



**УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО
СКОПЈЕ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
Институт за хемија**



Павлинка Љубчо Кокошкарова

**ЕЛЕКТРОХЕМИСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА КРВЕН
СЕРУМ СО ПРИМЕНА НА СОВРЕМЕНИ ВОЛТАМЕТРИСКИ
ТЕХНИКИ**

Докторски труд

Скопје, 2025

Докторанд:
ПАВЛИНКА ЛЈУБЧО КОКОШКАРОВА

Тема:
ЕЛЕКТРОХЕМИСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА КРВЕН СЕРУМ СО
ПРИМЕНА НА СОВРЕМЕНИ ВОЛТАМЕТРИСКИ ТЕХНИКИ

Комисија за одбрана:

Проф. д-р Валентин Мирчески, редовен професор на
Природно-математички факултет, УКИМ, Скопје (ментор)

Проф. д-р Рубин Гулабоски, редовен професор на Факултет
за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип
(претседател)

Проф. д-р Татјана Рушковска, редовен професор на
Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце
Делчев“, Штип (член)

Проф. д-р Слоботка Алексовска, редовен професор на
Природно-математички факултет, УКИМ, Скопје (член)

Проф. д-р Наташа Ристовска, редовен професор на
Природно-математички факултет, УКИМ, Скопје (член)

Научна област:
Хемија

Датум на одбрана: 17. 01. 2025
Павлинка Љубчо Кокошкарва

ЕЛЕКТРОХЕМИСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА КРВЕН СЕРУМ СО ПРИМЕНА НА СОВРЕМЕНИ ВОЛТАМЕТРИСКИ ТЕХНИКИ

- А п с т р а к т -

Резултатите елаборирани во оваа дисертација претставуваат сеопфатна волтаметричка студија, дизајнирана со цел да се направи електрохемишка карактеризација на хуман серум растворен во фосфатен пуфер, без дополнителен предтретман на примерокот. Со употреба на квадратно-бранова волтаметрија (анг. square-wave voltammetry, SWV) како работна техника, на електрода изработена од странично ориентиран пиролизичен графит (анг. edge plane pyrolytic graphite electrode, EPPGE), истражувањата во оваа дисертација создадоа основа за развој на едноставен метод за детекција и квантификација на урична киселина, билирубин и албумин во хуман серум, што е многу важно во подрачјето на медицинската дијагностика. Електрохемискиот протокол се базира на специфичните структурни карактеристики на EPPGE, како и на електрохемиските и адсорпциските својства на анализите што се цел на студијата. Притоа, сензитивноста и брзината на применетата волтаметричка техника се од суштинско значење за успешноста на целокупната развиена методологија во дисертацијата. Во рамките на дисертацијата, покрај детекција на електрохемиски активни супстанции од хуман серум и увид во нивните електрохемиски својства, дополнително беа дизајнирани експерименти што придонесоа за воочување на потенцијалните интерферентни соединенија присутни во хуманиот серум, кои можат да влијаат врз волтаметриските сигнали на урична киселина, билирубин и албумин. Дополнително, беше истражуван потенцијалот за можни меѓусебни интеракции помеѓу испитуваните аналити. Влијанието на матрицот на хуманиот серум врз волтаметриското однесување на студираните аналити беше детално проучено, со цел да се добие увид во механизмот на нивната електрохемишка трансформација. За сите аналити се конструирани калибрациски криви преку зависноста на интензитетот на струјата на соодветните волтаметриски пикови како функција од концентрацијата на испитуваните аналити присутни во електрохемиската ќелија. Развиената волтаметричка методологија беше успешно применета за квантификација на испитуваните аналити (урична киселина, билирубин и албумин) во серија примероци од хуман серум. Притоа, добиените резултати беа споредени со резултатите добиени со примена на стандардни клиничко-биохемиски методи. Перформансите на развиениот биосензор во оваа дисертација беа проценети преку соодветна статистичка анализа. Методолошкиот пристап елабориран во дисертацијата може да се гледа како основа за развој на специфични point-of-care (POC) системи, наменети за брза и симултана анализа на урична киселина, билирубин и албумин во хуман серум.

Клучни зборови: хуман серум, електрохемија, волтаметрија, биосензор, електрода од странично ориентиран пиролизичен графит.

Pavlinka Ljubcho Kokoshkarova

ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF BLOOD SERUM USING MODERN VOLTAMMETRIC TECHNIQUES

-A b s t r a c t-

The results elaborated in this thesis present a voltammetric investigation into a comprehensive electrochemical characterization of label-free human blood serum in a phosphate buffer using an unmodified graphite electrode via voltammetry. Utilizing advanced square-wave voltammetry (SWV) as a working technique at an edge plane pyrolytic graphite electrode (EPPGE), this research establishes foundational principles for a sensitive, rapid, simple, and label-free method for the simultaneous detection of uric acid, bilirubin, and albumin analytes in human blood serum. The electrochemical protocol leverages the specific structural features of the EPPGE, the inherent redox and adsorption properties of the analytes, and the sensitivity and speed of the employed advanced voltammetric technique. A comprehensive study was conducted to assess potential interfering compounds present in human serum that could affect the voltammetric signals of uric acid, bilirubin, and albumin. Additionally, the investigation explored the possible mutual interferences between the analyte molecules under study. The impact of the matrix of the human serum on the voltammetric behavior of the studied analytes was also examined to gain insights into the underlying mechanisms. Calibration curves were constructed for all three analytes, and the methodology was successfully applied to quantify the target analytes (uric acid, bilirubin and albumin) in a series of human blood serum samples. The results were compared with those obtained from standard clinical biochemical laboratory methods. The performances of the developed biosensor were evaluated through appropriate statistical analysis. This novel approach signifies an important progression toward the development of point-of-care devices for the rapid and simultaneous quantification of uric acid, bilirubin, and albumin levels in human serum.

Keywords: human serum, electrochemistry, voltammetry, biosensor, edge plane pyrolytic graphite electrode.

Благодарност

На крајот на овој истражувачки пат (крај на овој, но почеток на следниот), сакам да ја изразам својата искрена благодарност на сите оние кои придонесоа за реализација на овој труд.

Пред сè, сакам да се заблагодарам на мојот ментор проф. д-р Валентин Мирчески, чија стручност, посветеност и постојана поддршка беше незаменлива во секој чекор на моето истражување. Неговите совети, насоки и визија ми помогнаа да ја обликувам и развијам оваа дисертација.

Исто така, сакам да се заблагодарам на членовите на мојата комисија, проф. д-р Рубин Гулабоски, проф. д-р Татјана Рушковска, проф. д-р Слоботка Алексовска и проф. д-р Наташа Ристовска, кои со своите сугестии и позитивни критики значајно придонесоа за квалитетот на овој труд.

Благодарност до деканката на Факултетот за медицински науки при УГД Штип, до менаџментот на УГД Штип и Министерството за образование и наука за поддршката сите овие години.

Огромна благодарност до деканката Sławomira Skrzypek од Универзитетот во Лоѓ, Полска, која отвори нов прозорец во мојата истражувачка работа.

Благодарност до сите мои колеги, посебно до Викторија Цацкова, Марјан Карашов и ас. м-р Леон Стојанов кои несебично придонесоа за напредокот на ова истражување.

Благодарност до моето семејство, кое ме поддржуваше во тек на сите предизвици, кое обезбеди доволно љубов и сила да издржам во текот на овој долг и макотрпен процес. Без нивната стрпливост и охрабрување, овој труд немаше да биде ваков каков што е.

На крај, целиот овој труд е за оние кои искрено и длабоко во себе веруваа дека

ЈАС МОЖАМ И УМЕАМ.

Изјавувам дека електронската верзија на докторскиот труд е идентична со отпечатениот докторски труд.

Потпис на авторот, с.р

СОДРЖИНА

1.	ВОВЕД.....	11
2.	ВОЛТАМЕТРИЈА.....	13
2.1.	Вовед во волтаметриските техники.....	13
2.2.	Важни дефиниции во волтаметриските техники.....	16
2.3.	Краток опис на инструментацијата што се користи во волтаметриските експерименти	18
2.4.	Краток преглед на некои важни дефиниции во циклична волтаметрија	19
2.5.	Пулсни волтаметриски техники.....	25
2.6.	Квадратно-бранова волтаметрија	26
3.	ВОЛТАМЕТРИСКИ БИОСЕНЗОРИ	30
3.1.	Основни дефиниции за волтаметриските биосензори	30
3.2.	Електрохемиски сензори дизајнирани за детекција на урична киселина	32
3.3.	Електрохемиски сензори дизајнирани за детекција на билирубин	33
3.4.	Електрохемиски сензори дизајнирани за детекција на албумин	34
3.5.	Волтаметриски сензори дизајнирани за детекција на урична киселина и билирубин присутни во хуман серум	35
4.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ УСЛОВИ	38
4.1.	Статистичка анализа: Некои основни поими и дефиниции	39
4.2.	Согласност од етичка комисија.....	43
5.	ФИЗИОЛОШКИ И БИОХЕМИСКИ СВОЈСТВА НА УРИЧНА КИСЕЛИНА, БИЛИРУБИН И АЛБУМИН	44
6.	КРАТОК ПРЕГЛЕД НА РАБОТНИ ЕЛЕКТРОДИ ВО ВОЛТАМЕТРИЈА ШТО СЕ ДИЗАЈНИРАНИ СО ОБРАБОТКА НА ЈАГЛЕРОД	51
6.1.	Електрохемиски својства на EPPGE.....	52
7.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	53
7.1.	Циклична волтаметрија на хуман серум	53
7.2.	Квадратно-бранова волтаметрија на хуман серум	57
7.3.	Асигнација на електродните процеси во квадратно-брановите волтамограми при анализа на хуман серум	61
7.4.	Механизми на електродна трансформација на урична киселина, билирубин и албумин	65
	в) Механизам на електрохемиска оксидација на албумин	68

7.5. Атсорптивни својства на урична киселина, билирубин и албумин	69
7.6. Атсорптивни својства на урична киселина, билирубин и албумин присутни во хуман серум, во волтаметриски анализи со примена на EPPGE работна електрода	71
7.7. Влијание на фреквенцијата на потенцијалниот сигнал во SWV врз својствата на волтаметриските одговори на урична киселина, билирубин и албумин во хуман серум	73
7.8. Влијание на матрицот на хуманиот серум врз електрохемиската трансформација на испитуваните анализи присутни во хуман серум	76
8. ОПТИМИЗАЦИЈА НА ИНСТРУМЕНТАЛНИТЕ ПАРАМЕТРИ ЗА АНАЛИТИЧКИ ЦЕЛИ ПРИ ВОЛТАМЕТРИСКО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА УРИЧНА КИСЕЛИНА, БИЛИРУБИН И АЛБУМИН ВО ХУМАН СЕРУМ	87
9. ВЛИЈАНИЕ НА ИНТЕРФЕРЕНТНИ СУПСТАНЦИ ВРЗ ЕЛЕКТРОХЕМИСКИТЕ ПРОЦЕСИ ОД УРИЧНА КИСЕЛИНА, БИЛИРУБИН И АЛБУМИН ПРИ ВОЛТАМЕТРИСКИ АНАЛИЗИ НА ХУМАН СЕРУМ	89
10. КОНЦЕНТРАЦИСКИ ЗАВИСНОСТИ НА ИНТЕНЗИТЕТОТ НА ВОЛТАМЕТРИСКИТЕ ОДГОВОРИ ОД УРИЧНА КИСЕЛИНА, БИЛИРУБИН И АЛБУМИН: КОНСТРУКЦИЈА НА КАЛИБРАЦИСКИ КРИВИ	93
11. АНАЛИТИЧКА АПЛИКАЦИЈА НА ВОЛТАМЕТРИСКАТА МЕТОДОЛОГИЈА ЗА ДИРЕКТНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА УРИЧНА КИСЕЛИНА, БИЛИРУБИН И АЛБУМИН ВО ХУМАН СЕРУМ	95
12. ЗАКЛУЧОЦИ	96
13. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА.....	99
14. ПРИЛОЗИ	105
15. ПУБЛИКУВАНИ ТРУДОВИ.....	127

СПИСОК НА СКРАТЕНИЦИ

ALB	Albumin	Албумин
BCG	Bromocresol green	Бром крезол зелено
BDDE	Boron doped diamond electrode	Електрода од дијамант со примеси на бор
BLR	Bilirubin	Билирубин
BPPGE	Basal plane pyrolytic graphite electrode	Електрода од челно ориентиран пиролитичен графит
CE	Counter electrode	Помошна електрода
CPE	Carbon paste electrode	Електрода од јаглеродна паста
CV	Cyclic voltammetry	Циклична волтаметрија
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Диметилсулфоксид
DPV	Differential pulse voltammetry	Диференцијална пулсна волтаметрија
$E_{p,a}$	Anodic peak potential	Потенцијал на анодниот пик
$E_{p,c}$	Cathodic peak potential	Потенцијал на катодниот пик
$E_{1/2} (E_{mid})$	Mid-peak potential	Потенцијал што се наоѓа на средина помеѓу анодниот и катодниот пик
EPPGE	Edge plane pyrolytic graphite electrode	Електрода од странично ориентиран пиролитичен графит
ΔE	Step potential	Потенцијален чекор
E_{sw}	SW amplitude	Квадратно-бранова амплитуда
f	Frequency	Фреквенција
GCE	Glassy carbon electrode	Електрода од стаклест јаглерод
HOPG	Highly ordered pyrolytic graphite	Високо подреден пиролитичен графит
HPLC	High pressure liquid chromatography	Течна хроматографија со висок притисок
$I_{p,a}$	Anodic peak current intensity	Интензитет на струјата на анодниот пик
$I_{p,c}$	Cathodic peak current intensity	Интензитет на струјата на катодниот пик
LOD	Limit of detection	Граница на детекција
LOQ	Limit of quantification	Граница на квантификација
MWCNT	Multi walled carbon nanotubes	Јаглеродни наноцевки со повеќе ѕидови
POC	Point-of-care	Тест за директна примена
RE	Reference electrode	Референтна електрода
ROS	Reactive oxygen species	Реактивни кислородни честички
RSD	Relative standard deviation	Релативна стандардна девијација
ν	Scan rate	Брзина на промена на потенцијалот
SD	Standard deviation	Стандардна девијација
SPCE	Screen printed carbon electrode	Површински отпечатена електрода
SWV	Square-wave voltammetry	Квадратно-бранова волтаметрија
UA	Uric acid	Урична киселина
WE	Working electrode	Работна електрода

1. ВОВЕД

Во денешно време, еден од предизвиците на модерната медицина е секако откривањето на нарушувањата и болестите уште во рана фаза, што овозможува зголемување на шансите за да се излечат пациентите, а со тоа, и да се намалат трошоците за лекување. За реализација на ова, потребно е да се развијат методи и протоколи за ефикасна замена на лабораториските анализи кои вклучуваат скапа апаратура и искусни аналитичари, со имплементација на таканаречени point-of-care уреди [1]. РОС - уредите во суштина се мали електрични системи што овозможуваат брза и евтина дијагноза, што се реализира со спроведување на биохемиски анализи во непосредна близина на самиот пациент. Еден од најголемите предизвици со кој се соочуваат истражувачите кои работат на дизајнирањето на овие РОС - уреди е добивање на веродостојни резултати за кратко време (од неколку секунди до неколку минути), преку спроведување на протокол што ќе биде изведен без примена на предтретман на примероците за анализа.

Ваквиот тип на РОС - уреди треба да бидат мали, едноставни за употреба, специфични и да даваат точни резултати. Овие карактеристики на РОС - уредите се неопходни, за да им овозможат на медицинските лица да донесат брзи клинички одлуки што ќе придонесат за подобрување на третманот на пациентите. Биосензорите, во суштина се основа за дизајнирање на РОС - уредите. Биосензорите најчесто се дефинираат како интегрирани аналитички системи што користат „елемент“ за специфично препознавање на аналитот, кој е подложен на дефинирана хемиска реакција, како и трансдукциски механизам што е електричен систем способен да го претвори хемискиот сигнал во мерлив електричен параметар. Биосензорите во денешно време наоѓаат голема примена во клиничката медицина, пред сè поради нивната висока селективност, осетливост, брзина на добивање одговор и ниска цена [2]. Во случаи кога како трансдуктори се користат соодветно дизајнирани електроди, што овозможуваат претворање на сигналот предизвикан од хемиската реакција во електричен сигнал, тогаш таквите системи се нарекуваат електрохемиски сензори (или електрохемиски биосензори) [3, 4]. Во принцип, електрохемиските биосензори детектираат и мерат електрични сигнали што се производ на електрохемиски промени што се случуваат на границата електрода-раствор. Овие електрохемиски промени се резултат на хемиската реакција на таргетируваниот аналит со т.н. „елемент за препознавање“. Овој „елемент за препознавање“ е некоја специфична молекула што е најчесто адсорбирана/имобилизирана на површината од работната електрода и е способна да стапи во хемиска реакција само со молекулите од дефиниран аналит (строго специфична). Во електрохемиските биосензори, како трансдуктори се користат сензорни (или работни) електроди, а тоа најчесто се некои типови на јаглеродни или метални електроди. Многу често, површината на овие работни електроди е подложна на разни површински модификации. Електрохемиските техники што главно се користат во електрохемиските сензори се амперометрија, потенциометрија, волтаметрија, кондуктометрија или фотоелектрохемија. Наноматеријалите, пак, се хемиски системи што најчесто се користат за модификација на работните електроди.

Јаглеродните наноцевчиња и наночестички од графен, главно се користат за зголемување на активната површина за имобилизација на биорецепторите, како и за овозможување побрз пренос на електрони помеѓу работната електрода и испитуваниот аналит, што пак резултира со подобрување на осетливоста, опсегот на детекција и времето на реакција на сензорот. Правилното функционирање на електрохемиските биосензори во

голема мера зависи од комплексноста на примерокот што се анализира. Притоа, кога се работи за анализа на примероци што содржат големи липофилни молекули (липиди, протеини), голема е веројатноста овие молекули да се адсорбираат на површината од работните електроди на електрохемискиот биосензор. Одвивањето на вакви физички феномени на површината од работните електроди секако ќе има влијание и врз перформансите на електрохемискиот биосензор.

Крвниот хуман серум е комплексен медиум што најчесто се употребува во клиничко-биохемиските анализи. Иако постојат голем број на електрохемиски студии што се изведени за разни типови на анализи во хуман серум, најголем дел од тие студии се базирани на ензимски реакции, со примена на работни електроди што најчесто се модифицирани со некои типови на наночестички, или со комбинација од полимери и наночестички. Неодамна, од групата на професорот Мирчески беше покажано дека со примена на немодифицирана електрода од странично ориентиран пиролитичен графит, може да се изврши електрохемиска детекција на важни аналити што се присутни во хуман серум [5]. Целта на оваа докторска работа е да се направи детална волтаметричка анализа на хуман серум со примена на немодифицирана електрода од странично ориентиран пиролитичен графит. Паралелно со асигнирањето на механизмите на електрохемиска трансформација на биохемиските молекули што покажуваат електрохемиска активност во хуман серум (урична киселина, билирубин, албумин), направен е обид да се испита и влијанието на одредени интерферентни системи врз волтаметричките својства на овие електрохемиски активни аналити. Меѓусебните интеракции меѓу молекулите на испитуваните електрохемиски активни аналити во серумот е исто така предмет на студија во докторската работа. Секако, оптимизацијата на експерименталните и инструменталните услови е неопходен сегмент во дизајнирањето на еден ваков електрохемиски биосензор. Испитувањето на концентрациските подрачја во кои постои линеарна зависност помеѓу измерените струи на волтаметричките одговори и концентрациите на испитуваните аналити во хуманиот серум, дава информации за опсегот на концентрациските региони во кои трите аналити можат да бидат определени симултано. Тестирањето на перформансите на оптимизираниот електрохемиски систем на реални примероци од хуман серум од пациенти, како и споредбата на добиените резултати со стандардни методи, е во насока на проценка на реалните можности и потенцијалот на волтаметричкиот биосензор. Крајната цел на докторската работа е да се постават основи за дизајнирање на електрохемиски биосензор што ќе овозможи брза и прецизна квантификација на урична киселина, билирубин и албумин во хуман серум со примена на немодифицирана електрода од странично ориентиран пиролитичен графит.

2. ВОЛТАМЕТРИЈА

2.1. Вовед во волтаметриските техники

За секој процес што се одвива во нашиот универзум е потребна движечка сила. Во биолошките системи, најчесто енергијата на електроните е движечка сила за голем дел од процесите што се одвиваат во физиолошки услови. Реакциите на пренос на електрони играат важна улога во одвивањето на различни биохемиски реакции, особено во биоенергетиката. Иако голем број важни процеси во биолошките системи се електрохемиски процеси, сепак основните принципи за важноста на електрохемијата во живите организми се сè уште недоволно познати за голем дел од научната јавност. Така на пример, фотосинтезата и дишењето, се базираат на сложена секвенца на пренос на електрони и јони во комплексниот пат на интерконверзија на енергијата во живите системи. Во овие процеси се вклучени едноставни молекули, како што се јаглероден диоксид, вода, кислород и глукоза, но и сложени молекули како ензимите. Во општ хемиски контекст, процесот на размена на електрони помеѓу два различни системи што се наоѓаат во непосреден контакт е познат како процес на оксидо-редукција. Многу често, ваквите процеси се именуваат со едноставен термин како „редокс реакција“. Редокс реакциите, кои се суштински за разбирање на основните биохемиски процеси поврзани со зачувување и трошење на хемиска енергија преку раскинување и/или формирање на хемиски врски во живите организми, се едни од системите што се важен дел од електрохемијата.

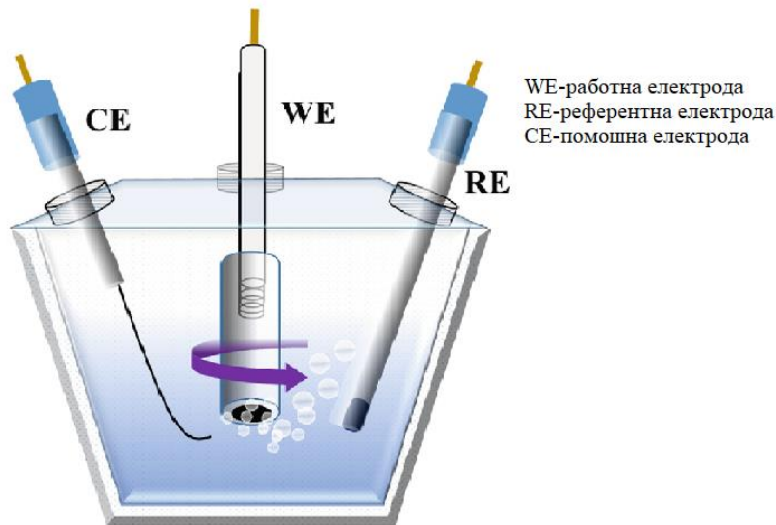
Електрохемијата е дел од физичката хемија чија примарна задача е да ги проучува хемиските процеси при кои доаѓа до размена на полнеж (електрони или јони) помеѓу два системи, односно процеси што се случуваат на границата помеѓу два системи што се во непосреден контакт [6, 7]. Во најголем дел, предмет на интерес на електрохемијата се системите во кои доаѓа до размена на електрони помеѓу даден електричен спроводник (електрода) и анализ (супстанца што се испитува). Сепак, преносот на полнеж не се ограничува само на размена на електрони. Во специфична гранка на електрохемијата, пренос на полнеж може да се одвива и со пренос на јони преку границата формирана помеѓу два немешливи електролитни раствори [8], слично како што се одвива преносот на јони преку клеточните мембрани.

Електрохемиските техники се составен дел од инструментацијата на голем број научноистражувачки лаборатории од областа на хемијата, физиката, биохемијата, фармацијата и заштитата на животната средина. Причини за големата присутност на електрохемиските техники во разни видови испитувања се: ниската цена, брзината за изведување на експериментите, можноста за брза квалитативна и квантитативна анализа, како и потенцијалот за испитување на механизмите на електрохемиските реакции на голем број системи. Секако, релативно едноставниот експериментален протокол што се користи во електрохемиските техники е многу често примарен фактор за примена на овие техники во различни видови на анализи. Испитувањата на механизмите на електрохемиска трансформација на границата електрода/електролит на голем број важни органски и неоргански системи, овозможуваат електрохемиските техники да се применуваат не само за аналитички цели, туку и во механистички студии [6-8]. Во денешно време, електрохемиските техники се главна алатка што помага во студирање на редокс трансформациите на голем број важни системи, во разбирањето на кинетичките и

термодинамичките процеси што влијаат врз процесите на трансфер на полнеж, како и во проучувањето на голем број физички феномени што се случуваат на површината од работната електрода (процеси на адсорпција, кристализација, хемиска реакција и сл).

Во фамилијата на инструментални електрохемиски техники, волтаметриските техники се едни од најпознатите членови. Зборот **волтаметрија** е всушност скратеница од „**волт-ампер-метрија**“. Во волтаметриските техники, електричниот потенцијал (или поточно, потенцијалната разлика помеѓу две електроди) е движечка сила за процесите, односно влезен параметар што предизвикува промени во системот што се испитува. Мерната физичка величина во волтаметријата е јачината на електричната струја што протекува како резултат на размената на полнеж во електрохемиска ќелија, во која (најчесто) молекулите од дефиниран аналит разменуваат електрони со дефиниран електричен спроводник (работна електрода). Во електрохемијата, терминот „редокс активни супстанци“ најчесто се користи за дефинирање за аналитите што може да се оксидираат или редуцираат на работната електрода во една електрохемиска ќелија. Генерално, процесот на испуштање на електрони од даден систем се дефинира како процес на оксидација, додека редукација е процес при кој даден систем прима електрони од некој друг систем со кој е во непосреден контакт. Специфичниот карактер на волтаметриските техники во однос на мултинаменски анализи ги прави да се користат како рутински инструментални техники, како за квалитативни анализи, така и за квантитативно определување на голем број неоргански и органски аналити присутни во различни аналитички примероци како лекови, биолошки материјал (крв, урина, серум, плазма), храна, отпадни води, медикаменти и разни метални легури [9]. Треба да се наведе дека најголеми предизвици при примената на волтаметриските техники се влијанијата на интерферентни супстанци (кога се работи електрохемиска анализа во комплексен матрикс), како и онечистувањето на работните електроди со супстанци што се присутни во примероците за анализа.

Кај сите волтаметриски техники, влезниот сигнал на ексцитација што се контролира преку надворешен извор е електричниот потенцијал (или потенцијалната разлика) што се нанесува помеѓу електродите што се вронети во електролитен раствор присутен во една електрохемиска ќелија. Притоа, како излезен мерлив волтаметриски параметар што се детектира при електрохемиска трансформација на аналитот/аналитите во електрохемиската ќелија е јачината на електричната струја. Волтаметриските експерименти најчесто се одвиваат во едноставни електрохемиски ќелии, слични на ќелијата што е прикажана на слика 1.



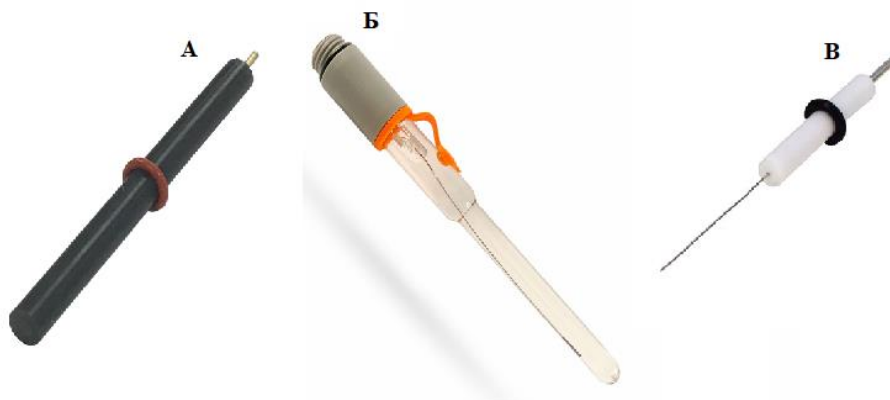
Слика 1. Приказ на триелектродна електрохемиска ќелија што се употребува во волтаметриските експерименти.

Електрохемиската ќелија што се користи во волтаметриските техники се состои од специјално дизајниран сад во кој има 10 - 20 mL електролитен раствор (најчесто тоа е пуферски раствор), во кој се вронети три електроди и тоа: **рабочна електрода, референтна и помошна електрода** (слика 1).

Рабочната електрода е главен сегмент од електрохемиската ќелија и е изработена од материјал што е добар спроводник на електрони. Оваа електрода најчесто е изработена од злато, платина, или од некој тип на материјал од јаглерод (графит или допиран дијамант). Во споредба со останатите електроди што се присутни во електрохемиската ќелија, површината од работната електрода е многу помала. На површината од работната електрода се одвива процесот на електрохемиска трансформација (односно процесот на размена на електрони) помеѓу електродата и анализот што е предмет на интерес. За аналитички цели од примарна важност е струјата што се детектира во електрохемискиот систем, во најголем дел, да потекнува од процесот на размена на електрони помеѓу работната електрода и анализот. Таквата струја се нарекува **Фарадеева струја**.

Во сите електрохемиски експерименти каде волтаметријата се употребува како работна техника, потребно е на една од електродите да се одржува константен потенцијал. Оваа електрода е дизајнирана на специфичен начин што овозможува истата да има **константен потенцијал** и истата се нарекува **референтна електрода**. Сребро/сребро-хлоридната електрода, што се запишува како Ag/AgCl (заситен раствор на KCl) или Ag/AgCl (раствор на KCl со концентрација 3 mol/L), најчесто се користи како референтна електрода во волтаметриските експерименти.

Помошната електрода е електрода со значително поголема површина отколку кај работната електрода присутна во електрохемиската ќелија. На помошната електрода се одвива спротивна електрохемиска реакција во однос на реакцијата што се одвива на работната електрода, а целта е да се овозможи балансирање на вкупниот полнеж во електрохемиската ќелија. Приказ на формата и дизајнот на трите електроди што се употребуваат во волтаметриските експерименти е даден на слика 2.

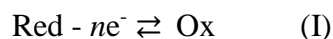


Слика 2. Приказ на работна електрода (А), референтна електрода (Б) и помошна електрода (В) што се употребуваат во волтаметриските техники.

Кога молекули (или јони) од т.н. „електрохемиски активен аналит“ се растворени во пуферскиот систем што се наоѓа во електрохемиската ќелија, приложената потенцијална разлика (од надворешно контролиран извор) помеѓу работната и референтната електрода ќе предизвика промени на концентрацијата на електроактивните честички од аналитот што се наоѓаат непосредно до површината на работната електрода. Притоа, на површината од работната електрода, молекулите (или јоните) од аналитот ќе претрпат реакција на редукција или оксидација. Доколку аналитот е целосно растворлив во електролитот што се наоѓа во електрохемиската ќелија, промената на концентрацијата на електроактивниот аналит на работната електрода ќе предизвика транспорт на молекулите (или јоните) од аналитот од внатрешноста на растворот кон површината на работната електрода. Во ваков случај, низ системот во кој се изведуваат електрохемиските експерименти ќе протече електрична струја, чиј интензитет е пропорционален со концентрацијата на аналитот што се наоѓа растворен во електрохемиската ќелија. Оваа едноставна зависност помеѓу измерената струја и концентрацијата на аналитот ги прави волтаметриските техники да бидат користени во рутински анализи при квантитативно определување на различни органски и неоргански супстанции.

2.2. Важни дефиниции во волтаметриските техники

Да претпоставиме дека во електрохемиска ќелија се одвива едноставна електрохемиска реакција, што може да се претстави со следната реакциона шема (I):



Во реакционата шема (I), симболот „Ox“ се однесува на оксидираната форма на електрохемиски активен аналит што е присутен во електрохемиската ќелија, додека симболот „Red“ се однесува на редуцираната форма на испитуваниот аналит. За овој едноставен систем, опишан со реакционата шема (I), во литературата се познати најмалку два математички изрази што ја дефинираат меѓусебната зависност помеѓу приложениот

електроден потенцијал (или потенцијалната разлика) и концентрациите на формите Ох и Red од анализот што е предмет на интерес. За системи што се дефинираат како „електрохемиски реверзибилни“ [6, 7], најчесто важи **Нернстовата равенка**, што ја има следната форма и ја дава зависноста помеѓу аплицираниот потенцијал и концентрациите на Ох и Red од анализот чии електрохемиски својства ги студираме:

$$E = E^{\theta} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c(\text{Ox})_{x=0}}{c(\text{Red})_{x=0}} \quad (1)$$

Во Нернстовата равенка (1), симболите за физичките параметри го означуваат следново:

E^{θ} - е симбол за стандарден потенцијал на оксидациско-редукцискиот пар Ох/Red;

R - е симбол за универзалната гасна константа ($R = 8,314 \text{ J/mol K}$);

T - е симбол за термодинамичка температура (K);

n - е симбол за стехиометрискиот број на разменети електрони помеѓу работната електрода и анализот што е предмет на студирање;

F - е симбол за Фарадеевата константа ($96\,485 \text{ C/mol}$);

$x = 0$ - е симбол кој означува дека се работи за концентрации на електродната површина.

Покрај Нернстовата равенка, за голем број електрохемиски системи, посебно за т.н. кинетичко-контролирани електрохемиски реакции, често се употребува **Батлер-Волмеровата равенка** што ја има следната форма:

$$\frac{I}{nFA} = k_s e^{\alpha\varphi} [c(\text{Red})_{x=0} - e^{-\varphi} c(\text{Ox})_{x=0}] \quad (2)$$

Во Батлер-Волмеровата равенка (2), симболите за физичките параметри се дефинирани како:

$\varphi = nF(E - E^{\theta})/RT$ е симбол за т.н. бездимензионален електроден потенцијал;

k_s - е симбол за стандардна константа на брзина на пренос на електрони (cm s^{-1});

α - е симбол за коефициент на електронскиот трансфер;

A - е симбол за површина на активниот сегмент од работната електрода (cm^2).

Последната равенка (2) е важен израз што може да се употреби за определување на константите на брзина на пренос на електрони k_s [6-8]. Овој физички параметар (k_s) е во директна корелација со брзината на размена на електрони што се случува помеѓу работната електрода и анализот што е предмет на студирање.

При изведувањето на волтаметриски експерименти, преку контролирано нанесување (од надворешен извор) на потенцијална разлика помеѓу работната и референтната електрода, се предизвикува промена на површинската концентрација на двете редокс форми на парот (Ох и Red) од анализот што е присутен во електрохемиската ќелија. Како резултат на електрохемиската трансформација на формата Ох во форма Red (или обратно) на активната површина од работната електрода, инструментот може да детектира електрична струја што протекува низ електрохемиската ќелија (т.н. Фарадеева струја). Во најголем дел од волтаметриските експерименти, а посебно при дизајнирањето

на волтаметриските сензори [10], интензитетот на Фарадеевата струја е физичка величина од примарен интерес што се употребува во аналитички цели. Интензитетот на Фарадеевата струја е во директна корелација со концентрацијата од аналитот што е присутен во растворена форма во електрохемиската ќелија.

Инструменталниот одговор што се добива со волтаметриските техники се нарекува **волтамограм**. Волтамограмот е крива со специфични карактеристики, што во суштина ја претставува зависноста помеѓу измерената струја и нанесениот потенцијал (т.н. *I-E* крива). Карактеристиките и формата на снимените волтамограми зависат од природата на аналитот, од типот на феномените на трансфер на маса, од бројот на разменети електрони помеѓу работната електрода и аналитот, од временскиот опсег на мерењето на струјата, од природата на хемиските реакции и адсорпциските феномени што се случуваат во електрохемиската ќелија, како и од природата на волтаметриската техника што се користи во експерименти [6-8]. Фарадеевата струја на волтамограмите е важна и за кинетиката, што е поврзана со чекорот на електрохемиска трансформација на молекулите (или јоните) од испитуваниот аналит на површината од работната електрода. Фарадеевата струја е функција од концентрацијата на аналитот, но во исто време зависи и од други фактори како што се големината, формата и материјалот на работната електрода, отпорот на растворот (електролитот) присутен во електрохемиската ќелија, температурата, евентуалните хемиски реакции и адсорпциски феномени што се вклучени во целокупниот електрохемиски процес, како и од бројот на електрони разменети помеѓу работната електрода и молекулите (јоните) на аналитот што се студира и е растворен во електрохемиската ќелија.

2.3. Краток опис на инструментацијата што се користи во волтаметриските експерименти

Електрохемиските инструментални системи што се употребуваат во најголем дел од волтаметриските експерименти, најчесто се дизајнирани од три меѓусебно поврзани модули и тоа: потенциостат, електрохемиска ќелија и компјутер (слика 3).

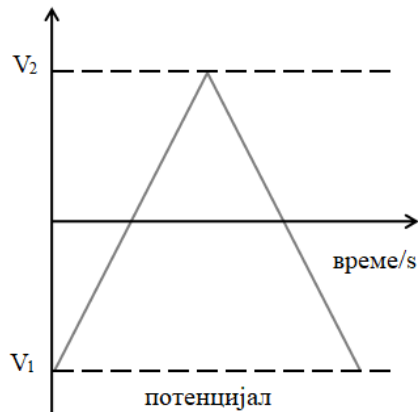


Слика 3. Приказ на електрохемиски систем што се состои од потенциостат (1) поврзан со електрохемиска ќелија (2) и компјутер (3).

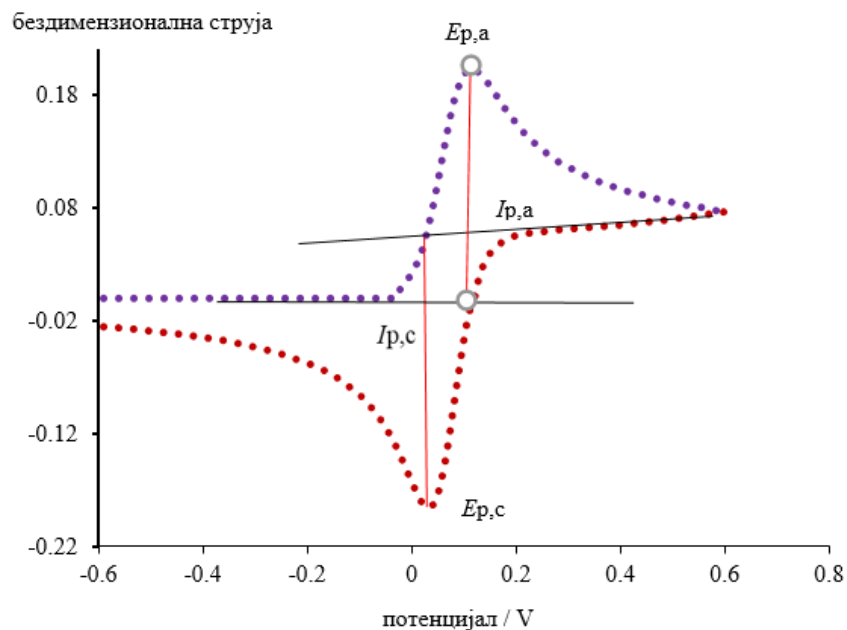
Потенциостатот е најважниот сегмент во целокупниот електрохемиски инструментален систем. Овој електричен уред, во суштина е хардверот што е одговорен за правилно функционирање на секоја електрохемиска инструментација (слика 3). Главната функција на потенциостатот е да овозможи апликација на соодветен потенцијал и да изврши регистрација (детекција) на промените на струјата што се случуваат како резултат на електрохемиска трансформација на анализот што е присутен во електрохемиската ќелија. Секој потенциостат во својот хардвер вклучува повеќе електрични кола, како и голем број на конвертори, амплификатори и микропроцесори. Во електрохемиските инструменти што биле дизајнирани до крајот на 80-тите години од минатиот век, најчесто се користела промена на потенцијалот што била аплицирана во континуирана линеарна форма. Скоро сите модерни потенциостати што се комерцијално достапни по 1990-тата година, користат модифицирана форма на потенцијалот. Во најголем број на инструментални техники, потенцијалната разлика помеѓу работната електрода и референтната електрода (што се вронети во електролитниот раствор во електрохемиската ќелија) се аплицира во форма на чекори со скалеста форма. Позитивните аспекти од апликацијата на скалесто-модулирана потенцијална разлика се отсликуваат во минимизирање на т.н. „капацитетни“ струи (наречени се уште и „нефарадееви струи“ или „паразитски“ струи), што секогаш се присутни во волтаметриските експерименти [6, 7]. Најважни електрохемиски техники, што најчесто се применуваат денес како експериментални волтаметриски алатки, се циклична волтаметрија (анг. cyclic voltammetry, CV) и квадратно-бранова волтаметрија.

2.4. Краток преглед на некои важни дефиниции во циклична волтаметрија

Од волтаметриските техники што најчесто се применуваат во аналитички цели, но и за кинетички мерења и за студирање на механизми на електрохемиска трансформација, најпозната е техниката наречена **циклична волтаметрија**. Во цикличната волтаметрија, потенцијалот се менува во дефинирани периодични циклуси, на начин што, почнувајќи од дефинирана почетна вредност, потенцијалот се менува до дефинирана крајна вредност, со однапред определена брзина. После достигнувањето на крајната дефинирана вредност, потенцијалот се менува по истиот пат, но во обратна насока, кон почетната вредност. Во сценарио кога потенцијалот се менува од позитивни кон негативни вредности, тогаш во таа насока се следат процесите на редукција на анализот на работната електрода. Кога, пак, потенцијалот се менува во насока од негативни кон позитивни вредности, тогаш се следат процесите на оксидација на испитуваниот анализ. Формата на потенцијалот и изгледот на еден цикличен волтамограм се прикажани на слика 4 и 5, соодветно. Треба да се нагласи дека во денешно време, кај скоро сите модерни потенциостати, потенцијалот што се аплицира во цикличната волтаметрија има скалеста, а не линеарна форма. Иако точниот назив за оваа техника треба да е „циклична скалеста волтаметрија“, сепак терминот „циклична волтаметрија“ е најчесто во употреба.



Слика 4. Форма на потенцијалот во циклична волтаметрија како функција од времето. Со ознаката „ V_1 “ е дефиниран почетниот потенцијал, додека „ V_2 “ е симбол за крајниот дефиниран потенцијал.



Слика 5. Приказ на цикличен волтамограм на едноставна електрохемиска реакција од типот $\text{Red} - 1e^- \rightleftharpoons \text{Ox}$.

Иако изведувањето на експериментите во услови на циклична волтаметрија не е тешка задача, сепак правилното разбирање на физичките и хемиските феномени што се „скриени“ во формата на еден цикличен волтамограм може да претставува голем предизвик, па дури и за електрохемичари со големо експериментално искуство. Цикличните волтамограми, како тој што е прикажан на слика 5, може да „кријат“ различни феномени во нивната форма. Покрај трансферот на електрони, во формата на цикличните волтамограми најчесто се отсликани и процесите на трансфер на маса на молекулите од анализот кон и од работната електрода со дифузија, потоа различни феномени на адсорпција, ефекти на спрегнати хомогени хемиски реакции, феномени на

процеси на кристализација и други фазни трансформации [6, 7]. Сепак, оваа техника е доволно проучена и применета за електрохемиско студирање на различни хемиски системи и голем број електродни механизми [6, 7]. Притоа, во литературата постојат доволен број на податоци, што значително помагаат во интерпретацијата и разбирањето на процесите што се отсликани преку цикличните волтамограми снимени при различни експериментални услови [6, 7, 11].

Главни карактеристики што се важни при обработката на секој цикличен волтамограм (како тој на слика 5) се: интензитетот на струјата на пикот во директна (анодна) насока ($I_{p,a}$), (што се јавува при промена на потенцијалот од негативни кон позитивни вредности т.н. аноден пик), интензитетот на струјата на пикот во повратна (катодна) насока ($I_{p,c}$) (што се јавува при промена на потенцијалот од позитивни кон негативни вредности, т.н. катоден пик). Односот на интензитетот на овие две струи $I_{p,a}/I_{p,c}$ е исто така важен параметар во процесот на обработка на цикличните волтамограми. Покрај тоа, раздвоеноста на директниот ($E_{p,a}$) и повратниот ($E_{p,c}$) пик во однос на потенцијалната скала (изразена во милivolти, mV), положбата на директните и повратните пикови во однос на потенцијалната скала, како и потенцијалот што се наоѓа на средина помеѓу директниот и повратниот пик (анг. mid-peak potential, $E_{mid,p}$, или $E_{1/2}$, дефиниран со изразот $E_{1/2} = [E_{p,a} + E_{p,c}]/2$), се важни параметри за кинетички и термодинамички карактеризации кај оваа техника [6, 7]. Цикличната волтаметрија, иако се применува и во аналитички цели за квантитативно определување на голем број аналити, сепак специфичните карактеристики на инструменталниот одговор кај оваа техника овозможуваат примена на оваа техника примарно за определување на механизмите на електрохемиска трансформација [6]. Поради тоа, цикличната волтаметрија се нарекува уште и „електрохемиска спектроскопија”.

Во електрохемијата, терминот „електрохемиска реверзибилност“ на електрохемиските процеси е од посебна важност [6, 7]. Кога се работи за електрохемиски експерименти што се изведуваат во волтаметриски услови, во литература постојат неколку дефиниции што се однесуваат на главните критериуми за електрохемиска реверзибилност.

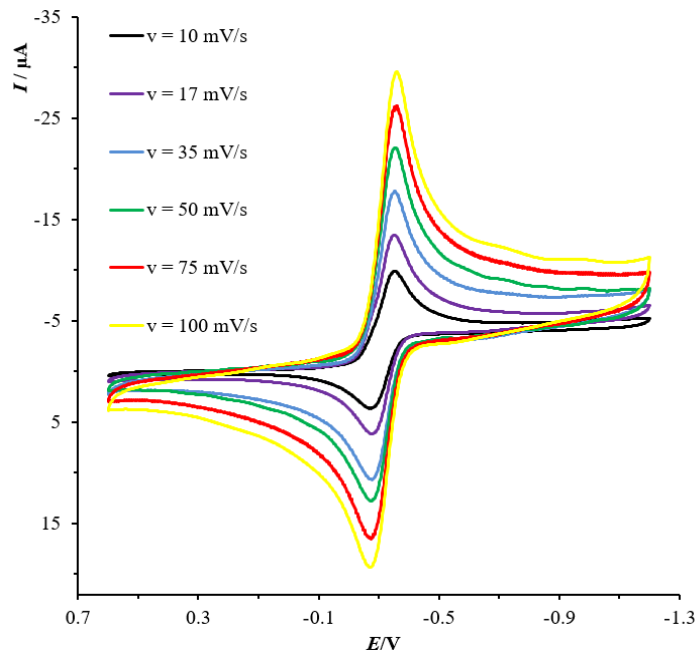
Со цел да го дефинираме терминот „електрохемиска реверзибилност“, ќе претпоставиме дека во електрохемиската ќелија се одвива електрохемиска реакција што може да се претстави со шемата: $Red - ne^- \rightleftharpoons Ox$. Притоа, партиципантите во оваа електрохемиска реакција, односно двете редокс форми од испитуваниот аналит (Ox и Red), претпоставуваме дека се целосно растворливи во растворувачот (најчесто, вода). За процесот $Red - ne^- \rightleftharpoons Ox$ да биде дефиниран како „електрохемиски реверзибилна реакција“, потребно е брзината на размена на електрони помеѓу молекулите од аналитот и работната електрода да е многу голема, а притоа да не постојат значителни енергетски бариери при процесот на размена на електрони. Ако брзината на хетерогениот процес на размена на електрони помеѓу електродата и редокс формите од студираниот аналит (Ox, Red) е многу поголема од брзината на процесите на дифузија (кај електрохемиските реакции во кои трансферот на маса на молекулите од аналитот до работната електрода се одвива преку процес на дифузија), тогаш електродната реакција може да се дефинира како електрохемиски реверзибилна.

Во едно вакво сценарио, потенцијалното раздвојување (ΔE_p) помеѓу директниот (аноден, $E_{p,a}$) и повратниот (катоден, $E_{p,c}$) пик од цикличниот волтамограм може да се дефинира со следниот израз:

$$\Delta E_p = |E_{p,a} - E_{p,c}| = 2,303 \frac{RT}{nF} \quad (3)$$

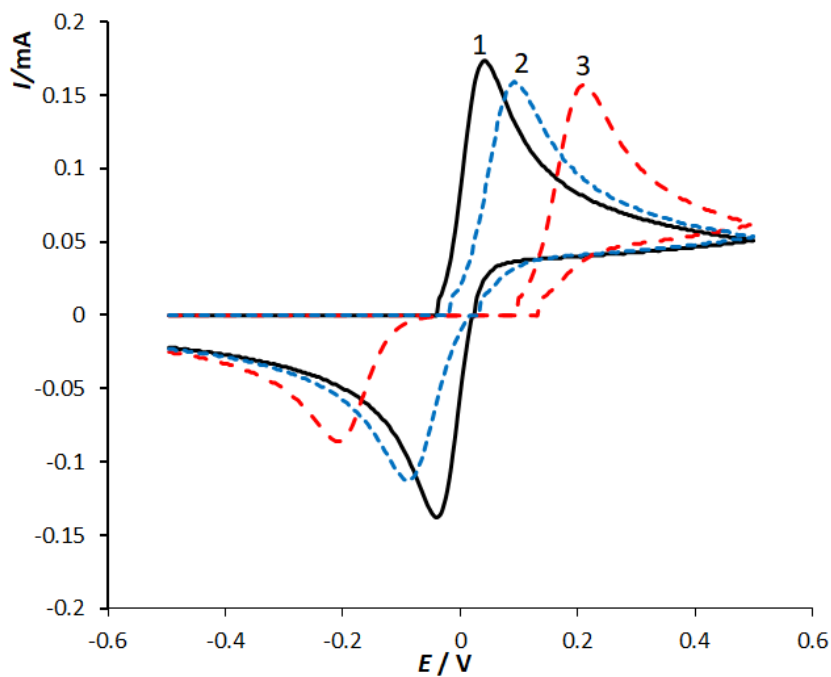
Доколку се примени равенката (3) за карактеризација на едностепен дифузиски контролиран електрохемиски реверзибилен процес, каде еден електрон е вклучен во размената помеѓу работната електрода и молекулите на анализот, се доаѓа до информација дека параметарот ΔE_p , што е поврзан со големината на потенцијалното раздојување помеѓу директниот и повратниот пик, изнесува околу 59 mV (при температура од 25 °C).

Покрај овој критериум, дополнително, кај електрохемиски реверзибилните процеси, потенцијалното раздојување помеѓу директниот и повратниот пик (ΔE_p) треба да биде константно и неговата вредност да не зависи од брзината на промена на потенцијалот [6, 7]. Дополнително, како важен критериум за електрохемиски реверзибилен процес во волтаметријата е утврден и односот на големината на струите што одговараат на двата пикови на директната и повратната струја ($I_{p,a}/I_{p,c}$) од цикличните волтамограми. Овој однос $I_{p,a}/I_{p,c}$ треба да биде еднаков на 1 (или многу блиску до 1) и при многу големи брзини на промени на потенцијалот [6, 7]. Наведените критериуми се важни во определувањето на „електрохемиската реверзибилност“ во циклична волтаметрија, за системи кај кои процесите на трансферот на маса на честичките на анализот се контролирани од дифузија [6, 7]. Приказ на серија од експериментални циклични волтамограми што прикажуваат еден електрохемиски реверзибилен процес е даден на слика 6.

