxidu vodíku v míchaném roztoku Britton-Robinsonova pufru (pH 7). Bylo sledováno chování elektrod bez pokrytí a s pokrytím elektrody ochrannou vrstvou Nafionu. V obou případech grafů 9, 10 vidíme časovou stabilitu pro platinovou a stříbrnou uhlíkovou elektrodu. Z daných grafů je zřejmá zlepšená stabilizace proudové linie, díky pokrytí elektrody ochrannou vrstvou Nafionu (**B**).



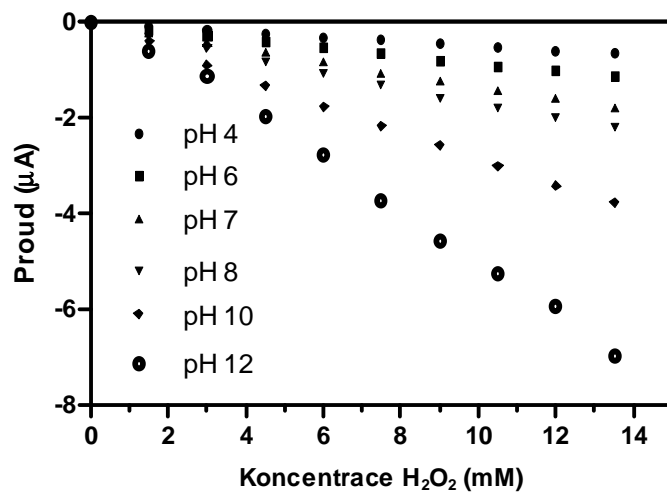
Graf 9: Amperometrická odezva na přidavek 20 mM 3% peroxidu vodíku. **A**: platinované uhlíkové vlákno, **B**: identicky připravená elektroda pokrytá ochrannou vrstvou Nafionu. Měření bylo provedeno v míchaném Britton-Robinsonově pufru (pH 7), při potenciálu 700 mV vs. Ag/AgCl.



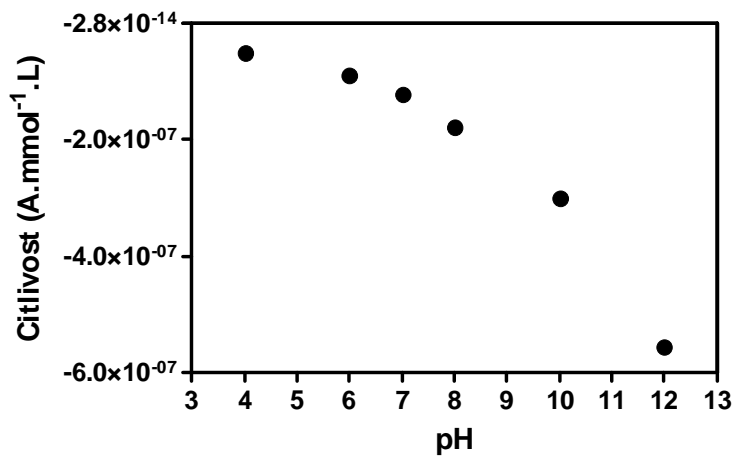
Graf 10: Amperometrická odezva na přidavek 20 mM 3% peroxidu vodíku. **A:** stříbrné uhlíkové vlákno, **B:** identicky připravená elektroda pokrytá ochrannou vrstvou Nafionu. Měření bylo provedeno v míchaném Britton-Robinsonově pufru (pH 7), při potenciálu 0 mV vs. Ag/AgCl.

4.1.3 pH závislost odezvy senzoru

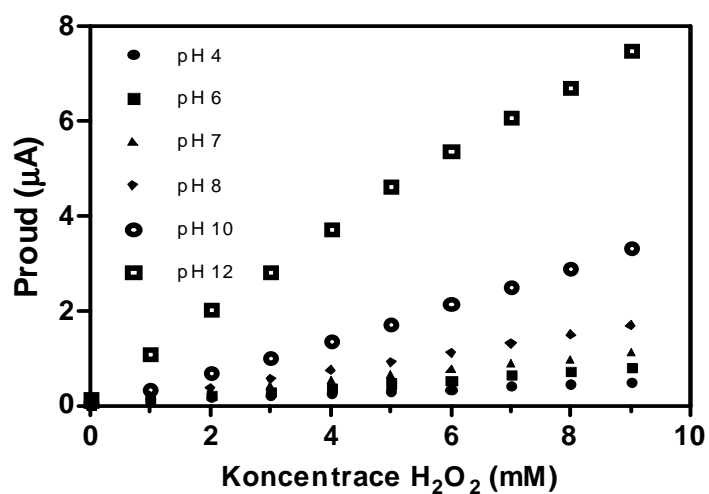
Amperometrické měření bylo prováděno v míchaném roztoku Britton-Robinsonově pufru, v rozmezí hodnot pH 4-12, s konstantními přídávky 3% peroxidu vodíku. Pro platinovou elektrodu bylo měřeno při potenciálu 700 mV vs. Ag/AgCl, pro stříbrnou elektrodu při potenciálu 0 mV vs. Ag/AgCl. Platinová i stříbrná elektroda poskytovala výbornou proudovou odezvu v širokém rozmezí pH (pH 4-12). S rostoucí hodnotou pH, rostla proudová odezva na peroxid vodíku. Nejlepší odezva senzoru na přídávky peroxidu vodíku byla v nejjzákladnějším použitém prostředí, v pH 12. Proudová odezva je však dostatečná i v pH 7, standardní pH biologických vzorků. Příslušná data proudových odezev uhlíkových platinových a stříbrných elektrod v závislosti na pH jsou znázorněna v následujících grafech 11 až 14.



