

Određivanje konstante disocijacije površinski samoformiranih kratkolančanih alkilnih tiola cikličkom voltametrijom

Zaračko, Mia

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:989144>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Mia Zaračko

Završni rad

Zagreb, 2015

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Mia Zaračko

**Određivanje konstante disocijacije samoformiranih kratkolančanih alkilnih tiola
cikličkom voltametrijom**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Izv. prof. dr. sc. Stjepan Milardović

Članovi ispitnog povjerenstva:

Izv. prof. dr. sc. Zoran Mandić

v. predavač dr. sc. Lidija Furač

Zagreb, 2015.

Sažetak

Određivanje konstante disocijacije samoformiranih monoslojeva kao i karakterizacija modificirane elektrode provodilo se elektrokemijskom metodom cikličke voltametrije. Ispitivana su tri samoformirajuća sloja na Au elektrodi: mezo-2,3-dimerkaptojantarna kiselina (DMSA), N-acetilcistein(NAC) i L-cistein (Cys). Svaki od spojeva u svojoj strukturi sadrži funkcionalne skupine koje ioniziraju u različitim područjima pH. U tu svrhu pripremljeni su Britton-Robinson puferi širokog spektra različitih pH vrijednosti.

Prije svakog nanošenja samoformirajućeg sloja, Au elektroda je tretirana mehanički i kemijski kako bi se postigla površina zrcalnog sjaja. Finalno je tretirana elektrokemijski u 0,1 M otopini HClO_4 . Višestrukim provođenjem cikličke voltametrije osigurano je uklanjanje tvari koje bi mogle utjecati na kvalitetu sloja. Nakon što je Au elektroda očišćena, slijedi njeno močenje u otopini spoja koji se ispituje, u trajanju od najmanje 24 sata. Radi određivanja pK testiranih spojeva provodilo se mjerenje cikličkom voltametrijom u otopini elektrolita koji sadrži Britton-Robinson pufere različitih pH vrijednosti uz dodatak 1 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ i 1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Poznavanjem teorijskih pK vrijednosti za svaki spoj, pomno se prati ponašanjem cikličkog voltamograma u očekivanom području pH. Pomicanjem pH u dovoljno bazično područje dolazi do promjena u strujnom odzivu na voltamogramu. Stavljanjem u ovisnost izmjerene vršne anodne struje za različite pH vrijednosti, jasno se uočava trend strujnog odziva kao funkcija pH vrijednosti za sva tri spoja. Precizno određivanje pK vrijednosti izvodi se iz prve derivacije vršne struje po promjeni pH vrijednosti ($\delta I_p / \delta \text{pH}$). Iz minimuma tako dobivenih krivulja očitava se pK vrijednost.

Ključne riječi: ciklička voltametrija, DMSA, NAC, Cys, samoformirajući monosloj, pK vrijednost, Britton-Robinson pufer

Summary

Determination of dissociation constant for self-assembled monolayers is performed by cyclic voltammetry. In order to characterize modified electrode cyclic voltammetry was also used. Three self-assembled monolayers were tested: meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA), N-acetylcysteine (NAC) and L-cysteine (Cys). Each of the compounds contains functional groups which undergo ionization in solution of different pH and therefore enable the determination of pK values of tested compounds. For this purpose Britton-Robinson buffers wide pH containing 0,04 M CH₃COOH (iced), 0,04 M H₃BO₃ and 0,04 M H₃PO₄, (w = 85 %) were made. The solution were adjusted to the desired pH by additions of 0,2 M NaOH.

Before each application of self-assembled monolayer, Au electrode was cleaned in 0,1 M HClO₄ solution, electrochemically by cyclic voltammetry, to reassured the removal of substances that could affect the quality of the layer. After cleaning the electrode was wetting in the solution of tested compounds at least for 24 hours. Determination of pK was performed by cyclic voltammetry in the solution composed of 8 mL Britton-Robinson buffer, 1 mL K₄[Fe(CN)₆]*3H₂O and 1 mL K₃[Fe(CN)₆].

Dependence between obtained anodic peak current vs. pH showed noticeable trend of current response with an increase in pH. Accurate determination of pK values was done by using the first derivative from which the minimum corresponds to pK value of self-assembled monolayer.