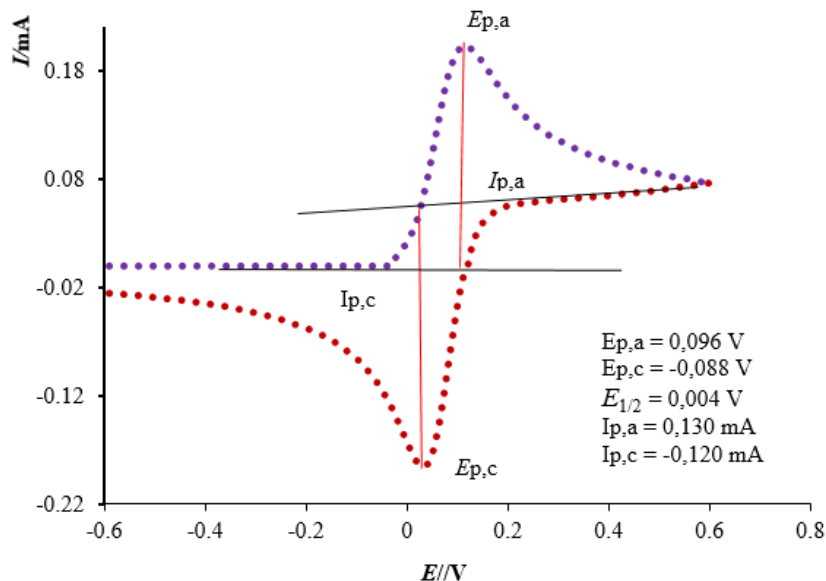


Слика 6. Циклични волтамограми на соединението Coenyzme Q0 снимени при различни брзини на промена на потенцијалот (v). Оваа серија на циклични волтамограми отсликува одвивање на електрохемиски реверзибилен дифузиски контролиран редокс процес [12].

Секое отстапување од овие наведени критериуми во цикличните волтамограми, имплицира дека има отстапување од електрохемиската реверзибилност на аналитот од интерес, што е најчесто предизвикано од процесот на бавен трансфер на електрони [6, 7]. Електрохемиските процеси што се карактеризираат со отстапување од критериумите за реверзибилност дефинирани во циклична волтаметрија (поради бавен трансфер на електрони, или поради некој друг процес), се нарекуваат квазиреверзибилни или иреверзибилни електрохемиски реакции. Приказ на циклични волтамограми што отсликуваат реверзибилен, квазиреверзибилен и иреверзибилен електрохемиски процес, се прикажани на слика 7а, додека карактеристичните параметри на еден цикличен волтамограм се претставени на слика 7б.



Слика 7а. Циклични волтамограми што прикажуваат одвивање на електрохемиски реверзибилен (1, крива со црна боја), квазиреверзибилен (2, крива со испрекинатата сина боја) и иреверзибилен (3, крива со испрекинатата црвена боја) дифузиски контролиран електроден процес ($Red - 1e^- \rightleftharpoons Ox$).



Слика 76. Приказ на цикличен волтамограм и на параметрите што се важни при обработката на секој цикличен волтамограм. $E_{p,a}$ е потенцијал на директниот (аноден) пик, $E_{p,c}$ е потенцијал на повратниот (катоден) пик, додека потенцијалот што се наоѓа на средина помеѓу директниот и повратниот пик е дефиниран со симболот $E_{1/2}$. Со $I_{p,a}$ е означен интензитетот на струјата на директниот пик, додека со $I_{p,c}$ е означен интензитетот на струјата на повратниот пик.

Доколу дадена електродна реакција ги исполнува критериумите да се дефинира како електрохемиски реверзибилна, и доколку трансферот на маса на молекулите од анализот е контролиран од брзината на дифузија, тогаш за таквата реакција интензитетот на струјата на пиковите (важи и за директниот и за повратниот пик) од цикличните волтамограми (I_p) е во директна корелација со концентрацијата на анализот преку **Randles-Sevcik-овата равенка** што е дефинирана со формулата (4):

$$I_p = 0,4463 n F A c \left(\frac{n F \nu D}{RT} \right)^{1/2} \quad (4)$$

Во изразот за Randles-Sevcik-овата равенка (4), значењето на симболите во формулата е:

I_p - е симбол за јачина на електричната струја на волтаметрискиот пик (A);

n - е симбол за стехиометриски број на електрони разменети помеѓу работната електрода и молекулите на анализот;

F - е Фарадеева константа (96 489 C/mol);

A - е симбол за активна површина на работната електрода (cm²);

c - е симбол за аналитичката концентрација на електроактивните честички на анализот што е присутен во растворот од електрохемиската ќелија (mol/cm³);

D - е симбол за коефициентот на дифузија на електрохемиски активните форми од анализот (cm² s⁻¹);

ν - е симбол што ја означува брзината на промена на потенцијал (V/s), применета во експериментите изведени со циклична волтаметрија;

R - универзална гасна константа ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$);

T - термодинамичка температура (K).

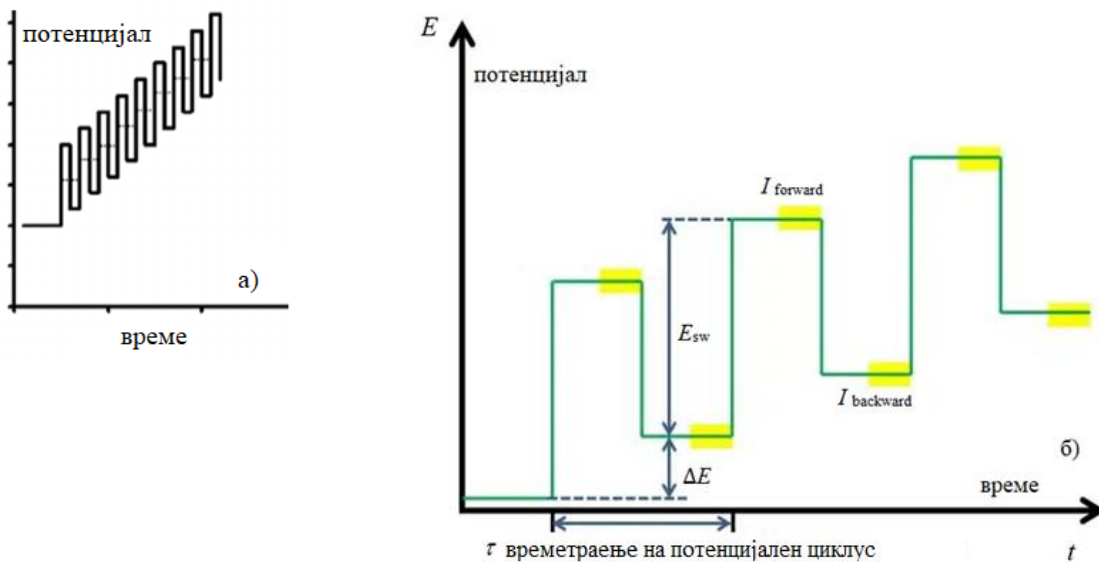
Бидејќи изразот (4) дефинира дека јачината на струјата од пиковите на цикличните волтамограми (I_p) е пропорционална со аналитичката концентрација c на аналитот присутен во електрохемиската ќелија, можно е изразот (4) да се искористи при квантитативно определување на испитуваниот аналит. Покрај тоа, изразот (4) имплицира дека со претставување на зависноста на јачината на струјата на волтаметриските пикови од цикличните волтамограми (I_p) како функција од квадратен корен од брзина на промена на потенцијалот ($\nu^{1/2}$), може да се дефинира едноставен дијагностички критериум за препознавање на трансферот на маса со помош на дифузија, во кој учествуваат редокс активните молекули од аналитот од интерес [6, 7].

2.5. Пулсни волтаметриски техники

Пулсните волтаметриски техники се воведени како алтернатива за цикличната волтаметрија од различни причини [6, 7, 8, 13]. Имено, со воведувањето на пулсните техники, овозможена е, пред сè, поголема аналитичка осетливост на волтаметриските методи. Покрај тоа, за пулсните волтаметриски техники развиени се и едноставни критериуми што овозможуваат дијагностицирање на механизмите на испитуваните електрохемиски реакции, многу слично како во цикличната волтаметрија. Дефинирањето на потенцијалот во форма на пулсеви и мерењето на струјата на крајот од тие потенцијални пулсеви, овозможува да се постигне значително диференцирање на Фарадеевата струја (струјата од интерес) во однос на капацитетната струја (што често е нежелна струјна компонента присутна во експерименталните волтамограми). Додека Фарадеевата струја е резултат на процесот на размена на електрони помеѓу работната електрода и молекулите на аналитот од интерес, капацитетната струја претставува еден вид на „паразитска струја“ што е резултат на перманентна промена на полнежите во т.н. двоен електричен слој формиран на границата електрода/електролит поради постојаната промена на потенцијалот [6, 7, 13]. Капацитетната струја не е пожелна за кинетички и аналитички цели и нејзина минимизација може ефективно да се изведе преку начинот на мерење на струјата воведен кај пулсните волтаметриски техники [1, 8]. Во фамилијата на пулсни волтаметриски техники, најпознати се диференцијалната пулсна волтаметрија (анг. differential pulse voltammetry, DPV) и SWV. Во основата на сите пулсни техники, е идејата, преку начинот на мерењето на струјата во текот на потенцијалните пулсеви, да се постигне зголемен однос на Фарадеевата во однос на капацитетната струја. Имено, познато е дека Фарадеевата струја опаѓа пропорционално со $t^{-1/2}$ (за т.н. дифузијски-контролирани електродни реакции) [6, 7]. За овие реакции, капацитетната струја опаѓа експоненцијално со времето [6, 7, 8]. Според тоа, со мерење на струите на крајот на аплицираните потенцијални пулсеви, ќе се детектираат значително помали вредности на капацитетните струи, додека детектираните фарадееви струи сè уште ќе имаат значителна вредност. На овој начин се зголемува аналитичката осетливост на пулсните волтаметриски техники за примена во квантитативни анализи [8, 13].

2.6. Квадратно-бранова волтаметрија

Квадратно-брановата волтаметрија (SWV) е една од најсофистицирните техники од фамилијата на пулсни волтаметриски техники. Потенцијалната форма во SWV се состои од симетрични квадратно-бранови пулсеви што имаат константна висина (дефинирана како квадратно бранова амплитуда, E_{sw}), кои се нанесуваат на скалеста потенцијална рампа (слика 8a). Потенцијалот во квадратно-брановата волтаметрија се менува со постојан чекор (потенцијален инкремент, ΔE). Други важни параметри на потенцијалната функција кај квадратно-брановата волтаметрија се: должината на два соседни потенцијални пулса, што во суштина е времетраењето на потенцијалниот циклус (τ); фреквенција (f)-параметар што е дефиниран како инверзна величина од времетраењето на два соседни потенцијални пулса ($f = 1/\tau$); периодот на мерење на струјата-параметар што е дефиниран како временски сегмент на крајот на потенцијалниот пулс во кој се мери струјата во текот на тој пулс. Параметар од суштинско значење во квадратно-брановата волтаметрија е квадратно-брановата фреквенција $f = 1/\tau$. Фреквенцијата претставува критично време на експериментот во кој се одвива одредена електродна трансформација во директна (анодна) и повратна (катодна) насока. Фреквенцијата што се аплицира во SWV обично е во границите од 1 Hz до 1 000 Hz, што одговара на времетраење на еден пулс од околу 0,5 ms до 50 ms [8]. Овие параметри кај техниката квадратно-бранова волтаметрија се прикажани на слика 8.



Слика 8. а) Форма на потенцијалот во техниката SWV и б) карактеристични параметри на еден потенцијален циклус во оваа техника. E_{sw} е амплитуда на пулсот (mV); ΔE е потенцијален инкремент (mV), τ е времетраење на потенцијален циклус (s), додека жолто обоените сегменти го означуваат времето на крајот од потенцијалните пулсеви (или, временскиот сегмент) каде се мери струјата во текот на еден потенцијален пулс [7].

Специфичните карактеристики на оваа техника, главно, произлегуваат од формата на сигналот на екситација, како и од начинот на мерење на струјата што се мери во мал сегмент на крајот од секој потенцијален пулс [8]. Потенцијалните пулсеви што се усогласени со насоката на скалестата рампа се означени како директни (анг. forward) пулсеви, додека спротивно ориентираните пулсеви се означени како повратни, обратни или (анг. backward) пулсеви. Два соседни, спротивно ориентирани пулсеви формираат еден потенцијален циклус (слика 8б). Целта на примената на два спротивно ориентирани пулсеви во квадратно-брановата волтаметрија, е да се добие увид во механизмот на електродната реакција од интерес при секоја вредност на скалестиот потенцијал. Притоа, во секој аплициран потенцијален циклус истовремено можат да се следат и процесите на оксидација (во анодна насока) и процесите на редукција (во катодна насока). Податоците добиени од мерењата на струите во SWV како функција од аплицираниот потенцијал ја дефинираат формата на еден квадратно-бранов волтамограм (слика 9).

Квадратно-брановиот волтамограм прикажан на слика 9 отсликува една електродна реакција помеѓу работната електрода и молекулите на аналит кој е целосно растворен во растворот присутен во електрохемиската ќелија [14].



Слика 9. Приказ на квадратно-бранов волтамограм за т.н. дифузииска електрохемиска реакција. Со $I_{forward}$ (или I_f) е означена т.н. директна компонента на квадратно-брановиот волтамограм (дефинирана како позитивна струја), додека со $I_{backward}$ (или I_b) е означена повратната компонента на квадратно-брановиот волтамограм (дефинирана како негативна струја). I_{net} е вкупната струја која е дефинирана како разлика помеѓу I_f и I_b [14].

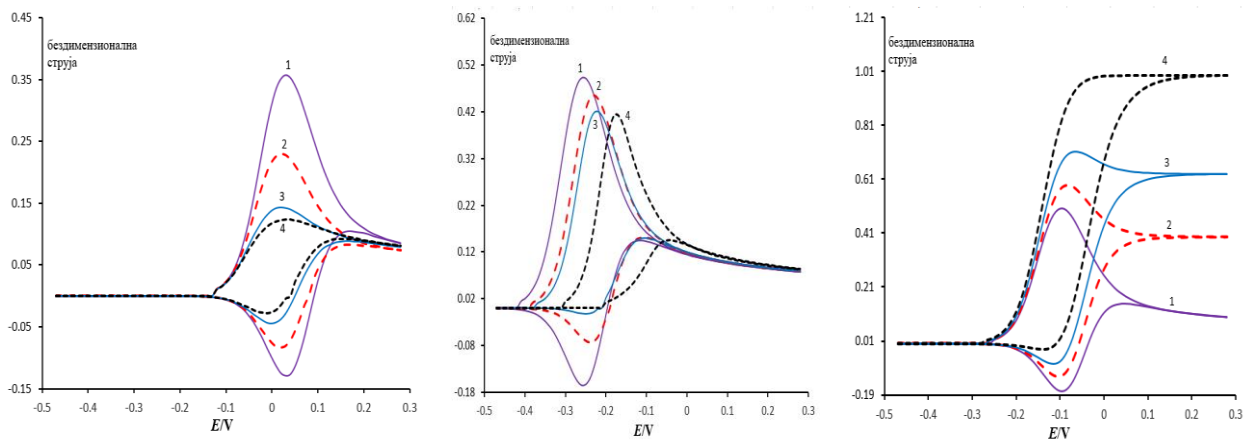
Волтамограмот на слика 9 отсликува електродна реакција од типот $Red - 1e^- \rightleftharpoons Ox$. Кај овој волтамограм, директната (forward) компонента на струјата (I_f) е дефинирана од струите измерени на крајот на директните (forward) пулсеви (оваа струја е дефинирана да има позитивен предзнак). Повратната компонента на струјата (I_b), пак, соодветствува на струите измерени во повратните (backward) пулсеви и таа е со негативен предзнак. Дополнително, во квадратно-брановата волтаметрија може да се дефинира и вкупна (или „нет“) волтаметриска крива, што се добива математички како разлика на соодветните вредности на директните и повратните струи ($I_{net} = I_f - I_b$). Вкупната волтаметриската крива, во суштина, е збир од апсолутните вредности на директните и повратните струи,

бидејќи, како што е наведено погоре, I_f е со позитивен предзнак, а I_b струјната компонента е со негативен предзнак. Овој начин на дефинирање на нет-струите во SWV има големо значење во поглед на осетливоста на оваа техника за аналитички цели [8].

Од слика 9 може да се забележи дека сите компоненти на струјата, вклучувајќи ги директната, повратната и вкупната струја, имаат профили што се карактеризираат со форма на пик (врв). Оваа карактеристика е многу важна за аналитички цели, бидејќи интензитетот на пикот (или „струјата на пикот“) е пропорционален со концентрацијата на аналитот, додека позицијата на пикот на потенцијалната оска (или „потенцијал на пикот“) е најчесто тесно поврзан со природата на аналитот [6, 8].

Со испитување на карактеристиките на директните и повратните струи од квадратно-брановите волтамограми, како функција од параметрите на аплицираниот потенцијал, може да се најде аналогија на SWV со CV, бидејќи и двете техники обезбедуваат увид во механистичките аспекти на дадена електродна реакција. Покрај тоа, во споредба со цикличната волтаметрија, параметарот наречен „амплитуда“ на потенцијалните пулсеви (или интензитет на потенцијалниот пулс) е дополнителен значаен степен на слобода при изведувањето на SW волтаметриските експерименти. Важно е да се нагласи и дека во SWV може да се аплицираат брзини на промена на потенцијалот дури и поголеми од 1 V/s. На тој начин, временската скала на SW волтаметриските експерименти е значително пократка од времето на електрохемиските експерименти во конвенционалната циклична волтаметрија. Типичен експеримент за чие изведување се потребни неколку минути во цикличната волтаметрија може да се изведе во само неколку секунди со примена на SWV. Овој податок укажува дека SWV може да се користи како техника за определување на кинетички параметри дури и кај системи кои подлежат на брзи електрохемиски/хемиски трансформации.

И покрај големиот потенцијал на SWV за студирање на различни хемиски системи, сепак поради сложеноста на теориите што се развиени за оваа техника, не е премногу експонирана како техника за испитување на електродните механизми. Иако последниве 30 години голем број на теоретски модели се развиени за студирање на различни електродни механизми во услови на SWV [8], пошироката примена на SWV за механистичките студии сè уште е предизвик за голем број експерименталисти што работат со волтаметриски техники. На слика 10а-в се прикажани директните и повратните струи од симулирани квадратно-бранови волтамограми за едноелектронски електроден дифузишки механизам поврзан со претходна реверзибилна хемиска реакција (CE механизам), последователна реверзибилна хемиска реакција (EC механизам), и регенеративна иреверзибилна хемиска реакција (EC' механизам), соодветно. Волтамограмите на слика 10 го прикажуваат влијанието на брзината на хемиските реакции врз формата на волтаметриските криви. Притоа, во сите случаи на слика 10, брзината на хемиските реакции кај соодветните механизми се зголемува одејќи од волтамограмот со број 1 (волтамограм со виолетова боја) кон волтамограмот со број 4 (волтамограм со црна испрекината линија). Како што може да се забележи од кривите на слика 10, брзината на хемиските реакции предизвикува различни ефекти врз карактеристиките на волтамограмите кај трите различни механизми, Сепак, за целосно дијагностицирање на овие механизми потребно е поголемо познавање на соодветните теоретски модели за механизмите од слика 10 во услови на SWV, кои се покомплексни отколку моделите за CV.



Слика 10. Приказ на директни и повратни струи од квадратно-бранови волтаметриски одговори за едностепен електронски трансфер ($\text{Red} - 1e^- = \text{Ox}$) кај т.н. SE механизам (а), EC механизам (б) и EC' механизам (в). Кривите во насока од 1 кон 4 покажуваат зголемување на брзината на хемиските реакции во соодветните механизми [15]

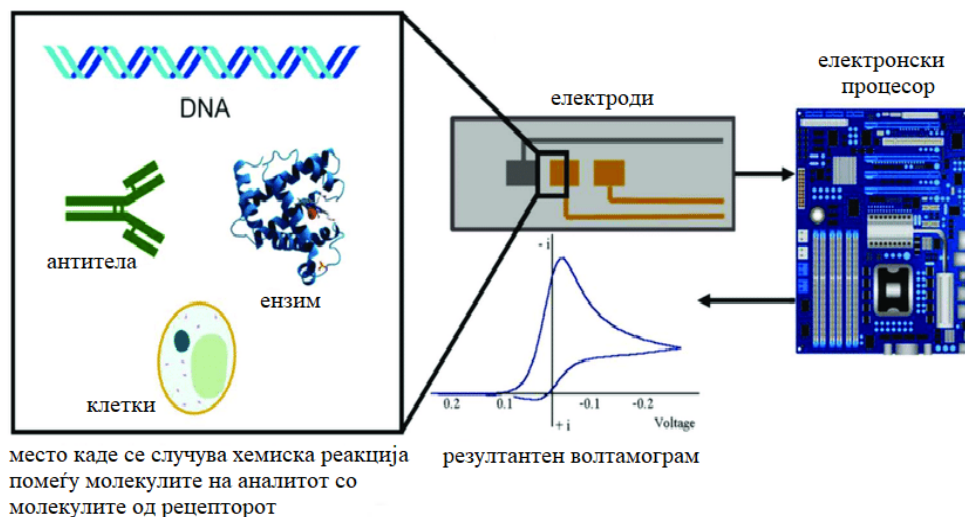
Квадратно-брановата волтаметрија е исклучително брза пулсна електрохемиска техника, што овозможува мерење на кинетиката на електронските трансфери дури и на многу брзи електродни реакции. Истовремено, со оваа техника е можно и прецизно определување на кинетиката и термодинамиката на хемиски реакции што евентуално се поврзани со електродната реакција на анализот што го испитуваме. Покрај за кинетички и механистички студии, квадратно-брановата волтаметрија, поради нејзината висока осетливост кон анализи од различна природа, е една од волтаметриските техники што интензивно се употребува и во дизајнот на биосензори за квантитативно определување на голем број важни физиолошки активни супстанции.

3. ВОЛТАМЕТРИСКИ БИОСЕНЗОРИ

3.1. Основни дефиниции за волтаметриските биосензори

Поставувањето на голем број точни медицински дијагнози се темели врз резултати добиени со примена на мали преносни електрични уреди, во кои спаѓаат т.н. биосензори. Ваквите минијатурни уреди што се наоѓаат во непосредна близина на пациентите (POCT-point-of-care testing) се одликуваат, пред сè, со висока економичност, специфичност и кратко време за добивање на одговор. Биосензорите наоѓаат примена при анализа на храна, дизајн на лекови, форензички анализи, мониторинг на животната средина и во многу други области [16].

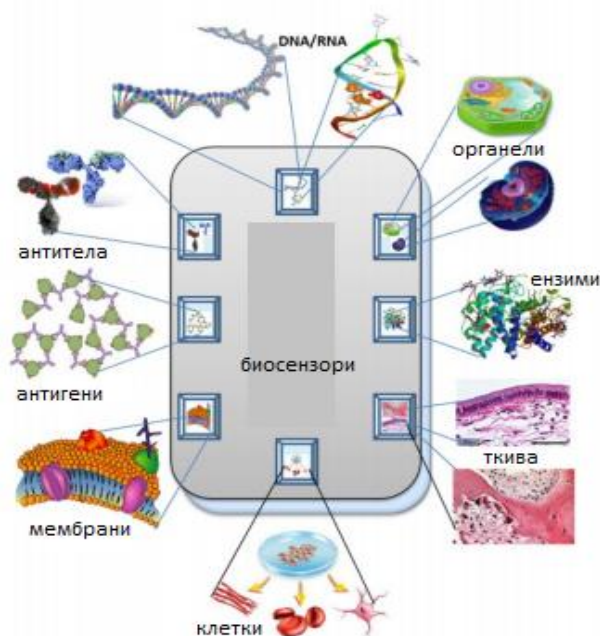
Сензорите се системи што се способни дефинирано својство, добиено преку одвивање на дадена хемиска реакција/физички процес, да го претворат во електричен сигнал. Притоа, преку интензитетот на електричниот сигнал може да ја определеме концентрацијата на дефинирана супстанца што учествува во хемиската реакција. Биосензорите се најчесто мали уреди што содржат биорецептори (ензим, антитело, микроорганизми, RNA, DNA) што се соодветно имобилизирани на даден носач, кој е во суштина интегриран електричен систем што може да ги конвертира промените предизвикани од хемиските реакции во електрични сигнали. Thevenot и соработниците [17] предложиле една од многуте дефиниции за биосензорите што гласи: „Биосензорите се независни интегрирани уреди кои можат да обезбедат одредени квантитативни или семиквантитативни информации како резултат на директниот контакт на биохемискиот рецептор со трансдукторот“.



Слика 11. Шематски приказ на еден електрохемиски биосензор.

Електрохемиските биосензори се едни од најзастапените видови на биосензори. Тие се разликуваат од другите биоаналитички системи, бидејќи кај електрохемиските биосензори најчесто не е потребна дополнителна подготовка на аналитите. Биосензорите се состојат од две главни компоненти: (а) елемент за биолошка идентификација што

реагира со целниот аналит и (б) трансдуктор што ја трансформира промената во хемиската реакција во електричен сигнал со даден интензитет што е пропорционален со концентрацијата на определуваниот аналит.



Слика 12. Приказ на биорецептори наменети за модификација на работна електрода при дизајнот на електрохемиски биосензори.

Основни карактеристики со кои се одликуваат биосензорите се:

Селективност - претставува способност на сензорот да одговори на целниот аналит. Висок степен на селективност е најпосакуваниот параметар на биосензорите, но исто така е важно и да се знае во кои концентрации други супстанции (интерференти) го попречуваат одговорот на сензорот.

Време на одговор - е време што е неопходно да се добие 95% од инструменталниот одговор.

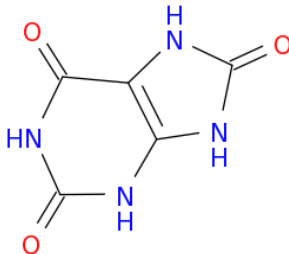
Линеарност - е ранг на концентрации каде сензорот дава линеарна зависност помеѓу електричниот мерен сигнал и концентрацијата на аналитот од интерес.

Осетливост - е параметар што кажува која е најмалата концентрација на аналитот за која може биосензорот да даде веродостоен одговор.

Во литературата постојат одреден број на податоци за електрохемиски биосензори за урична киселина, албумин и билирубин и некои од карактеристиките на тие биосензори се дадени во следните делови од докторската работа.

3.2. Електрохемиски сензори дизајнирани за детекција на урична киселина

Уричната киселина (анг. uric acid, UA) е краен оксидациски производ на метаболизмот на пуринските бази во човечкиот организам.



Слика 13. Молекуларна структура на урична киселина.

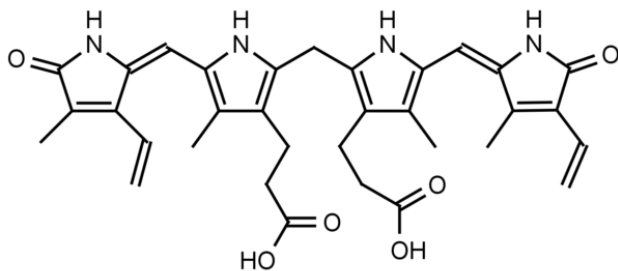
Во практика, уричната киселина се идентификува преку анализа на биолошки течности (хуман серум и урина), најчесто со употреба на конвенционални методи, како што се хроматографија, мембранска капиларна електрофореза и спектрофотометриски методи, во системи што скоро секогаш се базираат на ензимски реакции [18]. Важно е да се нагласи дека определувањето на урична киселина отвора можности за рана интервенција во случаи на нејзина зголемена концентрација. Од хемиски аспект, уричната киселина е слаба киселина, со двостепена дисоцијација со $pK_{a,1} = 5,4$ и $pK_{a,2} = 9,8$. Во физиолошки опсег на рН (7,35 - 7,45), уричната киселина најчесто е во форма на биурат (98%) (што е депротониран уратен анион), додека многу мала количина (< 1%) се наоѓа во форма на недисоцирана урична киселина [19]. Физиолошките нивоа на урична киселина се движат во граници помеѓу 3,5 mg/dL и 7,2 mg/dL (210 $\mu\text{mol/L}$ и 430 $\mu\text{mol/L}$) кај мажи, и помеѓу 2,6 mg/dL и 6,0 mg/dL (155 $\mu\text{mol/L}$ и 360 $\mu\text{mol/L}$) кај жени [19]. Овие нивоа се одржуваат преку егзоген внес (исхрана) но, главно преку ендоген пат (катаболизам на нуклеински киселини) [20]. Високите нивоа на урична киселина доведуваат до појава на хиперурикемија, состојба при која недисоцираната урична киселина се таложи на васкуларно ниво, при што биуратот е еден од факторите што придонесуваат за формирањето на камења во бубрезите. Овој феномен се јавува поради ниската растворливост (6 mg/dL или 360 $\mu\text{mol/L}$) на уричната киселина во водени раствори со физиолошки рН вредности [19].

Најголем дел од електрохемиските сензори за квантификација на урична киселина од водени раствори, или во биолошки примероци, се базираат на нејзина оксидација на работни електроди што се модифицирани со наночестички [21]. Наночестичките од оксидите на некои преодни метали можат да се користат како функционални системи во електрохемиска детекција на уричната киселина [22]. Тоа се должи главно на нивната висока биокомпатибилност, електрохемиска стабилност и добра електрична спроводливост [23, 24]. Дополнително, ниската цена и широката достапност се карактеристики што им даваат предност на овие наносистеми во однос на наночестичките што се базирани на благородни метали. Во литература можат да се најдат податоци за биосензори што се дизајнирани за детекција на урична киселина, каде најчесто се употребуваат наночестички од CuO [23], TiO_2 [24-26], јаглеродни наночестички [27] и Au [28]. Во најголем број од биосензорите, овие наносистеми се нанесуваат на површината од работна електрода изработена од стаклест јаглерод (анг. glassy carbon electrode, GCE).

Кога се работи за квантификација на уричната киселина во биолошки течности (серум или урина) со примена на електрохемиски методи, најчесто се употребуваат т.н. ензимски биосензори. Кај ензимските биосензори дизајнирани за детекција на урична киселина, најчесто ензимот уриказа се нанесува или на работна електрода што е модифицирана со некои добро електроспроводливи полимери [29, 30], или пак на електрода на чија површина се нанесени композитни филмови од полимер и наночестички [31-35]. Во литература скоро и нема податоци каде е покажано дека уричната киселина може да се определува во биолошки течности со примена на немодифицирани електроди. Дополнителен предизвик при определувањето на уричната киселина во биолошки течности може да претставува присуството на допамин и аскорбинска киселина, чии потенцијали на оксидација се многу блиски со тие на уричната киселина [36, 37].

3.3. Електрохемиски сензори дизајнирани за детекција на билирубин

Билирубин (анг. bilirubin, BLR) е тетрапиролен деградационен продукт, на непротеинскиот дел (хемот) од молекулата на хемоглобинот, миоглобинот, цитохромите, пероксидазата и каталазата.



Слика 14. Молекулска структура на билирубин.

Синтезата на билирубин се одвива во ретикулоендотелните клетки во црниот дроб и слезината. Во присуство на бактерии во цревата, билирубинот се конвертира во уробилиногенски супстанции што се исфрлаат во урината. Притоа, со определување на концентрацијата на билирубин може да се евалуира функцијата на црниот дроб и да се дијагностицираат голем број на заболувања на црниот дроб, како жолтица или цироза. Нормалните концентрации на вкупен билирубин во крвен serum кај здрави пациенти се движаат во граници од 3,4 - 20,5 $\mu\text{mol/L}$.

Електрохемиските методи се широко користени во детекцијата на билирубин. Во принцип, постојат два основни електрохемиски методолошки пристапи за определување на билирубин. Првиот принцип се базира на т.н. неензимски методи, кои вклучуваат директна оксидација на билирубин на површината на работна електрода. Вториот принцип за електрохемиско определување на билирубин е базиран на ензимски методи, при што се користи ензимот билирубин оксидаза како медијатор за електрохемиска детекција на билирубин.

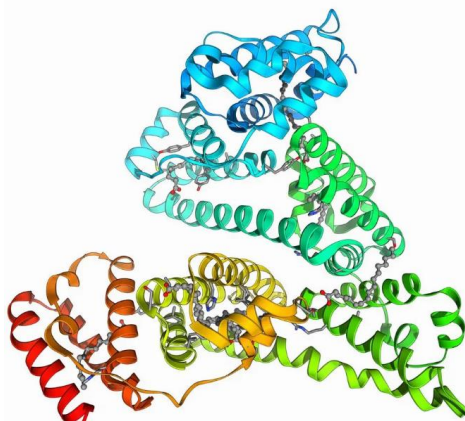
Електрохемиски студии за директно определување на билирубин се аплицирани во водени раствори [38], но и во неводена средина [39, 40]. Во овие студии е потврдена електроактивната природа на билирубинот и генералните механизми на негова

електрохемиска трансформација. Во споменатите студии е покажано дека електрохемиската оксидација на билирубинот најчесто се одвива во повеќе последователни чекори, при што билирубинот електрохемиски се оксидира во биливердин, пурпурин или колетелин, зависно од применетиот потенцијал [38]. Електрохемиското определување на билирубин е корисна метода за проценка на билирубин во серум од крв, бидејќи електрохемиските методи се брзи, евтини и не бараат голем волумен на серум.

Неензимските електрохемиски методи кои вклучуваат оксидација на билирубин најчесто се применети на јаглеродни електроди чија површина е модифицирана со наночестички или нанокластери. Во литературата се познати неензимски електрохемиски сензори за определување на билирубин кои користат јаглеродни наноматеријали како што се јаглеродни наноцевчиња [41], графен [42] и метални наноматеријали како што се златни наночестички [43, 44]. Покрај користењето на еднородни наночестички, многу често за определување на билирубин се користени и смеси од неколку различни наноматеријали. Така на пример, во трудот [45] е развиен електрохемиски сензор за определување на билирубин добиен со модифицирање на работната електрода со наноматеријали од фероцен карбоксамид, Au и јаглеродни наноцевчиња. Овој сензор, опишан во трудот на С. Wang и соработниците [45], покажал значително подобрување на струјниот одговор за билирубин, долготрајна стабилност и добра репродуцибилност. Ензимските сензори за определување на билирубин се застапени во многу поголема мера отколку неензимските електрохемиски сензори. Најголем дел од ензимските електрохемиски сензори дизајнирани за определување на билирубин се базираат на специфичните својства на билирубин оксидазата, ензим што најчесто се имобилизира на површината од јаглеродни електроди модифицирани со полимери или со наночестички [46-50]. Главните недостатоци на ензимските електрохемиски биосензори за определување на билирубин се отсликуваат во инактивацијата на имобилизираниот ензим билирубин оксидаза во присуство на комплексни матрикси како што е крв или серум.

3.4. Електрохемиски сензори дизајнирани за детекција на албумин

Албуминот (анг. albumin, ALB) е најзастапен протеин во хуманиот серум.



Слика 15. Молекулска структура на албумин.

Овој протеин е неопходен за одржување на осмотскиот притисок, а неговото присуство во урината служи како фактор за голем број на дијагнози. Најчесто, референтните концентрации на албумин во хуман серум се движат во граници од 32 – 50 g/L. Зголеменото ниво на албумин во серум најчесто е поврзано со дехидратација, прекумерна дијареа и при употреба на лекови како стероиди, инсулин и некои хормони. Амперометриските определувања на албуминот секогаш се проблематични поради релативно големата реактивност, како и поради изразениот афинитет за атсорпција на молекулите на албумин како врз липофилни, така и врз хидрофилни електроди.

Со примена на антитело за албумин, имобилизирано на површината на златна електрода, разработен е електрохемиски сензор за определување на албумин од авторите од трудот [51]. Притоа, авторите од [51] определиле граница на детекција на албумин од 0,2 mg/L со ваквиот тип на сензор. Специфичен волтаметриски сензор за определување на албумин е развиен со кополимеризација на акриламид (анг. acrylamide) на површината од златна електрода покриена со хитозан (chitosan) [52]. Нискотемпературна полимеризација била предуслов растворувачот да формира кристали од мраз, при што се формирала макропорозна криоструктура во која бил „заробен“ фероцен. Со примена на диференцијална пулсна волтаметрија на ваква електрода, авторите од трудот [52] детектирале албумин во граници од 0,1 $\mu\text{g/L}$ до 1 mg/L, со пресметана граница на детекција на албумин од 50 ng/L. Авторите на трудот [53] развиле биосензор на база на наночестички од циркониум диоксид, додека авторите во трудот [54] покажале дека е возможна директна волтаметриска детекција на албумин со употреба на сребрена електрода модифицирана со L-цистеин. Сепак, поради специфичните хемиски и атсорпциски својства на албуминот, постои генерална констатација дека воопшто не е лесно да се развие едноставен амперометриски (волтаметриски) сензор за квантификација на албумин.

3.5. Волтаметриски сензори дизајнирани за детекција на урична киселина и билирубин присутни во хуман серум

Во последниве десетина години, повеќе автори работеле на дизајнирање на волтаметриски сензори за директно определување на урична киселина, допамин, билирубин и албумин во хуман серум. Во биолошките сензори за определување на урична киселина, најголемиот проблем доаѓа од присуство на аскорбинска киселина, чиј сигнал често интерферира со волтаметрискиот сигнал од урична киселина. Во последниве неколку години, развиени се неколку типови на ефикасни и едноставни ензимски и неензимски амперометриски сензори за директно определување на урична киселина во хуман серум и урина. Така, во трудот [55] авторите вршеле испитувања за селективно и симултано определување на допамин и урична киселина со помош на квадратно-бранова волтаметрија, при што како работна електрода користеле GCE модифицирана со полипрокатерол хидрохлорид (p-ProH). Притоа, утврдено е дека во примероци од хуман серум и урина, растворени во фосфатен пуфер со pH = 5,0, се добиваат добро раздвоени пикови на допамин и урична киселина, со граници на детекција од 0,3 $\mu\text{mol/L}$ и 0,5 $\mu\text{mol/L}$, соодветно. Самата електрода се одликувала со едноставност во конструкцијата, репродуктивност, висока стабилност, селективност и добра сензитивност. Друга група автори работеле на определување на урична киселина и холестерол во хуман серум

користејќи волтаметриски техники, при што како електролит е употребен фосфатен пуфер со $\text{pH} = 6,86$ [56]. Се знае дека холестеролот го зголемува ризикот за развој на кардиоваскуларни болести, а има и лошо влијание врз имуниот систем. Авторите од овој труд користеле органомодифицирана работна електрода. Едноставен волтаметриски сензор базиран на површински отпечатена електрода (анг. screen printed carbon electrodes, SPCE) за определување на урична киселина во клинички примероци од серум е претставен во трудот [57]. Со употреба на квадратно-бранова волтаметрија, авторите покажале дека е можно да се определи урична киселина во серум растворен во фосфатен пуфер со $\text{pH} = 7,0$. Притоа, работната GCE била модифицирана со *N,N*-диметилформаид. Определената граница на детекција за урична киселина била $1,9 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$. Предложениот сензор покажал многу висока репродукцибилност. Најмногу проблеми при определувањето со овој сензор се забележани во присуство на ацетаминофен, допамин и аскорбинска киселина, кои се јавуваат како интерференти на одговорите од уричната киселина. Релативно едноставен и ефикасен ензимски волтаметриски сензор за директно определување на урична киселина е разработен од страна на Yan и соработниците [58]. Со модифицирање на површината на работната електрода (GCE) со наночестички од фероцен и Cu_2O , со имобилизација на ензимот уриказа, авторите развиле метода за определување на урична киселина со граница на детекција од $0,0596 \mu\text{mol/L}$. Retna Raj и соработниците [59] користеле златна електрода модифицирана со слој од меркаптобензимидазол за директно определување на урична киселина во хуман серум. Притоа, овој приод овозможил определување на урична киселина во присуство на аскорбинска киселина, чиј сигнал многу често интерферира со волтаметрискиот одговор на уричната киселина. На немодифицирана дијамантска електрода што содржи бор, авторите [60] разработиле брза и едноставна метода за директно определување на урична киселина во хуман серум во микроларни и милиларни концентрации. Притоа, авторите покажале дека методата е погодна за клинички испитувања на урична киселина. Како работна техника е употребена SWV. Волтаметриска метода за директно определување на допамин во присуство на урична киселина во урина и во хуман серум е разработена од страна на Mikhelson и Muratova [61]. Со употреба на диференцијално пулсна волтаметрија на електрохемиски третирана SPCE работна електрода, авторите успеале ефикасно да ги раздвојат сигналите на допамин и урична киселина во микроларни подрачја на концентрации на овие аналити. Ефикасен амперометриски ензимски биосензор за квантификација на урична киселина е развиен од страна на Ghosh и соработниците [62]. Со примена на нафионски филм во кој бил инкорпориран ензимот уриказа, авторите извршиле модификација на работната GCE. Електроактивацијата на уриказата е направена со помош на циклизација (со CV), при што се индуцирани електростатски интеракции помеѓу фероцен (исто така вметнат во нафионската мембрана) и резидуите на триптофан од структурата на ензимот уриказа. Рангот на линеарност на овој сензор бил во границите од 500 pmol/L до $600 \mu\text{mol/L}$ на урична киселина, со граница на детекција од 230 pmol/L . Друг ефикасен неензимски амперометриски сензор за детекција на урична киселина е развиен со употреба на дијамантски микроелектроди со примеси на бор [63]. Оваа метода се базира на супериорните карактеристики на дијамантската електрода, како што се ниска капацитетна струја, мал потенцијал за неспецифична адсорпција, можности за електрохемиска регенерација на нејзината површина и долготрајна стабилност. Со оваа метода, било можно да се определува урична киселина во концентрации до 1 pmol/L во присуство на аскорбинска киселина. Во друг труд [64], со употреба на златна електрода

модифицирана со органо-сулфурен униформен слој, развиен е сензор за детекција на урична киселина во граници од 2,5 $\mu\text{mol/L}$ до 5 nmol/L , со граница на детекција од 0,4 $\mu\text{mol/L}$. Интересен тип на биосензор базиран на модифицирана GCE работна електрода со дендримери од цистеамин и златни наночестички е употребена во трудот [65] за директно определување на урична киселина во присуство на аскорбинска киселина. Со употреба на циклична волтаметрија како работна техника, постигната е многу ниска граница на детекција на урична киселина од 34,5 nmol/L .

Дизајнирањето на волтаметриски методи за детекција на билирубин во физиолошки примероци најчесто се базира на т.н. ензимски сензори. Авторите во трудот [66] развиле амперометриски ензимски биосензор за детекција на билирубин со употреба на ензимот билирубин оксидаза што бил имобилизиран на наночестички од циркониум и силициум депонирани врз златна електрода. Линеарниот одговор на сензорот во однос на концентрацијата на билирубин се движел во границите од 11,7 $\mu\text{g/L}$ до 146,2 mg/L , при што била постигната граница на детекција од 58,5 ng/L . Молекулата на билирубин во својата структура содржи активен центар дипирометан, што може да биде оксидиран до биливердин. Друг алтернативен волтаметриски протокол за определување на билирубин е развиен со употреба на платинска електрода модифицирана со нанографитни честички, со примена на квадратно-бранова волтаметрија како работна техника [42]. Во трудот [67] авторите дизајнирале волтаметриски сензор за селективно квантитативно определување на билирубин со помош на SPE модифицирани со наноматеријали (анг. multi walled carbon nanotubes, MWCNT) и графен. Притоа, употребен е примерок добиен од комерцијален лиофилизиран крвен серум разреден со помош на фосфатен пуфер со $\text{pH} = 7,2$. Непознатата концентрација на билирубин во хуман серум била определена како резултат на конструираната калибрациска крива. Пресметаната граница на детекција за билирубин кај овој сензор е $0,3 \pm 0,022 \text{ nM}$. Во литературата постојат ограничен број трудови што се базираат на неензимски методи за директно определување на билирубин во биолошки примероци. Таков еден пример на неензимски сензор за директна детекција на билирубин е дизајниран со употреба на Mn-Cu биметална кристална електрода покриена со нафионска мембрана. На ваков тип на електрода, авторите во трудот [68] развиле метода за определување на билирубин во граници од 0,7 до 245,6 mg/L , при што определената граница на детекција била 14,6 $\mu\text{g/L}$. Сепак, и покрај големиот број на електрохемиски сензори развиени за билирубин, сè уште е предизвик да се развие сензор за определување на билирубин во хуман серум со примена на немодифицирани електроди. Главен проблем при ваквите студии се адсорпциските феномени што се јавуваат на работните електроди, а потекнуваат од комплексноста на хуманиот серум.

4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ УСЛОВИ

Волтаметриските експерименти во докторската работа беа реализирани со примена на потенциостат/галваностат од тип PalmSens2 (PalmSens BV, Холандија), што беше контролиран со помош на софтверот PS Trace 5,9 (PalmSens BV). Сите експерименти беа изведени на собна температура, во конвенционална триелектродна волтаметричка ќелија што се состои од работна електрода изработена од странично ориентиран пиролитичен графит (EPPGE) со геометриска површина од 7,069 mm² (ALS Co., Ltd.), референтна електрода (Ag/AgCl електрода (3 mol/L KCl), и графитна прачка како помошна електрода. Работната EPPGE, беше чистена со абразивна хартија, со суспензија од Al₂O₃ во вода и последователно беше чистена со ултразвучна бања, по што електродата беше измиена со дејонизирана вода и соодветно исушена, пред да се врони во електрохемиската ќелија. Фосфатен пуферски раствор (pH = 7,34; 0,1 mol/L) беше користен како основен електролит во сите волтаметриски експерименти (освен ако не е поинаку наведено). Во 20 mL од овој фосфатен пуфер беа ставени неколку стотини µL хуман серум и последователно беа спроведени волтаметриските мерења. Користењето на примероците од хуман серум беше одобрено од Етичкиот комитет на Факултетот за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип, со Одлука бр. 0801-2/13 од 16 февруари 2022 година. Основните раствори на урична киселина (Reanal Budapest, p.a. > 99%) и говедски серумски албумин (Sigma Aldrich, ≥ 98%) беа подготвени со растворање во вода, додека основниот раствор на билирубин (Alfa Aesar, 97%) прво беше растворен во неколку капки диметил сулфоксид (Thermo Scientific, 99,7%) пред да се додаде вода за постигнување на посакуваната конечна концентрација. Сите раствори беа подготвени со употреба на дејонизирана вода обезбедена од системот за прочистување Arrium® mini Plus (Sartorius). Постапката за подготовка на серум беше спроведена во согласност со воспоставените протоколи, кои вклучуваа собирање на полна крв; при што се остава да коагулира во присуство на активатор на коагулација за време од 15 - 25 минути на собна температура. Полесната фракција потоа беше издвоена преку процес на центрифугирање, со примена на 1 000 - 2 000 вртежи/минута, за време од 10 минути, што резултираше со одвојување на серумот како супернатант (полесна фракција во горниот дел на епруветата). Добиените примероци од серум беа складирани на -5 °C без понатамошен третман и беа користени по потреба. Концентрациите на урична киселина, билирубин и албумин во серумот беа определени користејќи дијагностички реагенси од BioSystems (Шпанија) и анализирани на клинички биохемиски анализатор (BS-240Pro, Mindray, Кина) веднаш по рутинските постапки за собирање на крв и одвојувањето на серумот.

Спектрофотометрискиот метод базиран на ензимот уриказа беше употребен за определување на содржината на урична киселина во серумот. Методот вклучува формирање на водороден пероксид, кој реагира со 2,4-дихлорофенол сулфонат и 4-аминоантипирин во присуство на пероксидаза, што доведува до формирање на црвено обоен комплекс на кинонимин (анг. quinoneimine).

За определување на билирубин во серумот, беше користен спектрофотометриски метод базиран на диазо-реакција. Директниот билирубин, кој е водорастворлив, може директно да се определи преку неговата реакција со диазотизирана сулфанилна киселина. Индиректниот или неконјугиран билирубин, кој е врзан за албумин, бара отстранување на албумините за да се определи неговата концентрација, за што е неопходна употреба на акцелератор (цетримид).

Определувањето на серумскиот албумин беше извршено користејќи колориметриски метод базиран на реакцијата на албумин во примерокот и бромкрезол зелено (анг. bromocresol green, BCG). Во кисела средина, врзувањето на албумин со BCG доведува до промена на апсорпцијата на комплексот, што е пропорционална со концентрацијата на албумин. Доколку не е дополнително наведено, реферираните концентрациски вредности на сите наведени компоненти во докторската работа се однесуваат на супстанците што се присутни во електрохемиската ќелија. Во табела 1 се дадени референтните вредности на некои од параметрите што се определуваат во хуман серум во рутинските биохемиски анализи.

Табела 1. Референтни вредности на некои биохемиски параметри што најчесто се определуваат во рутинските биохемиски анализи во хуман серум

назив на анализ	скратеница	референтни вредности
албумин	Alb	32 - 50 g/L
алкална фосфатаза	AP	50 - 122 U/L
аланин аминотрансфераза	ALT	0 - 55 U/L
аспартат аминотрансфераза	AST	5 - 34 U/L
амилаза	AMY	25 - 125 U/L
директен билирубин	BiID	0,0 - 8,6 μ mol/L
вкупен (тотален) билирубин	BiIT	3,4 - 20,5 μ mol/L
вкупен холестерол	Chol	2,6 - 5,2 mmol/L
креатин киназа	CK	29 - 200 U/L
креатин киназа (изоензим 1)	CK-MB	0 - 25 U/L
креатинин	Crea	50,4 - 110,5 μ mol/L
Ц-реактивен протеин	CRP	0,0 - 0,5 mg/L
γ -глутамил трансфераза	GGT	9 - 64 U/L
глукоза	Glu	3,9 - 5,5 mmol/L
железо	Fe	10,0 - 30,0 μ mol/L
лактат дехидрогеназа	LDH	125 - 220 U/L
триглицериди	Tgl	0,3 - 1,7 mmol/L
„добар“ холестерол	HDL	1,04 - 1,55 mmol/L
уреа	Urea	2,5 - 9,2 mmol/L
урична киселина	UA	240 - 420 μ mol/L

4.1. Статистичка анализа: Некои основни поими и дефиниции

Волтаметриските експерименти применети врз комплексни примероци како што е хуманиот серум, најчесто опфаќаат голем број на мерења врз селектираниот примерок за анализа и истите се повторуваат неколку пати. Тоа се прави со цел да се обезбеди веродостојност на добиените резултати за мерните својства или за мерните концентрации на анализите што ги има во хуманиот серум. Иако постојат различни статистички методи што се користат за обработка на добиените податоци, сепак некои од параметрите што се определуваат со статистичката анализа се генерално прифатени како круцијални во секоја статистичка анализа.

Статистичкиот параметар кој најчесто се користи за проценка на вредноста кон која се стреми мерното својство (при поголем број реализирани мерења на истото својство при исти услови) е средната вредност (анг. average, A_v), што се пресметува според изразот (5):

$$A_v = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (5)$$

Во изразот (5), со n е означен бројот на вкупни мерења што се направени врз даденото својство, додека x_i е ознака за поединечните измерени вредности на својството што се мери. Средната вредност на дадено мерно својство е експериментална пресметана вредност што е најблизу до вистинската вредност на мерното својство што се определува при мерењата. Треба да се напомене, дека не секогаш средната вредност кореспондира со вистинската вредност на мерното својство. Причина за тоа се различни видови на систематски грешки што се појавуваат често, како при изведување на експериментите, така и при процесот на мерење. Степенот на расејување (или отстапување) на измерените вредности околу средната вредност е од суштинско значење при статистичките анализи. Овој степен на отстапување од средната вредност покажува колку близу еден до друг се податоците од последователните мерења на дадено својство на материјата што е предмет на мерење. Мерка за степенот на расејување на податоците околу средната вредност на мерното својство (добиена при експерименти од последователни мерења) е стандардната девијација (анг. standard deviation, SD). Важно е да се нагласи дека стандардната девијација има исти единици како и својството што се мери.

