

# Elektroanalitička svojstva folne kiseline na elektrodi izmijenjenoj različitim nanomaterijalima

---

Stanko, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2019

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:352965>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-14**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Karla Stanko**

**Elektroanalitička svojstva folne kiseline na  
elektrodi izmijenjenoj različitim  
nanomaterijalima**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Biljane Nigović.

Željela bih se zahvaliti svojoj mentorici prof.dr.sc. Biljani Nigović na vodstvu, savjetima, pomoći i susretljivosti pri izradi ovog diplomskog rada. Također zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova na ugodnoj radnoj okolini i pomoći.

# SADRŽAJ

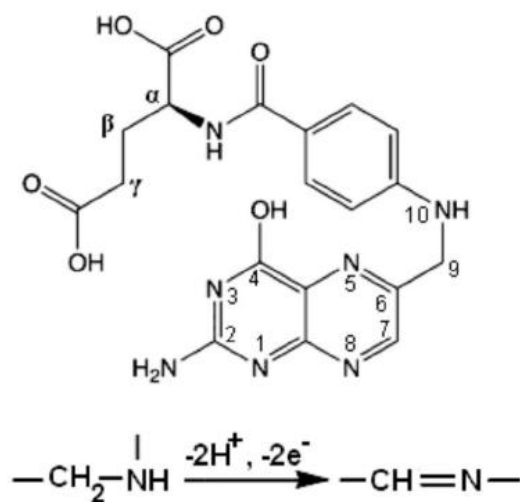
<b>1. <u>UVOD</u></b> .....	1
1.1. FOLNA KISELINA .....	2
1.2. ELEKTROANALITIČKE METODE.....	5
1.2.1. VOLTAMetriJA .....	5
1.2.1.1. CIKLIČKA VOLTAMetriJA .....	7
1.2.1.2. PRAVOKUTNOVALNA VOLTAMetriJA .....	10
1.2.2. KRUTE ELEKTRODE.....	11
1.2.2.1. ELEKTRODA OD STAKLASTOG UGLJIKa .....	12
1.2.3. NANOMATERIJALI.....	13
<b>2. <u>OBRAZLOŽENJE TEME</u></b> .....	16
<b>3. <u>MATERIJALI I METODE</u></b> .....	18
3.1. KEMIKALIJE .....	19
3.2. RADNI INSTRUMENTI .....	19
3.3. PRIPREMA OTOPIA I SUSPENZIJA NANOMATERIJALA.....	20
3.3.1. MATIČNA OTOPIA .....	20
3.3.2. BRITTON-ROBINSON PUFER .....	20
3.3.3. RADNE OTOPIE.....	21
3.3.4. SUSPENZIJE NANOMATERIJALA .....	22
3.4. PRIPREMA ELEKTRODA I UVJETI MJERENJA.....	23
<b>4. <u>REZULTATI I RASPRAVA</u></b> .....	25
<b>5. <u>ZAKLJUČCI</u></b> .....	49
<b>6. <u>LITERATURA</u></b> .....	52
<b>7. <u>SAŽETAK/SUMMARY</u></b> .....	57
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA</b>	
<b>BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1. UVOD

## 1.1. FOLNA KISELINA

Folnu kiselinu (vitamin B9) otkrili su i izolirali Herschell K. Mitchell, Esmond E. Snell i Roger J. Williams 1941. godine u Lederle laboratoriju iz nekoliko tona listova špinata. Naredna istraživanja dovela su u vezu deficijenciju folne kiseline i poremećaja u novorođenčadi. Folna kiselina važna je za stimulaciju hematopoetskog sustava (prevencija megaloblastične anemije), sintezu purina i timidilata, metilaciju tRNA, rast i diobu stanica, metabolizam homocisteina (Lovander i sur., 2018). Taj vodotopljivi vitamin nalazi se i u jetri, bubrezima, kvascu, zelenom lisnatom povrću i citrusima. Sama folna kiselina je biokemijski inaktivna pa se konvertira u tetrahidrofolnu kiselinu i metiltetrahidrofolat djelovanjem dihidrofolat reduktaze. Ti kongeneri folne kiseline transportiraju se receptor-posredovanom endocitozom u stanice kako bi mogli obavljati navedene biološke funkcije (www.drugbank.ca).

U vidu fizikalno-kemijskih karakteristika, folna kiselina ((2-S)-2-[[4-[(2-amino-4-okso-1-H-pteridin-6-il)metilamino]benzoil]amino]glutarna kiselina) (Slika 1) krutina je žute boje, bez mirisa. Molekulska formula spoja je  $C_{19}H_{19}N_7O_6$ , molekulska masa 441,404 g/mol, talište iznosi  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$  i topljiv je u vodi (1,6 mg/L, pri  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).



Slika 1. Strukturna formula folne kiseline i njena oksidacija na C9-N10 (Yardim i Şentürk, 2014)

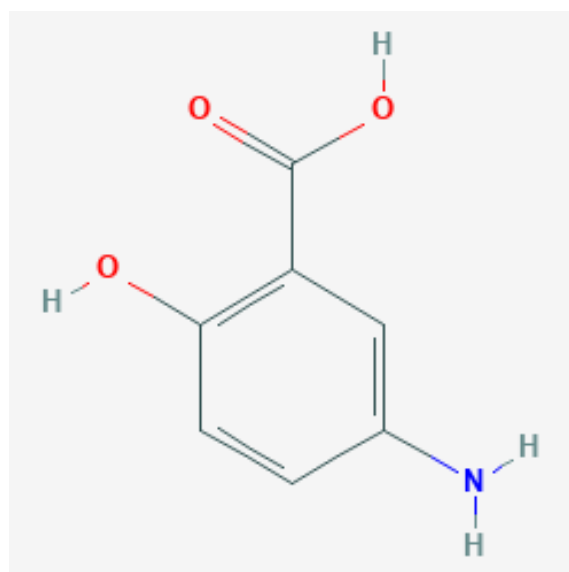
Sama ili u smjesi s drugim tvarima određuje se kemiluminiscencijom, mikroemulzijskom elektrokinetičkom kromatografijom, fluorimetrijom, tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s ultraljubičastim ili elektrokemijskim detektorom, tekućinskom

kromatografijom s tandemskom masenom spektroskopijom, kapilarnom elektroforezom ili upotrebom biosenzora. Međutim, te su metode skupe, komplicirane i duže traju. Za razliku od njih elektrokemijske metode, kao što je voltometrija, jednostavnije su, daju brži odgovor, ali jednako osjetljive kao i ostale analitičke metode. U početku se ponašanje folne kiseline proučavalo na živinim elektrodama (Cakir i sur., 1997; Legall i Van der Berg, 1993; Villamil i sur., 1993; Han i sur., 1991), no sve se više rabe modificirane elektrode (Yardim i Şentürk, 2014) kao što su zlatna elektroda modificirana višestrukim slojevima ugljikovih nanocjevčica (MWNT-GE-multi-walled carbon nanotube modified gold electrode)( Lovander i sur., 2018), mikroelektroda s cilindričnim ugljikovim vlaknima (Oshea i sur., 1991), elektroda od ugljikove paste s 1,3-dipropilimidazolbromidom, cinkovim oksidom i ugljikovim nanocjevčicama (Khaleghi i sur., 2016), staklasta ugljikova elektroda s filmom bizmuta (BiF-GCE-bismuth film glassy carbon electrode) (Vladislavić i sur., 2017), ugljikova ionska tekuća elektroda modificirana nanočesticama zlata i grafena (AuNPs-GR-CILE-gold nanoparticles and graphene modified carbon ionic liquid electrode) (Wang i sur., 2015), staklasta ugljikova elektroda s nanožicama bizmuta (BiNWs-GCE-bismuth nanowires glassy carbon electrode) (Ananthi i sur., 2015), elektroda od ugljikove paste s nanočesticama zlata (AuNPs-CPE-gold nanoparticles carbon paste electrode) (Arvand i Dehsaraei, 2013), elektroda od staklastog ugljika s filmom olova (plated lead film electrode) ( Korolczuk i Tyszczyk, 2007).

Folna kiselina prema ATK klasifikaciji pripada skupini B03BB01 – Lijekovi s djelovanjem na krv i krvotvorne organe – Lijekovi za liječenje slabokrvnosti – Vitamin B12 i folna kiselina - Folna kiselina i derivati – Folna kiselina. U Hrvatskoj je registriran lijek pod nazivom Folacin proizvođača Jadran galenski laboratorij koji sadrži 5 mg folne kiseline u obliku tableta. Peroralno se primjenjuje za liječenje megaloblastične anemije uzrokovane deficitom folata zbog pothranjenosti, hepatobilijarnih bolesti, upalnih bolesti crijeva (Crohn, ulcerozni colitis), malapsorpcije te povećane potrebe za folnom kiselinom (trudnoća). Koristi se i za prevenciju defekta neuralne cijevi novorođenčeta u žena koje planiraju trudnoću te su u rizičnoj skupini, kod dugotrajnog liječenja antagonistima folne kiseline (metotreksatom ili kombinacijom sulfametoksazola i trimetoprima), antikonvulzivima (fenitoin, primidon, fenobarbiton) te kao profilaksa deficita folata u kroničnim hemolitičkim stanjima ili pri bubrežnoj dijalizi. Za liječenje megaloblastične anemije preporučuje se primjena 5 mg (1 tableta) folne kiseline dnevno tijekom 4 mjeseca, kod upalnih bolesti crijeva daje se do 15 mg dnevno. Za prevenciju defekta neuralne cijevi u novorođenčeta preporučuje se trudnicama uzimanje 5 mg folatne kiseline dnevno tijekom prva tri mjeseca trudnoće. Kod planirane trudnoće

preporučuje se uzimati folnu kiselinu i 4 tjedna prije trudnoće. Veće doze preporučuju se u alkoholičara te u bolesnika koji uzimaju antikonvulzive. Što se tiče interakcija, folna kiselina može smanjiti plazmatsku koncentraciju fenobarbitona, fenitoina i primidona, i time povećati mogućnost nastanka epileptičnih napada, a sulfasalazin može smanjiti apsorpciju folne kiseline. Općenito, folna kiselina se dobro podnosi te čak vrlo velike doze ne bi trebale nanijeti štetu bolesniku. Dobro se apsorbira iz gastrointestinalnog trakta, uglavnom iz duodenuma i jejunuma. Distribuirana se ravnomjerno u sva tkiva. Selektivno se koncentrira u cerebrospinalnom likvoru. Vršnu koncentraciju u plazmi dostiže za oko 30 do 60 minuta nakon peroralne primjene. U plazmi i jetri metabolizira se u 5-metiltetrahydrofolat, djelatnu tvar koja se veže s glutaminskom kiselinom i čini koenzim. U jetri je pohranjeno oko 50% od ukupnih rezervi folata. Oko 70% veže se na proteine plazme. Izlučuje se urinom, glomerularnom filtracijom. Nakon doze od 5 mg, izlučiti će se urinom za 5 sati (mediately.co).

Deficit folne kiseline zabilježen je u 40 % odraslih oboljelih od Chronove bolesti jer u prehrani tih pacijenata nema dovoljne količine hrane koja bi njome obilovala, a njima je neophodna za obnovu stanica koje se uslijed bolesti oštećuju. To posebice vrijedi za djecu kojoj je još potrebna za pravilan rast i razvoj. Usto, protuupalni lijekovi u terapiji Chronove bolesti, poput mesalazina (Slika 2) mogu vezati folnu kiselinu i ometati njenu apsorpciju u crijevima. Njezin nedostatak potencijalno pridonosi i razvoju anemije u oboljelih (Vranešić Bender, 2005).



Slika 2. Struktura mesalazina (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)



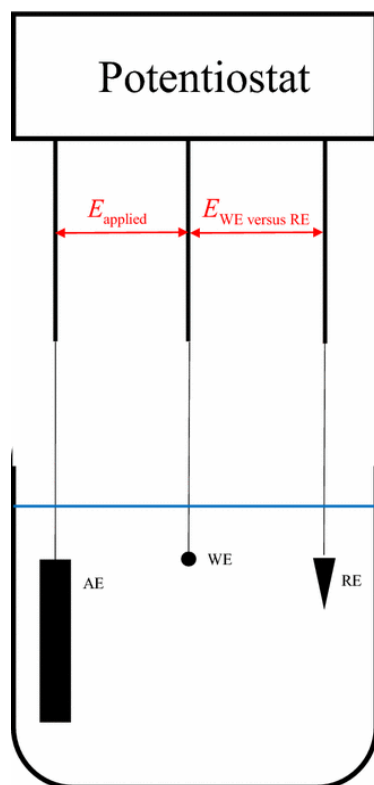
## 1.2. ELEKTROANALITIČKE METODE

Elektroanalitičke metode čine skupinu analitičkih metoda kod kojih se podatak o koncentraciji, aktivitetu ili drugom termodinamičkom svojstvu određivane molekulske vrste dobiva u ovisnosti o električnom naponu, struji ili naboju. Upotrebljavaju se u elektroorganskoj sintezi molekula te ispitivanju njihovog učinka putem odnosa redoks potencijala i aktivnosti. Prema signalu pobude, čija je posljedica odvijanje elektrokemijske reakcije na radnoj elektrodi, te mjerenoj varijabli dijele se na potenciometriju, voltometriju, kronoamperometriju, elektrogravimetriju, kronopotenciometriju, kulometriju i konduktometriju. Koriste se za određivanje i identifikaciju ljekovitih tvari u uzorcima. Usto je dodatna prednost što nije neophodno provesti postupke odjeljivanja prije analize (Nigović i Behetić, 2007). Ove metode često su alternativa spektroskopiji i kromatografskim metodama. Svim elektroanalitičkim tehnikama je zajednička pretvorba kemijskog signala (npr. koncentracija ili količina analita) u fizikalni (napon, struja, vodljivost, radijacija, tlak itd.) koji se prevede u električni i obradi putem elektroničkih instrumenata. Posebna pogodnost je što osim elektroda nisu potrebni drugi detektori. Zato se ove metode često koriste za detekciju tvari nakon provedene kromatografije, kapilarne elektroforeze i protočne injekcijske (*eng. flow-injection*; FIA) analize. Također, za analizu je potrebna mala količina uzorka pa to ove metode čini ekonomičnijim (P.C.Hauser, 1998). Elektroanalitičke metode selektivno detektiraju aktivne tvari, pri čemu su visoko osjetljive, točne i precizne. Neke se od njih primjenjuju i u Europskoj farmakopeji. Potenciometrijskom titracijom može se odrediti sadržaj ljekovitih i pomoćnih tvari, ali i onečišćenja (npr. fluorida u izofluranu). Za određivanje vode u aktivnim tvarima rabi se amperometrijska titracija koja pokazuje točku ekvivalencije tijekom Karl-Fischerove titracije. Konduktometrija može ispitati čistoću farmaceutske vode mjerenjem njezine vodljivosti, kao i čistoću farmaceutskih tvari (npr. određivanje onečišćenja ionskim spojevima u heparinu male molekulske mase, manitolu, saharozi) (Nigović i Behetić, 2007).

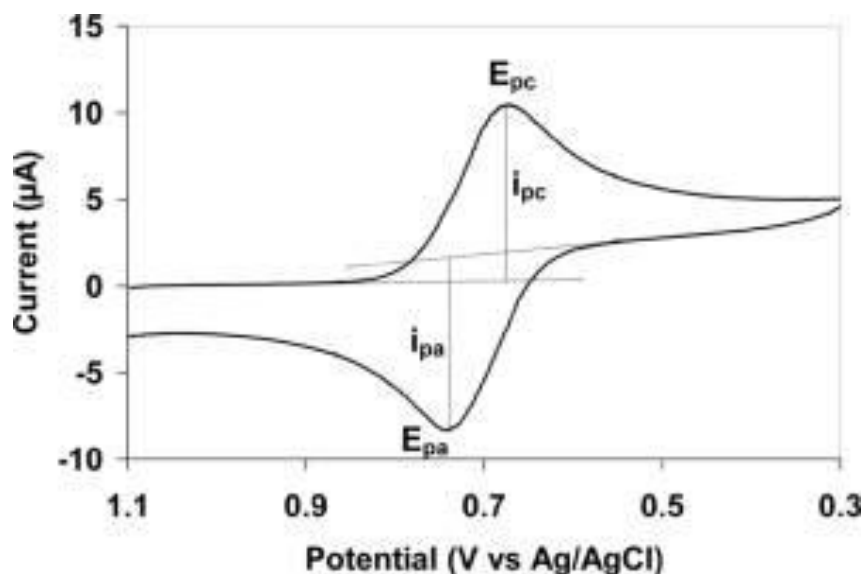
### 1.2.1. VOLTAMETRIJA

Voltometrija je termin kojim su obuhvaćene sve tehnike koje mjere jakost struje kao funkciju potencijala. Začetnik razvoja ove metode bio je Jaroslav Heyrovský (dobitnik Nobelove nagrade 1959. godine), izumitelj jedne od voltometrijskih tehnika koju je nazvao

polarografijom. Neko vrijeme voltometrija i polarografija su bili korišteni kao sinonimi. Međutim, polarografija se sada odnosi isključivo na „voltometriju s kapajućom živinom elektrodom“. Elektroanalitičke tehnike koje se osnivaju na prijenosu elektrona na granici elektrode i elektrolita mogu biti statične i dinamične. Kod statičnih tehnika (potenciometrija), struje gotovo da i nema te se ne događa neto reakcija. S druge strane, dinamične tehnike (voltometrija) mjere tok struje i sustav je dinamičan u vidu da se izvodi neto reakcija (redukcija ili oksidacija tvari). U voltametriji najčešće se koriste tri elektrode: referentna, radna i pomoćna (Scholz, 2015). Potencijal se mjeri između radne i referentne elektrode, a struja između radne i pomoćne elektrode. Potenciostat zadaje napon i mjeri jakost struje (Slika 3). Uz elektrokemijski članak i potenciostat koristi se i računalo koje omogućuje obradu i prikaz podataka. Redoks reakcija odvija se na radnoj elektrodi i za tu se svrhu koriste kapajuća ili statična živina elektroda, viseća živina kap ili živina film elektroda. Za oksidacijske procese primjenjuju se krute elektrode, npr. staklasta ugljikova elektroda, ugljikova, platinska, zlatna elektroda. Grafički prikaz ovisnosti jakosti struje o potencijalu naziva se voltamogram (Slika 4).



Slika 3. Elektrokemijski članak s tri elektrode i potenciostatom (link.springer.com),  $E_{\text{applied}}$ -primijenjeni napon,  $E_{WE}$ -radna elektroda,  $E_{RE}$ -referentna elektroda,  $E_{AE}$ -pomoćna elektroda

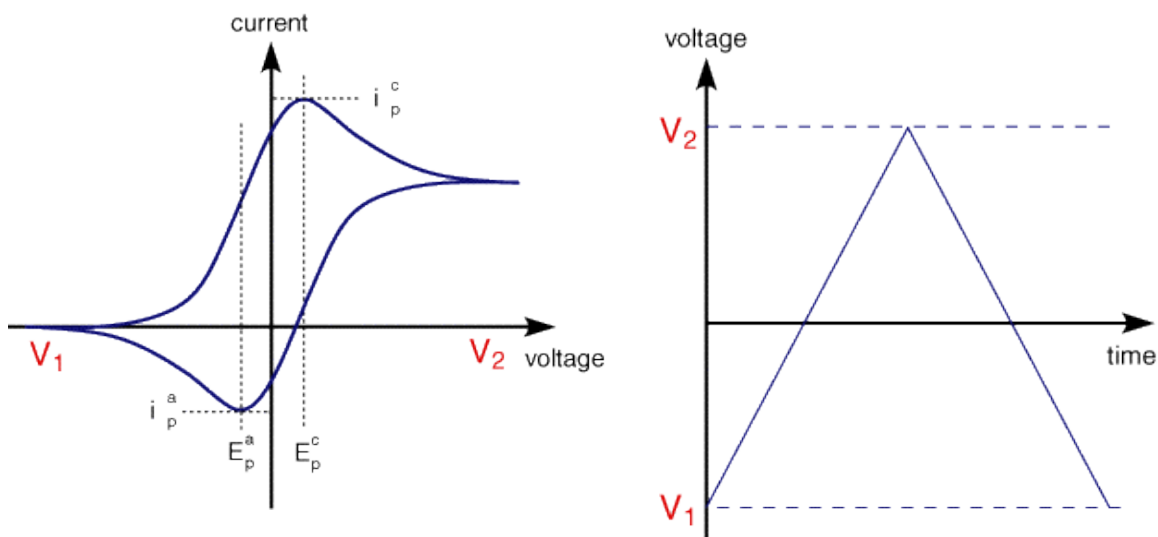


Slika 4. Ciklički voltamogram (chem.libretexts.org)

Od voltametrijskih tehnika u primjeni su najviše ciklička voltometrija (CV), diferencijalna pulsna (DPV), pravokutnovalna (*eng. square-wave voltammetry*; SWV) i stripping voltometrija (metoda otapanja pretkoncentriranog analita) (Nigović i Behetić, 2007).