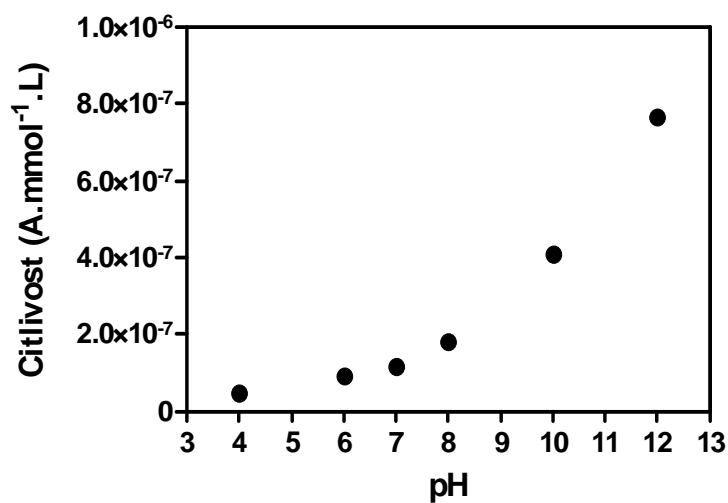
Graf 11: Kalibrační křivky pro detekci peroxidu vodíku na platinové uhlíkové elektrodě. Měřeno v míchaném Britton-Robinsonově pufru, při potenciálu 700 mV vs. Ag/AgCl pro každou hodnotu pH.



Graf 12: Závislost směrnic kalibračních křivek pro peroxid vodíku v rozmezí koncentrací 0-13 mM H₂O₂ na pH, měřeno na platinované uhlíkové elektrodě v míchaném Britton-Robinsonově pufru, při potenciálu 700 mV vs. Ag/AgCl.



Graf 13: Kalibrační křivky pro detekci peroxidu vodíku na stříbrné uhlíkové elektrodě. Měřeno v míchaném Britton-Robinsonově pufru, při potenciálu 0 mV vs. Ag/AgCl pro každou hodnotu pH.



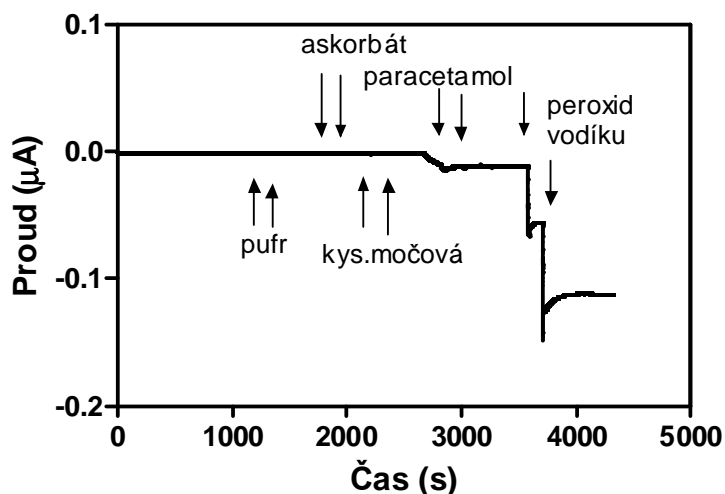
Graf 14: Závislost směrnice kalibračních křivek pro peroxid vodíku v rozmezí koncentrací 0-9 mM H₂O₂ na pH, měřeno na stříbrné uhlíkové elektrodě v míchaném Britton-Robinsonově pufru, při potenciálu 0 mV vs. Ag/AgCl.

4.1.4 Selektivita a detekční limity senzoru

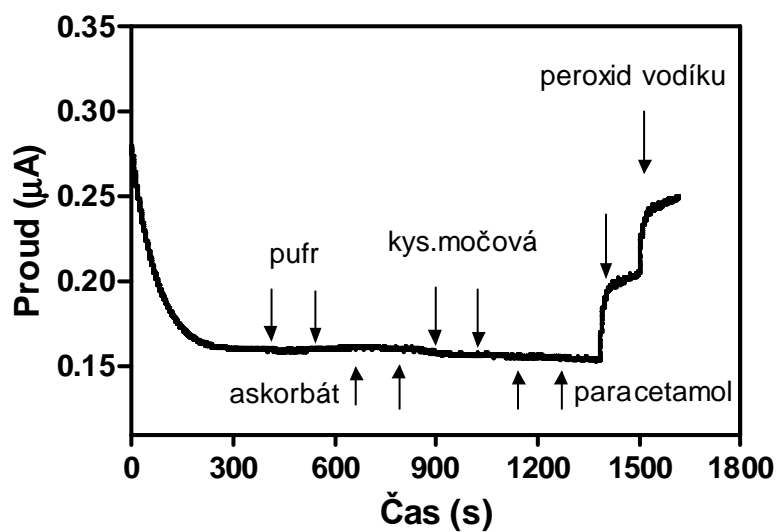
Při testování selektivity senzorů byly vybrány jako modelové interferující látky kyselina askorbová, kyselina močová a paracetamol, které představují možné interference obsažené v biologických matricích. Interferující látky byly vstříkovány do kádinky s Britton-Robinsonovým pufrům (pH 7) pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky za kontinuálního míchání roztoku. Interferující látky byly používány ve stejné koncentraci jako peroxid vodíku (1 a 1,5 mM).