Key words: cyclic voltammetry, DMSA, NAC, Cys, self-assembled monolayer, pK value, Britton-Robinson buffer

Sadržaj:

1.	Uvod	1
2.	Opći dio	2
2.1.	Kiseline i baze	2
2.1.1.	Teorija kiselina i baza.	2
2.1.2.	Jakost kiselina i baza	4
2.1.3.	Određivanje jakosti kiselina i baza na temelju podataka o pK	7
3.	Metode određivanja pK	10
3.1.	Potenciometrija	10
3.2.	Konduktometrija	11
3.3.	Kalorimetrija	12
3.4.	Nuklearna magnetska rezonancija	13
3.5.	Elektroforeza	14
3.6.	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	15
3.7.	Odjeljivanje(ekstrakcija) i raspodjela	15
3.8.	Topljivost	16
3.9.	UV/Vis spektrometrija	17
4.	Određivanje površinske pK vrijednosti	18
4.1.	Određivanje površinske pK vrijednosti	18
4.2.	Određivanje površinske pK vrijednosti primjenom cikličke voltametrije	19
5.	Samoformirajući monoslojevi (SAM)	21
5.1.	Uvod	21
5.2.	Samoformirajući monoslojevi (SAM)	23
5.2.1.	Definicija i priprema	23
5.2.2.	Samoformirajući monoslojevi tiola na zlatnoj površini	24
5.2.3.	Reaktivnost monoslojeva	25
5.3.	Mezo-2,3, dimerkaptojantarna kiselina (DMSA)	26
5.4.	N-acetilcistein(NAC)	27
5.5.	Cistein (Cys).	28
6.	Ciklička voltametrija	30
6.1.	Elektrokemijski dvosloj	30

6.2. Ciklička voltametrija	31
7. Eksperimentalni dio	38
7.1. Kemikalije	38
7.2. Instrumentacija	38
7.3. Priprema radne elektrode	39
7.4. Priprema otopina	39
7.4.1. Priprema otopina za karakterizaciju monoslojeva na površini elektrode	39
8. Rezultati i obrada	41
8.1. Karakterizacija Au elektrode	41
8.2. Karakterizacija Au/Au DMSA modificirane elektode	43
8.3. Karakterizacija Au/Au NAC modificirane elektode	47
8.4. Karakterizacija Au/Au Cys modificirane elektode	50
9. Zaključak	54
10. Simboli	55
11. Literatura	56
12. Životopis	57

1. UVOD

Prve spoznaje o samoformirajućim monoslojevima potječu iz 1940-ih godina kada se uočava da uranjanjem platinaste pločice u otopinu odgovarajućih molekula površina te pločice mijenja svojstva i postaje hidrofobna kao posljedica vezanja hidrofobnih molekula. Do danas su poznati mnogi primjeri takvih interakcija između površine i površinski aktivnih tvari, a jedni od najistraživanijih su tiolni samoformirajući monoslojevi na površini zlata, zatim monoslojevi alkil triklorsilana na hidoksiliranoj površini, masne kiseline na površinama metalnih oksida te alkil fosfonati na cirkoniju^[1].

Ovaj rad bavi se samoformirajućim monoslojevima kratkolančanih alkil tiola na površini zlata. Ti slojevi s ionizirajućim završnim grupama utječu na svojstva površine. Stoga je određivanje pK vrijednosti vrlo važno jer definira naboj površine kada je u ravnoteži s otopinom određenog pH. Koristeći otopinu s negativnim redoks parom $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Ciklički voltamogrami pokazuje strujni odziv na kojem se uočavaju razlike u nabijenosti površine kao posljedica promjene pH. Naime, elektrostatske interakcije odbijanja ili privlačenja između redoks para i nabijene površine rezultirat će smanjenjem ili povećanjem anodne vršne struje. Određivanje površinske pK vrijednosti bazira se na radovima J. Zhao i drugih^[2].

2. Opći dio

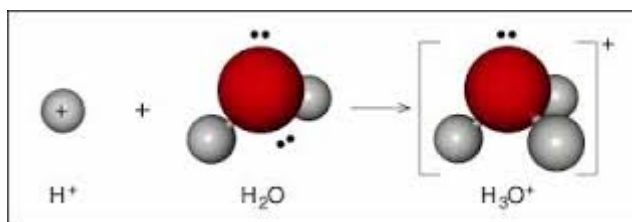
2.1. Kiseline i baze

Razumijevanje načina na koji površina metala reagira s otopinom u koju je uronjena omogućuje izradu površina s kontroliranim svojstvima. Kiselost i bazičnost otopine u koju je uronjena metalna površina bitno utječu na površinske strukture i mijenjanju njihove osobine. Stoga, promjenama pH vrijednosti otopina u kojima je metal uronjen može se mijenjati površinski naboj modificiranih metalnih površina.

