



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“
ХИМИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ФИЗИКОХИМИЯ

Мария Генова Пимпилова

**МОДИФИЦИРАНЕ НА СЪКЛОВЪГЛЕРОДНИ ЕЛЕКТРОДИ С
ЕЛЕКТРООТЛОЖЕНО ЗЛАТО ИЛИ 2D-НАНОМАТЕРИАЛИ:
ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ И ПРИЛОЖЕНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен „доктор“

Област на висше образование:

4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: *4.2 Химически науки*

Докторска програма: *Физикохимия*

Научен ръководител:

доц. д-р Нина Димчева

**Пловдив
2023 г.**

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на катедрен съвет на катедра „Физикохимия“ на Химическия факултет при Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ проведено на 22.12.2023 г Протокол №17.

Дисертационният труд съдържа 134 страници (формат А4), в които са включени 44 фигури, 6 таблици и 12 схеми. Цитирани са 238 източника.

Материалите по защитата са на разположение на интересувалите се в отдел „Развитие на академичния състав и докторантури“ към ПУ „Паисий Хилендарски“, Националния център за информация и документация към Министерството на образованието и науката и в Централната библиотека на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на г. от часа в....., на заседание на Научното жури.

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Една от основните цели на световните научни усилия е да се подобри качеството на живот. Постигането на тази цел е пряко свързано с наличието на методи за бърза диагностика на често срещани заболявания, контрол на качеството на храните и мониторинг на околната среда. Редица научни изследвания са насочени към разработването на аналитични методи, които отговарят на тези изисквания. Въз основа на техния принцип на работа се делят на оптични (абсорбция, люминесценция, хемилуминесценция и повърхностен плазмонен резонанс), масови (пиезоелектрични и магнитоелектрични) и електрохимични.

През последните няколко десетилетия електроаналитичните методи привлякоха вниманието на много изследователи, поради тяхната експериментална простота, относително ниска цена и ниски граници на откриване. Други важни предпоставки за тяхната висока популярност са лесната им цифровизация и компактните размери на апаратурата, като последното позволява *in situ* мониторинг. Поради изброените причини, те намират широко приложение в области като клиничния, индустриалния, екологичния и селскостопанския анализ.

Електродните материали играят основна роля при разработването на високочувствителни електроаналитични методи за определяне на целевите аналити. Модифицирането на електродни повърхности се извършва с една основна цел – повишаване на чувствителността на определянето, което на свой ред се постига или посредством увеличаване на електрохимично-активната повърхност, или чрез нанасяне на катализатори върху нея.

Настоящият дисертационен труд разглежда получаването на модифицирани електродни повърхности, тяхното охарактеризиране с помощта на разнообразни електрохимични методи и демонстрира успешното им прилагането при:

- количествен анализ на бързо-деградиращи активни компоненти на лекарства;
- вредни за човешкия организъм компоненти на растителни масла.

II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е посредством подходящо модифициране на електроди от каталитично-неактивен електропроводим материал да бъдат създадени два типа чувствителни и селективни електрохимични сензори за количествен анализ на две различни групи биологично-значими съединения – от една страна на катехоламините допамин и L-епинефрин, които са бързо-деградиращи компоненти на лекарствени форми, а от друга - на водороден пероксид и негови органични аналози, като последните са практически неразтворими във водни разтвори.

В изпълнение на поставената цел, са конкретизирани следните изследователски задачи:

1. Да бъде получен модифициран стъкловъглероден електрод чрез електрохимично отлагане на златни наноструктури, който да послужи като базов преобразовател на сигнала при разработването на ензимен електрод за количествен анализ на катехоламините допамин и адреналин, при което:
 - Златните отложения да бъдат получени по две алтернативни процедури с оглед избора на модифициран електрод с по-голяма електрохимично достъпна повърхност, като бъде характеризирана и повърхностната му морфология;

- Чрез ковалентна имобилизация на ензим лакказа върху модифицирания със златни наночастици стъкловъглероден електрод да бъде получен ензимен електрод и да бъде характеризирани по отношение на операционните параметри на биосензора при количествено определяне на катехоламините допамин и L-епинефрин.
2. Да бъде получен електрод-катализатор на базата на стъкловъглероден електрод, модифициран с 2D-наноматериал графитен въглероден нитрид – чист или дотиран с метални оксиди, като бъде изследвана електрокаталитичната активност на модифицирания електрод в процеса на електрохимична редукция на водоразтворимите пероксидни съединения водороден пероксид и третичен бутилхидропероксид, при което:
 - Да бъде избран и оптимизиран най-подходящия състав на модифициращата фаза за създаване на електрокатализатор;
 - Да бъде изследвано влиянието на свързващия полимер и киселинността на средата върху каталитичната активност на разработения електрод при електрохимичната редукция на хидропероксидите;
 - Да бъде проучена възможността на пероксидния електрод за определяне на ензимна активност на каталаза в неутрална водна среда.
 3. Да бъде изследвана каталитичната активност на разработения на базата на стъкловъглероден електрод, модифициран с 2D-наноматериал графитен въглероден нитрид, дотиран с Co_3O_4 електрод-катализатор в среда от полярен органичен разтворител по отношение на водонеразтворими органични пероксиди и да бъде проучена възможността за определяне на пероксидното съдържание в смес от растителни масла.

III. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

III.1. Получаване на модифицирани електродни материали

III.1.1. Електрохимично отлагане на злато върху стъкловъглерод

Модифицирането на стъкловъглеродните електроди със злато беше извършено чрез директна електроредукция на тетрахлоороауратни йони от електролити съдържащи: 50 mM HAuCl_4 разтворен в 0.1 M солна киселина или 3.5 mM HAuCl_4 разтворен в 0.1 M HCl . Отлагането на Au беше извършено в потенциодинамичен режим по два алтернативни начина: процедура 1 (EDP1) със стартов потенциал от 0 V до -0.6 V и обратно; и процедура 2 (EDP2) от стартов потенциал -0.6 V до 0 V и обратно.

III.1.1.2. Получаване на модифицирани стъкловъглеродни електроди с графитен въглероден нитрид g- C_3N_4 – чист и дотиран с оксиди на преходни метали

Получаването на модификатора беше извършено както следва: необходимото количество от катализатора ($\text{Co-Mg-g-C}_3\text{N}_4$, $\text{Co-Bi-g-C}_3\text{N}_4$, $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4$, Co_3O_4 или $\text{g-C}_3\text{N}_4$) беше претеглено в подходящ контейнер и към него беше добавен необходимия обем от суспензията на полимера (Nafion 117) с избраната концентрация. След получаване на дисперсията, модифициращата фаза беше нанесена върху почистените стъкловъглеродни повърхности чрез накапване на порция от 5 μl и се суши на стайна температура в продължение на 16 часа.

За сравнение, алтернативна методика на модифициране на стъкловъглеродните електроди беше извършена както следва: оцененият като най-активен катализатор $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4$ беше диспергиран във водна среда, съдържаща 5% етиленгликол чрез ултразвуково

третиране в продължение на 30 min (двукратно). Отлагането е извършено по гореописания начин и след сушене на стайна температура в продължение на 24 часа, върху модифицираната електродна повърхност беше нанесено полимерно покритие от Nafion с концентрация 0.2% или 5 mM воден разтвор на глутаров алдехид чрез накапване и последващо сушене на въздух за 24 часа.

III.1.1.3. Иммобилизация на ензим лакказа върху модифицирани със злато (Au) стъкловъглеродни електроди

Непосредствено преди ензимната иммобилизация върху електродната повърхност, получените модифицирани електроди се почистват в разтвор на H₂SO₄ (0.5 M) с метода циклична волтамперометрия в интервала от потенциали от -0.2 до 1.5 V (vs. Ag|AgCl, sat. KCl) със скорост на сканиране 0.1 V.s⁻¹ в течение на поне 20 цикъла или до получаване на две последователни припокриващи се волтамперограми.

Функционализирането на повърхността на златните отложения се осъществява чрез хемисорбция, която е извършена чрез потапяне на модифицираните електроди в разтвор на цистамин или цистеин (5.10⁻⁴g в 2 ml H₂O) за 2 часа при стайна температура. Иммобилизацията на ензима лакказа е извършена чрез омрежване на ензима върху самоподдържащ се монослой (SAM) върху електродите със златни отложения.¹ Ензимната иммобилизация се извърши съгласно следната процедура: 3 µl от разтвора на ензима с концентрация 20 mg.ml⁻¹ се нанасят върху функционализираната електродна повърхност, добавя се порция от 1µl 5 mM разтвор на глутаров алдехид. Така получената смес се оставя да прореагира за 30 минути на стайна температура и се нанася втори слой, следвайки описаната процедура. Така приготвените ензимни електроди се съхраняват в 0.05 M натриев цитратен буфер, pH 4.0, в хладилник при 4°C до следващите измервания.

III.1.1.4. Иммобилизация на ензим каталаза върху стъклени подложки

За целта се използват стъклени подложки за микроскопски препарати, които преди ензимната иммобилизация се почистват чрез промиване с етанол, след това с ултрачиста вода и се подлагат на ултразвукова обработка за 3 минути, след което се изсушават на въздух. Върху подготвените подложки се нанася чрез накапване пряко приготвен разтвор на каталаза с концентрация 5 mg.ml⁻¹ във фосфатен буфер с pH 7.0 и престояват в хладилник при 4°C в продължение на 2 часа до трикратно намаляване на обема на течността. След това върху третираната с каталаза подложка се добавя 0.5 mM глутаров алдехид, като се спазва съотношение с ензимния разтвор 2:1 (на всеки 10 µl ензимен разтвор се добавя порция от 5 µl омрежващ агент)². Получената реакционна смес се оставя да прореагира в хладилник при 4°C в продължение на 24 часа.

III.1.2. Охарактеризиране на модифицираните стъкловъглеродни електроди

Всички електрохимични изследвания, както в потенциодинамичен, така и в потенциостатичен режим бяха проведени в три-електродна електрохимична клетка състояща се от: 1) работен (немодифициран или модифициран стъкловъглерод); 2) сравнителен - (Ag|AgCl, sat. KCl или Ag|Ag+); и 3) спомагателен електрод (Pt пластина) и съдържаща 20 ml или 10 ml фонов електролит (0.1 M фосфатен буфер, pH = 7.0, или 0.05 M цитратен буфер съдържащ 0.1 M NaClO₄, pH = 4.0, или аprotонен органичен

¹ N. Dimcheva and E. Horozova, "Improved operational stability of a laccase-based electrode applicable in biofuel cells," 2018.

² N. B. Milosavić, R. M. Prodanović, D. Veličković, and A. Dimitrijević, Enzyme Stabilization and Immobilization, vol. 1504. New York, NY: Springer New York, 2017.

разтворител съдържащ 0.1M TBAClO₄), свързана към електрохимичната станция Autolab 302N. При необходимост, електролитът се продухва с химически чист аргон (99.99%) преди измерванията.

Модифицираните електроди са охарактеризирани с помощта на разнообразни електрохимични методи като: циклична волтаперометрия, диференциална импулсна волтаперометрия, хроноамперометрия, електрохимична импедансна спектроскопия и др. Повърхностната морфология на отложенията върху стъкловъглеродните електроди е изследвана с помощта на сканираща електронна микроскопия.

III.3. Определяне на електрохимично-активната повърхност на модифицираните електроди

Електрохимично достъпната повърхност на електродите (немодифицирани или модифицирани) беше определяна с помощта на циклична волтаперометрия, при ниски скорости на сканиране (2–10 mV.s⁻¹). За целта електрохимичната клетка в триелектродна конфигурация се запълва с електролит 0.1 M KCl, в който са разтворени K₃[Fe(CN)₆] и K₄[Fe(CN)₆], взети в еквимолекулно съотношение (обикновено 5 mM разтвори). На цикличните волтаперни криви, регистрирани при дадените условия, се появяват два пика – един на окисление и един редуционен. За изчисляване на електрохимично-активната повърхност, се определя височината на редуционния пик (сила на тока, A), като при това се отчита базовата линия, от която се определя височината.

Получената стойност за ток на пика се замества в уравнението на Randles-Sevcik, от което се изчислява електрохимично-достъпната повърхност на електрода:

$$i_p = 0.446 \cdot \frac{(nF)^{3/2}}{(RT)^{1/2}} \cdot A \cdot C \cdot D^{1/2} \cdot \nu^{1/2}, \quad (\text{Уравнение 1})$$

където i_p – ток на пика, A; A – повърхност на работния електрод, cm²; C – концентрация на K₃[Fe(CN)₆] или K₄[Fe(CN)₆], или [Ru(NH₃)₆]Cl₃, (редокс-сонда), mol.dm⁻³; D – дифузионен коефициент, cm².s⁻¹, който за K₃[Fe(CN)₆] има стойност от 7,6.10⁻⁶, за [Ru(NH₃)₆]Cl₃ е 8,43.10⁻⁶ cm².s⁻¹; n – брой електрони; R – универсалната газова константа (8.314 J.mol⁻¹. K⁻¹); T – абсолютната температура, K; F – константа на Фарадей, (96485 C.cm⁻³); ν – скорост на сканиране, V.s⁻¹.

Електрохимично – активната повърхност на модифицираните със златни отложения стъкловъглеродни електроди беше определена и по алтернативна методология, основаваща се на свойствата на златото в силно кисела среда да формира повърхностен монослой от златен оксид при потенциали по-високи от 1.2 V, както и да редуцира оксидната фаза от повърхността при последваща електродна поляризация в интервала 0.95 – 0.85 V³. Серия от поне 10 последователни циклични волтаперни криви в 0.5 M H₂SO₄ са регистрирани, като за последната заснета крива се определя площта на пика при редукция на монослой от оксидната фаза. Електрохимично-активната повърхност A на електродите се определя по формулата:

$$A = \frac{S_p}{\nu Q_{O_2}} \quad (\text{Уравнение 2}),$$

където: S_p е площта на пика [$\mu\text{A.V}$], определяна софтуерно; ν е скоростта на сканиране [V.s⁻¹]; $Q_{O_2} = 400 \mu\text{C.cm}^{-2}$ е количеството електричество, необходимо за формиране/редукция на един монослой кислород от оксиданта фаза .