U obou elektrod nezpůsobovala, kyselina močová a askorbát výrazné interference (graf 15, 16). Platinovaná mikroelektroda byla poněkud citlivá na paracetamol.

Dále byly testovány detekční limity. U platinového senzoru byl zjištěn detekční limit k peroxidu vodíku $6 \mu\text{M L}^{-1}$ a u stříbrného senzoru $8 \mu\text{M L}^{-1}$ pro poměr signál/šum=3.



Graf 15: Amperometrická měření v Britton-Robinsonově pufru při pH 7 v míchaném roztoku s platinovou povrchovou úpravou uhlíkového vlákna, při potenciálu 700 mV vs Ag / AgCl. Proudové odezvy přidavku pufru (pH 7), askorbátu, kyseliny močové, paracetamolu a peroxidu vodíku (3%).



Graf 16: Amperometrická měření v Britton-Robinsonově pufru při pH 7 v míchaném roztoku se stříbrnou povrchovou úpravou uhlíkového vlákna, při potenciálu 0 mV vs Ag / AgCl. Proudové odezvy přidavku pufru (pH 7), askorbátu, kyseliny močové, paracetamolu a peroxidu vodíku (3%).

5 Závěr

Předložené práce se zabývá detekcí peroxidu vodíku amperometrickou metodou. Při stanovení peroxidu vodíku amperometrickými metodami se často používají kovové pracovní elektrody. Klasické kovové elektrody se vyznačují značně nelineární odezvou při vyšších koncentracích peroxidu vodíku, tento problém jsme se snažili obejít zvětšením aktivního povrchu elektrody. Jednou z metod získání takového povrchu byla depozice kovů z roztoků jejich solí v přítomnosti kapalně krystalických fází povrchově aktivních látek. Cílem této práce byla konstrukce uhlíkové mikroelektrody a její následná elektrochemická modifikace částicemi platiny a stříbra depozicí z roztoků povrchově aktivních látek a solí těchto kovů. Nalezli jsme optimální složení depozičních lázní za použití dostupných chemikálií, z nichž nejlepších výsledků jsme dosáhli při použití látky Triton X-100 (pro platinovou elektrodu) a Pluronic F127 (pro elektrodu stříbrnou). Provedli jsme testování vlastností těchto senzorů, které spočívalo v ověření linearity odezvy senzorů na přídavky peroxidu vodíku, testování pH závislosti a časové stability odezvy modifikovaných elektrod, testování na interferující látky (např. na askorbát, kyselinu močovou, paracetamol) a zjištění detekčních limitů ($8 \mu\text{M L}^{-1}$ -platinová elektroda a $6 \mu\text{M L}^{-1}$ – stříbrná elektroda).

6 Summary

Fast, accurate, reliable and simple analytical determination of hydrogen peroxide is of great importance in the health industry, pharmaceutical, food and the environment analyses. Development of highly sensitive and selective methods for determination of hydrogen peroxide is attractive in physical and analytical chemistry, but also in other disciplines.

For monitoring of hydrogen peroxide a range of methods is used such as fluorescence, spectrophotometry, titration methods and chemiluminescence. Nowadays, electrochemical methods are increasingly becoming an attractive alternative to these methods, especially for their simplicity, fast detection, accuracy, reliability and relatively low cost.

The aim of my diploma work was the detection of hydrogen peroxide amperometric by coated carbon fiber microelectrodes using amperometric method. For determination of hydrogen peroxide by amperometric methods are metallic working electrode often used. Conventional metal electrodes are characterized by highly non-linear response at higher concentration of hydrogen peroxide. We were trying to circumvent this problem by enlargement of the active electrode surface. One method of obtaining such a surface is the electrochemical deposition of metals from solutions of their salts in the presence of liquid crystalline phases of surfactants.

The first step of this work was to design carbon microelectrodes. The next step after the preparation of microelectrodes was their subsequent electrochemical modification by platinum or silver particles deposited from solutions of surfactants and salts of these metals. Carbon fiber coating and electrochemical measurements were performed using CH Instruments Electrochemical Workstation Model 660 - C) in a classic three-electrode configuration. Ag/AgCl was used as a reference electrode (MF-2052, Bioanalytical Systems, USA), platinum wire served as an auxiliary electrode and carbon fiber electrode as a working electrode (Ten Cate Advanced Composites, Amsterdam, Netherlands). In the process of electrodeposition the carbon fiber microelectrodes were immersed in the deposition solution and the electrodes were subjected to the deposition potential. The electrochemical deposition of metals from their salt solutions itself does not yield highly sensitive hydrogen peroxide electrode. To increase the sensitivity of the sensors different surfactant (Tween 20, 40, 60, 80, Triton X-100, Pluronic F127) were tested as additives

into the plating solution. The sensors were equipped with platinum layer deposited from the solutions of 0.01 M K_2PtCl_6 with surfactant 25% Triton X-100. The deposition of platinum was performed by constant potential of -200 mV for 60 sec (vs. Ag/AgCl) were used.