### 1.2.1.1. CIKLIČKA VOLTAMETRIJA

Ciklička voltometrija (CV) je često primjenjivana elektrokemijska tehnika za istraživanje redukcijskih i oksidacijskih procesa molekulskih vrsta. Tijekom mjerenja primjenjuje se linearno rastući potencijal određenom brzinom promjene potencijala koji nakon određene vrijednosti promijeni svoj smjer (napravi jedan ciklus). Budući da je brzina promjene potencijala (*eng. scan rate*;  $\nu$ ) stalna, može se prikazati ovisnost jakosti izmjerene struje o nametnutom potencijalu. Tako se dobiva ciklički voltamogram (Slika 5) (Elgrishi i sur., 2018).



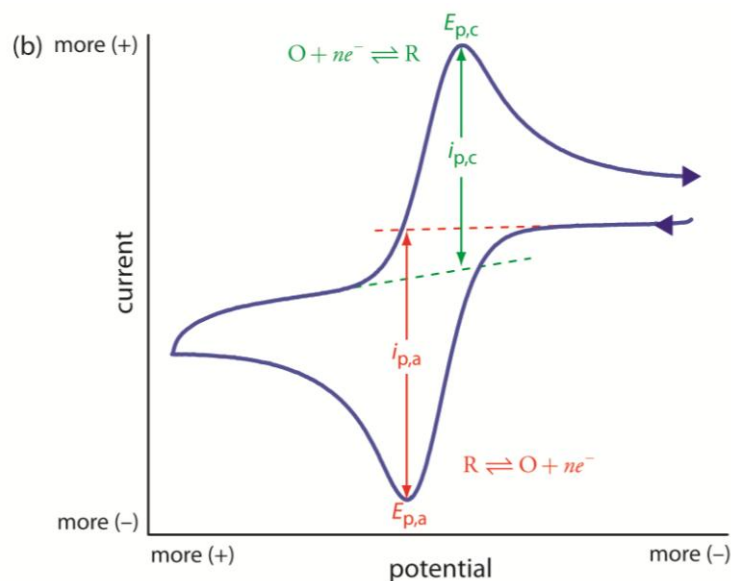
Slika 5. Prikaz signala pobude i odaziva u cikličkoj voltometriji ([www.ceb.cam.ac.uk](http://www.ceb.cam.ac.uk))

Jakost struje raste približavanjem potencijala redoks potencijalu analizirane tvari. Na karakterističnom potencijalu redoks procesa nastat će strujni vrh, a potom jakost struje pada zbog smanjenja koncentracije analita u blizini elektrode. Promjenom smjera potencijala dolazi do redukcije ili oksidacije produkata nastalih u prvom dijelu ciklusa. Na oblik cikličkog voltamograma utječu brzine prijenosa elektrona, prijenosa tvari te kemijske reakcije koje prate redoks reakcije (Nigović i Behetić, 2007).

Potencijali vrha redukcije ( $E_{pc}$ ) i oksidacije ( $E_{pa}$ ) te vršne jakosti struje ( $i_{pc}$ ,  $i_{pa}$ ) važne su varijable cikličke voltometrije (Slika 6). Potencijal vrha je karakterističan za svaku tvar, a reflektira njegovu sposobnost da prima ili daje elektrone. Brz transfer elektrona označava da je reakcija reverzibilna. Broj izmijenjenih elektrona određuje se iz razlike potencijala vrhova prema jednadžbi (1):

$$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 2,303 RT/nF \quad (1)$$

pri čemu je  $\Delta E_p$  razlika potencijala vrha i oksidacije,  $R$  opća plinska konstanta (8,314 J/Kmol),  $T$  apsolutna temperatura (u K),  $n$  broj izmijenjenih elektrona, a  $F$  Faradayeva konstanta (96485,34 C/mol). Pri radnim uvjetima od 25 °C, za redoks proces prijenosa  $n$  elektrona  $\Delta E_p$  iznosi  $0,0592/nV$  ili 60 mV za jedan elektron (Nigović i Behetić, 2007).



Slika 6. Prikaz određivanja vršnih potencijala i vršnih jakosti struja u cikličkoj voltametriji za reverzibilnu redoks reakciju (chem.libretexts.org)

Vršna jakost struje opisana je Randles-Ševčikovom jednađbom (2):

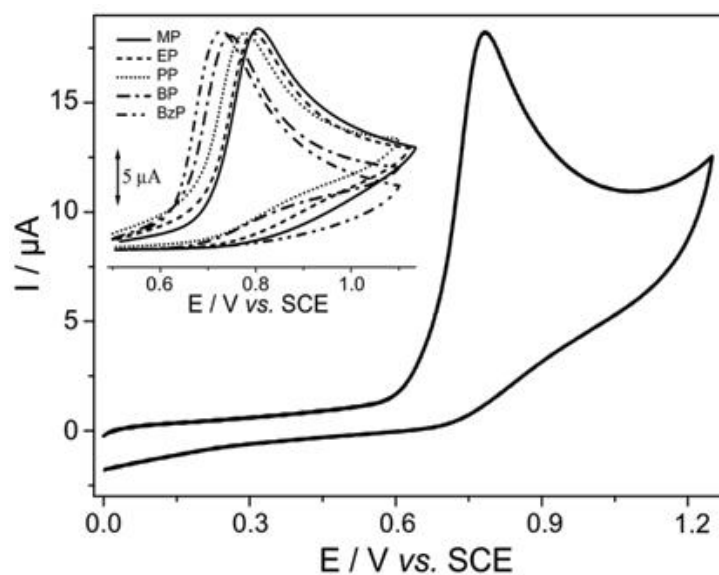
$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{\frac{3}{2}} A c_0 D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} = K c_0 \quad (2)$$

gdje je  $n$  broj izmijenjenih elektrona,  $A$  površina radne elektrode ( $\text{cm}^2$ ),  $D$  difuzijski koeficijent elektroaktivne vrste ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ),  $v$  brzina promjene potencijala ( $\text{V/s}$ ), a  $c_0$  koncentracija otopine ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ ). Ovaj izraz povezuje koncentraciju otopine i vršnu jakost struje u slučaju reverzibilne redoks reakcije (chem.libretexts.org).

Ako je riječ o ireverzibilnom procesu, tada Randles-Ševčikova jednađba (3) glasi:

$$i_p = \pm 0,496 (\alpha n')^{1/2} n F A c_0 (F D v / R T)^{1/2} \quad (3)$$

gdje je  $\alpha$  koeficijent prijenosa,  $n$  broj prenesenih elektrona po molu prije koraka o kojem ovisi brzina reakcije, a ostali članovi su jednaki onima u jednađbama (1) i (2). Za ireverzibilnu redoks reakciju (sporija izmjena elektrona) karakteristični su široko odijeljeni pikovi manje amplitude, izostanak povratnog pika te pomak vrha potencijala ovisno o brzini promjene potencijala (Slika 7) (Brownson i Banks, 2014).

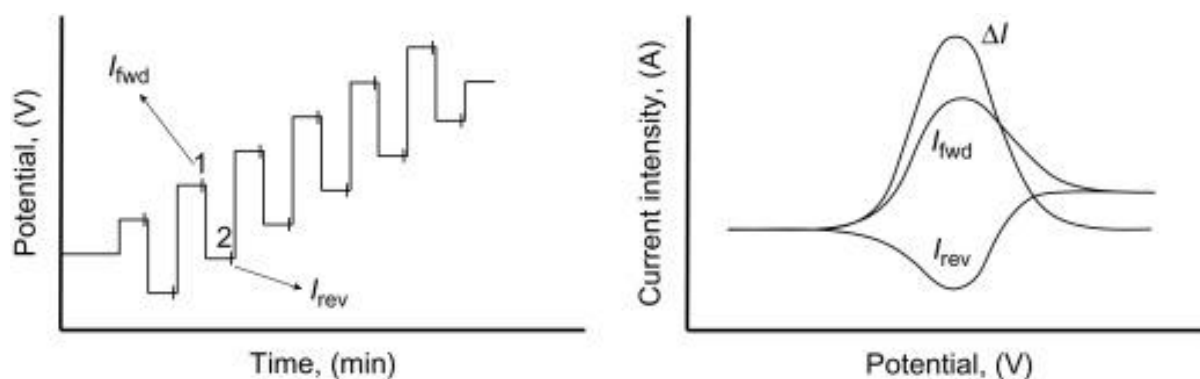


Slika 7. Prikaz cikličkog voltamograma ireverzibilne redok reakcije (www.scielo.br)

Ciklička voltametrija rijetko se koristi za kvantifikaciju ljekovitih tvari jer granica detekcije u idealnim uvjetima iznosi  $10^{-5} - 10^{-6}$  M (Nigović i Behetić, 2007). Međutim, koristi se u brojnim drugim istraživanjima kao što su ispitivanje arsenovih spojeva u kiselim otopinama (Brusciotti i DUBY, 2007), redoks priroda superoksid dismutaze (Azab i sur., 1992), adsorpcija i apsorpcija vodika na tanke filmove paladija (Gabrielli i sur., 2004).

### 1.2.1.2. PRAVOKUTNOVALNA VOLTAMETRIJA

Pravokutnovalna voltametrija (*square-wave voltammetry*, SWV) pulsna je tehnika koja mjeri jakost struje na radnoj elektrodi dok se potencijal mijenja tijekom vremena. Odaziv nastaje nakon primjene pravokutnovalnih pulseva na stepeničasti signal potencijala između radne i referentne elektrode. Jakost struje mjeri se na kraju pozitivnog smjera u kojem se odvija oksidacija te negativnog tijekom kojeg se događa redukcija analita, a za svaki od tih procesa dobiva se pik. Ako se prikaže razlika jakosti tih dviju struja u ovisnosti o primijenjenom potencijalu, dobiva se pravokutnovalni voltamogram. Visina pika proporcionalna je koncentraciji tvari (Slika 8) (Dias i sur., 2017).



Slika 8. Prikaz pobudnog signala u pravokutnovalnoj voltametriji i pravokutnovalni voltamogram ( $I_{fwd}$  = *forward current intensity*=polazna jakost struje,  $I_{rev}$ =*reverse current intensity*=povratna jakost struje,  $\Delta I=I_{fwd}-I_{rev}$ ) (Dias i sur., 2017)

Najveća prednost ove metode je njezina brzina jer frekvencije od 1 do 100 ciklusa u sekundi omogućuju brzu promjenu potencijala pa sama analiza kraće traje i cijeli se voltamogram snimi za nekoliko sekundi. Osim mogućnosti kvantifikacije analita, isti se može i identificirati prema potencijalu maksimuma (Nigović i Behetić, 2007). Nadalje, ova tehnika ne zahtijeva uklanjanje kisika iz otopine osim kad tijekom analize stupa u interakciju s elektrodnom reakcijom (Dias i sur., 2017). Mnogi je istraživači koriste za ispitivanje kinetike na elektrodama i dobivanje konstanti nastajanja kompleksa. Također se rabi kao brzi detektor u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC) gdje daje informacije o tvarima različitog potencijala koje simultano eluiraju iz kromatografske kolone ([www.ameteksi.com](http://www.ameteksi.com)).

Neke od primjena pravokutnovalne voltametrije su određivanje herbicida piklorama u prirodnim vodama (Massaroppi i sur., 2003), određivanje kadmija (II) u vodi za piće (Mhammedi i sur., 2010), determinacija rutina u zelenom čaju (Malagutti i sur., 2006).

### 1.2.2. KRUTE ELEKTRODE

Čvrste elektrode svoju primjenu u elektrokemiji imaju već pedesetak godina. Da bi čvrsti materijal djelovao kao elektroda, mora imati određene osobine: vodljivost, kemijsku i elektrokemijsku stabilnost pri različitim uvjetima, brz prijenos elektrona za raznovrsne redoks sustave te reproducibilna električna, mikrostrukturalna i kemijska svojstva. Predobradom takve elektrode, koja uključuje optimiranje morfologije površine elektrode, mikrostrukture i

kemijske prirode, snižava se pozadinska struja i povećava reakcijska kinetika analita koji je otopljen ili vezan za površinu elektrode. Tijekom tog procesa elektrode se „aktiviraju“ i to mehaničkim poliranjem, zagrijavanjem u vakuumu, tretmanom laserom, elektrokemijskom polarizacijom te djelovanjem plazme radiofrekvencije (Swain, 2007).

Popularnost im sve više raste jer oksidacija mnogih organskih molekula ne može biti praćena na živinoj elektrodi zbog njezinog ograničenog anodnog potencijala. Usto, mehanički su stabilnije i čvršće pa je njima lakše rukovati. Mnoge takve elektrode pokazuju površinska svojstva koja mogu značajno utjecati na redoks reakciju analita (Usli i Ozkan, 2007).

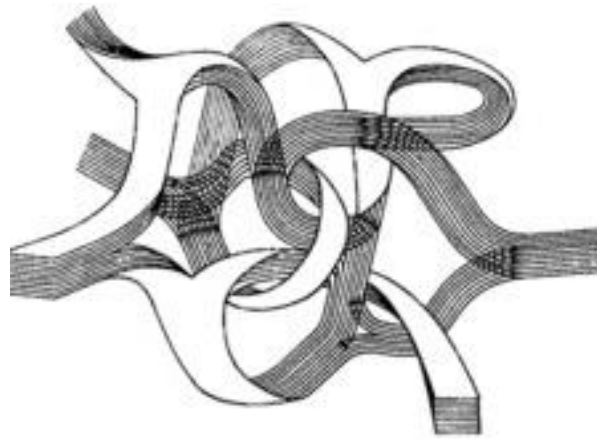
Krute elektrode najčešće karakterizira mala površina koja smanjuje razgradnju analita elektrolizom pa je izbor radne elektrode jedna od ključnih stavki koja osigurava osjetljivost i reproducibilnost mjerenja. Najčešće se koriste staklasta ugljikova elektroda, platinska, zlatna, ugljikova elektroda, itd. (Nigović i Behetić, 2007).

#### 1.2.2.1. ELEKTRODA OD STAKLASTOG UGLJIKA

Krute ugljikove elektrode često su u primjeni jer imaju širi raspon potencijala od drugih krutih elektroda, nisku pozadinsku struju, kemijski su inertne, relativno su jeftine i prikladne za detekciju različitih tvari. Materijal takvih elektroda ima šesteročlani aromatski prsten i  $sp^2$  hibridizaciju, a delokalizacija  $\pi$  elektrona i slabe Van der Waalove sile osiguravaju dobru električnu vodljivost. Najpoznatije elektrode bazirane na ugljiku sadrže staklasti ugljik, ugljikovu pastu, fullerene, voskom impregniran grafit, ugljikove nanocjevčice, itd. (Usli i Ozkan, 2007).

Staklasta ugljikova elektroda (*eng. glassy carbon electrode*; GCE) ima kombinirana svojstva stakla i uobičajenog industrijskog ugljika. Ima izvrsna električna i mehanička svojstva, širok raspon potencijala, veliku kemijsku inertnost i relativno veliku reproducibilnost. Nepermeabilna je za plinove i visokorezistentna na kiseline. Običan grafit se usitni u prah djelovanjem koncentriranih kiselina pri čemu taj postupak ne utječe na staklasti ugljik. Strukturno, staklasti ugljik je sastavljen od nasumično povezanih grafitnih ploha (Slika 9).





Slika 9. Struktura staklastog ugljika (Szeluga i sur., 2016)

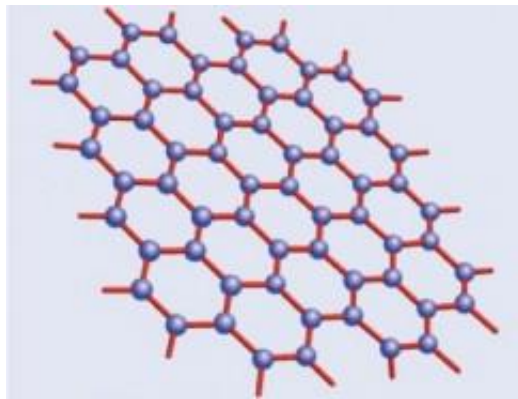
Gotovo sve staklaste ugljikove elektrode poliraju se malim aluminijskim česticama ( $\sim 0,05 \mu\text{m}$ ) na glatkoj tkanini za poliranje. Taj je tretman potreban za aktiviranje elektrode, stvaranje njezine površine reproducibilnom i poboljšanje njenog analitičkog učinka. Tako pripremljena elektroda treba biti isprana deioniziranom vodom prije upotrebe. Neki od dodatnih postupaka aktivacije elektrode uključuju elektrokemijske i kemijske procese, zagrijavanje u vakuumu ili tretman laserom (Uslu i Ozkan, 2007).

### 1.2.3. NANOMATERIJALI

Nanomaterijali su vrlo sitne čestice koje su prisutne u prirodi ili dobivene iz drugih tvari, kao što je ugljik ili minerali poput srebra. Ono što ih definira je barem jedna dimenzija manja od 100 nm. Često se ne mogu vidjeti ni konvencionalnim laboratorijskim mikroskopima. Mogu poprimiti jedinstvena optička, magnetna, električna i druga svojstva pa se široko primjenjuju u elektronici, medicini i drugim poljima ([www.niehs.nih.gov](http://www.niehs.nih.gov)). Nanomaterijali kao što su nanočestice, nanotube, nanožice i nanovlakna različitih veličina i sastava sve se više koriste u elektroanalizi jer mogu pospješiti imobilizaciju antigena, enzima i nukleinskih kiselina na površine elektrokemijskih uređaja, poboljšati reakcije prijenosa elektrona te povećati analitički signal (Merkoči i sur., 2010). Također unapređuju performanse biosenzora i tako osiguravaju bolju stabilnost, ponovljivost i osjetljivost u različitim ispitivanjima (Zhang i Wei, 2016). Najčešći nanomaterijali u upotrebi su nanočestice metala (npr. zlata, srebra) i

metalnih oksida (primjerice ZnO, TiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub>), grafen i druge modifikacije ugljika kao što su fulereni, ugljikove nanocjevčice i nanovlakna, nanoprah dijamanta itd.

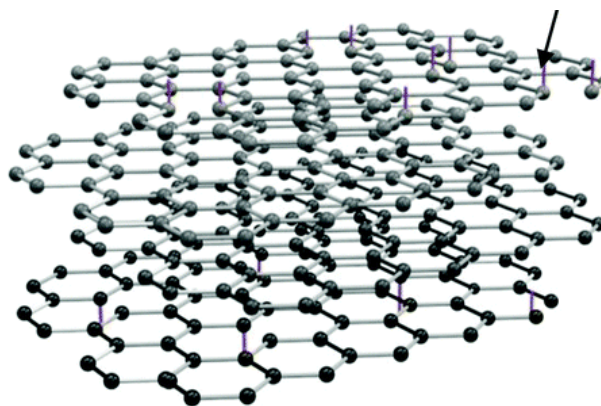
Grafen je sloj grafita debljine jednog atoma u obliku heksagonalne mreže (Slika 10) u kojoj su ugljikovi atomi povezani sp<sup>2</sup> vezama i egzistiraju u dvije dimenzije pa su nazvani dvodimenzionalnim (2D) materijalom. Izolirali su ga Andre Geim i Konstantin Novoselov 2004. godine i za to dobili Nobelovu nagradu 2010. ([www.nanowerk.com](http://www.nanowerk.com)).



Slika 10. Strukturni prikaz grafena ([graphene.nus.edu.sg](http://graphene.nus.edu.sg))

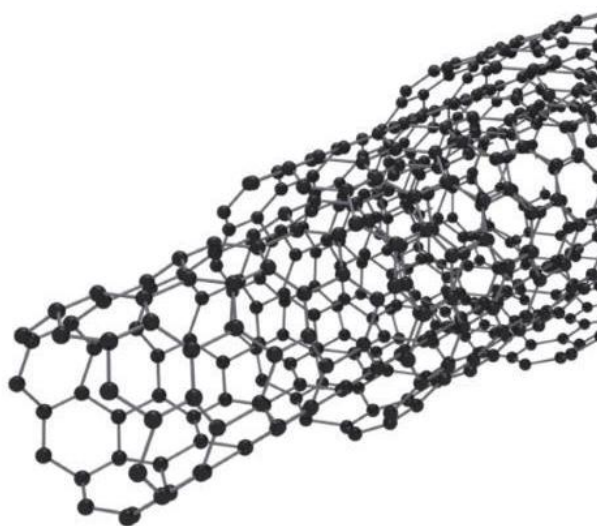
Izuzetno je snažan, oko 200 puta jači od čelika, izuzetno dobro provodi toplinu i elektricitet te posjeduje specifične mogućnosti apsorpcije svjetlosti. Jedan je od najtanjih materijala na svijetu i vrlo je lagan (0,77 mg/m<sup>2</sup>). Grafen je inertan, ali može „apsorbirati“ različite atome i molekule što mijenja njihova elektronska svojstva pa se koristi pri izradi senzora. Također se modificira različitim kemijskim skupinama pa nastanu različiti materijali kao što je grafen oksid ([www.graphene-info.com](http://www.graphene-info.com)).

Nanopločice grafena (*eng. graphene nanoplatelets*; GNP) predstavljaju jedan ili nekoliko slojeva grafena pomiješanog s debljim grafitom pa su strukturom između te dvije modifikacije (Slika 11). Debljina im varira od 0,34 do 100 nm u jednoj proizvodnoj seriji. Imaju odličnu električnu i toplinsku vodljivost, mehaničku čvrstoću, planarnu strukturu, lagane su i jeftinije od ugljikovih nanovlakana i nanocjevčica, a električna vodljivost im je veća od vodljivosti grafen oksida. To su razlozi zbog kojih često zamjenjuju različita nanostrukturirana punila u ispitivanjima materijala, metalne nanočestice i glinu. Lako se i uspješno uklapaju u polimerni matriks i tako mu promijene mehanička svojstva (Cataldi i sur., 2018).