2.1.1. Teorija kiselina i baza

Početno mišljenje o kiselinama i bazama bilo je da je riječ o dvije kemijski oprečne tvari te da se njihovom međusobnom reakcijom poništavaju njihova svojstva. Zatim je ustanovljeno da otopine kiselina i baza provode električnu struju pa su nazvane elektrolitima^[2].

Značajan pomak u razumijevanju kiselina i baza postavlja švedski kemičar **Arrhenius** koji tvrdi da se jaki elektroliti u vodenim otopinama većim dijelom nalaze u ioniziranom obliku, a manje u molekulskom obliku. Kiseline je definirao kao molekule oblika HA koje u vodi disociraju na vodikov ion H^+ i anion A^- . Naime, proton H^+ vrlo je nestabilan te kako bi se stabilizirao u vodenoj otopini, veže se na slobodni elektronski par vode i daje stabilan hidronijev ion H_3O^+ :

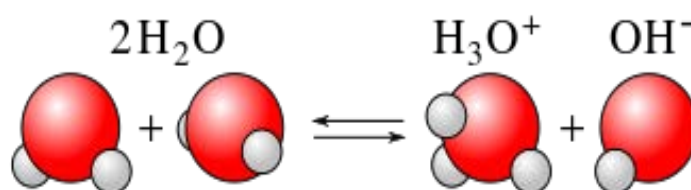


Slika 1. Stabilizacija H^+ iona u hidronijev ion H_3O^+

Stoga, je stvarna reakcija disocijacije kiseline u vodenoj otopini:



Na temelju toga, Arrhenius takve spojeve koji disocijacijom u vodenim otopinama daju hidronijev ion, H_3O^+ naziva kiselinama. Bazama, kao spojevima kemijski suprotnim kiselinama naziva tvari koje u vodenim otopinama disocijacijom daju hidroksidni ion, OH^- . Naime, ustanovio je da i voda vrlo slabo vodi električnu struju jer je slabo disocirana na hidronijev i hidroksidni ion, a koncentracije tih iona su jednake ($10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) što uzrokuje neutralnost vode.

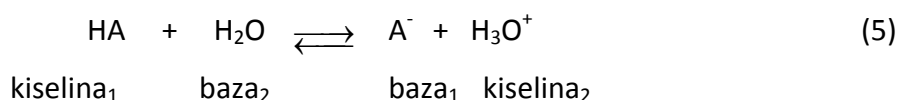


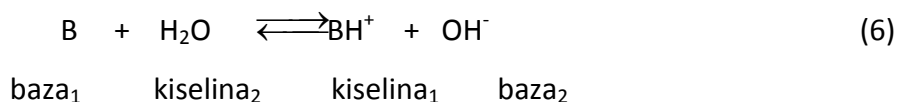
Slika 2.: Disocijacija vode kao uzrok njene neutralnosti te potvrda suprotnosti kiselina i baza

Takvo nepotpuno objašnjenje kiselina i baza proširili su **Bronsted** i **Lowry** svojom teorijom protona prema kojoj je kiselina tvar koja daje proton (proton donor), a baza je tvar koja prima proton (proton akceptor). Odatle slijedi da su kiseline sve molekulske vrste koje mogu odvojiti proton:

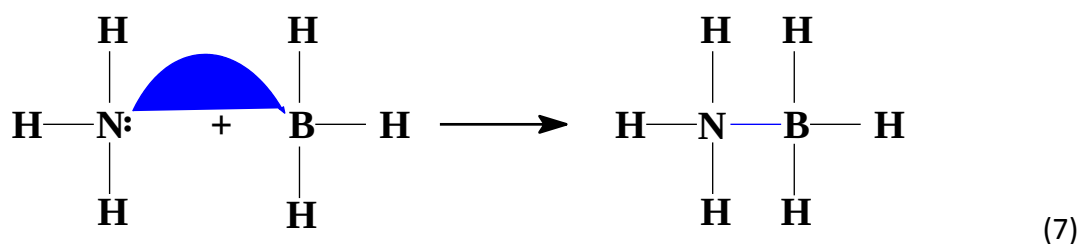


Kako su baze tvari koje mogu primiti proton, upravo one nastaju odvajanjem protona od kiseline. Dakle, kiselina može donirati protone samo ako je prisutna baza koja će taj proton primiti. Iz toga proizlazi da svaka kiselina ima svoju konjugiranu bazu i obratno. Što je kiselina slabija, teže otpušta proton pa je njena konjugirana baza jača i obratno.