For silver coated electrodes, the best results were achieved by deposition of silver in the presence of Pluronic F127. Silver layer was deposited from the solutions of 0,08 M $AgNO_3$ with surfactant Pluronic F127 25%. Silver deposition was performed for 60 seconds by constant potential of -300 mV (vs. Ag/AgCl).

After coating with platinum or silver the carbon fiber was coated by Nafion layer deposited from 5% Nafion solution (Fluka) using a „dip-dry“ method.

The visual check of platinum or silver nanostructures was carried out using scanning electron microscopy (SEM) Hitachi SU - 6600.

For testing our sensors, constant potential amperometry in stirred solution was used. The tested electrodes were immersed in a beaker containing 25 ml of Britton-Robinson buffer (universal buffer, contained 0.04 M H_3PO_4 , H_3BO_3 0.04 m, 0.04 m CH_3COOH , the desired pH values were adjusted is with 0.2 M NaOH). The solution was stirred using a magnetic stirrer rotating at approx. 300 rpm. All measurements were performed at room temperature (25 °C).

We conducted the testing of the properties of these sensors, namely verifying the linearity of sensors responses to additions of hydrogen peroxide. Amperometric measurements were carried out in stirred solution of Britton-Robinson buffer (pH 7). Platinized carbon electrodes were subjected to constant potential of 700 mV vs. Ag/AgCl, silver coated carbon electrodes were tested at constant potential of 0 and -400 mV vs. Ag/AgCl. Once the current lines have stabilized, the squirts of 25 μ l of 3% hydrogen peroxide to the 25 ml of Britton-Robinson buffer were applied (each addition corresponded to 1,5 mM H_2O_2). With silver electrodes, aliquots of 20 μ l of 3% hydrogen peroxide electrode were used (each addition corresponded to 1 mM H_2O_2). Hydrogen peroxide aliquots were introduced into the beaker using automatic dispenser-autosampler (number of injections ranged between 20-80). Platinized and silver electrodes - coated microelectrodes developed by us were sensitive (detection limit for platinum electrode was 8 μ M L^{-1} H_2O_2 at $S/N=3$ and 6 μ M L^{-1} for the silver electrode, the response was linear up to relatively high (tens of millimoles per lite H_2O_2) concentrations of hydrogen peroxide.

Furthermore, the temporal response stability of modified microsensors were tested. We have found that a coverage of the electrode by the protective of layer Nafion has a beneficial effect on the stability of the current response. When testing the selectivity of sensors ascorbic acid, uric acid, paracetamol have been chosen as model interfering substances, which represent the most common interference contained in biological matrices. Interfering substances were injected into the beaker of a Britton-Robinson buffer (pH 7) using the Hamilton microsyringe under continuous stirring of the solution. With the exception of paracetamol on platinized electrode, ascorbate, uric acid and paracetamol did not cause significant interferences.

When testing the pH dependence of amperometric measurements in stirred solution, BR buffer in the range of pH 4-12 was used. Platinum and silver electrode provided similar pH dependences of their current responses to additions of hydrogen peroxide in this broad pH range.

7 Literatura

1. J. Wang, Analytical electrochemistry, Second edition, Wiley-VCH, 2000.
2. F. Vydra a kol.: Rozpouštěcí polarografie a voltametrie, SNTL Praha 1977.
3. M. Čákrť a kol.: Elektroanalytické metody, 2 THÉTA, Český Těšín 2001.
4. J. Berek a kol: Elektroanalytická chemie, Nakladatelství Karolinum, Praha 2005.
5. V. Kalous a kol., Metody chemického výzkumu, SNTL, Praha 1987
6. P. Skládal, Biosenzory, Brno 2002.
7. R. N. Adams and J. B. Justice, Jr., Voltametry in the Neurosciences, Principles, Methods and Applications, The Humana Press Inc.,1987.
8. P. R. Haddad, P. E. Jackson, Ion chromatography, Principles and applications, Elsevier science B. V, 1990.
9. P. Jírů, O. Grubner, J. Tichý: Základy heterogenní katalýzy, SNTL, Praha 1967.
10. L. Martovská, P. Chuchvalec: Kinetika a katalýza, příklady a úlohy, Ediční středisko VŠCHT, Praha 1991.
11. Z. Song, R. Yuan, Y. Chai, B. Yin, P. Fu, J. Wang, Multilayer structured amperometric immunosensor based on gold nanoparticles and Prussian blue nanoparticles/nanocomposite functionalized interface, *Electrochimica Acta* 55 (2010) 1778-1784.
12. Y. Liu, Z. Chu, W. Jin, A sensitivity-controlled hydrogen peroxide sensor based on self-assembled Prussian Blue modified electrode, *Electrochemistry Communicatians* 11 (2009) 484-487.
13. J.Hrbac, V. Halouzka, R. Zboril, K. Papadopoulos, T. Triantis, Carbon electrodes modified by nanoscopic iron (III) oxides to assemble chemical sensors for the hydrogen peroxide amperometric detection, *Electroanalysis* 19 (2007) No 17, 1850-1854.
14. H. Yin, S. Ai, W. Shi, L. Zhu, A novel hydrogen peroxide biosensor on horsedish peroxidase immobilized on gold nanoparticles – silk fibroin modified glassy carbon electrode and direct electrochemistry of horsedish peroxidase, *Sensors and Actuators B* 137 (2009) 747-753.
15. M. Somasundrum, K. Kirtikara, M. Tanticharoen, Amperometric determination of hydrogen peroxide by direct and catalytic reduction at a cooper electrode, *Analytica Chimica Acta* 319 (1996) 59-70.