Slika 11. Prikaz strukture nanopločica grafena (Im i sur., 2017)

Višeslojne ugljikove nanocjevčice (*eng. multi-walled carbon nanotubes; MWCNTs*) predstavljaju izdužene, cilindrične nanomaterijale građene od ugljika  $sp^2$  hibridizacije čiji promjer iznosi 3-30 nm (Slika 12) (Kukovecz i sur., 2013). Imaju veliku vodljivost (odnosi se na vanjski zid nanocjevčice), kemijski su stabilne, mogu značajno povećati snagu materijala u koji se ugrade i termička stabilnost im je održana i pri temperaturi višoj od 600 °C. Upotrebljavaju se u izradi električki vodljivih polimera, katoda baterija, membranskih filtara za vodu, materijala koji provode toplinu, itd. ([www.azonano.com](http://www.azonano.com)).



Slika 12. Struktura višeslojnih ugljikovih nanocjevčica ([www.ossila.com](http://www.ossila.com))

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Folna kiselina se kao suplement koristi kod upalnih bolesti crijeva kao što je Chronova bolest jer oboljeli često imaju nizak status folata. Tome doprinose i protuupalni lijekovi koje istovremeno primjenjuju jer mogu smanjiti apsorpciju folne kiseline zbog čega su potrebe pacijenata dodatno povećane. Stoga je važno pratiti njezinu koncentraciju u organizmu i to ne samo zbog njenih brojnih fizioloških uloga, nego i određivanja adekvatne doze suplementa za svakog pacijenta. Uzevši sve navedeno u obzir, metoda koja bi simultano određivala folnu kiselinu i lijek za Chronovu bolest (mesalazin je jedan od njih) u biološkim uzorcima, značajno bi unaprijedila dosadašnje načine analize. U tom bi slučaju za dobivanje podataka bilo potrebno manje reagensa, vremena i količine uzorka pa bi postupak analize bio ekonomičniji.

U svrhu istovremenog određivanja folne kiseline i mesalazina odabrane su elektroanalitičke metode, odnosno voltometrija jer je riječ o jeftinoj tehnici, velike brzine izvedbe koja uspješno analizira biološke uzorke, ali i farmaceutske oblike. Folna kiselina podliježe oksidaciji između dviju aromatskih struktura uslijed čega nastaje dvostruka veza na položaju C9-N10 pa se taj prijenos elektrona na voltamogramu vizualizira u obliku pika.

Da bi se ostvario što veći signal i smanjila pozadinska struja, ispitivanja su vršena na elektrodi od staklastog ugljika modificiranoj različitim nanomaterijalima, kao što su nanopločice grafena i kemijski modificirane višeslojne ugljikove nanocjevčice. Osim tih varijacija, mijenjala se pH vrijednost ispitivane otopine i parametri unutar same metode. Usto, vršena su mjerenja smjese folne kiseline i mesalazina kako bi se optimirali parametri nove metode koja bi u uzorku simultano određivala obje tvari.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. KEMIKALIJE

Za izradu ovog diplomskog rada korištene su sljedeće supstancije:

1. Borna kiselina,  $H_3BO_3$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
2. Fosfatna kiselina,  $H_3PO_4$  (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
3. Nafion (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
4. Natrijev hidroksid, NaOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
5. Folna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
6. Octena kiselina,  $CH_3COOH$  (Alkaloid Skopje, Skopje, Makedonija)
7. Ultračista voda (dobivena pomoću Milli-Q sustava, Millipore, Bradford, SAD)
8. Višeslojne ugljikove nanocjevčice modificirane amino skupinama (US Research Nanomaterials, Inc., Houston, SAD)
9. Višeslojne ugljikove nanocjevčice modificirane karboksilnim skupinama (US Research Nanomaterials, Inc., Houston, SAD)
10. Višeslojne ugljikove nanocjevčice modificirane hidroksilnim skupinama (US Research Nanomaterials, Inc., Houston, SAD)
11. Višeslojne ugljikove nanocjevčice modificirane grafitom (US Research Nanomaterials, Inc., Houston, SAD)
12. 1 %-tna otopina kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini
13. Mesalazin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)

### 3.2. RADNI INSTRUMENTI

Za vaganje uzoraka za analizu i korištenih nanomaterijala upotrijebljena je analitička vaga Mettler Toledo AB-204-S. Britton-Robinson puferu i otopinama za ispitivanje podešavala se pH vrijednost pomoću pH-metra s kombiniranom staklenom elektrodom (Mettler Toledo) koji se kalibrira standardnim otopinama pufera čiji je  $pH_1 = 4,00 \pm 0,01$  te  $pH_2 = 7,00 \pm 0,01$ . Kako bi se suspenzije nanomaterijala i otopine uzoraka homogenizirale, upotrijebila se ultrazvučna kupelj Elmasonic S 30H Elma. Korištena je i za čišćenje površine elektrode nakon svakog mjerenja i prije nanošenja sloja nanomaterijala na istu površinu.

Za cikličku i pravokutnovalnu voltometrijsku analizu upotrebljavao se potenciostat  $\mu$ -Autolab (Eco Chemie) kojim je upravljao računalni program GPES 4.9 te elektrokemijski čanak s tri

elektrode. Staklasta ugljikova elektroda rabila se kao radna elektroda, a tijekom ispitivanja njezina se površina modificirala različitim nanomaterijalima, primjerice dijamntnim nanoprahom, nanopločicama grafena te višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama s vezanim kemijskim skupinama kao što su karboksilna, hidroksilna i amino skupina te grafit. Otopina nafiona ili kitozana služila je za suspendiranje navedenih nanomaterijala. Ulogu referentne elektrode imala je srebro/srebrov klorid (Ag/AgCl) elektroda, dok je platinska elektroda korištena kao pomoćna elektroda.

### 3.3. PRIPREMA OTOPINA I SUSPENZIJA NANOMATERIJALA

#### 3.3.1. MATIČNA OTOPINA

Za potrebu izrade matične otopine folne kiseline ( $M_r = 441,404 \text{ g/mol}$ ) koncentracije  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  prvo je na analitičkoj vagi u praščiću za vaganje izmjerena odvaga navedene tvari koja iznosi 4,414 mg i koja je potom kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 10,0 mL. Da bi taj prijenos uistinu bio kvantitativan, praščić se dodatno isprao ultračistom vodom u tikvicu. Tikvica je dopola napunjena ultračistom vodom i dodane su joj dvije kapi NaOH jer se tako pospješuje otapanje folne kiseline. Zatim je tikvica stavljena u ultrazvučnu kupelj kako bi se folna kiselina što brže otopila te da ne bi zaostale neotopljene čestice. Nakon tog postupka tikvica je napunjena ultračistom vodom do oznake, izmučkana, poklopljena čepom, oblijepljena parafilmom oko čepa i spremljena u hladnjak na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  gdje je ujedno zaštićena od svjetlosti.

Budući da je u pojedinim koracima analizirana smjesa folne kiseline i mesalazina, trebalo je pripremiti i matičnu otopinu mesalazina ( $M_r = 153,137 \text{ g/mol}$ ) koncentracije  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ . Odvagom 0,0015 g navedene tvari i ponavljanjem svih gore opisanih koraka, osim dodavanja dvije kapi NaOH, priređena je i ta matična otopina.

#### 3.3.2. BRITTON-ROBINSON PUFER

Britton-Robinson (BR) pufer smjesa je borne ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), octene ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) i fosfatne ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) kiseline koncentracije 0,5 M. U odmjernu tikvicu od 250,0 mL pipetira se 20,0 mL svake kiseline i nadopuni se ultračistom vodom do oznake. Tako dobiven pufer ima pH vrijednost 1,8, a željeni pH dobiva se dodavanjem određenog volumena 0,2 M otopine NaOH.



### 3.3.3. RADNE OTOPINE

Radne otopine folne kiseline koncentracija  $1 \times 10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M i  $1 \times 10^{-5}$  M priređene su pipetiranjem potrebnog volumena matične otopine u odmjernu tikvicu od 20,0 mL, a koji je zatim razrijeđen Britton-Robinson puferom određene pH vrijednosti. U Tablici 1. prikazane su koncentracije radnih otopina i volumeni matične otopine potrebni za postizanje gore navedenih koncentracija.

Tablica 1. Priprema radnih otopina folne kiseline

otopina	koncentracija otopine	volumen matične otopine	ukupni volumen otopine
radna otopina 1	$1 \times 10^{-4}$ M	2 mL	20,0 mL
radna otopina 2	$5 \times 10^{-5}$ M	1 mL	20,0 mL
radna otopina 3	$1 \times 10^{-5}$ M	100 $\mu$ L	20,0 mL

Kada su bili mjereni zajedno, koncentracija mesalazina također je trebala iznositi  $5 \times 10^{-5}$  M i  $1 \times 10^{-5}$  M. Određeni volumeni matične otopine mesalazina pipetirani su u odmjernu tikvicu od 20,0 mL i razrijeđeni Britton-Robinson pufera željenog pH. U Tablici 2. prikazane su koncentracije radnih otopina i volumeni matične otopine mesalazina potrebni za postizanje spomenutih koncentracija.

Tablica 2. Priprema radnih otopina mesalazina

otopina	koncentracija otopine	volumen matične otopine	ukupni volumen otopine
radna otopina 1	$5 \times 10^{-5}$ M	1 mL	20,0 mL
radna otopina 2	$1 \times 10^{-5}$ M	100 $\mu$ L	20,0 mL

### 3.3.4. SUSPENZIJE NANOMATERIJALA

Na analitičkoj vagi izvaže se zasebno 1 mg nanopločica grafena, 1 mg višeslojnih ugljikovih nanocjevčica s vezanim amino skupinama, 1 mg višeslojnih ugljikovih nanocjevčicama modificiranih karboksilnim skupinama, 1 mg višeslojnih ugljikovih nanocjevčica s vezanim hidroksilnim skupinama i 1 mg višeslojnih ugljikovih nanocjevčica modificiranih grafitom. Svaki od navedenih nanomaterijala kvantitativno je prenesen u pojedinačne tikvice volumena 5,0 mL te je u svaku pipetiran 1,0 mL 0,3%-tne otopine Nafiona u etanolu. Ta je otopina dobivena razrjeđivanjem 600  $\mu$ l 5 %-tne otopine do ukupnog volumena 10,0 mL. Koncentracije tako priređenih suspenzija nanomaterijala iznose 1 mg/mL.

Za daljnja mjerenja ponovljen je prethodno opisan postupak vaganja navedenih nanomaterijala, ali je kao suspenzijsko sredstvo korištena otopina 0,5 %-tnog kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini. 1 %-tna otopina octene kiseline dobivena je razrjeđivanjem 100  $\mu$ l 100 %-tne octene kiseline do konačnog volumena od 10,0 mL. Miješanjem otopine 1 %-tnog kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini i 1 %-te otopine octene kiseline u jednakim omjerima, priređena je 0,5 %-tna otopina kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini. U zasebne tikvice od 5,0 ml stavljen je 1 mg svakog od nanomaterijala te je dodan 1 mL pripremljene otopine pa je tako koncentracija svake suspenzije iznosila 1 mg/ml.

Dodatno je pripremljena suspenzija višeslojnih ugljikovih nanocjevčica s grafitom u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini u koncentraciji 0,5 mg/mL i 2,0 mg/mL. Isto je napravljeno s višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama s vezanim amino skupinama. Da bi se postigla koncentracija 0,5 mg/mL, 1 mg svakog nanomaterijala zasebno je suspendirano u 2 mL spomenute otopine kitozana u tikvici od 5,0 mL. Dispergiranjem 2 mg svake tvari u 1 ml navedene otopine kitozana u pojedinačnim tikvicama volumena 5,0 mL dobivene su suspenzije nanomaterijala koncentracije 2 mg/mL.

Sve priređene suspenzije nanomaterijala zatvorene su čepom, oblijepljene parafilmom oko njega i pohranjene u hladnjak na 4 °C gdje su također zaštićene od svjetlosti.

### 3.4. PRIPREMA ELEKTRODA I UVJETI MJERENJA

Staklasta ugljikova elektroda prije svakog mjerenja polirala se na krpici posutom prahom aluminijevog oksida ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), stavila u ultrazvučnu kupelj kako na njenoj površini ne bi zaostala nijedna čestica te isprala deioniziranom vodom. Isto se učinilo i prilikom modifikacije te elektrode, samo je nakon sušenja na površinu elektrode nanoseno 5  $\mu\text{l}$  suspenzije nanomaterijala koja je prethodno homogenizirana u ultrazvučnoj kupelji. U razvoju metode u pojedinim je mjerenjima volumen nanomaterijala iznosio 3 i 10  $\mu\text{l}$ . Elektroda se može koristiti nakon što se nanese sloj u potpunosti osušio. Nakon određenog broja mjerenja sloj nanomaterijala opet se skidao poliranjem elektrode na krpici s  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , elektroda se stavila u ultrazvučnu kupelj i isprala destiliranom vodom. Ti su postupci provedeni za svaki nanomaterijal, dakle za višeslojne ugljikove nanocjevčice s vezanim grafitom, višeslojne ugljikove nanocjevčice s vezanim amino skupinama, višeslojne ugljikove nanocjevčice modificirane karboksilnim skupinama te višeslojne ugljikove nanocjevčice s vezanim hidroksilnim skupinama.

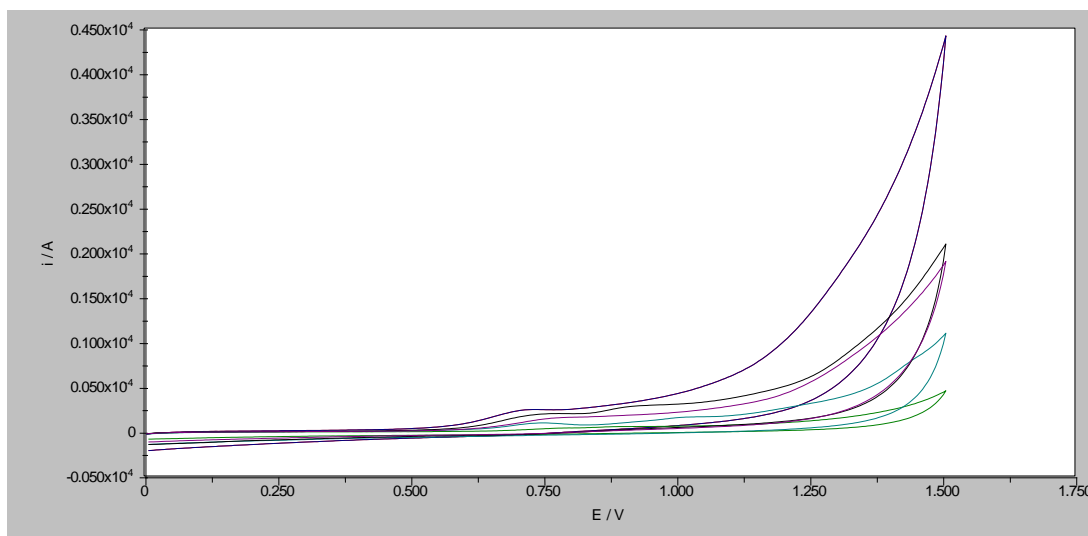
Pripremljena elektroda prvo se uronila u otopinu Britton-Robinson pufera željenog pH te su snimljena dva ciklička voltamograma da bi joj se ustalilo očitavanje jakosti struje. Potom se elektroda mogla uroniti u otopinu analita. Završetkom analize otopine uzorka elektroda je nanovo uronjena u otopinu Britton-Robinson pufera jer se dio analita adsorbirao na njenu površinu tijekom mjerenja pa bi mogao utjecati na daljnje rezultate mjerenja. Zatim se moglo pristupiti mjerenju drugih koncentracija analita. U slučaju da se želi nanijeti sloj drugog nanomaterijala, taj se korak preskače jer se površina elektrode ionako mora mehanički očistiti prethodno opisanim načinom.

Ciklički voltamogrami snimljeni su na nemodificiranoj staklastoj ugljikovoj elektrodi (*eng. glassy carbon electrode; GCE*), GCE modificiranoj višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama s grafitom, višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama vezanim s hidroksilnim skupinama, višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama modificiranim karboksilnim skupinama i višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama s vezanim amino skupinama suspendiranim u 0,3 %-tnoj otopini Nafiona u etanolu i 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini. pH vrijednosti kretale su se u rasponu od 2 do 8 koristeći Britton-Robinson pufer i 0,2 M otopinu NaOH. Brzina promjene potencijala iznosila je 100 mV/s u rasponu potencijala od 0 do 1,5 V.

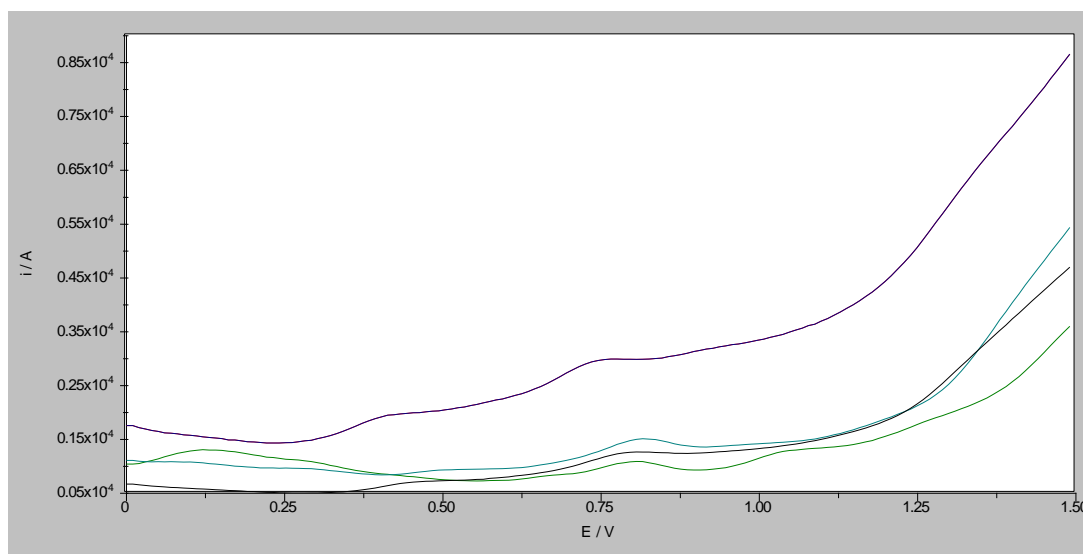
Pravokutnovalni voltamogrami snimljeni su na nemodificiranoj GCE te modificiranoj s gore navedenim nanomaterijalima u području potencijala od 0 do 1,5 V, frekvencije od 60 do 100 Hz, amplitude pulsa od 20 do 80 mV, promjene porasta potencijala od 2 do 10 mV te pH vrijednosti analiziranih otopina u rasponu od 2 do 8. Za razvoj nove metode bilo je nužno mijenjati ove parametre kako bi se najbolje međusobno uskladili i pružili optimalne uvjete analize, odnosno voltametrijskog odgovora analita.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Prvim mjerenjima trebalo je utvrditi pH vrijednost pri kojoj bi oksidacijski pik folne kiseline dao najveći odaziv i pri kojem bi pozadinska struja bila minimizirana. Cikličkom i pravokutnovalnom (SWV) voltametrijom analizirana je otopina folne kiseline u Britton-Robinson puferu (osnovni elektrolit) u pH rasponu od 2 do 8 upotrebom nemodificirane staklaste ugljikove elektrode (GCE). Mjerenje se najprije vršilo u BR puferu željenog pH kako bi se ustalilo očitavanje jakosti struje i rad elektrode, a potom u otopini uzorka. Dobiveni ciklički i pravokutnovalni voltamogrami prikazani su na slikama 13 i 14.