Стандардната девијација, определена за сет од последователни мерења на дадено својство, мерено при идентични услови, најчесто се дефинира со изразот (6):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum |x - \bar{x}|^2}{n}} \quad (6)$$

Во изразот (6), со „ x “ се означени поединечните вредности на мерното својство, додека со „ \bar{x} “ е означена средната вредност на мерното својство. Дополнителен параметар што е тесно поврзан со стандардната девијација и со средната вредност на мерното својство е релативната стандардна девијација (анг. relative standard deviation, RSD). Релативната стандардна девијација се изразува во проценти (%) и таа се дефинира како однос од стандардната девијација и средната вредност (7):

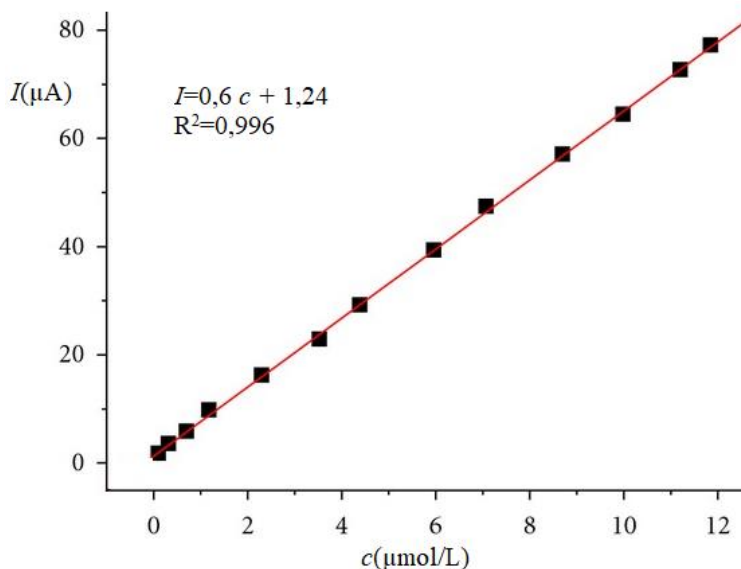
$$RSD = [(SD) / (\bar{x})] \times 100 \quad (7)$$

Во суштина, вредноста на RSD покажува колкаво е процентуалното отстапување на мерното својство од средната вредност на тоа својство.

При изведувањето на дадена аналитичка процедура за анализа на примерок за анализа, неопходно е да се подготват т.н. „стандардни криви“, познати уште и како „калибрациски криви“ или „криви на концентрациски зависности“. Овие зависности на

споменатите криви ги претставуваат интензитетите на некое мерно својство на даден аналит, како функција од неговата концентрација. Притоа, овие криви на концентрациска зависност, служат како алатки што овозможуваат да се процени во кои концентрациски подрачја постои линеарна зависност помеѓу мерните својства и концентрацијата на определуваниот аналит. Во волтаметријата најчесто се мери интензитетот на струјата на волтаметриските пикови како функција од концентрацијата на испитуваниот аналит. Доколку волтаметријата се користи како работна техника и доколку постои линеарна корелација помеѓу мерното својство и концентрацијата на испитуваниот аналит, тогаш равенката што одговара на линеарната зависност помеѓу мерното својство во волтаметријата (интензитетот на струјата на пикот) и концентрацијата на аналитот, нуди можност да се определи непознатата концентрација на дефиниран аналит.

При експериментални мерења со примена на стандардни раствори, се следи зависноста од интензитетот на мерното својство како функција од концентрацијата на испитуваниот аналит (слика 16).



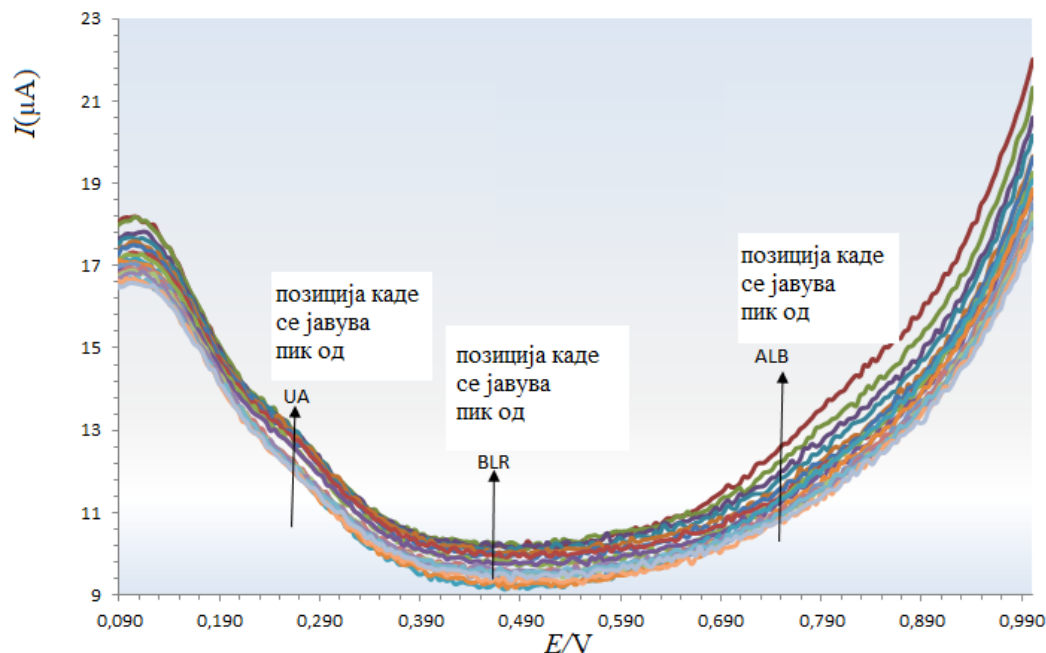
Слика 16. Приказ на зависноста на определено мерно својство (интензитет на струја на волтаметриски пик) како функција од моларната концентрација (c) на даден аналит. Равенката на линеарната права овозможува определување на непозната концентрација, во ситуација кога мерното својство (I) ќе биде определено од мерењето на непознатата концентрација на аналитот.

Линијата што најдобро ги поврзува сите точки добиени од мерењата се добива со т.н. регресивна анализа и се нарекува регресиона права. Правата добиена на ваков начин има наклон дефиниран како „ a “, и отсечок на y -оската дефиниран како „ b “. Вредностите „ a “ и „ b “ во суштина се бројни вредности што ги добиваме од програмот што го користиме при регресионата анализа. На сл. 16 наклонот „ a “ има вредност 0,6 а отсечокот „ b “ има вредност од 1,24. Доколку ги знаеме вредностите на наклонот и отсечокот од линеарната права, во ситуација кога вредноста на мерното својство „ I “ (интензитетот на струјата на пикот во волтаметриските мерења) на аналит со непозната концентрација ја измериме експериментално, тогаш концентрацијата на непознатиот аналит може да се пресмета според изразот: $c = (I - b)/a$. Во последниот израз, со „ c “ е означена концентрацијата на непознатиот аналит, а со „ I “ е означена вредноста на интензитетот на

струјата на волтаметрискиот пик што се анализира, додека „ a “ и „ b “ се вредностите на наклонот и отсечокот добиени од стандардната регресиона анализа на калибрациската крива. Степенот на меѓусебна корелација помеѓу мерните својства и концентрациите на определуваниот аналит најчесто го дава параметарот именуван како „коэффициент на корелација“ што има ознака R^2 . R^2 има вредности помеѓу 0 и 1, при што колку вредноста на R^2 е поблиску до 1, толку корелацијата помеѓу мерното својство и концентрацијата на аналитот што се определува е подобра. Сите денешни компјутерски пресметковни програми, достапни на комерцијална основа, имаат сопствен алгоритам што овозможува релативно едноставно пресметување на параметрите што се неопходни при статистичка обработка на податоци, што е неопходна во аналитички цели.

Важни параметри во статистичката обработка на податоци во аналитички цели се граница на детекција (анг. limit of detection, LOD) и граница на квантификација (анг. limit of quantification, LOQ). Во волтаметријата, границата на детекција (LOD) се дефинира како најмалата концентрација на аналитот што дава сигнал (пик) што може недвосмислено да се разликува (според интензитетот) од интензитетот на слепата проба (или blank на основниот електролит во волтаметријата), што е измерена на потенцијал при кој се јавува сигналот (пикот) од аналитот. Границата на детекција (LOD) се пресметува според изразот: $LOD = 3 \times SD/a$, каде SD е стандардна девијација на слепата проба, додека „ a “ е наклонот на калибрациската крива на соодветната концентрациска зависност на мерното својство од концентрацијата на испитуваниот аналит. Границата на квантификација (LOQ) се дефинира како најмалата концентрација на дефиниран аналит, при која тој аналит може да се определи со дефинирана точност. Границата на квантификација (LOQ) најчесто се пресметува според изразот: $LOQ = 3,3 \times LOD$.

На слика 17 е прикажана серија од „blank“-ови, односно волтамограми измерени само во присуство на пуфер во електрохемиската ќелија. Притоа, за статистичка анализа што се прави во неопходните пресметки за граница на детекција и граница на квантификација на дефинираните аналити, во хуман серум се мерат интензитетите на струите на квадратно-брановите нет-волтамограми, на позиции (потенцијали) каде се јавуваат пиковите од урична киселина, билирубин и албумин, како што е прикажано на слика 17.



Слика 17. Серија од нет-квадратно-бранови волтамограми снимени со EPPGE како работна електрода во присуство само на основниот електролит (фосфатен пуфер со pH = 7,34) во електрохемиската ќелија. За статистички цели, потребно е да се измерат струите на потенцијали на кои се дефинираат пиковите од урична киселина, билирубин и албумин, како што е прикажано на кривите.

4.2. Согласноност од етичка комисија

Сите експериментални мерења беа изведени во согласност со етичките упатства и регулативи што важат во Република Северна Македонија. Информирана согласност беше добиена од сите субјекти, а сите методи беа изведени во согласност со релевантните упатства и регулативи на Етичкиот комитет на Факултетот за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ во Штип, вклучувајќи човечки субјекти под протокол број 0801-2/13 на 16 февруари 2022 година. Венска крв за анализа беше собрана од здрави пациенти и од пациенти со различни патологии. Волонтерите беа целосно информирани за експерименталните аспекти на студијата пред нивното учество. Потоа, од собраните примероци на полна крв беше изолиран серум, согласно стандардните протоколи.

5. ФИЗИОЛОШКИ И БИОХЕМИСКИ СВОЈСТВА НА УРИЧНА КИСЕЛИНА, БИЛИРУБИН И АЛБУМИН

Бидејќи во претходното поглавје (3) беа опишани некои од електрохемиските сензори за детекција на урична киселина, билирубин и албумин, во овој дел накратко заради потсетување се опишани некои од поважните физиолошки и биохемиски својства на овие молекули. Продукцијата и метаболизмот на УА се комплексни процеси што вклучуваат различни фактори што ја регулираат хепаталната продукција, како и реналната и гастроинтестиналната екскреција на оваа компонента. УА е краен продукт на егзогениот пул (анг. „pool“) на пурины и на ендогениот метаболизам на пурины. Егзогениот пул варира значително со диета додека ендогеното производство на УА главно произлегува од црниот дроб, цревата и други ткива како мускулите, бубрезите и васкуларниот ендотел [69].

УА е хетероциклична органска молекула со формула $C_5H_4N_4O_3$ (7,9-дихидро-1H-пурин-2,6,8(3H)-трион) и моларна маса од 168 g/mol. Многу ензими учествуваат во конверзијата на двете пурински нуклеотидни бази, аденин и гванин, во урична киселина. Почетно, аденозин монофосфатот (АМР) се конвертира во инозин преку два различни механизми; доаѓа до прво отстранување на amino група со деаминаза при што се формира инозин монофосфат (ИМР) проследено со дефосфорилирање со нуклеотидаза за формирање на инозин, или со отстранување на фосфатна група со нуклеотидаза за формирање на аденозин проследено со деаминација за формирање на инозин [70].

Гванин монофосфатот (GMP) се конвертира во гванозин со нуклеотидаза. Нуклеозидите, инозин и гванозин, потоа се конвертираат во пуринска база хипоксантин и гванин, соодветно, од страна на пуринска нуклеозид фосфорилаза (PNP). Хипоксантинот потоа се оксидира во ксантин со помош на ксантин-оксидаза (ХО), а гванинот се деаминира во ксантин под дејство на гванин-деаминаза. Ксантинот потоа повторно се оксидира под дејство на ксантин-оксидаза при што се формира крајниот продукт, УА. Слика 18 го прикажува ензимскиот пат на деградација на пурините.



Слика 18. Ензимска деградација на пурините кај луѓето [70].

При физиолошко рН, UA е слаба киселина со рKa од 5,8. Уричната киселина главно постои во форма на урат, што е сол на уричната киселина. Со зголемување на концентрацијата на урат во крвта, се зголемува формирањето на кристали од урична киселина. Нормалниот референтен опсег на UA во хуман серум е од 240 – 420 $\mu\text{mol/L}$. Растворливоста на уричната киселина во вода е ниска. Кога нивото на урична киселина е поголемо од 420 $\mu\text{mol/L}$ се формираат кристали од урична киселина како мононатриум урат (MSU). Во човечкиот организам не е можно UA да биде оксидирана до порастворливо соединение алантоин поради недостатокот на ензимот уриказа. Најголемиот дел од дневното исфрлање на UA се одвива преку бубрезите [71].

Концентрацијата на урична киселина може да се измери во серум, плазма, урина и во кондензат на издишан воздух. Одредувањето на концентрацијата на урична киселина вклучува методи со фосфоволфрамова киселина, ензимски (уриказни) методи, со помош на течна хроматографија со висок притисок (анг. high pressure liquid chromatography, HPLC), системи за сува хемија и биосензорски методи. Пред одредувањето на урат во урината, може да биде потребна алкализација на урината, поради тоа што уратите кристализираат при рН помало од 5,75 [72].

Производството и катаболизмот на пурините е релативно константно помеѓу 300 и 400 mg на ден. Бубрезите елиминираат приближно 2/3, додека гастроинтестиналниот тракт елиминира 1/3 од уричната киселина. Скоро целата UA се филтрира од страна на гломерулите, додека постгломеруларната реапсорпција и секреција ја регулира количината на екскретирана урична киселина. Во проксималните тубули се врши реапсорпција и секреција на урична киселина, и приближно 90% се реапсорбира во крвта. Ова главно е постигнато на проксимално тубуларно ниво со транспортери кои ги разменуваат интрацелуларните ањони за урична киселина. Скоро сите реапсорпции на урична киселина се случуваат во S1 сегментот на проксималниот тубул. Во S2 сегментот на проксималниот тубул, уричната киселина се секретира во поголема мера отколку што се реапсорбира. Постсекреторната реапсорпција се случува на дисталниот дел на проксималниот тубул, и приближно 10% од филтрираната урична киселина се појавува во урината [69].

Хиперурикемија е клучен ризик-фактор за развој на гихт (подагра), бубрежна дисфункција, хипертензија, хиперлипидемија и дијабетес. Хиперурикемија се јавува како резултат на зголемено производство на UA, нарушена бубрежна екскреција на UA, или комбинација од двете [73]. Оваа состојба се карактеризира со високо ниво на урична киселина во крвта, што предизвикува депозиција (натрупување) на уратни кристали во зглобовите и бубрезите [74]. Генерално, хиперурикемија кај возрасните се дефинира како концентрација на урична киселина во крвта повеќе од 7,0 mg/dL кај мажите и 6,0 mg/dL кај жените. Кај здравите луѓе, уричната киселина се екскретира преку урината. Сепак, екскрецијата на уричната киселина може да биде ослабена при болести на бубрезите, што води до хиперурикемија [71].

Покрај проблемите со излучувањето на UA поради дисфункција на бубрезите, хиперурикемија може да се јави и од зголемено генерирање на урична киселина. Диети богати со пурин или фруктоза, или изложеност на олово исто така може да придонесат за високи нивоа на урична киселина. Фруктозата е уникатна шеќерна молекула бидејќи брзо го исцрпува АТР и ја зголемува количината на урична киселина. Кај одредени луѓе, недостатокот на ензими како резултат на генетски мутации исто така може да предизвика зголемено ниво на урична киселина во крвта. Така на пример, хипоксантин-гванин

фосфорибозил трансферазата (HGPRT) го катализира формирањето на IMP и GMP за рециклирање на пуринските бази со 5-фосфорибозил- α -пирофосфат (PRPP) како ко-супстрат. Леш–Нихан-овиот синдром, ретко наследено X-поврзано нарушување предизвикано од недостаток на ензимот HGPRT, доведува до акумулација на пурини и PRPP, кои се користат во спасувачкиот пат (salvage) на хипоксантин и гванин. Дефектот на HGPRT резултира со акумулација на хипоксантин и гванин, што дополнително доведува до високи нивоа на урична киселина. Вишокот PRPP исто така ја зголемува стапката на *de novo* синтеза на пурини и последователно го промовира производството на неговиот краен деградационен продукт, урична киселина.

Леш–Нихан-овиот синдром е резултат на акумулација на високи нивоа на урична киселина во телото почнувајќи од раната детска возраст, што доведува до тешка подагра, бубрежна дисфункција, ментална ретардација, невролошки дефекти и самоуништувачко однесување [71]. Високото ниво на урична киселина во крвта долго време се поврзува со подагра. Подагра (гихт) е медицинска состојба која се карактеризира со црвени, чувствителни, топли и надуени зглобови предизвикани од повторливи напади на акутен воспалителен артритис. Мажите имаат поголем ризик да развијат гихт во споредба со жените поради повисоките основни нивоа на урична киселина во крвта. Патолошки, гихтот е предизвикан од зголемување на нивото на урична киселина во крвта, што доведува до натрупување на кристали во зглобовите, тетивите и другите ткива и бубрежни камења со урична киселина.

Од неодамна, гихтот е поврзан со кардиоваскуларните болести. Покрај тоа, многу студии ја поврзуваат хиперурикемијата како фактор на ризик на кардиоваскуларните болести, вклучувајќи хипертензија, метаболен синдром и коронарна артериска болест, како и со тесно поврзани васкуларни заболувања како што се цереброваскуларни болести, васкуларната деменција, прееклампсија и болести на бубрезите [71, 75].

Клиничките студии покажаа дека хиперурикемијата е поврзана со зголемена активност на плазмениот ренин кај пациенти со хипертензија. Модел на блага хиперурикемија третирана со инхибитор на уриказа разви хипертензија по неколку недели поради бубрежна вазоконстрикција посредувана од UA со активирање на системот ренин-ангиотензин (RAS) [76].

За разлика од хроничната хиперурикемија, акутното зголемување на нивото на UA во плазмата може да предизвика различни корисни ефекти кај луѓето. Администрацијата на UA го зголемува антиоксидативниот капацитет во плазмата, го намалува оксидативниот стрес поврзан со вежбање кај здрави испитаници и ја обновува ендотелната функција кај пациенти со дијабетес тип 1 и редовни пушачи. UA, како значаен антиоксидант, кој сочинува и до 60% од антиоксидативниот капацитет во плазмата, може да вклучи различни механизми на дејство. UA е чистач (отстранувач) на слободни радикали кој го стабилизира витамин C во серумот.

Во концентрации блиски до физиолошките нивоа кај луѓето, UA спречува инактивација на екстрацелуларната супероксид-дизмутаза (ecSOD) (индуцирана од водород пероксид), ензим што ги отстранува супероксидните анјони ($\bullet\text{O}^{2-}$). Исто така, предложено е дека UA се спротивставува на оксидативното оштетување поврзано со атеросклероза и стареење кај луѓето. Сумирани заедно, овие наоди имплицираат дека UA може да дејствува повољно во зачувувањето на васкуларната функција.

Прооксидантните и проинфламаторните дејства припишани на UA може да бидат резултат на конверзија на ксантин дехидрогеназа во ксантин оксидаза и на

последователната акумулација на реактивни кислородни видови (анг. reactive oxygen species, ROS) кои се јавуваат паралелно со производството на UA како ефект на деградацијата на ATP при исхемични услови. Во овој случај, производството на ROS може да предизвика инфламаторна реакција и оштетување на артерискиот ѕид што се припишува на вишокот на UA. Хиперурикемијата има различен, заштитен ефект во невродегенеративните болести, вклучувајќи болести како Паркинсоновата болест (PD), мултиплекс склероза и Алцхајмерова болест/деменција. На пример, поголемите нивоа на UA го намалуваат ризикот од Паркинсонова болест и го намалуваат ризикот од прогресија на болеста. Иако поврзаните механизми веројатно се хетерогени, повеќето теории инкорпорираат одредена улога за добро опишаниот антиоксидативен ефект на UA.

Билирубин е релативно комплексна органска молекула со моларна маса од 584,66 g/mol. Дневно се произведува приближно 4 mg билирубин на kg телесна маса од протеини што содржат хем од еритроидни и не-еритроидни извори. Хемоглобинот, ослободен од распаѓањето на старите еритроцити, е главен еритроиден извор, но секако значаен придонес има и слободниот хем и хемоглобин што се произведува но, не се вградува во зрелите еритроцити (неефикасна еритропоеза). Приближно 20% од вкупното дневно производство на билирубин обично е од други хемопротеини, главно во црниот дроб, како што се цитохромите, каталаза, пероксидаза и триптофан пиролаза [77].

Хемот е витален за аеробниот живот, бидејќи е есенцијален за дишење, за транспорт на електрони, оксидо-редукциски процеси, метаболизам на лекови и детоксикација. Хемот не се транспортира од клетка до клетка, при што секоја клетка синтетизира хем според своите потреби. Интрацелуларните нивоа на хем се регулираат со специфична рамнотежа помеѓу синтеза, екскреција и деградација. Деградацијата на хем во телото е катализирана од мембранско-сврзан ензим, хем-оксигеназа, кој користи O₂ и никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADP) како кофактори. Производи на оваа реакција се јаглероден моноксид, железо и биливердин. Биливердинот веднаш се редуцира во билирубин под дејство на цитоплазматски ензим, биливердин редуктаза. Билирубинот практично е нерастворлив во вода и истиот може да се транспортира само доколку е врзан за албуминот од крвната плазма. Ваквиот билирубин се означува како неконјугиран (индиректен) билирубин. Поголемиот дел од билирубинот што се формира се конвертира во црниот дроб со специфичен глукуронил трансферазен ензим, во билирубин глукуронид кој потоа се излачува во жолчката [78].

антиинфламаторни лекови што го дислоцираат билирубинот од неговите врзувачки места за албумин, зголемувајќи го нивото на неврзан билирубин. Незрелоста на крвно-мозочната бариера кај новороденчињата воглавно се смета како причина за подложност на kernicterus [77].

Од самото постоење па сè до смртта зависиме од молекуларниот кислород, токсични бирадикални видови кои го поттикнуваат оксидативното фосфорилирање и од производството на енергија. Неизбежна последица на оваа зависност, сепак, е формирањето на реактивни кислородни слободни радикални видови како $O_2^{\cdot-}$ (супероксиден радикален анјон) и реактивниот и токсичен хидроксилан радикал ($\cdot OH$). Иако овие видови можат да бидат корисни (на пр., како оружје во бактерицидната фагоцитоза), тие се потенцијално штетни затоа што можат да иницираат слободно-радикален синџир на реакции кои на крајот водат до клеточно и биомолекуларно оштетување. Овие окси-радикали, и нивните реакции со липидните пероксиди, се сè почесто посочувани како фактори кои придонесуваат за појава или влошување на многу болести, вклучувајќи рак, кардиоваскуларни болести, бронхопулмонална дисплазија, емфизем и оштетувања од исхемија-реперфузија и како агенси во основата на стареењето.

Против овие реактивни окси-радикали и нивните реакциони продукти постојат низа ендогени одбранбени антиоксидативни ензими. Тие вклучуваат каталаза, супероксид дисмутаза, церулоплазмин и системот глутатион пероксидаза-глутатион редуктаза. Овие одбранбени ензими се поддржани од група на помали, непротеински, неензимски молекули, како витамин Е (α -токоферол), β -каротен, аскорбинска киселина и UA. Овие супстанции се сметаат дека играат дополнителна улога во блокирањето на оксидативното оштетување, особено во плазмата и во клеточните мембрани. Пред околу 35 години било предложено дека билирубинот можеби е важен, но занемарен член на оваа група ендогени антиоксиданти поради неговите силни антиоксидативни својства. Новите студии, опишани подоцна, дадоа дополнителна поддршка на ова гледиште [78].

Лесната хипербилирубинемија може да има заштитен ефект против исхемична кардиоваскуларна болест и рак. Во една неодамнешна студија на голема популација, шансите за намалување на колоректален рак биле 0,295 кај мажи и 0,186 кај жени за секое зголемување од 1 mg/dL на нивоата на билирубин во серумот. Исто така, познато е дека постои инверзна врска помеѓу нивоата на билирубин во серумот и смртноста од рак [80].

Неконјугираниот билирубин не е само моќен липидорастворлив антиоксидант кој ги прекинува последователните реакции. Тој, исто така, го заробува и брзо реагира со друг, нерадикален, облик на кислород—синглет кислород. Синглет кислородот е обичен диоксиген кој е подигнат на метастабилно енергетско ниво над неговото нормално основно енергетско ниво. Тој е многу токсичен и се смета дека е интермедиер главно одговорен за најголем дел од кожните оштетувања забележани кај пациенти со фотосензитивни порфирични болести [78].

Албуминот е најзастапениот циркулирачки протеин што се наоѓа во плазмата, со моларна маса од 66,5 kDa. Тој претставува половина од вкупната протеинска содржина на протеини (32-50 g/L) во плазмата кај здрави луѓе. Албуминот се синтетизира од хепатоцитите при што многу малку се складира во црниот дроб, а поголемиот дел од него брзо се излачува во крвотокот. Хуманиот албумин дејствува како најзначаен модулатор на плазма-онкотскиот притисок и функционира како транспортер на различни супстанции наречени лиганди.

Оние лиганди кои се транспортирани од серумскиот албумин вклучуваат ендогени лиганди како билирубин, јони, масни киселини и егзогени лиганди како лекови. Списокот на лекови кои се транспортираат со албумин вклучува метадон, пропранолол, тиопентал, фуросемид, варфарин, метотрексат, алфентанил и многу други [81]. Тешките болести на црниот дроб може да резултираат со хипоалбуминемија, што доведува до помал број на достапни места за врзување на лекови. Ова резултира со поголеми количини на неврзани егзогени лекови, што може да доведе до зголемена осетливост на лекот. Оваа осетливост се манифестира кога пациентите имаат серумски концентрации на албумин помали од 2,5 g/dL.

Откако албуминот ќе влезе во циркулацијата, околу 30% до 40% останува во крвотокот, а остатокот влегува во интерстициелниот простор. Поголемиот дел од протеинот што ја напушта циркулацијата потоа се враќа во циркулацијата преку лимфниот систем. Циркулаторниот полуживот на албуминот е 16 часа. Поголемиот дел од онкотскиот ефект на албуминот се припишува на неговата голема молекулска тежина (66,5 kDa), додека остатокот се смета дека произлегува од неговиот негативен полнеж. Ова последното му овозможува на албуминот да привлече позитивно наелектризираны молекули и на крај, вода во интраваскуларниот простор [81].

Албуминот се администрира кај пациенти на кои е потребно да им се зголеми волуменот на крв и да се подобри транспортот на протеини. Како лабораториска вредност, серумскиот албумин, исто така, може да им помогне на лекарите за добивање на увид во функцијата на црниот дроб на пациентите или способноста да биосинтетизираат протеини и фактори од витално значење за вкупната телесна хомеостаза [82-84]. Во лабораторија, говедскиот серумски албумин се користи како лабораториски стандард [85, 86].

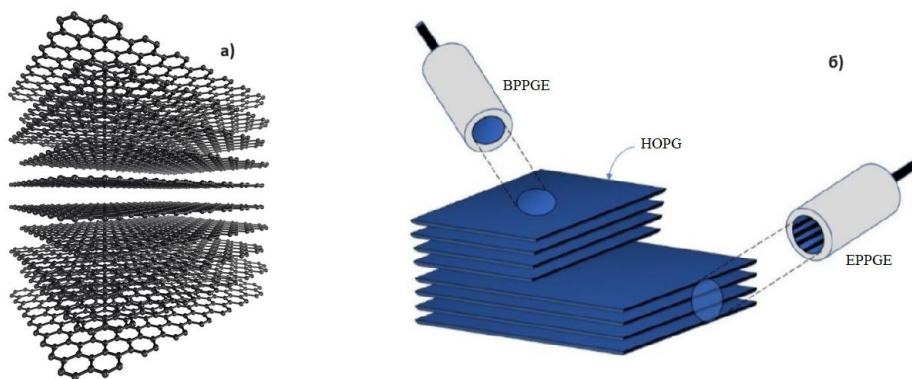
Некои пациенти што се неухранети имаат хипоалбуминемија или ниско ниво на серумски албумин. Ефектите од гладувањето може да се јават брзо, што води до намалување на албуминот за една третина во рок од 24 до 48 часа од почетокот на гладувањето. Сепак, ова брзо се менува со надополнување, со што се враќа способноста на црниот дроб за синтеза на албумин во рок од 15 до 30 минути. Бидејќи неухранетоста е поврзана со несакани настани во постоперативниот период, таа најчесто се користи како клиничка мерка за нутритивна оптимизација и подготвеност за операција. Албуминот е една од многуте лабораториски анализи што се користат за да се процени нутритивниот статус на пациентот [87].

6. КРАТОК ПРЕГЛЕД НА РАБОТНИ ЕЛЕКТРОДИ ВО ВОЛТАМЕТРИЈА ШТО СЕ ДИЗАЈНИРАНИ СО ОБРАБОТКА НА ЈАГЛЕРОД

Историјата на користење на јаглерод како материјал за електрода датира од почетокот на XIX-тиот век кога за прв пат е употребена графитна електрода за електрохемиска екстракција на алкални метали [88]. Материјалот во форма на јаглеродна паста (анг. carbon paste) за првпат бил користен во електроанализа во 1958 година од страна на R.N. Adams [89]. Carbon paste електродата била дизајнирана како алтернатива на живината електрода во форма на капка и на почетокот нејзината употреба била фокусирана на оксидација на јодидни јони. Оттогаш, употребата на јаглерод како материјал за работна електрода доживува голем прогрес, а денес јаглеродните електроди се широко употребувани во електроаналитички цели [88, 90, 91]. Популарноста на јаглеродот како материјал за дизајн на работни електроди во електрохемијата главно се должи на неговите нетоксични својства, ниската цена, достапноста на различни типови на јаглеродни материјали, добрата електрична спроводливост, поширокиот потенцијален опсег од опсегот на металните електроди, неговата хемиска и електрохемиската инертност и стабилност, можноста за користење како во водени, така и во неводени медиуми, како и можностите што ги нудат јаглеродните електроди за едноставна површинска модификација преку силни ковалентни или нековалентни врски со голем број на површински модификатори [92]. Поради големиот број на активни микро-површини во структурата на јаглеродните електроди, овие електроди лесно се подложни на адсорпција на органски соединенија. Адсорпциските феномени на површината на јаглеродните електроди често доведуваат до онечистување на нивната работна површина, при што значително се блокира пристапот на аналитите до работните површини. Притоа, овие адсорпциски процеси покажуваат значително влијание врз брзината на размена на електрони на јаглеродните работни електроди со молекулите од аналитите што се испитуваат. За да се добијат репродуцибилни резултати при употребата на јаглеродни електроди, потребно е да се примени процедура (протокол) за перманентно чистење на нивната површина. Применетиот протокол за чистење на работната површина од јаглеродните електроди најчесто зависи од природата на користениот јаглероден материјал. Јаглеродот и неговите алотропски модификации (графит, графен и дијамант) најчесто се употребуваат за конструирање на работни електроди во волтаметрија, како што се GCE, CPE, BDDE, фулерени (C₆₀), графен и многу други.

Графитот е широко распространета природна алотропска модификација на јаглеродот, што се карактеризира со висока термичка стабилност. Неговата структура се состои од паралелни слоеви со конјугирани, хексагонални ароматични јаглеродни прстени, меѓусебно поврзани со σ и π врски (слика 20a). Постојењето на делокализирани π орбитали овозможува слободно движење на електроните паралелно со слоевите во структурата на графитот. Поради овие структурни карактеристики, графитот покажува релативно висока електрична спроводливост. Затоа, графитот е добар материјал од кој можат да се дизајнираат работни електроди што наоѓаат широка примена во електрохемијата. Графитните слоеви во структурата на графитот се поврзани меѓу себе со слаби Ван дер Валсови сили, што ги прави лесни за раздвојување. Како резултат на тоа, графитот е најмека алотропска форма на јаглеродот, а тоа го прави материјал што е лесно подложен на абразија. Синтетичкиот графит се добива со контролирана пиролиза на нискомолекуларни јаглеводороди (при околу 800 °C). Добиениот производ потоа се

подложува на термичка обработка на повисоки температури. Пиролитичниот графит може се трансформира во високоподреден пиролитички графит (анг. highly ordered pyrolytic graphite, HOPG) со жарење на приближно 3 000 °C, под притисок од неколку килобари [93]. HOPG (слика 20б) е материјалот што најчесто се користи во конструкцијата на графитни работни електроди [88]. Анизотропната структура на HOPG овозможува (во зависност од начинот на сечење) да се добијат два типа на електроди со различни својства и тоа: електрода од странично ориентиран пиролитичен графит (EPPGE) и електрода од челно ориентиран пиролитичен графит (анг. basal plane pyrolytic graphite electrode, BPPGE) [94]. Како резултат на сечењето на HOPG долж неговата кристална решетка се добива EPPGE. Од друга страна, BPPGE може да се формира со сечење преку кристалната решетка на HOPG (слика 20б).



Слика 20. а) Структура на графит; б) конструкција на електрода од странично ориентиран пиролитичен графит (edge plane pyrolytic graphite electrode - EPPGE) и електрода од челно ориентиран пиролитичен графит (basal plane pyrolytic graphite electrode - BPPGE) со обработка (дефинирано сечење) на високо-подреден пиролитичен графит (highly ordered pyrolytic graphite - HOPG)

6.1. Електрохемиски својства на EPPGE

Дебатата за електрохемиската активност на базалната рамнина во однос на активноста на страничната (рабна) рамнина на графитот трае повеќе од 50 години.

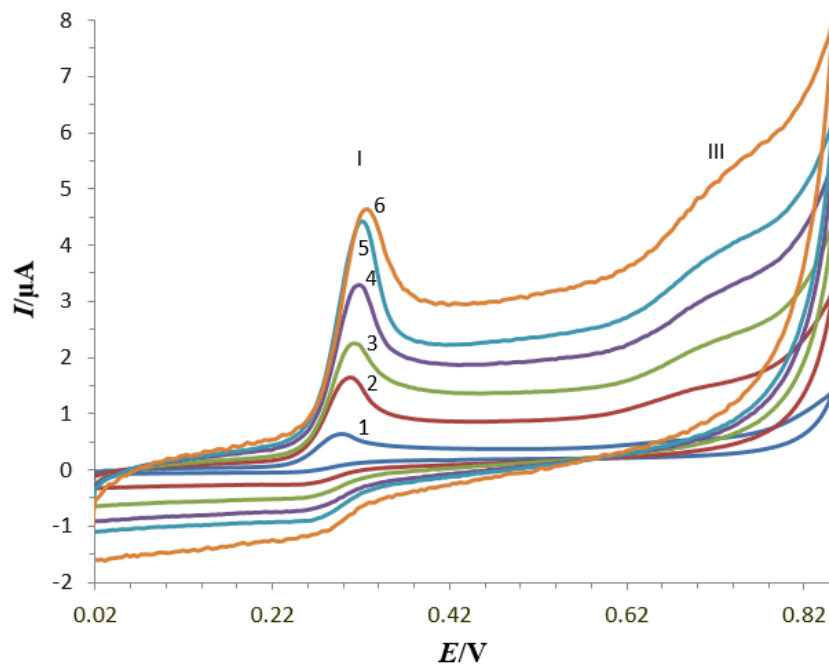
Иницијалните студии покажале дека страничната рамнина (или рамнината на работ) од HOPG (слика 20б) поседува изразена електрохемиска активност, додека пак базалната рамнина покажува релативно ниска електрохемиска активност. Овие информации се добиени од голем сет на електрохемиски студии каде е испитувана брзината на пренос на електрони на EPPGE и BPPGE преку тестирање на електрохемиската активност на различни аналити [95]. Дополнително, преку студии во кои е следен степенот на адсорпција на разни површинско активни аналити, покажано е дека ваквите липофилни аналити покажуваат поголема склоност за адсорпција на електродите базирани на рамнина на рабовите (edge plane) отколку на базалните рамнини од пиролитичките електроди. Примената на EPPGE во електроанализата на разни биохемиски системи опширно е елаборирана во трудот [96]. Денес, во најголем дел од електроаналитичките студии, EPPGE почнува сè повеќе да се употребува како работна електрода, при што на EPPGE се гледа како на алтернатива за GCE.

7. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

7.1. Циклична волтаметрија на хуман серум

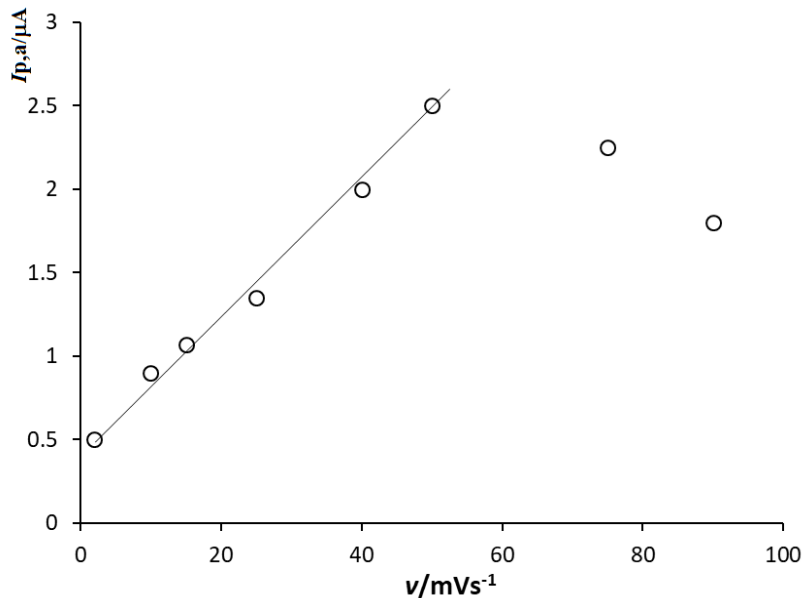
Цикличната волтаметрија многу често е примарна техника што се применува за директна детекција на важни аналити присутни во биолошки примероци (хормони, DNA, витамини, голем број метаболити). Покрај тоа, CV се користи и како алатка што е способна да даде податоци за редокс статусот на биолошките примероци, да изврши проценка на оксидативното оштетување на клетките, ефикасно да ги студира интеракциите помеѓу дефинирани аналити, како и да обезбеди пристап до кинетички и термодинамички параметри што се важни за процеси што се случуваат во биолошките примероци [6]. Детален преглед на најважните примени на CV во анализата на биолошки примероци е дадена во одличниот прегледен труд на Wang и соработниците [97]. Еден од заедничките заклучоци на сите волтаметриски студии што се однесуваат на примена на CV на хуман серум е исклучително високиот степен на загадување на работните електроди. Секако, тоа се должи на адсорпциските својства на голем број липофилни и волуменозни молекули што се присутни во хуман серум. Кога се работи за анализа на хуман серум со CV со примена на GCE или Pt како работни електроди, тогаш дополнителен заеднички заклучок е присуството на два електрохемиски процеси дефинирани преку два пара на пикови што се појавуваат на потенцијали од околу +0,3 V и на +0,7 V (во однос на потенцијалот на Ag/AgCl референтна електрода) [98].

На слика 21 се прикажани иницијалните скенови од циклични волтамограми снимени во услови кога 0,25 mL хуман серум од здрав пациент се растворени во 20 mL фосфатен пуфер во електрохемиската ќелија. Волтамограмите се снимени при брзини на промена на потенцијалот од 2 mV/s до 90 mV/s, со примена на EPPGE како работна електрода. Важно е да се напомене дека со употреба на други електроди базирани на јаглерод скоро е невозможно да се добијат волтаметриски одговори со примена на CV во хуман серум.



Слика 21. Иницијални циклични скалести волтамограми (први скенови) на 0,25 mL хуман серум растворен во 20 mL фосфатен пуфер. Брзината на промена на потенцијалот што соодветствува со цикличните волтамограми е: 2 mV/s (1); 10 mV/s (2); 25 mV/s (3); 40 mV/s (4); 50 mV/s (5) и 90 mV/s (6). Потенцијаниот чекор при овој сет на експерименти е 2 mV. Како работна електрода е користена EPPGE. Концентрациите на компонентите во електрохемиската ќелија, присутни во примерокот хуман серум се: $c(\text{албумин}) = 13,94 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{билирубин}) = 0,35 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{урична киселина}) = 6,94 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{глюкоза}) = 133,41 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{креатинин}) = 1,77 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{уреа}) = 163,41 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{холестерол}) = 87,56 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{триглицериди}) = 30,73 \mu\text{mol/L}$.

На сите волтамограми претставени на слика 21 се забележува еден добро дефиниран електрохемиски процес на околу +0,300 V, како и еден послабо дефиниран електрохемиски процес, чиј пик се појавува на околу +0,720 V. Формата и позицијата на на двата електрохемиски процеси од цикличните волтамограми во однос на потенцијалната оска на слика 21, во голема мера се слични на студии на хуман серум што се изведени со други видови на електроди, пред сè GCE [97]. Првиот електрохемиски процес покажува карактеристики на квазиреверзибилен процес [6], со добро дефиниран интензивен директен (аноден) пик, и повратен (катоден) пик што е со многу помал интензитет. Потенцијалот на анодниот пик од овој процес се поместува кон попозитивни вредности со зголемувањето на брзината на промена на потенцијалот и тоа: од +0,302 V (при брзина на промена на потенцијал од 2 mV/s) до +0,334 V (при брзина на промена на потенцијал од 90 mV/s). Вториот волтаметрички пик што се дефинира на потенцијали од околу +0,720 V поседува својства на електрохемиски иреверзибилен процес, во рангот на аплицирани брзини на промена на потенцијал. Добрата дефиниција на анодниот пик од електрохемискиот процес што егзистира на потенцијали од околу +0,300 V дава можност да се направи зависност на интензитетот (пик-струјата) на овој пик како функција од аплицираните брзини на промена на потенцијалот.

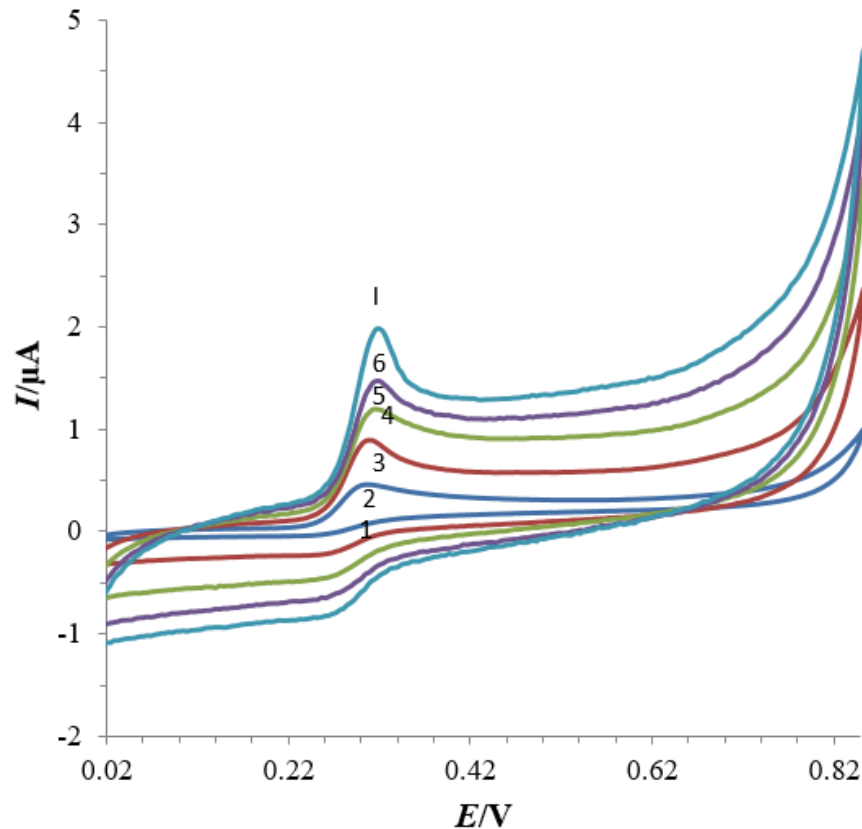


Слика 22. Зависност на струјата на анодниот пик што е дефиниран на потенцијал од околу $+0,300 \text{ V}$ на цикличните волтамограми од слика 21, како функција од брзината на промена на потенцијалот. Останатите услови се идентични како тие на слика 21.

Од зависноста претставена на слика 22 може да се забележи дека струјата на анодниот пик од процесот што се јавува на потенцијал од околу $+0,300 \text{ V}$ на цикличните волтамограми од слика 21 е линеарно зависен параметар од брзината на промена на потенцијалот (v) во ранг од 2 mV/s до 50 mV/s . При брзини на промени на потенцијалот поголеми од 50 mV/s доаѓа до намалување на струјата на анализираниот аноден пик. Ова однесување претставено на слика 22 најчесто е карактеристично за електрохемиски процеси што се одвиваат од адсорбирана состојба [6].

На слика 23 се прикажани вторите скенови од цикличните волтамограми снимени при идентични услови како тие на слика 21. Забележливо е дека интензитетот на првиот пар на пикови што се одвиваат на околу $+0,300 \text{ V}$ на волтамограмите од слика 23 е значително намален во однос на соодветните пикови од слика 21. Покрај тоа, во овие втори скенови од цикличните волтамограми, скоро целосно исчезнува пикот што се јавува на потенцијал од околу $+0,720 \text{ V}$. Понатамошните скенирања доведуваат до значителни намалувања во интензитетот и на првиот пар на пикови, кои скоро целосно исчезнуваат од цикличните волтамограми после третата серија на последователни скенирања. Овие податоци се во целосна согласност со литературните податоци за студиите на хуман серум со примена на CV на работни електрооди чија површина не е модифицирана. Во најголема мера, овие феномени се последица на значителен степен на деактивација на површината од работната електрода поради силните адсорпциски процеси што се случуваат поради присуството, пред сè на холестерол, триглицериди и голем број липофилни ензими и протеини присутни во хуманиот серум. Дополнително, релативно долгото време потребно за изведување на експериментите во CV е значителен фактор што придонесува за одвивањето на овие адсорпциски ефекти во поголем обем. Поради овие феномени на блокирање на површината од работната електрода, истата мора да биде детално исчистена

по секое завршено единечно волтаметриско мерење, според протоколот што е опишан во експерименталниот дел на докторската работа.

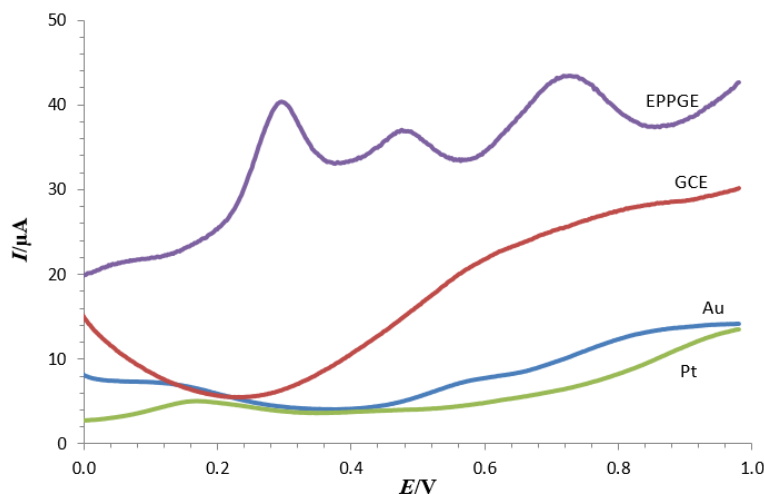


Слика 23. Циклични скалести волтамограми (втори скенови) на 0,25 mL хуман серум растворен во 20 mL фосфатен пуфер. Брзината на промена на потенцијалот што соодветствува со цикличните волтамограми е: 2 mV/s (1); 10 mV/s (2); 25 mV/s (3); 40 mV/s (4); 50 mV/s (5) и 90 mV/s (6). Потенцијаниот чекор при овој сет на експерименти е 2 mV. Како работна електрода е користена ЕРРГЕ. Концентрациите на компонентите во електрохемиската ќелија присутни во примерокот хуман серум се: $c(\text{албумин}) = 13,94 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{билирубин}) = 0,35 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{урична киселина}) = 6,94 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{глукоза}) = 133,41 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{креатинин}) = 1,77 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{уреа}) = 163,41 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{холестерол}) = 87,56 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{триглицериди}) = 30,73 \mu\text{mol/L}$.

Примената на пулсни волтаметриски техники може да обезбеди дополнително подобрување на сите аспекти од волтаметриските одговори во хуман серум. Тоа се должи пред сè на начинот на мерењето на струите во пулсните техники, како и во многу поголемата брзина на изведувањето на волтаметриските експерименти [8]. Во понатамошните студии, SWV е употребена како главна техника во електрохемиските анализи на хуман серум.

7.2. Квадратно-бранова волтаметрија на хуман серум

Резултатите од иницијалните анализи на хуман серум со примена на SWV се елаборирани во трудот [5]. Волтаметрискиот одговор на хуман серум зависи од повеќе фактори, како што се природата на пуферскиот систем, рН на пуферскиот раствор, како и од применетата волтаметриска техника и аплицираните инструментални параметри. Сепак, волтаметриското однесување на хуман серум испитувано во конвенционален триелектроден систем најмногу зависи од природата на работната електрода [5, 99]. Во трудот [99] е покажано дека хуманиот серум покажува многу слаба или речиси никаква електрохемиска активност на електроди изработени од Pt, Au или GCE. Единствено со употреба на SWV како работна техника, со примена на EPPGE, можно е да се добијат волтамограмски одговори на хуман серум што покажуваат добро дефинирани пикови (слика 24) [99].

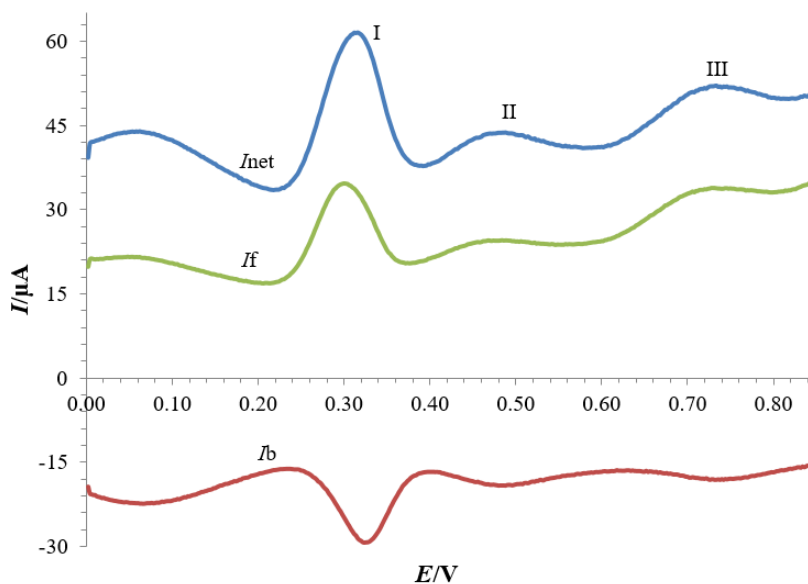


Слика 24. SWV нет-волтамограми на хуман серум со волуменски удел од 2,4% снимени со примена на различни типови на електроди, во фосфатен пуфер (рН = 7,34) како основен електролит. Концентрациите на компонентите во електрохемиската ќелија присутни во примерокот хуман серум се: $c(\text{албумин}) = 12,10 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{билирубин}) = 4,96 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{урична киселина}) = 11,76 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{глукоза}) = 207,56 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{креатинин}) = 1,73 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{уреа}) = 207,3 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{холестерол}) = 249,76 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{триглицериди}) = 43,90 \mu\text{mol/L}$. Хуманиот серум потекнува од пациент со покачени вредности на концентрација на билирубин, урична киселина, албумин и глукоза во крв. Волтамограмите се снимени при фреквенција $f = 50 \text{ Hz}$, квадратно-бранова амплитуда $E_{sw} = 50 \text{ mV}$, потенцијален чекор $dE = 2 \text{ mV}$, почетен потенцијал $E_s = 0,00 \text{ V}$.