16. L. Wen-Zhi, L. You. Qin, Preparation of nano-copper oxide modified glassy carbon electrode by a novel film plating/potentiometric cycling method and its characterization, *Sensor and Actuators B* 141 (2009) 147-153.
17. K. F. Fernandes, C. S. Lima, F. M. Lopes, C. H. Collins, Hydrogen peroxide detection system consisting of chemically immobilised peroxidase and spectrometer, *Process Biochemistry* 40 (2005) 3441-3445.
18. R. Garjonyte, A. Malinauskas, Amperometric sensor for hydrogen peroxide, based on Cu₂O or CuO modified carbon paste electrodes, *Fresenius J. Anal. Chem.* (1998) 122-123.
19. D. Krznarić, Anodic oxidation processes of copper with a mercury electrode in the presence of hydrogen peroxide and in unbuffered sodium chloride solutions, *Analytica Chimica Acta* 293 (1994) 67-76.
20. M. S. Lin, H. J. Leu, A Fe₃O₄-based chemical sensor for cathodic determination of hydrogen peroxide, *Electroanalysis* 17 (2005) No 22, 2068-2073.
21. M. F. Suaud-Chagny, R. Cespluglio, J. P. Rivot, M. Buda, F. Gonon, High sensitivity measurement of brain catechols and indoles in vivo using electrochemically treated carbon-fiber electrodes, *Journal of Neuroscience Methods* 48 (1993) 241-250.
22. G. Modi, V. Pillay, Y. E. Choonara, V. M. K. Ndesendo, L. C. Toit, D. Naidoo, Nanotechnological applications for the treatment of neurodegenerative disorders, *progress in Neurobiology* 88 (2009) 272-285.
23. T. Kondo, Y. Kuwahara, H. Ito, S. Aoshima, Y. Einaga, A. Fujishima, T. Kawai, Electrochemical detection of hydrogen peroxide with Ferrocene-immobilized diamond electrodes , <http://www.electrochem.org/dl/ma/206/pdfs/1805.pdf>
24. S. Dong, S. Zhang, L. Chi, P. He, Q. Wang, Y. Fang, Electrochemical behaviors of amino acids at multiwall carbon nanotubes and Cu₂O modified carbon paste electrode, *Analytical biochemistry* 381 (2008) 199-204.
25. I. G. Casella, E. Desimoni, A. M. Salvi, Chemically modified electrode for the detection of carbohydrates, *Analytica Chimica Acta* 243 (1991) 61-63.
26. P. Luo, F. Zhang, R. P. Baldwin, Comparison of metallic electrodes for constant-potential amperometric detection of carbohydrates amino acids and related compounds in flow systems, *Analytica Chimica Acta* 244 (1991) 169-178.

27. D. P. Root, D. Wijesuriya, P. W. Alexander, Steady- state and flow-injection response of metallic silver electrode for potentiometric detection of metal cyanide complex formation, *Analytica Chimica Acta* 225 (1989) 105-113.
28. T. R. I. Cataldi, D. Nardiello, A pulsed potential waveform displaying enhanced detection capabilities towards sulfur-containing compounds at a gold working electrode, *Journal of Chromatography A*, 1066 (2005) 133-142.
29. R. Agraz, M. T Sevilla, L. Hernández, Chemically modified electrode for the simultaneous determination of trace and speciation analysis, *Analytica Chimica Acta* 273 (1993) 205-212.
30. A. Abbaspour, S. M. M. Moosavi, Chemically modified carbon paste electrode for determination of copper (II) by potentiometric method, *Talanta* 56 (2002) 91-96.
31. L. M. Aleixo, M. Fátima, B. Souza, O. E. S. Godinho, G. O. Neto, Y. Gushikem, J. C. Moreira, Development of chemically modified electrode based on carbon paste and functionalized silica gel for preconcentration and voltammetric determination of mercury (II), *Analytica Chimica Acta* 271 (1993) 143-148.
32. T. Molina- Holgado, J. M. Pinilla-Macias, L. Hernández-Hernández, Voltammetric determination of lead with a chemically modified carbon paste electrode with diphenylthiocarbazone, *Analytica Chimica Acta* 309 (1995) 117-122.
33. N. Y. Stozhko, N. A. Malakhova, M. V. Fyodorov, K. Z. Brainina, Modified carbon-containing electrodes in stripping voltammetry of metals. Part I. Glassy carbon and carbon paste electrodes, *J solid State Electrochem* 12 (2008) 1185-1204.
34. N. Y. Stozhko, N. A. Malakhova, M. V. Fyodorov, K. Z. Brainina, Modified carbon-containing electrodes in stripping voltammetry of metals. Part II. Composite and microelectrodes, *J solid State Electrochem* 12 (2008) 1219-1230.
35. R. Vittal, H. Gomathi, K. J. Kim, Beneficial role of surfactants in electrochemistry and in the modification of electrodes, *Advances in Colloid and Interface Science* 119 (2006) 55-68.
36. S. Griese, D. K. Kampouris, R. O. Kadara, C. E. Banks, A critical review of the electrocatalysis reported at C₆₀ Modified Electrodes, *Electroanalysis* 20 (2008) No 14, 1507-1512.
37. S. E. W. Jones, R. G. Compton, Fabrication and applications of nanoparticle-modified electrodes in stripping analysis, *Curr. Anal. Chem.* (2008) 177-182.