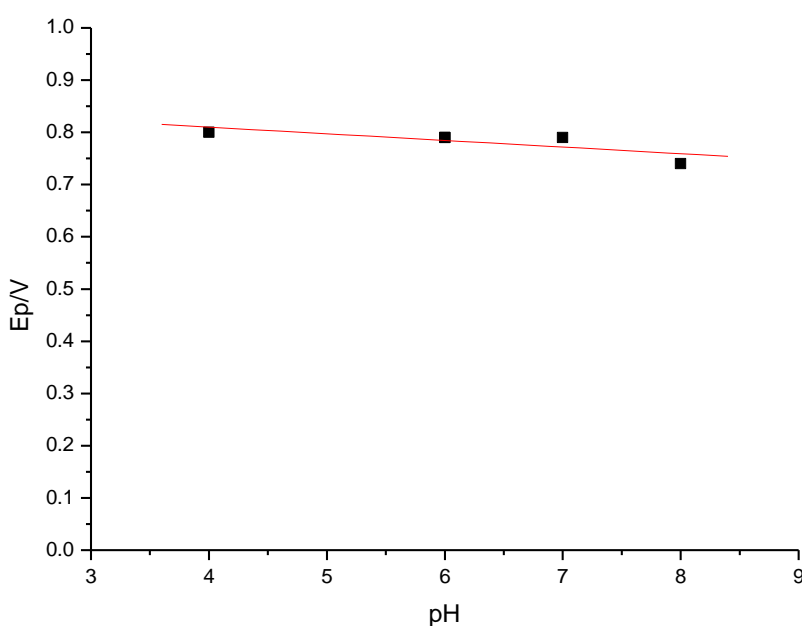


Slika 13. Ciklički voltamogrami otopine folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 2 (zeleno), pH 4 (cijan), pH 6 (crno), pH 7 (magenta) i pH 8 (plavo) na GCE pri brzini promjene potencijala 100 mV/s



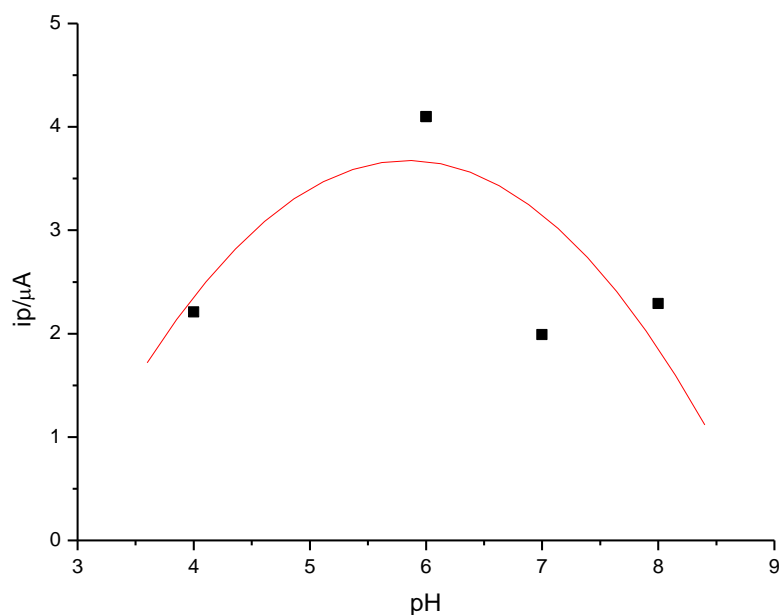
Slika 14. Pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 4 (zeleno), pH 6 (cijan), pH 7 (crno) i pH 8 (plavo) na GCE frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV

Pri pH 6 strujni vrh na potencijalu približno 0,80 V na oba je voltamograma najpravilniji, nema rastezanja pika i pokazuje najveću jakost struje. Nastaje kao posljedica oksidacije folne kiseline na položaju C9-N10 pri čemu se formira dvostruka veza. Pri tom pH karboksilne skupine folne kiseline su u deprotoniranom obliku. Zbog uočenih karakteristika taj je pH odabran za daljnja ispitivanja. Slika 15 prikazuje ovisnost potencijala folne kiseline o promjeni pH pri čemu se dobiva gotovo linearna ovisnost, a potencijali jako malo variraju s promjenom pH. Međutim, definiranost i visina strujnog pika uvjetuju izbor konkretne pH vrijednosti za naredna ispitivanja.



Slika 15. Ovisnost vršnog potencijala folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu mjenog na nemodificiranoj GCE frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV ovisno o promjeni pH

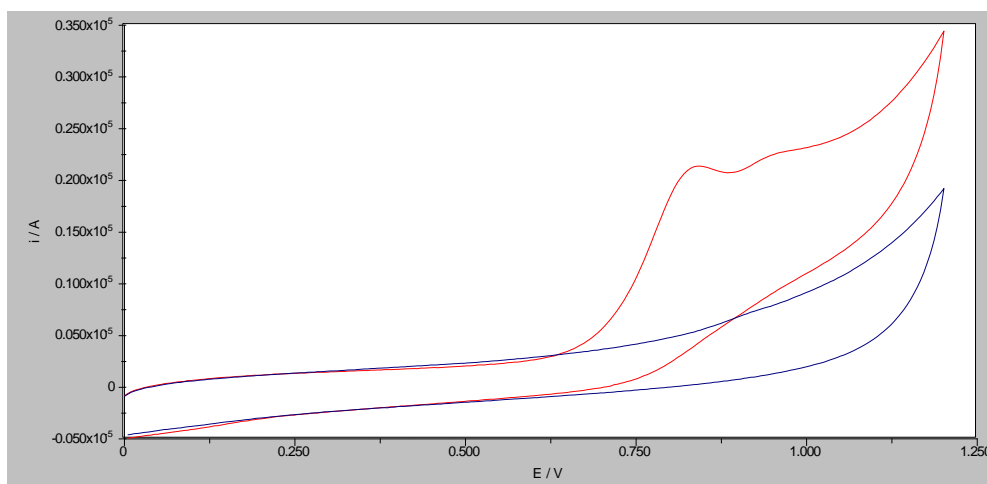
Na isti način pratila se ovisnost vršne jakosti struje ( $i_p$ ) o promjeni pH pri čemu se dobiva parabola koja jasno opisuje da jakost struje postupno raste, doseže svoj maksimum predajom elektrona i onda počinje padati. Na slici 16. eksplicitno se vidi da je vršna jakost struje najveća pri pH 6 te je taj podatak znatno uvjetovao izbor pH vrijednosti za iduća mjerenja.



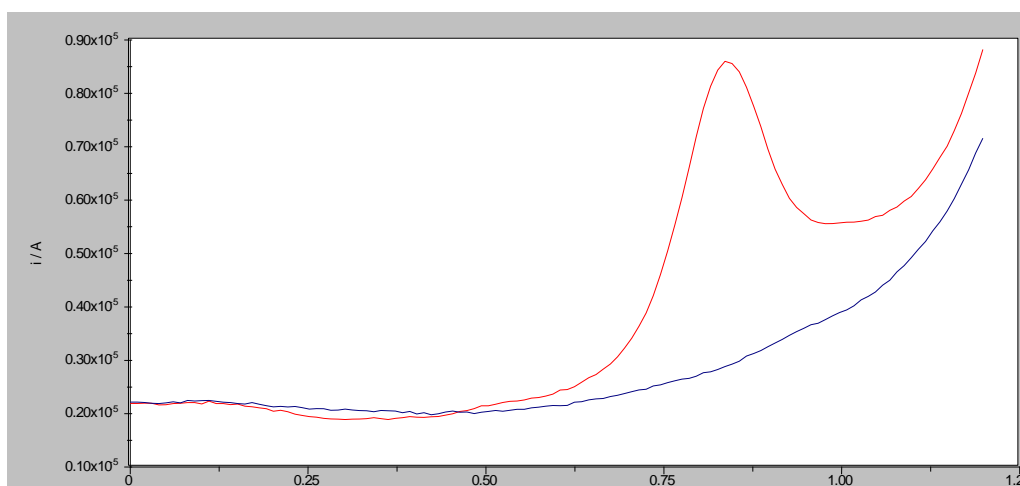
Slika 16. Ovisnost vršne jakosti struje ( $i_p$ ) folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu mjerene na nemodificiranoj GCE frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV ovisno o promjeni pH

Nakon toga su snimljeni ciklički i pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 na nemodificiranoj GCE u rasponu potencijala od 0 do 1,2 V jer je u tom području odaziv bio najistaknutiji te su očitane vrijednosti vršnog potencijala uzorka folne kiseline ( $E_{pot}$ ) te jakosti struje ( $I$ ). Navedeno je prikazano na slikama 17 i 18.





Slika 17. Ciklički voltamogram otopine folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 (crveno) i osnovnog elektrolita (plavo) na GCE pri brzini promjene potencijala 100 mV/s,  $E_{\text{pot}} = 0,84$  V,  $I = 9,29 \times 10^{-8}$  A

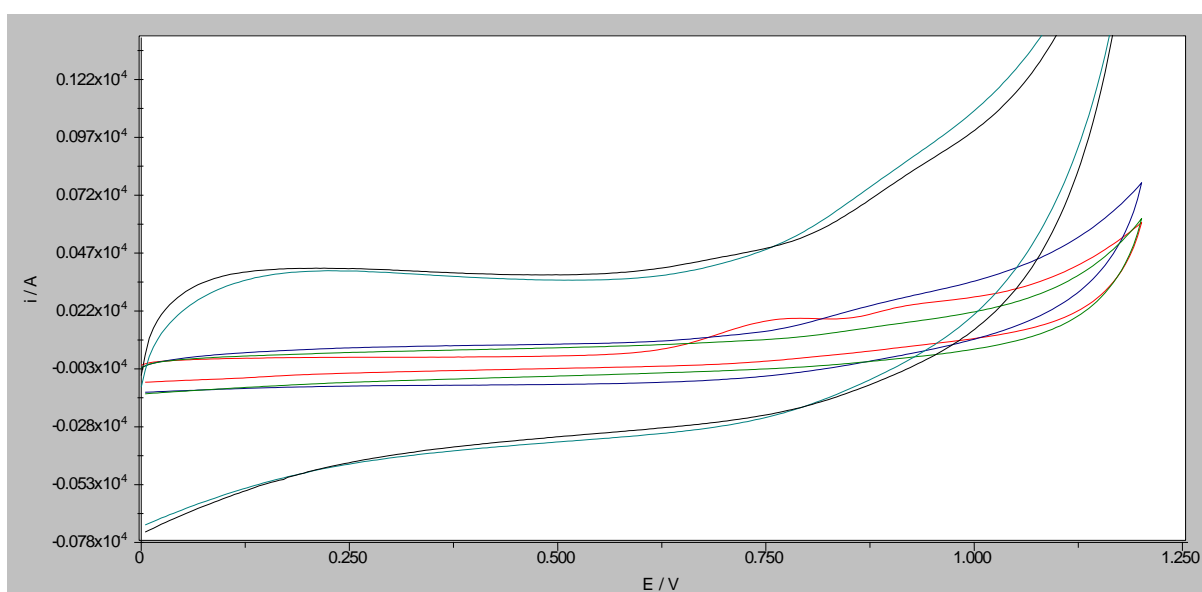


Slika 18. Pravokutnovalni voltamogram otopine folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 (crveno) i osnovnog elektrolita (plavo) na GCE frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV,  $E_{\text{pot}} = 0,84$  V,  $I = 4,52 \times 10^{-6}$  A

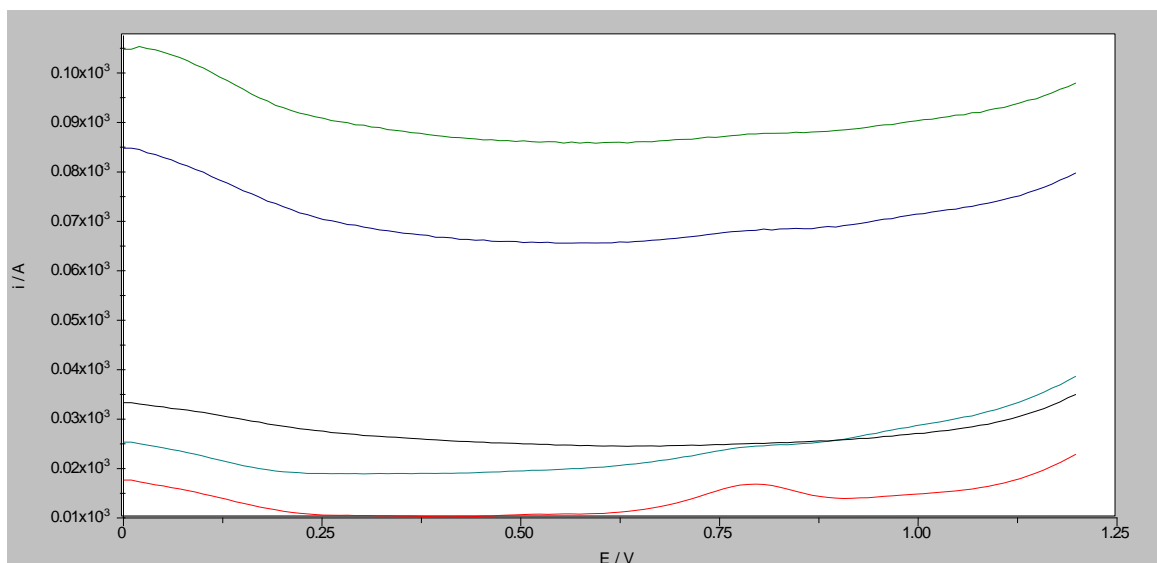
Voltamogrami jasno grafički, ali i brojčano pokazuju da je pravokutnovalna voltometrija puno osjetljivija metoda te je odaziv, odnosno jakost struje za dva reda veličine veća nego u cikličkoj voltametriji.

Nadalje, primjenom suspenzija nanomaterijala na površini GCE željelo se istražiti hoće li te promjene rezultirati većim voltametrijskim odazivom, manjom pozadinskom strujom i povećanom osjetljivošću. Stoga su snimljeni ciklički i pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 u rasponu potencijala od 0 do 1,2 V

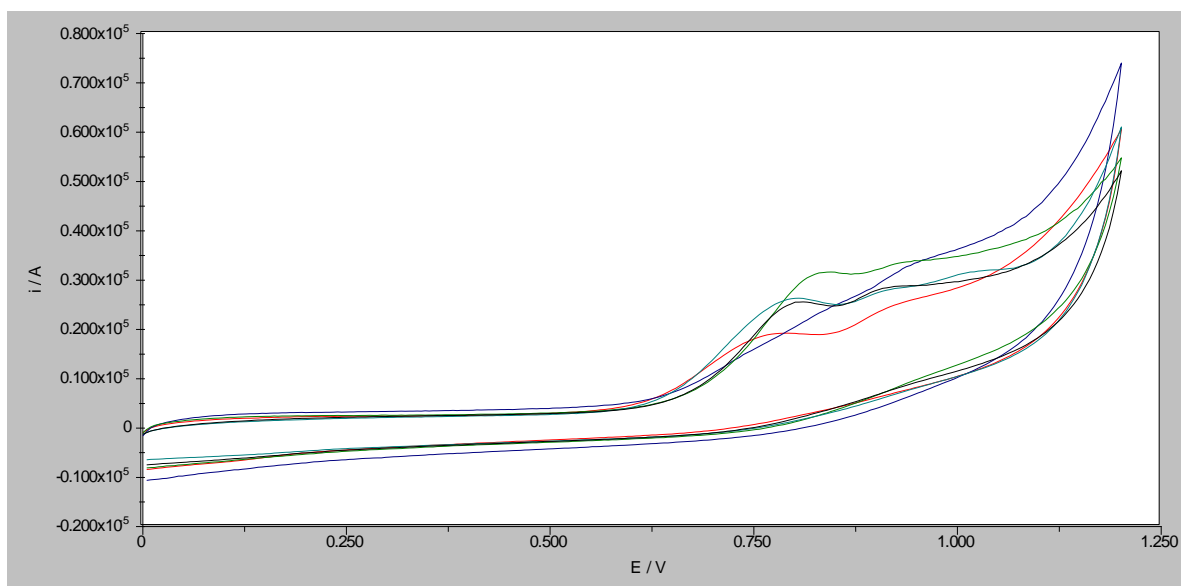
na GCE modificiranoj višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama s grafitom (MWCNT/grafit), višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama vezanim s hidroksilnim skupinama (MWCNT/OH), višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama modificiranim karboksilnim skupinama (MWCNT/COOH) i višeslojnim ugljikovim nanocjevčicama s vezanim amino skupinama (MWCNT/NH<sub>2</sub>) suspendiranima u 0,3 %-tnoj otopini Nafiona u etanolu i 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini. Koncentracija svake suspenzije nanomaterijala iznosila je 1 mg/mL. Dobiveni voltamogrami prikazani su na slikama 19, 20, 21 i 22.



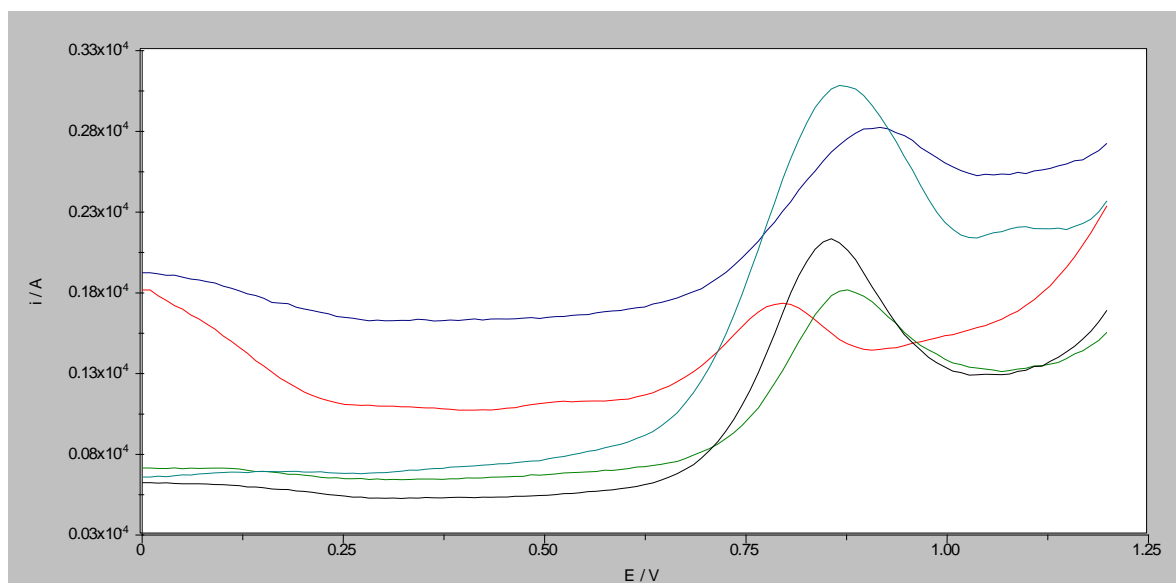
Slika 19. Ciklički voltamogrami otopine folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 na nemodificiranoj GCE (crveno) i GCE čija je površina modificirana MWCNT/NH<sub>2</sub> (zeleno), MWCNT/grafit (plavo), MWCNT/OH (cijan) i MWCNT/COOH (crno) ( $c=1$  mg/mL) u 0,3 %-tnoj otopini Nafiona u etanolu pri brzini promjene potencijala 100 mV/s



Slika 20. Pravokutnovoltni voltamogram otopine folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 na nemođificiranoj GCE (crveno) i GCE čija je površina modifikirana MWCNT/NH<sub>2</sub> (crno), MWCNT/grafit (cijan), MWCNT/OH (plavo) i MWCNT/COOH (zeleno) ( $c=1$  mg/mL) u 0,3 %-tnoj otopini Nafiona u etanolu frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV

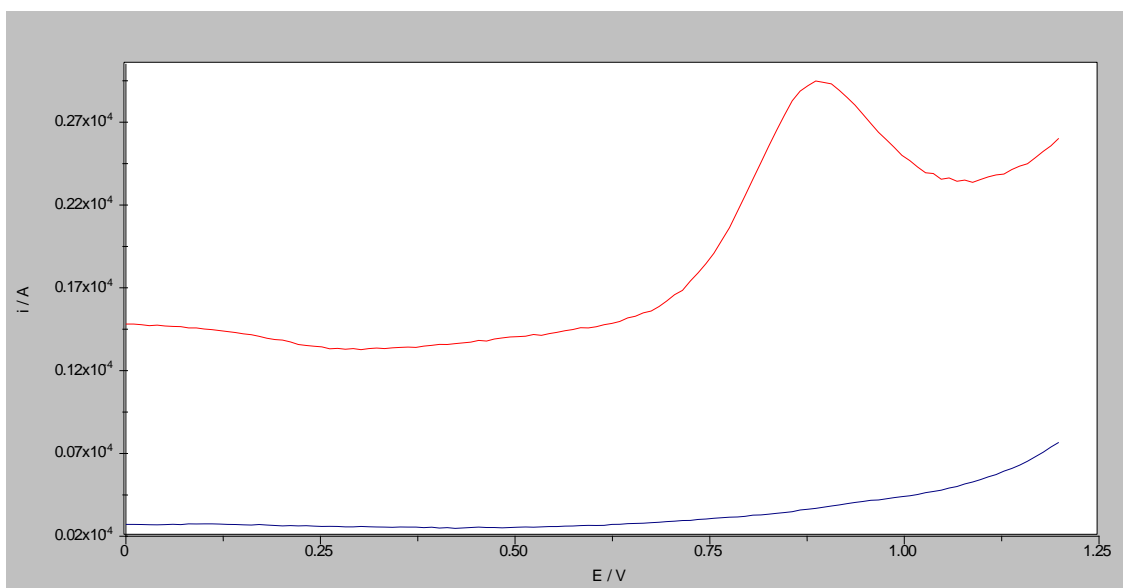


Slika 21. Ciklički voltamogrami otopine folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 na nemođificiranoj GCE (crveno) i GCE čija je površina modifikirana MWCNT/NH<sub>2</sub> (crno), MWCNT/grafit (cijan), MWCNT/OH (plavo) i MWCNT/COOH (zeleno) ( $c=1$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselinu pri brzini promjene potencijala 100 mV/s