³ Álvarez-Martos and E. E. Ferapontova, “Electrochemical Label-Free Aptasensor for Specific Analysis of Dopamine in Serum in the Presence of Structurally Related Neurotransmitters,” Anal. Chem., vol. 88, no. 7, pp. 3608–3616, 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.5b04207.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

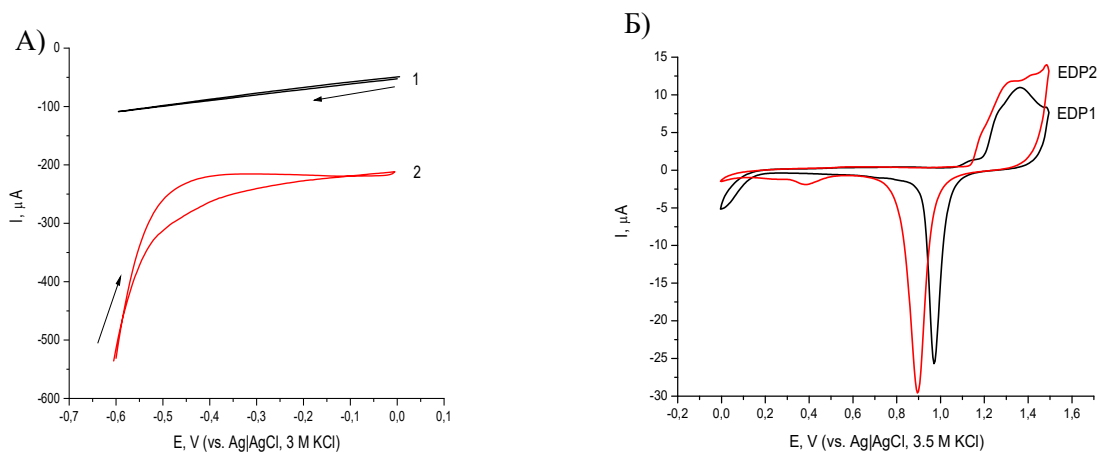
IV.1. Модифициран с електрохимично отложено злато стъкловъглероден електрод – получаване, охарактеризиране и приложения

Настоящият раздел илюстрира предимствата и възможностите, които предоставя модифицирането на стъкловъглероден материал с електрохимично отложено злато с оглед увеличаване на електрохимично-активната повърхност. Целта, която си поставихме при разработването на модифицирания със злато стъкловъглероден електрод, е да получим преобразувател на сигнала с добре развита повърхност, който впоследствие да бъде функционализиран с ензим за молекулно разпознаване, като комбинацията от двата елемента доведе до получаването на електрохимичен биосензор за количествено определяне на биологично важни съединения.

IV.1.1. Получаване и охарактеризиране на стъкловъглеродни електроди, модифицирани с електрохимично отложено злато

IV.1.1.1. Получаване на стъкловъглеродни електроди с електроотложено злато

Предварителните ни изследвания показаха, че електрохимичната редукция на злато върху стъкловъглерод протича с видима скорост при потенциали -0.3 V и по – отрицателни. И в тази връзка са тествани две алтернативни процедури на отлагане на злато, чиято цел е да бъде получен модифициран електрод със силно развита електрохимично-достъпна повърхност. При първата процедура на отлагане (*Фиг. 1А, крива 1*), стъкловъглеродният електрод се поляризира при стартов потенциал от 0 V , при което не протичат окислителни или редукционни процеси. Постепенно потенциалът на поляризация се измества със скорост от 0.1 V s^{-1} в отрицателна посока до -0.6 V , след което отново се връща към началния потенциал от 0 V . Втората процедура за електрохимично отлагане на злато се провежда в същия диапазон от потенциали и със същата скорост на изменение на потенциала на поляризация на работния стъкловъглероден електрод, с тази разлика, че началният потенциал е -0.6 V , при който редукцията на тетрахлоауратните йони протича със значителна скорост (*Фиг. 1А, крива 2*). Видът на регистрираната при тези условия циклична волтамперна крива показва, че с изместване на потенциала на поляризация в положителна посока силата на тока на редукция постепенно намалява и достига до една практически постоянна стойност в интервала от потенциали на поляризация от -0.4 V до 0 V . При обратния ход отново не се наблюдава наличието на Фарадееви токове в диапазона от потенциали от 0 V до -0.35 V , но токовете на редукция осезаемо нарастват при изместване на потенциала на поляризация в отрицателна посока и достигат най-високата си стойност при -0.6 V . Волтамперната крива има изразен хистерезисен характер и върху нея ясно могат да се наблюдават области, в които редукцията на тетрахлоауратните йони протича с висока скорост.



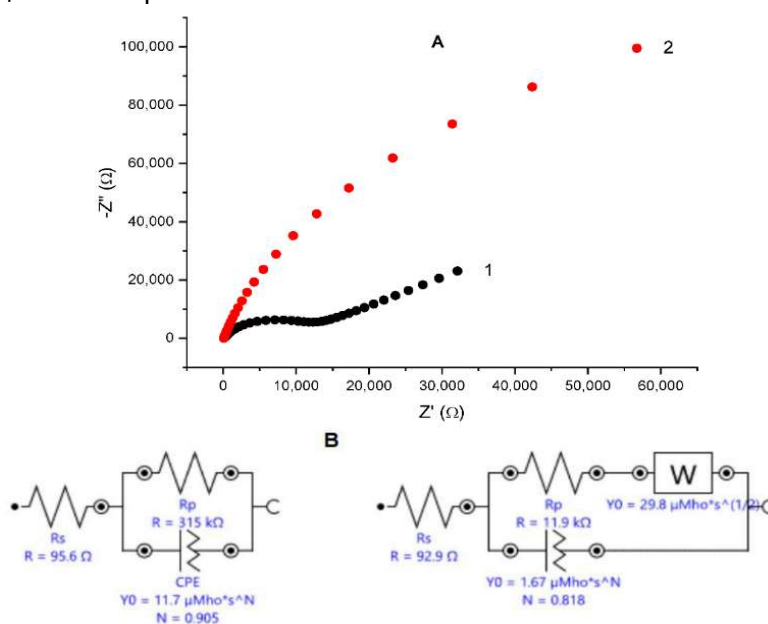
Фигура 1. Циклични волтампърни криви, регистрирани върху: А) стъкловъглероден електрод в разтвор на 0.1 M HCl, съдържащ 50 mM HAuCl₄ (pH = 1) в интервала от потенциали от -0.6 до 0 V: стартов потенциал 0 V (1); стартов потенциал -0.6 V (2) и Б) стъкловъглеродни електроди модифицирани по процедура 1 (EDP1, червено) и по процедура 2 (EDP2, черно) в 0.5 M H₂SO₄, сравнителен електрод Ag|AgCl (sat. KCl); скорост на сканиране 100 mV.s⁻¹.

Непосредствено след получаването си, модифицираните със злато стъкловъглеродни електроди бяха подложени на електрохимично почистване в 0.5 M разтвор на H₂SO₄. При това почистване, освен десорбирането на онечистванията от повърхността на модифицираните електроди, при анодния ход на цикличната волтамперна крива се извършва образуване на повърхностен оксиден слой върху златните отложения, който при катодния ход се редуцира с образуването на дълбок пик с потенциал при максимума около 0.9 – 1.0 V(vs. Ag|AgCl, sat. KCl) (Фиг.1Б). Волтамперните криви на модифицирания по втората процедура стъкловъглерод се отличават с по-дълбок и широк пик на редукция в сравнение с получения по EDP1, което свидетелства за наличието на по-развита електрохимично-активна повърхност на електродните материали. Тези зависимости се наблюдават и за двете изследвани концентрации на тетрахлоауратните йони, използвани при модифициране на електродите. Беше установено, че площта на редукционните пикове получени с електродните материали, модифицирани с електрохимично-отложено злато по двете алтернативни процедури при използване на 3.5 mM разтвор на HAuCl₄ е между 3.8 и 4.1 пъти по-малка от площта на редукционните пикове, получени при модифицирането на стъкловъглеродните електроди с 50 mM разтвор на HAuCl₄. Тези данни недвусмислено показват, че електрохимично-достъпната повърхност на златните отложения е в пъти по-голяма, когато за модифициране се използва по-концентрирания разтвор на тетрахлоауратни йони, независимо от това по коя от двете процедури се извършва електроотлагането.

Определената електрохимично достъпна повърхност за получените по втората процедура модифицирани със злато електродни материали е $0.312 \pm 0.009 \text{ cm}^2$, която е с близо 51% по-голяма от тази на получените по първата процедура ($0.207 \pm 0.018 \text{ cm}^2$) и ~5 пъти по-голяма от геометричната повърхност на златен електрод със същия диаметър (0.071 cm^2).

IV.1.1.2. Характеризиране на модифицираните със злато електроди с електрохимична импедансна спектроскопия (EIS) и сканираща електронна микроскопия

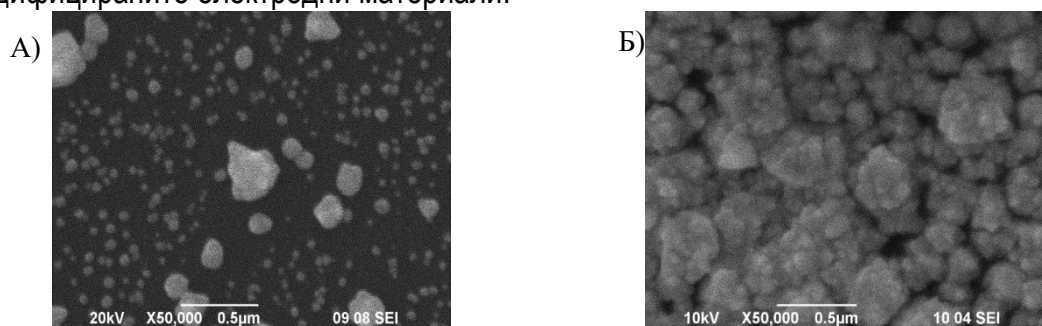
На *Фиг.2А* са представени зависимостите на имагинерната компонента на импеданса от реалната за немодифициран стъкловъглероден електрод (*крива 1*) и за същия електрод, покрит с електроотложено по втората процедура злато (*крива 2*). Графиката на Nyquist за чистия стъкловъглероден електрод се състои от полуокръжност, характерна за възникването на съпротивление при преноса на заряд, последвано от линейен регион с наклон от 45° , характерен за дифузионно-лимитирани процеси проявяващ се в средно- и нисочестотния диапазон. Импедансният спектър на модифицирания със злато стъкловъглероден електрод има дъговиден ход в областта на високите честоти, като в областта на средни и ниски честоти преминава в почти линейна зависимост, сключваща ъгъл между оста X и линейната част на спектъра по-голям от 45 градуса. Симулациите, извършени въз основа на експерименталните данни, дават като резултат еквивалентната електрическа верига (верига на Randles, *Фигура 2В*), съдържаща елемент с постоянна фаза (CPE), свързан паралелно към съпротивлението на пренос на заряд (R_p). Изчислената стойност за R_p ($11.9\text{ k}\Omega$) е много по-малка от тази за чистия електрод ($315\text{ k}\Omega$), което означава, че преносът на електрони от и към модифицираната със злато повърхност е силно улеснен в сравнение с немодифицирания стъкловъглерод. В специализираната литература CPE често се представя като типична характеристика на несъвършените кондензатори (напр. двойния електричен слой) и предполага значителна грапавост на повърхността поради повишена поръзност или наличие на неравномерности върху електродните повърхности ⁴.



Фигура 2. EIS спектри: диаграма на Nyquist (A) на стъкловъглероден електрод (1) и същия електрод с електрохимично отложено злато (2); сравнителен електрод (Ag|AgCl, sat KCl); електролит: 0.1 M KCl, съдържащ 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ като редокс-сонда; честотен обхват: 100 kHz до 1 Hz. (B) Еквивалентни вериги на Randles за чист (вляво) и модифицирания със злато (вдясно) стъкловъглероден електрод.

⁴ Song *et al.*, “Enhanced Electrochemical Impedance Spectroscopy Analysis of Microbial Biofilms on an Electrochemically in Situ Generated Graphene Interface,” *ACS Sensors*, vol. 5, no. 6, pp. 1795–1803, 2020, doi: 10.1021/acssensors.0c00570.

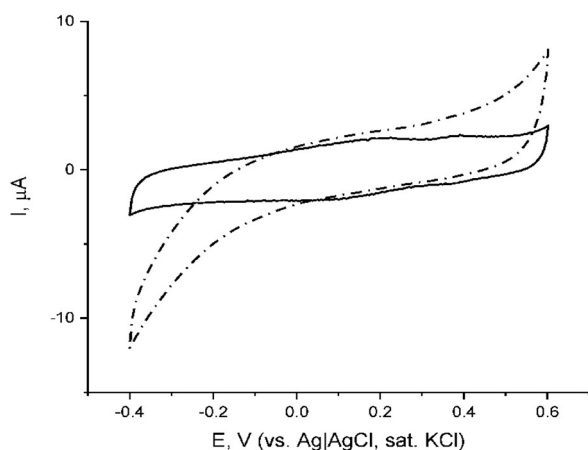
Електронномикроскопското изображение на златните отложения, получени по първата процедура показва, че те са неравномерно разпределени и на места образуват кълъстери с размери надхвърлящи 100 nm (Фиг. 3А). Морфологията на златните структури, отложени по втората процедура (Фиг. 3Б), се характеризира с плътно заселване на повърхността с обемни образувания, наподобяващи розети с диаметри, вариращи от няколко десетки до стотици нанометри. От микроскопското изображение е видно, че покритието на повърхността наподобява поръзозен филм, богат на микро- и мезопорести образувания. Изследванията със сканираща електронна микроскопия потвърждават изказаната по-горе хипотеза за наличие на неравномерно разпределени формирания вследствие на отлагането на злато. Тези наблюдения обясняват получените значителни различия в определената по електрохимичен път контактна повърхност на модифицираните електродни материали.