Како главна причина за електрохемиската неактивност на хуман серум (и на други биолошки примероци) на електроди од метален тип (Pt, Au), како и на GCE најчесто се наведува комплексниот состав на серумот. Притоа, присуството на големи липофилни супстанции во хуманиот серум многу често доведува до физички феномени (адсорпција, кристализација) на површината од работна електрода. Како последица на овие феномени, често се случува значително блокирање на активната површина на работната електрода, што има големо влијание врз трансферот на електрони помеѓу работната електрода и анализите. Покрај тоа, комплексните механизми на електродна трансформација, како и интеракциите помеѓу разните супстанции присутни во хуманиот серум можат да

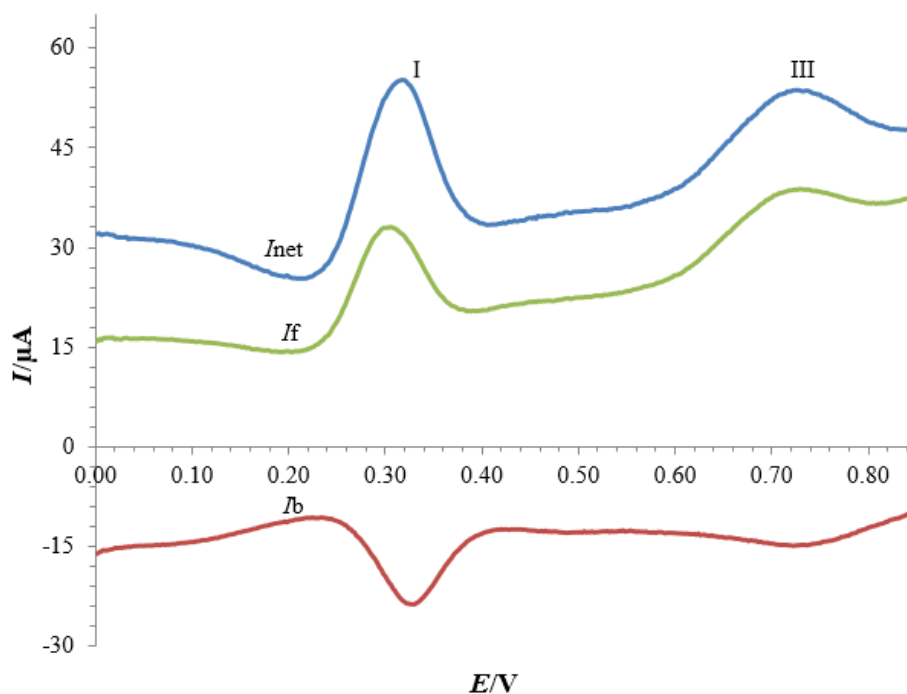
придонесат за голема енергетска бариера во процесот на размена на електрони [100, 101]. Сепак, како што е покажано неодамна во трудовите [5, 99], со употреба на EPPGE како работна електрода, во голема мера можно е да се надмине енергетската бариера во процесот на електронски трансфер помеѓу работната електрода и одредени аналити што се присутни во хуманиот серум. Комбинацијата од EPPGE како работна електрода и брза и осетлива волтаметричка техника како SWV, отвора можности за апликација на овие електрохемиски системи за директна анализа на хуман серум, во постапка која исклучува претходен третман на примерокот за анализа.

На слика 25 е прикажан квадратно-бранов волтамограм добиен со растворање на хуман серум со волуменски удел од 2,4% во фосфатен пуфер. Квадратно-брановиот волтаметрички одговор на овој примерок хуман серум снимен во анодна насока од почетен потенцијал од 0,000 V се карактеризира со три добро дефинирани пикови (пиковите со ознаки I, II и III) кои отсликуваат одвивање на три различни електрохемиски реакции. Првиот пик (пик со ознака I на слика 25) е дефиниран на потенцијал од околу +0,300 V, додека вториот пик (пик со ознака II на слика 25) се дефинира на потенцијал од околу +0,480 V. Третиот пик (пикот со ознака III на слика 25) се појавува при потенцијал од околу +0,720 V. Заедничка карактеристика на сите три електродни процеси прикажани на слика 25 е тоа што покажуваат значителен степен на електрохемиска реверзибилност [8].



Слика 25. Квадратно-бранов волтамограм што ги прикажува вкупната (I_{net}), директната (I_f) и повратната (I_b), струјна компонента добиени при анализа на хуман серум со волуменски удел од 2,4% растворен во фосфатен пуфер со рН = 7,34. Концентрациите на компонентите во електрохемиската ќелија присутни во примерокот хуман серум се: $c(\text{албумин}) = 19,44 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{билирубин}) = 2,03 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{урична киселина}) = 13,59 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{глукоза}) = 277,32 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{креатинин}) = 7,72 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{уреа}) = 609,76 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{холестерол}) = 135,12 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{триглицериди}) = 34,63 \mu\text{mol/L}$. Хуманиот серум потекнува од пациент со покачени вредности на концентрација на билирубин, урична киселина и глукоза во крвта. Волтамограмот е снимен со примена на EPPGE како работна електрода, при фреквенција $f = 50 \text{ Hz}$, квадратно-бранова амплитуда $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$, потенцијален чекор $dE = 4 \text{ mV}$, почетен потенцијал $E_s = 0,00 \text{ V}$.

Сите три електрохемиски процеси, пресликани преку вкупната (I_{net}) струјна компонента на квадратно-брановите волтамограми (пиковите со ознаки I, II и III на слика 25), имаат добро дефинирани пикови и во директна (I_f) и во повратна насока (I_b). Покрај тоа, со вредност близу до 1,0 се карактеризираат сите струи на директните пикови измерени во однос на струите на повратните пикови на процесите I, II и III од слика 25 (при фреквенција од 50 Hz). Од друга страна, положбата во однос на потенцијалната оска на директните и повратните пикови е скоро идентична кај сите три процеси (пиковите I, II и III на слика 25). Како што е наведено во [8], овие параметри се карактеристични за електрохемиски реакции за системи што покажуваат висок степен на електрохемиска реверзибилност во услови на SWV. Важно е да се потенцира дека трите пикови што се дефинирани на квадратно-брановите волтамограми од слика 25 се појавуваат само при анализи на хуман серум од пациенти што имаат покачена концентрација на билирубин. Кај пациенти што имаат нормални вредности на билирубин, квадратно-брановите волтаметриски одговори се состојат од два електрохемиски процеси (пиковите I и III на слика 26), при што не постои добро дефиниран процес што би се пресликал во пик II како на слика 25.

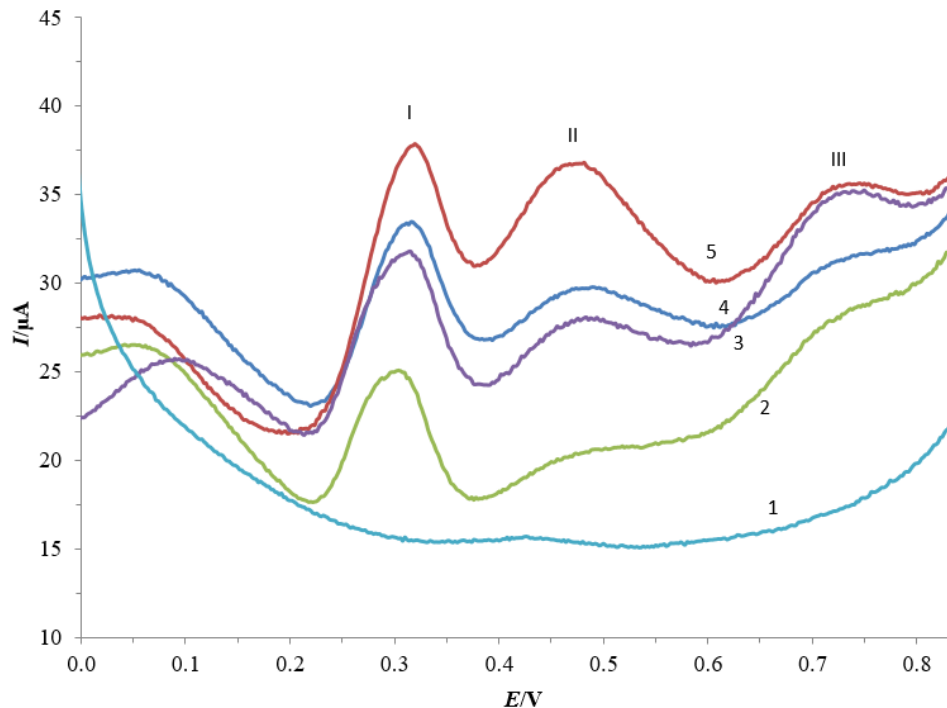


Слика 26. Квадратно-бранов волтамограм што ја прикажува вкупната (I_{net}), директната (I_f) и повратната (I_b) струјна компонента добиена при анализа на хуман серум со волуменски удел од 2,4% растворен во фосфатен пуфер со $pH = 7,34$. Хуманиот серум потекнува од пациент со нормални вредности на концентрацијата на билирубин во крвта. Концентрациите на компонентите во електрохемиската ќелија присутни во примерокот од хуман серум се: $c(\text{албумин}) = 15,40 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{билирубин}) = 0,13 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{урична киселина}) = 11,83 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{глюкоза}) = 255,85 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{креатинин}) = 1,63 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{уреа}) = 343,90 \mu\text{mol/L}$. Волтамограмот е снимен со примена на EPPGE како работна електрода, при фреквенција $f = 50 \text{ Hz}$, квадратно-бранова амплитуда $E_{sw} = 50 \text{ mV}$, потенцијален чекор $dE = 4 \text{ mV}$, почетен потенцијал $E_s = 0.00 \text{ V}$.

Споредбата на електрохемиските процеси дефинирани преку пиковите I и III од квадратно-брановите волтамограми на слика 26, со електрохемиските процеси дефинирани преку цикличните волтамограми од слика 21 доведува до неколку важни заклучоци. Имено, додека двата процеси од цикличните волтамограми покажуваат одреден степен на електрохемиска иреверзибилност, овие два процеси отсликани во квадратно-брановите волтамограми (пиковите I и III, при условите дефинирани на слика 26) покажуваат висок степен на електрохемиска реверзибилност. Додека повратната струјна компонента од пикот што се појавува на $+0,720\text{ V}$ во цикличните волтамограми целосно изостанува при применетите брзини на промена на потенцијалот, оваа струјна компонента е добро дефинирана во квадратно-брановите волтамограми при што целиот процес во SWV покажува висок степен на електрохемиска реверзибилност (пик III на слика 26). Повратната струјна компонента од процесот што се одвива на околу $+0,300\text{ V}$ во циклична волтаметрија (слика 21) е слабо дефинирана и целиот процес покажува квазиреверзибилно електрохемиско однесување во услови на циклична волтаметрија [6]. Во квадратно-брановите волтамограми, оваа струјна компонента е пресликана во добро дефиниран пик, при што целиот процес пресликан во пик I на слика 26 има карактеристики на електрохемиски реверзибилен систем [8].

Ваквото различно однесување на овие два електрохемиски процеси студирани во CV и SWV имплицираат дека и во двата електронски трансфери пресликани преку пиковите I и III има присуство и на хемиска реакција која се одвива после електродниот процес. Во литературата добро е познато дека SWV е многу побрза техника од CV [8]. Според тоа, доколку брзината на хемиските реакции вклучени во процесите I и III е голема, само брза електрохемиска техника (каква што е SWV) може во голема мера да го направи ефектот на овие хемиски реакции помал или незначителен во временскиот период на мерењето на струјата. Овој ефект, може да има влијание и врз директните и повратните струјни компоненти кај електродни механизми во кои електрохемиските реакции се поврзани со хемиски реакции [8], како што е случајот со процесите I и III во услови на SWV (слика 26).

На слика 27 е прикажана серија од нет-струјни компоненти од квадратно-бранови волтамограми, снимени при различни додадени волумени на хуман серум во електрохемиската ќелија. Анализите се однесуваат на хуман серум од пациент што има покачена концентрација на билирубин. Како што може да се забележи од прикажаните волтамограми на слика 27, во сите случаи се дефинираат три пикови, чии потенцијали се многу близу до потенцијалите на пиковите со ознаки I, II и III претставени на слика 25. Последователното зголемување на волуменскиот удел на хуманиот серум во електрохемиската ќелија од 0,5% до 2,4% доведува до пропорционално зголемување на интензитетот на струите од сите три пикови од квадратно-брановите волтамограми прикажани на слика 27. Овој факт имплицира дека сите три пикови прикажани на слика 25 и слика 27 потекнуваат од електрохемиската активност на аналити што се присутни во хуманиот серум. Како следен чекор во волтаметриските анализи е асигнација на овие три електрохемиски процеси и на механизмот на електрохемиска трансформација на овие аналити присутни во хуман серум.

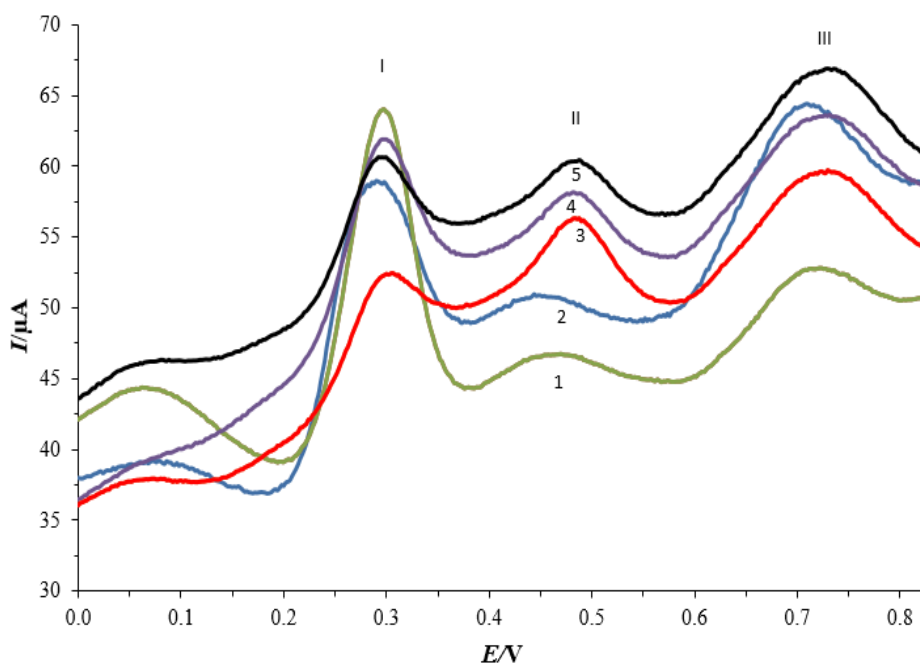


Слика 27. Квадратно-бранови волтамограми на хуман серум растворен во фосфатен пуфер со pH = 7,34. Волуменските удели на хуманиот серум се 0,00% (1); 0,50% (2); 1,0% (3); 1,5% (4) и 2,4% (5). Хуманиот серум е добиен од пациент со покачена концентрација на билирубин. Концентрациите на компонентите во електрохемиската ќелија присутни во примерокот хуман серум што соодветствуваат на кривата со број 5 се : $c(\text{албумин}) = 18,34 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{билирубин}) = 3,20 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{урична киселина}) = 6,54 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{глукоза}) = 174,15 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{креатинин}) = 1,52 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{уреа}) = 121,95 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{триглицериди}) = 30,00 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{холестерол}) = 175,36 \mu\text{mol/L}$. Останатите експериментални услови се идентични со условите на слика 25.

7.3. Асигнација на електродните процеси во квадратно-брановите волтамограми при анализа на хуман серум

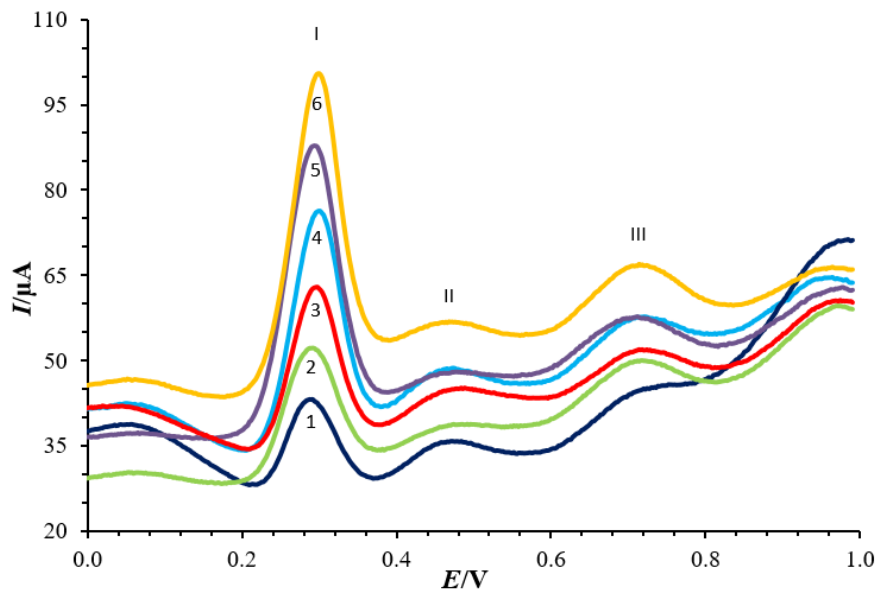
На квадратно-брановите волтамограми претставени на слика 25 и слика 27 се дефинирани три пикови, што потекнуваат од електродни трансформации на три различни супстанции присутни во хуманиот серум. Карактеристично за овие волтамограми е што пикот II (пикот што се дефинира на потенцијали од околу +0,480 V) е присутен само во примероци на хуман серум земени од пациенти што имаат покачена концентрација на билирубин во крвта. Со цел да се направи асигнација на овој електрохемиски процес дефиниран преку пикот II, беше направена серија од експерименти во кои кон хуман серум добиен од пациент со покачена концентрација на билирубин, беше додаван стандарден додаток од билирубин (основниот раствор на билирубин е подготвен со растворање на билирубин во диметилсулфоксид (DMSO)). Последователно беа снимени квадратно-бранови волтамограми при секое додавање на стандарден додаток на билирубин кон пуферскиот раствор присутен во електрохемиската ќелија, во кој беше додаден хуман серум со волуменски удел од 2,4%. Дел од тие волтамограми се прикажани на слика 28. Како што може да се забележи, со последователно додавање на стандард од билирубин кон хуманиот серум растворен во електрохемиската ќелија, доаѓа до

пропорционално зголемување на интензитетот на струјата на пикот означен со II, позициониран на околу +0,480 V. Податоците од слика 28, заедно со фактот дека пикот II се дефинира единствено во квадратно-брановите волтаметриски одговори при анализа на примероци од хуман серум што потекнува од пациенти со покачена концентрација на билирубин, укажува дека пикот II потекнува од електрохемиската активност на билирубин на EPPGE работната електрода [99, 102]. Важно е да се наведе дека ова е еден од ретките експериментални случаи каде се дефинира активност на билирубин во водени раствори во неутрална средина, со употреба на работна електрода чија активна површина не е модифицирана со наночестички или на друг начин. Во литературата постојат податоци за одвивање на електрохемиски реверзибилен процес на билирубин само во силно алкална средина, со употреба на живина капка како работна електрода [103]. Сепак, поради хидролизата на билирубин во алкална средина при $pH > 11$, стабилноста на билирубин при тие услови е мала, што пак оневозможува да се изведат повеќе заклучоци за неговото волтаметриско однесување.



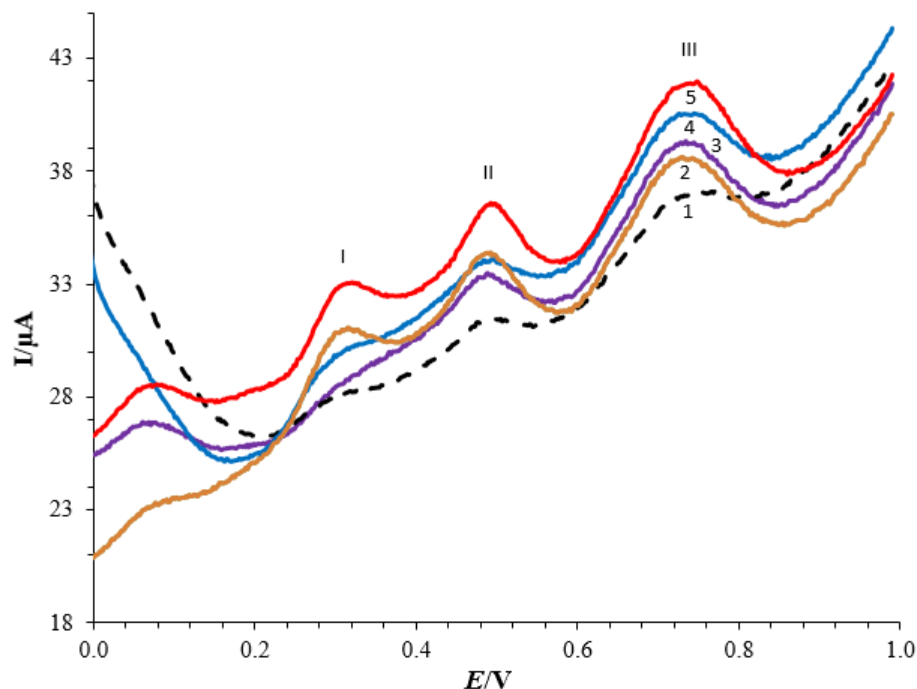
Слика 28. Квадратно-бранови волтамограми на хуман серум со волуменски удел од 2,4% добиен од пациент со зголемена концентрација на билирубин (1). Волтамограмите означени со броевите 2, 3, 4 и 5 се добиени кога во електрохемиската ќелија што содржи хуман серум (крива 1) се додава дефиниран волумен од стандарден додаток од раствор на билирубин растворен во диметилсуфлорид. Концентрацијата на билирубин во електрохемиската ќелија изнесува: (1) 1,71 $\mu\text{mol/L}$; (2) 4,20 $\mu\text{mol/L}$; (3) 6,69 $\mu\text{mol/L}$; (4) 9,18 $\mu\text{mol/L}$; (5) 1,67 $\mu\text{mol/L}$. Во електрохемиската ќелија е додавано по 50 μL од стандард на билирубин чија концентрација во стандардот е 1 mmol/L. Другите компоненти во серумот се: $c(\text{урична киселина}) = 13,29 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{албумин}) = 19,07 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{холестерол}) = 135,36 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{триглицериди}) = 34,39 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{глукоза}) = 267 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{уреа}) = 607,32 \mu\text{mol/L}$. Останатите експериментални и инструментални услови се идентични како условите за слика 25.

Од сите три електрохемиски процеси што се дефинираат во квадратно-брановите волтамограми (слика 25, 27 и 28), најдобра дефиниција и најголем интензитет има пикот означен со I. Пикот I се дефинира на потенцијал од околу +0,300 V и егзистира во квадратно-брановите волтамограми кај сите анализирани серуми добиени и од здрави пациенти и од пациенти со различни патологии. Притоа, покрај поголемиот интензитет во однос на другите два пикови, пикот I е релативно тесен, симетричен и се карактеризира со висок степен на електрохемиска реверзибилност. Интензитетот на пикот I од квадратно-брановите волтамограми е особено изразен кај пациенти што имаат зголемено ниво на урична киселина во крвта. На слика 29 е прикажана серија од квадратно-бранови волтамограми, каде кон примерокот на хуман серум (добиен од здрав пациент) со волуменски удел од 2,4%, што е растворен во фосфатен пуфер, последователно се додавани дефинирани волумени од стандарден додаток на урична киселина. Како што може да се забележи од волтамограмите на слика 29, при овие анализи доаѓа до пропорционално зголемување на струјата на пикот I како функција од концентрацијата на стандардот од урична киселина додаден во електрохемиската ќелија. Притоа, постои многу добра линеарна зависност помеѓу интензитетот на струјата на пикот I како функција од концентрацијата на додадениот стандард од урична киселина во целото подрачје на анализирани концентрации на слика 29. Овие резултати од анализите на слика 29, како и својствата на електрохемискиот процес имплицираат дека пикот I во квадратно-брановите волтамограми од анализите на хуман серум е резултат на електрохемиска трансформација на урична киселина, што е во согласност и со литературните податоци [22].



Слика 29. Квадратно-бранов волтамограм од хуман серум со волуменски удел од 2,4% (крива 1), и квадратно-бранови волтамограми снимени со примена на стандарден додаток на урична киселина во електрохемиската ќелија (криви со број 2 - 6). Концентрацијата на урична киселина во електрохемиската ќелија што одговара на волтамограмите од 1 до 6 е: 5,22 $\mu\text{mol/L}$ (2); 10,07 $\mu\text{mol/L}$ (3); 14,91 $\mu\text{mol/L}$ (4); 19,77 $\mu\text{mol/L}$ (5) и 24,62 $\mu\text{mol/L}$ (6). Концентрациите на албумин и билирубин присутни во хуманиот серум растворен во електрохемиската ќелија се : $c(\text{албумин}) = 15,04 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{билирубин}) = 1,78 \mu\text{mol/L}$, соодветно. Останатите инструментални услови се како на слика 25.

Како што е прикажано и дискутирано на цикличните волтамограми приложени на слика 21 и слика 23, процесот што се јавува на потенцијали од околу +0,720 V поседува карактеристики на иреверзибилна електрохемиска трансформација, чиј интензитет значително се намалува после второто скенирање во цикличните волтамограми. Сепак, овој процес во квадратно-брановите волтамограми, претставен преку пик III, е добро дефиниран и истиот поседува карактеристики на квазиреверзибилна електрохемиска трансформација (слика 25 и 27). Очигледно е дека во услови на значителна временска скала во волтаметриските мерења (како што има во експериментите на слика 21, изведени со примена на CV), чекорот на електронскиот трансфер на размена на електрони на процесот што се дефинира на околу +0,720 V (претставен со пик III во квадратно-брановите волтамограми) е поврзан со одредена хемиска реакција. Меѓутоа, поради релативно малата временска скала на мерењето во квадратно-бранова волтаметрија, брзината на хемиската реакција (вклучена во процесот дефиниран со пик III) станува незначителна. Овој ефект на брзината на мерење на струјата во SWV доведува до дефиниција на процес (пик III) што покажува карактеристики на електрохемиска квазиреверзибилна електродна реакција. Важно е да се напомене дека пик III е постојано присутен во квадратно-брановите волтамограми и кај хуман серум добиен од крв на пациенти со одредени патологии, но и кај хуман серум добиен од крв на здрави пациенти. Асигнацијата на овој процес (пик III од квадратно-брановите волтамограми) е најпроблематична, бидејќи и други автори го забележале присуството на овој процес во волтаметриски анализи (извршени во крвна плазма [98]), но изостанала неговата асигнација. Сепак, постојат одредени литературни податоци дека електрохемиска активност на вакви високи анодни потенцијали во водени раствори е забележана од протеинот албумин [104, 105]. Албумин е протеин чија содржина е значителна во составот на хуманиот серум, при што неговата концентрација се движи во граници од 32 - 50 g/L (моларната маса на албумин е 66 500 g/mol). Волтаметриските експерименти изведени на примерок од хуман серум со волуменски удел од 2,4%, добиен од пациент со покачена концентрација на билирубин, при кои се зголемува концентрацијата на албумин додадена преку стандарден додаток, се прикажани на слика 30. Како што може да се забележи од волтамограмите на слика 30, зголемувањето на концентрацијата на албумин во електрохемиската ќелија доведува до соодветно зголемување на интензитетот на пикот III (криви 2 - 5 на слика 30). Покрај тоа, може да се забележи дека додавањето на стандард од албумин во електрохемиската ќелија, има одредено влијание и врз пиковите од урична киселина и билирубин. Овој ефект е дискутиран подоцна, во делот што ги обработува аналитичките аспекти во овој труд. Согласно литературните податоци [5, 99, 104] и експерименталните факти прикажани на квадратно-брановите волтамограми на слика 30, може со значителна веројатност да се претпостави дека пикот III потекнува од електрохемиската активност на албумин присутен во хуман серум.



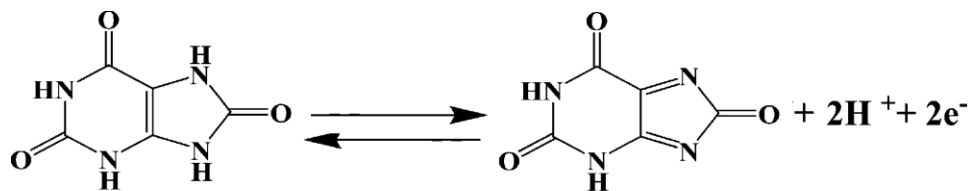
Слика 30. Квадратно-бранов волтамограм на хуман серум со волуменски удел од 2,4% (добиеен од пациент со покачена концентрација на билирубин во крвта (1, црна испрекинатата линија). Волтамограмите означени со броевите 2, 3, 4 и 5 се добиени кога во електрохемиската ќелија што содржи хуман серум (крива 1) се додава стандарден додаток од раствор на албумин растворен во фосфатен пуфер со $\text{pH} = 7,34$. Концентрацијата на албумин во електрохемиската ќелија изнесува: (1) $12,83 \mu\text{mol/L}$, (2) $15,32 \mu\text{mol/L}$, (3) $17,81 \mu\text{mol/L}$, (4) $20,3 \mu\text{mol/L}$, (5) $22,79 \mu\text{mol/L}$. $c(\text{урична киселина}) = 7,12 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{билирубин}) = 1,12 \mu\text{mol/L}$. Останатите експериментални и инструментални услови се идентични како условите на слика 25.

7.4. Механизми на електродна трансформација на урична киселина, билирубин и албумин

а) Механизам на електрохемиска оксидација на урична киселина

Процесот на електрохемиска оксидација на UA е испитуван многу одамна, при што иницијалните електрохемиски студии за UA датираат од 60-тите години од минатиот век [106]. Познато е дека во неутрална средина, оксидацијата на урична киселина започнува со формирање на диимин, преку размена на 2 електрони и 2 протони [106]. Во вториот чекор, добиениот диимин прима две молекули на вода, при што се формира имино-алкохол и урична киселина-4,5-диол. Во последниот чекор од оксидацијата, дериватот именуван како урична киселина-4,5-диол се разложува на алантоин и CO_2 во неутрална средина [107]. Целосниот процес на електрохемиска оксидација на урична киселина е релативно комплексен, како што е прикажано подолу на слика 31.

Сепак, во волтаметриски услови, општо е прифатено дека оксидацијата на урична киселина се одвива според поедноставната реакциона шема претставена на слика 32, каде

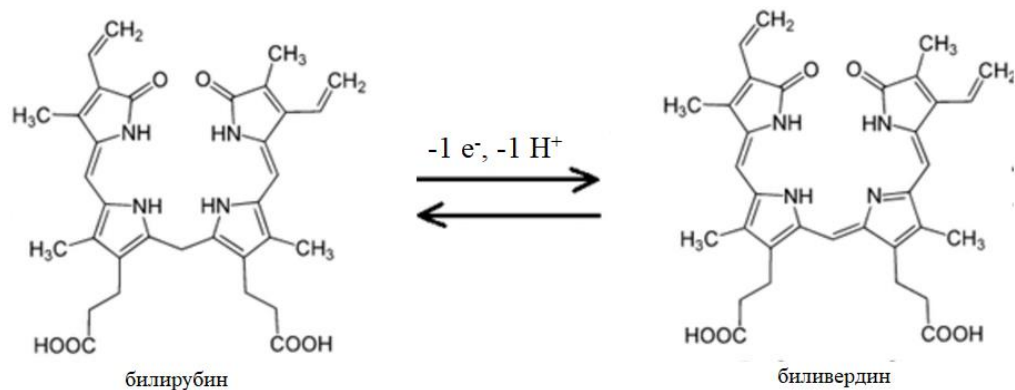


Слика 32. Реакциска шема на оксидација на урична киселина.

Оксидативните својства на UA се искористени за развивање на голем број електрохемиски методи за нејзина детекција. Како резултат на електрохемиската активност на уричната киселина, развиени се голем број брзи и едноставни електрохемиски сензори за квантификација на концентрацијата на UA. Голем дел од сензорите дизајнирани за квантификација на UA во разни примероци се елаборирани во неодамнешниот ревијален труд на Chelmea и соработниците [22].

б) Механизам на електрохемиска оксидација на билирубин

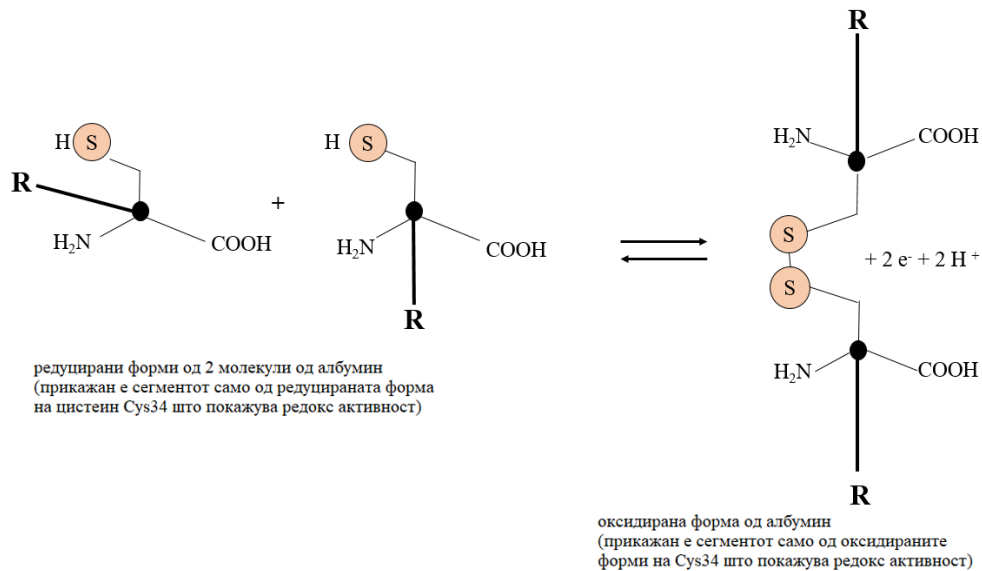
Оксидацијата на билирубин во волтаметриски услови е исклучително комплексен процес. Во литература постојат информации за механизмот на електрохемиска трансформација на билирубин како во водени раствори [38], така и во неводени раствори [39]. Во овие наведени студии е покажано дека билирубинот покажува електрохемиска активност, а неговата електрохемиска оксидација најчесто се одвива во неколку чекори во кои билирубинот електрохемиски се оксидира во биливердин, пурпурин или колетелин, што главно зависи од големината на применетиот потенцијал [39]. Кога се работи за водени раствори, општо е прифатен електрохемискиот механизам во кој билирубинот се оксидира до биливердин, во чекор на електрохемиска трансформација што вклучува еден електрон и еден протон (слика 33). Овој процес на оксидација на билирубин претставен на слика 33, главно се однесува за кисели и неутрални раствори. Во силно алкални раствори, билирубинот подлежи на хидролиза, при што доаѓа до негова деградација. Иако билирубинот покажува добра електрохемиска активност, сепак за негово определување најчесто се користат сензори во кои билирубинот е поврзан во комплексни соединенија со одредени хемиски системи (албумин, глутаралдеhid, или јони на некои преодни метали) [110]. Најголем дел од сензорите за детекција на билирубин се базираат на негова оксидација на работни електроди чија површина е модифицирана со наночестички [110], додека скоро и да не постојат електрохемиски сензори за определување на билирубин во биолошки примероци со употреба на работна електрода чија површина не е модифицирана.



Слика 33. Реакциска шема на процесот на оксидација на билирубин до биливердин во водени раствори.

в) Механизам на електрохемиска оксидација на албумин

Албуминот е најзастапениот протеин во серумот, кој има молекулска маса од приближно 66 500 g/mol. Кај здрави пациенти, албуминот е присутен во концентрации од 32 – 50 g/L (приближно тоа одговара на моларни концентрации од 0,53 до 0,75 mmol/L). Албуминот се синтетизира исклучиво во црниот дроб, пред да биде секретран во крвниот систем. Примарната улога на ALB во крвниот систем е да обезбеди перманентен колоиден осмотски притисок. Бидејќи ALB е доста застапен во серумот и има релативно мала молекулска маса, овој протеин придонесува со околу 80% во вкупниот колоиден осмотски притисок [111]. Хуманиот ALB што е присутен во серум се состои од единечен полипептиден ланец од 585 аминокиселински остатоци и има вкупно 35 цистеински (Cys) остатоци. Од овие 35 цистеински остатоци, 34 Cys-остатоци се вклучени во формирање на 17 интрамолекуларни дисулфидни врски, кои пак придонесуваат за неговата терциерна специфична т.н. „срцевидна“ структура [112]. Преостанатиот единечен Cys-остаток на позиција 34 (Cys34) е слободен и овој цистеински остаток всушност е сегментот што покажува редокс активност во структурата на албуминот [112, 104]. Најчесто, електрохемиската оксидација на албумин од хуман серум се прикажува преку оксидацијата на цистеинските остатоци Cys34 од две молекули албумин, како што е прикажано на реакционата шема на слика 34.



Слика 34. Приказ на редокс активноста на цистеинските остатоци од молекули албумин (Cys34) од хуман серум.

Важно е да се потенцира дека редуцираната и оксидираната форма на ALB имаат различни физички и хемиски својства. Така на пример, потенцијалот за врзување на некои лиганди, како што се билирубин и триптофан, се намалува пропорционално со степенот на оксидација на ALB [113]. Овие различни својства на редуцираната и оксидираната форма на албуминот од хуман серум, многу често претставуваат голем предизвик во дизајнирањето на електрохемиски сензори за детекција на албумин, посебно кога се работи за аналитички апликации во биолошки примероци.

7.5. Атсорптивни својства на урична киселина, билирубин и албумин

Најголем број од проблемите при волтаметриските анализи на урична киселина и билирубин од водени раствори се јавуваат поради нивната слаба растворливост во вода. Сепак, во волтаметриските техники се познати специфични методолошки протоколи во кои при даден период на акумулација на дефиниран потенцијал, се овозможува зголемена пре-концентрација на одредени аналити на површината од работната електрода. Во вториот чекор од овие волтаметриски протоколи, со нанесување на потенцијална разлика помеѓу работната и референтната електрода, се овозможува електрохемиска трансформација на аналитите од атсорбирана состојба. Атсорпциските волтаметриски постапки се исклучително важни при студирањето на аналити што се тешко растворливи во вода како што се ензими, протеини, липиди и други липофилни молекули. Посебно ефикасни електроаналитички техники, како за студирање на електродните механизми на атсорбирани хемиски системи, така и за нивна квантификација се пулсните волтаметриски техники [13], а посебно SWV [8]. При апликацијата на пулсните волтаметриски техники за анализирање на хемиски системи од атсорбирана состојба, волтаметриските одговори (најчесто) имаат форма на релативно тесни и симетрични пикови чиј интензитет е функција од концентрацијата на аналитите во електрохемиската ќелија. Со внимателно

анализирање на експерименталните и инструменталните услови, со помош на пулсните волтаметриски техники аплицирани врз хемиски системи што покажуваат адсорпциски својства, може да се постигнат многу ниски граници на детекција на голем број липофилни аналити, дури и во наномоларни концентрациски подрачја.

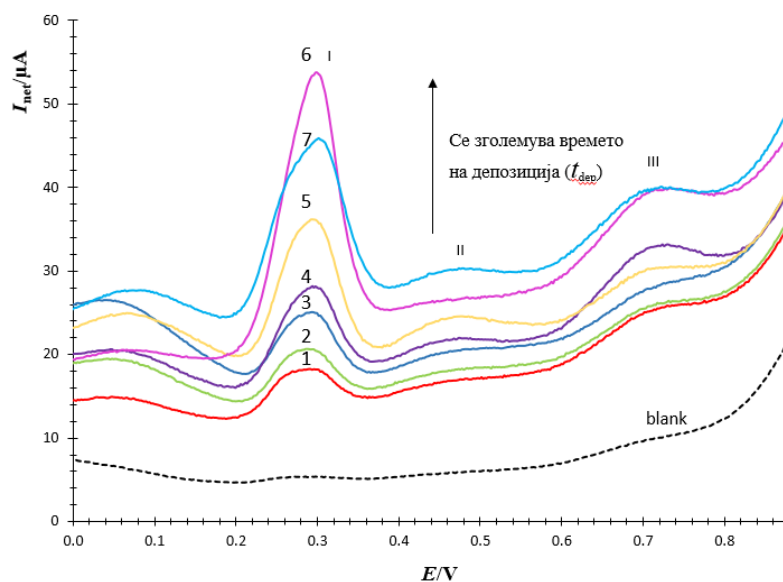
Процесот на електрохемиска оксидација на UA е детално студира на пиролитична графитна електрода (PGE) од страна на Dryhurst [114]. Оксидацијата на UA најчесто се дефинира како квазиравнотежен процес што опфаќа пренос на два електрони, при што производот на чекорот на електронски трансфер е вклучен во иреверзибилна хемиска реакција [114]. Специфично за електрохемиската трансформација на уричната киселина е фактот што оваа супстанца може да претрпи оксидација само од адсорбирана состојба, најчесто на површината од работна електрода од јаглороден тип [114].

За разлика од UA, чија електрохемиска активност може да се студира и на електроди чија работна површина не е модифицирана [22], при испитувањето на електрохемиските својства на билирубин и при дизајнирањето на сензори за детекција на билирубин, скоро и да не постојат трудови каде немодифицирани работни електроди се користат за оваа намена [110, 115]. Во литературата постојат лимитиран број на информации за квантификација на билирубин на немодифицирана работна електрода [116]. Слабата растворливост во неутрални раствори и силните адсорпциски својства на билирубинот на работната површина од разни електроди изработени на јаглородна основа се наведуваат како главен проблем при дизајнирањето на волтаметриски сензори за квантификација на билирубин [110].

Адсорпциските својства на албумин употребени за модификација на работни електроди од јаглороден тип се познати во литература [117-119]. Кога албумин од хуман серум се користи како платформа за модификација на површината од работните електроди, неговата функција се поврзува со потенцијалот за негово поврзување и транспорт на голем број важни молекули [120, 121]. На овој начин, најчесто се олеснува електронскиот трансфер помеѓу аналитите од интерес и работните електроди модифицирани со албумин (или со системи што содржат албумин). Како што беше и претходно наведено, самиот албумин може да покаже електрохемиска активност, главно изразена преку оксидацијата на цистеинските остатоци Cys34. Сепак, неговата комплексна структура многу често доведува до недоволно изразена електрохемиска активност на редокс активниот сегмент од структурата на албуминот (цистенинскиот остаток Cys34). Овој ефект во голема мера го оневозможува деталното студирање на електрохемиските својства на албуминот со примена на работни електроди чија површина не е модифицирана.

7.6. Атсорптивни својства на урична киселина, билирубин и албумин присутни во хуман серум, во волтаметриски анализи со примена на EPPGE работна електрода

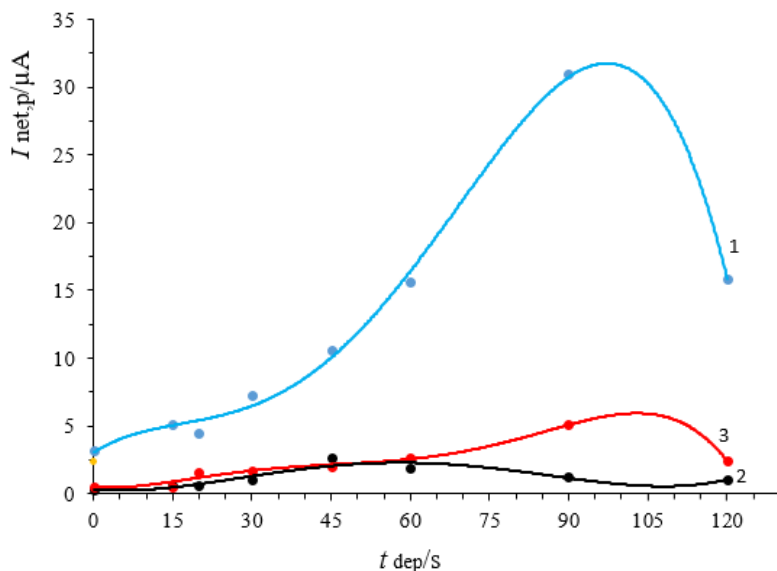
Имајќи предвид одредени литературни податоци за атсорпциските својства на урична киселина, билирубин и албумин на јаглеродни електроди што се дискутирани и наведени во претходното поглавје, се очекува дека молекулите на сите три редокс активни аналити ќе покажат афинитет за атсорпција и на површината на работната EPPGE електрода. На слика 35 се прикажани серија од SW волтамограми на хуман серум, што се снимени со примена на EPPGE работна електрода. Волтамограмите се снимени при различни времиња на депозиција, при потенцијал на депозиција од 0,00 V во однос на референтната електрода Ag/AgCl. Релативно тесните форми на нет-волтаметриските пикови, како и промените на интензитетот на големина на струите на нет-пиковите како функција од времето на депозиција, често служат како иницијални показатели за електродни процеси на површински имобилизирани редокс системи [8] (слика 35).



Слика 35. Приказ на нет-квadratно-бранови волтамограми кои ги илустрираат промените на волтаметриските одговори како функција од времето на депозиција. Волуменскиот удел на хуман серум (растворен во фосфатен пуфер со pH = 7,34) е 2,4%. Концентрациите на урична киселина, билирубин и албумин во електрохемиската ќелија се 14,19 $\mu\text{mol/L}$, 2,35 $\mu\text{mol/L}$ и 19,81 $\mu\text{mol/L}$, соодветно. Времето на депозиција аплицирано за соодветните волтамограми е: 0 s (1), 15 s (2), 20 s (3), 30 s (4), 45 s (5), 60 s (6) и 120 s (7). Кривата на дното (црна испрекинатата линија, означена со blank) е струјата на фосфатниот пуфер снимен во отсуство на хуман серум. Останатите експериментални и инструментални услови се идентични како условите за слика 25.

Дополнително, кривите на атсорпција прикажани на слика 36, поврзани со урична киселина, билирубин и албумин покажуваат и информации за заситување на површината на работната електрода по време на депозиција од околу 85 s за урична киселина (1), 50 s за билирубин (2) и 90 s за албумин (3) под специфичните експериментални услови наведени во слика 36. Набљудувањата во врска со атсорпциските карактеристики на сите три анализирани видови на електроди базирани на јаглерод се конзистентни со податоците од литературата, како и со претходните наоди публикувани од нашата истражувачка група [5, 99].

Како што може да се заклучи од кривите претставени на слика 36, атсорпцијата на UA доминира во волтаметриските одговори при анализа на хуман серум. Интензитетот на одговорот на UA е последица на чекорот на брза размена на електрони, што е пресликано преку високиот степен на електрохемиска реверзибилност во услови на SWV. Заситувањето на електродата со BLR се случува за значително пократко време на депозиција во споредба со UA (крива 2 во слика 36). Волтаметрискиот одговор на BLR е со многу послаб интензитет во однос на волтаметрискиот одговор од UA, што е резултат на значително покомплексниот електроден механизам на редокс трансформација на BLR, проследен со последователни хемиски реакции, што придонесува до дополнителни атсорпциски ефекти од реакциските продукти. Заситувањето на електродата со ALB се случува во споредливо време со UA (крива 3 на слика 36). Треба да се напомене дека иако концентрацијата на ALB доминира во хуманиот серум во споредба со UA и BLR, поради големата моларна маса, дифузиониот коефициент на големите молекули на ALB се очекува да биде значително понизок од оној за другите аналити. Овој ефект најверојатно има големо влијание врз морфологијата на атсорпционата изотерма (крива 3 на слика 36).



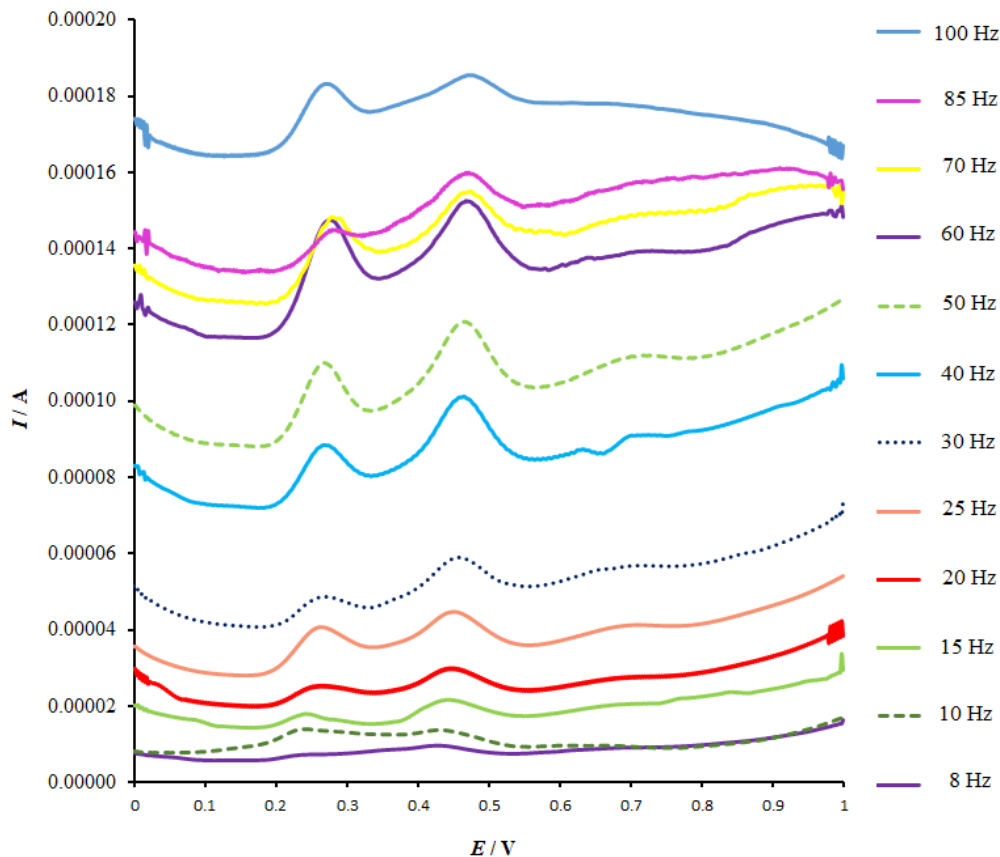
Слика 36. Атсорпциски криви што ја прикажуваат зависноста помеѓу пик-струите од волтамограмите на слика 35 како функција од времето на депозиција (t_{dep}) за урична киселина (1), билирубин (2) и албумин (3). Останатите експериментални услови се идентични како на слика 35.

Со оглед на комплексниот состав на хуманиот серум, треба да се напомене дека намалувањето на интензитетот на кој било волтаметриски пик при продолжено време на депозиција може да биде последица на конкурентна адсорпција со молекулите од други хемиски системи присутни во матрицата, како и на конкурентната адсорпција помеѓу молекулите од студираниот аналит од интерес. Поради овие причини, намалувањето на волтаметрискиот одговор после одредено време на депозиција не мора да имплицира заситување на електродата само со молекулите од дефиниран аналит. Во принцип, волтаметриското однесување на хуманиот серум при продолжени времиња на депозиција најчесто ја рефлектира комплексноста на сите површински феномени што се јавуваат во сложен медиум каков што е хуманиот серум.