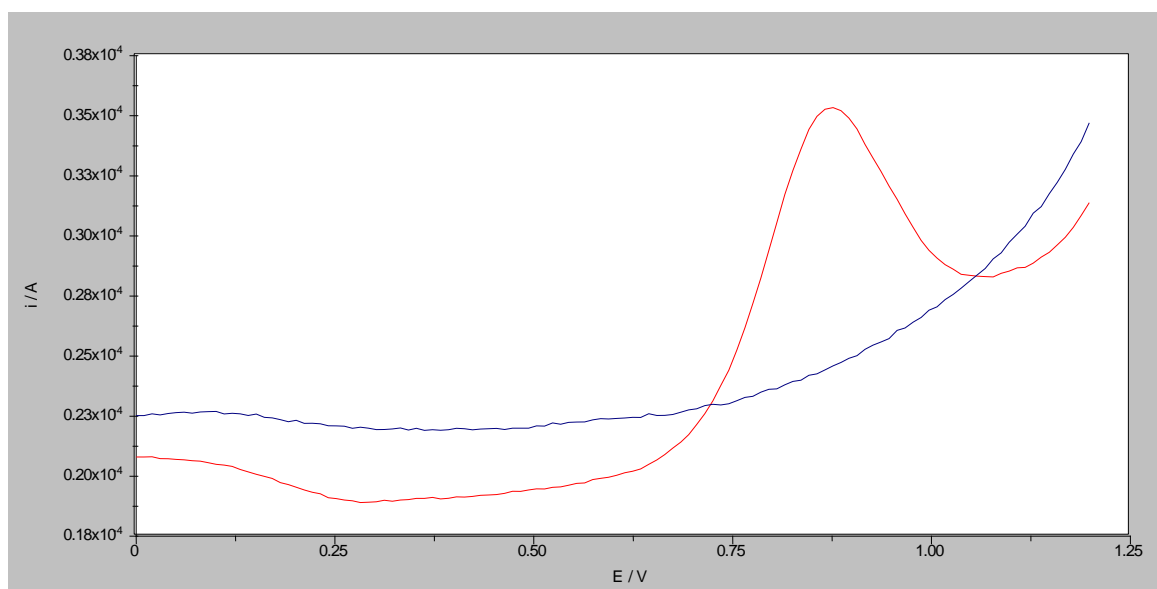


Slika 22. Pravokutnovalni voltamogram otopine folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 na nemedificiranoj GCE (crveno) i GCE čija je površina modificirana MWCNT/NH<sub>2</sub> (crno), MWCNT/grafit (cijan), MWCNT/OH (plavo) i MWCNT/COOH (zeleno) ( $c=1$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV

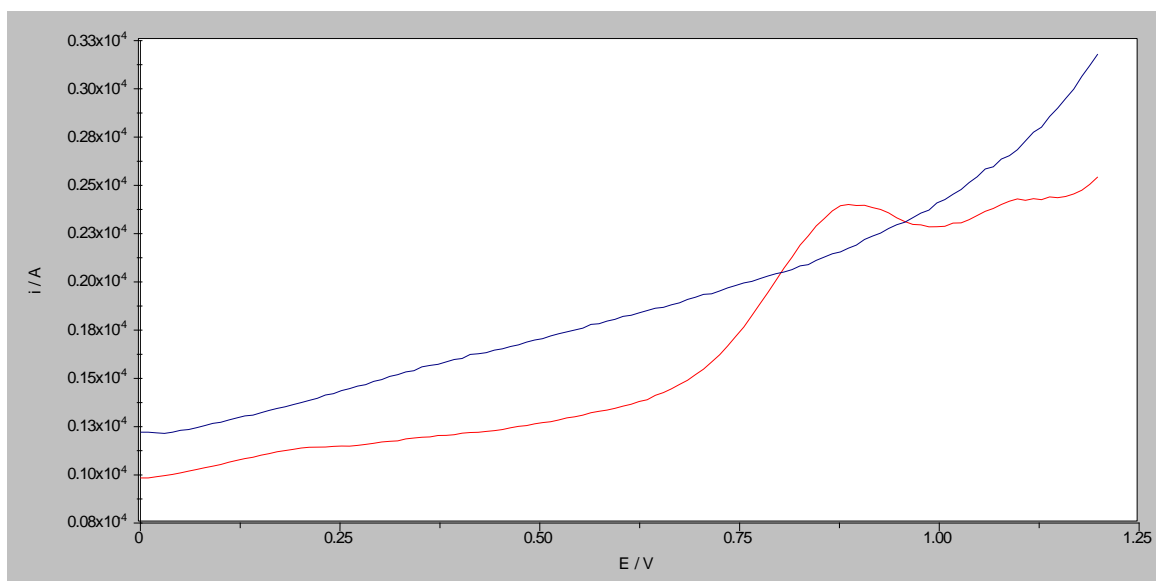
Iz priloženih voltamograma vidljivo je da su oksidacijski pikovi znatno veći kada se koristila suspenzija nanomaterijala u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini te da je pravokutnovalna voltametrijom i u ovim slučajevima znatno osjetljivija. Najbolje definirani pikovi dobiveni su modifikacijom površine elektrode uporabom MWCNT/NH<sub>2</sub> i MWCNT/grafit pa su ti nanomaterijali odabrani za daljnja preliminarna ispitivanja, ali su im promijenjene koncentracije kako bi se procijenio eventualni učinak takve varijacije na rezultate mjerenja. U tu su svrhu pripremljene suspenzija MWCNT/grafit u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini u koncentraciji 0,5 mg/mL i 2,0 mg/mL, a isto je napravljeno s MWCNT/NH<sub>2</sub> (priprema je opisana u odjeljku 3.3.4.). Pravokutnovalnom voltametrijom analizirala se otopine folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 u rasponu potencijala od 0 do 1,2 V na GCE čija je površina bila modificirana prethodno navedenim nanomaterijalima te su izmjerene vrijednosti vršnog potencijala uzorka folne kiseline ( $E_{pot}$ ) te jakosti struje (I). Voltamogrami su predstavljani slikama 23, 24, 25 i 26.



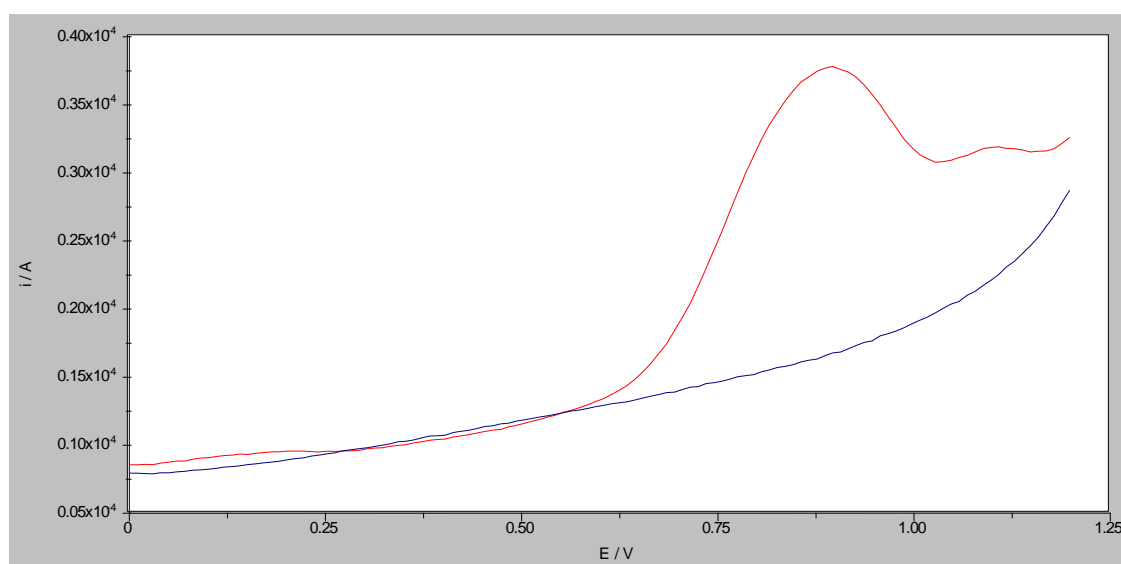
Slika 23. Pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 (crveno) i osnovnog elektrolita (plavo) na GCE čija je površina modificirana MWCNT/NH<sub>2</sub> ( $c=0,5$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV,  $E_{\text{pot}} = 0,89$  V,  $I = 10,0 \times 10^{-6}$  A



Slika 24. Pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 (crveno) i osnovnog elektrolita (plavo) na GCE čija je površina modificirana MWCNT/NH<sub>2</sub> ( $c=2,0$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV,  $E_{\text{pot}} = 0,87$  V,  $I = 10,9 \times 10^{-6}$  A

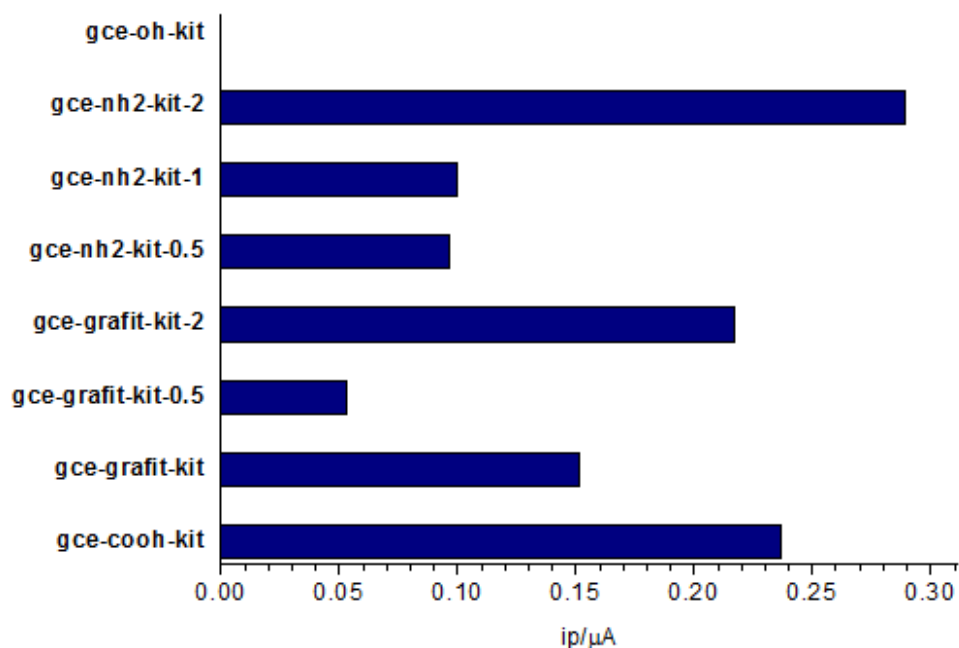


Slika 25. Pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 (crveno) i osnovnog elektrolita (plavo) na GCE čija je površina modificirana MWCNT/grafit ( $c=0,5$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV,  $E_{\text{pot}} = 0,88$  V,  $I = 4,55 \times 10^{-6}$  A

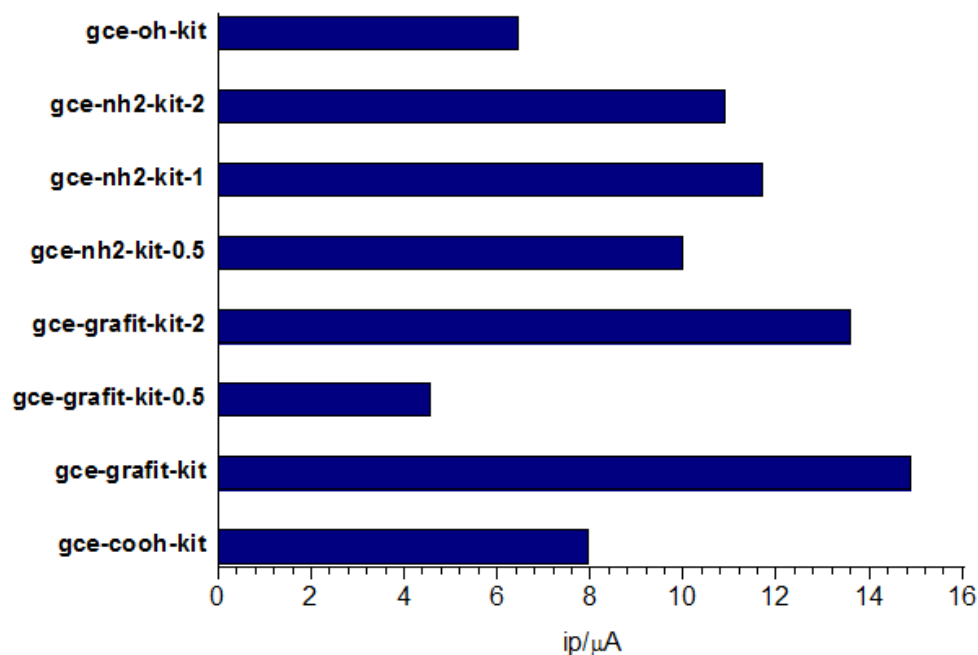


Slika 26. Pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 (crveno) i osnovnog elektrolita (plavo) na GCE čija je površina modificirana MWCNT/grafit ( $c=2,0$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV,  $E_{\text{pot}} = 0,86$  V,  $I = 13,6 \times 10^{-6}$  A

Voltamogrami nedvojbeno prikazuju da je MWCNT/NH<sub>2</sub> najprikladniji materijal za analizu folne kiseline jer unatoč malo manjim vrijednostima vršne jakosti struje pri koncentraciji nanaomaterijala 2 mg/mL daje puno pravilnije i definiranije voltametrijske pikove od onih koji se dobiju korištenjem MWCNT/grafit u istoj koncentraciji. Da bi se ova zapažanja dodatno potvrdila i sa sigurnošću donijela odluka o najprikladnijem nanomaterijalu za sljedeća ispitivanja, izrađeni su grafički prikazi koji uspoređuju izmjerene vršne jakosti struje na modificiranoj elektrodi tijekom cikličke (Slika 27) i pravokutnovalne voltametrije (Slika 28). Također se primjećuje da su vršni potencijali lagano pomaknuti prema pozitivnijim vrijednostima što ukazuje na ireverzibilnu reakciju oksidacije, a to potvrđuje i odsutnost povratnog pika. Razlog ovakvom postojanom odazivu na elektrodi modificiranoj s MWCNT/NH<sub>2</sub> je vjerojatna interakcija pozitivno nabijenih amino skupina nanomaterijala i deprotoniranih karboksilnih skupina folne kiseline u uvjetima voltametrijskih mjerenja.



Slika 27. Vršna jakost struje folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 izmjerena cikličkom voltametrijom na modificiranim GCE pri brzini promjene potencijala 100 mV/s



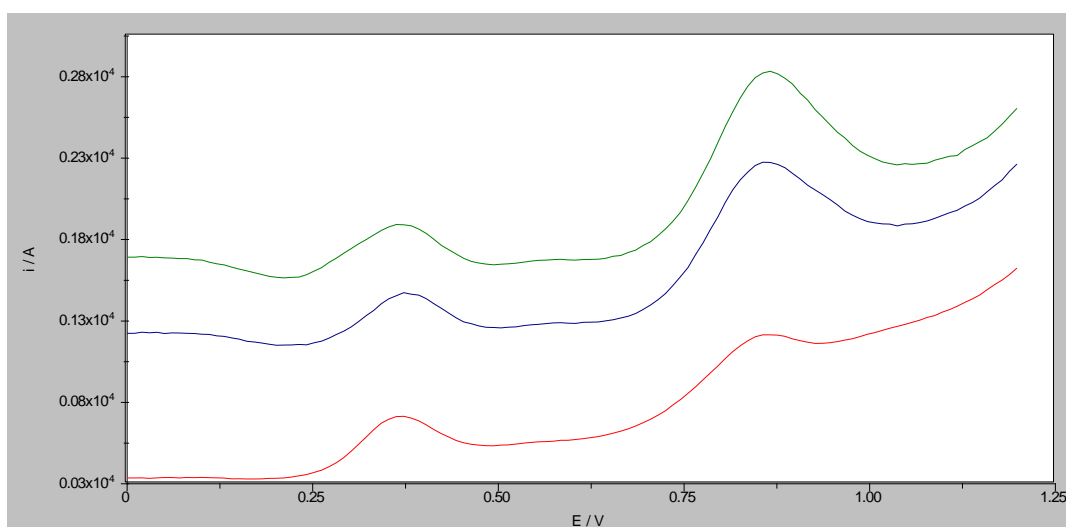
Slika 28. Vršna jakost struje folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M u BR puferu pH 6 izmjerena pravokutnovalnom voltametrijom na modificiranim GCE pri frekvenciji 100 Hz, amplitudi pulsa 40 mV i porastu promjene potencijala 10 mV

\* gce-oh-kit : GCE modificirana MWCNT/OH ( $c=1$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini; gce-nh2-kit-2 : GCE modificirana MWCNT/ $\text{NH}_2$  ( $c=2$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini; gce-nh2-kit-1 : GCE modificirana MWCNT/ $\text{NH}_2$  ( $c=1$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini; gce-nh2-kit-0,5 : GCE modificirana MWCNT/ $\text{NH}_2$  ( $c=0,5$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini; gce-grafit-kit-2 : GCE modificirana MWCNT/grafit ( $c=2$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini; gce-grafit-kit-0,5 : GCE modificirana MWCNT/grafit ( $c=0,5$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini; gce-grafit-kit : GCE modificirana MWCNT/grafit ( $c=1$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini; gce-cooh-kit : GCE modificirana COOH ( $c=1$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini

Budući da je pronađena optimalna pH vrijednost i prikladan nanomaterijal, sljedeća mjerenja bavila su se analizom smjese folne kiseline i mesalazina u nižim koncentracijama jer su ti spojevi u još nižim razinama prisutni u ljudskom organizmu pa je ta promjena vrlo važna. Snimljeni su pravokutnovalni voltamogrami otopine smjese folne kiseline i mesalazina, čija je koncentracija bila  $5 \times 10^{-5}$  M, na GCE modificiranoj MWCNT/ $\text{NH}_2$  ( $c=1,0$  i  $2,0$  mg/mL) u 0,5

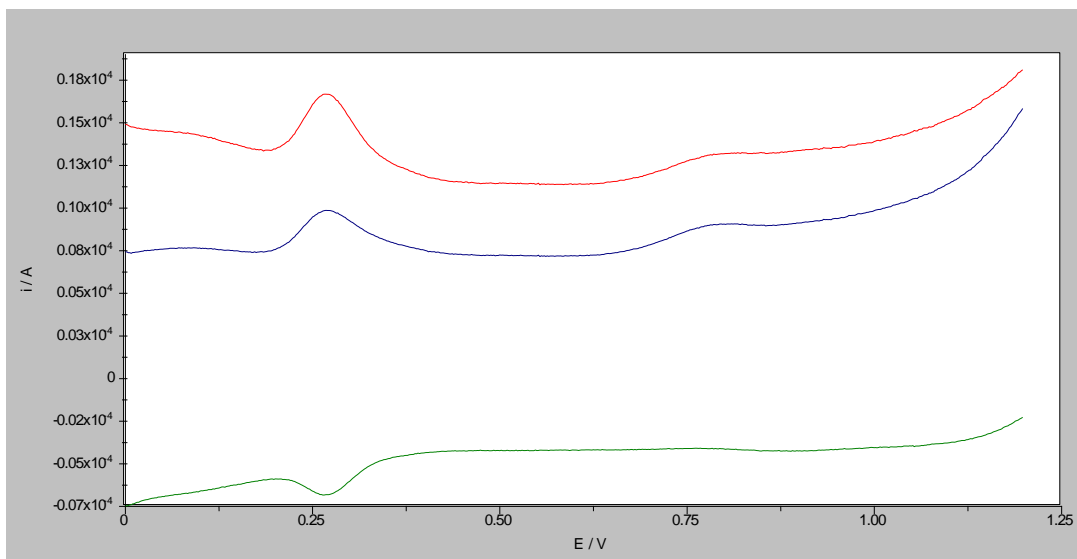


%-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiseline pri optimalnim SWV instrumentalnim parametrima folne kiseline te su izmjerene vrijednosti vršnog potencijala i jakosti struje ( $E_{pot}$ ,  $i_{me}$ ,  $E_{pot, fo}$ ,  $I_{fo}$ ; me=mesalazin, fo=folna kiselina) (Slika 29). Već je utvrđeno da pri potencijalu od približno 0,85 V nastaje oksidacijski pik folne kiseline dok se pri znatno nižem potencijalu, oko 0,35 V, razvija pik mesalazina. Takva razlika vršnih potencijala pogoduje istovremenom određivanju njihove koncentracije jer ne dolazi do preklapanja voltametrijskih pikova koje bi onemogućilo kvantitativno mjerenje.