Dodatno objašnjenje kiselina i baza dao je **G.N. Lewis** postavivši elektronsku teoriju. Kiseline i baze karakterizira prema njihovom načinu stvaranja veze. Kako kiselina otpušta proton, ona je elektrofilna čestica koja teži primanju elektronskog para, dok baza koja veže proton je nukleofilna čestica koja može dati elektronski par.



baza

kiselina

Konačno, svaka kiselina interpretira se kao koordinacijski nezasićena molekulska vrsta koja zbog tog razloga ima sklonost vezati se s elektron donorom, tj. bazom. S obzirom na takva svojstva, znači da je svaki kation kiselina, a anion baza. Kiseli karakter kationa je jače izražen u slučaju kada je njegov naboj viši, a radijus manji, dok je baza jača što je anion veći. Postoje i slučajevi kada molekula ili ion mogu biti i kiselina i baza, npr. ion HSO_4^- koji primanjem protona prelazi u H_2SO_4 , a otpuštanjem protona u SO_4^{2-} .

2.1.2. Jakost kiselina i baza

Kiseline se mogu podijeliti na nekoliko različitih načina. Tako primjerice govorimo o halogenovodičnim kiselinama ili o oksokiselinama kao kiselinama koje često koristimo. Na jakost kiselina odnosno baza utječu faktori. Najviše spominjani faktori u analizi kiselosti su: veličina elementa na koji je vezan vodikov atom, elektronegativnost, naboj, rezonancija, hibridizacija, induktivni i sterički efekti ^[3].

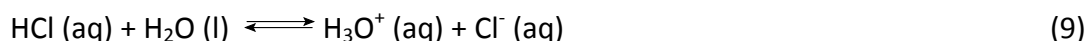
1. Elektronegativnost

Za kovalentne spojeve bez kisika (pr. HCl, HF, HBr, H₂S)

Primjer: klorovodična kiselina, HCl (aq)



Koliko lako će kiselina otpuštati proton ovisi o jakosti veza koju čini vodik s kisikom iz vode u odnosno na jakosti veze vodika i elementa koji čini anion kiseline (konjugirane baze) :



Što je veća polarnost H-A veze u kiselini, veza je jača i manje je sklonija kidanju i otpuštanju protona. Što je H-A veza slabija, kiselina je jača i lakše otpušta vodikov ion. Budući da polarnost raste s elektronegativnošću atoma, tamo gdje je najmanja razlika u elektronegativnosti, veza H-A je najslabija, a kiselina najjača. Stoga, u nizu halogenih kiselina možemo odrediti da kiselost raste u sljedećem nizu s obzirom na razliku u elektronegativnosti elemenata u spoju:



1,9 0,9 0,7 0,4 - razlika elektronegativnosti

Uspoređujući dvije kiseline u kojima su protoni koji se otpuštaju vezani za dva različita elementa u istom redu periodnog sustava, element veće elektronegativnosti je kiseliji jer je elektronegativniji atom sposobniji primiti elektronski par u konjugiranoj bazi.

Stoga vrijedi porast kiselosti u nizu:



Uspoređujući dvije baze u istom redu periodnog sustava, elektronegativniji atom tvori slabiju bazu pa jakost baza pada u nizu: $\text{OH}^- < \text{NH}_2^- < \text{CH}_3^-$

U slučaju dva atoma iste skupine, onaj koji je teži tvori slabiju bazu pa vrijedi:



2) Veličina

Uspoređujući dvije kiseline u kojima su protoni koji se otpuštaju vezani za dva elementa u istoj skupini periodnog sustava, teži element je kiseliji nego lakši element. Stoga za kiseline s halogenim elementom vrijedi porast kiselosti u nizu : $\text{HI} > \text{HCl} >> \text{HF}$

Također od fluora do joda raste veličina halogenog elementa tako da je privlačna sila između jezgre halogenog elementa i elektrona u veznoj orbitali s vodikom sve slabija. Navedeni slijed je suprotan onome koji daje utjecaj elektronegativnosti što ukazuje da na kiselost ne utječe samo elektronegativnost, već je bitan utjecaj veličine atoma s kojeg se odvaja vodikov atom.