Во контекст на адсорпциските феномени на анализираните хемиски системи присутни во хуман серум, интензитетот на струјата на пиковите од квадратно-брановите волтамограми на UA, BLR и ALB беше студираан и како функција од потенцијалот на депозиција. Притоа, во експерименти со хуман серум земен од пациент што има зголемена концентрација на билирубин, студираан беше ефектот на потенцијалот на депозиција во граници од $-0,300\text{ V}$ до $+0,400\text{ V}$. Зависноста помеѓу добиените струи на нет-пиковите од квадратно-брановите волтамограми за UA, BLR и ALB како функција од потенцијалот на депозиција (при време на депозиција од 30 s) во сите случаи е параболична крива, со максимуми дефинирани при потенцијали на депозиција од $0,000\text{ V}$ за сите аналити. Овој податок е важен не само како дополнителна конфирмација за адсорпциските својства на испитуваните аналити во хуман серум, туку и за процесот на оптимизација на инструменталните параметри во постапката за аналитичка апликација на волтаметриската методологија за квантификација на UA, BLR и ALB во хуман серум.

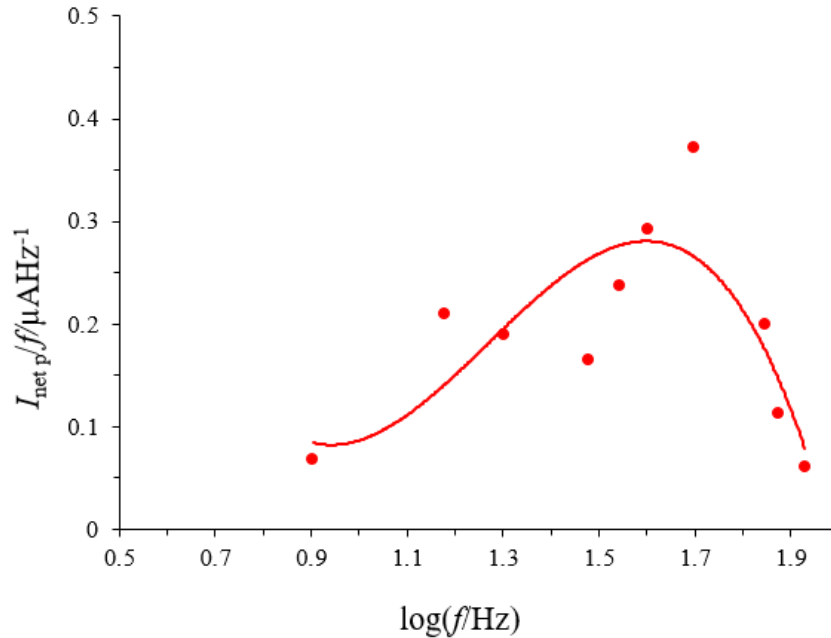
7.7. Влијание на фреквенцијата на потенцијалниот сигнал во SWV врз својствата на волтаметриските одговори на урична киселина, билирубин и албумин во хуман серум

Во SWV, еден од клучните параметри што влијае врз брзината на мерењата на струите во тек на аплицираните пулсеви е фреквенцијата [8]. Фреквенцијата претставува критичен инструментален параметар кај сите пулсни волтаметриски техники [13]. Фреквенцијата има посебно значење во SWV, пред сè во студирањето на хемиски системи чија електрохемиска трансформација се случува од адсорбирана состојба [8]. Влијанието на фреквенцијата во SWV не се одразува само на брзината на размена на електрони помеѓу работната електрода и молекулите на студираниот редокс аналит, туку фреквенцијата има влијание и врз адсорпциските својства што се случуваат во текот на временската скала на секој аплициран потенцијален пулс при студии на редокс системи што покажуваат површинска активност [8]. На слика 37 е прикажана серија од квадратно-бранови волтамограми од хуман серум, снимени при фреквенции од 8 до 100 Hz.



Слика 37. Приказ на нет струјните компоненти на серија од квадратно-бранови волтамограми на хуман серум со волуменски удел од 2,4%, снимени при различни фреквенции, без примена на време на депозиција. Концентрацијата на уричната киселина во електрохемиската ќелија е 14,65 $\mu\text{mol/L}$, додека концентрациите на билирубин и албумин во електрохемиската ќелија се 2,22 $\mu\text{mol/L}$ и 20,54 $\mu\text{mol/L}$, соодветно. Останатите експериментални услови се идентични како на слика 25.

На слика 38 е прикажан односот помеѓу струите на нет-квадратно-брановите волтаметрички пикови на урична киселина и аплицираната фреквенција ($I_{\text{net,p}}/f$), претставени како функција од логаритамот на применетата SW фреквенција.

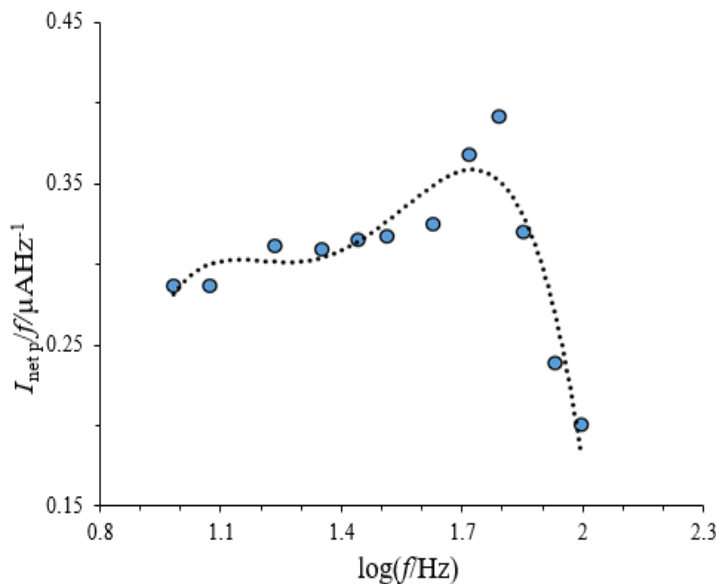


Слика 38. Зависност помеѓу односот $I_{\text{net,p}}/f$ на нет-волтамограмите за урична киселина и фреквенцијата како функција од логаритамот на применетата SW фреквенција. Концентрацијата на уричната киселина во електрохемиската ќелија е $14,65 \mu\text{mol/L}$, додека концентрациите на билирубин и албумин се $2,22 \mu\text{mol/L}$ и $20,54 \mu\text{mol/L}$, соодветно. При овој сет на експерименти не е применето време на депозиција. Останатите експериментални услови се идентични како на слика 25.

Параболичната зависност помеѓу односот $I_{\text{net,p}}/f$ како функција од применетите фреквенции во SWV е карактеристично својство за т.н. „површински електродни механизми“ во кои најмалку еден од учесниците во електрохемиската реакција е значително адсорбиран на површината од работната електрода [8]. Ова својство е наречено „квазиреверзибилен максимум“ и истото може да се употреби за карактеризација на површински електродни механизми, но и за определување на константата на брзина на пренос на електрони, со примена на релативно едноставен протокол елабориран од Мирчески и соработниците [8]. Од аналитичка гледна точка, фреквенцијата што одговара на максимумот на параболичната крива на зависност $I_{\text{net,p}}/f$ како функција од $\log(f)$ може да се смета како оптимална вредност при волтаметриските аналитички протоколи наменети за квантификација на даден аналит. Во случајот на урична киселина присутна во серум, фреквенцијата што одговара на максимумот на кривата претставена на слика 38 изнесува 50 Hz.

Однесувањето опишано на слика 38 не е карактеристично само за уричната киселина, туку и за билирубин (слика 39) и за албумин. Треба да се нагласи дека при повисоки фреквенции (обично поголеми од 80 Hz), артефактите кои произлегуваат од некомпензираниот отпор [122] поради блокирањето на електродата со продуктите на електродните реакции за сите три анализирани хемиски системи од хуманиот серум, стануваат значителна пречка за одвивањето на електрохемиските реакции. Овие факти се поткрепени и со морфолошката анализа на нет-SW пиковите при фреквенции повисоки од

80 Hz за сите три анализирани системи (слика 37), што е во корелација и со теоретските податоци [122] за дискутираните феномени.



Слика 39. Зависност помеѓу односот $I_{\text{net,p}}/f$ на нет-волтамограмите за билирубин како функција од логаритамот на применетата SW фреквенција. Концентрацијата на уричната киселина во електрохемиската ќелија е $14,65 \mu\text{mol/L}$, додека концентрациите на билирубин и албумин се $2,22 \mu\text{mol/L}$ и $20,54 \mu\text{mol/L}$, соодветно. При овој сет на експерименти не е применето време на депозиција. Останатите експериментални услови се идентични како на слика 25.

7.8. Влијание на матриксот на хуманиот серум врз електрохемиската трансформација на испитуваните аналити присутни во хуман серум

Податоците од кривите на зависности прикажани на сликите 38 и 39 имплицираат на висока електрохемиска реверзибилност [8] на процесите на урична киселина и билирубин анализирани во хуман серум со примена на EPPGE како работна електрода, во услови на SWV. Тој факт може да се забележи и од својствата на оксидациските и редуциските струјни компоненти од квадратно-брановите волтамограми на овие аналити (слика 25). Од друга страна, цикличните волтамограми на хуман серум прикажани на слика 21, укажуваат на значителен степен на иреверзибилност во електрохемиската трансформација и кај уричната киселина и кај албуминот. Ако се земат предвид волтаметриските карактеристики на електрохемиски активните аналити присутни во хуман серум во услови на CV и во услови на SWV, тогаш логично е да се постави прашањето за причините што доведуваат до вакви дискрепанци помеѓу двете техники. Во поглавјето каде се дискутирани механизмите на електродна трансформација на урична киселина, билирубин и албумин, заедничка карактеристика на сите електродни механизми е што чекорот на размена на електрони кај сите механизми е поврзан со чекор на

последователна хемиска реакција. Општо земено, електрохемиските трансформации на урична киселина, билирубин и албумин можат да се класифицираат во т.н. „ЕС механизми“ [8], односно во електрохемиски механизми каде електрохемиската реакција е поврзана со хемиска неповратна реакција на добиениот продукт од електрохемискиот чекор.

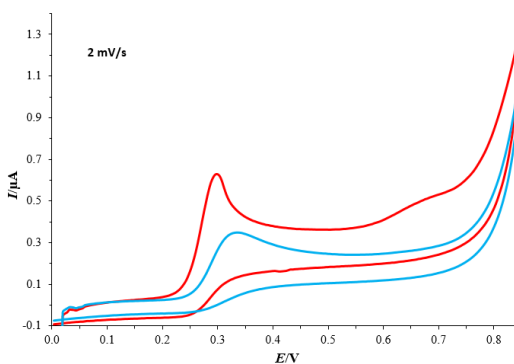
Од гледна точка на временската скала на одвивање на експериментите во CV и во SWV, познато е дека SWV е многу побрза техника од CV. Тоа се должи пред сè на специфичниот начин на изведување на експериментите и мерењето на струјата во SWV [8]. Овој податок укажува дека во SWV значително е намалена временската скала за одвивање на хемиската реакција кај ЕС механизмите. Согласно на тоа, влијанието на хемиската реакција ќе биде значително помала во услови на SWV во однос на брзината на истата хемиска реакција во услови на CV кај дефиниран ЕС механизам. Тоа секако е една од причините за различната електрохемиска реверзибилност на испитуваните системи во квадратно-бранова и во циклична волтаметрија. Сепак, постои и уште една можност што треба да се испита за однесувањето на испитуваните анализи во хуман серум во услови на SWV, а тоа е ефектот на матриксот од хуманиот серум.

Со цел да се испита влијанието на матриксот на хуман серум врз волтаметриските одговори на UA и BLR, беа дизајнирани серија од експерименти во кои најпрво беа студирани електрохемиските својства на чисти супстанции UA и BLR во фосфатен пуфер со pH = 7,34. Потоа, во електрохемиската ќелија беше додаван хуман серум од здрав пациент, со волумен од 50 μL до 300 μL . При секое додавање на дефиниран волумен од хуман серум кон пуферскиот систем во кој беа растворени (а) чиста урична киселина (10 $\mu\text{mol/L}$) или (б) чист билирубин (10 $\mu\text{mol/L}$), беа снимани квадратно-бранови волтамограми како функција од квадратно-брановата фреквенција. Притоа, систематски беа следени волтаметриските карактеристики и на директните (анодните) и на повратните (катодните) струјни компоненти од добиените квадратно-бранови волтамограми. Во сетот на анализи реализирани со UA, беа снимени и циклични волтамограми при различни брзини на промена на потенцијал, во услови кога нема додаден хуман серум, како и во присуство на дефиниран волумен на хуман серум додаден кон електрохемиската ќелија во која беше растворена урична киселина со концентрација од 10 $\mu\text{mol/L}$.

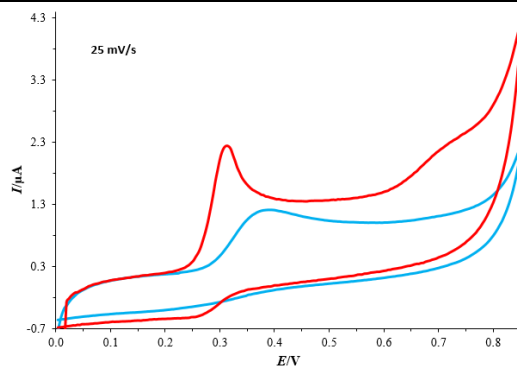
Во табела 2 е претставена серија од циклични волтамограми од чиста урична киселина снимена во фосфатен пуфер со pH = 7,34 (волтамограмите со сина боја) и на истиот раствор од урична киселина во електрохемиската ќелија потоа се додадени 200 μL серум од пациент без патологија (волтамограмите со црвена боја). Цикличните волтамограми се снимени при брзини на промена на потенцијал во ранг од 2 mV/s до 90 mVs. Волтамограмите се систематизирани на начин да се визуелизира ефектот на додадениот серум во однос на волтамограмите од чиста урична киселина, при неколку дефинирани брзини на промена на потенцијалот.

Табела 2. Циклични волтамограми на 10 $\mu\text{mol/L}$ UA снимена во фосфатен пуфер со рН = 7,34 (волтамограми со сина боја) и соодветни циклични волтамограми снимени кога во електрохемиската ќелија се додадени 200 μL serum од здрав пациент (волтамограми со црвена боја). Волтамограмите се снимени при неколку различни брзини на промена на потенцијалот. Концентрацијата на UA на волтамограмите со црвена боја е 12 $\mu\text{mol/L}$. Потенцијалниот чекор е 2 mV. Концентрациите во електрохемиската ќелија на следните компоненти присутни во примерокот хуман serum се: $c(\text{албумин}) = 13,94 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{билирубин}) = 0,35 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{глукоза}) = 133,41 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{креатинин}) = 1,77 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{уреа}) = 163,41 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{холестерол}) = 87,56 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{триглицериди}) = 30,73 \mu\text{mol/L}$.

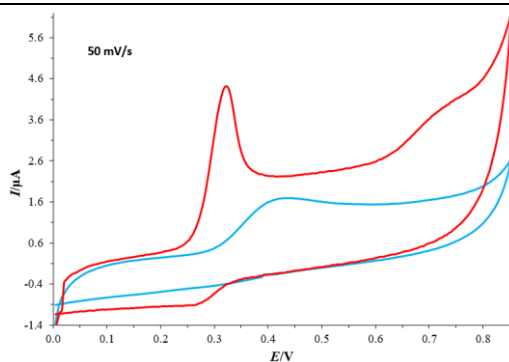
2 mVs⁻¹



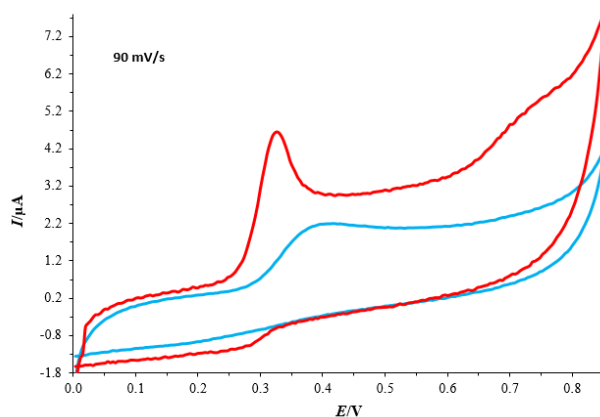
25 mVs⁻¹



50 mVs⁻¹

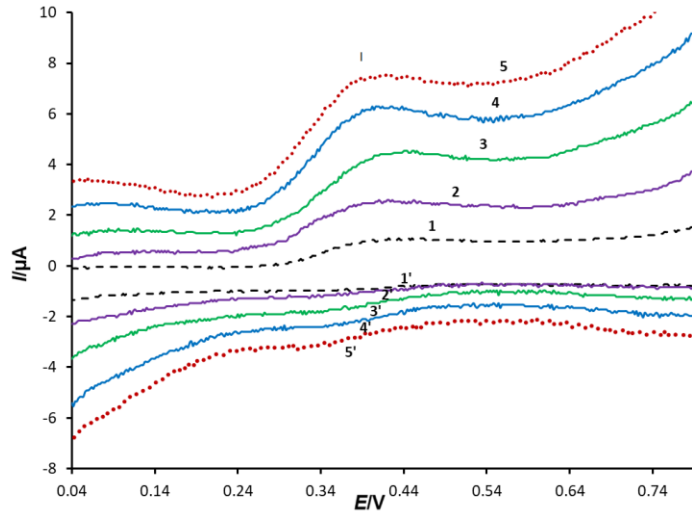


90 mVs⁻¹



Како што е прикажано на цикличните волтамограми во табела 2, додавањето на само околу 1% на хуман серум има значително влијание врз електрохемиското однесување на урична киселина. Важно е да се нагласи дека додавањето на 200 μL серум кон 20 mL пуферски раствор што содржи 10 $\mu\text{mol/L}$ UA (во конкретниот случај на цикличните волтамограми од табела 2), доведува до зголемување на концентрацијата на UA само за околу 2 $\mu\text{mol/L}$ во однос на почетната концентрација на UA (волтамограмите со сина боја во табела 2). Сепак, ефектот на матрицот на хуманиот серум е значителен не само по формата и интензитетот и на оксидациониот и на редукциониот пик од UA, туку и врз електрохемиската реверзибилност која станува понагласена со додавањето на хуман серум во електрохемиската ќелија во која на почеток има само UA (со концентрација од 10 $\mu\text{mol/L}$). Овој ефект на хуманиот серум врз зголемувањето на електрохемиската реверзибилност на UA најдобро се забележува на цикличните волтамограми снимени при брзина на промена на потенцијалот од 50 mV/s.

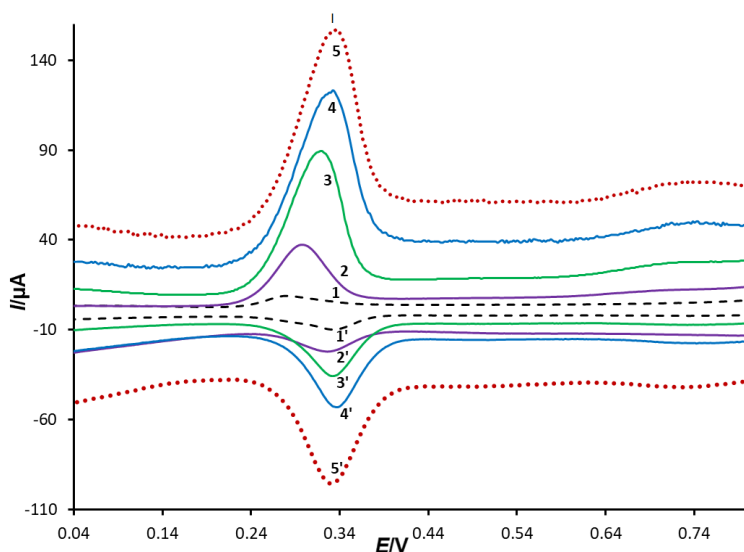
Детална студија на ефектот на волуменскиот удел на хуманиот серум од здрав пациент врз електрохемиските својства на UA (иницијално растворена во фосфатен пуфер со pH = 7,34, со концентрација од 10 $\mu\text{mol/L}$) беше изведена и со примена на SWV. Во почетните експерименти при ова сценарио, беа снимени квадратно-бранови волтамограми на чиста урична киселина како функција од аплицираната фреквенција на потенцијалниот сигнал во SWV. Како што може да се забележи од струјните компоненти на квадратно-брановите волтамограми од UA претставени на слика 40, директните пикови се релативно добро дефинирани при сите аплицирани фреквенции. Важно е да се напомене дека при сите применети фреквенции, повратните пикови се со понизок интензитет отколку соодветните директни пикови, додека поголем интензитетот на повратните пикови се забележува при повисоки фреквенции. Ова однесување на UA е карактеристично за ЕС реакциските механизми [8] и истото кореспондира со литературните податоци за електрохемиското однесување на UA во водени раствори со вредност на pH што е околу 7,00.



Слика 40. Приказ на директните и повратните струјни компоненти од квадратно-брановите волтамограми на урична киселина (со концентрација од $10 \mu\text{mol/L}$) растворена во фосфатен пуфер со $\text{pH} = 7,34$. Фреквенцијата што одговара на овие струјни компоненти е 8 Hz (1-1'), 25 Hz (2-2'); 50 Hz (3-3'); 75 Hz (4-4'); 90 Hz (5-5'). Останатите инструментални услови се идентични како на слика 25.

Додавањето на дефинирани волумени на хуман серум (од $50 \mu\text{L}$ до $300 \mu\text{L}$) од здрав пациент, кон електрохемиската ќелија што содржи $10 \mu\text{mol/L}$ UA растворена во фосфатен пуфер со $\text{pH} = 7,34$, беше следено во ранг на аплицирани фреквенции од 8 Hz до 150 Hz, при секој додаден дефиниран волумен на хуман серум во електрохемиската ќелија. На слика 41 се прикажани директните и повратните струјни компоненти, снимени при идентични фреквенции како и волтамограмите од чиста UA претставени на слика 40, во сценарио кога кон електрохемиската ќелија што содржи $10 \mu\text{mol/L}$ UA, беа додадени $100 \mu\text{L}$ хуман серум од здрав пациент (со волуменски удел од околу 0,50%). Како што може да се види од волтаметриските струјни компоненти од слика 41, додавањето на хуман серум доведува до значителни промени како во формата, така и во интензитетот и на директните и на повратните пикови од UA. Притоа, очигледно е дека додавањето на хуман серум доведува до зголемување на електрохемиската реверзибилност на процесот на урична киселина. Така на пример, односот на струите на оксидациските пикови во однос на струите на редукциските пикови се менува од 2,4 (при фреквенции од 8 Hz) до 1,6 (при фреквенции од 90 Hz). Покрај тоа, потенцијалната сепарација помеѓу директните и повратните пикови се намалува со зголемување на фреквенцијата, додека и директните и повратните пикови стануваат тесни и добиваат форма карактеристична за површински електродни механизми [8]. Важно е да се нагласи дека додавањето на хуман серум кон електрохемиската ќелија во која има иницијално растворено $10 \mu\text{mol/L}$ UA, доведува до поместување и на директните и на повратните пикови од квадратно-брановите волтамограми (споредба на слика 40 и слика 41) кон понегативни потенцијали за околу 50 mV. Сите овие наведени параметри укажуваат дека додавањето на хуман серум во електрохемиската ќелија што содржи $10 \mu\text{mol/L}$ UA, значително влијае врз нејзините електрохемиските својства. Бидејќи електрохемиската трансформација на урична

киселина се одвива според „површински ЕС механизам“, логично е да се претпостави дека (а) некои системи присутни во матриксот на хуманиот серум доведуваат до стабилизација на продуктот од електрохемискиот чекор од ЕС реакцијата на урична киселина, или (б) адсорпцијата на некои од супстанците присутни во хуманиот серум на површината од EPPGE работната електрода, придонесува за модификација на работната електрода и овозможува подобра комуникација помеѓу работната електрода и молекулите на урична киселина. Секако, покрај овие два наведени ефекти, подобрената растворливост на урична киселина во присуство на хуман серум, дополнително придонесува за електрохемиско однесување на урична киселина во присуство на хуман серум, како што е прикажано на волтамограмите на слика 41.



Слика 41. Приказ на директните и повратните струјни компоненти од квадратно-брановите волтамограми на урична киселина (со концентрација од $10 \mu\text{mol/L}$) растворена во 20 mL фосфатен пуфер со $\text{pH} = 7,34$, во која се додадени $100 \mu\text{L}$ хуман серум (со волуменски удел од $0,5\%$) од пациент без патологија. Крајната концентрација на урична киселина (после додавањето на хуманиот серум во електрохемиската ќелија) изнесува $11 \mu\text{mol/L}$. За подобра визуелна споредба, фреквенцијата што одговара на овие струјни компоненти е идентична како на слика 33 и истата изнесува: 8 Hz (1-1'), 25 Hz (2-2'); 50 Hz (3-3'); 75 Hz (4-4'); 90 Hz (5-5'). Останатите инструментални услови се идентични како на слика 25.

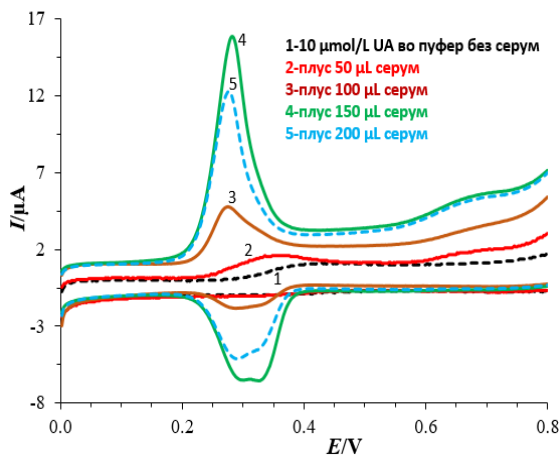
Во табела 3 се претставени директните и повратните струјни компоненти од квадратно-брановите волтамограми на UA (со концентрација $10 \mu\text{mol/L}$), снимени при дефинирани фиксни фреквенции, како функција од содржината на додаден серум од здрав пациент кон електрохемиската ќелија во која иницијално е растворена урична киселина. На сите волтамограми прикажани во табела 3 се забележува дека додавањето на хуман серум со волуменски удел до околу 1% доведува до значително зголемување на струите на пиковите и во директна и во повратна насока, без разлика на применетата фреквенција. Покрај тоа, при поголеми фреквенции (повисоки од 50 Hz), волтаметриските својства на урична киселина се блиски до електрохемиски реверзибилен процес [8]. На слика 42 се претставени зависностите на односот на нет-струите на SWV пиковите и фреквенциите

($I_{\text{net,p}}/f$) како функција од $\log(f)$. Овие зависности се конструирани при неколку различни волуменски удели на хуман серум додадени во електрохемиската ќелија, во која иницијално има растворено урична киселина (со концентрација од $10 \mu\text{mol/L}$) во фосфатен пуфер со $\text{pH} = 7,34$. Зголемувањето на волуменскиот удел на хуманиот серум во волтаметриската ќелија од 0,25% до околу 1,25% доведува до значително зголемување на односот $I_{\text{net,p}}/f$ и до поместување на максимумите на кривите кон повисоки фреквенции (криви 2 - 5) во однос на кривата конструирана за урична киселина во отсуство на хуман серум (крива 1).

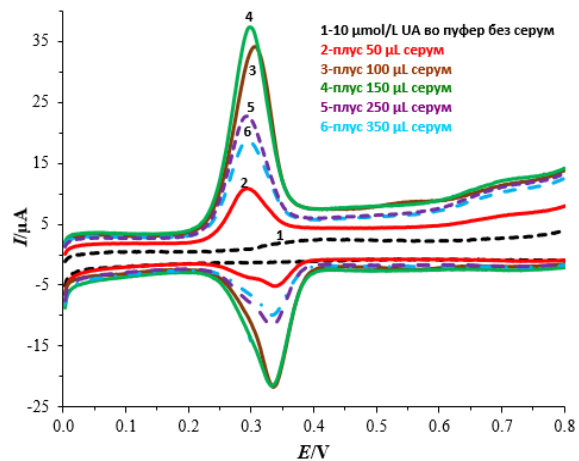
Овие податоци за поместувањето на позицијата на т.н. „квазиреверзибилен максимум“ на урична киселина кон повисоки вредности на фреквенциите во присуство на хуман серум, имплицираат дека присуството на хуман серум доведува до значително зголемување на електрохемиската реверзибилност на уричната киселина, како што може да се перцепира и од волтамограмите прикажани во табела 3.

Табела 3. Приказ на директните и повратните струјни компоненти од квадратно-брановите волтамограми на урична киселина снимени при различни фреквенции во отсуство на серум (кривите означени со број 1, црна испрекината линија), како и во присуство на дефиниран волумен на хуман серум додаден кон електрохемиската ќелија во која иницијално се растворени $10 \mu\text{mol/L}$ урична киселина во 20 mL фосфатен пуфер со $\text{pH} = 7,34$. Вредностите на додадените волумени на хуман серум се дадени во сликите.

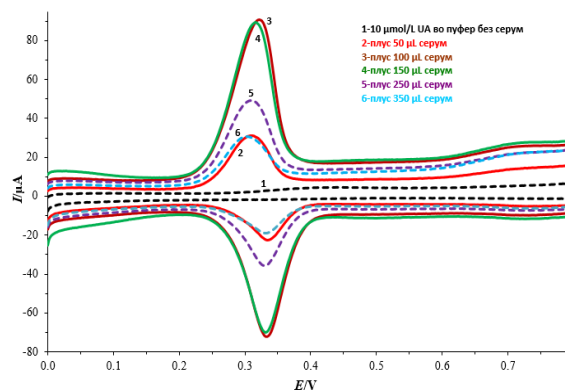
8 Hz



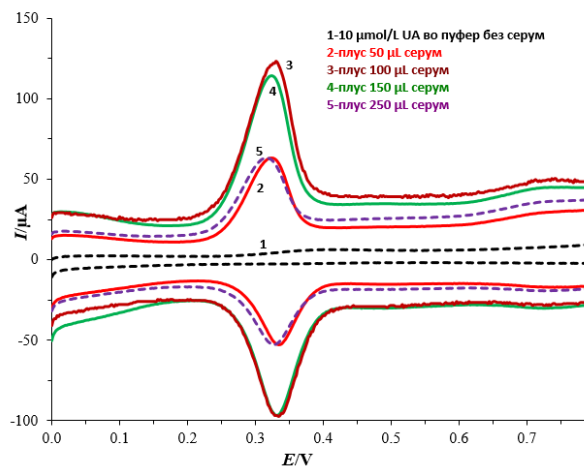
25 Hz

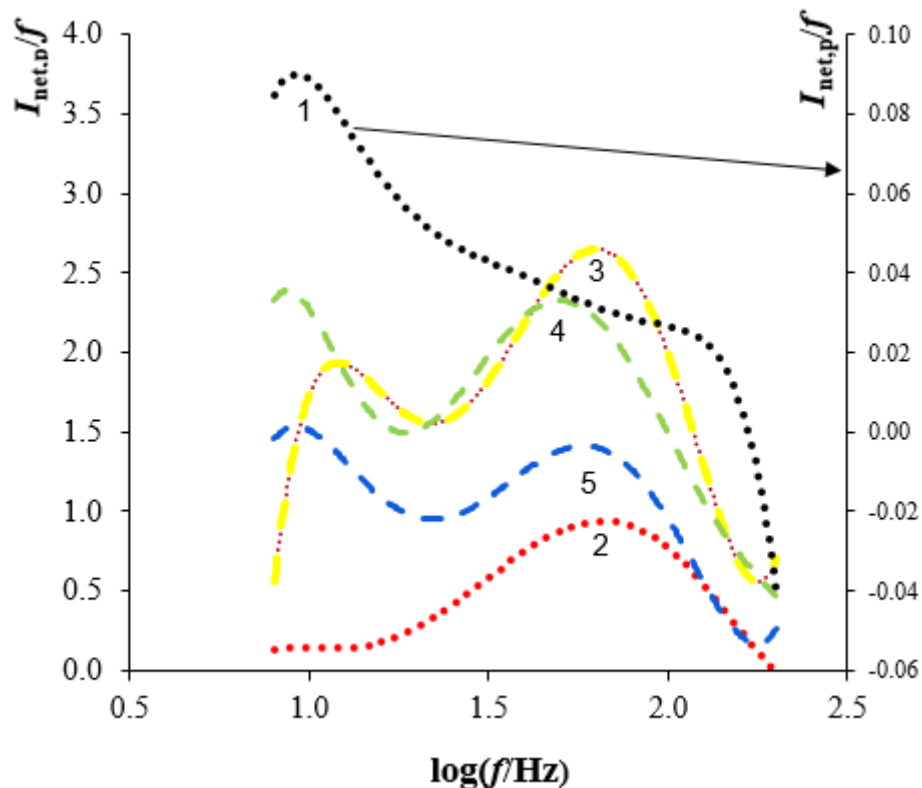


50 Hz



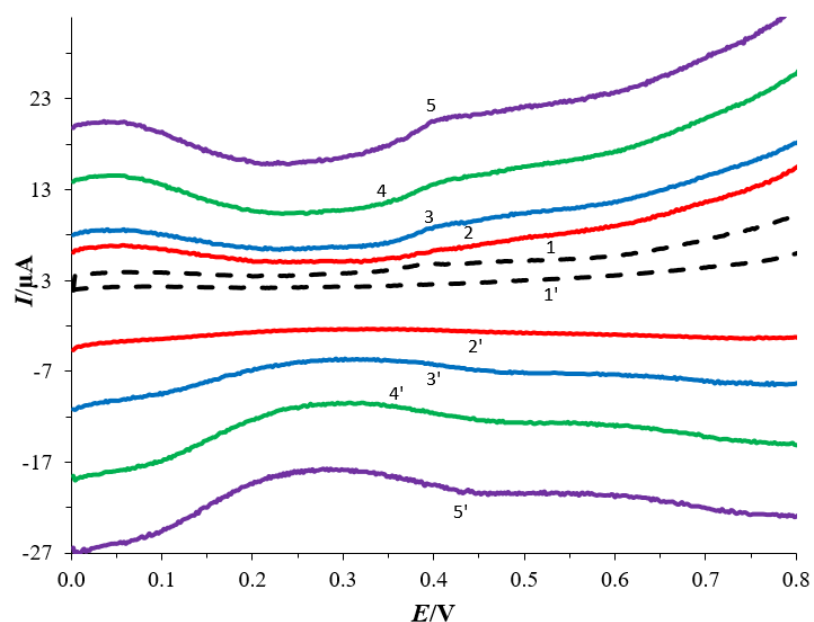
75 Hz





Слика 42. Криви на зависностите на односите на нет-волтаметриските пикови во однос на аплицираните фреквенции ($I_{\text{net,p}}/f$) како функција од $\log(f)$. Кривите се однесуваат на урична киселина во отсуство на хуман серум во електрохемиската ќелија (крива 1) и во присуство на хуман серум во електрохемиската ќелија со волуменски удели од 0,25% (2), 0,5% (3), 0,75% (4) и 1,25% (5). Во инцијалниот експеримент, во електрохемиската ќелија има растворена урична киселина со концентрација од $10 \mu\text{mol/L}$. Останатите услови се идентични како на слика 41.

Како што беше наведено претходно, исклучително е тешко да се анализира билирубин во водени раствори со неутрална рН вредност со примена на работни електроди чија површина не е модифицирана. Сепак, со примена на EPPGE како работна електрода, и со билирубин иницијално растворен во DMSO и додаден во 20 mL фосфатен пуфер со рН = 7,34, возможно е да се изврши увид во електрохемиското однесување на чист билирубин со SWV. На слика 43 се прикажани директните и повратните струјни компоненти од билирубин (со концентрација од $10 \mu\text{mol/L}$) од квадратно-бранови волтамограми, снимени при неколку различни фреквенции. Додека при ниски фреквенции електрохемиската активност на билирубинот се пресликува во слабо дефиниран директен пик и со многу слабо дефиниран повратен пик (криви со црна боја со ознаки 1-1' на слика 43), при фреквенции повисоки од 50 Hz, веќе има солидна дефиниција и на директните и на повратните пикови од квадратно-брановите волтамограми (кривите со ознаки 4-4' и 5-5' на слика 43). Ваквото електрохемиско однесување на билирубин е карактеристично за ЕС реакциските механизми, што е во согласност со неговиот процес на електрохемиска оксидација до биливердин, процес во кој се инволвирани $1 e^-$ и $1 H^+$ јон (реакциска шема на слика 33).

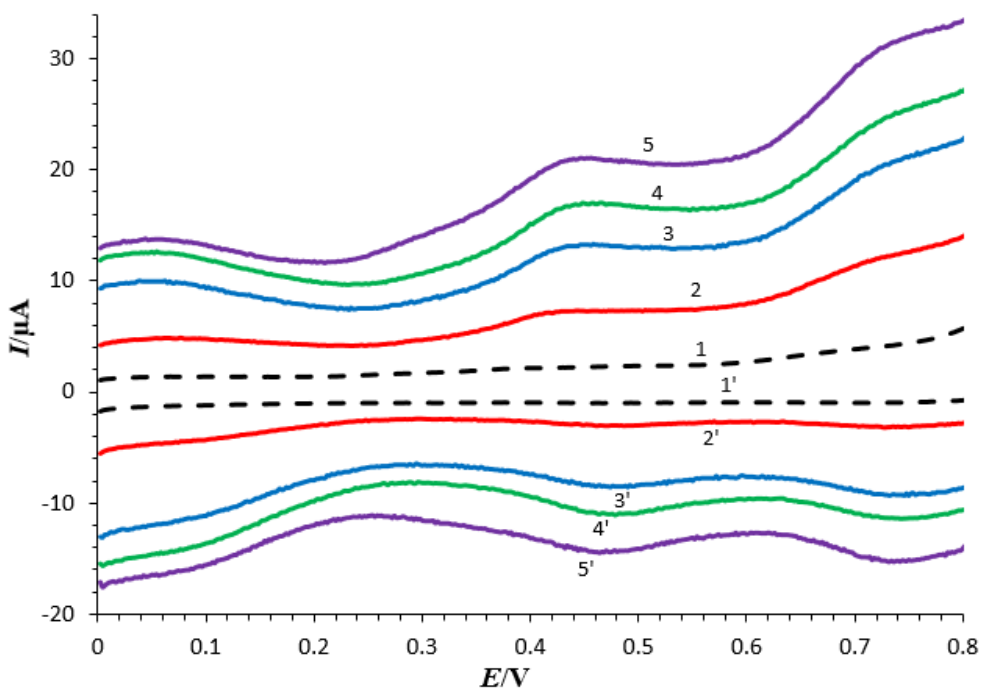


Слика 43. Приказ на директните и повратните струјни компоненти од квадратно-брановите волтамограми на билирубин (со концентрација од $10 \mu\text{mol/L}$) растворен во фосфатен пуфер со $\text{pH} = 7,34$. Фреквенцијата што одговара на овие струјни компоненти е 8 Hz (1-1'), 25 Hz (2-2'); 50 Hz (3-3'); 75 Hz (4-4'); 100 Hz (5-5'). Основниот раствор на билирубин беше добиен со негово растворање во DMSO. Останатите инструментални услови се идентични како на слика 25.

На слика 44 се прикажани директните и повратните струјни компоненти, снимени при идентични фреквенции како и волтамограмите од чист билирубин (што се претставени на слика 43), во сценарио кога кон електрохемиската ќелија што содржи $10 \mu\text{mol/L}$ билирубин, беа додадени $300 \mu\text{L}$ хуман серум (со волуменски удел од околу $1,50\%$), од пациент кој има нормални вредности на концентрација на билирубин и ниски вредности на концентрација на урична киселина. Како што може да се види од волтаметриските струјни компоненти од слика 44, додавањето на хуман серум доведува до значителни промени како во формата, така и во интензитетот и на директните и повратните пикови од билирубин. Притоа, со додавањето на хуман серум, и директните и повратните пикови од билирубин стануваат добро дефинирани при фреквенции повисоки од 25 Hz , а односот на струите на директните во однос на повратните пикови се приближува кон 1 при фреквенции повисоки од 50 Hz (криви 3-3', 4-4', и 5-5' на слика 44). Покрај тоа, потенцијалната сепарација помеѓу директните и повратните пикови се намалува со зголемување на фреквенцијата, додека позициите на потенцијалната скала на директните во однос на повратните пикови стануваат приближно еднакви при фреквенции поголеми од 75 Hz . Преку овие експерименти, дополнително се покажува дека хуманиот серум има влијание и врз електрохемиската реверзибилност на билирубин, слично (но не толку интензивно изразено) на влијанието како и кај уричната киселина (дискутирано на сликите 40 и 41 и во табела 3). Важно е да се нагласи дека додавањето на хуман серум со

волуменски удел од околу 1,5%, придонесува за минимално зголемување на почетната концентрација на билирубин во електрохемиската ќелија (од 10 $\mu\text{mol/L}$ на 10.2 $\mu\text{mol/L}$).

Експериментите дизајнирани со додавање на мали количини на хуман серум кон раствори што содржат чиста урична киселина и чист билирубин во електрохемиската ќелија, покажуваат дека матриксот на серумот игра многу важна улога во зголемување на електрохемиската реверзибилност и на уричната киселина и на билирубинот. Секако, овие податоци што се прикажани и дискутирани на сликите 40 - 44 и во табелите 2 и 3, нудат дополнителни информации за електрохемиските својства на компонентите анализирани во хуман серум со примена на EPPGE како работна електрода и со употреба SWV. Тие информации се важни за подетално да се разбере механизмот на електрохемиска трансформација на испитуваните компоненти во хуман серум, но и да се добијат податоци што ќе бидат од корист при развивање на протоколи за квантификацијата на студираниите аналити во хуман серум со примена на SWV.



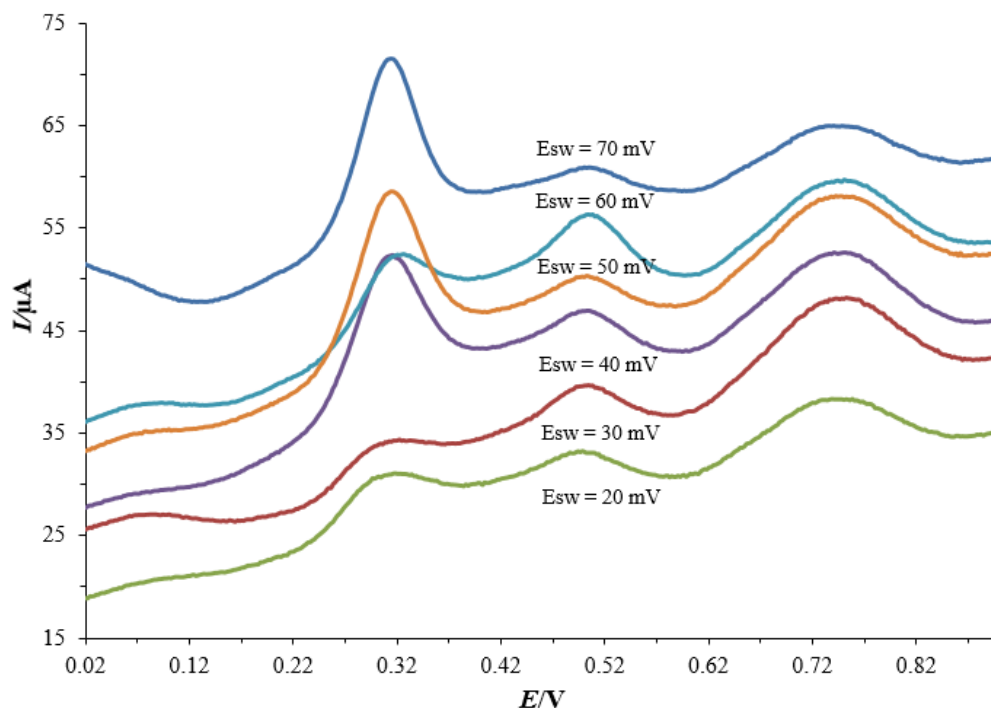
Слика 44. Приказ на директните и повратните струјни компоненти од квадратно-брановите волтамограми на билирубин (со концентрација од 10 $\mu\text{mol/L}$) растворен во 20 mL фосфатен пуфер со pH = 7,34. Кон овој раствор на билирубин во електрохемиската ќелија се додадени 300 μL хуман серум (со волуменски удел од 1,5%) од пациент без патологија. Крајната концентрација на билирубин (после додавањето на хуман серум во електрохемиската ќелија) изнесува 10,2 $\mu\text{mol/L}$. За подобра визуелна споредба, фреквенцијата што одговара на овие струјни компоненти е идентична како на слика 43 и истата изнесува: 8 Hz (1-1'), 25 Hz (2-2'); 50 Hz (3-3'); 75 Hz (4-4'); 100 Hz (5-5'). Основниот раствор на билирубин е добиен со негово растворање во DMSO. Останатите инструментални услови се идентични како на слика 25.

8. ОПТИМИЗАЦИЈА НА ИНСТРУМЕНТАЛНИТЕ ПАРАМЕТРИ ЗА АНАЛИТИЧКИ ЦЕЛИ ПРИ ВОЛТАМЕТРИСКО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА УРИЧНА КИСЕЛИНА, БИЛИРУБИН И АЛБУМИН ВО ХУМАН СЕРУМ

Покрај добивањето на информации за механизмите на електрохемиска трансформација на аналитите од интерес присутни во даден примерок хуман серум, оптимизацијата на инструменталните параметри се смета за еден од клучните сегменти во сеопфатниот процес на дизајнирање амперометриски биосензори, особено во примероци каде се спроведува т.н. мултиваријантна волтаметриска анализа. Како што е покажано во резултатите елаборирани во претходните поглавја во оваа дисертација, електрохемиската трансформација на молекулите од сите три студирани аналити присутни во хуман серум се одвива главно од адсорбирана состојба. Фреквенцијата е еден од клучните фактори што влијае и врз електрохемиската реверзибилност и врз адсорпциските феномени, како во SWV [8], така и во останатите пулсни волтаметриски техники [13]. Како оптимална вредност погодна за аналитички цели, во SWV применета на површински редокс системи, се смета вредноста на фреквенцијата што одговара на максимумот на кривата на зависност $I_{\text{net,p}}/f$ како функција од $\log(f)$ за даден аналит [8]. Доколку се анализираат соодветните криви што ги претставуваат „квазиреверзибилните максимуми“ конструирани за урична киселина и билирубин (слика 38 и слика 39, соодветно), фреквенциите што одговараат на максимумите на кривите се во регионот помеѓу 50 Hz и 60 Hz.

Покрај квадратно-брановата фреквенција, квадратно-брановата амплитуда (E_{sw}), потенцијалниот чекор (dE), потенцијалот на депозиција (E_{dep}) и времето на депозиција (t_{dep}) се критични инструментални параметри што влијаат врз дефиницијата и интензитетот на волтаметриски пикови кај површински редокс системи [8]. Што се однесува до оптимизацијата на потенцијалот на депозиција, треба да се напомене дека овој инструментален параметар влијае врз процесот на адсорпција на молекулите од испитуваните аналити. Притоа, влијанието на потенцијалот на депозиција, при време на депозиција од 15 s, беше тестирано во области на аплицирани потенцијали во регионот помеѓу -0,30 V и +0,40 V. Бидејќи беа добиени максимални големини на струите на пиковите од квадратно-брановите волтамограми за сите испитувани аналити (урична киселина, билирубин и албумин) при 0,00 V, оваа вредност на потенцијалот на депозиција од 0,00 V беше избрана како оптимална за аналитички цели на студирани аналити во хуман серум.

Покрај фреквенцијата, амплитудата (E_{sw}) на квадратно-брановите пулсеви многу често се дефинира како еден од круцијалните параметри во аналитичките апликации на SWV [8]. Треба да се нагласи дека квадратно-брановата амплитуда има влијание врз две важни карактеристики на добиените волтамограми: (а) влијае врз мерливите својства на волтаметриските пикови, но (б) амплитудата има влијание и врз односот сигнал-шум на резултатните пикови. Покрај тоа, важно е да се потенцира дека амплитудата на применетите квадратно-бранови потенцијални пулсеви служи како параметар што има значително влијание на брзината на хетерогена размена на електрони помеѓу работната електрода и молекулите на аналитите од интерес [8]. На слика 45 е прикажана серија од квадратно-бранови волтамограми на хуман серум, снимени како функција од применетата квадратно-бранова амплитуда.



Слика 45. Приказ на квадратно-бранови волтамограми на хуман серум (нет-струјни компоненти), снимени како функција од квадратно-брановата амплитуда, при фреквенција од 50 Hz. Останатите услови се како на слика 25.

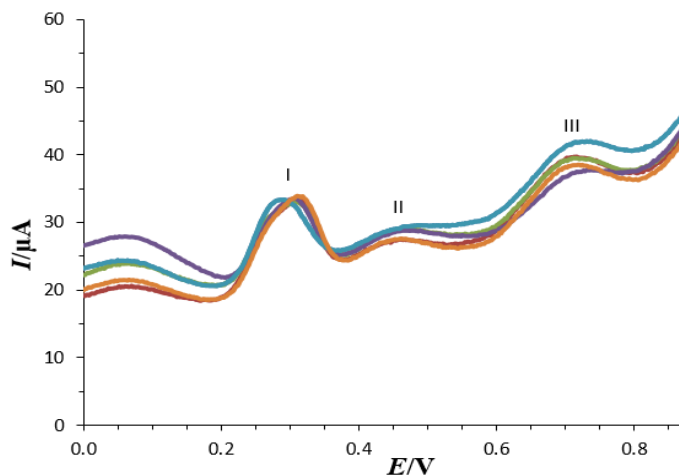
При апликација на квадратно-бранови амплитуди до вредности од околу 50 mV, интензитетот на сите три волтаметриски пикови се зголемува пропорционално со E_{sw} . Меѓутоа, како што амплитудата на квадратниот бран се зголемува над 50 mV, волтаметриските пикови од билирубин и албумин почнуваат значително да се шират, што води до одреден степен на меѓусебно преклопување кога амплитудата надминува 90 mV. Вредност на квадратно-брановата амплитуда од 50 mV придонесува за дефиниција на волтаметриски пикови со добра резолуција. Притоа, односот на интензитетот на пиковите во однос на полуширината на пиковите (овој однос се смета како важен параметар во аналитички цели) има највисока вредност при амплитуди од 50 mV, поради што оваа вредност за E_{sw} беше одбрана во протоколот за квантификација на студираниите аналити во хуман серум.

Освен од квадратно-брановата амплитуда и фреквенцијата, резолуцијата, формата и интензитетот на волтаметриските пикови од сите испитувани аналити во хуман серум зависи и од големината на потенцијалниот чекор (dE). Освен врз резолуцијата на волтаметриските пикови, потенцијалниот чекор влијае и врз степенот на електрохемиска реверзибилност на електродните процеси од сите аналити. Истражувањето на овој инструментален параметар покажа дека потенцијален чекор од 4 mV се покажа како соодветен за аналитички евалуации поврзани со сите волтаметриски пикови. При примена на потенцијални чекори со вредности поголеми од 8 mV, формата на волтаметриските пикови беше значително деформирана, при што волтаметриските пикови беа со дефиниции несоодветни за аналитички цели.

9. ВЛИЈАНИЕ НА ИНТЕРФЕРЕНТНИ СУПСТАНЦИ ВРЗ ЕЛЕКТРОХЕМИСКИТЕ ПРОЦЕСИ ОД УРИЧНА КИСЕЛИНА, БИЛИРУБИН И АЛБУМИН ПРИ ВОЛТАМЕТРИСКИ АНАЛИЗИ НА ХУМАН СЕРУМ

Спроведувањето волтаметриски анализи во комплексен систем, како што е хуманиот серум, претставува значителен предизвик, особено во експериментални сценарија при кои не се имплементираат претходни третмани и не се аплицираат дополнителни реагенси во примерокот за анализа. Имајќи предвид дека хуманиот серум е исклучително комплексен систем, покрај уричната киселина, билирубинот и албуминот, се очекува, голем број други молекули присутни во серумот да покажат потенцијал за адсорпција на површината на работната електрода. Во таков случај, многу од овие молекули присутни во матрицата од хуманиот серум, можат да имаат силно влијание врз адсорпциските својства на анализираните аналити. Притоа, ваквите ефекти на конкурентна адсорпција потенцијално можат да влијаат врз процесот на пренос на електрони помеѓу работната електрода и молекулите на испитуваните аналити. Покрај тоа, не е исклучена можноста и од меѓусебни интеракции на површината на работната електрода помеѓу адсорбираните молекули од испитуваните урична киселина, билирубин и албумин.