38. M. I Montenegro, M. A. Quierós, J. L. Daschbach: *Microelectrodes: Theory and applications*, Kluwer Academic Publisher 1991.
39. J. Wang, Y. Lin, L. Chen, Organic-phase biosensors for monitoring phenol and hydrogen peroxide in pharmaceutical antibacterial products, *Analyst* 118 (1993) 277-280.
40. A. K. Upadhyay, T. Ting, S. Chen, Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on coimmobilized horseradish peroxidase and methylene green in ormosils matrix with multiwalled carbon nanotubes, *Talanta* 79 (2009) 38-45.
41. P. Du, B. Zhou, CH. Cai, Development of an amperometric biosensor for glucose based on electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at the single-walled carbon nanotube/nile blue A nanocomposite modified electrode, *Journal of Electroanalytical chemistry* 614 (2008) 149-156.
42. M. Khayyami, G. Johansson, D. Kriz, B. Xie, P. Larsson, B. Danielsson, Flow-injection determination of trace hydrogen peroxide or glucose utilizing an amperometric biosensor based on glucose oxidase bound to a reticulated vitreous carbon electrode, *Talanta* 43 (1996), 957-962.
43. S. J. Updike, G. P. Hicks, Enzyme electrode, *Nature* 214 (1967) 986-988.
44. Y. Lu, M. Yang, F. Qu, G. Shen, R. Yu, Amperometric biosensors based on platinum nanowires, *Analytical Letters* 40 (2007), 875-886.
45. A. Lupu, P. Lisboa, A. Valsesia, P. Colpo, F. Rossi, Hydrogen peroxide detection nanosensor array for biosensor development, *Sensor and Actuators B* 137 (2009) 56-61.
46. L. Juan, M. Yang, F. Qu, G. Shen, R. Yu, Seed-mediated growth of platinum nanoparticles on carbon nanotubes for fabrication of electrochemical biosensors, *Electrochimica Acta* 53 (2008) 3559-3565.
47. T. Shimomura, T. Itoh, T. Sumka, F. Mizukami, M. Ono, Amperometric determination of choline with enzyme immobilized in a hybrid mesoporous membrane, *Talanta* 78 (2009) 217-220.
48. A. E. Albers, V. S. Okreglak, Ch. J. Chang, A FRET-based approach to ratiometric fluorescence detection of hydrogen peroxide, *J. Am. Chem. Soc.* 28 (2006) No. 30, 9641.

49. C. Matsubara, N. Kawamoto, K. Takamura, Oxo [5, 10, 15, 20-tetra(4-pyridyl)porphyrinato]titanium (IV):an ultra-high sensitivity spectrophotometric reagent for hydrogen peroxide, *Analyst* 117 (1992) 1781-1784.
50. E. C. Hurdish, H. Jr. Romeyn, Accuracy of determination of hydrogen peroxide by cerate oxidimetry, *Anal. Chem.* 26 (1954) 320-325.
51. N. V. Klassen, D. Marchington, H. C. E. McGowan, H₂O₂ Determination by the 13-method and by KmnO₄ titration, *Anal. Chem.* 68 (1994) 2921-2925.
52. A. Chovin, P. Garrigue, N. Sojic, Electrochemiluminescent detection of hydrogen peroxide with an imaging sensor array, *Electrochimica Acta* 49 (2004) 3751-3757.
53. X. Liu, A. Li, B. Zhou, CH. Qiu, H. Ren, Chemiluminiscence determination of surfactant Triton X –100 in environmental water with luminal-hydrogen peroxide system, *Chemistry Central Journal* (2009) 3-7.
54. A. Tahirović, A. Čopra, E. Omanović-Miklićanin, K. Kalcher, A chemiluminiscence sensor for the determination of hydrogen peroxide, *Talanta* 72 (2007) 1378-1385.
55. Y. Qiao, G. Yang, F. Jian, Y. Qin, L. Yang, Hydrogen peroxide electrochemical detection for the development of protein film- modified sensor, *Sensor an Actuators B* 141 (2009) 205-209.
56. R. C. Peña, J. C. M. Gamboa, T. R. L. C. Paixão, M. Bertotti, Flow injection amperometric determination of hydrogen peroxide in household commercial products with a ruthenium hexacyanoferrate modified electrode, *Microchim Acta* (2009) 277-281.
57. H. Razmi, H. Heidari, Amperometric determination of hydrogen peroxide on surface af a novel PbPCNF-modified carbon-ceramic electrode in acidic medium, *Journal of electroanalytical Chemistry* 625 (2009) 101-108.
58. C. G. Zambonin, I. Losito, Kinetic investigation of reactions connected to the system ascorbate + O₂ by amperometric detection of H₂O₂ at a modified platinum electrode, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4113-4119.
59. S. A. G. Evans, J. M. Elliott, L. M. Andrews, P. N. Bartlett, P. J. Doyle, G. Denuault, Detection of hydrogen peroxide at mesopours platinum microelectrodes, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1322-1326.
60. P. Vanysek, P. Gauthier, Disposable Graphite electrode for studies of catalytic layers of platinum, *Journal of new for electrochemical systems* 11 (2008) 157-163.