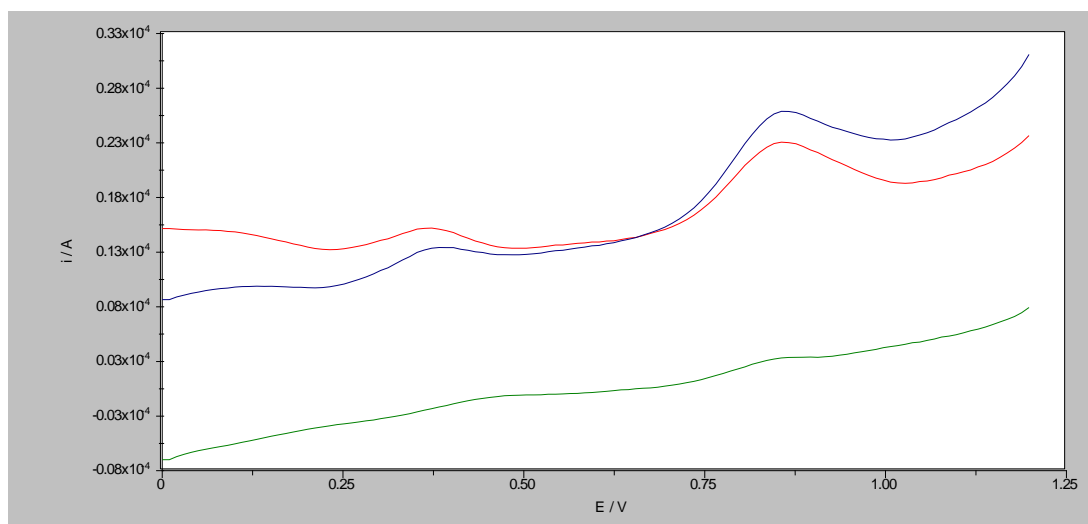


Slika 29. Pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline i mesalazina koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M u BR puferu pH 6 na nemodificiranoj GCE (crveno), GCE modificiranoj MWCNT/ $\text{NH}_2$  ( $c = 1,0$  mg/mL (plavo) i  $c = 2,0$  mg/mL (zeleno)) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiseline frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV,  $E_{pot, me} = 0,36$  V,  $I_{me} = 2,85 \times 10^{-6}$  A,  $E_{pot, fo} = 0,85$  V,  $I_{fo} = 2,67 \times 10^{-6}$  A (za zeleni voltamogram)

Da bi se potvrdila priroda ponašanja te dvije supstancije, načinjeni su pravokutnovalni voltamogrami na modificiranoj GCE koji ujedno prikazuju polazni i povratni odaziv pri različitim promjenama porasta potencijala. Voltamogrami koji potvrđuju da je oksidacija folne kiseline ireverzibilna reakcija za razliku od oksidacije mesalazina predstavljeni su slikama 30 i 31. Na njima se može uočiti i da porastom potencijala oksidacijski pik folne kiseline raste, dok se polazni i povratni pikovi mesalazina smanjuju. Oksidacija mesalazina je pri nižim brzinama promjene potencijala reverzibilna te se uočava povratna reakcija redukcije, dok je kod većih brzina promjene potencijala ireverzibilna što se očituje manjim voltametrijskim pikom koji se iskazuje kao razlika struja polaznog i povratnog odaziva.



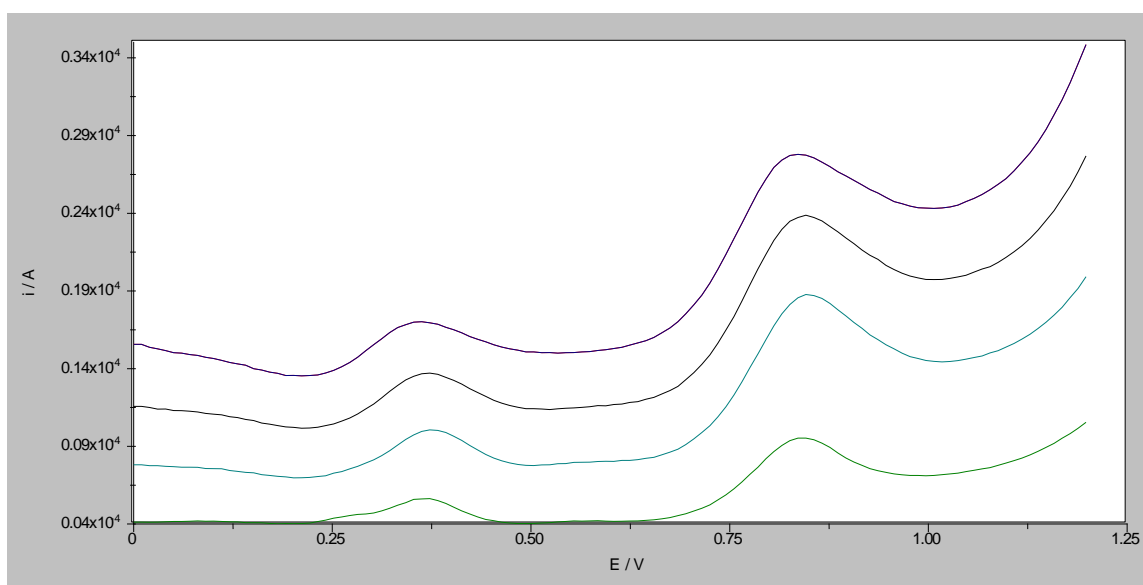
Slika 30. Pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline i mesalazina koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M u BR puferu pH 6 na nemodificiranoj GCE (plavo) i modificiranoj MWCNT/NH<sub>2</sub> (c=2,0 mg/mL) (crveno) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselinu te povratni odaziv (zeleno) frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 2 mV



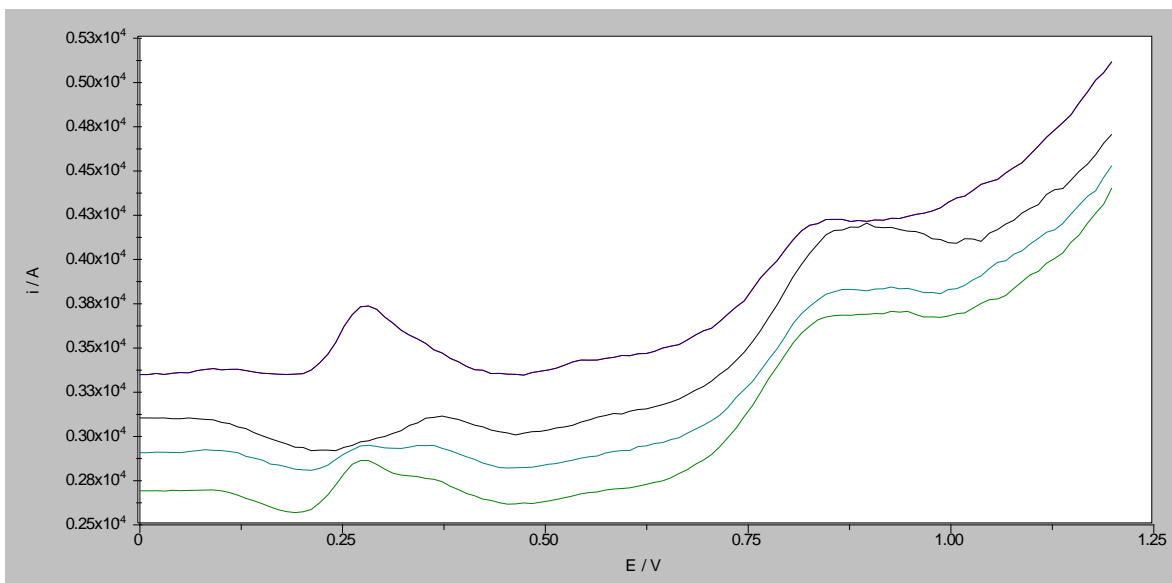
Slika 31. Pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline i mesalazina koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M u BR puferu pH 6 na nemodificiranoj GCE (plavo) i modificiranoj MWCNT/NH<sub>2</sub> (c=2,0 mg/mL) (crveno) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselinu te povratni odaziv (zeleno) frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV

Nakon toga smjesa je analizirana SWV tehnikom primjenom istog nanomaterijala koncentracije 1,0 mg/mL koji se pokazao stabilnijim od dvostruko veće koncentracije. Deblji

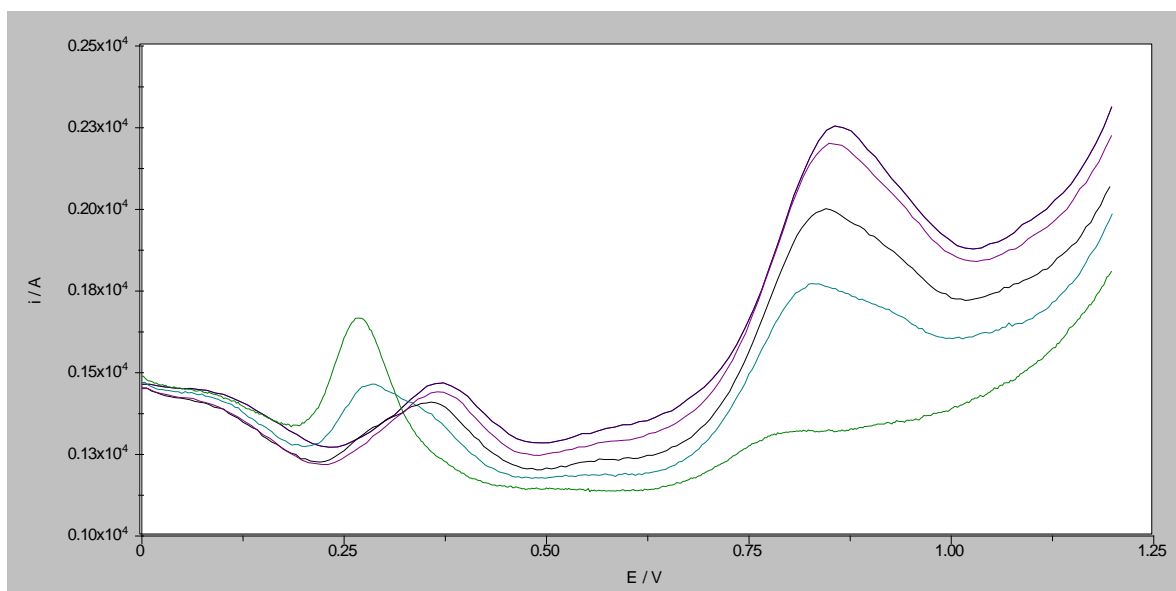
sloj nanomaterijala odvajao se od površine elektrode, a nije rezultirao bitno većim vrijednostima jakosti struje. Kombinirale su se različite vrijednosti frekvencije, amplitude pulsa i promjene brzine potencijala kako bi se utvrdilo na koji način te izmjene utječu na voltametrijske odazive oba analita te koji bi bili optimalni parametri u slučaju simultanog određivanja tih dviju tvari. Ta mjerenja prikazana su slikama 32, 33 i 34.



Slika 32. Pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline i mesalazina koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M u BR puferu pH 6 na GCE modificiranoj MWCNT/NH<sub>2</sub> ( $c=1,0$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini frekvencije 100 Hz, promjene porasta potencijala 10 mV i amplitude pulsa 20 mV (zeleno), 40 mV (cijan), 60 mV (crno) i 80 mV (plavo)

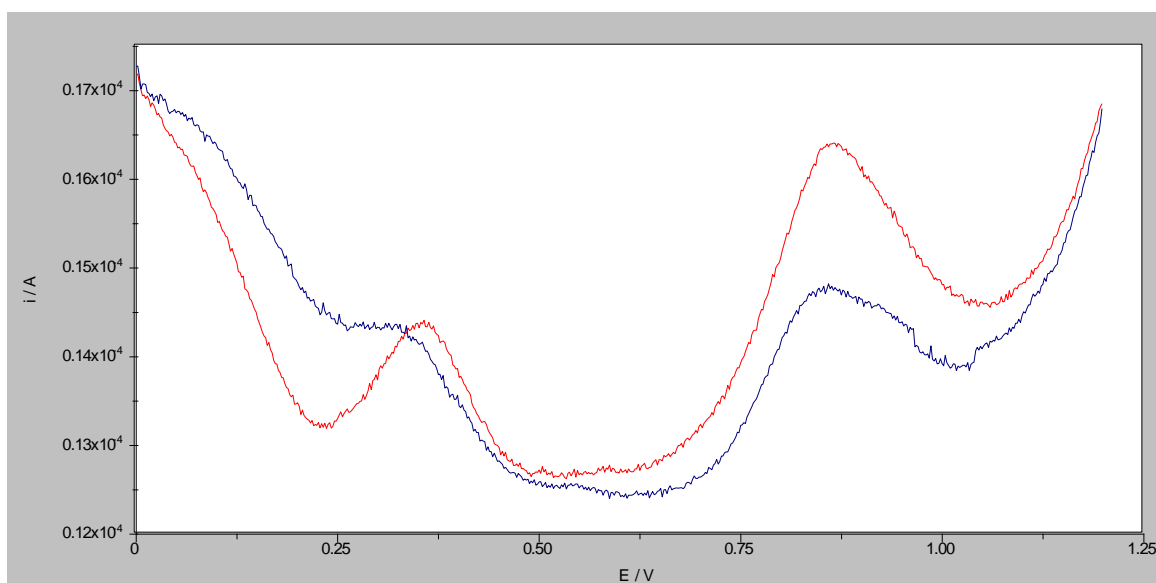


Slika 33. Pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline i mesalazina koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M u BR puferu pH 6 na GCE modificiranoj MWCNT/ $\text{NH}_2$  ( $c=1,0$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini promjene porasta potencijala 10 mV, amplitude pulsa 40 mV i frekvencije 70 Hz (zeleno), 80 Hz (cijan), 90 Hz (crno) i 100 Hz (plavo)

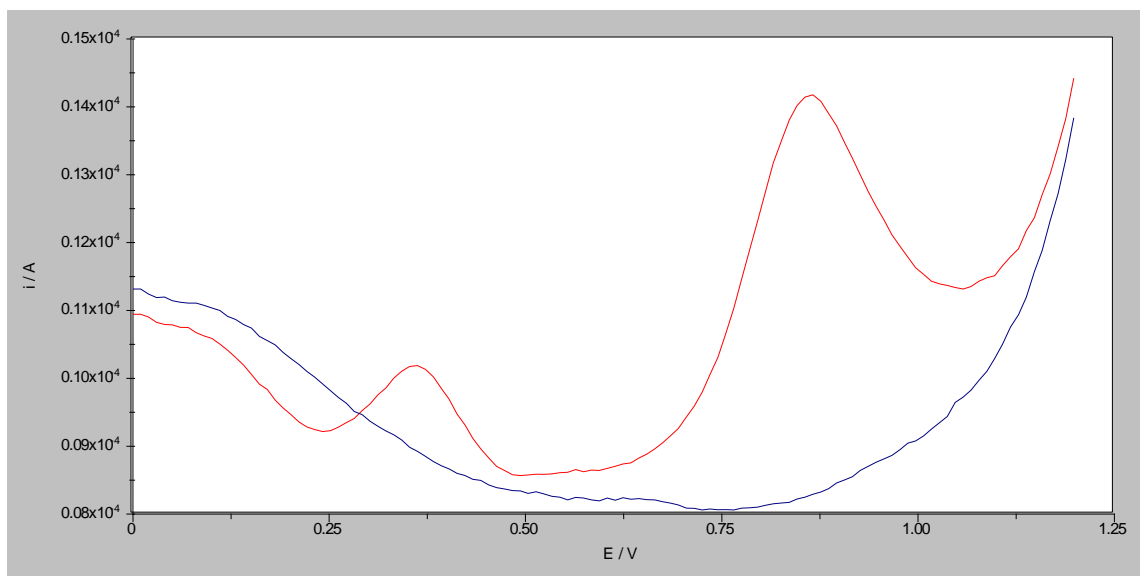


Slika 34. Pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline i mesalazina koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M u BR puferu pH 6 na GCE modificiranoj MWCNT/ $\text{NH}_2$  ( $c=1,0$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini frekvencije 85 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 2 mV (zeleno), 4 mV (cijan), 6 mV (crno), 8 mV (magenta), 10 mV (plavo)

Pređoĉeni voltamogrami pokazuju da najbolje rezultate daju SWV parametri koji su po vrijednostima bliski ili identični onima koji su se koristili pri ispitivanju same folne kiseline. Amplituda pulsa od 80 mV na slici 32 daje najbolje pikove, ali svejedno dolazi do blagog rastezanja pika folne kiseline, a isti je sluĉaj u znaĉajnijoj mjeri opažen kad se primjenjuje frekvencija od 100 Hz na idućoj slici. Štoviše, na slici 33 vidljivo je da pri frekvenciji nižoj od 90 Hz dolazi i do cijepanja pika mesalazina, a ta dva fenomena znatno bi otežavala određivanje koncentracije tih dvaju analita. Međutim, malo niža frekvencija (85 Hz) od one optimalne u analizi folne kiseline te promjena porasta potencijala od 10 mV daju jasno definirane pikove i za mesalazin i za folnu kiselinu (Slika 34). Voltamogrami na slikama 35 i 36 potvrđuju da je moguće kombinirati parametre koji su odvojeno korišteni za pojedinaĉna ispitivanja tih dviju tvari, no daleko najbolji rezultati uz najdefiniranije pikove najvećih iznosa jakosti struja daju oni koji su korišteni u analizi folne kiseline (frekvencija 100 Hz, amplituda pulsa 40 mV i promjena porasta potencijala 10 mV).

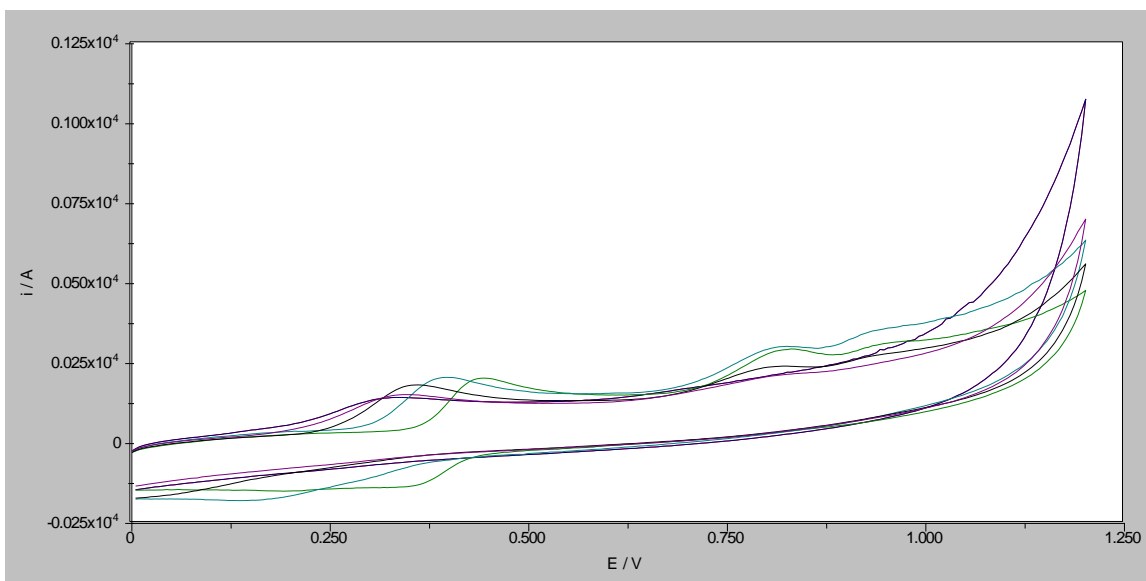


Slika 35. Pravokutnovalni voltamogrami otropole folne kiseline i mesalazina koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M (crveno) i osnovnog elektrolita (plavo) u BR puferu pH 6 na GCE modificiranoj MWCNT/NH<sub>2</sub> (c=2,0 mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 2 mV,  $E_{\text{pot, me}} = 0,36\text{V}$ ,  $I_{\text{me}} = 1,43 \times 10^{-6}$  A,  $E_{\text{pot, fo}} = 0,86$  V,  $I_{\text{fo}} = 2,66 \times 10^{-6}$  A

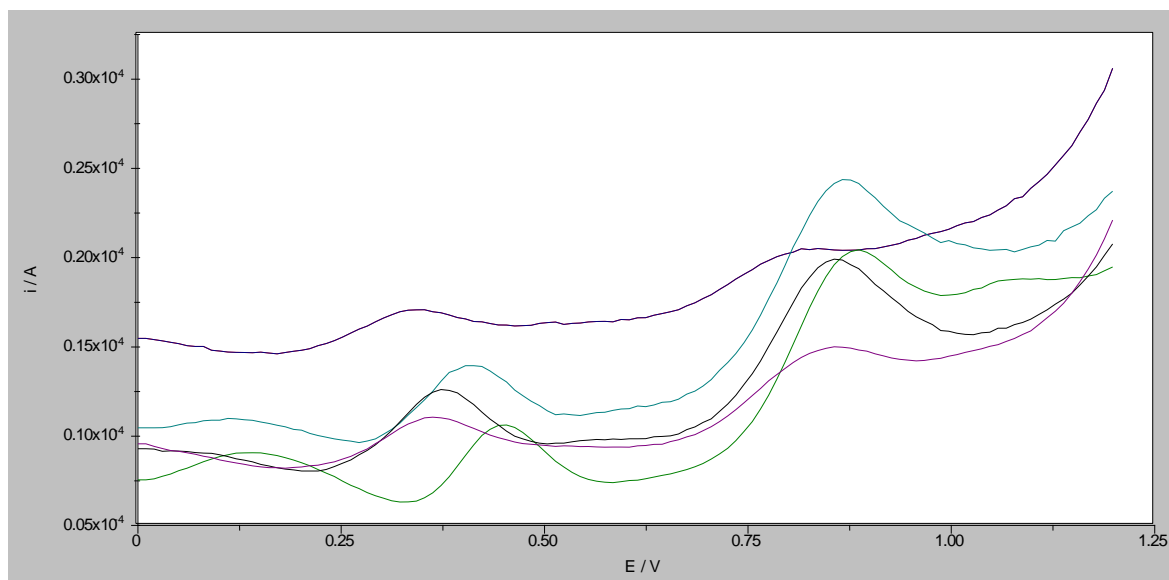


Slika 36. Pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline i mesalazina koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M (crveno) i osnovnog elektrolita (plavo) u BR puferu pH 6 na GCE modificiranoj MWCNT/NH<sub>2</sub> ( $c=2,0$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini frekvencije 60Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV,  $E_{\text{pot, me}} = 0,36\text{V}$ ,  $I_{\text{me}} = 1,28 \times 10^{-6}$  A,  $E_{\text{pot, fo}} = 0,86$  V,  $I_{\text{fo}} = 4,04 \times 10^{-6}$  A

Iako su voltametrijska mjerenja izvedena pri pH 6 dala dobro odijeljene potencijale oksidacije folne kiseline i mesalazina ispitano je kako se njihova smjesa ponaša pri različitim pH vrijednostima te postoji li možda bolji odabir. U tu su svrhu snimljeni ciklički i pravokutnovalni voltamogrami njihove smjese u rasponu pH 4-8 na GCE čija je površina modificirana MWCNT/NH<sub>2</sub> ( $c=1,0$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini, a koji su prikazani slikama 37 i 38.