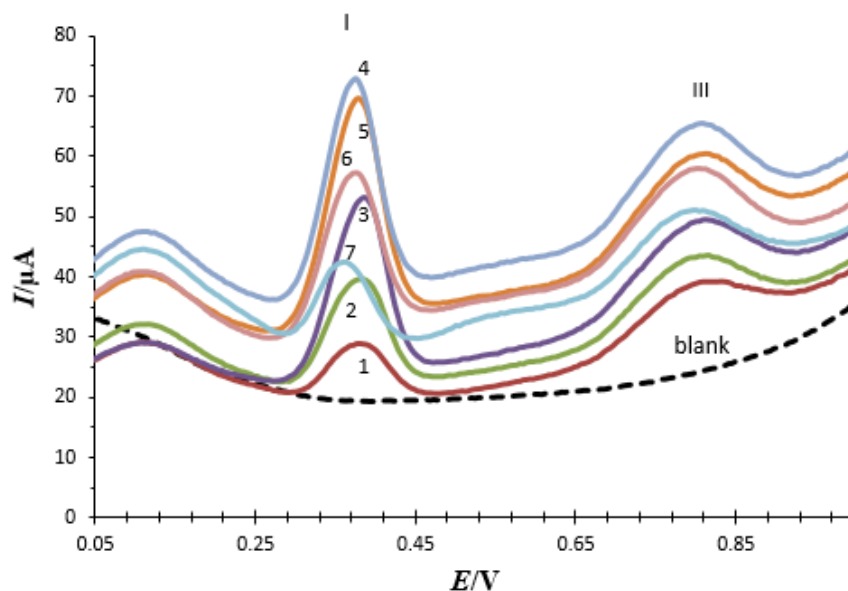
Имајќи ги предвид различните аналити што се присутни во хуманиот серум, беа извршени испитувања на влијанието на глюкоза, холестерол и триглицериди врз волтаметриското однесување на анализираните супстанции. Преку серија волтаметриски експерименти спроведени врз хуман серум, беше покажано дека глюкозата нема забележливо влијание на волтаметриските пикови на испитуваните аналити, кога нејзината концентрација е во граници до 300 $\mu\text{mol/L}$. Отсуството на промени во интензитетот на струите и во позицијата на волтаметриските пикови од урична киселина и албумин, забележани при перманентно зголемување на концентрацијата на глюкоза во волтаметриската ќелија, имплицира отсуство на влијание на глюкозата врз електрохемиските својства на испитуваните аналити (слика 46).



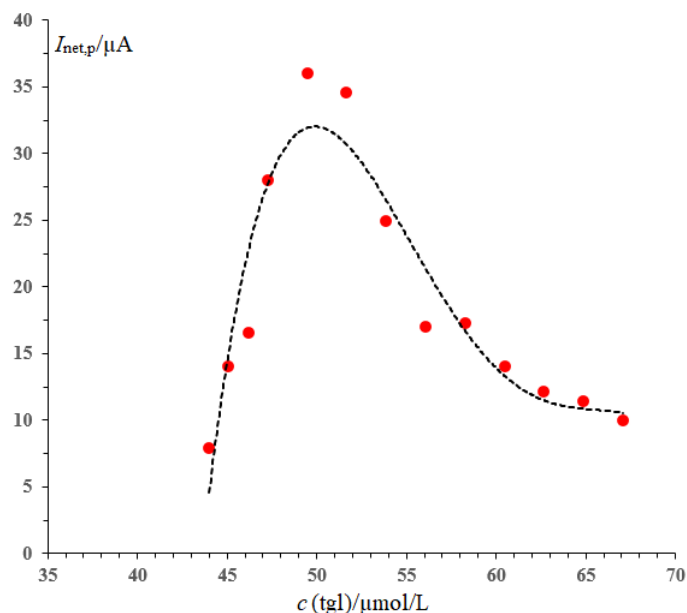
Слика 46. Влијание на концентрацијата на глюкоза врз волтаметриските пикови добиени со анализа на хуман серум (нет-струјни компоненти). Концентрации на глюкоза од 50 $\mu\text{mol/L}$ до 300 $\mu\text{mol/L}$ немаат влијание врз интензитетот на пиковите од урична киселина и албумин. Хуманиот серум е од здрав пациент. Останатите инструментални услови се како на слика 26.

Спротивно на овие сознанија за отсуство на влијание на глюкозата врз електрохемиските процеси на урична киселина, билирубин и албумин, во случајот со влијанието на холестерол беа забележани значителни ефекти. Имено, при концентрации на холестерол поголеми од $200 \mu\text{mol/L}$ во електрохемиската ќелија, доаѓа до значително намалување на интензитетот на сите волтаметриски пикови од урична киселина, билирубин и албумин. Овој ранг на концентрации на холестерол, генерално се однесува за пациенти кои имаат покачени нивоа на холестерол во крвта. Во литература е познато дека холестеролот е силно липофилна молекула, што има тенденција значително да се адсорбира на површината на работните електроди дизајнирани на база на јаглерод [56]. Оваа силна адсорпција на холестеролот најчесто предизвикува силна изолација на површината на работната електрода. На тој начин, со адсорпцијата на холестеролот се спречува адсорпцијата на аналитите од интерес, при што холестеролот ќе влијае и врз процесот на пренос на електрони помеѓу работната електрода и молекулите од урична киселина, билирубин и албумин.

Во однос на влијанието на триглицериди врз волтаметриските одговори на студираните аналити, се забележува интересен тренд во контекст на однесувањето на уричната киселина (Слика 47). Зголемувањето на концентрацијата на триглицериди во опсег од $44 \mu\text{mol/L}$ до $52 \mu\text{mol/L}$ резултира со значително зголемување на волтаметрискиот пик на уричната киселина. Сепак, последователното зголемување на триглицериди води до значително намалување на интензитетот на волтаметрискиот пик (волтамограми на слика 47 и крива на слика 48).



Слика 47. Влијание на концентрацијата на триглицериди врз квадратно-брановите волтамограми (нет-струјни компоненти) на хуман серум. Концентрацијата на урична киселина во електрохемиската ќелија е $6,05 \mu\text{mol/L}$ додека концентрацијата на албумин е $16,50 \mu\text{mol/L}$. Содржината на триглицериди во електрохемиската ќелија изнесува $44,15 \mu\text{mol/L}$ (1), $45,22 \mu\text{mol/L}$ (2), $46,29 \mu\text{mol/L}$ (3), $49,50 \mu\text{mol/L}$ (4), $51,64 \mu\text{mol/L}$ (5), $53,78 \mu\text{mol/L}$ (6) и $59,13 \mu\text{mol/L}$ (7). Волтамограмите се снимени при време на депозиција од 30 s и потенцијал на депозиција од 0,00 V. Останатите услови се идентични како на слика 25.



Слика 48. Влијание на концентрацијата на триглицериди врз интензитетот на струите на нет-пиковите на урична киселина. Експериментите услови при кои е конструирана кривата се идентични како условите на слика 47.

Очигледно е дека умерената концентрација на триглицериди придонесува за промена на адсорпциските својства на урична киселина и ја олеснува електронската комуникација помеѓу работната електрода и молекулите од урична киселина. Од друга страна, триглицеридите присутни во концентрации поголеми од 52 $\mu mol/L$ покажуваат значителна адсорпција на површината на работната електрода, со што доаѓа до значително намалување на површинската концентрација на урична киселина. Концентрациите на триглицеридите прикажани на слика 48 се во ранг над горната граница на референтните вредности за здрав пациент. Важно е да се напомене дека триглицеридите во студираниот концентрационен опсег имаат мало влијание врз електрохемискиот процес на албуминот (нет-пиковите од квадратно-брановите волтамограми што го прикажуваат процесот на електрохемиска трансформација на албумин на слика 47).

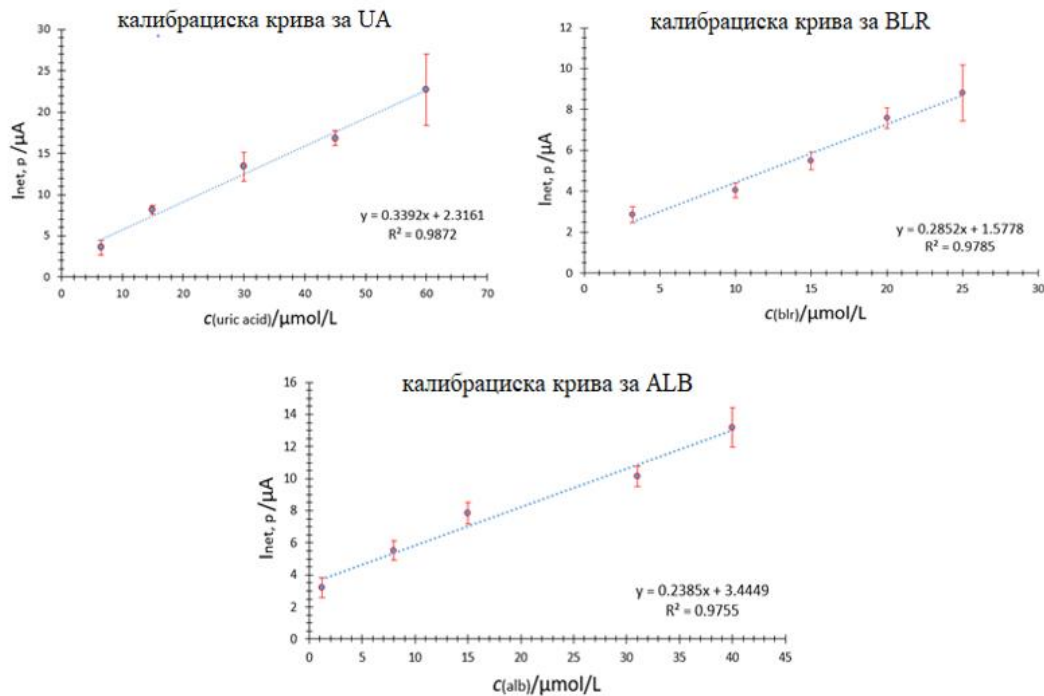
Бидејќи електрохемиската активност на молекулите од испитаните аналити (урична киселина, билирубин и албумин) присутни во хуман серум се одвива од адсорбирана состојба, разумно е да се заклучи дека многу веројатни се процеси на конкурентна адсорпција и меѓусебни интеракции на молекулите од адсорбираните аналити на површината на EPPGE. За да се испитаат овие ефекти, беа дизајнирани волтаметрички експерименти во кои концентрацијата на еден аналит систематски се менуваше, додека концентрациите на останатите два аналита во електрохемиската ќелија се одржуваа константни. При овој сет на експерименти, беше утврдено дека уричната киселина присутна во концентрации над 65 $\mu mol/L$ во електрохемиската ќелија, придонесува за истовремено намалување на интензитетите на волтаметричките пикови (што ја претставуваат електрохемиската трансформација) и на билирубинот и албуминот. Овие наоди се согласуваат со генералната тенденција на уричната киселина да се адсорбира посилено од билирубинот, како што може да се заклучи од податоците на слика 36. Во друг

сет на експерименти, концентрации на билирубин во електрохемиската ќелија поголеми од 40 $\mu\text{mol/L}$, придонесуваат до намалување на интензитетот на пикот што потекнува од електрохемискиот процес на урична киселина. Очигледно е дека во споменатите концентрациски подрачја, адсорпцијата на молекулите од билирубинот (при концентрации $c > 40 \mu\text{mol/L}$) и урична киселина (при концентрации $c > 65 \mu\text{mol/L}$) е значителна, што може негативно да влијае на интензитетот и на двата волтаметриски пикови. Во контекст на третиот аналит (албумин), важно е да се напомене дека при концентрации на албумин во електрохемиската ќелија поголеми од 60 $\mu\text{mol/L}$, се забележува умерено зголемување на интензитетот на волтаметрискиот пик поврзан со електрохемискиот процес на билирубинот. Имајќи ги предвид литературните податоци [123] кои укажуваат дека албуминот има својства да посредува во мембранскиот транспорт на липофилните молекули на билирубин, логично е да се заклучи дека зголемените концентрации на албумин во волтаметриската ќелија овозможуваат подобра адсорпција на билирубинот и ја промовираат неговата интеракција со работната електрода. Овие интеракции помеѓу молекулите од испитуваните аналити се важни во контекст на разбирање на волтаметриските анализи во хуман серум, бидејќи истите придонесуваат кон подобро разбирање на механизмите на електрохемиска трансформација на уричната киселина, билирубинот и албуминот.

Имајќи ги предвид резултатите елаборирани во овој дел од дисертацијата, важно е да се нагласи дека интеракции со поголем интензитет помеѓу молекулите на аналитите се очекуваат главно кај пациенти кои имаат зголемени концентрации на сите три аналити во серумот. Проблемот со конкурентните интеракции помеѓу молекулите од испитуваните аналити, делумно може да се надмине со намалување на волуменскиот удел на серумот, односно волтаметриските експерименти да се спроведат со волуменски удел на хуман серум помал од 2,4% во електрохемиската ќелија.

10. КОНЦЕНТРАЦИСКИ ЗАВИСНОСТИ НА ИНТЕНЗИТЕТОТ НА ВОЛТАМЕТРИСКИТЕ ОДГОВОРИ ОД УРИЧНА КИСЕЛИНА, БИЛИРУБИН И АЛБУМИН: КОНСТРУКЦИЈА НА КАЛИБРАЦИСКИ КРИВИ

На слика 49 се прикажани три криви што ги прикажуваат концентрациските зависимости на волтаметриските пикови од урична киселина, билирубин и албумин, конструирани при квадратно-бранови волтаметриски анализи за сите три аналити присутни во хуман серум.



Слика 49. Графици што ја покажуваат концентрационата зависност на интензитетот на струјата на волтаметриските нет-пикови, конструирани за UA, BLR и ALB. Кривите се конструирани со метод на стандарден додаток спроведен со волуменски удел од 2,4% хуман серум првично растворен во фосфатен пуфер. Инструменталните параметри аплицирани при овој протокол се: SW фреквенција $f = 50 \text{ Hz}$, SW амплитуда $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$, потенцијален чекор $dE = 4 \text{ mV}$, потенцијал за депозиција $E_{\text{dep}} = 0,0 \text{ V}$, и време за депозиција $t_{\text{dep}} = 30 \text{ s}$. Секој точка презентирани на графикот е просечна вредност од 9 мерења. Почетната точка на графиците ја претставува соодветната концентрацијата на дефинираниот аналит во анализираниот хуман серум, определена со UV-Vis методот.

Треба да се нагласи дека вредноста на секоја точка на правите на концентрациските зависимости претставени на слика 49 претставува просечна вредност добиена од најмалку девет мерења. Експерименталниот протокол применет за конструирање на графиците на сликите вклучува анализа на хуман серум со волуменски удел од 2,4% , што содржи висока концентрација на билирубин, а нормални концентрации на урична киселина и албумин. Првата точка на секоја калибрациска крива на слика 49 се однесува на

концентрацијата на конкретниот аналит во серумот што е одредена со примена на UV-Vis метод. Притоа, концентрацијата во електрохемиската ќелија постепено се зголемува, паралелно за сите три аналити, со додавање на соодветни стандардни додатоци за сите аналити. На тој начин, повисока концентрација на даден аналит беше измерена во присуство на повисоки концентрации на другите два аналити. Овој протокол е применет со цел да се претстават зависностите прикажани во сликите на еден пореален начин, со цел да се земат предвид потенцијалните интеракции помеѓу аналитите. Важно е да се напомене дека по секое волтаметриско мерење, работната електрода беше чистена во согласност со процедурата опишана во [99].

Во табела 4 се претставени главните перформанси на протоколот за SW волтаметричка метода развиена за симултана анализа на урична киселина, билирубин и албумин во хуман серум. При вредности на инструменталните параметри што претходно беа оптимизирани, линеарна зависност помеѓу интензитетот на струите на нет-пиковите и концентрациите за урична киселина, билирубин и албумин постои во концентрациските региони од 6 $\mu\text{mol/L}$ до 60 $\mu\text{mol/L}$ (за урична киселина), од 3 $\mu\text{mol/L}$ до 25 $\mu\text{mol/L}$ (за билирубин) и од 2 $\mu\text{mol/L}$ до 40 $\mu\text{mol/L}$ (за албумин). Определените граници на детекција за испитуваните аналити се 2,80 $\mu\text{mol/L}$ (за урична киселина), 2,20 $\mu\text{mol/L}$ (за билирубин) и 1,99 $\mu\text{mol/L}$ (за албумин). Вредностите на коефициентите на корелација (R^2) се во ранг од 0,99 и 0,98 за сите испитувани аналити, со што се потврдува добрата линеарност на развиената аналитичка постапка. Покрај тоа, релативната стандардна девијација се движи во границите помеѓу 2,00% и 2,60%, факт што укажува на прилично добра прецизност на методата, имајќи ја предвид целокупната комплексност на испитуваниот систем. Индикаторите за грешка прикажани на секоја од точките на правите линии од концентрациските зависности на слика 49 откриваат зголемени стандардни девијации што се особено изразени при повисоки концентрации на аналитите. Оваа појава може да се препише на изразените меѓусебни интеракции помеѓу сите три компоненти, кои се поинтензивни при повисоки концентрации на аналитите, како што беше дискутирано во претходното поглавје на дисертацијата.

Табела 4. Валидација на параметрите за определување на урична киселина, билирубин и албумин со примена на квадратно-бранова волтаметрија.

аналит	концентрациски ранг/ $\mu\text{mol/L}$	равенка на линеарна регресиона права	коефициент на корелација R^2	стандардна девијација SD/ μA	релативна стандардна девијација RSD %	граница на детекција LOD/ $\mu\text{mol/L}$	граница на квантификација LOQ/ $\mu\text{mol/L}$
UA	6-60	$y=0,3392x+2,3161$	0,99	0,32	2,56	2,80	9,24
BLR	3-25	$y=0,2852x+1,5778$	0,98	0,25	2,60	2,20	7,26
ALB	2-40	$y=0,2385x+3,4449$	0,98	0,23	2,08	1,99	6,56

*границата на детекција (LOD) беше пресметана според изразот: $\text{LOD} = 3\text{SD}/a$; каде SD е ознака за стандардната девијација на нет-струјните компоненти од основниот електролит, додека со „a“ е означен наклонот на соодветната права на линеарната регресиона линија од зависностите прикажани на слика 49. Границата на квантификација (LOQ) е пресметана според изразот: $\text{LOQ} = 3,3 \times \text{LOD}$.

11. АНАЛИТИЧКА АПЛИКАЦИЈА НА ВОЛТАМЕТРИСКАТА МЕТОДОЛОГИЈА ЗА ДИРЕКТНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА УРИЧНА КИСЕЛИНА, БИЛИРУБИН И АЛБУМИН ВО ХУМАН СЕРУМ

Волтаметриската методологија елаборирана во оваа дисертација беше употребена за симултано определување на концентрациите на студираниите аналити во неколку примероци на хуман серум. Резултатите добиени од овие волтаметриски експерименти се прикажани во табела 5, заедно со податоците добиени со примена на стандардниот UV-Vis метод што се користи во клиничката биохемија. Споредбата на двата сета на податоци покажува дека постои значителна согласност помеѓу двата резултати добиени со два различни протоколи. Притоа, поизразени разлики помеѓу добиените вредности се јавуваат кај примероци што содржат високи концентрации на урична киселина (види серум со бр. 4, на пример). Овој резултат е очекуван, а ефектите поврзани со меѓусебни интеракции од молекулите од аналитите, што главно се јавуваат при високи концентрации на аналитите, беа елаборирани во претходните поглавја од дисертацијата. Важно е да се напомене дека податоците презентирани во Табела 5 се однесуваат на концентрациите на аналитите што се присутни во електрохемиската ќелија.

Табела 5. Споредба на определените вредности за концентрациите на UA), BLR и ALB од анализите направени со UV-Vis протокол и анализите направени со примена на волтаметриската методологија елаборирана во оваа дисертација.

серум бр.	UA UV-Vis $\mu\text{mol/L}$	UA во оваа работа $\mu\text{mol/L}$	BLR UV-Vis $\mu\text{mol/L}$	BLR во оваа работа $\mu\text{mol/L}$	ALB UV-Vis $\mu\text{mol/L}$	ALB во оваа работа $\mu\text{mol/L}$
1	5,2	6,9	/	/	15,5	16,2
2	/	/	/	/	20,8	21,6
3	4,3	8,8	/	/	18,5	15,7
4	64,5	54,2	3,43	4,3	23,6	24,1
5	/	/	10,1	9,2	/	/
6	5,6	5,8	7,2	6,6	/	/
7	35,1	42,8	/	/	/	/

*Вредностите се однесуваат на концентрациите на аналитите во електрохемиската ќелија.

**За овој сет на експерименти, примероци од хуман серум со волуменски удел од 2,4% се растворени во фосфатен пуфер со $\text{pH} = 7,34$. Волтаметриските мерења се спроведени при време на депозиција $t_{\text{dep}} = 30 \text{ s}$, фреквенција $f = 50 \text{ Hz}$, амплитуда $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$ и потенцијален чекор $dE = 4 \text{ mV}$. За секој серум, се направени минимум 5 мерења, а просечните вредности на струи на соодветните нет-пикови од квадратно-брановите волтамограми се употребени за евалуација на концентрациите на UA, BLR и ALB, користејќи ги равенките на линеарните линии од Табела 4.

***За примероците со броеви 4 и 7 е користен хуман серум со волуменски удел од 4,8%.

12. ЗАКЛУЧОЦИ

Резултатите презентирани во оваа дисертација се добиени преку систематска и сеопфатна волтаметриска студија на електрохемиските својства на хуман серум. Во применетиот протокол е употребена директна анализа на примероците на хуман серум, без дополнителна примена на какви било хемикалии и постапки што би се додале кон хуманиот серум во целата постапка на анализа. Со примена на квадратно-бранова волтаметрија на немодифицирана електрода изработена од странично ориентиран пиролитичен графит (EPPGE), можно е да се добие увид во електрохемиските својства на три важни аналити присутни во хуманиот серум: урична киселина, билирубин и албумин. Волтаметриските одговори на сите испитувани аналити во хуманиот серум покажуваат својства на значително изразени електрохемиски реверзибилни процеси во услови на квадратно-бранова волтаметрија.

Како главни придобивки од резултатите елаборирани во докторската дисертација може да се наведат следните:

-Урична киселина, билирубин и албумин, присутни во хуман серум (што е растворен во граници од 1% до 5% во фосфатен пуфер со $pH = 7,34$, покажуваат добро изразена електрохемиска активност, но само со употреба на EPPGE како работна електрода и квадратно-бранова волтаметрија како работна техника. Процесите поврзани со електрохемиската трансформација на овие три аналити во хуман серум се дефинираат на потенцијали од околу $+0,30\text{ V}$ (за UA), $+0,48\text{ V}$ (за BLR) и $+0,72\text{ V}$ (за ALB).

-Електрохемиската трансформација на сите аналити (урична киселина, билирубин и албумин) присутни во хуман серум може да се опише со EC реакциски механизам.

-Анализите спроведени со примена на квадратно-бранова волтаметрија покажаа дека временската скала на мерењата (изразена преку квадратно-брановата фреквенција) игра многу важна улога во целокупниот процес на електрохемиска трансформација на сите испитувани аналити.

-Молекулите на сите системи испитувани во оваа дисертација покажуваат изразени адсорпциски својства на површината од работната електрода, при што најсилно изразени адсорпциски својства покажува уричната киселина.

-Матриксот на серумот има големо влијание врз електрохемиското однесување на сите три аналити. Во експерименти дизајнирани со чисти супстанции (урична киселина или билирубин) растворени во пуфер, додавањето на мали порции на хуман серум (волуменски удел до околу 2%) од здрав пациент, придонесува кон зголемување на електрохемиската реверзибилност на испитуваните аналити. Најверојатно, овие феномени се должат од комбинација на ефекти поврзани со (а) стабилизирање на продуктите од електрохемиската трансформација на аналитите, (б) модификација на работната електрода со конкурентна адсорпција на компоненти присутни во хуман серум кои ја подобруваат електронската комуникација помеѓу работната електрода и аналитите, и (в) подобрена растворливост на аналитите.

-Испитувањето на влијанието на интерференти покажа дека холестеролот кога е присутен во граници поголеми од $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ во електрохемиската ќелија, придонесува за намалување на интензитетите на пиковите од сите три аналити, додека глукозата не покажува влијание до концентрации од околу $300\text{ }\mu\text{mol/L}$. Триглицеридите, пак, присутни во концентрациски подрачја од $44\text{ }\mu\text{mol/L}$ до $52\text{ }\mu\text{mol/L}$ придонесуваат за значително зголемување на интензитетот на волтаметрискиот пик од урична киселина, додека при

повисоки концентрации од 55 $\mu\text{mol/L}$ предизвикуваат намалување на интензитетот на пикот од урична киселина.

-Поради адсорпциските својства на молекулите од сите испитувани аналити, испитувана е и можноста за меѓусебни интеракции на испитуваните компоненти. Притоа, концентрации на урична киселина повисоки од 65 $\mu\text{mol/L}$ предизвикуваат ефект на намалување на пиковите од сите аналити, додека концентрациите на билирубин што предизвикуваат ефект на намалување на пиковите од другите аналити се повисоки од 40 $\mu\text{mol/L}$. Албуминот во концентрации повисоки од 60 $\mu\text{mol/L}$ придонесува за умерено зголемување на пикот од билирубин.

-Со цел да се дизајнира протокол за симултано определување на урична киселина, билирубин и албумин во хуман серум, извршена е оптимизација на инструменталните параметри. Притоа, потенцијал на депозиција од 0,00 V, време на депозиција од 30 s, фреквенција од 50 Hz, амплитуда од 50 mV и потенцијален чекор од 4 mV се покажаа како најпогодни за симултано определување на сите три аналити.

-Во хуман серум од пациент со покачени вредности за билирубин, направена е концентрациска зависност на интензитетот на струјата од волтаметриските пикови од сите три аналити. Притоа, со паралелно зголемување на концентрациите на сите аналити во електрохемиската ќелија (со постепено паралелно додавање на стандардни додатоци од аналитите), утврдено е дека постои линеарна зависност помеѓу измерените струи на нет-пиковите и на аналитите во регион од 6 $\mu\text{mol/L}$ до 60 $\mu\text{mol/L}$ (за UA), од 3 $\mu\text{mol/L}$ до 25 $\mu\text{mol/L}$ (за BLR) и од 2 $\mu\text{mol/L}$ до 40 $\mu\text{mol/L}$ (за ALB).

-Определените граници на детекција за испитуваните аналити се 2,80 $\mu\text{mol/L}$ (за урична киселина), 2,20 $\mu\text{mol/L}$ (за билирубин) и 1,99 μM (за албумин).

-Вредностите на коефициентите на корелација (R^2) се во ранг од 0,99 и 0,98 за сите испитувани аналити, со што се потврдува добрата линеарност на развиената аналитичка постапка.

-Релативната стандардна девијација се движи во границите помеѓу 2,00% и 2,60%, факт што укажува на прилично добра прецизност на методата, имајќи ја предвид целокупната комплексност на испитуваниот систем.

-Развиениот протокол со употреба на EPPGE како работна електрода и квадратно-бранова волтаметрија како работна техника, беше применет за определување на урична киселина, билирубин и албумин во неколку примероци од хуман серум. Притоа, резултатите од волтаметриските експерименти беа во добра согласност со резултатите добиени со конвенционалните определувања на овие аналити со примена на UV-Vis техника.

-Протоколот елабориран во оваа дисертација, во суштина е брза, евтина и едноставна волтаметриска методологија, што исклучува употреба на дополнителни реагенси за стабилизација на серумот, или употреба на специфични реактивни реагенси.

-Резултатите елаборирани во оваа дисертација може да се гледаат како солидна основа за развивање на point-of-care уреди за детекција и квантификација на урична киселина, билирубин и албумин, што е од суштинско значење за брза медицинска дијагностика.

-Резултатите презентирани во оваа дисертација ја демонстрираат можноста за дизајнирање на ефтин, брз и веродостоен амперометриски биосензор, дури и во многу комплексни медиуми каков што е хуманиот крвен серум. Развиената методологија овозможува „label-free“ (или протокол без било каков предтретман) квантификација на

трите аналити. Иако развиената методологија до одреден степен зависи од целокупниот состав на матриксот, сепак таа нуди рационализиран пристап, избегнувајќи ја потребата од скапи процедури, што бараат долго време за изведување, кои традиционално се користат во електрохемиската детекција на испитуваните аналити [17, 124-126].

Развиениот волтаметриски протокол во оваа дисертација се издвојува од останатите протоколи познати во литература, пред сè поради својата брзина, ниската цена и едноставна изведба на експериментите. Ова е посебно важно, имајќи предвид дека за анализа на биохемиски системи присутни во биолошки примероци, најчесто се употребуваат ензимски методи на електроди модифицирани со наночестички [22, 62, 127]. Волтаметриската методологија елаборирана во оваа дисертација, може да се гледа како клучен чекор кон дизајнирање на point-of-care сензорски системи за брза и истовремена квантификација на урична киселина, билирубин и албумин во хуман серум, што е особено важно во медицинската дијагностика.

Во литературата не постојат трудови каде е прикажано симултано електрохемиско определување на урична киселина, билирубин и албумин во хуман серум. Покрај тоа, во дисертацијата за прв пат е покажано дека матриксот на серумот делува како еден вид каталитичко средство во електрохемиската детекција на урична киселина, билирубин и албумин.

13. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- [1] P. Chandra, „Personalized biosensors for point-of-care diagnostics: from bench to bedside applications,“ *Nanotheranostics*, vol.7, no. 2, pp. 210-215, 2023.
- [2] Y. Saylan, E. Ozgur, and A. Denizli, „Recent advances of medical biosensors for clinical applications,“ *Medical Devices & Sensors*, vol 4, 2021.
- [3] E. T. S. G. da Silva, D. E. P. Souto, J. T. C. Barragan, J. de F. Giarola, A. C. M. de Moraes, and L. T. Kubota, „Electrochemical biosensors in point-of-care devices: Recent advances and future trends,“ *ChemElectroChem.*, vol.4, pp. 77-794, 2017.
- [4] J. Wang, „Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics,“ *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, pp. 1887-1892, 2006.
- [5] K. Најков, Квадратно-бранова волтаметрија на крвен серум, магистерска работа, Природно-математички факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј-Скопје, 2010.
- [6] R. G. Compton, and C.E. Banks, *Understanding voltammetry*, 2nd Edition, Imperial College Press, London, UK, 2011.
- [7] A. J. Bard, and L. R. Faulkner, *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*, 3rd edition, John Wiley & Sons, Inc., 2004.
- [8] V. Mirceski, S. Komorsky-Lovric, and M. Lovric, *Square-wave voltammetry-Theory and application* (Scholz, F. ed.), Springer, Berlin, 2007.
- [9] P. T. Kissinger, and W. R. Heineman, *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 1984.
- [10] J. Baranwal, B. Barse, G. Gatto, G. Broncova, and A. Kumar, „Electrochemical sensors and their application: A review,“ *Chemosensors*, vol. 10, pp. 363, 2022.
- [11] A. B. Vocasly, „Cyclic voltammetry, electrochemical technique,“ in: „*Characterization of materials*“, 2nd ed. Wiley, 2012.
- [12] П. Кокоскарова, Хемиски својства и функции на нови бензохинонски деривати добиени при реакција на коензим Q-0 во алкална средина, магистерска работа, Природно-математички факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј-Скопје, 2014.
- [13] A. Molina, and J. Gonzales, *Pulse voltammetry in physical electrochemistry and electroanalysis*, in Monographs in Electrochemistry (F. Scholz, ed.), Berlin Heidelberg, Springer, **2016**.
- [14] R. Gulaboski, and V. Mirceski, „Calculating of square-wave voltammograms-A practical on-line simulation platform,“ *J. Solid State Electrochem.*, vol. 28, pp. 1121-1130, 2024.
- [15] R. Gulaboski, V. Maksimova, and V. Ivanova-Petropulos, *Инструментални фармацевтски анализи*, Универзитет „Гоце Делчев“-Штип 2019.
- [16] V. Naresh, and N. A. Lee, „A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors,“ *Sensors*, vol. 21, pp. 1109, 2021.
- [17] D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst, and G. S. Wilson, „Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification,“ *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, pp. 121-131, 2001.
- [18] M. N. Islam, I. Ahmed, M. I. Anik, M. S. Ferdous, and M. S. Khan, „Developing Paper Based Diagnostic Technique to Detect Uric Acid in Urine,“ *Front. Chem.*, vol. 6, pp. 496, 2018.
- [19] C. L. Benn, P. Dua, R. Gurrell, P. Loudon, A. Pike, R. I. Storer, and C. Vangjeli, „Physiology of Hyperuricemia and Urate-Lowering Treatments,“ *Front. Med.*, vol. 5, pp. 160, 2018.
- [20] G. Desideri, G. Castaldo, A. Lombardi, M. Mussap, A. Testa, R. Pontremoli, L. Punzi, and C. Borghi, „Is it time to revise the normal range of serum uric acid levels?,“ *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 18, pp. 1295-1306, 2014.
- [21] C. Wang, J. Du, H. Wang, C. Zou, F. Jiang, P. Yang, and Y. Du, „A facile electrochemical sensor based on reduced graphene oxide and Au nanoplates modified glassy carbon electrode for simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid,“ *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 204, pp. 302-309, 2014.

- [22] L. Chelmea, M. Badea, I. Scarneciu, M. A. Moga, L. Dima, P. Restani, C. Murdaca, D. Ciurescu, and L. E. Gaman, „New trends in uric acid electroanalysis.“ *Chemosens.*, vol.11, pp. 341, 2023.
- [23] J. A. Buledi, S. Ameen, S. A. Memon, A. Fatima, A. R. Solangi, A. Mallah, F. Karimi, S. Malakmohammadi, S. Agarwal, and V. K. Gupta, „An improved non-enzymatic electrochemical sensor amplified with CuO nanostructures for sensitive determination of uric acid,“ *Open. Chem.*, vol. 19, pp. 481-491, 2021.
- [24] R. S. Dubey, K. V. Krishnamurthy, and S. Singh, „Experimental studies of TiO₂ nanoparticles synthesized by sol-gel and solvothermal routes for DSSCs application,“ *Results Phys.*, vol. 14, pp. 102390, 2019.
- [25] Z. F. Yin, L. Wu, H. G. Yang, and Y. H. Su, „Recent Progress in Biomedical Applications of Titanium Dioxide,“ *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 14, pp.4844, 2013.
- [26] B. Rajeswari, K. V. N. S. Reddy, S. A. Devi, G. Madhavi, and I. R. V. S. Reddy, „Determination of uric acid using TiO₂ nanoparticles modified glassy carbon electrode,“ *Biointerface Res. Appl. Chem.*, vol. 12, pp. 6058-6065, 2022.
- [27] D. Sun, Q. Zhao, F. Tan, X. Wang, and J. Gao, „Simultaneous detection of dopamine, uric acid, and ascorbic acid using SnO₂ nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes/carbon paste electrode,“ *Anal. Methods.*, vol. 4, pp. 3283, 2012.
- [28] Y. Zhao, J. Zhou, Z. Jia, D. Huo, Q. Liu, D. Zhong, Y. Hu, M. Yang, M. Bian, and C. Hou, „In-situ growth of gold nanoparticles on a 3D-network consisting of a MoS₂/RGO nanocomposite for simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, dopamine and uric Acid,“ *Microchim. Acta.*, vol.2, pp. 92, 2019.
- [29] C. Hwang, W. J. Lee, S. D. Kim, S. Park, and J. H. Kim, „Recent advances in biosensor technologies for point-of-care urinalysis,“ *Biosensors*, vol. 12, pp. 1020, 2022.
- [30] B. Thakur, and S. N. Sawant, „Polyaniline/Prussian-Blue-Based Amperometric Biosensor for Detection of Uric Acid,“ *ChemPlusChem.*, vol. 2, pp. 166-174, 2012.
- [31] S. A. Balogun, and O. E. Fayemi, „Recent advances in the use of CoPc-MWCNTs nanocomposites as electrochemical sensing materials,“ *Biosensors*, vol. 12, pp. 850, 2022.
- [32] K. Arora, M. Choudhary, and B. D. Malhotra, „Enhancing performance of uricase using multiwalled carbon nanotube doped polyaniline,“ *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 174, pp. 1174-1187, 2014.
- [33] R. Rawal, S. Chawla, N. Chauhan, T. Dahiya, and C. S. Pundir, „Construction of amperometric uric acid biosensor based on uricase immobilized on PBNPs/cMWCNT/PANI/Au composite,“ *Int. J. Biol. Macromol.* vol.50, pp. 112-118, 2012.
- [34] M. E. Ghica, and C. M. A. Brett, „Poly (brilliant green) and poly (thionine) modified carbon nanotube coated carbon film electrodes for glucose and uric acid biosensors,“ *Talanta*, vol. 130, pp. 198-206, 2014.
- [35] T. Fukuda, H. Muguruma, H. Iwasa, T. Tanaka, A. Hiratsuka, T. Shimizu, K. Tsuji, and T. Kishimoto, „Electrochemical determination of uric Acid in urine and serum with uricase/carbon nanotube/carboxymethylcellulose electrode,“ *Anal. Biochem.*, vol. 590, pp. 113533, 2020.
- [36] J. Du, R. Yue, F. Ren, Z. Yao, F. Jiang, P. Yang, and Y. Du, „Novel graphene flowers modified carbon fibers for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid,“ *Biosens. Bioelectron.*, vol. 53, pp. 220-224, 2014.
- [37] Y. J. Yang, and W. Li, „CTAB functionalized graphene oxide/multiwalled carbon nanotube composite modified electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and nitrite,“ *Biosens. Bioelectron.*, vol.56, pp. 300-306, 2014.
- [38] P. Longhi, T. Mussini, and S. Rondinini, „A study of the electrochemical reduction of bilirubin and its derivatives,“ *Bioelectrochem. Bioenergy*, vol. 17, pp. 101-104, 1987.
- [39] J. D. Van Norman, and R. Szentirmay, „Chemistry of bilirubin and Biliverdin in N, N’-Dimethylformamide,“ *Anal. Chem.*, vol. 46, pp. 1456-1464, 1974.
- [40] Ch. Slifstein, and M. Ariel, „The electrochemistry of bilirubin in dimethylsulfoxide,“ *J. Electroanal. Chem.*, vol. 48, pp. 447-463, 1973.
- [41] H. Filik, A.A. Avan, and S. Aydar, „Nafion/multi-wall carbon nanotubes composite modified glassy carbon electrode for sensitive determination of bilirubin,“ *Curr. Nanosci.*, vol. 11, pp. 784-791, 2015.
- [42] I. Taurino, V. Van Hoof, A. Magrez, L. Forró, G. De Micheli, and S. Carrara, „Efficient voltammetric discrimination of free bilirubin from uric acid and ascorbic acid by a CVD nanographite-based microelectrode,“ *Talanta*, vol.130, pp. 423-426, 2014.

- [43] Q. Feng, Y. Du, C. Zhang, Z. Zheng, F. Hu, Z. Wang, and C. Wang, „Synthesis of the multi-walled carbon nanotubes-COOH / graphene / gold nanoparticles nanocomposite for simple determination of bilirubin in human blood serum,“ *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 185, pp. 337-344, 2013.
- [44] J. Narang, N. Chauhan, A. Mathur, V. Chaturvedi, and C.S. Pundir, „A third generation bilirubin sensor development by using gold nanomaterial as an immobilization matrix for signal amplification“, *Adv. Mater. Lett.*, vol. 6, pp. 1012-1017, 2015.
- [45] C. Wang, G. Wang, and B. Fang, „Electrocatalytic oxidation of bilirubin at ferrocenecarboxamide modified MWCNT – gold nanocomposite electrodes,“ *Microchim. Acta*, vol. 164, pp. 113-118.
- [46] J. Wang, and M. Ozsoz, „A polishable amperometric biosensor for bilirubin,“ *Electroanalysis*, vol. 2, pp. 647-650, 1990.
- [47] B. Shoham, Y. Migron, A. Riklin, I. Willner, and B. Tartakovsky, „A bilirubin biosensor based on a multilayer network enzyme electrode,“ *Biosens. Bioelectron.*, vol.10, pp. 341-352, 1995.
- [48] P. Kannan, H. Chen, V.T.Wen Lee, and D. H. Kim, „Highly sensitive amperometric detection of bilirubin using enzyme and gold nanoparticles on sol-gel film modified electrode,“ *Talanta*, vol. 86, pp. 400-407, 2011.
- [49] P. Das, M. Das, S. R. Chinnadayala, I. M. Singha, and P. Goswami, „Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications,“ *Biosens. Bioelectron.*, vol. 79, pp. 386-397, 2016.
- [50] N. Chauhan, R. Rawal, V. Hooda, and U. Jain, „Electrochemical biosensor with graphene oxide nanoparticles and polypyrrole interface for the detection of bilirubin,“ *RSC Adv.*, vol. 6, pp. 63624-63633, 2016.
- [51] Y. H. Chuang, Y. T. Chang, K. L. Liu, H. Y. Chang, and T. R. Yew, „Electrical impedimetric biosensors for liver function detection,“ *Biosens. Bioelectron.*, vol. 28, pp. 368, 2011.
- [52] A. Fatoni, A. Numnuam, P. Kanatharana, W. Limbut, and P. Thavarungkul, „A novel molecularly imprinted chitosan-acrylamide, graphene, ferrocene composite cryogel biosensor used to detect microalbumin,“ *Analyst*, vol. 139, pp. 6160, 2014.
- [53] H. Basavanagoudra, V. D. Jangannanavar, H. Vaddar, M. K. Patil, S. R. Inamdar, S. Anegundi, and K. M. Goudar, „Designing a novel, ultra-sensitive, and biocompatible electrochemical nano-biosensor for detection of tryptophan and bovine serum albumin using zirconium dioxide nanostructures,“ *Chem. Phys. Impact*, vol. 8, pp. 100516, 2024.
- [54] L. Lu, Y. Zi, and H. Wang, „Microdetermination of human serum albumin by differential pulse voltammetry at a L-cysteine modified silver electrode,“ *J. Chem. Sci.*, vol. 120, pp. 419-424, 2008.
- [55] D. Kong, Q. Zhuang, Y. Han, L. Xu, Z. Wang, L. Jiang, J. Su, C. H. Lu, and C. Chib, „Simultaneous voltammetry detection of dopamine and uric acid in human serum and urine with a poly (procaterol hydrochloride) modified glassy carbon electrode,“ *Talanta*, vol. 185, pp. 203, 2018.
- [56] K. V. Derina, E. I. Korotkova, E. V. Dorozhko, and O. A. Voronova, „Voltammetric determination of cholesterol in human blood serum,“ *J. Anal. Chem.*, vol.72, pp. 904, 2017.
- [57] M. Metto, S. Eramias, B. Gelagay, and A. P. Washe, „Voltammetric determination of uric acid in clinical serum samples using DMF modified screen printed carbon electrodes,“ *Int. J. Electrochem.*, 2019.
- [58] Q. Yan, N. Zhi, L. Yang, G. Xu, Q. Feng, Q. Zhang, and S. Sun, „A highly sensitive uric acid electrochemical biosensor based on nano-cube cuprous oxide/ferrocene/uricase modified glassy carbon electrode,“ *Sci. Reports*, vol.10, 2020.
- [59] C. Retna Raj, F. Kitamura, and T. Ohsaka, „Square-wave voltammetric sensing of uric acid using the self-assembly of mercaptobenzimidazole,“ *Analyst*, vol.127, pp. 1155-1158, **2002**.
- [60] B. Nigovic, J. Vlak, „Simultaneous monitoring of febuxostat and uric acid in human serum samples using the direct square-wave voltammetric method,“ *Curr. Anal. Chem.*, vol.15, pp. 678-684, 2019.
- [61] K. N. Mikhelson, and I. S. Muratova, „Voltammetric sensing of dopamine in urine samples with electrochemically activated commercially available screen-printed carbon electrodes,“ *Int. J. Biosens. Bioelectron.*, vol. 4, 2018.
- [62] T. Ghosh, P. Sarkar, and A. P. F. Turner, „A novel third generation uric acid biosensor using uricase electro-activated with ferrocene on a nafion coated glassy carbon electrode,“ *Bioelectrochem.*, vol. 102, pp. 1-9, 2015.
- [63] R. Kiran, E. Scorsone, P. Mailley, and P. Bergonzo, „Quasi-real time quantification of uric acid in urine using boron doped diamond microelectrode with in situ cleaning,“ *Anal. Chem.*, vol.84, pp.10207-10213, 2012.

- [64] M. R. Miah, M. T. Alam, and T. Ohsaka, „Sulfur-adlayer-coated gold electrode for the in vitro electrochemical detection of uric acid in urine“, *Anal. Chim. Acta*, vol. 669, pp. 75-80, 2010.
- [65] A. S. Ramirez-Segovia, J. A. Banda-Aleman, S. Gutierrez Granados, A. Rodriguez, F. J. Rodriguez, L. A. Godinez, E. Bustos, and J. Manriquez, „Glassy carbon electrodes sequentially modified by cysteamine-capped gold nanoparticles and poly(amidoamine) dendrimers generation 4.5 for detecting uric acid in human serum without ascorbic acid interference“, *Anal. Chim. Acta*, vol. 18, pp. 18-25, 2014.
- [66] B. Batra, S. Lata, Sunny, J. S. Rana, and C. S. Pundir, „Construction of an amperometric bilirubin biosensor based on covalent immobilization of bilirubin oxidase onto zirconia coated silica nanoparticles/chitosan hybrid film“, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 44, pp. 64-69, 2013.
- [67] M. Thangamuthu, V. E. Gabriel, C. Santschi, and O. J. E. Martin, „Electrochemical Sensor for bilirubin detection using screen printed electrodes functionalized with carbon nanotubes and graphene“, *Sensors*, vol. 18, 800, 2018.
- [68] H-B. Noh, M-S. Won, and Y-B. Shim, „Selective nonenzymatic bilirubin detection in blood samples using a nafion/Mn-Cu sensor“, *Biosens. Bioelectr.*, vol. 61, pp. 554-561, 2014.
- [69] K. Chaudhary, K. Malhotra, J. Sowers, and A. Aroor, „Uric acid-key ingredient in the recipe for cardiorenal metabolic syndrome“, *Cardiorenal Med.*, vol. 3, pp. 208-220, 2013.
- [70] J. Maiuolo, F. Oppedisano, S. Gratteri, C. Muscoli, and V. Mollace, „Regulation of uric acid metabolism and excretion“, *International Journal of Cardiology*, vol. 213, pp. 8-14, 2016.
- [71] M. Jin, F. Yang, I. Yang, Y. Yin, J. J. Luo, H. Wang, and X-F. Yang, „Uric acid, hyperuricemia and vascular diseases“, *Front. Biosci.*, vol. 17, pp. 656-669, 2012.
- [72] D. Pasalic, N. Marinkovic, and L. Feher-Turkovic, „Uric acid as one of the important factors in multifactorial disorders—facts and controversies“, *Biochem. Med.*, vol. 22, pp. 63-75, 2012
- [73] J. Su, Y. Wei, M. Liu, T. Liu, J. Li,, Y. Ji, and J. Liang, „Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of *Rhizoma Dioscoreae septemlobae* extracts and its main component dioscin via regulation of mOAT1, mURAT1 and mOCT2 in hypertensive mice“, *Arch. Pharm. Res.*, vol. 37, pp. 1336-1344, 2014.
- [74] X-H. Wu, J. Zhang, S-Q. Wang, V.C. Yang, S. Anderson, and Y-W. Zhang, „Riparoside B and timosaponin J, two steroidal glycosides from *Smilax riparia*, resist to hyperuricemia based on URAT1 in hyperuricemic mice“, *Phytomedicine*, vol. 21, pp. 1196-1201, 2014.
- [75] E. Albrecht, M. Waldenberger, J. Krumsiek, et al., „Metabolite profiling reveals new insights into the regulation of serum urate in humans“, *Metabolomics*, vol. 10, pp. 141-151, 2014.
- [76] J-X. Zhang, Y-P. Zhang, Q-N. Wu, and B. Chen, „Uric acid induces oxidative stress via an activation of the renin–angiotensin system in 3T3-L1 adipocytes“, *Endocrine*, vol. 48, pp. 135-142, 2014.
- [77] X. Wang, J. R. Chowdhury, and N. R. Chowdhury, „Bilirubin metabolism: Applied physiology“, *Current Paediatrics*, vol. 16, pp. 70-74, 2006.
- [78] A. F. McDonagh, „Is bilirubin good for you?“, *Clinics in perinatology*, vol. 17, pp. 359-369, 1990.
- [79] T. Ruskovska, *Klinicka biohemija*, Univerzitet Goce Delcev-Stip, 2019.
- [80] S.D. Zucker, P. S. Horn, and K .E.Serman, „Serum bilirubin levels in the US population: gender effect and inverse correlation with colorectal cancer“, *Hepatology*, vol.40, pp. 827-835, 2004.
- [81] P. Yuwen, W. Chen W, H. Lv, C. Feng, Y. Li, T. Zhang, P. Hu, J. Guo, Y. Tian, L. Liu, J. Sun, and Y. Zhang, „Albumin and surgical site infection risk in orthopaedics: a meta-analysis“, *BMC Surg.*, vol. 17, pp. 2-9, 2017.
- [82] R. Chang, and J. B. Holcomb, „Choice of fluid therapy in the initial management of sepsis, severe sepsis, and septic Shock“, *Shock*, vol. 46, pp. 17-26, 2016.
- [83] M. A. Rothschild, M. Oratz, and S. S. Schreiber, „Serum albumin“, *Hepatology*, vol. 8, pp. 385-401, 1988.
- [84] D. Annane, S. Siami, S. Jaber, C. Martin, S. Elatrous, A. D. Declère, J. C. Preiser, H. Outin, G. Troché, C. Charpentier, J. L. Trouillet, A. Kimmoun, X. Forceville, M. Darmon, O. Lesur, J. Reignier, F. Abroug, P. Berger, C. Clec'h, J. Cousson, L. Thibault, and S. Chevret, „Effects of fluid resuscitation with colloids vs crystalloids on mortality in critically ill patients presenting with hypovolemic shock: the CRISTAL randomized trial“, *JAMA*, vol. 310, pp. 1809-1817, 2013.
- [85] S. Finfer, R. Bellomo, N. Boyce, J. French, J. Myburgh, and R. Norton, „A comparison of albumin and saline for fluid resuscitation in the intensive care unit“, *N Engl J Med.*, vol. 350, pp. 2247-2256, 2004.