61. A. R. Layson, M. R. Columbia, The morphology of platinum black electrodeposited on highly oriented pyrolytic graphite studied with scanning electron microscopy and scanning tunneling microscopy, *Microchemical Journal* 56 (1997)103-113.
62. A. C. Hill, R. E. Patterson, J. P. Sezon, M. R. Columbia, Effect of Pb (II) on the morphology of platinum electrodeposited on highly oriented pyrolytic graphite, *Langmuir* 15 (1999) 4005-4010.
63. C. M. Welch, C. E. Banks, A. O. Simm, R. G. Compton, Silver nanoparticle assemblies supported on glassy-carbon electrodes for the electro-analytical detection of hydrogen peroxide, *Anal Bioanal Chem* 382 (2005) 12-21.
64. A. Safavi, N. Maleki, E. Farjami, Electrodeposited silver nanoparticles on carbon ionic liquid electrode for electrocatalytic sensing of hydrogen peroxide, *Electroanalysis* 21 (2009) No 13, 1533-1538.
65. P. Yang, W. Wei, Ch. Tao, B. Xie, X. Chen, Nano-silver/multi-walled carbon nanotube composite films for hydrogen peroxide electroanalysis, *Microchim acta* 162 (2008) 51-56.
66. D. Lin, Y. Jiang, Y. Wang, S. Sun, Silver nanoparticles confined in SBA-15 mesoporous silica and the application as sensor for detection hydrogen peroxide, *Journal of Nanomaterials* (2008) doi: 10.1155/2008/473791.
67. P. Yuan, Y. Zhuo, Y. Chai, H. Ju, Dendritic silver/silicon dioxide nanocomposite modified electrodes for electrochemical sensing of hydrogen peroxide, *Electroanalysis* 20 (2008) No 17, 1839- 1844.
68. W. Lian, L. Wang, Y. Song, H. Yuan, S. Zhao, P. Li, L. Chen, A hydrogen peroxide sensor based on electrochemically roughened silver electrodes, *Electrochimica Acta* 54 (2009) 4334-4339.
69. J. M. Elliott, P. R. Birkin, P. N. Bartlett, G. S. Attard, Platinum microelectrodes with unique high surface areas, *Langmuir* 15 (1999) No. 22, 7411-7415.
70. S. Park, H. Boo, S. Y. Lee, H. Kim, K. Kim, H. Kim, T. Chung, Apparent electrocatalysis on 3D nanoporous platinum film electroplated from hexagonal lyotropic liquid crystalline phase of triton X-100, *Electrochimica Acta* 53 (2008) 6143-6148.
71. Y. Zhong, C. Xu, L. Kong, H. Li, Synthesis and high catalytic properties of mesoporous Pt nanowire array by novel conjugate template method, *Applied Surface* 255 (2008) 3388-3393.

72. V. Ganesh, S. K. Pal, S. Kumar, V. Lakshminarayanan, Self- assembled monolayers (SAMs) of alkocyanobiphenyl thiols on gold surface using a lyotropic liquid crystalline medium, *Electrochimica Acta* 52 (2007) 2987-2997.
73. L. Coppola, C. L. Mesa, G. A. Ranieri, M. Terenzi, Water self-diffusion in micellar solutions and in lyotropic mesophases of the system water/ triton TX-100, *Colloid Polym Sci* 267(1989)86-91.
74. X. Liu, Y. Xu, X. Ma, G. Li, A third-generation hydrogen peroxide biosensor fabricated with hemoglobin and Triton X-100, *Sensor and Actuators B* 106 (2005) 284-288.
75. B. C. Anderson, S. M. Cox, A. V. Ambardekar, S. K. Mallapragada, The effect of salts on the micellization temperature of aqueous Poly (ethylene oxide)-b-poly (propylene oxide) solutions and the dissolution rate and water diffusion coefficient in their corresponding gels, *Journal of Pharmaceutical science* 91 (2002) 180-188.
76. A. K. Sahu, K. G. Nishanth, G. Sevarani, P. Sridhar, S. Pitchumani, A. K. Shukla, polymer electrolyte fuel cells employing electrodes with gas-diffusion layers of mesoporous carbon derived from a sol-gel route, *Carbon* 47 (2009) 102-108.
77. Ch. Hsu, H. Jang, M. Su, K. Chang, Y. Huang, Amperometric determination of hydrogen peroxide residue in beverages using a Nafion modified palladium electrode, *Eur Food Res Technol* 226 (2008)809-815.
78. M. Liu, J. Xiang, J. Zhou, H. Ding, A disposable amperometric sensor for rapid detection of serotonin in the blood and brain of the depressed mice based on Nafion membrane-coated colloidal gold screen-printed electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 640 (2010)1-7.
79. F. G. Bidkorbeh, S. Shahrokhian, A. Mohammadi, R. Dinarvand, Electrochemical determination of naltrexone on the surface of glassy carbon electrode modified with nafion-doped carbon nanoparticles: Application to determinations in pharmaceutical and clinical preparations, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 638 (2010) 212-217.
80. H. Kim, M. Piao, S. Choi, Ch. Shin, Y. Lee, Development of amperometric hydrogen peroxide sensor based on Horseradish Peroxidase- immobilized poly (thiophene-co-epoxyThiophene), *Sensor* 8 (2008) 4110-4118.
81. J. Hrbáč, Č. Gregor, M. Machová, J. Králová, T. Bystron, M. Číž, A. Lojek, Nitric oxide sensor based on carbon fiber covered with nickel porphyrin layer deposited

using optimized electropolymeration procedure, *Bioelectrochemistry* 71 (2007) 46-53.