Фигура 3. Електронномикроскопски снимки на повърхностната морфология на стъкловъглероди модифицирани с 50 mM HAuCl₄; EDP1 - А и EDP2 – Б.

Въз основа на получените резултати за електрохимично-достъпната повърхност на модифицираните електроди и вида на повърхностната им морфология, всички последващи изследвания бяха извършени с електроди, модифицирани със злато отложено по втората процедура.

IV.1.2. Получаване и електрохимично характеризиране на лакказен ензимен електрод

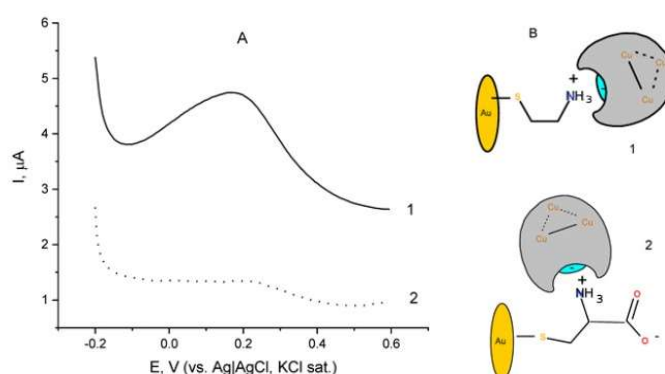


Фигура 4. Циклични волтамперни криви на лакказен електрод във фонов електролит в аерирана (пунктир) и деаерирана с Ar среда (плътен), 0.05 M цитратен буфер, съдържащ 0.1 M NaClO₄, pH = 4.0; скорост на сканиране, $v = 5 \text{ mV/s}$, сравнителен електрод Ag|AgCl, sat. KCl.

Имобилизацията на ензима лакказа беше извършена както е описано в III.1.1.3. Сравнителното разглеждане на поведението на получения ензимен електрод в присъствие и отсъствие на кислород (Фиг.4) показва, че ензимът катализира електроредукцията на разтворения в буфера кислород. На волтамперната крива записана в деаериран буфер (Фиг.5, плътна линия), се забелязват два широки окислителни пика: при около 0.2 V и приблизително 0.4 V, като при обратното сканиране съответните редукционни пикове са по-малко видими и се появяват при потенциали от около 0.1 V и 0.350 V, съответно. Двете двойки редокс пикове не присъстват на волтамограмата, получена в наситен с кислород буферен разтвор (Фиг. 4, пунктир), но се наблюдава ясно изразена редукционна

вълна, започваща при около 0.1 V, която е в резултат на електрохимичната редукция на кислород, катализирана от имобилизирания ензим.

С оглед да се оцени влиянието на повърхностния заряд на електрода върху ориентацията на ензима при неговата имобилизация, беше проведено сравнително изследване на два идентично приготвени лакказни електрода, като преди закрепването на ензима, едната електродна повърхност беше покрита с монослой от цистеин, а другата - с цистаминов монослой. DPV волтамограмата на ензима, имобилизиран върху модифицирана с цистамин повърхност (Фиг. 5А, крива 1), показва, че при потенциал от 0.18 ± 0.02 V токът достига максимум, който вероятно се дължи на редокс трансформацията на Т1 медния център, отговорен за свързването на бензендиоли^{5 6}. В подкрепа на това твърдение са резултатите от експериментите проведени в деаериран буфер, които свидетелстват, че няма промяна във вида на волтамперната крива. За ензима, имобилизиран върху цистеиновия монослой (Фиг. 5А, крива 2), максимумът е слабо изразен и се проявява като рамо, което предполага много по-неефективен електронен обмен между активният център на ензима и подлежащата повърхност на електрода. Тези резултати доказват, че повърхностните заряди влияят върху ориентацията, която ензимът заема върху електрода при неговата имобилизация. Най-вероятно в случая на лакказа прикрепена към монослой от цистамин, ориентацията е благоприятна за обмен на електрони с подлежащата повърхност на електрода, докато свързването на ензима към цистеинов монослой може да доведе до някои пространствени затруднения при обмена на електрони (Фиг. 5В).



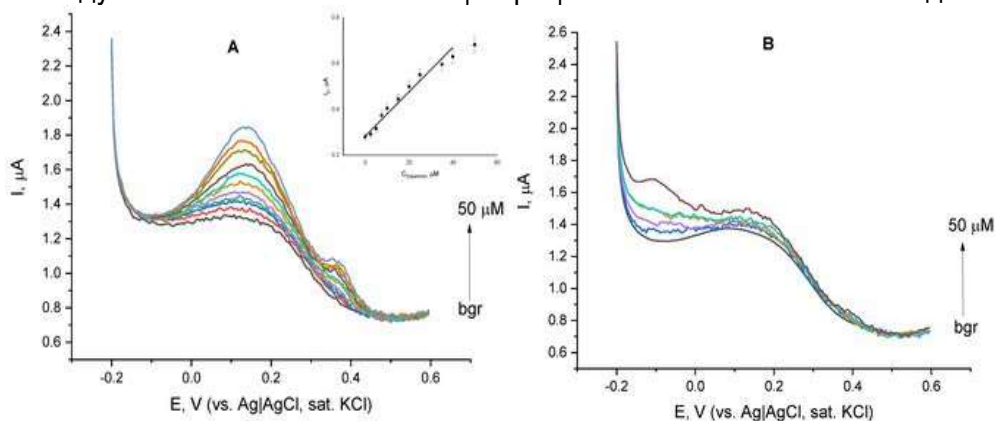
Фигура 5. (А) Диференциални импулсни волтамограми на лакказа, имобилизирана върху хемосорбиран монослой от (1) цистамин и (2) цистеин; фонов електролит: 0.05 М цитратен буфер, рН = 4.0, съдържащ 0.1 М NaClO₄; (В) Схема на ориентация на лакказа при имобилизация върху SAM от (1) цистамин и (2) цистеин.

Наличието на ясно изразен максимум върху импулсната волтамперна крива записана с ензимния електрод, получен чрез свързване на лакказа към функционализиран с цистаминов монослой модифициран електрод, мотивира допълнителните ни проучвания на електрохимичното поведение на получения биосензор в присъствие на избраните два катехоламина - допамин и L-епинефрин. От диференциално импулсните записи получени чрез добавяне на аликвотни части от допамин към буфера (Фиг. 6А), се вижда нарастване

⁵ D. M. Ivnitcki, C. Khripin, H. R. Luckarift, G. R. Johnson, and P. Atanassov, "Surface characterization and direct bioelectrocatalysis of multicopper oxidases," *Electrochim. Acta*, vol. 55, no. 24, pp. 7385–7393, 2010, doi: 10.1016/j.electacta.2010.07.026.

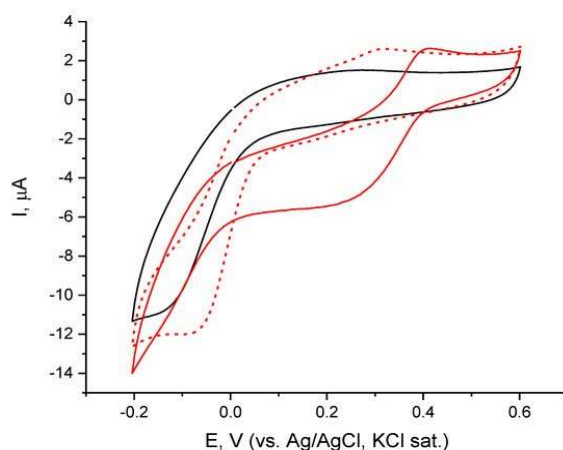
⁶ G. Gupta, V. Rajendran, and P. Atanassov, "Bioelectrocatalysis of oxygen reduction reaction by laccase on gold electrodes," *Electroanalysis*, vol. 16, no. 13–14, pp. 1182–1185, 2004, doi: 10.1002/elan.200403010.

на пика дори при ниски концентрации (2 μM). С увеличаване на концентрацията на допамин, пикът нараства и се измества в отрицателна посока. Наблюдава се линейна зависимост между височината на пика и концентрацията на допамин в диапазона от 2 до 40 μM (Фиг. 6А, вътре). При същите условия, добавянето на L-епинефрин (Фиг.6В) не повлиява съществено върху формата или позицията на волтамперните максимуми и връзката между височината на пика и концентрацията на анализа не е последователна.



Фигура 6. Диференциални импулсни волтамограми на лакказа, в присъствието на допамин (А) и L-епинефрин (В); фонов електролит - постоянно аериран 0.05 М цитратен буфер, съдържащ 0.1 М NaClO_4 , $\text{pH} = 4.0$. Вътре (А) зависимост на височината на пика от концентрацията на допамин.

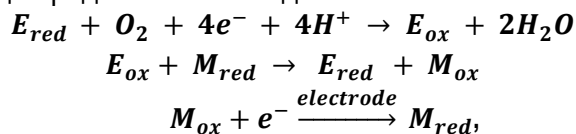
На цикличните волтамперни криви, получени с лакказния биосензор в присъствие на допамин и L-епинефрин, се наблюдават допълнителни разлики между двата катехоламина (Фиг. 7). Наличието на два субстрата на лакказата - кислород и катехоламин, предизвиква протичане на редукционен ток при потенциали, по-малко положителни от 0.4 V, т.е. при много по-ниски свръхнапрежения от редукцията на кислород, катализирана от ензима. Това показва способността на тези вещества да улесняват преноса на електрони между имобилизирания ензим и повърхността на електрода - явление, известно като медиаторна биоелектрокатализа⁷.



Фигура 7. Циклични волтамперни криви на лакказен електрод във фонов електролит (черен, пълтен) и в присъствие на допамин (червен, пълтен) и L-епинефрин (червен, пунктир); концентрация на катехоламините, $C = 49.8 \mu\text{M}$.

⁷ К. Kano and Т. Ikeda, "Fundamentals and Practices of Mediated Bioelectrocatalysis," *Anal. Sci.*, vol. 16, no. 10, pp. 1013–1021, Oct. 2000, doi: 10.2116/analsci.16.1013.

Механизмът на медираната от катехоламин електрохимична редукция на кислорода, може да бъде представен по следния начин:

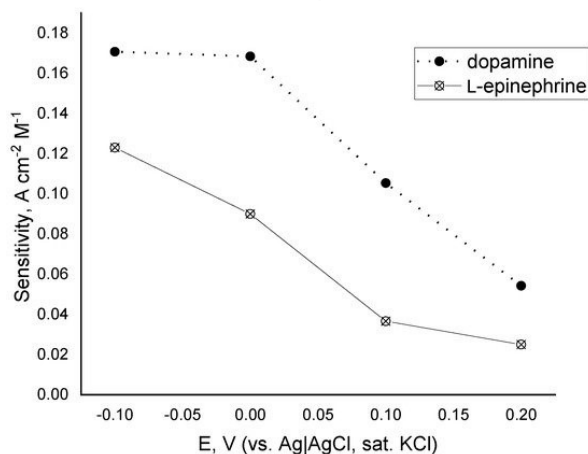


където E_{red} и E_{ox} са редуцирана/окислена форма на ензима и M_{red} и M_{ox} редуцирани и окислени форми на медиатора (в случая – катехоламин). Предложеният механизъм бе потвърден от сравнителни изследвания, при които в отсъствието на кислород не се наблюдава електроредукция на катехоламините. Волтамперните криви, снети в присъствието на двата катехоламина върху лакказния биосензор силно се различават от зависимостите, получени с модифицирания стъкловъглероден електрод без ензим, което свидетелства за наличието на биокаталитична активност на имобилизирания ензим.

Структурата на субстрата също оказва влияние върху ефективността на медиаторния електронен пренос (МЕТ процес). В присъствие на допамин при потенциали по отрицателни от 0.4 V (Фиг. 7 червена пълтна линия) имобилизираната лакказа редуцира кислорода и се достига до граничен ток в областта от 0.3 до 0 V, наблюдава се втора редукционна вълна, припокриваща тази на ензимната кислородна редукция в режим на директен електронен пренос, но с по-висок интензитет на тока. В присъствието на L-епинефрин ефективността на МЕТ процеса в диапазона от 0.4 до 0 V е много по-ниска (Фиг. 7 червена пунктирна линия), с начален потенциал за медиаторна редукция на кислород под 0.3 V, и достигане на плато при потенциали по-отрицателни от 0 V.

IV.1.3. Количествено определяне на допамин и L-епинефрин с лакказен биосензор

Въз основа на предходните констатации, беше извършено подробно проучване на



Фигура 8. Електродна чувствителност при определянето на допамин (пълни кръгове) и L-епинефрин (празни кръгове) като функция от работния потенциал; сравнителен електрод Ag|AgCl, sat. KCl; електролит - 0.05 M цитратен буфер с 0.1 M NaClO₄, pH = 4.0; 20 ± 1 °C.