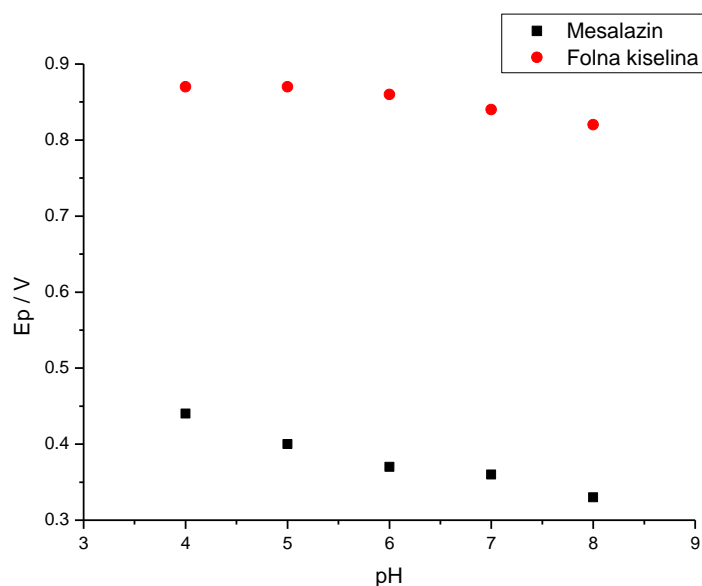


Slika 37. Ciklički voltamogrami otopine folne kiseline i mesalazina koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M u BR puferu pH 4 (zeleno), 5 (cijan), 6 (crno), 7 (magenta) i 8 (plavo) na GCE modificiranoj MWCNT/ $\text{NH}_2$  ( $c=1,0$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini pri brzini promjene potencijala 100 mV/s



Slika 38. Pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline i mesalazina koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M u BR puferu pH 4 (zeleno), 5 (cijan), 6 (crno), 7 (magenta) i 8 (plavo) na GCE modificiranoj MWCNT/ $\text{NH}_2$  ( $c=1,0$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV

Pri nižim pH vrijednostima, primjerice pH 4, dolazi do rastezanja pika folne kiseline jer su u tom pH području i  $pK_a$  vrijednosti njezinih karboksilnih skupina. Pri pH većem od 6 dolazi do izrazitog smanjivanja oksidacijskih pikova obaju analita te do loše definiranog pika folne kiseline. Stoga je potvrđeno da se pH 6 pokazao kao optimalna vrijednost. Zatim, može se zamijetiti da se porastom pH pikovi vrlo lagano pomiču prema nižem potencijalu, odnosno da se analiti malo lakše oksidiraju u lužnatijem mediju. Sve navedeno potvrđuje i grafički prikaz ovisnosti potencijala mesalazina i folne kiseline o promjeni pH na kojem se jasno vidi izrazito malen postupni pad potencijala porastom pH (slika 39).



Slika 39. Ovisnost vršnog potencijala mesalazina i folne kiseline koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M u BR puferu mjenjenog na GCE modificiranoj MWCNT/ $NH_2$  ( $c=1,0$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV ovisno o promjeni pH

Iz grafičkog prikaza dobiveni su i odgovarajući izrazi ovisnosti vršnog potencijala ( $E_p$ ) pojedine tvari o pH vrijednosti pa tako jednačba (4) za folnu kiselinu glasi:

$$E_p = -0,017 (V)pH + 0,958 \quad (4)$$

Prethodnim je znanstvenim istraživanjima otkriveno da nagib pravca iznosa 59 mV ili veći upućuje da su protoni bitni za kinetiku izmjene elektrona (*eng. proton coupled electron*



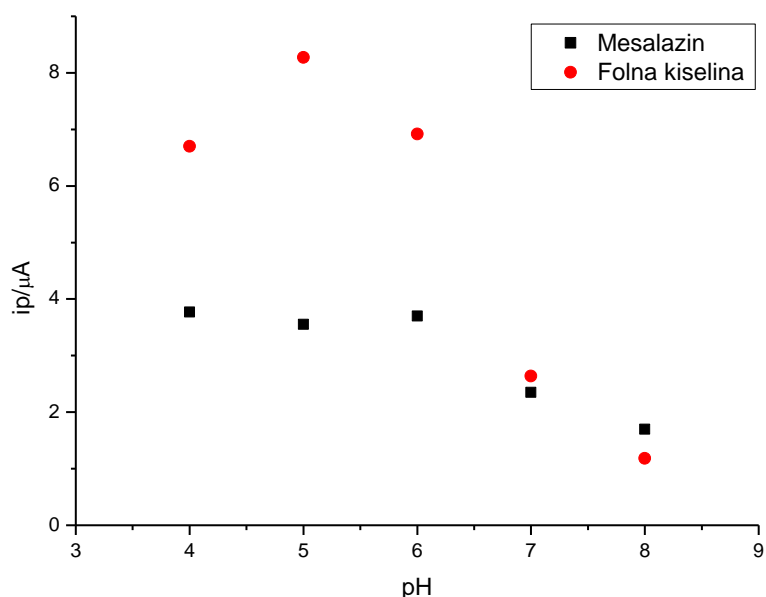
*transfer*, PCET) iz čega se zaključuje da prilikom oksidacije folne kiseline na modificiranoj elektrodi protoni oslobođeni u reakciji nisu ograničavajući korak u brzini izmjene elektrona.

Za mesalazin jednačina (5) glasi:

$$E_p = -0,026 (V)pH + 0,536 \quad (5)$$

Prema tom izrazu niti reakcija oksidacije mesalazina nije ovisna o protonima oslobođenima u reakciji, ali u usporedbi s oksidacijskom reakcijom folne kiseline, ovdje ipak imaju veći značaj u cjelokupnom procesu.

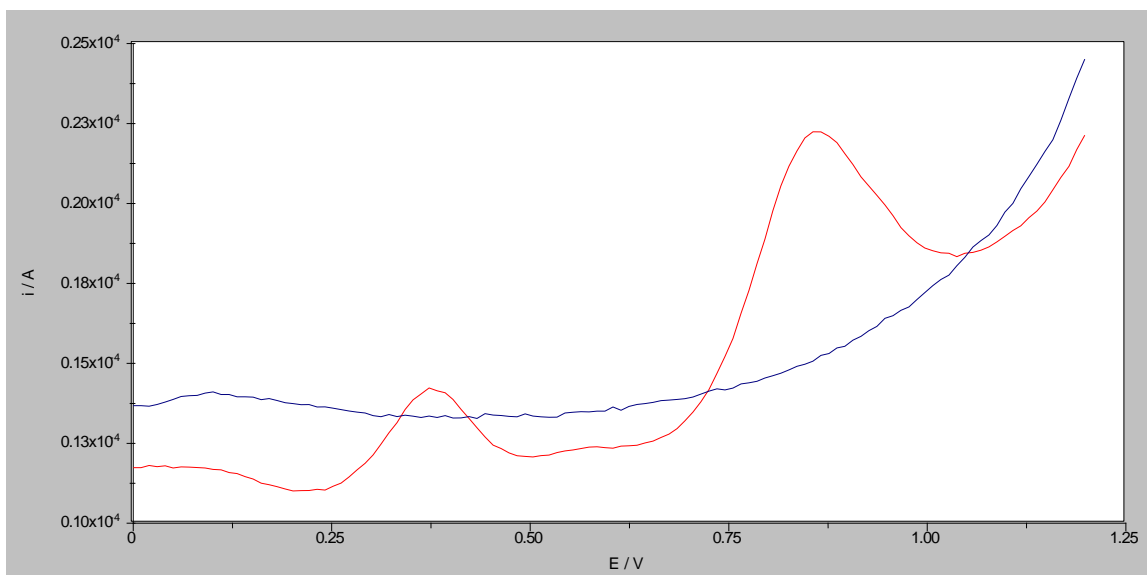
Sukladno promjeni potencijala i struja se mijenja. Prijenosom elektrona dostigne se maksimum struje, odnosno vršna jakost struje ( $i_p$ ), a zatim njezina vrijednost pada. Ovisnost jakosti struje ovisno o promjeni promjeni pH medija prikazana je slikom 40.



Slika 40. Ovisnost vršne jakosti struje ( $i_p$ ) mesalazina i folne kiseline koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M u BR puferu mjerene na GCE modificiranoj MWCNT/ $NH_2$  ( $c=1,0$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV ovisno o promjeni pH

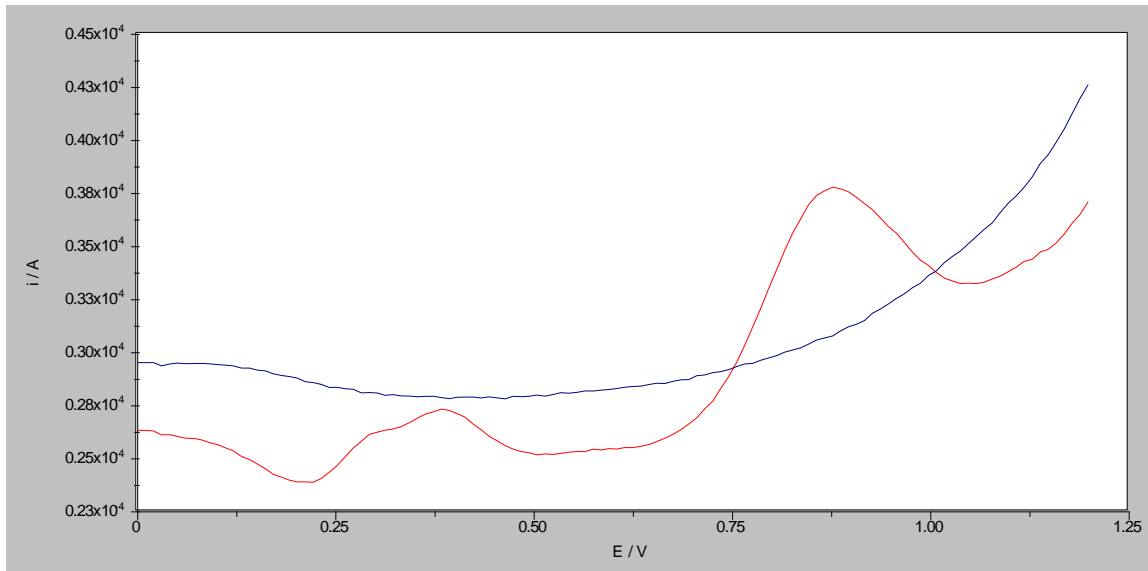
U svim prethodnim mjerenjima na površinu modificirane elektrode nanoseno je 5  $\mu$ l željene suspenzije nanomaterijala (Slika 41). Kako bi se proučio utjecaj promjene volumena

nanesenog sloja na voltametrijski odaziv elektrode, snimljeni su voltamogrami smjese folne kiseline i mesalazina pri istim uvjetima, samo je u prvom slučaju taj volumen bio 3  $\mu\text{l}$  (Slika 42), a u drugom 10  $\mu\text{l}$  (Slika 43).

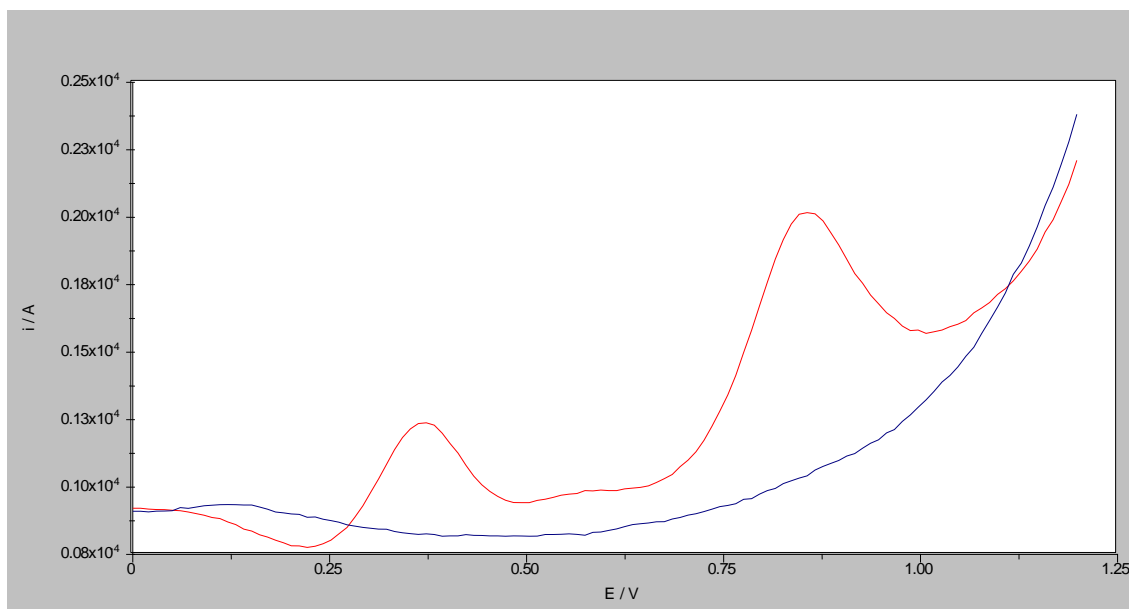


Slika 41. Pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline i mesalazina koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M (crveno) i osnovnog elektrolita (plavo) u BR puferu pH 6 na GCE modificiranoj MWCNT/ $\text{NH}_2$  ( $c=1,0$  mg/mL,  $V=5$   $\mu\text{l}$ ) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV,  $E_{\text{pot, me}}= 0,37\text{V}$ ,  $I_{\text{me}} = 2,64 \times 10^{-6}$  A,  $E_{\text{pot, fo}}= 0,86$  V,  $I_{\text{fo}}= 6,81 \times 10^{-6}$  A

Mjerenjem vršne jakosti struje pokazalo se da nanošenje sloja nanomaterijala volumena 3  $\mu\text{l}$  daje veće vrijednosti nego kada ga se nanese 5  $\mu\text{l}$ , ali dolazi do slabog cijepanja pika mesalazina što je analitički nepoželjno (Slika 42). Tada taj blagi prirast struje nije od velike važnosti. Isti se porast opaža uporabom 10  $\mu\text{l}$  suspenzije nanomaterijala (Slika 43), no u otopini uzorka taj se sloj vrlo brzo počeo odvajati od površine elektrode i taložiti u analiziranoj smjesi. Takva nestabilnost površine onemogućava reproducibilnost mjerenja te je nedostatna za osjetljivu analizu, stoga je i u ovoj situaciji malen porast struje zanemariv prema ovom nedostatku. Dakle, 5  $\mu\text{l}$  suspenzije nanomaterijala optimalan je volumen za modifikaciju GCE u simultanoj detekciji folne kiseline i mesalazina.



Slika 42. Pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline i mesalazina koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M (crveno) i osnovnog elektrolita (plavo) u BR puferu pH 6 na GCE modificiranoj MWCNT/NH<sub>2</sub> (c=1,0 mg/mL, V=3  $\mu$ l) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiseleni frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV,  $E_{\text{pot, me}} = 0,38\text{V}$ ,  $I_{\text{me}} = 2,78 \times 10^{-6}$  A,  $E_{\text{pot, fo}} = 0,87$  V,  $I_{\text{fo}} = 8,00 \times 10^{-6}$  A



Slika 43. Pravokutnovalni voltamogrami otopine folne kiseline i mesalazina koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M (crveno) i osnovnog elektrolita (plavo) u BR puferu pH 6 na GCE modificiranoj MWCNT/NH<sub>2</sub> (c=1,0 mg/mL, V=10  $\mu$ l) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiseleni frekvencije 100 Hz, amplitude pulsa 40 mV i promjene porasta potencijala 10 mV,  $E_{\text{pot, me}} = 0,36\text{V}$ ,  $I_{\text{me}} = 3,77 \times 10^{-6}$  A,  $E_{\text{pot, fo}} = 0,85$  V,  $I_{\text{fo}} = 7,17 \times 10^{-6}$  A

## **5.ZAKLJUČCI**

Ispitivanjem oksidacije folne kiseline koncentracije  $1 \times 10^{-4}$  M cikličkom i pravokutnovalnom voltametrijom na nemodificiranoj GCE ustanovilo se kako je pH 6 BR pufera, odnosno osnovnog elektrolita, najbolji izbor. Mjerenja su pokazala da se promjenom pH potencijal oksidacijskog pika folne kiseline neznatno mijenja, dok vrijednosti vršne jakosti struje formiraju krivulju paraboličnog izgleda čiji je vrh pri spomenutom pH.

Utjecaj modifikacije površine GCE različitim nanomaterijalima ( $c=1,0$  mg/mL) na oksidaciju folne kiseline ispitan je korištenjem MWCNT/NH<sub>2</sub>, MWCNT/grafit, MWCNT/OH i MWCNT/COOH u 0,3 %-tnoj otopini Nafiona u etanolu te u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini. Snimljeni voltamogrami pokazali su da je 0,5 %-tna otopina kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini puno bolje suspenzijsko sredstvo jer su dobiveni pikovi evidentno definirani i intenzivniji. Od navedenih nanomaterijala, najbolje performanse uočene su za MWCNT/NH<sub>2</sub> i MWCNT/grafit pa su pripremljeni u koncentracijama 0,5 mg/mL i 2,0 mg/mL u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini. Međutim, koncentracija 1,0 mg/mL odabrana je za daljnja ispitivanja zbog stabilnosti modificirane površine.

Analiza smjese folne kiseline i mesalazina koncentracije  $5 \times 10^{-5}$  M u BR puferu na nemodificiranoj GCE i modificiranoj svim navedenim nanomaterijalima korištenjem različitih SWV voltametrijskih parametara pokazala je da je MWCNT/NH<sub>2</sub> ( $c=1,0$  mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini idealan nanomaterijal za razvoj nove metode te da su parametri pravokutnovalne voltametrije korišteni u ispitivanju same folne kiseline optimalni i za njihovo simultano određivanje (frekvencija 100 Hz, amplituda pulsa 40 mV i porast potencijala 10 mV). Mjerenjem iste smjese u rasponu pH 4-8, pH vrijednost 6 pokazala se kao optimalna jer ne dolazi do rastezanja pikova te su zabilježene najveće vrijednosti vršnih jakosti struja oba analita. Iz jednadžbe ovisnosti vršnog potencijala ( $E_p$ ) o promjeni pH izvedeno je da protoni oslobođeni u reakciji oksidacije folne kiseline nisu ograničavajući korak u brzini izmjene elektrona, dok isto vrijedi za mesalazin, no ipak s većim utjecajem na cijeli proces. Također je utvrđeno da porastom brzine promjene potencijala oksidacijski pik folne kiseline raste, a pik mesalazina se smanjuje. Ta činjenica, kao i voltamogrami njihove smjese na kojima nema povratnog pika folne kiseline, ali postoji povratni pik mesalazina, dokazuje da je oksidacija folne kiseline ireverzibilna reakcija, a mesalazina reverzibilna. Upravo zato se njegov pik smanjuje povećanjem brzine promjene potencijala jer nema povratne reakcije redukcije u tim uvjetima.

Ispitan je utjecaj volumena suspenzije nanomaterijala MWCNT/NH<sub>2</sub> (c=1,0 mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini nanesenih na površinu GCE. Sloj nanomaterijala volumena 3  $\mu$ l rezultirao je cijepanjem voltametrijskog pika mesalazina, dok sloj na površini GCE volumena 10  $\mu$ l tijekom mjerenja nije pokazao zadovoljavajuću stabilnost. Uzevši te dvije pojave u obzir, volumen nanomaterijala 5  $\mu$ l istaknuo se kao najbolji odabir.