3) Naboj

U slučaju dviju kiselina s istim elementom, ona koja ima pozitivan naboj je kiselija od one koja je neutralna. Stoga je amonijev ion (NH_4^+) kiseliji od amonijaka (NH_3). U određivanju kiselosti NH_3 i NH_4^+ treba biti oprezan jer se NH_3 može ponašati kao kiselina i kao baza.

4) Rezonancija

Općenito je pravilo da što je više mogućih rezonantnih struktura konjugirane baze, to je konjugirana kiselina kiselija. Važnu ulogu u stabilizaciji rezonancijom ima prisutnost karbonilnih skupina C=O . Stoga vrijedi da je : $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ značajno kiseliji od $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$. Dvije karbonilne skupine još više pomažu kiselostipa je $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3$ kiselije od CH_3COCH_3 .

5) Hibridizacija

Za bilo koji atom, kiselost raste u slijedu ($\text{sp} > \text{sp}^2 > \text{sp}^3$) višeg stupnja hibridizacije, tj. etin je kiseliji od etena a ovaj je kiseliji od etana (etin > eten > etan). Navedeni slijed može se objasniti gubitkom protona H^+ te elektronski par koji je zaostao u konjugiranoj bazi ima nižu energiju ako se nalazi u orbitali s većim udjelom s-karaktera budući da s-orbitale imaju nižu energiju nego p-orbitale. Budući da je najveći udio s-orbitale u sp-hibridu (50%), a najmanji u sp^3 -hibridu (25%), iz toga proizlazi da je u slučaju sp-hibridizacije ostvarena najveća kiselost. Dakle, što je veći s-karakter vezne orbitale s elektronskim parom, to je atom manje bazičan.

6) Induktivni efekti

Elektronegativne grupe blizu atoma s kojeg se otpušta proton čine jaču kiselinu. Stoga vrijedi da je $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$ kiseliji od $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$. U ovom slučaju H-atom nije direktno vezan za elektronegativni atom stoga velična nema utjecaja, već samo elektronegativnost.

7) Sterički efekti

Spojevi s većim volumenom su manje kiseli od spojeva s manjim volumenom. Budući da se kiselost mjeri u otopini, otapalo se ne može tako dobro organizirati kako bi neutraliziralo veliku konjugiranu bazu kao što može neutralizirati malu konjugiranu bazu.

Jakost oksokiselina ovisi o jakosti H-A veze. Što je veza slabija, kiselina je jača. Dakle, jakost veze ovisi o gustoći elektronskog oblaka oko kisikovog atoma na koji je vezan vodikov atom. Gustoća elektronskog oblaka, a time i jakost H-A veze je manja što je centralni atom molekule elektronegativniji. Uz porast elektronegativnosti središnjeg atoma, vezni elektroni se raspodjeljuju između kisika i središnjeg atoma. Ako je na središnji atom vezano više kisikovih atoma, privlačna sila između njih i protona je podijeljena na sve kisikove atome. Iz tog razloga O-H veza je slabija što je više kisikovih atoma u molekuli na kojima nije vezan vodik^[2]. Tako jakost kiselina pada u nizu: $\text{HClO}_4 > \text{H}_2\text{SO}_4 > \text{H}_3\text{PO}_4 > \text{H}_2\text{CO}_3 > \text{H}_3\text{BO}_3$

2.1.3. Određivanje kiselost kiselina i baza na temelju podatka o pK

Kiseline se po jačini dijele na: jake ($\text{p}K_{\text{a}} < 0$), umjereno jake ($\text{p}K_{\text{a}} = 0-2$), slabe ($\text{p}K_{\text{a}} = 2-7$) i vrlo slabe ($\text{p}K_{\text{a}} > 7$)^[2]. Analogno vrijedi i za baze. Jake kiseline i baze u razrijeđenim vodenim otopinama potpuno su disocirane pa koncentracija H_3O^+ ili OH^- odgovara pripremljenoj koncentraciji kiseline ili baze. To znači da se pH vrijednost može izračunati iz koncentracije kiseline, odnosno, baze. Kod slabih kiselina ili baza u obzir se mora uzeti stupanj disocijacije kiselina ili baza.