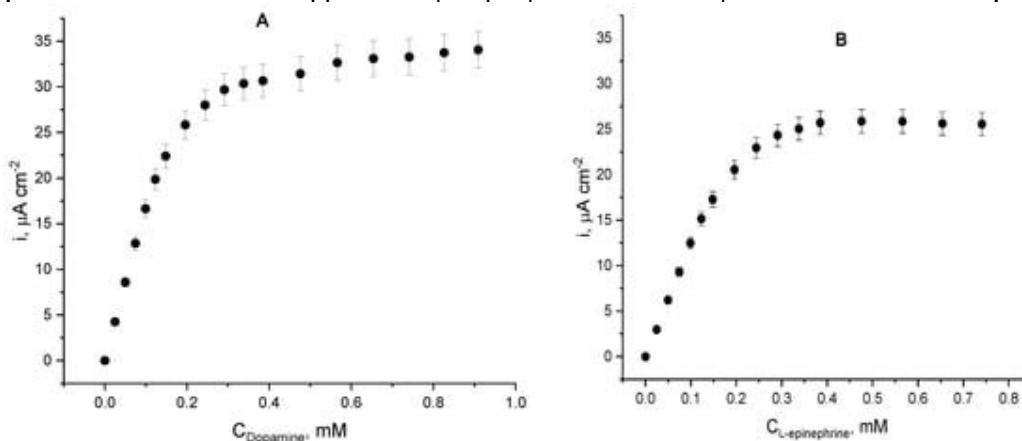
кислородната редукция върху лакказния биосензор в присъствието на допамин или L-епинефрин като медиатори, чрез измерване силата на тока при постоянен потенциал. Диапазонът от потенциали, започващ от 0.2 до -0.1 V (vs. Ag|AgCl, sat. KCl), е избран така, че неговата начална точка е потенциалът, при който се появява максимум върху DPV волтамперограмата, а крайната точка е потенциалът, при който редукционният ток в присъствие на L-епинефрин достига гранична стойност. При прилагане на потенциал от 0.2 V отговорът на ензимния електрод към L-епинефрин е около два пъти по-нисък от този към допамин, докато при -0.1 V неговата чувствителност нараства с 76%. Това рязко увеличение на чувствителността е кумулативен резултат от две паралелни електродни реакции - медиаторна

кислородна редукция и електроредукция на ензимно генериран L-епинефрин полухинон. Електродната чувствителност към допамин е практически еднаква при потенциали от 0 V и -0.1 V, след което рязко намалява с увеличаване на приложения потенциал (Фиг.8). Същият параметър за L-епинефрин постепенно намалява с изместване на работния

потенциал в положителна посока в изследвания диапазон. На базата на получените резултати може да се направи заключение, че лакказата реагира и с двата катехоламина, но притежава различен афинитет към тях и следователно тяхното едновременно определяне с един единствен електрод не е надеждно. Въпреки това, чрез използване на диференциален подход, включващ два идентични лакказни електрода, поляризиращи при различни потенциали, осигурява реална перспектива за тяхното разграничаване.

IV.1.4. Определяне на кинетични константи на имобилизирания ензим и операционни параметри на лакказния биосензор

Електрохимичните зависимости на Михаелис–Ментен (Фиг. 9) са построени на базата на хроноамперометричните записи, получени при добавяне на стандартни разтвори на катехоламините при постоянен потенциал от -0.1 V (vs. Ag|AgCl , sat. KCl), тъй като най-високата електродна чувствителност беше постигната при този работен потенциал. И в двата случая, плътността на тока първоначално се повишава линейно с концентрациите на катехоламините до около $120\text{ }\mu\text{M}$ за допамин и до $200\text{ }\mu\text{M}$ за L-епинефрин с чувствителност от $0.18\text{ }\mu\text{A mol}^{-1}\text{cm}^{-2}$ (допамин) и $0.2\text{ }\mu\text{A mol}^{-1}\text{cm}^{-2}$ (L-епинефрин). Тази първоначална линейна тенденция съответства на област с дифузионен контрол, типична за ниските концентрации на субстрата. При по-високи концентрации на катехоламините, зависимостта се отклонява от линейността и ензимът достига насищане при концентрации на допамин над $300\text{ }\mu\text{M}$, докато за L-епинефрин концентрацията на насищане надвишава $350\text{ }\mu\text{M}$.



Фигура 9. Зависимост на плътността на тока от концентрациите на катехоламини (графика на Михаелис–Ментен): А) допамин; и В) L-епинефрин; работен електрод: лакказа, имобилизирана върху цистаминов монослой; цитратен буфер, $\text{pH} = 4.0$; работен потенциал -0.1 V (vs. Ag|AgCl , sat. KCl); $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Изчислените привидни кинетични константи, максимална скорост (V_{max}^{app}) и константа на Михаелис–Ментен (K_M^{app}) се различават за двата катехоламина. Стойността на K_M^{app} за допамин ($0.116 \pm 0.015\text{ mM}$) е близка до тази, определена спектрофотометрично за свободния ензим в разтвор със същия субстрат, $K_M^{app} = 0.0918\text{ mM}$ ⁸. Възможна причина за наблюдаваното явление е, че имобилизираната лакказа притежава достатъчна конформационна подвижност, но влиянието на дифузията на субстрата през ензимния слой води до слабо увеличаване на стойността ѝ. Установи се, че привидната константа на Михаелис за L-епинефрин ($0.245 \pm 0.031\text{ mM}$), определена при същите условия, е повече от два пъти по-голяма, което показва по-слабо взаимодействие

⁸ M. Deng *et al.*, “High catalytic activity of immobilized laccase on core–shell magnetic nanoparticles by dopamine self-polymerization,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 112, pp. 15–24, 2015, doi: 10.1016/j.molcatb.2014.11.012.

между ензим и субстрат. Това се потвърждава и от максималната скорост, която за допамин е по-голяма ($4.08 \pm 0.16 \times 10^{-5} \text{ A cm}^{-2}$) в сравнение с получената за адреналин ($3.36 \pm 0.17 \times 10^{-5} \text{ A cm}^{-2}$). При концентрации, надвишаващи 400 μM , се наблюдава леко намаляване на плътността на тока, което може да бъде обяснено с ензимно инхибиране от L-епинефрин.

Анализът на операционните параметри предполага по-голям афинитет на лакказата към допамин, което се вижда не само от стойностите на привидните кинетични константи, но и от 1.45 пъти по-високата чувствителност на електрода и 1.30 пъти по-високата максимална плътност на тока, отколкото намерените за L-епинефрин (Таблица 1). Горните граници на откриване за двата субстрата са над 0.1 mM, което прави биосензора удобен аналитичен инструмент за мониторинг на концентрациите на катехоламини във фармацевтични продукти.

Границите на откриване са изчислени като три пъти дисперсията (σ) на фоновия отговор е разделена на наклона на линейната област от калибровъчната графика: $\text{LOD} = 3 \sigma / \text{наклон}$. Границите на количествено определяне и за двата анализа бяха изчислени като $\text{LOQ} = 10 \sigma / \text{наклон}$, където σ има същото значение. И двете стойности са в суб-микромоларния диапазон, което прави ензимния електрод потенциално приложим в биологични течности. Определените операционни параметри на разработения лакказен електрод показват много добра аналитична производителност по отношение на чувствителност и граници на откриване на двата изследвани катехоламина.

Таблица 1. Операционни параметри на лакказния електрод за допамин и L-епинефрин, присъстващи като субстрати; работен потенциал -0.1 V (vs. Ag|AgCl, sat. KCl); температура: $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Операционни параметри	Допамин	L-епинефрин
Максимална плътност на тока i_{max} (A cm^{-2})	$(33.76 \pm 1.2) \times 10^{-6}$	$(25.80 \pm 1.3) \times 10^{-6}$
Чувствителност, $\text{A L mol}^{-1} \text{cm}^{-2}$	0.178 ± 0.005	0.123 ± 0.002
Горна граница на определяне, mM	0.12	0.19
Граница на откриване, LOD, M	3.74×10^{-8}	5.41×10^{-8}
Граница на количествено определяне, LOQ, M	1.25×10^{-7}	1.80×10^{-7}

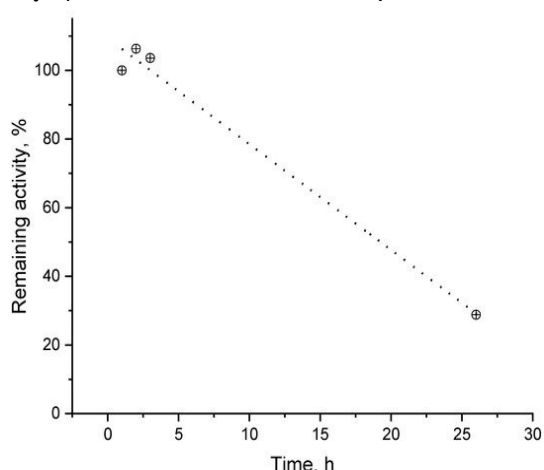
Валидирането на ензимния електрод беше извършено чрез анализиране на фармацевтични продукти с известни концентрации (Таблица 2). Определените средни стойности от $41.2 \pm 1.5 \text{ mg mL}^{-1}$ за допамин (при обявена концентрация от производителя 40 mg mL^{-1}) и 0.948 mg mL^{-1} за L-епинефрин (1 mg mL^{-1}) подкрепят хипотезата за приложимостта му при определяне на тези два анализа във фармацевтични продукти.

Таблица 3. Валидиране на лакказен електрод с реални проби — инжекционни разтвори с известна концентрация на допамин (40 mg.mL^{-1}) и L-епинефрин (1 mg.mL^{-1}).

Катехоламин	Добавен обем, μL	Определена концентрация, mg.mL^{-1}	Аналитичен добив, %
Допамин	10	39.6	99
	20	42.3	106
	30	41.5	104
L-епинефрин	20	0.89	89
	40	1.046	105
	60	0.909	91

IV.1.5. Изследвания за пречести влияния и стабилност

Златните наночастици са отличен катализатор за електрохимично окисление на L-аскорбинова киселина и наличието ѝ в изследваната проба може потенциално да попречи на отклика на електрода към катехоламина дори при потенциали близки до 0 V . С цел да се изследва отговора на лакказния електрод към L-аскорбат бяха проведени експерименти при идентични експериментални условия и работни потенциали 0 V и -0.1 V . При потенциал 0 V добавянето на L-аскорбинова киселина предизвиква протичане на ток на редукция с повишено ниво на шум. При тези условия, добавянето на L-аскорбинова киселина към допамин в съотношение 1:1, увеличава сигнала на ензимния електрод с 0.8% . Добавянето ѝ към L-епинефрин в същото съотношение води до нарастване на сигнала с 1.1% . Тези проценти на пречене са установени при условие, че концентрациите са избрани в линейната област на калибровъчните графики (т.е. до 0.12 mM). При работен потенциал -0.1 V , наличието на L-аскорбат ще увеличи отклика на ензимния електрод към допамин с 1.4% , докато сигналът към L-епинефрин ще бъде надценен с 2.2% . Следва да се отбележи, че тези работни потенциали осигуряват определяне на катехоламините практически без смущения, тъй като само присъствието на L-аскорбат в пробата може потенциално да



Фигура 10. Оставаща каталитична активност като функция от времето на живот на биосензора. Данните са нормализирани спрямо първото измерване при $E = -0.1 \text{ V}$; цитратен буфер, $\text{pH} = 4.0$; субстрат – допамин.

повлияе на отговора на електрода към всеки от катехоламините.

Стабилността на разработения електрод беше тествана за период от 26 часа (Фиг.10), използвайки допамин като ензимен субстрат. Активността на прясно приготвения ензимен електрод се запазва в рамките на следващите 3 часа, което бе установено чрез последователни измервания. Като показател за активност е приета максималната плътност на тока, т.е. измереният сигнал при високи концентрации на анализа разделен на електрохимично достъпната повърхност на електрода. След съхранение в хладилник в продължение на 21 часа във влажна атмосфера, максималната плътност на тока намалява до $1/3$ от първоначалната. Трябва да се отбележи, че

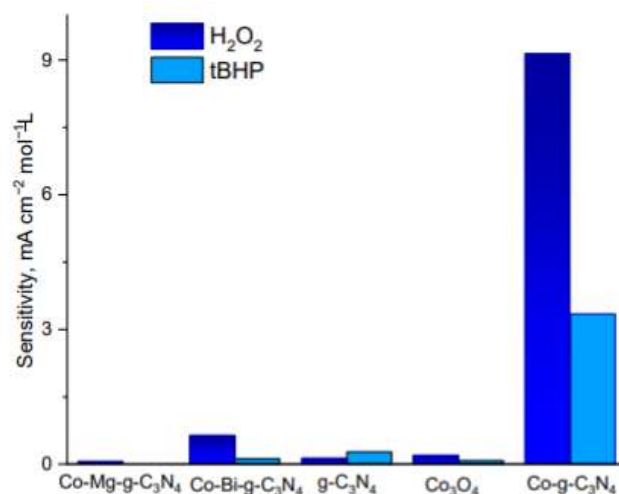
след първа употреба може да се наблюдава леко повишение на отклика на ензимния електрод към допамин, което най-вероятно се дължи на улеснения достъп на анализа до повърхността на електрода в резултат на набъбването на слоя, съдържащ протеин.

Следва да се отбележи, че при предварителните ни експерименти с лакказа, имобилизирана в слой от полимера Nafion върху идентично приготвен модифициран стъкловъглерод, чувствителността на биосензора намаляваше с над 10% при всяко следващо измерване в рамките на 4 часа. Следователно, избраният метод на имобилизация, въпреки че е трудоемък, предоставя много по-висока операционна стабилност на лакказния биосензор в сравнение с други методи, като имобилизиране на ензима чрез включването му в полимерен филм.