## **6. LITERATURA**

1. Ananthi A, Kumar SS, Phani KL. Facile one-step direct electrodeposition of bismuth nanowires on glassy carbon electrode for selective determination of folic acid, *Electrochimica Acta*, 2015, 151, 584-590.
2. Arvand M, Dehsaraei M. A simple and efficient electrochemical sensor for folic acid determination in human blood plasma based on gold nanoparticles-modified carbon paste electrode, *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, 2013, 33 (6), 3474-3480.
3. Azab HA, Banci L, Borsari M, Luchinat C, Sola M, Viezzoli MS. Redox chemistry of superoxide dismutase. Cyclic voltammetry of wild-type enzymes and mutants on functionally relevant residues, *Inorg. Chem.*, 1992, 31 (22), 4649-4655.
4. Brownson DAC, Banks CE. Interpreting Electrochemistry. U: The Handbook of Graphene Electrochemistry, London, Springer-Verlag, 2014, str. 23-77.
5. Brusciotti F, DUBY PF. Cyclic voltammetry study of arsenic in acidic solutions, *Electrochimica Acta*, 2007, 52 (24), 6644-6649.
6. Cakir S, Atayman I, Cakir O. Simultaneous square-wave voltammetric determination of riboflavin and folic acid in pharmaceutical preparations, *Mikrochimica Acta*, 1997, 126, 237-240.
7. Cataldi P, Athanassiou A, Bayer IS. Graphene Nanoplatelets-Based Advanced Materials and Recent Progress in Sustainable Applications, *Appl. Sci.*, 2018, 8, 1438.
8. Cyclic Voltammetry, URL: <https://www.ceb.cam.ac.uk/research/groups/rg-eme/teaching-notes/linear-sweep-and-cyclic-voltammetry-the-principles>, pristupljeno 3. veljače 2019.
9. Cyclic Voltammetry, URL: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Book%3A\\_Analytical\\_Chemistry\\_2.0\\_\(Harvey\)/11\\_Electrochemical\\_Methods/11.4%3A\\_Voltammetric\\_Methods](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/11_Electrochemical_Methods/11.4%3A_Voltammetric_Methods), pristupljeno 3. veljače 2019.
10. Cyclic Voltammetry, URL: [https://chem.libretexts.org/Courses/University\\_of\\_California\\_Davis/UCD\\_Chem\\_115\\_Lab\\_Manual/Lab\\_1%3A\\_Cyclic\\_Voltammetry](https://chem.libretexts.org/Courses/University_of_California_Davis/UCD_Chem_115_Lab_Manual/Lab_1%3A_Cyclic_Voltammetry), pristupljeno 2. veljače 2019.
11. Dias LG, Meirinho SG, Veloso ACA, Rodrigues LR, Peres AM. Electronic tongues and aptasensors. U: *Bioinspired Materials for Medical Applications*. Rodrigues L, Mota M, urednici, Sawston, Woodhead Publishing, 2017, str. 371-402.
12. El Mhammedi MA, Achak M, Bakasse M. Square Wave Voltammetry for Analytical Determination of Cadmium in Natural Water Using Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>-Modified Platinum Electrode, *American Journal of Analytical Chemistry*, 2010, 1 (3), 150-158.
13. Elgrishi N, Rountree KJ, McCarthy BD, Rountree ES, Eisenhart TT, Dempsey JL. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry, *J. Chem. Educ.*, 2018, 95, 197-206.



14. Folicin, URL:  
<https://mediately.co/hr/drugs/Ne4Wa6082Zm4e8QEXzCzio4ZRNR/> folicin-5-mg-tablete#packagings, pristupljeno 2. veljače 2019.
15. Folic Acid, URL: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00158>, pristupljeno 2. veljače 2019.
16. Folic Acid,  
 URL:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135398658#section=Top>, pristupljeno 2. veljače 2019.
17. Gabrielli C, Grand PP, Lasia A, Perrot H. Investigation of Hydrogen Adsorption and Absorption in Palladium Thin Films II. Cyclic Voltammetry, *Journal of The Electrochemical Society*, 2004, 151 (11), 1937-1942.
18. Gil ES, Andrade CH, Barbosa NL, Braga RC, Serrano SHP. Cyclic voltammetry and computational chemistry studies on the evaluation of the redox behavior of parabens and other analogues, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2012, 23(3), 565-572.
19. Graphene, URL: <https://www.graphene-info.com/graphene-introduction>, pristupljeno 6. veljače 2019.
20. Graphene, URL: <https://graphene.nus.edu.sg/what-exactly-is-graphene/>, pristupljeno 6. veljače 2019.
21. Graphene, URL: [https://www.nanowerk.com/what\\_is\\_graphene.php](https://www.nanowerk.com/what_is_graphene.php), pristupljeno 6. veljače 2019.
22. Han J, Chen HY, Gao H. Alternating –current adsorptive stripping voltammetry in a flow system for the determination of ultratrace amounts of folic-acid, *Analytica Chimica Acta*, 1991, 252 (1-2), 47-52.
23. Hauser PC. Electroanalytical methods. U: Instrumental Multi-Element Chemical Analysis. Alfassi ZB, urednik, Dordrecht, Springer, 1998, str. 201-202.
24. Im HJ, Jun GH, Lee DJ, Ryu HJ, Hong SH. Enhanced electromagnetic interference shielding behavior of Graphene Nanoplatelet/Ni/Wax nanocomposites, *J. Mater. Chem. C*, 2017, 5, 6471-6479.
25. Khaleghi F, Irai AE, Sadeghi R, Gupta VK, Wen Y. A Fast Strategy for Determination of Vitamin B<sub>9</sub> in Food and Pharmaceutical Samples Using an Ionic Liquid-Modified Nanostructure Voltammetric Sensor, *Sensors*, 2016, 16, 747
26. Korolczuk M, Tyszczyk K. Determination of folic acid by adsorptive stripping voltammetry at a lead film electrode, *Electroanalysis*, 2007, 19 (18), 1959-1962.
27. Kukovecz Á, Kozma G, Kónya Z. Multi-Walled Carbon Nanotubes. U: Springer Handbook of Nanomaterials. Vajtai R, urednik, Berlin, Springer, 2013, str. 147-188.
28. Legall AC, Van der Berg CMG. Determination of folic-acid in sea-water using adsorptive cathodic stripping voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 1993, 282 (3), 459-470.
29. Lovander MD, Lyon MD, Parr IV DL, Wang J, Parke B, Leddy J. Review – Electrochemical Properties of 13 Vitamins : A Critical Review and Assessment, *Journal of The Electrochemical Society*, 2018, 165 (2), 18-49.
30. Malagutti AR, Zuin VG, Cavalheiro ETG, Mazo LH. Determination of Rutin in Green Tea Infusions Using Square-Wave Voltammetry with a Rigid

- Carbon-Polyurethane Composite Electrode, *Electroanalysis*, 2006, 18 (10), 1028-1034.
31. Massaroppi MRC, Machado SAS, Avaca LA. Electroanalytical determination of the herbicide picloram in natural waters by square wave voltammetry, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2003, 14 (1), 113-119.
  32. Mesalazin, URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4075>, pristupljeno 16. veljače 2019.
  33. Merkoçi A, Ambrosi A, de la Escosura-Muñiz A, Pérez-López B, Guix M, Maltez M, Marin S. Nanomaterials for Electroanalysis. U: *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*. Meyers RA, urednik, New York, Wiley, 2010, <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9077>.
  34. Microsoft Word – Square Wave Voltammetry, docx, URL: [https://www.ameteksi.com/-/media/ameteksi/download\\_links/documentations/library/princetonappliedresearch/application\\_note\\_s-7.pdf?la=en](https://www.ameteksi.com/-/media/ameteksi/download_links/documentations/library/princetonappliedresearch/application_note_s-7.pdf?la=en), pristupljeno 4. veljače 2019.
  35. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT), URL: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3469>, pristupljeno 7. veljače 2019.
  36. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT), URL: <https://www.ossila.com/products/multi-walled-carbon-nanotubes>, pristupljeno 7. veljače 2019.
  37. Nanomaterials, URL: <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/sy-nano/index.cfm>, pristupljeno 6. veljače 2019.
  38. Nigović B, Behetić S. Elektroanalitika u farmaciji, *Farm. Glas.*, 2007, 63, 163-175.
  39. Oshea TJ, Garcia AC, Blanco PT, Smyth MR. Electrochemical pretreatment of carbon-fiber microelectrodes for the determination of folic-acid, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1991, 307 (1-2), 63-71.
  40. Scholz F. Voltammetric techniques of analysis: the essentials, *ChemTexts*, 2015, (<https://link.springer.com/article/10.1007/s40828-015-0016-y#aboutcontent>) – online journal
  41. Swain GM. Solid Electrode Materials: Pretreatment and Activation. U: *Handbook of Electrochemistry*. Zoski CG, urednik, Amsterdam, Elsevier, 2007, str. 111-153.
  42. Szeluga U, Pusz S, Kumanek B, Olszowska K, Czajkowska S, Myalski J, Kubacki J, Trzebicka B, Borowski AF. Influence of unique structure of glassy carbon on morphology and properties of its epoxy-based binary composites and hybrid composites with carbon nanotubes, *Composites Science and Technology*, 2016, 134, 72-80.
  43. Uslu B, Ozkan SA. Solid Electrodes in Electroanalytical Chemistry: Present Applications and Prospects for High Throughput Screening of Drug Compound, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2007, 10, 495-513.
  44. Villamil MJF, Ordieres AJM, Garcia AC, Blanco PT. Simultaneous adsorptive stripping voltammetric determination of riboflavin and folic-acid in multivitamin preparations, *Analytica Chimica Acta*, 1993, 273 (1-2), 377-382.

45. Vladislavić N, Buzuk M, Buljac M, Bralić M, Brinić S. Sensitive Electrochemical Determination of Folic Acid Using ex-situ Prepared Bismuth Film Electrodes, *Croatica Chemica Acta*, 2017, 90 (2), 231-239.
46. Vranešić Bender D. Osobitosti prehrane i suplementacije oboljelih od upalnih bolesti crijeva, *Medix*, 2005, 11 (58), 130-133.
47. Wang X, You Z, Cheng Y, Sha H, Li G, Zhu H., Sun W. Application of nanosized gold and graphene modified carbon ionic liquid electrode for the sensitive electrochemical determination of folic acid, *Journal of Molecular Liquids*, 2015, 204, 112-117.
48. Yardim Y, Şentürk Z. Electrochemical Behaviour of Folic Acid at A Boron-Doped Diamond Electrode: Its Adsorptive Stripping Voltammetric Determination in Tablets, *Turk J Pharm Sci*, 2014, 11 (1), 87-100.
49. Zhang Y, Wei Q. The role of nanomaterials in electroanalytical biosensors: A mini review, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2016, 781, 401-409.

## **7. SAŽETAK/SUMMARY**

## 7.1. SAŽETAK

Folna kiselina, koja pripada skupini B vitamina, neophodna je za razvoj hematopoetskog sustava, rast i diobu stanica te brojne druge, izuzetno važne, biološke procese. Peroralno se primjenjuje u liječenju megaloblastične anemije, hepatobilijarnih bolesti i prevenciji defekta neuralne cijevi kod novorođenčadi. Kao suplement često je koriste oboljeli od Chronove bolesti jer je u njih zamijećen deficit folata.

Ovim radom ispitivane su elektrokemijske karakteristike folne kiseline uporabom cikličke i pravokutnovalne voltometrije (SWV) u Britton-Robinson (BR) puferu različitih pH vrijednosti na nemodificiranoj GCE i GCE modificiranoj raznovrsnim nanomaterijalima. Cilj je bio istražiti njezino oksidacijsko ponašanje u svrhu razvoja nove elektroanalitičke metode za istovremeno određivanje folne kiseline i mesalazina, jednog od najkorištenijih lijekova u liječenju Chronove bolesti.

BR pufer pH vrijednosti 6 iskazao se najprikladnijim zbog najveće vršne jakosti struje i izrazito pravilne definiranosti oksidacijskog pika koji se javlja pri potencijalu 0,85 V. Nadalje, modificiranjem površine GCE ustanovljeno je da nanosene suspenzije nanomaterijala u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini doprinose intenzivnijem odazivu analita. Najbolje performanse pokazale su višeslojne ugljikove nanocjevčice modificirane amino skupinama (MWCNT/NH<sub>2</sub>) i grafitom (MWCNT/grafit).

Analizom smjese folne kiseline i mesalazina u BR puferu pH nastao je dodatan pik na oko 0,35 V oksidacijom mesalazina. MWCNT/NH<sub>2</sub> (c=1,0 mg/mL) pokazao se kao optimalan nanomaterijal za modifikaciju GCE upotrijebljene za njihovu istovremenu detekciju. Pravokutnovalni voltamogrami otopine njihovih uzoraka dokazuju da je oksidacija mesalazina reverzibilna reakcija pri čemu se vidi povratni pik, dok se oksidacija folne kiseline odvija ireverzibilno. Utvrđeno je da su optimalni SWV parametri za simultano određivanje ovih dvaju analita frekvencija 100 Hz, amplituda pulsa 40 mV i porast potencijala 10 mV. Korelacijom vršnog potencijala i promjene pH došlo se do ovisnosti koje potvrđuju da protoni oslobođeni tijekom oksidacijskih reakcija obiju tvari ne utječu na kinetiku izmjene elektrona. Nadalje, nanošenjem sloja nanomaterijala volumena 3 μl cijepao se pik mesalazina, a nestabilnost u otopini uzorka pokazao je sloj volumena 10 μl. Volumen nanomaterijala 5 μl određen je kao najprimjereniji jer daje dobro definirane voltametrijske odgovore i postojan je tijekom određenog broja mjerenja.

## 7.1. SUMMARY

Folic acid is one of the B vitamins group that has an integral part in development of hematopoietic system, cell growth and proliferation, but also other very important biological processes. It is used per oral for treating megaloblastic anemia, hepatobiliary disorders and in preventing neural tube defects in infants. As a supplement it is often used by patients with Chron's disease since they have folate deficiency.

This work examined electrochemical characteristics of folic acid in BR-buffer of different pH values on unmodified GCE and GCE modified with various nanomaterials using cyclic and square-wave voltammetry (SWV). The purpose was to investigate its oxidation in order to develop a new electroanalytical method for simultaneous determination of folic acid and mesalazine, one of the most used medication for Chron's disease.

BR-buffer of pH value 6 showed to be the most suitable because of the greatest peak current and distinctly defined oxidation peak that appeared at 0,85 V. Furthermore, by modifying GCE surface it was found that suspensions of nanomaterials in 0,5 % chitosan solution in 1 % acetic acid contribute to more intensive analyte's response. The best performances gave multi-walled carbon nanotubes modified by amino group (MWCNT/NH<sub>2</sub>) as well as graphitized multi-walled carbon nanotubes (MWCNT/graphite) (c=0,5; 1,0 and 2,0 mg/mL).

Analysis of folic acid and mesalazine in BR-buffer pH 6 resulted in an additional peak at approximately 0,35 V following mesalazine oxidation. MWCNT/NH<sub>2</sub> (c=1,0 mg/mL) approved as optimal nanomaterial for modification of GCE used for their parallel detection. Square-wave voltammograms of samples solution prove that oxidation of mesalazine is a reversible reaction during which a backward peak can be seen, while oxidation of folic acid goes irreversibly. It was noticed that optimal SWV parameters used for simultaneous determination of both analytes are frequency 100 Hz, puls amplitude 40 mV and potential step 10 mV. Correlation between peak potential and pH variation resulted in dependences that confirm that protons released during oxidation of both substances do not affect electron transfer kinetics. Moreover, applying nanomaterial layer of volume 3 µl resulted in mesalazine peak splitting, while volume of 10 µl indicated unstableness. Nanomaterial volume of 5 µl was set as the most convenient as it gives well defined voltammetric responses and proved to be stable during certain number of measurements.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### ELEKTROANALITIČKA SVOJSTVA FOLNE KISELINE NA ELEKTRODI IZMIJENJENOJ RAZLIČITIM NANOMATERIJALIMA

**Karla Stanko**

#### SAŽETAK

Folna kiselina, koja pripada skupini B vitamina, neophodna je za razvoj hematopoetskog sustava, rast i diobu stanica te brojne druge, izuzetno važne, biološke procese. Peroralno se primjenjuje u liječenju megaloblastične anemije, hepatobilijarnih bolesti i prevenciji defekta neuralne cijevi kod novorođenčadi. Kao suplement često je koriste oboljeli od Chronove bolesti jer je u njih zamijećen deficit folata. Ovim radom ispitivane su elektrokemijske karakteristike folne kiseline uporabom cikličke i pravokutnovalne voltametrije (SWV) u Britton-Robinson (BR) puferu različitih pH vrijednosti na nedomificiranoj GCE i GCE modificiranoj raznovrsnim nanomaterijalima. Cilj je bio istražiti njezino oksidacijsko ponašanje u svrhu razvoja nove elektroanalitičke metode za istovremeno određivanje folne kiseline i mesalazina, jednog od najkorištenijih lijekova u liječenju Chronove bolesti. BR pufer pH vrijednosti 6 iskazao se najprikladnijim zbog najveće vršne jakosti struje i izrazito pravilne definiranoosti oksidacijskog pika koji se javlja pri potencijalu 0,85 V. Nadalje, modificiranjem površine GCE ustanovljeno je da nanese suspenzije nanomaterijala u 0,5 %-tnoj otopini kitozana u 1 %-tnoj octenoj kiselini doprinose intenzivnijem odazivu analita. Najbolje performanse pokazale su višeslojne ugljikove nanocjevčice modificirane amino skupinama (MWCNT/NH<sub>2</sub>) i grafitom (MWCNT/grafit). Analizom smjese folne kiseline i mesalazina u BR puferu pH nastao je dodatan pik na oko 0,35 V oksidacijom mesalazina. MWCNT/NH<sub>2</sub> (c=1,0 mg/mL) pokazao se kao optimalan nanomaterijal za modifikaciju GCE upotrijebljene za njihovu istovremenu detekciju. Pravokutnovalni voltamogrami otopine njihovih uzoraka dokazuju da je oksidacija mesalazina reverzibilna reakcija pri čemu se vidi povratni pik, dok se oksidacija folne kiseline odvija ireverzibilno. Utvrđeno je da su optimalni SWV parametri za simultano određivanje ovih dvaju analita frekvencija 100 Hz, amplituda pulsa 40 mV i porast potencijala 10 mV. Korelacijom vršnog potencijala i promjene pH došlo se do ovisnosti koje potvrđuju da protoni oslobođeni tijekom oksidacijskih reakcija obiju tvari ne utječu na kinetiku izmjene elektrona. Nadalje, nanošenjem sloja nanomaterijala volumena 3 µl cijepao se pik mesalazina, a nestabilnost u otopini uzora pokazao je sloj volumena 10 µl. Volumen nanomaterijala 5 µl određen je kao najprimjereniji jer daje dobro definirane voltametrijske odgovore i postojan je tijekom određenog broja mjerenja.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 58 stranica, 43 grafička prikaza, 2 tablice i 49 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: folna kiselina, mesalazin, ciklička voltametrija, pravokutnovalna voltametrija, elektroda modificirana nanomaterijalima

Mentor: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ana Mornar Turk**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: ožujak 2019.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Analysis  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### ELECTROANALYTICAL CHARACTERISTICS OF FOLIC ACID ON ELECTRODE MODIFIED WITH VARIOUS NANOMATERIALS

**Karla Stanko**

#### SUMMARY

Folic acid is one of the B vitamins group that has an integral part in development of hematopoietic system, cell growth and proliferation, but also other very important biological processes. It is used per oral for treating megaloblastic anemia, hepatobiliary disorders and in preventing neural tube defects in infants. As a supplement it is often used by patients with Chron's disease since they have folate deficiency. This work examined electrochemical characteristics of folic acid in BR-buffer of different pH values on unmodified GCE and GCE modified with various nanomaterials using cyclic and square-wave voltammetry (SWV). The purpose was to investigate its oxidation in order to develop a new electroanalytical method for simultaneous determination of folic acid and mesalazine, one of the most used medication for Chron's disease. BR-buffer of pH value 6 showed to be the most suitable because of the greatest peak current and distinctly defined oxidation peak that appeared at 0,85 V. Furthermore, by modifying GCE surface it was found that suspensions of nanomaterials in 0,5 % chitosan solution in 1 % acetic acid contribute to more intensive analyte's response. The best performances gave multi-walled carbon nanotubes modified by amino group (MWCNT/NH<sub>2</sub>) as well as graphitized multi-walled carbon nanotubes (MWCNT/graphite) (c=0,5; 1,0 and 2,0 mg/mL). Analysis of folic acid and mesalazine in BR-buffer pH 6 resulted in an additional peak at approximately 0,35 V following mesalazine oxidation. MWCNT/NH<sub>2</sub> (c=1,0 mg/mL) approved as optimal nanomaterial for modification of GCE used for their parallel detection. Square-wave voltammograms of samples solution prove that oxidation of mesalazine is a reversible reaction during which a backward peak can be seen, while oxidation of folic acid goes irreversibly. It was noticed that optimal SWV parameters used for simultaneous determination of both analytes are frequency 100 Hz, puls amplitude 40 mV and potential step 10 mV. Correlation between peak potential and pH variation resulted in dependances that confirm that protons released during oxidation of both substances do not affect electron transfer kinetics. Moreover, applying nanomaterial layer of volume 3 µl resulted in mesalazine peak splitting, while volume of 10 µl indicated unstableness. Nanomaterial volume of 5 µl was set as the most convenient as it gives well defined voltammetric responses and proved to be stable during certain number of measurements.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 58 pages, 43 figures, 2 tables and 49 references. Original is in Croatian language.

**Keywords:** folic acid, mesalazine, cyclic voltammetry, square-wave voltammetry, nanomaterial-modified electrode

**Mentor:** **Biljana Nigović, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Reviewers:** **Biljana Nigović, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana Mornar Turk, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. Associate Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2019.