O jakostima kiselina i baza govori vrijednost konstante disocijacije koja ovisi o ravnotežnim aktivitetima komponenata.

Za reakciju:



Konstanta disocijacije je:

$$K_a = ([A^-] [H^+]) / [HA] \quad (14)$$

U praksi se koristi logaritamska mjera konstante disocijacije:

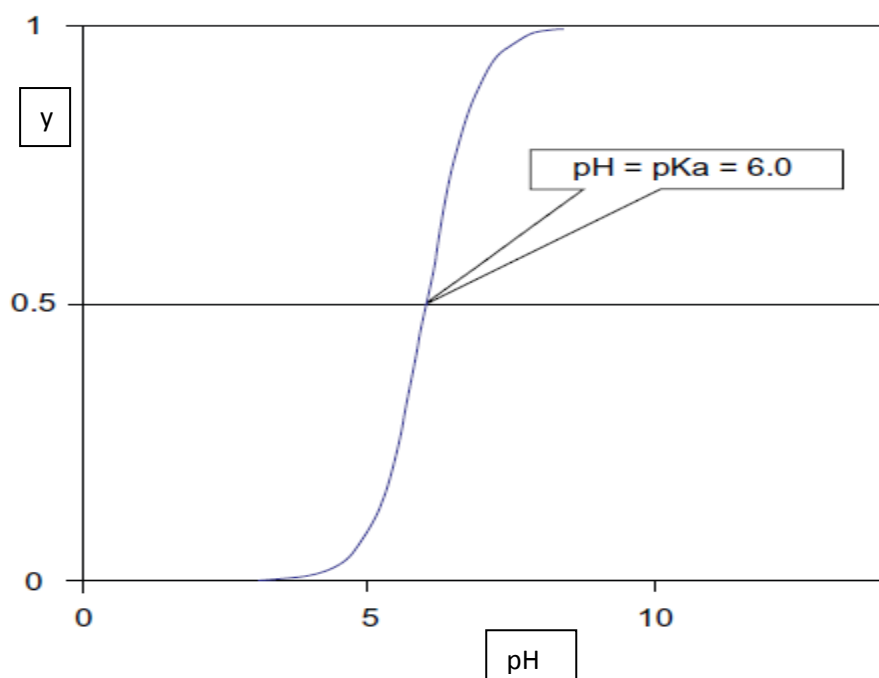
$$pK_a = -\log_{10} K_a \quad (15)$$

Kiselina će biti jača što je ravnoteža navedene reakcije više pomaknuta u desno, u smjeru disociranja, a konstanta kiseline K_a veća, odnosno pK_a manja. Analogno vrijedi i za baze. Uobičajne mineralne kiseline poput HCl imaju pK oko -10, dok je $pK_a(H_2O) = 15$, $pK_a(H_3N) = 35$, te $pK_a(CH_4) \approx 50$.

Davne 1916.godine, suradnjom Hendersona i Hasselbalcha predstavljena je jednadžba koja je povezivala pH i pK s ravnotežnim koncentracijama disociranog i nedisociranog oblika kiseline^[4]. Nazvana je prema svojim autorima Henderson-Hasselbalchovom jednadžbom, a opisuje se izrazom 10.

$$pH = pK_a + \log ([A^-] / [HA]) \quad (16)$$

U mnogim eksperimentima određivanje pK vrijednosti ostvaruje se mjerenjem određene fizikalne veličine (y -os) kao funkcije pH. Rezultat predstavlja karakteristična sigmoidna krivulja (slika 3.) iz koje se pK vrijednost može odrediti pronalaženjem točke infleksije.



Slika 3.: Primjer sigmoidalne krivulje ovisnosti mjerene vrijednosti o pH. Točka infleksije odgovara vrijednosti pK .

Točka infleksije općenito odgovara mjestu gdje je stupanj disocijacije jednak, $\alpha=0,5$, pri čemu je $pH=pK$. Stupanj disocijacije se definira kao:

$$\alpha = [A^-] / ([HA] + [A^-]) \quad (17)$$

3. Metode određivanja pK

Negativan logaritam konstante disocijacije, pK, kao svojstvo tvari jedan je od najviše korištenih parametara u modernoj kemiji. Općenito su, pH i pK nužni za razumijevanje ponašanja kemijskih tvari što je i razlog razvoja velikog broja metoda za njihovo određivanje. U nastavku su prikazane neke od glavnih metoda za određivanje pK vrijednosti.