IV.2. Стъкловъглероден електрод, модифициран с двумерни наноматериали на базата на графитен въглероден нитрид ($g-C_3N_4$)

IV.2.1. Разработване на модифицирани с чист и дотиран с метални оксиди графитен карбонитрид ($g-C_3N_4$) стъкловъглеродни електроди

Предвид факта, че чистият 2D-наноматериал $g-C_3N_4$, и дотиран с метални оксиди MgO , Bi_2O_3 , и масивния шпинел Co_3O_4 имат хетерогенна-каталитична активност при разкъсване на пероксидни връзки⁹, са изследвани като електрокатализатори в процеса на електрохимична редукция на два водоразтворими хидропероксида: водороден пероксид (H_2O_2) и третичен бутилхидропероксид (t-BHP). За целта, серия от стъкловъглеродни електроди, всеки модифициран с различен катализатор, диспергиран във водна суспензия на свързващия йонен полимер Nafion. Като мярка за електрокаталитичната им активност служи специфичната чувствителност на електрода, т.е. електродната чувствителност отнесена към електродната повърхност, получена при постоянен потенциал, при който се извършва електроредукция на пероксидите (Фиг. 11).



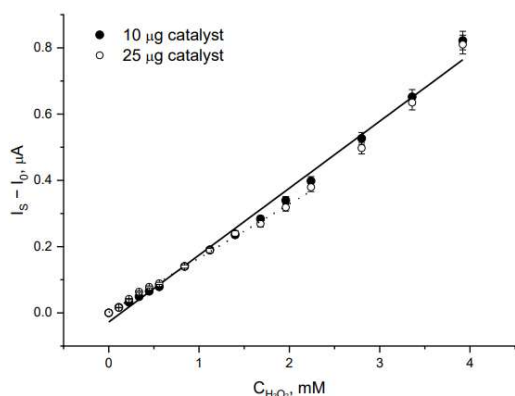
Фигура 11. Чувствителност на каталитичния електрод при електрохимична редукция на H_2O_2 (синя серия) и t-BHP (светлосиня серия) в неутрална водна среда; работен потенциал - 0.2 V (vs. Ag|AgCl, sat. KCl).

⁹ M. K. Stoyanova, "Enhancing the PMS activation ability of Co_3O_4 by doping with Bi and Mg," vol. 50, pp.144–150, 2018, [Online]. Available: http://www.bcc.bas.bg/BCC_Content_Volume_50-H_Special.html.

В процеса на електроредукция на двата водоразтворими хидропероксида, най-високата електрокаталитична активност бе установена за g-C₃N₄ дотиран с Co₃O₄ (Co-g-C₃N₄). Следва да се отбележи, че неговата активност е многократно по-висока от тази на индивидуалните компоненти: g-C₃N₄ или Co₃O₄, което предполага, че при комбинирането им се проявява синергизъм (Фиг. 11).

Въз основа на горните резултати и високата каталитична активност при електрохимична редукция на двата хидропероксида, Co-g-C₃N₄ е избран за следващите изследвания.

IV.2.1.1. Оптимизиране на състава на модифициращата фаза

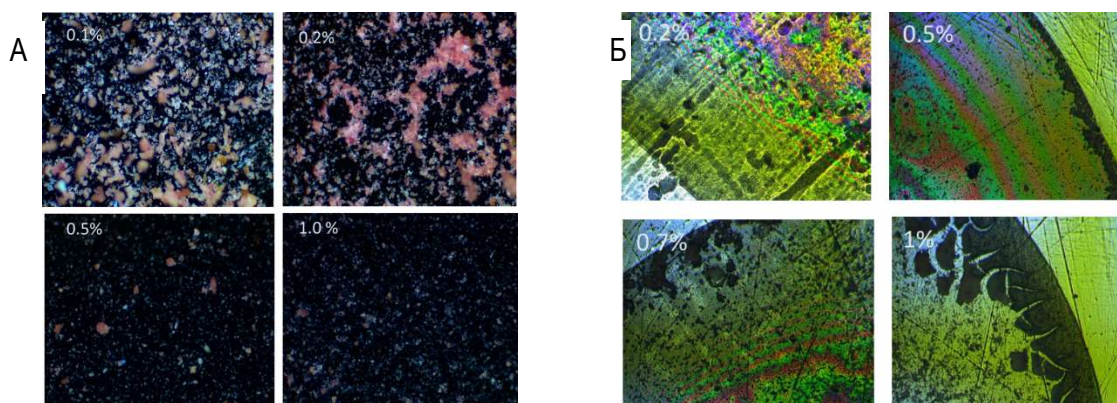


Фигура 12. Зависимост на сигнала на модифициран с Co-g-C₃N₄ електрод от концентрацията на пероксид при постоянен работен потенциал, суспензии със съдържание на катализатор 2 mg/ml (пълни кръгове) и 5 mg/ml (празни кръгове).

С цел формиране на тънък филм с достатъчно висока степен на покритие на електродната повърхност, бяха проведени серия от експерименти като съдържанието на Co-g-C₃N₄ в модифициращата фаза беше варирано между 10 mg/mL и 2 mg/mL, последвано от определяне на електродната чувствителност. Експерименталните данни показват, че за електродите приготвени чрез отлагане на суспензия, съдържаща 2 mg/mL и 5 mg/mL, силата на тока измерена при постоянен потенциал, зависи линейно от концентрацията на пероксида. Следва да се отбележи, че чувствителността на електрода намалява с увеличаване на количеството на катализатора (Фиг.12). Най-висока чувствителност се постига при модифициране със суспензия, съдържаща 2 mg/mL, поради което този състав беше

избран за по-нататъшните ни изследвания.

Съдържанието на втория компонент в модифициращата фаза, полимерът Nafion 117, също беше оптимизирано, за да гарантира не само проникваемост на покритието за анализа, но и механична стабилност на модифициращия слой. Концентрацията на полимерната суспензия е варирана от 0.1 до 1%. С помощта на поляризационна микроскопия (Фиг. 13 А), беше наблюдавано, че при намаляване на концентрацията на полимера от 1 до 0.1%, частиците на катализатора показват повишена склонност да агломерират, поради намаления вискозитет на дисперсната среда. Установи се, че частиците на катализатора са неравномерно разпределени в рамките на модифициращата фаза, тъй като твърдостта и модулът на Юнг, измерени чрез наноиндентация, показват много различни стойности за различни области на една и съща проба. Получените резултати свидетелстват, че колкото по-голямо е полимерното съдържание, толкова повече агломерирали структури са изтласкани към периферията на изследваната проба (Фиг.14Б). Това допринася за образуване на пукнатини в модифициращата фаза и нейното разрушаване по време на измерванията.



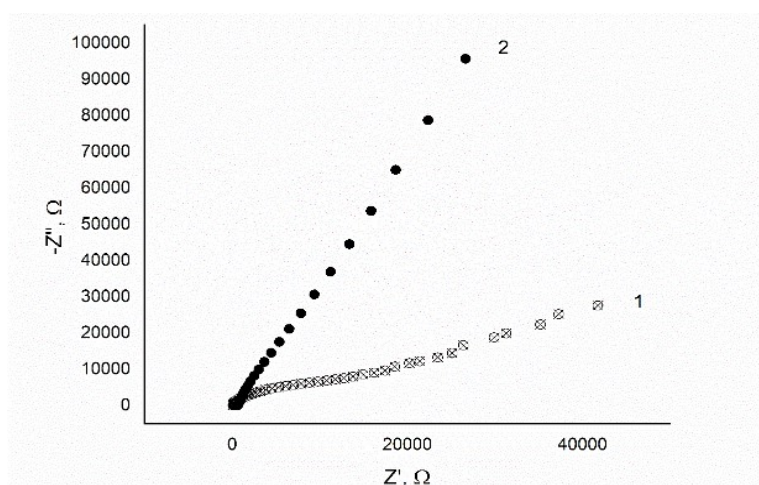
Фигура 13. Микроскопски изображения (поляризирана светлина А и с отразена светлина Б) на модифицирани с Co-g-C₃N₄ електроди (съдържание 2 mg/mL), диспергирани в полимерна суспензия с различно съдържание на Nafion™. Увеличение × 20.

С увеличаване на количеството на свързващия полимер в модификатора, отклоненията от линейността на зависимостта на електродния сигнал от концентрацията на хидропероксид стават значителни. Установи се, че отговорът на електрода постепенно се променя в рамките на няколко измервания, което най-вероятно е в резултат от набъбването на полимерния филм. Чувствителността, установена при електрокаталитичната редукция на хидропероксид при постоянен потенциал от -0.2 V (vs. Ag|AgCl), е практически идентична за модифициращи фази с полимерно съдържание от 0.1% или 0.2%, докато тази с 0.5% полимерно съдържание показва намаление на чувствителността на електрода с около 1/4 в сравнение с първите две. Тези резултати, заедно с нелинейната зависимост на сигнала от концентрацията, правят съдържание на полимер от 0.5% неподходящо за електроаналитични приложения, въпреки че механичната му стабилност е значително по-голяма от тази на покритие с 0.1% съдържание на полимер. Разликата в стабилността на електродите, приготвени с 0.2% Nafion като свързващо вещество и с 0.5% полимер не е съществена. Следователно, за получаването на каталитични електроди, приложими при анализ на водоразтворими хидропероксиди, беше избран като оптимален състав 2 mg/mL Co-gC₃N₄, диспергиран в 0.2% Nafion водна суспензия.

IV.2.2. Електрохимично характеризиране на модифицираните електроди

За стъкловъглеродни електроди, модифицирани със слой Nafion™ (Фиг.14, крива 1) диаграмата на Nyquist се характеризира с два участъка: начален, който се наблюдава във високо- честотния диапазон на спектъра и представлява полу-окръжност, последвана от линейна „опашка“, наклонена на около 45° спрямо абсцисата, характерна за средната и нискочестотната област на спектъра. Наличието на полукръг показва възникването на съпротивление при преноса на заряд ($R \sim 3,9 \text{ k}\Omega$), докато линейната част в средните и ниските честоти на възбуждане, се дължи на процеса на дифузия на редокс активните частици към електродната повърхност. EIS спектрите са получени в присъствието на Fe(CN)₆^{3-/4-}, използвани като редокс сонда, поради което появата на увеличено съпротивление при преноса на заряд може да се дължи на електростатичното отблъскване между хексацианофератните аниони и покритата с полимер стъкловъглеродна повърхност, тъй като полимерът Nafion съдържа множество отрицателно заредени флуоридни/сулфонатни странични групи, осигуряващи му отрицателен повърхностен заряд.

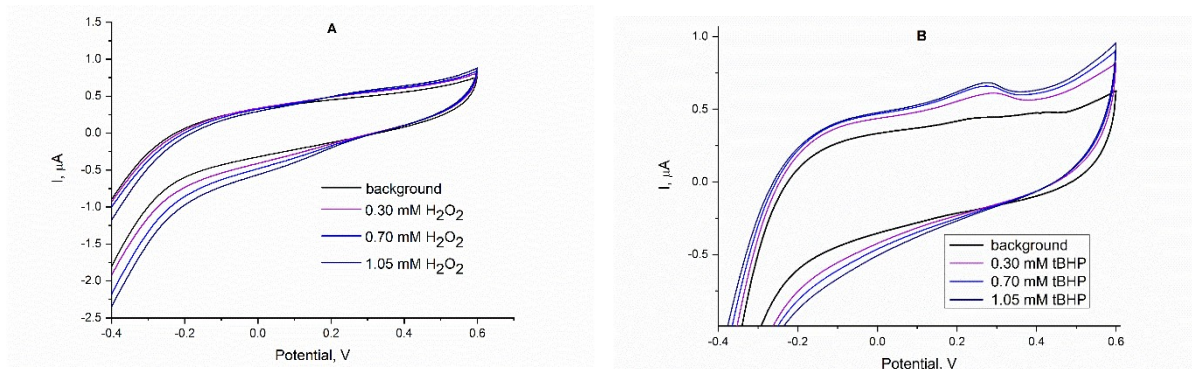
EIS спектърът на стъкловъглероден електрод, модифициран с композит Co-g-C₃N₄ – Nafion™ (Фиг. 14, крива 2), е записан при идентични условия в същия честотен диапазон: от 10⁵ Hz до 1 Hz. В този случай, обаче областта с високо съпротивление при пренос на заряд не е ограничена само във високочестотната област на спектъра, а е характерна за целия честотен диапазон, което се дължи на полупроводниковия характер на модифициращата фаза. На EIS спектъра на Co-g-C₃N₄-Nafion™ модифициран електрод не се открива полу-окръжност на диаграмата на Nyquist, а спектърът представлява права линия наклонена под ъгъл, по-голям от 45°, което съответства на заселване на повърхността на електрода с множество кондензатори, подобно на поведението на повърхност, модифицирана с графен¹⁰. Очевидно, преносът на заряд не е ограничен само в областта на високите честоти, но анализът на данните и симулациите показват стойност на съпротивлението при пренос на заряд, което е приблизително 3-4 порядъка по-високо, както може да се очаква поради полупроводниковата природа на катализатора Co-g-C₃N₄.



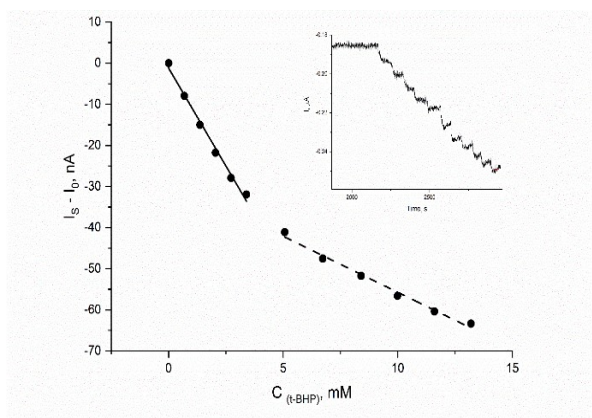
Фигура 14. EIS спектри (диаграма на Nyquist) на: модифициран с Nafion™ стъкловъглерод (1) и модифициран с Co-g-C₃N₄ – Nafion™ стъкловъглероден електрод (2) ; сравнителен електрод (Ag|AgCl, sat KCl); електролит 5 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} в 0.1 M KCl.