- [86] F. Kütting, J. Schubert, J. Franklin, A. Bowe, V. Hoffmann, M. Demir, A. Pelc, D. Nierhoff, U. Töx, and H. M. Steffen, „Insufficient evidence of benefit regarding mortality due to albumin substitution in HCC-free cirrhotic patients undergoing large volume paracentesis“, *J Gastroenterol Hepatol.*, vol. 32, pp. 327-338, 2017.
- [87] A. N. Friedman, and S. Z. Fadem, „Reassessment of albumin as a nutritional marker in kidney disease“, *J Am Soc Nephrol.*, vol. 21, pp. 223-230, 2010.
- [88] R. L. McCreery, „Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry“, *Chem. Rev.*, vol. 108, pp. 2646–2687, 2008.
- [89] R. N. Adams, „Carbon paste electrodes“, *Anal. Chem.*, vol. 30, pp. 1576, 1958.
- [90] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 2nd ed.; WILEY-VCH: New York, USA, 2000.
- [91] R. Kour, S. Arya, S.J. Young, V. Gupta, P. Bandhoria, and A. Khosla, „Review-Recent advances in carbon materials as electrochemical biosensors“, *J. Electrochem. Soc.*, vol. 167, 2020.
- [92] C.A.C.Sequeira, „Carbon anode in carbon history“, *Molecules*, vol. 25, 4996, 2020.
- [93] S. Michalkiewicz, A. Skorupa, and M. Jakubczyk, „Carbon materials in electroanalysis of preservatives: A review“, *Materials*, vol. 14, 7630, 2021.
- [94] C. E. Banks, and R. G. Compton, „New electrodes for old: From carbon nanotubes to edge plane pyrolytic graphite electrodes“, *Analyst*, vol. 131, pp. 15-21, 2006.
- [95] M. Velicky, P. S. Toth, C. R. Woods, K. S. Novoselov, and R. A. W. Dryfe, „Electrochemistry of basal plane versus edge plane graphite revisited“, *J. Phys. Chem. C*, vol. 123, pp. 11677-11685, 2019.
- [96] C. E. Banks, and R. G. Compton, „Edge plane pyrolytic graphite electrodes in electroanalysis: An overview“, *Anal. Sci.*, vol. 21, pp. 1263-1268, 2005.
- [97] H-W Wang, C. Bringans, A. J. R. Hickey, J. A. Windsor, P.A. Kilmartin, and A. J. R. Philips, „Cyclic voltammetry in biological samples: A systematic review of methods and techniques applicable to clinical settings“, *Signals*, vol. 2, pp. 138-158, 2023.
- [98] S. Chevion, E. M. Berry, N. Kitrossky, and R. Kohen, „Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry“, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 22, pp. 411-421, 1997.
- [99] P. Kokoskarova, L. Stojanov, K. Najkov, N. Ristovska, T. Ruskovska, S. Skrzypek, V. Mirceski, „Square-wave voltammetry of human blood serum“ *Sci. Rep.*, vol. 13, 2023.
- [100] C. Batchelor-McAuley, E. Katelhon, O. Barnes, R. G. Compton, E. Laborda, and A. Molina, „Recent advances in voltammetry“, *Chemistry Open*, vol.4, pp. 224-260, 2015.
- [101] N. Alyamni, J. L. Abot, and A. G. Zestos, „Perspective-advances in voltammetric methods for the measurement of biomolecules“, *ECS Sensors Plus*, vol. 3, 2024.
- [102] P. Kokoskarova, T. Ruskovska, M. Brycht, S. Skrzypek, and V. Mirceski, „Label-free voltammetric screening of human blood serum“, *Maced. J. Chem. Chem. Eng.*, vol. 43, pp. 49-59, 2024.
- [103] B. Zeng, Z. Liu, and X. Zhou, „Polarographic investigation and determination of bilirubin“ *Anal. Sci.*, vol. 10, pp. 95-99, 1994.
- [104] J. A. Reynaud, B. Malfoy, and A. Bere, „The electrochemical oxidation of three proteins: RNase A, bovine serum albumin and concanavalin A at solid electrodes“, *J. Electroanal. Chem.*, vol. 7, pp. 595-606, 1980.
- [105] J. R. Flores, R. O’Kennedy, and M. R. Smyth, „Adsorptive stripping voltammetry of bovin serum, “ *Anal. Chim. Acta*, vol. 212, pp. 355-358, 1988.
- [106] W. A. Struck, and P. J. Elving, „Electrolytic oxidation of uric acid: Products and mechanism“, *Biochemistry*, vol. 4, pp. 1343-1353, 1965.
- [107] C. C. de Lassichere, L. Latapie, D. Evrard, and P. Gros, „New Insight into the EC’ mechanism of uric acid regeneration in the presence of ascorbic acid on a poly (3,4-ethylenedioxythiophene) modified gold electrode“, *Electroanalysis*, vol. 30, pp. 1-7, 2018.
- [108] M. Sajid, M. K. Nazal, M. Mansha, A. Alsharaa, S. M. S. Jillani, and C. Basheer, „Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid: A review“, *Trends Anal. Chem.*, vol. 76, pp. 15-29, 2016.
- [109] M. Tefera, M. Tessema, S. Admassie, and W. Wubet, „Voltammetric determination of uric acid using multiwall carbon nanotubes coated-poly (4-amino-3-hydroxy naphthalene sulfonic acid) modified glassy carbon electrode“, *Heliyon*, vol. 7, 2021.

- [110] L. Ngashangva, V. Bachu, and P. Goswami, „Development of new methods for determination of bilirubin,“ *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 162, pp. 272-285, 2019.
- [111] R. Michelis, S. Sela, T. Zeitun, R. Geron, and B. Kristal, „Unexpected normal colloid osmotic pressure in clinical states with low serum albumin,“ *PLoS ONE*, vol. 11, 2016.
- [112] F. Tabata, Y. Wada, S. Kawakami, and K. Miyaji, „Serum albumin redox states: More than oxidative stress biomarker,“ *Antioxidants*, vol. 10, 503, 2021.
- [113] K. Nagumo, M. Tanaka, V. T. G. Chuang, H. Setoyama, H. Watanabe, N. Yamada, K. Kubota, M. Tanaka, K. Matsushita, A. Yoshida, H. Jinnouchi, M. Anraku, D. Kadowaki, Y. Ishima, Y. Sasaki, M. Otagiri and T. Maruyama, „Cys34-Cysteinylation of human serum Albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases,“ *PLoS ONE*, vol. 9, 2014.
- [114] G. Dryhurst, „Insights provided by electrochemical techniques into the biological redox chemistry of purines,“ *Bioelectrochem. Bioenerg.*, vol. 14, pp. 251-274, 1985.
- [115] V. Narwal, B. Batra, V. Kalra, R. Jalandra, J. Ahlawat, R. Hooda, M. Sharma, and J. S. Rana, „Bilirubin detection by different methods with special emphasis on biosensing: A review,“ *Sens. Bio-Sens. Res.*, vol. 33, 2021.
- [116] J. Raveendran, J. Stanley, and T. G. Satheesh Babu, „Voltammetric determination of bilirubin on disposable screen printed carbon electrode,“ *J. Electroanal. Chem.*, vol. 818, pp. 124-130, 2018.
- [117] F. Y. Oliva, L. B. Avalle, and O. R. Camara, „Electrochemical behavior of human serum albumin-TiO₂ nanocrystalline electrodes studied as function of pH: Part 1. Voltammetric response,“ *J. Electroanal. Chem.*, vol. 534, pp. 19-29, 2002.
- [118] H. Heli, N. Sattarahmady, A. Jabbari, A. Moosavi-Movahedi, G. H. Hakimelahi, and F. Tsai, „Adsorption of human serum albumin onto glassy carbon surface-Applied to albumin-modified electrode: Mode of protein-ligand interactions,“ *J. Electroanal. Chem.*, vol. 610, pp. 67-74, 2007.
- [119] H. Wang, Y. Wu, and J-F. Song, „Interface potential sensing from adsorption of human serum albumin (HSA) on carbon nanotube (CNT) monitored by zero current potentiometry for HAS determination,“ *Biosens. Bioelectr.*, vol.72, pp. 225-229, 2015.
- [120] U. Krag-Hansen, „Structure and ligand binding properties of human serum albumin“, *Dan. Med. Bull.*, vol. 37, pp. 57-84, 1990.
- [121] K. Nishi, K. Yamasaki, and M. Otagiri, „Serum albumin, lipid and drug binding,“ *Subcell Biochem.*, vol. 94, pp. 383-397, 2020.
- [122] V. Mirceski, and .M. Lovric, „Ohmic drop effects in square-wave voltammetry“, *J. Electroanal. Chem.*, vol. 497, pp. 114-124, 2001.
- [123] J. Cvorovic, and S. Passamonti, „Membrane transporters for bilirubin and its conjugates: A systematic review“, *Front. Pharmacol.*, vol. 8, 2017.
- [124] F. Simões, and M. G. Xavier, „Electrochemical sensors. In: Nanoscience and its Application“, *Elsevier*, pp. 155-178, 2017.
- [125] N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, „Electrochemical biosensors“, *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, pp. 1747-1763, 2010.
- [126] R. Ramachandran, T-W. Chen, S-M. Chen, T. Baskar, R. Kannan, P. Elumalai, P.Raja, T. Jeyapragasam, K. Dinakaran, and G. P. G. Kumar, „A review of the advanced developments of electrochemical sensors for the detection of toxic and bioactive molecules“, *Inorg. Chem. Front. Bioelectron.*, vol. 6, pp. 3440-3455, 2019.
- [127] V. Hooda, A. Gahlaut, A. Gothwal, and. V. Hooda, „Bilirubin enzyme biosensor: potentiality and recent advances towards clinical bioanalysis“, *Biotech. Lett.*, vol. 39, pp. 1453-1462, 2017.



OPEN Square-wave voltammetry of human blood serum

Pavlinka Kokoskarova¹, Leon Stojanov², Kosta Najkov², Natasha Ristovska², Tatjana Ruskovska¹, Sławomira Skrzypek³ & Valentin Mirceski^{2,3,4,5}

A study on voltammetric analysis of blood serum diluted in a phosphate buffer is presented using advanced square-wave voltammetry at an edge plane pyrolytic graphite electrode. The results demonstrate that even in a complex medium like human blood serum, electrochemical characterization can be achieved through the use of advanced voltammetric techniques in conjunction with an appropriate commercially available electrode, such as the edge plane pyrolytic graphite electrode, which boosts superior electrocatalytic properties. Without undergoing any chemical treatment of the serum sample, the square-wave voltammetry technique reveals, for the first time, the electrode reactions of uric acid, bilirubin, and albumin in a single experiment, as represented by well-defined, separated, and intense voltammetric signals. All electrode processes are surface-confined, indicating that the edge plane sites of the electrode serve as an ideal platform for the competitive adsorption of electroactive species, despite the extensive chemical complexity of the serum samples. The speed and differential nature of square-wave voltammetry are crucial for obtaining an outstanding resolution of the voltammetric peaks, maintaining the quasi-reversible nature of the underlying electrode processes, while reducing the impact of follow-up chemical reactions that are coupled to the initial electron transfer for all three detected species, and minimizing fouling of the electrode surface.

Voltammetry is a powerful tool for investigating the electrochemistry of a wide range of species, and it is widely used in fields such as pharmacy, medicinal chemistry, biochemistry, and other life sciences¹. The popularity of voltammetry can be attributed to its ability to provide intrinsic information on the energetic, kinetic, and mechanistic aspects of electron and ion transfer reactions through simple experimental setups and low-cost instrumentation. Cyclic voltammetry (CV) is the most commonly used voltammetric technique^{1,2} for mechanistic and kinetic analysis, while advanced pulse-voltammetric techniques are favoured for analytical determinations due to their superior analytical sensitivity¹⁻³. Square-wave voltammetry (SWV)⁴, combines the advantages of cyclic and pulse voltammetry¹⁻³, while offering enhanced analytical performance and the ability to provide both mechanistic and kinetic information of electrochemical processes^{3,4}.

Despite its advantages, the application of voltammetry in complex media such as blood serum, which contains numerous redox-active and surface-active species, poses a challenge^{5,6}. However, direct voltammetric determination of biomolecules in human serum is crucial for the development of simple and cost-effective electrochemical biosensors⁷. In previous studies, direct detection of biomolecules in human serum has been performed using surface-modified working electrodes⁷, most frequently featuring complex composite structures designed for electrocatalysis⁸, or immobilized enzymes for selective and sensitive detection of a specific species⁹. However, studies involving bare unmodified electrodes for detection of single or multiple biomolecules are rare¹⁰.

The current study highlights the potential of voltammetric characterization of blood serum through a deliberate selection of the working electrode and the voltammetric technique. For the first time, it is shown that a SW voltammetric experiment conducted under optimized conditions can effectively characterize electrochemically the presence of uric acid (UA), bilirubin (BR), and albumin (ALB) in blood serum.

A comprehensive literature review reveals that various electrochemical sensors for UA detection have been developed¹¹⁻²⁰ including electrode modifications with poly(procaterol)¹¹, N,N-dimethylformamide¹², ferrocene/Cu₂O nanoparticles and uricase¹³, mercaptobenzimidazole¹⁴, nafion membrane, ferrocene and uricase¹⁵,

¹Faculty of Medical Sciences, Goce Delcev University, Krste Misirkov 10A, 2000 Stip, Republic of North Macedonia. ²Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, "Ss Cyril and Methodius" University in Skopje, P.O. Box 162, 1000 Skopje, Republic of North Macedonia. ³Department of Inorganic and Analytical Chemistry, University of Lodz, Tamka 12, 91-403 Lodz, Poland. ⁴Research Center for Environment and Materials, Macedonian Academy of Sciences and Arts, Bul. Krste Misirkov 2, 1000 Skopje, Republic of North Macedonia. ⁵email: valentin.mirceski@chemia.uni.lodz.pl

sulphur-adlayer-coated gold electrode¹⁶, and cysteamine¹⁷. Direct determination of UA has been reported using boron-doped diamond microelectrodes in urine samples only¹⁸. The major challenge in designing an electrochemical amperometric sensor for UA detection is the presence of interferences from dopamine¹¹ and ascorbic acid¹².

Regarding bilirubin, which is a by-product of haem catabolism, a small number of non-enzymatic electrochemical sensors have been developed so far^{21–23}. A thorough review²⁴ indicates that most amperometric biosensors for bilirubin detection are based on bilirubin-specific enzymes, such as bilirubin oxidase^{25–30}, in combination with 3-mercaptopropionate²⁴, carbon nanotubes^{25–29}, zirconia and silica nanoparticles³⁰.

Albumin (ALB) is the most abundant protein in human plasma, playing a crucial role in regulating the oncotic pressure in blood vessels and serving as a transporter of various biomolecules. An elevated level of urinary albumin above the reference limit can indicate various pathological conditions, including kidney diseases and heart diseases such as heart failure.

Despite the limited number of reports in the literature, direct electrochemical detection of ALB in human serum is possible^{31,32}. For instance, an amperometric sensor was designed using an antibody specific for human albumin immobilized on a gold working electrode³¹. Another voltammetric biosensor was developed through the co-polymerization of acrylamide with N, N'-methylenebis-(acrylamide) in the presence of chitosan and ferrocene as a redox mediator³².

The objective of the current study is to investigate in detail the voltammetric response of blood serum using advanced, sensitive, and fast voltammetric techniques, such as SWV. The aim is to provide a basis for the qualitative detection of some blood serum components without previous separation steps and without the need for complex electrode surface modification.

Experimental

The voltammetric measurements were conducted using the PalmSens2 potentiostat/galvanostat (PalmSens BV, Netherlands), which was controlled by PSTrace 4.8 software (PalmSens BV) at room temperature. The measurements were carried out in a conventional three-electrode voltammetric cell that consisted of a range of working electrodes including an Edge-plane pyrolytic graphite electrode (EPGE) with a geometrical surface area of 7.069 mm² (ALS Co., Ltd.), a basal-plane pyrolytic graphite electrode (BPGE) with a geometrical surface area of 7.069 mm² (ALS Co., Ltd.), a glassy carbon electrode (GCE) with a geometrical surface area of 7.069 mm² (ALS Co., Ltd.), a Pt electrode with a geometrical surface area of 7.069 mm² (ALS Co., Ltd.), and a paraffin impregnated graphite electrode (PIGE) with a geometrical surface area of 19.635 mm². An Ag/AgCl electrode (3 mol/L KCl) was used as a reference electrode, while a graphite rod served as an auxiliary electrode. The GCE and Pt electrodes were cleaned using an Al₂O₃ slurry and rinsed with water before being dried in the air. The EPGE, BPGE and PIGE electrodes were cleaned by abrasive paper, Al₂O₃ slurry, and an ultrasonic bath, followed by rinsing with water and air-drying.

A phosphate buffer solution (pH = 7.34; 0.1 mol/L) was employed as the supporting electrolyte, unless otherwise specified, in which human serum samples were dissolved and analysed. The utilization of human serum samples was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medical Sciences, Goce Delcev University, Stip, through Decision No. 0801–2/13 dated February 16, 2022. The stock solutions of uric acid (Reanal Budapest, p.a. >99%) and bovine serum albumin (Sigma Aldrich, ≥98%) were prepared by dissolving in water, while the bilirubin stock solution (Alfa Aesar, 97%) was first dissolved in a few drops of dimethyl sulfoxide (Thermo Scientific, 99.7%) before water was added to attain the final desired concentration. All solutions were prepared using water from the Arium* mini Plus purification system provided by Sartorius. Data presented in this study were obtained from 17 human serum samples. The procedure for serum preparation was consistent with established protocols, which involved collecting whole blood and allowing it to coagulate in the presence of a clot-activator for 15–25 min at room temperature. The formed clot was then removed through centrifugation at 1000–2000 rotations/minute for 10 min, resulting in the separation of the serum as a supernatant fraction. The obtained serum samples were stored at –5 °C without further treatment and were used as required. Some of the samples were obtained from patients with medical conditions, resulting in elevated concentrations of the analysed analytes.

The serum concentrations of uric acid, bilirubin, and albumin were determined using diagnostic reagents from BioSystems (China) and analysed on a clinical chemistry analyser (BS-240Pro, Mindray, Spain) immediately after the routine procedures of blood collection and serum separation.

The spectrophotometric method based on the uricase enzyme was used for the determination of serum uric acid. The method involves the formation of hydrogen peroxide, which reacts with 2, 4-dichlorophenol sulfonate and 4-aminoantipyrine in the presence of peroxidase, leading to the formation of a red-colored quinoneimine dye complex.

For the determination of bilirubin in serum, a spectrophotometric method based on diazo reaction was employed. Direct bilirubin, which is water-soluble, can be directly determined by its reaction with diazotized sulfanilic acid. Indirect, or unconjugated bilirubin, which is bound to albumin, requires the removal of albumins for determination of its concentration, for which the use of an accelerator (cetrimide) is necessary.

The determination of serum albumin was performed using a colorimetric method based on the reaction between albumin in the sample and bromocresol green. In an acidic medium, the binding of albumin to bromocresol green leads to a change in the absorbance of the complex that is proportional to the albumin concentration.

Methodology

This scientific research study was conducted through a partnership between State University “Goce Delcev”-Stip and private health facility “Primarius d-r Samardziski”-Stip, based on a memorandum of cooperation.

The research, which involves the use of human biological material (serum), was approved by the Ethics Committee for Research at Faculty of Medical Sciences, Goce Delcev University, Stip, involving human subjects under protocol number 0801-2/13 on February 16th, 2022.

Statement. All experiments and methods were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

Informed consent was obtained from all subjects, and all methods were carried out in accordance with the relevant guidelines and regulations of the Ethical Committee of the Faculty of Medical Sciences, Goce Delcev University, Stip involving human subjects under protocol number 0801-2/13 on February 16th, 2022.

The authors confirm that all research was conducted in accordance with relevant regulations and declare that consent was obtained from all participants. Venous blood was collected from both healthy subjects and patients with various pathologies, within the appropriate age group. The volunteers were fully informed about the experimental aspects of the study prior to their participation. Serum was then isolated from the collected blood samples.

All participants who signed their consent were included in the study, while those who did not respond affirmatively to the questionnaire were excluded. The respondents were assured of anonymity in both the experimental process and the publication of results for scientific purposes.

Results

The voltammetric outcome of the blood serum is significantly influenced by several factors, including the type of working electrode, the pH of the buffer, the accumulation time, the potential applied prior to the voltammetric scan, and the type of voltammetric technique. The role of the electrode type is demonstrated in Fig. 1A, which displays the typical net SW voltammetric results obtained with Pt, GCE, PIGE, BPGE, and EPGE electrodes. Except for EPGE, all electrodes produced only a barely measurable voltammetric response from the serum.

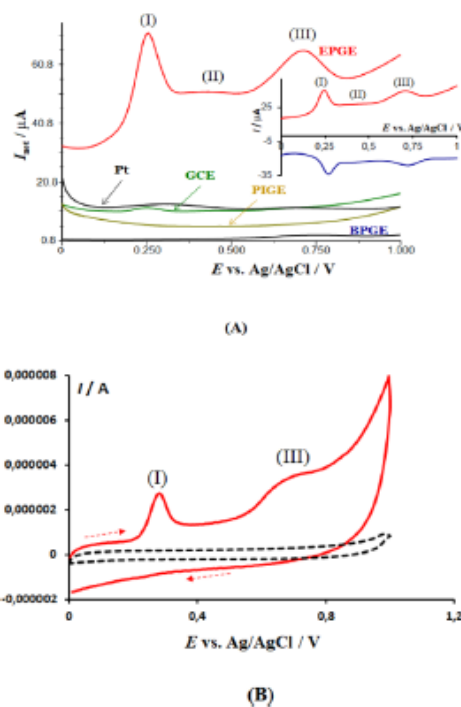


Figure 1. The panel (A) depicts the net square-wave voltammograms recorded at various working electrodes in a 20 mL phosphate buffer solution with a pH of 7.34 and containing 100 μL of human blood serum. The parameters of the potential modulation are as follows: SW frequency of 50 Hz, amplitude of 50 mV, and step potential of 1 mV. The inset displays the anodic (in red) and cathodic (in blue) voltammetric components, which correspond to the net voltammogram recorded at EPGE. The panel (B) also shows typical cyclic voltammograms of the phosphate buffer (represented by a dashed line) and the buffer containing 600 μL of human blood serum, scanned at a rate of 40 mV/s.

sample of a healthy individual. However, EPGE showed a superior voltammetric profile with three typical net SW voltammetric peaks located near 0.250 V (I), 0.400 V (II), and 0.720 V (III) (refer to Fig. 1A). The intensity of process (II) is frequently very weak, while process (I) dominates in all serum samples.

In comparison, the morphology of the voltammetric profile under cyclic voltammetry (CV) conditions is less favourable when compared to square wave voltammetry (SWV) (Fig. 1B). A typical cyclic voltammogram reveals two irreversible processes, namely processes (I) and (III). Additionally, repetitive cycling of the potential significantly reduces the intensity of the response. Specifically, in the second potential scan, the anodic voltammetric peaks are barely visible, indicating electrode surface fouling³³. Under SWV conditions, due to the speed of the technique, the blocking of the electrode surface is less significant. Nevertheless, it is important to thoroughly clean the electrode surface before each voltammetric scan, as described in the experimental section. Another notable difference from CV is the electrochemical reversibility of the electrode processes; under SWV conditions, all three electrode processes appear to be chemically reversible and electrochemically quasi-reversible, with well-developed anodic and cathodic SW voltammetric components, as shown in the inset of Fig. 1A.

By comparing the typical net SW voltammograms of different serum samples, it becomes evident that the voltammetric response is highly sensitive to the composition of the serum (Fig. 2A). The curve labelled as (1) in Fig. 2A corresponds to the serum with the highest UA content ($c[\text{UA}] = 1046 \mu\text{mol/L}$) among the other samples. The intensity of peak (I) is directly correlated with the UA concentration, as demonstrated in the inset of Fig. 2A. Additionally, the intensity of peak (I) depends significantly on the accumulation time, which suggests a surface electrode mechanism (Fig. 2B). The net peak-current of process (I) follows an isotherm-like relationship with the accumulation time, as shown in the inset of Fig. 2B. UA effectively adsorbs on the electrode surface, competing with other surface-active components in the complex serum sample.

Under the conditions of Fig. 2B, with UA concentration of $31.4 \mu\text{mol/L}$ in the voltammetric cell, the electrode becomes saturated with adsorbed UA after about 30 s. Importantly, during the accumulation process, the response remains well-defined, with a constant peak potential and half-peak width (refer to Fig. 2B). As demonstrated in Fig. 2C, adding a standard solution of UA to the supporting electrolyte that contains a serum sample clearly increases the response of peak (I), confirming the correct assignment of the voltammetric peak to the electrode reaction of UA.

Further examination of electrode reaction (I) was conducted by exploring the impact of the square-wave frequency and by closely observing the progression of all three voltammetric components in the square-wave voltammograms. It is important to note that a clear response can be obtained from any serum sample using a moderate square-wave frequency (f), typically below 250 Hz. At higher frequencies, however, the response is poorly defined, with hardly measurable voltammetric parameters, most likely due to complex adsorption phenomena that greatly affect charging and background currents, slow electron transfer at the electrode–electrolyte interface, and uncompensated resistance, all of which significantly impact surface electrode processes at higher square-wave frequencies³⁴. Nonetheless, for $f \leq 250 \text{ Hz}$, the evolution of the voltammetric profiles aligns well with theoretical predictions for a quasi-reversible surface electrode reaction, despite the complexity of the medium. Specifically, the net peak-current of process (I) increases non-linearly with f , while the frequency-normalized net peak-current (I_{net}/f) follows a parabolic relationship with $\log(f)$, resulting in the well-known characteristic of a “quasi-reversible maximum” (Fig. 3A)⁴. The critical frequency value related to the maximum position reflects the electrochemical standard rate constant, which is close to 150 s^{-1} .

A close examination of the relationship between the anodic and cathodic components of the SW voltammetric response for various frequencies provides further insight into the mechanism of the electrochemical oxidation of UA. The SW voltammograms shown in Fig. 3B indicate that the intensity of the cathodic components increases relative to the anodic components with increasing frequency. The plot of the peak-current ratio of the anodic and cathodic components ($I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$) in Fig. 3C reveals that the ratio decreases almost exponentially as the frequency increases. At a frequency of 150 Hz, the ratio is close to 1 and the intensities of the anodic and cathodic components are nearly equal. This voltammetric behaviour suggests that the oxidation of UA follows an EC reaction scheme, where the initial electron transfer reaction (E) is followed by a chemical reaction (C) that produces a redox-inactive product³⁵.

Our further attention was focused on process (II), which typically exhibits low intensity in voltammograms of healthy individuals' serum samples. Figure 4A presents characteristic voltammograms of serum samples with elevated BR content. Panel A refers to a sample containing $3.9 \mu\text{mol/L}$ in the voltammetric cell (curve 1). The peak II becomes measurable after a 90 s accumulation at the initial potential without any steering to the solution. Upon the addition of $1.2 \mu\text{mol/L}$ standard BR solution, the peak II clearly increases, confirming that process II is associated with the electrode reaction of BR (curve 2). The intensity of process II is also clearly visible in another serum sample containing a very high concentration of BR, as shown in the inset of Fig. 4A. With such a high concentration of BR, the response of UA is greatly reduced (peak I in the inset of Fig. 4A), indicating that competitive adsorption between UA and BR (and likely other species in the serum sample) plays a significant role in shaping the overall voltammetric response. To study this competitive adsorption further, we analysed a serum sample containing elevated concentrations of both UA and BR (Fig. 4B). When both components are present at comparable concentrations (i.e., $c(\text{UA}) = 11.38 \mu\text{mol/L}$ and $c(\text{BR}) = 50.39 \mu\text{mol/L}$), both characteristic peaks I and II increase concurrently with the accumulation time. However, the adsorption of UA is more effective and produces a larger net peak-current at lower concentrations compared to BR.

Our attention was drawn to the voltammetric peak III, which showed the most complex behaviour among peaks I and II. This peak appeared in all serum samples and was highly sensitive to both the accumulation time and the concentration of serum in the electrolyte solution. The results in Fig. 5A indicate that the peak III increased upon the addition of bovine serum albumin (BSA) standard solution, as well as the human serum albumin (HSA) (inset of Fig. 5A). Typically, increasing the accumulation time and the concentration of BSA in the sample caused the overall SW net voltammogram to shift towards lower absolute currents, implying that

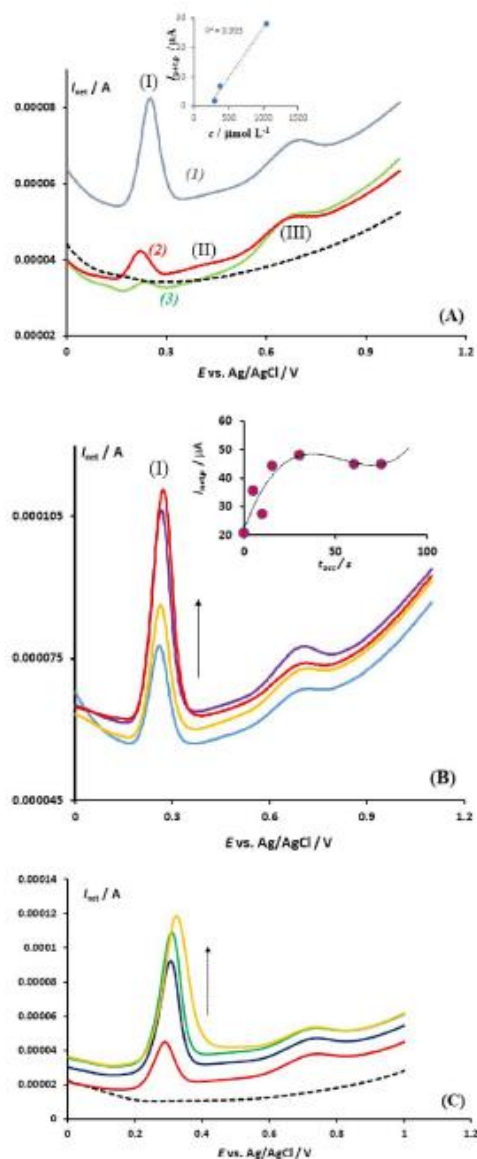


Figure 2. The figure illustrates the results of the net SW voltammograms recorded at the EPGE for different serum samples in a 20 mL phosphate buffer solution with a pH of 7.34 and containing 600 μL of the serum. The SW frequency was 25 Hz, the amplitude was 50 mV, and the step potential was 2 mV. The voltammogram of the blank buffer solution is shown as a dashed line. The inset in panel (A) displays the correlation between the net peak current of the process (I) and the concentration of uric acid (UA) in the serum sample. The concentrations of UA in the voltammetric cell were estimated to be 31.4 $\mu mol/L$ (sample 1), 11.4 $\mu mol/L$ (sample 2), and 9.0 $\mu mol/L$ (sample 3) using independent methods in the biochemical clinical laboratory. In panel (B), the effect of the accumulation time on the intensity of the peak (I) of sample 1 is shown. The accumulation time increases in the direction of the arrow from 0, 10, 15 to 30 s, conducted at the initial potential of 0.00 V in a quiet solution. The inset in this panel displays the isotherm-like dependence of the net peak current (I) on the accumulation time. In panel (C), the effect of adding a standard solution of UA is shown. The dashed line corresponds to the supporting electrolyte (blank) and the red curve represents the serum sample where the UA in the voltammetric cell was estimated to be 14.2 $\mu mol/L$. The other voltammograms were recorded after adding a standard solution of UA to the serum sample, where the total concentration of UA in the voltammetric cell increases in the direction of the arrow from 64.2, 114.2, and 164.2 $\mu mol/L$.

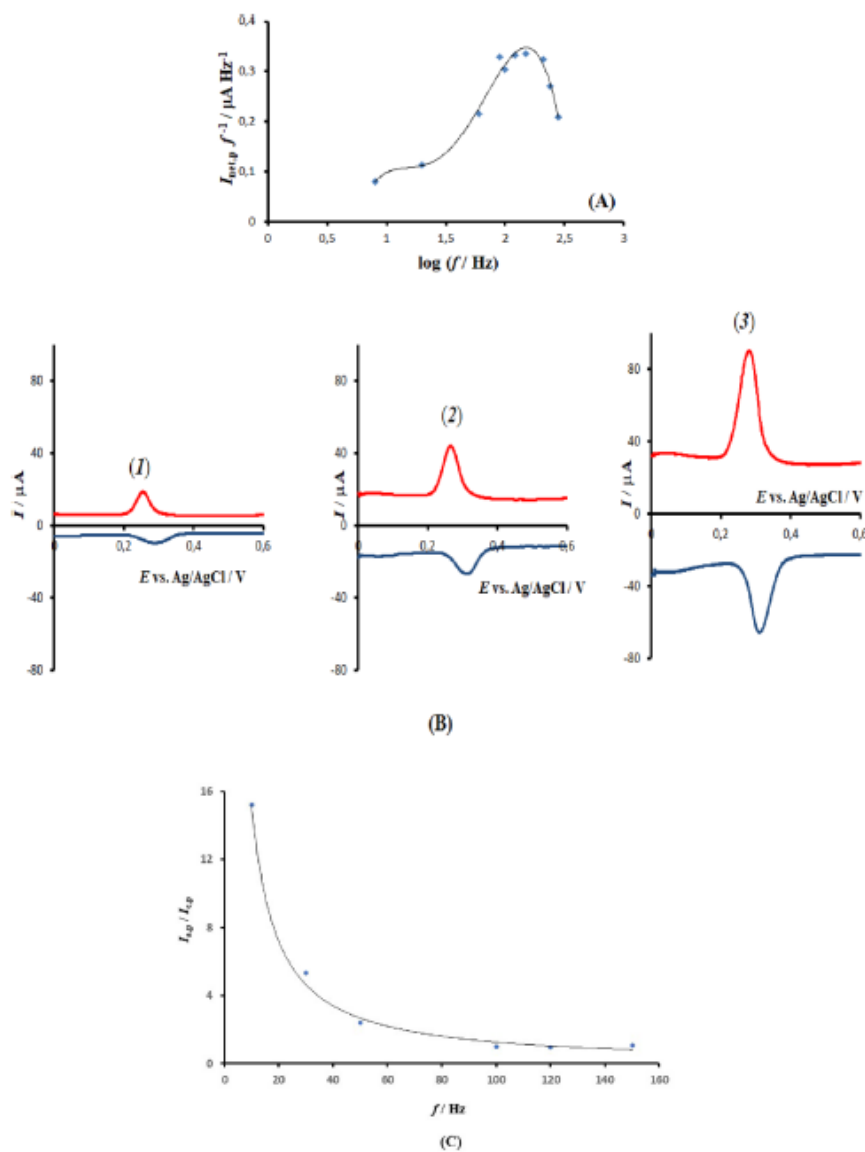


Figure 3. Analysis of the effect of SW frequency on voltammetric features of the process (I) at EPGE. (A) The relationship between frequency-normalized net peak current and the logarithm of the frequency. (B) Evolution of the anodic (red) and cathodic (blue) SW voltammetric components after 90 s of accumulation at a starting potential of 0.00 V for frequencies of 20 Hz (1), 60 Hz (2), and 100 Hz (3). (C) Dependence of the peak-current ratio of the anodic and cathodic SW voltammetric components on frequency. All other conditions are identical to those in Fig. 1.

serum albumins adsorption was a critical factor in the overall background current^{36,37}. An analogous voltammetric behaviour was also observed with HSA; however, the HSA standard solution contains stabilizing compounds

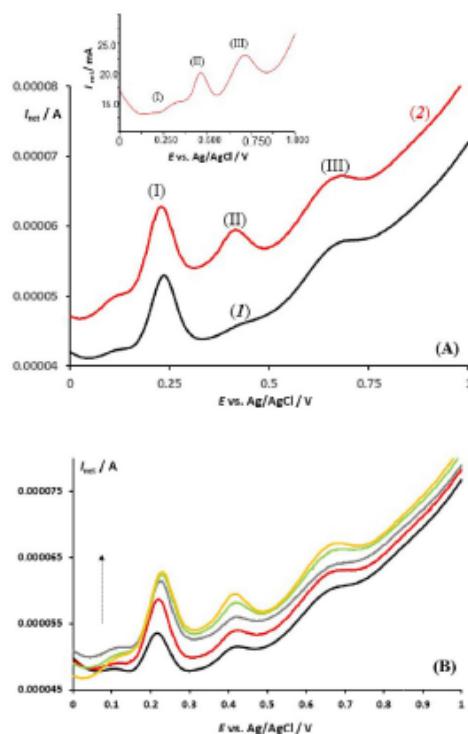


Figure 4. (A) The net SW voltammograms of a serum sample containing 3.9 $\mu\text{mol/L}$ total BR (curve 1) and an additional spike of 1.25 $\mu\text{mol/L}$ of standard BR solution (curve 2) are recorded at an EPGE with an accumulation time of 90 s at an initial potential of 0.00 V. The other conditions are identical to those in Fig. 2. The inset shows a typical voltammogram of a serum sample with elevated BR content ($c(\text{BR}) > 600 \mu\text{mol/L}$), recorded without accumulation at a SW frequency of 50 Hz. (B) The effect of accumulation time on the serum sample containing 11.38 $\mu\text{mol/L}$ UA and 50.39 $\mu\text{mol/L}$ BR. The accumulation time increases from 5 to 30 s in the direction of the arrow and is conducted at a potential of 0.00 V in a quiet solution. The other conditions are identical to those in Fig. 2.

(e.g., sodium azide etc.) which gives rise to a strong interfering voltammetric peak at about 0.900 V (the inset of Fig. 5A), thus precluding further experiments with HSA. By conducting experiments with BSA only, one could imply that peak III corresponded to the electrode reaction of albumins. The broad net SW peak at approximately 720 mV is a result of a slow, quasi-reversible electrode reaction, which is consistent with the data in Fig. 1A (as seen in the inset of Fig. 1A). The intensity of the net peak was dependent on both the serum albumins concentration and the accumulation time. The inset of Fig. 5B shows the dependence of the net peak-current on the BSA concentration, highlighting the adsorption characteristics of BSA and the saturation of the electrode at concentrations above 500 mg/L.

Discussion

The experimental data presented above demonstrate the effectiveness of SWV in providing insight into the electrochemistry of a variety of species in a complex medium when applied at a macroscopic electrode with superior electrocatalytic properties such as EPGE, which is a commercially available and conventional electrode. Despite numerous analytical studies aimed at detecting specific small biomolecules or drugs in a serum sample^{38–40}, this study is the first to use SWV in a spectroscopy-like manner to assign the voltammetric profile of a serum sample to the dominant underlying electrode processes. It is worth mentioning that attempts to study blood serum voltammetrically date back to the early works of Koryta et al.⁵⁶, where CV was applied at a Pt electrode. More recent studies have used CV to detect antioxidants or to generally characterize the redox status of a serum^{41,42}. However, when comparing the typical SW voltammetric profile of a serum sample (red curve in Fig. 1A) with the corresponding cyclic voltammogram (red solid curve in Fig. 1B), the superiority of SWV in terms of resolution of the voltammetric peaks, response intensity, and electrochemical reversibility of the underlying electrode

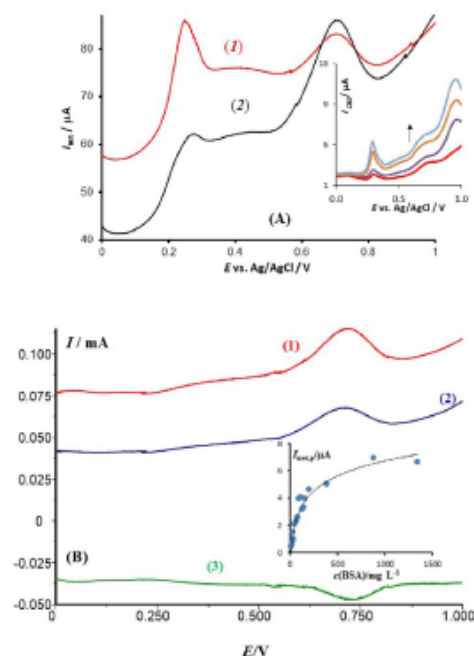


Figure 5. (A) Net SW voltammograms recorded at the EPGE working electrode in a 20 mL phosphate buffer at pH = 7.34, containing 200 μ L of a serum sample from a healthy individual (1) and the same sample spiked with a standard solution of bovine serum albumin (2). The mass percentage of bovine serum albumin added to the cell is 20%. The parameters of the potential modulation are SW frequency of 20 Hz, amplitude of 50 mV, and step potential of 1 mV. The inset shows the response of a healthy individual serum sample (red curve) spiked with the standard of human serum albumin at concentration of 3.6, 7.6 and 9.0 μ mol/L (in the arrow direction) recorded at the frequency of 50 Hz. (B) A typical SW voltammogram of bovine serum albumin at a concentration of 1350 mg/L, showing the net (1), anodic (2), and cathodic (3) voltammetric components recorded at a frequency of 100 Hz, SW amplitude of 50 mV, and step potential of 1 mV. The inset displays the dependence of the net peak current on the concentration of bovine serum albumin, recorded at a frequency of 50 Hz.

processes is evident. In addition to the importance of the voltammetric technique, the results depicted in Fig. 1A emphasize the crucial role that the type of working electrode plays in achieving a clear and reproducible voltammetric profile in highly complex media such as blood serum. The serum contains more than 300 different proteins, in addition to glucose, lipids, electrolytes, and a variety of exogenous substances. Previous studies^{43–45}, have shown that EPGE is less prone to fouling and passivation, and its high density of edge plane sites allows for effective adsorption of small molecules such as UA and BR (as demonstrated in Figs. 2 and 4).

The accumulation time study presented in Figs. 2B and 4B confirms that the concomitant adsorption of proteins, including albumin⁴⁶ does not hinder the accumulation and electrochemical activity of both UA and BR. Despite the overall voltammetric profile increasing with accumulation time due to protein adsorption, the abundant edge plane sites of the EPGE remain largely free for UA and BR adsorption. Importantly, in a sample containing comparable concentrations of UA and BR, both molecules adsorb on the electrode surface without significant interference, as shown in Fig. 4B. It is worth noting that the response of BR is only clearly visible in samples with a higher BR content relative to the concentration in a healthy person's serum, meaning that the concentration in the voltammetric cell should be higher than 0.3 μ mol/L.

The typical SW voltammograms of a serum are impacted by adsorption as depicted in Figs. 2B, 4B, and 5B. This is further demonstrated through the data in Fig. 3, which pertains to the electrode mechanism of UA. The SW voltammograms of uric acid oxidation recorded in such a complex matrix are consistent with theoretical predictions for an idealized surface electrode mechanism⁴⁷.

The morphological analysis of the voltammetric profile presented in Fig. 3B, considering the peak-like shape of the forward (anodic, oxidative) and backward (cathodic, reductive) SW voltammetric components and their positioning on the potential axis, is characteristic of a surface electrode reaction where both components of the redox couple are fixed on the electrode surface⁴. The relative positioning of the anodic voltammetric component

at more negative potentials than the corresponding cathodic component (Fig. 3B), recorded at a moderate SW amplitude of 50 mV, aligns with theoretical predictions for fast electrode processes of a firmly attached redox couple where mass transfer is negligible during the voltammetric scan⁴. By analysing the net peak-current for different SW frequencies (i.e., varying durations of potential pulses), the “quasi-reversible maximum” is obtained (Fig. 3A), which has been theoretically predicted for various surface electrode processes⁴. The frequency-normalized net peak current ($I_{\text{net,p}}/f$ in Fig. 3A) reaches its maximum value for a given frequency, implying a synchronization of the electron transfer rate with the duration of the SW potential pulses⁴. Based on the position of the quasi-reversible maximum, the standard rate constant can be estimated as $k_s = 150 \text{ s}^{-1}$, assuming an electron transfer coefficient of $\alpha = 0.5$ and a stoichiometric number of electrons of $n = 2$ ⁴.

Further understanding of the electrode mechanism of UA can be achieved by examining the relative intensities of the anodic and cathodic SW voltammetric components for different SW frequencies (i.e., varying durations of pulses and thus scan rates). When the frequency is low and the scan rate of the experiment is slow (panel 1 in Fig. 3B), the cathodic component is significantly less intense compared to the anodic component. Conversely, when the experiment is conducted at a relatively fast frequency of 100 Hz and short pulse duration ($t_p = 1/(2f) = 5 \text{ ms}$), the intensity of the cathodic component is almost equal to that of the anodic component (panel 3 in Fig. 3B). A detailed analysis of the anodic-to-cathodic peak current ratio ($I_{\text{ap}}/I_{\text{cp}}$) as a function of frequency is presented in Fig. 3C, revealing that the ratio decreases with increasing frequency as a result of the relative increase of the cathodic component caused by the shortening of pulse duration. This voltammetric behaviour is typical of a surface EC-type electrode mechanism where the electrode reaction (E) is followed by an irreversible chemical reaction (C), yielding an electro-inactive final product³⁵. This aligns with the mechanism of UA, where two-electron-two-proton oxidation (E step) is followed by a fast hydration reaction (C step), yielding allantoin as the final electro-inactive product^{12,48}.

The recent analysis highlights notable disparities in the electrochemical reversibility observed under cyclic voltammetry conditions (Fig. 1B) and square-wave voltammetry (as shown in the inset of Figs. 1A and 3B). The high velocity of SWV makes the oxidation process of UA appear nearly reversible, as the product of electrochemical oxidation can be electrochemically reduced back to the native form of UA before it is entirely consumed by the spontaneous subsequent hydration reaction. On the other hand, the slower CV experiment leads to full consumption of the electrochemical product, resulting in irreversible voltammetric behaviour.

A close examination of the voltammetric responses of BR and ALB suggests that both processes are also nearly reversible (as demonstrated in the inset of Figs. 1A and 5B). In agreement with previous findings, the electrode mechanism of BR is of an EC type³⁵; therefore, similarly to UA, the fast pace of the SWV reduces the impact of the follow-up chemical reaction, making the process nearly reversible. The electrode reaction pathway of ALB remains unknown, but it is presumably related to the oxidation of side amino acids⁴⁹. Our comparative voltammetric data obtained through SWV (Fig. 5B) and CV (Fig. 1B) indicate an EC type electrode mechanism for ALB as well.

The nearly reversible nature of the electrode processes of UA, BR, and ALB is essential for the shape of the overall net SW voltammetric response, specifically in terms of strong signal intensity (and thus, improved analytical sensitivity) and narrow half-peak width (and thus, higher resolution of the voltammetric peaks). Furthermore, the fast voltammetric experiment and short electrolysis time minimize the fouling of the electrode by the products of the specific electrode reaction³⁷.

Conclusions

It is demonstrated for the first time that square-wave voltammetry can be employed as a sort of spectroscopic technique for fast, reliable, and direct electrochemical characterization of human blood serum samples without any pre-treatment of the sample or the surface of the edge plane pyrolytic graphite electrode. The quality of the voltammetric response is superior compared to literature data, with respect to the intensity, resolution, and electrochemical reversibility of the voltammetric peaks. The data suggest that the edge plane sites of the electrode are critically important for the effective adsorption, particularly of uric acid and bilirubin, as the response is virtually absent when a range of other electrodes are used. Accordingly, it is plausible to expect that the edge side of carbon nanotubes can provide a similar voltammetric response. The presented collection of experimental data is expected to provide a basis for the further development of electrochemical sensors for direct detection and quantification of these analytes in a buffered blood serum sample.

Data availability

The datasets produced and/or analysed during the present study are not publicly accessible due to the confidentiality of participants' personal information. However, they can be obtained from the corresponding author valentin.mircheski@chemia.uni.lodz.pl upon reasonable request.

Received: 24 February 2023; Accepted: 27 April 2023

Published online: 25 May 2023

References

- Compton, R. G. & Banks, C. E. *Understanding Voltammetry* 2nd edn. (Imperial College Press, 2011).
- Bard, A. J. & Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications* 3rd edn. (John Wiley & Sons Inc., 2004).
- Molina, A. & Gonzalez, J. Pulse voltammetry in physical chemistry and electroanalysis. In *Monographs in Electrochemistry* (ed. Scholz, F.) (Springer-Verlag, Berlin, 2016).
- Mirčeski, V., Komorsky-Lovrić, S. & Lovrić, M. Square-wave voltammetry: Theory and application. In *Monographs in Electrochemistry* (ed. Scholz, F.) (Springer-Verlag, Berlin, 2007).

5. Osendorfova, N., Pradac, J., Pradacova, J. & Koryta, J. Cyclic voltammetric response of blood serum. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **58**, 255–261 (1975).
6. Pradac, J., Pradacova, J. & Koryta, J. Cyclic voltammetric determination of cysteine in rat organs after intravenous injection. *Biochim. Biophys. Acta* **237**, 450–454 (1971).
7. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* **16**, 121–131 (2001).
8. Wang, J. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. *Electroanalysis* **17**, 7–14 (2005).
9. Gulaboski, R. & Mirceski, V. Application of voltammetry in biomedicine-Recent achievements in enzymatic voltammetry. *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* **39**, 153–166 (2020).
10. Ronkainen, N. J., Halsall, H. B. & Heineman, W. R. Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1747–1763 (2010).
11. Kong, D. et al. Simultaneous voltammetry detection of dopamine and uric acid in human serum and urine with a poly (procatolol hydrochloride) modified glassy carbon electrode. *Talanta* **185**, 203–212 (2018).
12. Metto, M., Eramias, S., Gelagay, B. & Washe, A. P. Voltammetric determination of uric acid in clinical serum samples using DMF modified screen printed carbon electrodes. *Int. J. Electrochem.* <https://doi.org/10.1155/2019/6318515> (2019).
13. Yan, Q. et al. A highly sensitive uric acid electrochemical biosensor based on nano-cube cuprous oxide/ferrocene/uricase modified glassy carbon electrode. *Sci. Rep.* **10**, 10607 (2020).
14. Retna Raj, C., Kitamura, F. & Ohsaka, T. Square-wave voltammetric sensing of uric acid using the self-assembly of mercaptobenzimidazole. *Analyst* **127**, 1155–1158 (2002).
15. Ghosh, T., Sarkar, P. & Turner, A. P. F. A novel third generation uric acid biosensor using uricase electro-activated with ferrocene on a nafion coated glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry* **102**, 1–9 (2015).
16. Miah, M. R., Alam, M. T. & Ohsaka, T. Sulfur-adlayer-coated gold electrode for the in vitro electrochemical detection of uric acid in urine. *Anal. Chim. Acta* **669**, 75–80 (2010).
17. Ramirez-Segovia, A. S. et al. Glassy carbon electrodes sequentially modified by cysteamine-capped gold nanoparticles and poly (amidoamine) dendrimers generation 4.5 for detecting uric acid in human serum without ascorbic acid interference. *Anal. Chim. Acta* **812**, 18–25 (2014).
18. Kiran, R., Scorsone, E., Mailley, P. & Bergonzo, P. Quasi-real time quantification of uric acid in urine using boron doped diamond microelectrode with in situ cleaning. *Anal. Chem.* **84**, 10207–10213 (2012).
19. Nigovic, B. & Vlask, J. Simultaneous monitoring of febuxostat and uric acid in human serum samples using the direct square-wave voltammetric method. *Curr. Anal. Chem.* **15**, 678–684 (2019).
20. Mikhelson, K. N. & Muratova, I. S. Voltammetric sensing of dopamine in urine samples with electrochemically activated commercially available screen-printed carbon electrodes. *Int. J. Biosens. Bioelectron.* **4**, 169–173 (2018).
21. Noh, H. B., Won, M. S. & Shim, Y. B. Selective nonenzymatic bilirubin detection in blood samples using a Nafion/Mn–Cu sensor. *Biosens. Bioelectron.* **61**, 554–561 (2014).
22. Taurino, I. et al. Efficient voltammetric discrimination of free bilirubin from uric acid and ascorbic acid by a CVD nanographite-based microelectrode. *Talanta* **130**, 423–426 (2014).
23. Thangamuthu, M., Gabriel, V. E., Santschi, C. & Martin, O. J. F. Electrochemical sensor for bilirubin detection using screen printed electrodes functionalized with carbon nanotubes and graphene. *Sensors* **18**, 800 (2018).
24. Labib, M., Sargen, E. H. & Kelley, S. O. Electrochemical methods for the analysis of clinically relevant biomolecules. *Chem. Rev.* **116**, 9001–9090 (2016).
25. Weigel, MCh., Tritscher, F. & Lisdat, F. Direct electrochemical conversion of bilirubin oxidase at carbon nanotube-modified glassy carbon electrodes. *Electrochem. Commun.* **9**, 689–693 (2007).
26. Lim, J., Cirigliano, N., Wang, J. & Dunn, B. Direct electron transfer in nanostructured sol-gel electrodes containing bilirubin oxidase. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**, 1809–1814 (2007).
27. Schubert, K., Gero, G. & Lisdat, F. Bilirubin oxidase bound to multi-walled carbon nanotube-modified gold. *Electrochim. Acta* **54**, 3033–3038 (2009).
28. Goebel, G. & Lisdat, F. Organic interlayers for oxygen reducing electrodes based on bilirubin oxidase and MWCNT modified gold. *Electrochem. Commun.* **10**, 1691–1694 (2008).
29. Hooda, V., Gahlaut, A., Gothwal, A. & Hooda, V. Bilirubin enzyme biosensor: Potentiality and recent advances towards clinical bioanalysis. *Biotech. Lett.* **39**, 1453–1462 (2017).
30. Batra, R., Lata, S., Rana, J. S. & Pundir, C. S. Construction of an amperometric bilirubin biosensor based on covalent immobilization of bilirubin oxidase onto zirconia coated silica nanoparticles/chitosan hybrid film. *Biosens. Bioelectron.* **44**, 64–69 (2013).
31. Chuang, Y. H. et al. Electrical impedimetric biosensors for liver function detection. *Biosens. Bioelectron.* **28**, 368–372 (2011).
32. Fatoni, A. et al. A novel molecularly imprinted chitosan-acrylamide, graphene, ferrocene composite cryogel biosensor used to detect microalbumin. *Analyst* **139**, 6160–6167 (2014).
33. Kousar, A., Peltola, E. & Laurila, T. Nanostructured geometries strongly affect fouling of carbon electrodes. *ACS Omega* **6**, 26391–26403 (2021).
34. Mirceski, V. & Lovrić, M. Ohmic drop effects in square-wave voltammetry. *J. Electroanal. Chem.* **497**, 114–124 (2001).
35. Mirceski, V. & Lovrić, M. Adsorption effects in square-wave voltammetry of an EC mechanism. *Croat. Chem. Acta* **73**, 305–329 (2000).
36. Goto, T. et al. Inhibition of electrochemical fouling against biomolecules on a diamond-like carbon electrode. *Anal. Chem.* **27**, 91–94 (2011).
37. Hanssen, B. L., Iraj, S. S. & Wong, D. K. Y. Recent strategies to minimise fouling in electrochemical detection systems. *Rev. Anal. Chem.* **35**, 1–28 (2016).
38. Derina, K. V., Korotkova, E. I., Dorozhko, E. V. & Voronova, O. A. Voltammetric determination of cholesterol in human blood serum. *J. Anal. Chem.* **72**, 904–910 (2017).
39. Solangi, A. R., Mallah, A., Khuhawar, M. Y. & Bhangar, M. I. Cathodic stripping voltammetric determination of cefadroxil in pharmaceutical preparations and in blood serum. *Pak. J. Anal. Environ. Chem.* **7**, 107 (2006).
40. Özcan, A. Selective and sensitive electrochemical sensing of serotonin in human blood serum by means of electrochemically treated pencil graphite electrode. *Anadolu Univ. J. Sci. Technol. A Appl. Sci. Eng.* **17**, 551–562 (2016).
41. Kohen, R. & Nyska, A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* **30**, 620–650 (2002).
42. Tsvadze, AYu. et al. Voltammetric analysis in blood serum in patients with severe combined trauma. *Dokl. Phys. Chem.* **486**(1), 67–69 (2019).
43. Hadi, M. & Honarmand, E. Application of anodized edge-plane pyrolytic graphite electrode for analysis of dindamycin in pharmaceutical formulations and human urine samples. *Russ. J. Electrochem.* **53**, 380–390 (2017).
44. Banks, C. E. & Compton, R. G. Exploring the electrocatalytic sites of carbon nanotubes for NADH detection: An edge plane pyrolytic graphite electrode study. *Analyst* **130**, 1232–1239 (2005).
45. Wantz, F., Banks, C. E. & Compton, R. G. Edge plane pyrolytic graphite electrodes for stripping voltammetry: A comparison with other carbon based electrodes. *Electroanalysis* **17**, 655–661 (2005).
46. Smiechowski, M. F. et al. Electrochemical detection and characterization of proteins. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 670–677 (2006).
47. Mirčeski, V. & Lovrić, M. Split square-wave voltammograms of surface redox reactions. *Electroanalysis* **9**, 1283–1287 (1997).