8 Přílohy

NANOSILVER-NAFION COATED CARBON FIBER MICROELECTRODE FOR H₂O₂ AMPEROMETRY

Vladimir HALOUZKA¹, Petr JAKUBEC¹, Cenek GREGOR², Dalibor JANCIK², Gabriela VALASKOVA¹, Kyriakos PAPADOPOULOS³, Theodor TRIANTIS³ and Jan HRBAC¹

¹ Department of Physical Chemistry, Palacky University, tr. 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic; ² Center for Nanomaterial Research, Palacky University, Slechtitelu 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic; ³ Institute of Physical Chemistry, NCSR Demokritos, 15310 Agia Paraskevi Attikis, Athens, Greece

Abstract

Carbon fiber microelectrodes coated with a silver and Nafion layers constitute sensitive H₂O₂ sensors. The silver at the electrode is composed of porous, partially aggregated and crystalline deposits of silver nanoparticles. A wide concentration range (from 1x10⁻⁵ up to 0.1 M H₂O₂) is achieved when using amperometry in stirred solution at 0 mV (vs. Ag/AgCl).

1. INTRODUCTION

Electrodes containing silver nanoparticles as an active material have recently gained a great deal of interest as sensors for H₂O₂ amperometric determination in the cathodic region of potentials (e.g.[1], [2]). A one approach to achieve nanostructuring of the electrode surface is the electrodeposition from the mixture of target metal salt and a suitable structure directing agent. This technique was first described by Evans et al. [3] who prepared platinized platinum electrode from the aqueous solution containing K₂PtCl₆ and octaethyleneglycol monohexadecyl ether. In this contribution we have found that Pluronic F127 is an effective structure directing agent for coating carbon fiber microelectrode with silver. The properties of the electrode prepared this way are presented.

2. EXPERIMENTAL

For electrochemical measurements the CH Instruments 660C workstation with Pt wire as an auxiliary, Ag/AgCl as a reference and microelectrode sensor as a working electrode. Amperometry in stirred solution was used to test the microelectrode sensors. H₂O₂ aliquots were introduced into the cell using an autosampler. For testing the selectivities of

the sensor, aliquots of selected interference compounds were introduced into the cell using Hamilton microsyringes.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In our efforts to find optimum coating method, we tested a range of surfactants including Pluronic F127, which proved itself to be an optimum structure tuning agent. The electrodeposition of silver onto carbon fiber was therefore performed from 0.08 M silver nitrate solution containing 25 % of Pluronic F127 at -300 mV vs. Ag / AgCl for 60 sec in quiescent solution. The electrodes were then covered with Nafion using a "dip-dry (1h at 80°C)" method. Amperometric curves for H_2O_2 reduction are shown in Fig. 1 for two operational potentials. When the electrode is biased at 0 mV, a broad usable concentration range is achieved, at the expense of some current sensitivity.

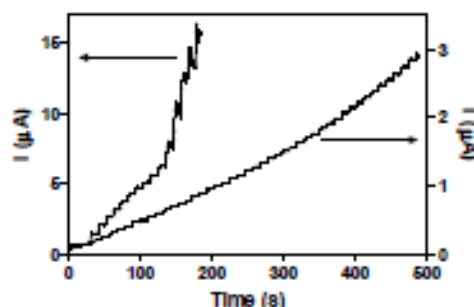


Fig. 1: Amperometric response curves of carbon fiber microelectrodes covered with silver and Nafion at -400 mV (left axis) and 0 mV (right axis) in stirred BR buffer (PH=7), each addition corresponded to 1 mM H_2O_2 .

As the potential employed (0 mV) is less cathodic than -400 mV used by most of the authors working in the field could make the measurement susceptible to interferences by easily oxidizable compounds, we tested representative species for interferences. We have found that ascorbic acid, uric acid and acetaminophen do not produce significant response.

4. CONCLUSION

We have shown that carbon fiber coated with a silver layer electrodeposited from silver nitrate / Pluronic F127 solution and subsequently stabilized by Nafion layer can be used as sensor for hydrogen peroxide amperometric monitoring.

5. ACKNOWLEDGEMENT

Financial support from the Grant Agency of the Czech Republic (project no. 524/05/P135) and project no. PrF-2010-025-Nanosystemy are gratefully acknowledged.

6. REFERENCES

- [1] C.M. Welch, C.E. Banks, A.O. Simm, R.G. Compton, *Anal. Bioanal. Chem.* 2005 382, 12–21.
- [2] M.R. Guascito, E. Filippo, C. Malitesta, D. Manno, A. Serra, A. Turco, *Biosens. Bioelectron.* 2008, 24, 1057–1063.
- [3] S.A.G. Evans, J.M. Elliott, L.M. Andrews, P.N. Bartlett, P.J. Doyle, G. Denuault, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1322–1326.