Електрохимичното поведение на модифициран с Co-g-C₃N₄/Nafion™ - стъкловъглероден електрод беше изследвано в отсъствие и присъствие на двата водоразтворими хидропероксида: водороден пероксид (Фиг. 15,A) и t-BHP (Фиг. 15,B) И за двата изследвани анализа се наблюдават много добре изразени редукционни вълни, започващи при потенциали от около 0.2 V и стигащи до -0.4 V (vs. Ag|AgCl) и по-отрицателни потенциали. Най-отчетлива разлика между фоновия ток и тока в присъствието на двата хидропероксида се забелязва при около -0.2 V. Сравнителните изследвания, проведени в напълно деаерирана среда показват, че върху модифицирания електрод, редукцията на кислорода започва при потенциали, по-отрицателни от -0.25 V и следователно се наблюдава припокриване на вълната на редукция на хидропероксида и кислородната редукция. Това наблюдение е важно, тъй като кислородът е продукт от електроредукцията на хидропероксидите и отделянето му влияе както върху нивото на шума, така и върху чувствителността на определянето.

¹⁰ J. D. Huffstutler *et al.*, “High performance graphene-based electrochemical double layer capacitors using 1-butyl-1-methylpyrrolidinium tris (Pentafluoroethyl) trifluorophosphate ionic liquid as an electrolyte,” *Electron.*, vol. 7, no. 10, pp. 1–11, 2018, doi: 10.3390/electronics7100229.



Фигура 15. Циклични волтампърни криви на електрод, модифициран с $\text{Co} - g\text{-C}_3\text{N}_4 / \text{Nafion}^{\text{TM}}$ в отсъствие и присъствие на H_2O_2 (A); в отсъствие и присъствие на $t\text{-BHP}$ (B); фонов електролит: фосфатен буфер, $\text{pH} = 7$, сравнителен електрод $\text{Ag}|\text{AgCl}$ (sat KCl).



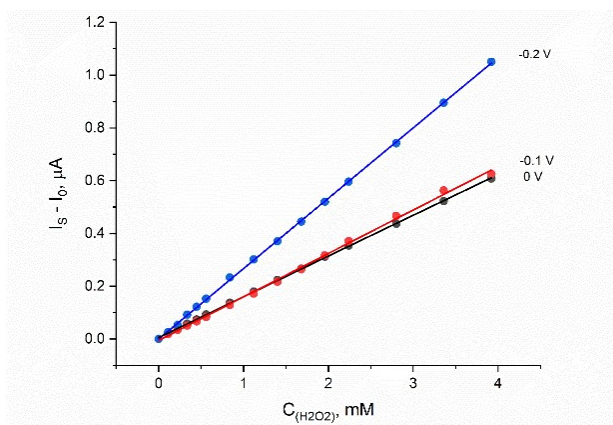
Фигура 16. Хроноамперометричен запис при добавяне на аликвоти от $t\text{-BHP}$ (вътре); работен електрод: GC електрод, покрит с $\text{Nafion}^{\text{TM}}$; фонов електролит: фосфатен буфер, $\text{pH} = 7.0$; $\text{Ag}|\text{AgCl}$ (sat KCl); работен потенциал: -0.3 V

На Фиг. 16 е представена електрохимичната редукция на $t\text{-BHP}$ върху стъкловъглероден електрод модифициран само с Nafion при постоянен потенциал от -0.3 V . Трябва да се отбележи, че с преминаване към по-малко отрицателни работни потенциали (напр. -0.2 V), сигналът намалява, а нивото на шума се увеличава значително, което не позволява да се разграничи сигнал от шум. На базата на хроноамперометричните записи бе построена калибровъчна графика, съставена от два линейни участъка – по-стръмна част (Фиг. 16, плътна линия), достигаща до 3.5 mM , последвана от линейна зависимост с около 3 пъти по-малък наклон, обхващаща областта от 5 до 13 mM . Съществуването на две линейни области най-вероятно е резултат от

затрудненото преминаване на $t\text{-BHP}$ през полимерния слой и е най-видимо при концентрации, надхвърлящи 3.5 mM .

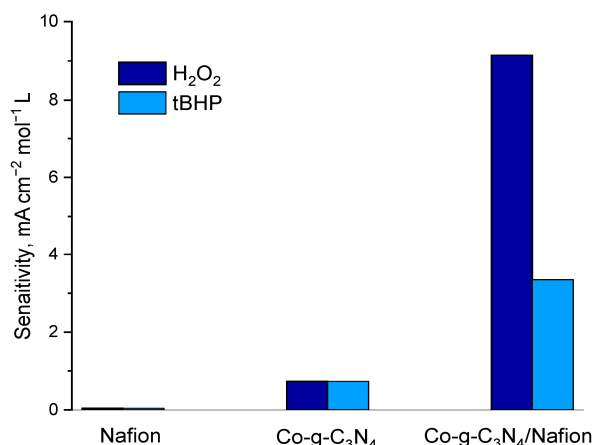
С оглед определяне на потенциала, при който електродната чувствителност е най-висока, откликът на електрода-катализатор като функция от концентрацията на хидропероксидите е изследван при постоянни потенциали -0.2 , -0.1 и 0 V (vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}$) в неутрална среда (Фиг.17). От представените зависимости се вижда, че с изместване на работния потенциал в отрицателна посока, чувствителността на електрода нараства слабо между 0 и -0.1 V , като почти се удвоява при работен потенциал от -0.2 V . И при трите работни потенциала се наблюдава ясно изразено стъпаловидно изменение на тока при добавяне на аналит, като сигналът е няколко пъти по – висок в сравнение с този на покрития само с Nafion електрод (регистриран при -0.3 V). При прилагане на потенциали, по-отрицателни от -0.2 V беше установено, че чувствителността нараства, но с по-високо

ниво на шум, докато в интервала от 0 V до -0.2 V нивата на шум са значително по-ниски. Тези резултати свидетелстват, че електрокаталитичната активност на Co-g-C₃N₄, е резултат от синергичното действие на двата компонента, съставляващи модифициращата фаза – катализаторът Co-g-C₃N₄ и йономера Nafion, което определя тази система като композит. При дадените експериментални условия линейната област, определена във водни разтвори, обхваща диапазона от концентрации от 0.4 до 14 mM.



Фигура 17. Зависимост на сигнала на електрода от концентрацията на H₂O₂ (калибровъчни графики) при работни потенциали: 0, -0.1 и -0.2 V; работен електрод: модифициран с Co-g-C₃N₄/Nafion™; фонов електролит: фосфатен буфер, pH = 7.0, сравнителен електрод Ag|AgCl (sat. KCl).

С цел да се изясни ролята на всяка от съставните части на композита, беше проведена серия от експерименти с електроди модифицирани само с полимер, само с Co-g-C₃N₄ и с Co-g-C₃N₄/Nafion (Фиг. 18). Изследванията са извършени при постоянен потенциал, при който беше установена най-високата чувствителност (-0.2 V vs. Ag|AgCl, sat. KCl) в присъствието и на двата изследвани хидропероксида. Най-ниската електрокаталитична активност е отчетена за електрода, покрит само с полимер, което най-вероятно е резултат от затрудненото преминаване на хидропероксидите през полимерния слой, тъй като предварителните експерименти, проведени с немодифициран стъкловъглероден електрод показват по-висока чувствителност в сравнение с електрода с покритие от Nafion. Модифицираният само с катализатор електрод проявява по-висока активност от Nafion/GCE, докато електродът модифициран с композит Co-g-C₃N₄/Nafion показва рязко увеличение на скоростта на електроредукция на H₂O₂. Чувствителността на електрода покрит с композитната фаза, надвишава повече от 10 пъти определената с модифициран само с катализатор Co-g-C₃N₄ електрод и е с около два порядъка по-висока от установената за стъкловъглероден електрод с полимерно покритие. Получените резултати показват изразен електрокаталитичен ефект на композита Co-g-C₃N₄/Nafion в процеса на електрохимичната редукция на водороден пероксид и t-BHP. При идентични условия, отклика на модифицирания с композит електрод към t-BHP при същия работен потенциал потвърждава наличието на електрокаталитичен ефект на композита. Неговата чувствителност е повече от 50 пъти по-висока от тази, постигната с електрод само с полимерно покритие и почти 5 пъти по-висока от тази на покрития с Co-g-C₃N₄/GCE. Сигналят на каталитичния електрод е стабилен и без шум с увеличаване на концентрацията на анализа и се спазва стриктно широка линейна динамична област от концентрации до 14 mM на хидропероксида (R² = 0.997).

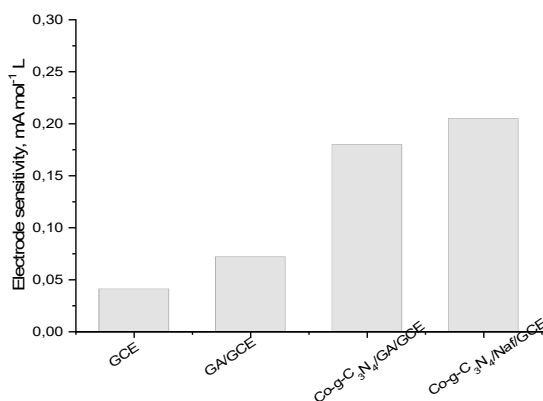


Фигура 18. Чувствителност на електрода, определена при постоянен потенциал от -0.2 V (vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}$, sat. KCl) за различни покрития на електрода: с покритие само от 0.2% Nafion; покрит със слой $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4$ (2 mg/mL диспергирани във вода) или с покритие от композита $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4/\text{Nafion}$ суспензия (0.01 mg катализатор); $\text{pH} = 7.0$.

IV.2.3. Влияние на свързващия полимер

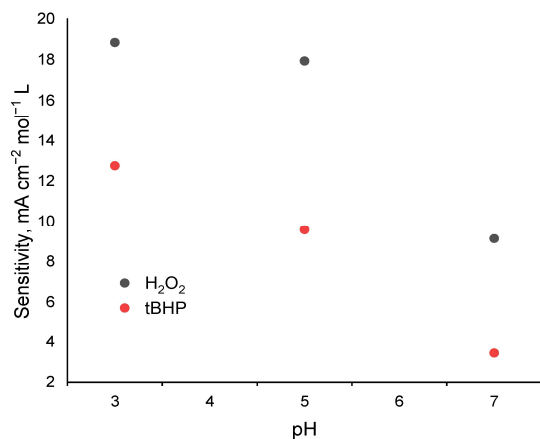
Аналогични на горните изследвания са проведени и с електрод, модифициран с $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4$, който е задържан върху повърхността чрез омрежване с глутаров алдехид. Целта на това изследване е да бъде установено доколко свързващият полимер влияе върху каталитичната активност на модифициращата фаза. Подобно на наблюдаваните в предходните експерименти явления, електрохимичната редукция на водоразтворимите хидропероксиди върху електрода – катализатор в среда от 0.1 M фосфатен буфер се установява в интервала от потенциали от 0.2 до около -0.3 V . Разликата между фоновия сигнал и сигнала в присъствие на пероксид е най – отчетлива при потенциал -0.2 V , което определи работния потенциал при следващите изследвания.

На *Фигура 19* са съпоставени резултатите от изследването на електрокаталитичната активност при постоянен потенциал -0.2 V (vs $\text{Ag}|\text{AgCl}$, sat. KCl) на чист стъкловъглероден електрод (GCE) и модифицирани стъкловъглеродни повърхности с: глутаров алдехид (GA/GCE); $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4/\text{GA}/\text{GCE}$ и $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4/\text{Naf}/\text{GCE}$. Анализът на получените данни показва, че сигналът, получен с електрода - катализатор при електрохимичната редукцията на H_2O_2 и t-BHP е 4 пъти по – висок от този на немодифицирания стъкловъглерод и повече от 2 пъти по-висок от сигнала на модифицирания само с глутаров алдехид. В сравнение с електродите, модифицирани с композита $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4/\text{Nafion}$, сигналът на омрежения с глутаров алдехид $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4$, получен при еквивалентни експериментални условия е с около 3% по-нисък, което най-вероятно се дължи на разликите в пропускливостта на модифициращата фаза по отношение на анализирания пероксид.



Фигура 19. Диаграма на чувствителност на електрода, определена при постоянен потенциал от -0.2 V (vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}$, sat. KCl) за различни покрития на електрода: чист стъкловъглероден електрод GCE; покритие само от глутаров алдехид GA/GCE; покрит със слой $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4$ ($2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ диспергирани във вода) и глутаров алдехид или с покритие от композита $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4/\text{Nafion}$; $\text{pH} = 7.0$, стайна температура.

IV.2.3.1. Влияние на киселинността на средата



Фигура 20. Зависимост на чувствителността на модифициран с $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4/\text{Nafion}$ стъкловъглероден електрод от pH на работната среда; фонов електролит: фосфатен буфер ($\text{pH} = 3.0$, $\text{pH} = 5.0$ и $\text{pH} = 7.0$), сравнителен електрод $\text{Ag}|\text{AgCl}$ (sat. KCl); работен потенциал: -0.2 V vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}$.