48. Crosnier de Lassichere, C., Latapie, L., Evrard, D. & Gros, P. New insight into the EC' mechanism of uric acid regeneration in the presence of ascorbic acid on a poly(3,4-ethylenedioxythiophene) modified gold electrode. *Electroanalysis* **30**, 1645–1650 (2018).
49. Chauhan, N., Rawal, R., Hoodac, V. & Jain, U. Electrochemical biosensor with graphene oxide nanoparticles and polypyrrole interface for the detection of bilirubin. *RSC Adv.* **6**(68), 63624–63633 (2016).

Author contributions

P.K. contributed in performing experiments and writing some parts of the manuscript, L.S. and K.N. contributed in making the experiments and in writing some parts of the manuscript, T.R. contributed in professional discussions and in writing of some parts of the manuscript, N.R. contributed in experiments with BSA, S.S. contributed in writing and correcting of the manuscript, V.M. contributed in giving ideas for the design of the experiments, in analysis of the results and in writing of the manuscript.

Competing interests


The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to V.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

LABEL-FREE VOLTAMMETRIC SCREENING OF HUMAN BLOOD SERUM¹

Pavlinka Kokoskarova¹, Tatjana Ruskovska¹, Mariola Brycht²,
Sławomira Skrzypek², Valentin Mirčeski^{2,3,4}

¹Faculty of Medical Sciences, Goce Delčev University,
Krste Misirkov 10A, 2000 Štip, North Macedonia

²University of Łódź, Faculty of Chemistry, Department of Inorganic and Analytical Chemistry,
Tamka 12, 91-403 Łódź, Poland

³Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Faculty of Natural Sciences and Mathematics,
Institute of Chemistry, Arhimedova 5, 1000 Skopje, North Macedonia

⁴Macedonian Academy of Sciences and Arts, Research Center for Environment and Materials,
Blvd. Krste Misirkov 2, 1000 Skopje, North Macedonia

valentin@pmf.ukim.mk

The current study presents a comprehensive voltammetric investigation into the direct analysis of untreated human blood serum in a phosphate buffer at an unmodified, graphite electrode by means of voltammetry. By employing advanced square-wave voltammetry at an edge plane pyrolytic graphite electrode (EPPGE), the basic principles were established for developing a sensitive, fast, simple, and label-free method for the simultaneous screening of uric acid, bilirubin, and albumin analytes that are present in human blood serum and are quite essential for rapid medical diagnostics. The electrochemical protocol utilizes the specific structural patterns of the EPPGE, the inherent redox and adsorption properties of the analyzed analytes, and the sensitivity and rapidity of the employed advanced voltammetric technique.

The methodology has been successfully applied for quantification of the considered analytes in a series of samples of human blood serum and was compared with the standard methods used in a clinical biochemical laboratory. This novel method represents a significant advancement towards the development of point-of-care devices aimed at swiftly and simultaneously quantifying uric acid, bilirubin, and albumin levels in human serum.

Keywords: human blood serum; label-free voltammetric biosensor; uric acid; bilirubin; albumin

ВОЛТАМЕТРИСКА АНАЛИЗА НА ЧОВЕЧКИОТ КРВЕН СЕРУМ БЕЗ ДОПОЛНИТЕЛНА УПОТРЕБА НА РЕАГЕНСИ

Во оваа студија е претставено комплетно волтаметриско испитување насочено кон директна анализа на човечкиот крвен серум во фосфатен пуфер со употреба на немодифицирана графитна електрода. Со примена на квадратнобранова волтаметрија на електрода од странично ориентиран пиролитичен графит се поставени основните принципи за развој на чувствителен, брз, едноставен и ефикасен метод за симултан скрининг на мочна киселина, билирубин и албумин, анализи кои се присутни во човечкиот крвен серум и се многу важни за брза медицинска дијагностика. Електрохемискиот протокол се базира на специфичните структурни карактеристики на електродата од странично ориентиран пиролитичен графит, интегралните редокс и адсорпциски својства на анализираните анализи, како и чувствителноста и брзината на употребената напредна волтаметриска техника.

Методологијата е успешно применета за квантификација на разгледаните анализи во серија примероци на човечки крвен серум и споредена е со стандардните методи користени во клиничко-биохемиските лаборатории. Овој нов метод претставува значителен чекор кон развојот на уредите

¹ Dedicated on the occasion of the Golden Jubilee of the *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*

за point-of-care, кои се насочени кон брзо и симултано квантифицирање на концентрациите на мочна киселина, билирубин и албумин во човечкиот крвен серум.

Клучни зборови: човечки крвен серум; волтаметриски биосензор; мочна киселина; билирубин; албумин

1. INTRODUCTION

The ongoing demand for the precise determination of biochemical markers requires the design of cost-effective and reliable devices capable of swiftly providing analytical responses to specific analytes. This necessity is particularly pronounced in clinical analyses, where advanced devices are being developed to allow for label-free, in situ sensing of important physiological systems across diverse matrices.¹ The effectiveness of such instrumental devices is crucial for the rapid diagnosis of numerous pathologies. Among the instrumental devices being explored in clinical analyses, there is a noticeable increase in the design of simple amperometric biosensors capable of converting specific biochemical signals into measurable electric currents that correlate with defined analyte concentrations. Key considerations in the design process of electrochemical amperometric biosensors include their specificity, reliability, and prompt response to analyte levels within a given matrix. In a broader context, amperometric biosensors consist of specific electronic conductors (working electrodes) that serve as platforms for facilitating electron exchange with defined physiological systems in a selective manner. Literature indicates that the development of amperometric sensors is tailored for quantifying significant analytes such as haemoglobin, uric acid, cholesterol, glucose, hydrogen peroxide, and creatinine, among others.²⁻⁸

While the rapid response, cost-effectiveness, and selectivity are favourable attributes of amperometric sensors,⁶⁻⁸ challenges persist due to the potential contamination of the working electrode and interferences arising from various analytes present in complex matrices like urine, blood, or serum. In our recent study, we elucidated a series of experimental findings concerning the direct square-wave voltammetry (SWV) of human blood serum.⁹ Utilizing an edge plane pyrolytic graphite electrode (EPPGE) as the working electrode, we demonstrated the distinct and simultaneous identification of three voltammetric signals corresponding to uric acid (UA), bilirubin (BLR), and albumin (ALB), while referring to some of their specific redox characteristics.

The results presented in the current work build upon our previous results⁹ by providing a

comprehensive examination of the electrochemical characteristics inherent to these systems. This investigation is vital for the development of a voltammetric biosensor capable of simultaneously quantifying these three compounds directly in human blood serum. The findings outlined herein can be viewed as a crucial foundation for the development of an economically feasible and rapid amperometric biosensor tailored for the direct quantification of the three analytes in human blood serum.

2. EXPERIMENTAL

The use of human blood serum samples was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medical Sciences, Goce Delčev University, Štip, North Macedonia, under Decision No. 0801-2/13, dated February 16, 2022. Voltammetric measurements were performed at room temperature, utilising a conventional three-electrode voltammetric cell, with square-wave voltammetry explored as a working technique. A PalmSens2 potentiostat/galvanostat (PalmSens BV, Netherlands) was the instrumental system used, under the control of PSTrace 5.9 software (PalmSens BV). An edge plane pyrolytic graphite electrode (EPPGE) with a geometrical surface area of 7.069 mm² (ALS Co., Ltd.) was used as the working electrode, a graphite rod as a counter electrode, and an Ag/AgCl electrode (3 M KCl) as the reference electrode. The EPPGE was meticulously cleaned through sequential treatment with abrasive paper, Al₂O₃ slurry, followed by rinsing with deionized water and subsequent air-drying. Unless specified otherwise, the instrumental parameters of SWV signal chosen for the purpose of analytical investigations included a frequency of 50 Hz, an amplitude of 50 mV, and a step potential of 4 mV. A phosphate buffer solution (0.1 M) with a pH of 7.34 was utilized as the supporting electrolyte in all experiments. In instances not explicitly specified, 500 μ l of human blood serum sample were dissolved in 20 ml of phosphate buffer (2.4% (V/V)) for consecutive analyses in voltammetric experiments.

Stock solutions of uric acid (Reanal Budapest, p.a. > 99 %) and bovine serum albumin (Sigma Aldrich, \geq 98 %) were prepared by dissolution in phosphate buffer (0.1 M) with pH of 7.34, while

the bilirubin stock solution (Alfa Aesar, 97 %) was prepared by dissolving it in dimethyl sulfoxide (Thermo Scientific, 99.7 %). All other solutions were prepared using deionized water from the Arim® mini Plus purification system provided by Sartorius. The interferences of various analytes (glucose, cholesterol, and triglycerides) were examined using aqueous primary standards obtained from Biosystems.

Serum preparation followed established protocols, involving the collection of whole blood and allowing coagulation with a clot-activator for 15 – 25 minutes at room temperature. Subsequent centrifugation at 1,000 – 2,000 rotations per minute for 10 minutes facilitated the separation of the serum as a supernatant fraction. The obtained serum samples were stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ until required, without further treatment. The standard spectrophotometric protocols for the quantification of uric acid, bilirubin, and albumin in human blood serum were applied, following the procedures described in more details in our previous work.⁹

All concentrations reported in the experiments pertain to their respective values within the electrochemical cell.

To estimate the molar concentration of a given analyte in the electrochemical cell, we applied the following equation:

$$c_2 = c_1 \cdot \varphi, \text{ where } \varphi = V_{\text{serum}} / (V_{\text{buffer}} + V_{\text{serum}}) \quad (1)$$

and φ represents the volume fraction. Here, V_{serum} is the volume of serum used for analysis in the electrochemical cell, and V_{buffer} is the volume of the buffer solution present in the electrochemical cell. In this context, c_2 signifies the molar concentration of the specified analyte in the electrochemical cell, while c_1 is the molar concentration of that analyte in human blood serum. To determine the molar concentration of albumin, we utilized the following expression:

$$c(\text{ALB}) = \gamma(\text{ALB}) / M(\text{ALB}), \quad (2)$$

where $\gamma(\text{ALB})$ denotes the mass concentration of albumin, and $M(\text{ALB})$ stands for the molar mass of albumin (66,500 g/mol).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Basic voltammetric characterization of uric acid, bilirubin, and albumin in human blood serum

Conducting voltammetry within complex matrices such as human blood serum poses considerable challenges. Large biomolecules like pro-

teins, and other analytes such as cholesterol, triglycerides, etc., in human blood serum often exhibit strong adsorption onto the surfaces of many working electrodes, thereby impeding electron transfer between the working electrode and the numerous redox-active analytes of interest. While certain electrodes, primarily graphite-based ones, have demonstrated some efficacy in designing biosensors for various analytes in human serum,^{10–13} recent exceptional studies have underscored EPPGE as a highly promising working electrode for conducting direct voltammetry within complex matrices.^{9,14,15} Thus, by utilizing EPPGE, coupled with square-wave voltammetry^{16,17} as the operative technique, our recent research has demonstrated the feasibility of conducting direct analysis in human blood serum.⁹

The methodology outlined in our previous work⁹ facilitated rapid and label-free sensing of diagnostically important molecules, including uric acid (UA), bilirubin (BLR), and albumin (ALB), within human blood serum samples. This was achieved by dissolving only 2.4% (V/V) of human blood serum in a phosphate buffer solution (at physiological pH of 7.34 to 7.45). A representative example of the SW voltammetric response of human blood serum is depicted in Figure 1.

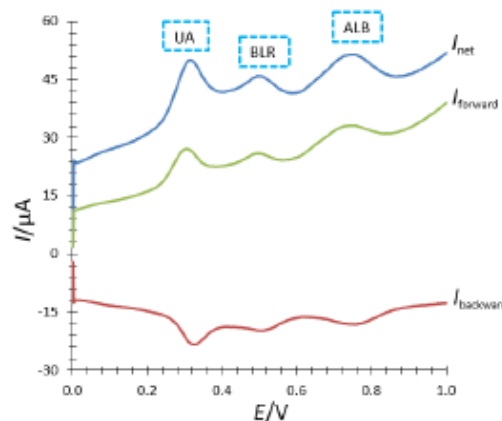


Fig. 1. Square-wave voltammogram of 2.4% (V/V) human blood serum in a phosphate buffer solution with pH = 7.34. The graph displays forward, backward, and net component of the recorded square-wave voltammogram. The concentrations of uric acid (UA), bilirubin (BLR), and albumin (ALB) in the electrochemical cell were $10.7\text{ }\mu\text{M}$, $5.5\text{ }\mu\text{M}$, and $7.6\text{ }\mu\text{M}$, respectively. Experimental conditions included a square-wave amplitude (E_{sw}) of 50 mV, step potential (dE) of 4 mV, square-wave frequency (f) of 50 Hz, deposition potential (E_{dep}) of 0.00 V, and deposition time (t_{dep}) of 30 s.

As comprehensively elaborated in our recent work,⁹ the initial process occurring at a potential of about +0.26 V corresponds to the redox activity associated with uric acid, while a second process taking place around +0.46 V is attributed to the redox activity of bilirubin. The third process, occurring at approximately +0.73 V, has been identified as originating from the redox activity of albumin. The three separate electrode processes are associated with a significant degree of electrochemical reversibility, as evidenced by distinct forward and backward current components. Additionally, redox active species exhibit notable affinity for adsorption onto the surface of the working

electrode.⁹ The notable electrochemical reversibility of bilirubin, uric acid, and albumin present in the serum correlates with their intrinsic attributes to undergo rapid electron exchange with the surface of the working EPPGE.

Figure 2 illustrates a series of SW voltammograms of human blood serum recorded following extended deposition periods at the initial potential of 0.0 V vs. Ag/AgCl reference electrode. The rather sharp definition of net SW voltammetric peaks, associated with the variations in their magnitudes relative to deposition time, frequently serve as compelling indicators of electrode processes of surface immobilized redox species (refer to Fig. 2).

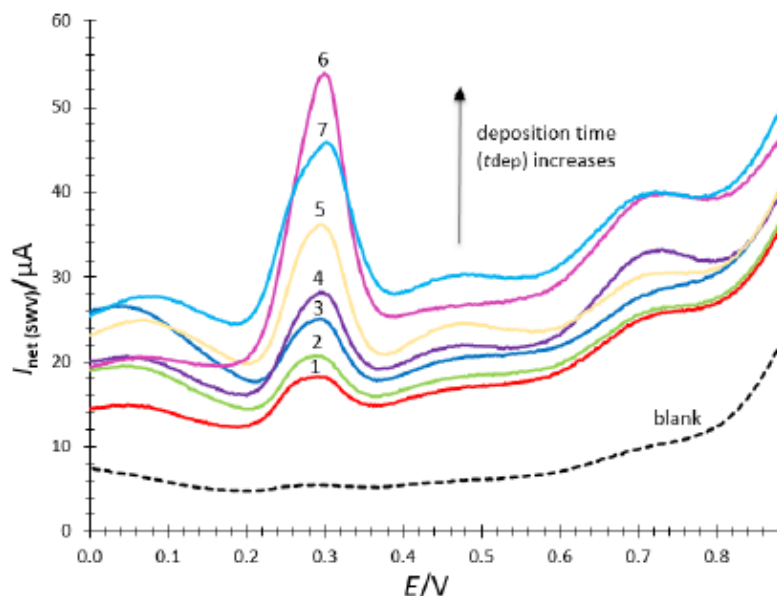


Fig. 2. Net square-wave voltammograms illustrating the changes observed as a function of deposition time for 2.4% (V/V) of human blood serum in a phosphate buffer solution with pH = 7.34. The concentrations of uric acid, bilirubin, and albumin in the electrochemical cell were 14.2 μ M, 2.3 μ M, and 20.4 μ M, respectively. Applied deposition time was 0 s (1), 15 s (2), 20 s (3), 30 s (4), 45 s (5), 60 s (6), and 120 s (7). The curve at the bottom represents the blank of the phosphate buffer recorded in the absence of human blood serum. Refer to Figure 1 for additional experimental conditions.

Additionally, the adsorption curves delineated in Figure 3 pertaining to uric acid, bilirubin, and albumin reveal distinct evidence of surface saturation on the working electrode beyond deposition time of about 85 s for uric acid (1), 50 s for bilirubin (2) and 90 s for albumin (3) under the specified experimental conditions referred to in Figure 3.

The observations regarding the adsorption characteristics of all three analytes on carbon-based electrodes are consistent with literature data,^{18–20} as well as with our previous findings.⁹ As

can be inferred from Figure 3, the adsorption of uric acid dominates. Moreover, the intensity of the response of uric acid is a consequence of rapid electron exchange and, thus, its significant degree of electrochemical reversibility, which is particularly important for electrode processes under conditions of SWV.¹⁶ The saturation of the electrode with bilirubin takes place at a significantly shorter deposition time compared to uric acid (curve 2 in Fig. 3), yet the response of bilirubin is much weaker due to the significantly more complex electrode

mechanism, accompanied by follow-up chemical reactions and the fouling effect of the reaction products.^{21,22} Saturation of the electrode with albumin occurs at a comparable time to uric acid (compare curves 1 and 3 in Fig. 3). It should be noted that even though the concentration of albumin dominates in the medium in comparison to uric acid and bilirubin, the diffusion coefficient of the large albumin molecules is expected to be significantly lower than for other small analytes,^{23,24} which affects the morphology of the adsorption isotherm (curve 3 in Fig. 3).

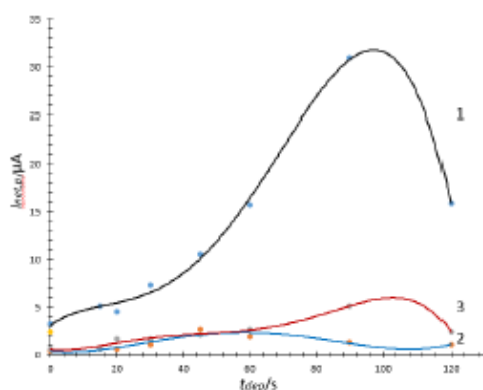


Fig. 3. Adsorption curves demonstrating the relationship between net SWV peak currents and deposition time (t_{dep}) for uric acid (1), bilirubin (2), and albumin (3). For additional experimental conditions, refer to Figure 1.

Given the complexity of the studied medium, it should be noted that the decreasing intensity of any voltammetric peak at prolonged deposition times could be a consequence of competitive adsorption with other analytes,^{25,26} as well as the competitive adsorption of the studied analytes. Thus, the decrease in response beyond a certain deposition time does not necessarily imply saturation of the electrode with a particular analyte only. Instead, it reflects the multifaceted surface phenomena occurring in such a complex medium.

3.2. Effect of the instrumental parameters on the voltammetric signals of uric acid, bilirubin, and albumin in human blood serum

The optimization of instrumental parameters is regarded as a pivotal stage in the comprehensive process of designing amperometric biosensors, particularly in samples where multivariate analysis is conducted. In the current scenario, wherein the redox transformation of the three studied biomole-

cules in human blood serum originates predominantly from an adsorbed state, factors such as frequency, square-wave amplitude, step potential, deposition potential, and deposition time are critical parameters essential to delineating voltammetric peaks exhibiting desirable measurable characteristics. With respect to the deposition potential, it should be noted that the influence was tested in regions between -0.30 V and $+0.40$ V. Because the maximum current magnitudes were obtained at a deposition potential of 0.00 V, this value was selected as optimal for analytical purposes. It has been extensively elucidated that frequency stands as a critical instrumental parameter across all pulse voltammetric methodologies,^{16,27} with particular significance in square-wave voltammetry.^{16,28} Its influence extends beyond merely modulating the rate of electron exchange between the working electrode and the redox analyte molecules, but it also exerts an impact on the adsorption phenomena occurring throughout the temporal duration of each applied potential pulse at surface-confined redox systems.¹⁶ Figure 4 depicts the relationships between the currents associated with the net square-wave voltammetric peaks of uric acid, presented as a function of the logarithm of the applied SW frequency.

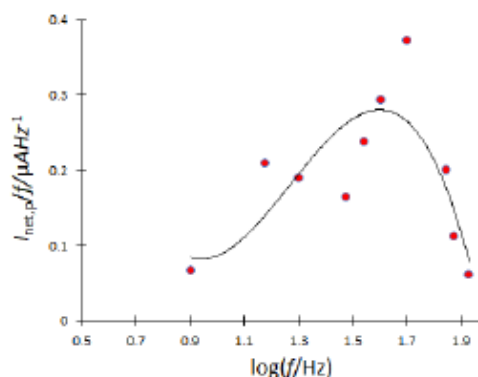


Fig. 4. The relationships between the ratio of $I_{net,p}/f$ of the net SW voltammograms for uric acid analysed in terms of the logarithm of the applied SW frequency. The concentration of uric acid in the electrochemical cell was $14.6 \mu\text{M}$, while the concentrations of bilirubin and albumin were $2.21 \mu\text{M}$ and $21.2 \mu\text{M}$, respectively. No deposition was applied for this set of experiments. For additional experimental conditions refer to Figure 1.

Specifically, a parabola-like dependency exists between the frequency normalized net peak currents and the SW frequency, exhibiting a maximum at around 50 Hz. Beyond this critical fre-

quency, the response decreases. This behaviour is characteristic of not only of uric acid but also of bilirubin and albumin. It implies that at higher frequencies (commonly larger than 70 Hz), artifacts arising from uncompensated resistance due to the blocking of the electrode with products of the electrode reactions for all three analytes become significant. This observation is further supported by the morphological analysis of the net SW peaks at frequencies higher than 70 Hz for all three analytes, correlating well with theoretical data.²⁹

It is important to note that the parabolic curve presented in Figure 4, where the ratio of the peak current and the frequency is presented as a function of the logarithm of the frequency can be also analyzed in the context of the notable feature of the surface electrode processes under conditions of SWV known as the 'quasi-reversible maximum'.¹⁶ The position of the maximum could be related to the standard rate constant of the electrode reaction, as discussed in the previous study.⁹ More importantly for the present study, from an analytical perspective, the SW frequency corresponding to the maximum of the curve in Figure 4 is considered as the optimal parameter for quantifying the studied analytes. It provides the highest response while remaining relatively unaffected by artifacts arising from the complexity of the electrode mechanisms of the studied analytes.

Besides frequency, the square-wave amplitude stands out as one of the most adjustable parameters in square-wave voltammetry, influencing two primary characteristics of the resulting voltammograms: the background signal and the signal-to-noise ratio of the resultant peaks.^{16,28} More importantly, the amplitude of applied pulses (E_{sw}) serves as a parameter predominantly influencing the rate of heterogeneous electron transfer between the working electrode and the analyte molecules.¹⁶ For square-wave amplitudes up to approximately 70 mV, the intensity of all three voltammetric peaks increases in proportion to E_{sw} . However, as the square-wave amplitude exceeds 70 mV, all voltammetric peaks begin to broaden significantly, leading to some degree of mutual overlapping when the amplitude surpasses 80 mV. A square-wave amplitude of 50 mV yielded well-resolved peaks with readily measurable features; thus, this value was adopted for analytical purposes.

Moreover, the resolution and some of the major characteristics of voltammetric peaks were found to be influenced by the step potential. Besides resolution of voltammetric peaks, step potential affects the overall degree of electrochemical reversibility of electrode processes.³⁰ An optimisa-

tion study of this instrumental parameter revealed that a potential step of 4 mV proved to be quite suitable for analytical evaluations related to all voltammetric peaks. At potential steps larger than 8 mV, all voltammetric peaks became distorted to some extent.

3.3. Effect of interferences

Conducting a voltammetric analysis within a complex system such as human blood serum presents significant challenges, particularly when no pre-treatment or additional complexing reagents are introduced to the sample. It is anticipated that numerous molecules within human blood serum will exhibit an inclination to adsorb onto the surface of the working electrode, alongside uric acid, bilirubin, and albumin. In this context, many of these systems may exert considerable effects regarding adsorption forces, and potentially influencing the electron transfer step as well. Furthermore, concurrent interactions at the working electrode surface among the adsorbed molecules of uric acid, bilirubin, and albumin may also occur.

Considering various significant parameters found in human blood serum, we examined how glucose, cholesterol, and triglycerides affect the voltammetric behaviour of the analyzed substances. Through a series of experiments conducted in human blood serum, we discovered that glucose has no discernible impact on voltammetric peaks when its concentration is below 300 μM . Conversely, when cholesterol concentrations surpass 200 μM in the electrochemical cell, there is a notable reduction in the intensity of all voltammetric peaks (not shown). This observation generally applies to patients with elevated cholesterol levels in their blood. It is well documented that cholesterol, being highly lipophilic, tends to strongly adsorb onto the surface of carbon-based electrodes.¹²

This strong adsorption of cholesterol leads to significant insulation of the working electrode's surface, thereby impeding the adsorption of other analyte molecules and hindering the electron exchange between the working electrode and the molecules under study.

Regarding the impact of triglycerides on the voltammetric profiles of the investigated molecules, an intriguing trend is observed in the context of the uric acid (Fig. 5). An elevation in triglyceride concentration within the range from 44 μM to 52 μM results in a notable increase in the voltammetric peak of uric acid. However, a subsequent increase in triglycerides leads to a significant reduction in the intensity of the voltammetric peak

(refer to Fig. 5). Evidently, a moderate concentration of triglycerides facilitates adsorption and electron communication between the working electrode and the uric acid, whereas triglycerides present at concentrations exceeding $52 \mu\text{M}$ exhibit substantial adsorption at the working electrode surface, thereby significantly diminishing the surface

concentration of uric acid. It is important to note that the concentrations of triglycerides depicted in Figure 5 are beyond the upper range of reference values of a healthy person. It should be noted that triglycerides in this concentration range have a minor impact on the peak of albumin (see the peak of albumin in the inset in Fig. 5).

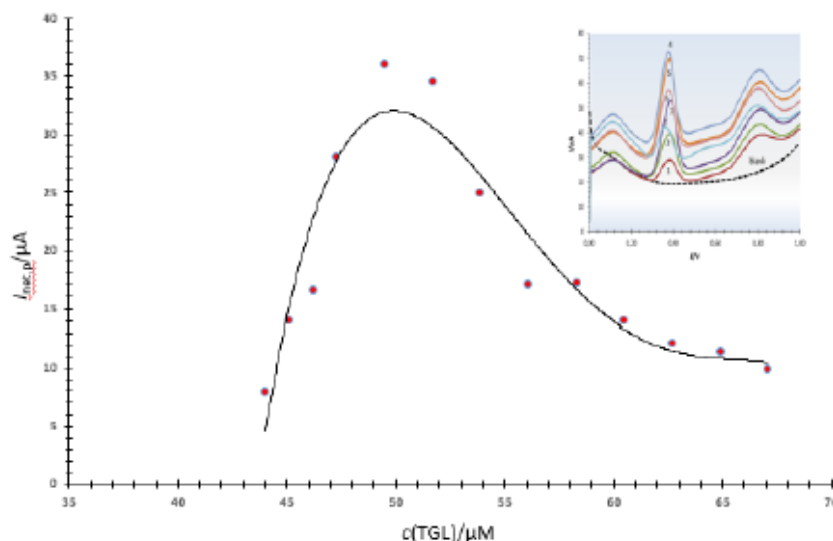


Fig. 5. A working curve demonstrating the impact of triglyceride concentration on the net SWV peak currents of uric acid. The experiments involved dissolving 2.4% (V/V) of human blood serum in a phosphate buffer, with conditions specified in Fig. 1. The concentration of uric acid in the electrochemical cell was maintained at $6.1 \mu\text{M}$. The inset displays net square-wave voltammograms recorded at various concentrations of triglycerides: $44 \mu\text{M}$ (1), $45.1 \mu\text{M}$ (2), $46.2 \mu\text{M}$ (3), $49.5 \mu\text{M}$ (4), $51.7 \mu\text{M}$ (5), $53.9 \mu\text{M}$ (6), and $58.3 \mu\text{M}$ (7). The concentration of albumin in the electrochemical cell was $16 \mu\text{M}$.

Given that the voltammetric activity exhibited by the examined systems (uric acid, bilirubin, and albumin) present in human blood serum occurs from an adsorbed state, it is reasonable to infer that competitive adsorption and interactions among the adsorbed analytes at the EPPGE surface are quite feasible. To investigate these effects, voltammetric analyses were conducted whereby the concentration of one analyte was systematically varied, while the concentrations of the remaining two analytes were held constant. It was observed that concentrations of uric acid exceeding $65 \mu\text{M}$ resulted in a concurrent reduction in the intensities of voltammetric peaks associated with both bilirubin and albumin. These findings agree with the general tendency of uric acid to adsorb more strongly than bilirubin, as can be inferred from data in Figure 3. Yet, concentrations of bilirubin exceeding $40 \mu\text{M}$ led to a decrease in the intensity of the uric acid peak as well. Obviously, competitive adsorption

between bilirubin ($c > 40 \mu\text{M}$) and uric acid ($c > 65 \mu\text{M}$) is significant, which can have a negative impact on the magnitude of both peaks.

Conversely, concentrations of albumin exceeding $60 \mu\text{M}$ resulted in a modest augmentation of the intensity of the voltammetric peak associated with bilirubin. Given the established role of albumin as a protein mediating the membrane transfer of highly lipophilic bilirubin molecules,³¹ it is reasonable to infer that elevated albumin concentrations within the voltammetric cell facilitate enhanced adsorption of bilirubin and promote its interaction with the working electrode. These interferences are significant in the context of voltammetry in human blood serum, as they contribute to a deeper comprehension of the voltammetric patterns of uric acid, bilirubin, and albumin. It is crucial to emphasise that more pronounced interactions between the analyte molecules are primarily expected in patients with elevated concentrations

of all three considered compounds in the serum. Yet, the problem with competitive interactions between the three analytes can be easily mitigated by decreasing the volume concentration of the studied serum in the voltammetric cell, i.e., to perform the analysis with less than 2.4% (V/V) serum content.

3.4. Constructing plots showing the concentration dependences of the voltammetric peaks of UA, BLR, and ALB

Figure 6 illustrates three curves demonstrating the concentration dependences of the voltammetric signals, constructed for all analyzed components.

Each data point on the concentration dependences lines in Figure 6 represents the average value derived from a minimum of nine measurements. Experimental procedures for generating the plots in Figure 6 involved the analysis of 2.4% (V/V) of human blood serum associated with a

high bilirubin concentration, alongside normal concentrations of uric acid and albumin. The first point in each calibration line in Figure 6 refers to the concentration of a particular analyte in the serum determined by the UV-Vis method. The concentration was gradually increased in parallel for the three analytes, by introducing corresponding standard additions. Thus, a higher concentration of a particular analyte was measured in the presence of higher concentrations of the other two analytes in order to present the dependencies presented in Figure 6 in a more rigorous way, considering potential interactions between analytes. It is worth noting that subsequent to each voltammetric scan, the working electrode was cleaned in accordance with the procedure outlined in our earlier study.⁹ The performance assessment of the SW voltammetric method is comprehensively presented through Table 1.

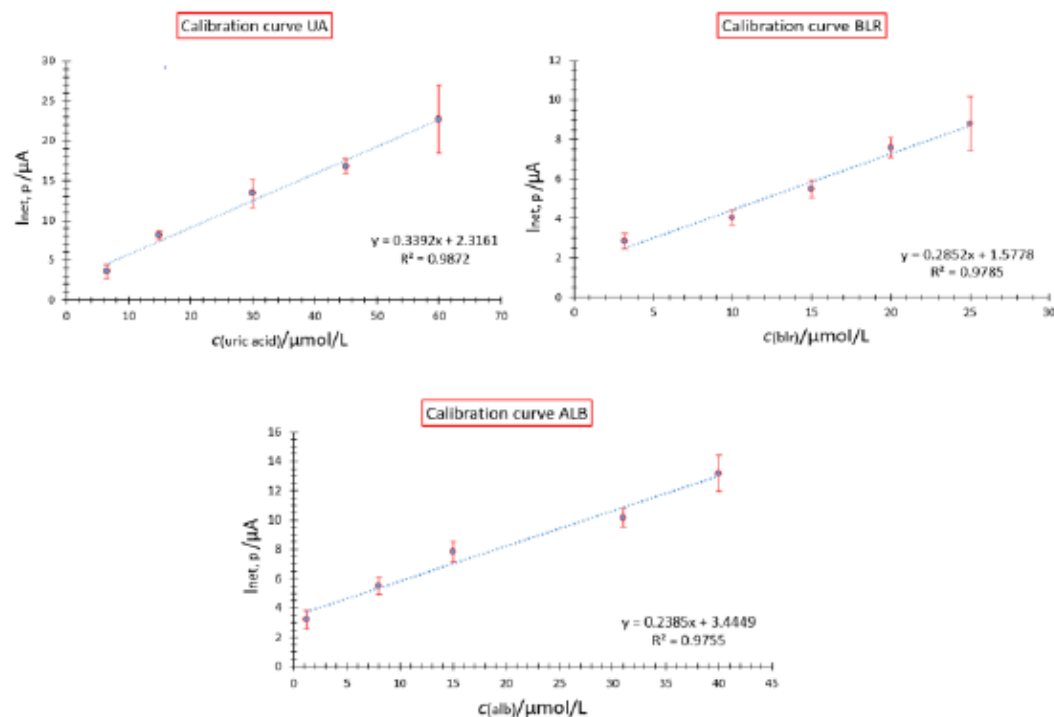


Fig. 6. Plots showing concentration dependences of voltammetric signals constructed for uric acid (UA), bilirubin (BLR), and albumin (ALB). Curves are constructed by the standard addition method performed with 2.4% (V/V) of human serum initially dissolved in phosphate buffer. The instrumental parameters used were SW frequency $f = 50$ Hz, SW amplitude $E_{sw} = 50$ mV, step potential $dE = 4$ mV, deposition potential $E_{dep} = 0.0$ V, and deposition time $t_{dep} = 30$ s. Each point presented on the graphs is an average of 9 measurements. The initial data points on each line shown represent their concentrations in human blood serum, as determined by the UV-Vis method.

Table 1

Validation parameters for the determination of uric acid, bilirubin, and albumin obtained by square-wave voltammetry

Analyte	Concentration range/ μM	Equation of linear regression line	Correlation coefficient R^2	Standard deviation SD/ μA	Relative standard deviation RSD/%	LOD/ μM	LOQ/ μM
UA	6 – 60	$y = 0.3392x + 2.3161$	0.99	0.32	2.56	2.80	9.24
BLR	3 – 25	$y = 0.2852x + 1.5778$	0.98	0.25	2.60	2.20	7.26
ALB	2 – 40	$y = 0.2385x + 3.4449$	0.98	0.23	2.08	1.99	6.56

*The limit of detection (LOD) was estimated according to following equation: $\text{LOD} = 3S/a$; where S is the standard deviation of the net current of the blank, and a is the slope of the corresponding linear regression line. Limit of quantification (LOQ) is estimated as: $\text{LOQ} = 3.3 \times \text{LOD}$.

Upon optimisation of experimental parameters, a linear correlation between the net SWV peak currents and concentration was observed for uric acid, bilirubin, and albumin across concentration ranges between 6 μM and 60 μM , 3 μM and 25 μM , and 2 μM and 40 μM , for uric acid, bilirubin, and albumin, respectively. The determined detection limits, as detailed in Table 1, are 2.80 μM , 2.20 μM , and 1.99 μM for uric acid, bilirubin, and albumin, respectively. Furthermore, the correlation coefficients (R^2) exceeded 0.99 and 0.98 for all examined analytes, affirming the method's robust linearity. Moreover, the relative standard deviation ranged between 2.00% and 2.60%, which indicates rather good precision of the method, keeping in mind the entire complexity of the studied matrix. The error bars depicted in the dependencies of Figure 6 reveal elevated standard deviations, observed particularly at higher analyte concentrations. This phenomenon can be attributed to the pronounced mutual interferences among all three components, which manifest more promi-

nently at elevated analyte concentrations, as discussed earlier in this work.

3.5. Analytical applications

The voltammetric methodology developed in this study was employed to simultaneously determine the concentrations of studied analytes in seven samples of human serum. The results obtained from these voltammetric experiments are delineated in Table 2, alongside data acquired from the standard UV-Vis method used in the clinical laboratory. Evidently, notable agreement is observed between both datasets, with more pronounced disparities emerging necessary at elevated concentrations of uric acid (see serum No.4, for example). This outcome was anticipated, given the influence elucidated earlier in this investigation regarding the impact of heightened uric acid concentrations. It is pertinent to note that the data presented in Table 2 denote the concentrations of the analytes in the electrochemical cell.

Table 2

A comparison between determined values for concentrations of UA, BLR, and ALB with UV/Vis protocol and with voltammetric methodology described in this work

Serum No.	UA/UV-Vis $\mu\text{mol/l}$	UA in this work $\mu\text{mol/l}$	BLR/UV-Vis $\mu\text{mol/l}$	BLR in this work $\mu\text{mol/l}$	ALB/UV-Vis $\mu\text{mol/l}$	ALB in this work $\mu\text{mol/l}$
1	5.2	6.9	/	/	15.5	16.2
2	/	/	/	/	20.8	21.6
3	4.3	8.8	/	/	18.5	15.7
4	64.5	54.2	3.43	4.3	23.6	24.1
5	/	/	10.1	9.2	/	/
6	5.6	5.8	7.2	6.6	/	/
7	35.1	42.8	/	/	/	/

*Values refer to the concentrations in electrochemical cell.

**For this set of measurements, 2.4% (V/V) of human serum were dissolved in phosphate buffer with pH of 7.34. Voltammetric measurements were conducted at deposition time $t_{\text{dep}} = 30$ s, frequency $f = 50$ Hz, amplitude $E_{\text{sw}} = 50$ mV, and step potential $dE = 4$ mV. For each serum, a minimum of 5 measurements were performed, and the average values of the peak currents were used for the evaluation of concentrations of UA, BLR, and ALB, by using the equations of linear lines from Table 1.

***For samples with numbers 4 and 7, 4.8% (V/V) human serum was used

4. CONCLUSIONS

This study presents a comprehensive voltammetric investigation into the direct analysis of untreated human blood serum. By employing advanced square-wave voltammetry at an unmodified, edge plane pyrolytic graphite electrode, a sensitive method for simultaneous quick screening of three crucial analytes (uric acid, bilirubin, and albumin), essential for rapid medical diagnostics, was established. The findings presented in this work demonstrate the feasibility of designing a cheap, fast, and reliable amperometric biosensor, even in highly complex media such as human blood serum. Without the need for any chemical pretreatment of the serum sample, the developed methodology enables simultaneous label-free quantification of the three analytes.

While the methodology developed relies to some extent on the overall composition of the matrix, it offers a streamlined approach, circumventing the need for expensive and time-intensive procedures traditionally employed in the electrochemical detection of targeted analytes.^{6-8,31,32} The efficacy and reliability of the simple method were successfully validated by quantifying the three analytes in a series of samples of human blood serum from several patients, providing quantitative data that was in agreement with the standard methods used in a clinical biochemical laboratory.

The developed analytical protocol stands out due to its importance, particularly considering the predominant use of enzymatic-based methods and the widespread adoption of nanoparticle-modified electrodes in the majority of electrochemical biosensors designed for quantifying these systems.^{11,13,14,19,33-36} The reported methodology is, indeed, envisioned as a pivotal step towards the establishment of point-of-care devices for the rapid and simultaneous quantification of uric acid, bilirubin, and albumin in human serum, which to the best of our knowledge, is a unique finding.

REFERENCES

- (1) Samuel, V. R.; Rao, K. J., A review on label free biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2022**, *11*, 100216. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100216>
- (2) Chen, X.; Wu, G.; Cai, Z.; Oyama, M.; Chen, X., Advances in enzyme-free electrochemical sensors for hydrogen peroxide, glucose, and uric acid. *Microchim. Acta*. **2014**, *181*, 689–705. <https://doi.org/10.1007/s00604-013-1098-0>
- (3) Domínguez-Renedo, O.; Navarro-Cunado, A. M.; Alonso-Lamilla, M. A., Electrochemical devices for cholesterol detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2023**, *224*, 115195. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115195>
- (4) Singh, A.; Sharma, A.; Ahmed, A.; Sundramoorthy, A. K.; Furukawa, H.; Arya, S.; Khosla, A., Recent advances in electrochemical biosensors: Applications, challenges and future scope. *Biosensors*. **2021**, *11*(9), 336. <https://doi.org/10.3390/bios11090336>
- (5) Labib, M.; Sargent, E. H.; Kelley, S. O., Electrochemical methods for the analysis of clinically relevant biomolecules. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 9001–9090. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00220>
- (6) Ronkainen, N. J.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R., Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1747–1763. <https://doi.org/10.1039/B714449K>
- (7) Thevenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16* (1–2), 121–131. [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(01)00115-4)
- (8) Ramachandran, R.; Chen, T-W.; Chen, S-M.; Baskar, T.; Kannan, R.; Elumalai, P.; Raja, P.; Jeyapragasam, T.; Dinakaran, K.; Kumar, G. P. G., A review of the advanced developments of electrochemical sensors for the detection of toxic and bioactive molecules. *Inorg. Chem. Front. Bioelectron.* **2019**, *6*, 3440–3455. <https://doi.org/10.1039/C9QI00965E>
- (9) Kokoskarova, P.; Stojanov, L.; Najkov, K.; Ristovska, N.; Ruskovska, T.; Skrzypek, S.; Mirceski, V., Square-wave voltammetry of human blood serum. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 8485. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34350-1>
- (10) Ossendorfova, N.; Pradac, J.; Pradacova, J.; Koryta, J., Cyclic voltammetric response of blood serum. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1975**, *58*, 255–261. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(75\)80358-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(75)80358-5)
- (11) Noh, H. B.; Won, M. S.; Shim, Y. B., Selective nonenzymatic bilirubin detection in blood samples using a Nafion/Mn–Cu sensor. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *61*, 554–561. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.002>
- (12) Derina, K. V.; Korotkova, E. I.; Dorozhko, E. V.; Voronova, O. A., Voltammetric determination of cholesterol in human blood serum. *J. Anal. Chem.* **2017**, *72* (8), 904–910. <https://doi.org/10.1134/S1061934817080068>
- (13) Tsivadze, A. Y.; Petrikov, S. S.; Goronchayovskaya, I. V.; Evseev, A. K.; Shabanov, A. K.; Batilchev, O. V.; Andreev, V. N.; Goldin, M. M., Voltammetric analysis in blood serum in patients with severe combined trauma. *Dokl. Phys. Chem.* **2019**, *486* (1), 61–64. <https://doi.org/10.31857/S0869-5652486161-64>
- (14) Wantz, F.; Banks, C. E.; Compton, R. G., Edge plane pyrolytic graphite electrodes for stripping voltammetry: A comparison with other carbon based electrodes. *Electroanalysis*. **2005**, *17*, 655–661. <https://doi.org/10.1002/elan.200403148>
- (15) Banks, C. E.; Compton, R. G., Edge plane pyrolytic graphite electrodes in electroanalysis: An overview. *Anal. Sci.* **2005**, *21* (11), 1263–1268. <https://doi.org/10.2116/analsci.21.1263>
- (16) Mirceski, V.; Komorsky-Lovric, Š.; Lovric, M., *Square-wave Voltammetry: Theory and Application*, (Scholz, F., ed.). Springer, Berlin, Heidelberg, **2007**.

- (17) Gulaboski, R.; Mirceski, V., Application of voltammetry in biomedicine – Recent achievements in enzymatic voltammetry. *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* **2020**, *39* (2), 153–166. <https://doi.org/10.20450/mjce.2020.2152>
- (18) Rawal, R.; Kharangarh, P. R.; Dawra, S.; Tomar, M.; Gupta, V.; Pundir, C. S., A comprehensive review of bilirubin determination methods with special emphasis on biosensors. *Process Biochem.* **2020**, *89*, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.034>
- (19) Dryhurst, G.; De, P. K., A direct electrochemical method for the determination of allopurinol and uric acid mixtures. *Anal. Chim. Acta.* **1972**, *58* (1), 183–191. [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(00\)86868-3](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(00)86868-3)
- (20) Guo, B.; Anzai, T.; Osa, T., Adsorption behavior of serum albumin on electrode surfaces and effects of electrode potential. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44* (4), 800–803. <https://doi.org/10.1248/cpb.44.800>
- (21) Narwal, B.; Batra, B.; Kalra, V.; Jalandra, R.; Ahlawat, J.; Hooda, R.; Sharma, M.; Rana, J. S., Bilirubin detection by different methods with emphasis on biosensing: a review. *Sens. Bio-Sens. Res.* **2021**, *33*, 100436. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2021.100436>
- (22) Zeng, B.; Liu, Z.; Zhou, X., Polarographic investigation and determination of bilirubin. *Anal. Sci.* **1994**, *10*, 95–99. <https://doi.org/10.2116/analsci.10.95>
- (23) Smiechowski, M. F.; Lvovich, V. F.; Roy, S.; Fleischman, A.; Fissel, W. H.; Riga, A. T., Electrochemical detection and characterization of proteins. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22*, 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.02.008>
- (24) Lu, L.; Zi, Y.; Wang, H., Microdetermination of human serum albumin by differential pulse voltammetry at a L-cysteine modified silver electrode. *J. Chem. Sci.* **2008**, *120*, 419–424. <https://doi.org/10.1007/s12039-008-0066-4>
- (25) Domínguez-Renedo, O.; Navarro-Cunado, A. M.; Alonso-Lomillo, M. A., Electrochemical devices for cholesterol detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2023**, *224*, 115195. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115195>
- (26) Pundir, C. S.; Narwal, V., Biosensing methods for determination of triglycerides: A review. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *100*, 214–227. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.008>
- (27) Molina, A.; Gonzales, J., Pulse voltammetry in physical electrochemistry and electroanalysis. In: *Monographs in Electrochemistry* (Scholz, F., ed.). Springer, Berlin, Heidelberg, **2016**.
- (28) Guziejewski, D., Electrode mechanisms with coupled chemical reactions – Amplitude effect in square-wave voltammetry. *J. Electroanal. Chem.* **2020**, *870*, 114186. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114186>
- (29) Mirceski, V.; Lovrić, M., Ohmic drop effects in square-wave voltammetry. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *497*, 114–124. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(00\)00464-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(00)00464-2)
- (30) Mirceski, V.; Stojanov, L.; Ogorevc, B., Step potential as a diagnostic tool in square-wave voltammetry of quasi-reversible electrochemical processes. *Electrochim. Acta*, **2019**, 327. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.134997>
- (31) Čvorović, J.; Passamonti, S., Membrane transporters for bilirubin and its conjugates: A systematic review. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 887. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00887>
- (32) Simões, F. R.; Xavier, M. G., Electrochemical sensors. In: *Nanoscience and Its Application* (Da Róz, A.L.; Ferreira, M.; De Lima Leite, F.; Oliveira, O. N., eds). Elsevier, **2017**, 155–178. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49780-0.00006-5>
- (33) Lisdat, F., Coupling biology to electrochemistry – future trends and needs, *J. Solid State Electrochem.* **2020**, *24* (8), 2125–2127. <https://doi.org/10.1007/s10008-020-04714-y>
- (34) Ghosh, T.; Sarker, P.; Turner, A. P. F., A novel third generation uric acid biosensor using uricase electroactivated with ferrocene on a nafion coated glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*. **2015**, *102*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.11.001>
- (35) Hooda, V.; Gahlaut, A.; Gothwal, A.; Hooda, V., Bilirubin enzyme biosensor: potentiality and recent advances towards clinical bioanalysis. *Biotech. Lett.* **2017**, *39*, 1453–1462. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2396-0>
- (36) Chelmea, L.; Badea, M.; Scarneci, I.; Moga, M. A.; Dima, L.; Restani, P.; Murdaca, C.; Ciurescu, D.; Gaman, L. E., New trends in uric acid electroanalysis. *Chemosensors*. **2023**, *11* (6), 341. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11060341>

15. ПУБЛИКУВАНИ ТРУДОВИ

1. P. Kokoskarova, L. Stojanov, K. Najkov, N. Ristovska, T. Ruskovska, S. Skrzypek, V. Mirceski, „Square-wave voltammetry of human blood serum“ *Sci. Rep.*, vol. 13, 2023.
2. P. Kokoskarova, T. Ruskovska, M. Brycht, S. Skrzypek, and V. Mirceski, „Label-free voltammetric screening of human blood serum“, *MJCCE*, vol. 43, pp. 49-59, 2024.