Поради факта, че полимерът Nafion притежава свойството протонна проводимост (йонен проводник), научен интерес представлява изследване на влиянието на концентрацията на протони върху сигнала на електрода, модифициран с $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4/\text{Nafion}$. Чрез направеното изследване, установихме че 100-кратното увеличаване на концентрацията на H^+ (до $\text{pH} = 5.0$), води до почти двукратно увеличаване на чувствителността на електрода, в сравнение с тази при неутрално pH при електроредукция с водороден пероксид (Фиг. 20). Разликата в чувствителността към другия анализ, t-BHP, е още по-голяма - около 3 пъти. По-нататъшното понижаване на pH на работната среда до $\text{pH} = 3.0$ води до незначително увеличаване на скоростта на електроредукция на H_2O_2 и приблизително 30% покачване на тази на t-BHP. Неравномерната промяна на електрокаталитичната активност в изследвания pH - интервал подкрепя хипотезата за повишена проницаемост на слоя полимер-катализатор при по-ниски pH . Каталитичната активност на модифицирания електрод в процеса на електрохимична редукция на H_2O_2 е почти идентична при $\text{pH} = 3.0$ и $\text{pH} = 5.0$, което предполага по-добра пропускливост на модифициращата фаза в кисела среда. Аналогичен експеримент беше извършен със стъкловъглероден електрод, модифициран с $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4/\text{GA}$. Проведените изследвания недвусмислено показват, че свързващият агент в модифициращата фаза оказва ефект както върху чувствителността на модифицираните електроди, така и върху поведението му в среда с pH различно от неутралното. Разликите в електрокаталитичната активност на двата типа модифициращи фази свидетелстват, че протоннообменният полимер Nafion е не

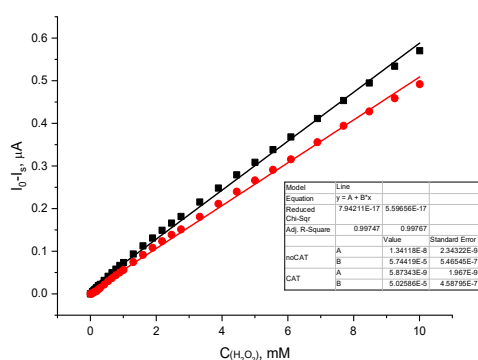
само свързващ агент в модифициращата фаза, но и съществен елемент от композита, осигуряващ по-висока каталитична активност на модифицираните електроди не само в неутрална, но и в кисела среда. Поради това, всички по-нататъшни изследвания бяха провеждани с Co-g-C₃N₄/Nafion-модифициран стъкловъглерод.

IV.2.3.2 Стабилност на модифицирания електрод

Стабилността на модифицирания електрод зависи силно от продължителността на процеса на сушене (т.е. от остатъчната влага в полимерно – композитния филм). При продължително сушене (48-72 h при стайна температура) полученият каталитичен електрод е стабилен повече от две седмици, но трябва да се извършва допълнително „активиране“ на чувствителността на електрода, която се повишава с около 15-20% след 3-4 серии от измервания. Най-вероятно това се дължи на лекото набъбване на полимерния слой, което го прави по-пропусклив за анализа. Възпроизводимостта на „активирания“ електрод е 96.5–97.0%.

IV.2.4. Приложение на разработения електрохимичен електрод-катализатор за проследяване на ензимна активност в неутрална водна среда

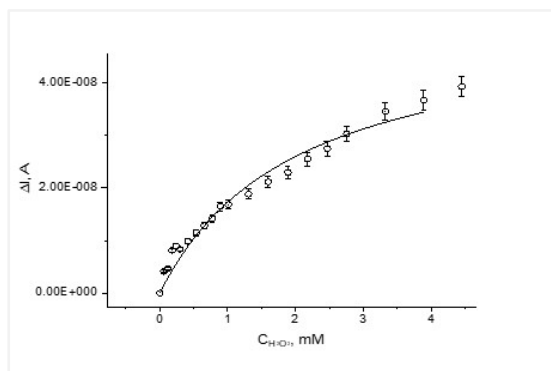
В ензимологията се използват два основни метода за проследяване на каталитичната активност на ензим каталаза, единият от които е спектрофотометричен, а другият – титриметричен. Разработеният от нас каталитичен пероксиден електрод предоставя трета алтернатива на горните два метода за проследяване на кинетиката на ензимното действие на каталазата.



Фигура 21. Зависимост на сигнала на каталитичния пероксиден електрод от концентрацията на H₂O₂ в отсъствие (черно) и в присъствие (червено) на имобилизирана каталаза.

сигналът на пероксидния каталитичен електрод е по-висок, когато в електрохимичната клетка отсъства имобилизирана каталаза. В присъствието на имобилизиран ензим (биореактор), сигналът отслабва, което се дължи на намаляване на концентрацията на водороден пероксид в разтвора вследствие протичането на ензимно-катализираното разлагане на пероксида.

На *фигура 21* е представена зависимостта на сигнала на каталитичния пероксиден електрод като функция от концентрацията на водороден пероксид в предварително деаериран разтвор с неутрално рН, при непрекъснато разбъркване. Концентрацията на пероксида се увеличава постепенно, като към работната среда са добавяни аликвотни части от свежо-приготвен разтвор на H₂O₂, който е съхраняван в ледена баня по време на измерванията, за да се избегне спонтанното му разлагане при стайна температура. По същия начин е проведен експеримента и в присъствие на имобилизирана каталаза от плесенна култура *Penicillium chrysogenum*. Изследванията показват, че



Фигура 22. Зависимост на скоростта на разлагане на водороден пероксид (I , A) от концентрацията му в присъствие на имобилизиран ензим каталаза.

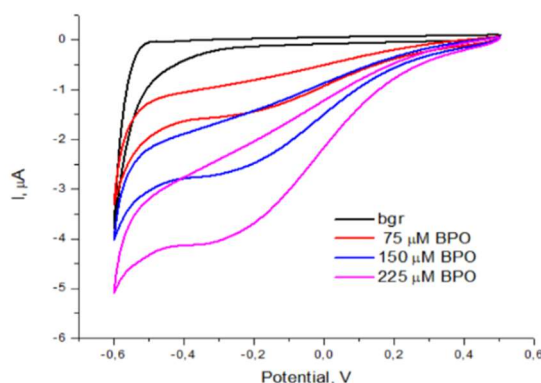
(Фиг.22). Провеждането на паралелно спектрофотометрично изследване свидетелства, че в сравнение с константата на Михаелис, определена при хетерогенно-каталитичното разлагане на H_2O_2 , се наблюдава известно увеличаване на стойността на привидната Михаелисова константа, което може да бъде обяснено с нарасналите дифузионни ограничения. Ниската максимална скорост на реакцията се дължи на изключително малкото количество ензим, което е имобилизирано върху твърдия носител $\sim 1.6 \mu g$. След преизчисляване на ензимната активност въз основа на получените зависимости, активността на имобилизираната каталаза беше намерена, че е: $102.15 U/mg$, т.е. наблюдава се двукратно понижение на активността на ензима вследствие на имобилизацията.

Получените резултати свидетелстват, че електрохимичните методи (като напр. амперометрична детекция при постоянен потенциал) могат да бъдат използвани като алтернативни на класическите – спектрофотометричен и титриметричен методи, за определяне на ензимната активност, а получените резултати са без аналог досега в описаните в научната литература.

IV.3. Електрокаталитична активност на модифициран Co-g-C₃N₄/Nafion електрод в неводна среда

Електрохимичното поведение на модифицирания с Co-g-C₃N₄/Nafion електрод е изследвано в среда от апротонен органичен разтворител ацетонитрил (ACN), като за повишаване електропроводимостта е добавен инертния електролит 0.1 M тетрабутил амониев перхлорат (TBAClO₄). На *Фигура 23* са представени цикличните волтамперни криви, снети върху електрода-катализатор в отсъствие и в присъствие на бензоилпероксид (BPO). Получените зависимости свидетелстват, че при добавяне на порции от разтвор на BPO към електролитния разтвор в клетката протича електрохимична редукция на пероксида. При обратния ход на цикличните волтамперни криви, получени в присъствие на бензоилпероксид се наблюдава редукционна вълна, започваща при потенциал 0.3 V (vs. Ag|Ag+ псевдо-сравнителен електрод) и достигаща до пикова стойност при -0.2 V, която при по-нататъшно изменение на потенциала в отрицателна посока преминава във втора вълна на редукция, която не се наблюдава на цикличните волтампереграми, получени в де-аерирана среда. С увеличаване на концентрацията на бензоилпероксид, редукционният максимум се измества постепенно към по-отрицателни потенциали. Получените поляризационни зависимости дават основание да се предположи, че е възможно

количественото определяне на органичния пероксид посредством хроноамперометрия при постоянен работен потенциал от -0.2 V , въз основа на калибровъчна графика.

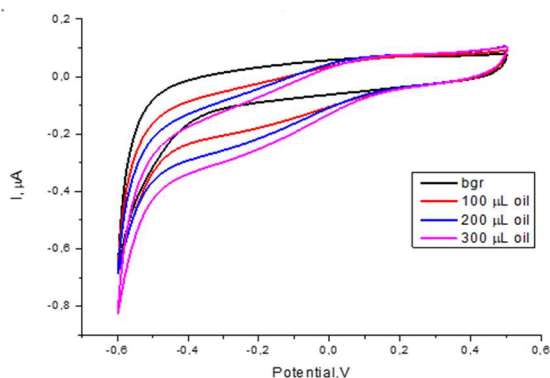


Фигура 23. Циклични волтампърни криви, снети върху $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4/\text{Nafion}/\text{GCE}$ в отсъствие и присъствие на BPO/ACN ; фонов електролит $0.1\text{ M TBAClO}_4/\text{ACN}$, сравнителен електрод $\text{Ag}|\text{Ag}^+$; скорост на сканиране $20\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Експериментите, проведени при постоянен потенциал -0.2 V (vs. $\text{Ag}|\text{Ag}^+$) с метода хроноамперометрия показаха, че токът на редукция се изменя стъпаловидно при добавяне на порции от пероксида, като достига стационарни стойности в рамките на 10 секунди. Установено бе, че зависимостта на сигнала от концентрацията на пероксида е линейна до концентрация $50\text{ }\mu\text{M}$ и по-висока. Трябва да се отбележи, че при ниски концентрации (до около $2\text{ }\mu\text{M}$) се наблюдава отклонение от линейността, което вероятно се дължи на ниските стойности на сигнала на електрода при тези концентрации, което на свой ред води до допускане на голяма грешка при отчитането му.

IV.3.1. Приложение на електрода – катализатор в неводна среда

Въз основа на получените резултати, каталитичният пероксиден електрод беше използван за определяне на концентрацията на пероксиди в реална проба – силно окислено растително масло (антицелулитно масажно масло).

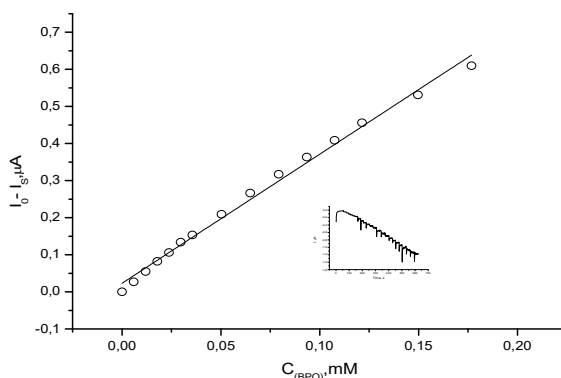


Фигура 24. Циклични волтампърни криви, снети върху $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4/\text{Nafion}/\text{GCE}$ в отсъствие и присъствие на масло/ CHCl_3 ; фонов електролит $0.1\text{ M TBAClO}_4/\text{ACN}$, сравнителен електрод $\text{Ag}|\text{Ag}^+$; скорост на сканиране $20\text{ mV}/\text{s}$

Електрохимичното поведение на електрода – катализатор при добавяне на антицелулитно масло разтворено в хлороформ (CHCl_3) е изследвано с оглед проучване на възможността за определяне на пероксиди в пробата при вече установените експериментални условия. Цикличните волтампърни криви наподобяват по вид получените при изследване поведението на каталитичния електрод в присъствие на моделния органичен пероксид BPO - добавянето на аликвоти от разтвора на реалната проба към работната среда, води до изразена редукционна вълна, започваща още при потенциал от 0.18 V и достигаща до плато в интервала -0.2 V до -0.4 V (Фиг. 24). Наличието на тази редукционна вълна ни

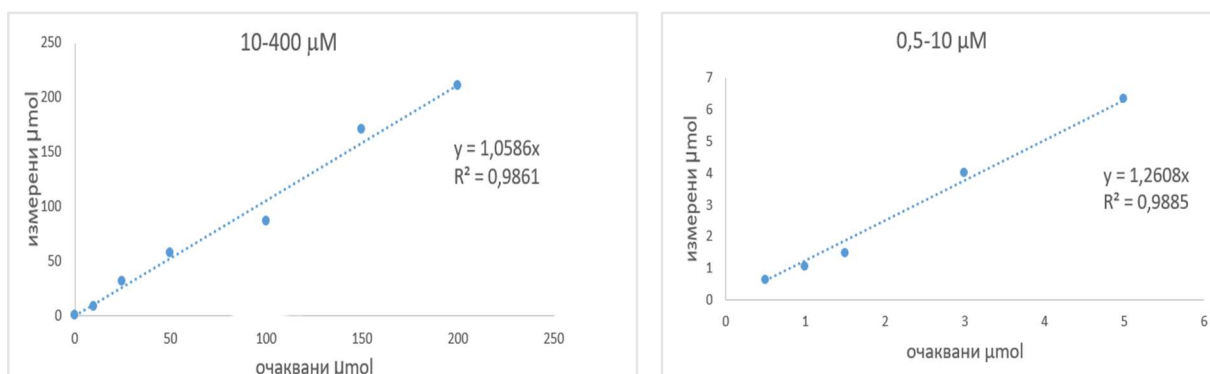
даде основание за построяване на калибровъчна графика, която да бъде приложима при определяне на количеството органични пероксиди в реалната проба.

Хроноамперометричните измервания са проведени (Фиг. 25, вътре) при постоянен потенциал $-0.2V$ (vs. $Ag|Ag^+$) при добавяне на аликвотни части от стандартния разтвор за калибриране на пероксидния електрод, въз основа на което е построена калибровъчна графика, показваща линейна зависимост на сигнала от концентрацията на ВРО с коефициент на корелация 0.993 . С оглед отчитането на влиянието на матрицата на реалната проба, стандартният $0.003 M$ разтвор на ВРО беше разтворен в хлороформ, към който е добавяно по $0.4 g$ неокислено масло. При всяко измерване, концентрацията на пероксид в реалната проба, беше съпоставяно с измереното по БДС пероксидно число на тези проби.



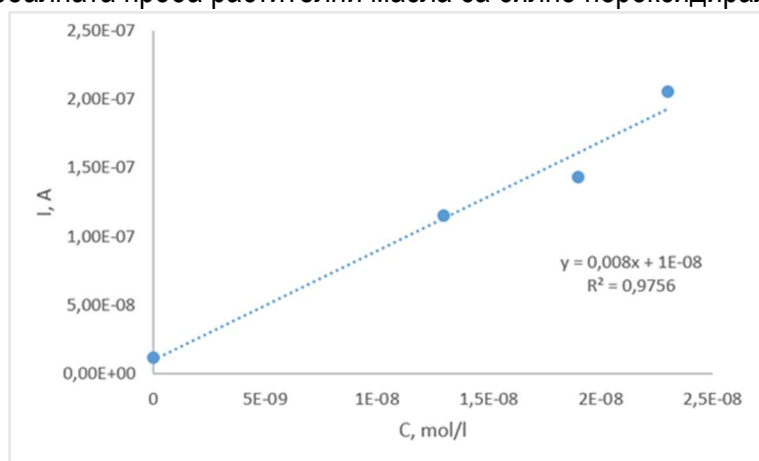
Фигура 25. Хроноамперометричен запис (вътре) и калибровъчна графика на електрод, модифициран с $Co-g-C_3N_4/Nafion$ при добавяне на аликвоти от $0.003M$ ВРО (в $CHCl_3$ /масло); фонов електролит: $0.1 M TBAClO_4/ACN$, сравнителен електрод $Ag|Ag^+$; потенциал: $-0.2 V$.

Експерименталните резултати, получени при изследването на проби с позната концентрация на пероксиди в диапазона от високи (10 до $400 \mu M$) и ниски (0.5 до $10 \mu M$) концентрации са представени на Фигура 26. На база експериментите, проведени при постоянен работен потенциал $-0.2V$ (vs. $Ag|Ag^+$), са изчислени (в микромолове O_2) концентрациите на пероксиди в реалната проба. Получените резултати свидетелстват за добро съвпадение на експериментално определените стойности с теоретично изчислените, при това с висок коефициент на корелация (съотв. $R^2 = 0.9861$ и $R^2 = 0.9885$).



Фигура 26. Измерени спрямо очаквани количества на O_2 в реална маслена проба, обогатена с пероксиди в широк ($10-400\mu M$) и тесен ($0.5-10 \mu M$) диапазон от концентрация.

Въз основа на получените зависимости, беше определено и пероксидното число (ПОЧ) на реалната проба, съдържаща смес от лесно-окисляеми растителни масла (антицелулитно масажно масло). На Фигура 27 са представени резултатите от определяне на степента на пероксидация на реалната проба по метода на стандартната добавка. Съгласно този метод, отрезът на калибровъчната права съответства на сигнала на реалната проба. Разделяйки този сигнал на наклона на правата, получаваме, че концентрацията на пероксиди в електрохимичната клетка е $1,25 \cdot 10^{-6}$ M. След преизчисляване, взимайки под внимание разреждането и масата на взетата реална проба, получаваме, че реалната проба съдържа 276 μmol пероксиди, което съответства на ПОЧ = 739.75 meq/kg. Изводът, който можем да направим от получената стойност на ПОЧ е, че съдържащите се в реалната проба растителни масла са силно пероксидирани.



Фигура 27. Зависимост на измерения с каталитичния електрод сигнал при добавяне на стандартен разтвор на пероксид (ВРО) от концентрацията на пероксида в електролизната клетка. Правата е получена чрез разтваряне на точно количество ВРО в хлороформ, към който е добавена реалната проба.

V. ИЗВОДИ

Дискутираните дотук експериментални резултати могат да бъдат обобщени както следва:

- Получен е електрохимичен биосензор на базата на стъкловъглерод модифициран чрез електрохимично отлагане на златни наноструктури и ковалентно свързана към тях лакказа, при което е установено, че:
 - Електрохимично-достъпната повърхност на модифицираните със златни отложения стъкловъглеродни електроди е с 51% по-голяма, когато за модифициране се използва потенциодинамична процедура 2 (стартираща от -0,6 до 0 V и обратно) за отлагане и разтвор на тетрахлоорауратните йони с концентрация 50 mM; повърхностната морфология на депозитите се характеризира с наличието на микро-порести образувания;
 - Лакказата проявява електрохимична активност в имобилизирано състояние: в отсъствие на кислород се наблюдават окислително-редукционни пикове на ензима, а в присъствие на кислород се наблюдава редукционна вълна; изследванията с диференциална импулсна волтаперометрия показват наличие на пик в отсъствие на субстрат, като тока на пика нараства при добавяне на субстрат допамин в концентрационния интервал от 2 до 40 μM .

Констатирано е, че със субстрат епинефрин такава зависимост не се наблюдава;

- Количественото определяне на катехоламините допамин и епинефрин се извършва с метода амперометрия при постоянен потенциал $-0.1V$ и се характеризира с граница на откриване от $0.037 \mu M$ за допамин и $0.054 \mu M$ L-епинефрин и много добра аналитична производителност по отношение на чувствителност; привидните константи на Михаелис се различават за двата субстрата, за допамин е два пъти по-малка в сравнение с тази на адреналина, което доказва, че структурата на субстрата оказва влияние на взаимодействието му с ензима;
 - Присъствието на L-аскорбинова киселина в изследваната проба влияе на отговора на ензимния електрод към всеки от катехоламините; при работен потенциал $0 V$ сигналът се увеличава с 0.8% за допамин и 1.1% за L-епинефрин; при работен потенциал $-0.1 V$, наличието на L-аскорбат увеличава отклика на ензимния електрод към допамин с 1.4% и с 2.2% към L-епинефрин;
 - Границите на откриване и границите на количествено определяне на двата субстрата са в суб-микромоларния диапазон, което прави ензимния електрод потенциално приложим в биологични течности. Приложимостта му е доказана с количествено определяне на допамин и L-епинефрин в ампули с инжекционен разтвор, като анализът за допамин показва стойности от $41.2 \pm 1.5 \text{ mg.mL}^{-1}$ и 0.948 mg.mL^{-1} за адреналин; аналитичният добив за допамин се изменя в рамките от 99% до 106% и от 95 до 105% за адреналин.
2. Получени са модифицирани електроди на базата на стъкловъглерод, модифициран с различен катализатор: g-C₃N₄, Co-Mg-g-C₃N₄, Co-Bi₂-g-C₃N₄, Co-g-C₃N₄ и Co₃O₄ диспергиран в полимер Nafion, като са определени електрохимично достъпните повърхности, при което е установено, че:
- В процеса на електрохимична редукция на водороден пероксид и третичен бутилхидропероксид най-висока електрокаталитична активност проявява електрода модифициран с Co-g-C₃N₄ и Nafion. Определен е оптималният състав на модифициращата фаза – 2 mg/ml катализатор и 0.2% полимер; електродната чувствителност е най-висока при приложен постоянен потенциал $-0.2 V$ (vs. Ag|AgCl, sat. KCl);
 - Високата електрокаталитична активност на модифицирания електрод, е резултат от синергичния ефект на двата компонента, съставлящи модифициращата фаза – катализатора Co-g-C₃N₄ и йономера Nafion, което определя системата като композит. Полимерът Nafion е съществен елемент в композитната фаза, осигуряващ висока каталитична активност на модифицираните електроди при електрохимичната редукция на хидропероксидите не само в неутрална, но и в кисела среда; стабилността на модифицирания електрод зависи силно от остатъчната влага в композитния филм;
 - Разработеният пероксиден електрод е приложим за определяне на ензимна активност на каталаза в неутрална среда, а получените резултати са без аналог досега в описаните в научната литература.

3. Изследвана е електрокаталитичната активност на разработения електрод-катализатор в среда от апротонен органичен разтворител ацетонитрил по отношение на бензоилпероксид, при което е установено, че:
 - При постоянен потенциал -0.2 V (vs. $\text{Ag}|\text{Ag}^+$) зависимостта на сигнала на каталитичният пероксиден електрод от концентрацията на анализа бензоилпероксид е линейна до концентрация $50\ \mu\text{M}$;
 - Показана е приложимостта на електрода-катализатор за определяне на концентрация на пероксиди в реална проба – силно окислена смес от растителни масла и е определено пероксидното число на реалната проба.

Разработеният на базата на каталитичния пероксиден електрод аналитичен метод притежава значителен потенциал да бъде използван като алтернативен на титриметричните методи за определяне на пероксидно число на растителни масла.

СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИТЕ, ВКЛЮЧЕНИ В ДИСЕРТАЦИЯТА

Публикации в реферирани и индексирани издания:

1. 2D Nanomaterial—Based Electrocatalyst for Water Soluble Hydroperoxide Reduction. Pimpilova M, Ivanova-Kolcheva V, Stoyanova M, Dimcheva N.; Catalysts. 2022 vol. 12 no. 8 p.807. IF: 4.501; JCR - Q2 (Chemistry, Physical) / CiteScore - Q1 (General Environmental Science) doi: 10.3390/catal12080807
2. Biosensing dopamine and L-epinephrine with laccase (*Trametes pubescens*) immobilized on gold modified electrode Mariya Pimpilova, Kalina Kamarska, Nina Dimcheva, Biosensors 2022 vol. 12, no. 9 p. 719, IF:5.4; JCR - Q1 (Chemistry, Analytical) / CiteScore - Q1 (Engineering (miscellaneous)) doi: 10.3390/bios12090719

Заявка за патент за изобретение:

1. „Електрохимичен метод за количествено определяне на пероксидни съединения“ с автори В. Колчева, Н. Димчева, М. Стоянова, М. Пимпилова. Заявка за патент за изобретение № BG|P|2023|113803, регистрирана в Патентно ведомство на Република България на 27.10.2023 г.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Постери:

1. М. Пимпилова, Н. Димчева, „Модифициране на електродни материали с Pd, Pt и Au“, Пета научна конференция за студенти, докторанти и млади учени "Предизвикателства в Химията", 22-23 ноември 2019г., ПУ "Паисий Хилендарски" гр. Пловдив, България.
2. Mariya Pimpilova, Vanina Kolcheva, Maria Stoyanova, Nina Dimcheva, „Investigation of the catalytic activity of immobilized catalase (*Penicillium chrysogenum* 245) using an electrochemical peroxide sensor“, Софийски електрохимични дни (СЕД2022) национална конференция с международно участие, 12 – 14 май 2022г., гр. София, България.
3. Мария Пимпилова, Нина Димчева, Калина Камарска, „Модифициране на електродни материали с Au“, VI Научна конференция за студенти и докторанти "Предизвикателства в химията", 7-8 октомври 2022г., ПУ "Паисий Хилендарски", гр. Пловдив, България.

4. Angel Peshkov, Mariya Pimpilova, Iliya Iliev, Nina Dimcheva, *“Electrochemical approach for the monitoring of immobilized catalase activity”*, Novel enzymes 2023, March 28-31, 2023, Greifswald, Germany.

Доклади:

1. Мария Пимпилова, Ванина Иванова – Колчева, Мария Стоянова, Нина Димчева, *„Разработване на нов $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-g-C}_3\text{N}_4$ - NAFION™ композитен катализатор за електрохимична редукция на пероксидни съединения във водна среда“*, XIX Национална конференция по химия за студенти и докторанти, 2 – 4 юни 2021г., СУ „Св. Климент Охридски“ гр. София, България.
2. Nina Dimcheva, Mariya Pimpilova, Vanina Kolcheva, Maria Stoyanova *„Development of novel $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-g-C}_3\text{N}_4$ – Nafion™ composite catalyst for electrochemical reduction of peroxide compounds“*, 3RD Virtual Congress on Materials Science & Engineering: Outlining the Importance of Materials Science for a Better Future; SEP 27 - OCT 01, 2021.
3. Мария Пимпилова, Ванина Иванова – Колчева, Мария Стоянова, Нина Димчева, *„Сравнително изследване на електрокаталитична активност на $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4$ модифициран електрод – катализатор за електрохимична редукция на пероксидни съединения във водна среда“*, XX Национална конференция по химия за студенти и докторанти, 18 – 20 май 2022г., СУ „Св. Климент Охридски“ гр. София, България.

НАУЧНИ И НАУЧНОПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

1. Успешно е разработен електрохимичен биосензор, с който може да се определя количествено допамин с помощта на две различни електрохимични техники - диференциална импулсна волтаметрия и амперометрия с постоянен потенциал, като последната е подходяща и за анализ на L-епинефрин.
2. Демонстрирано е практическото приложение на лакказният електрод за количествен анализ на допамин и L-епинефрин в ампули от инжекционен разтвор.
3. За първи път експериментално е доказан електрокаталитичен ефект на $\text{Co-g-C}_3\text{N}_4$ в комбинация с проводим полимер Nafion при електрохимична редукция на водороден пероксид и третичен бутилхидропероксид в широк диапазон от концентрации от 0.4 до 14 mM.
4. Разработеният пероксиден електрод е приложен за определяне на ензимна активност на каталаза в неутрална среда, а получените резултати са без аналог досега в описаните в научната литература.
5. Представен е електроаналитичен метод като алтернативен на титриметричните методи за определяне на пероксидно число на растителни масла на базата на каталитичния пероксиден електрод.

Благодарности: Проект към МОН КП – 06- Н39/8 „Хемо – ензимен катализ в неводна среда“ (2019/2024) и "Персонализирана иновативна медицина - ПЕРИМЕД" (ОП "Наука и образование за интелигентен растеж" дог. № BG05M2OP001-1.002-0005-C01). (2019/2023).