3.1. Potenciometrija

Jednostavnost i niska cijena potenciometrijske titracije učinila ju je jednom od najviše rabljenih metoda za određivanje pK vrijednosti. Temelji se na postupnom dodavanju poznatog volumena reagensa otopini, a kao funkcija dodanog volumena reagensa, mjeri se potencijal između dvije elektrode, referentne i indikatorske elektrode.

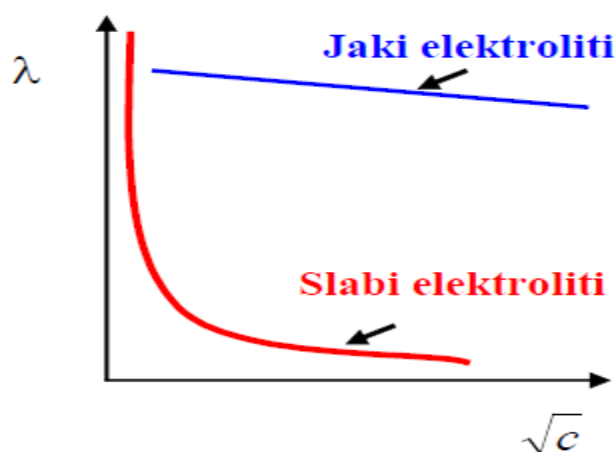
Stavljanjem u ovisnost potencijala i volumena dodatka dobiva se sigmoidalna krivulja čija točka infleksije daje ravnotežni potencijal.

Razvojem elektrokemijskih procesa, u uporabi se javlja staklena elektroda čija je primjena potpuno automatizirana a zbog svoje osjetljivosti na vodikove ione djeluje kao pH elektroda. Staklena elektroda je u širokoj uporabi od sredine 20-tog stoljeća. Otkriveno je njeno odstupanje od teoretskog odziva pri višoj temperaturi i ekstremnijim pH vrijednostima. Temperatura, stoga, ne samo da utječe na mjerenja, nego i na vrijednost pK te je važno da se titracija provodi pri konstantnoj temperaturi^[4]. Precizno određivanje pH iz titracijske krivulje potpomognuto je razvojem raznih kompjuterskih programa koji minimaliziraju većinu mogućih pogrešaka. Nedostatak potenciometrijske titracije je da zahtjeva veliku količinu uzorka za razliku od separacijskih metoda kao što su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) i kapilarna elektroforeza. Unatoč tome, zbog svoje jednostavnosti i relativno niskih troškova s obzirom na ostale metode, potenciometrijska titracija će i dalje biti jedna od osnovnih metoda određivanja pK za one analite kojih ima u dovoljnoj količini.

3.2. Konduktometrija

Konduktometrija je metoda u kojoj se točka ekvivalencije određuje mjerenjem promjena električne vodljivosti. Provodnost nekog elektrolita ovisi o prirodi elektrolita i količini iona koji prenose električnu struju stoga se mijenja s koncentracijom elektrolita. Temelji se na pretpostavci da su jaki elektrolit u potpunosti disocirani neovisno o koncentracijama dok će slabi elektrolit biti u potpunosti disocirani pri beskonačnom razrjeđenju.

Mjereći provodnosti različitih elektrolita, Friedrich Kohlrausch dolazi do zaključka da postoje dva tipa ponašanja vodljivih tvari koje on dijeli na jake i slabe elektrolite^[5] (slika 4.).



Slika 4.:Ovisnost provodnosti i drugog korijena koncentracije za slabi i jaki elektrolit

Iz prikaza ovisnosti provodnosti o drugom korijenu koncentracije, kod jakih elektrolita vrijedi linearan odnos te se granična provodnost može odrediti linearnom ekstrapolacijom na maksimalno razrjeđenje. Iz toga proizlazi I. Kohlrauschov zakon za jake elektrolite:

$$\lambda = \lambda_0 - b\sqrt{c} \quad (18)$$

Kod slabih elektrolita vidljivo je da provodnost s porastom koncentracije naglo pada i u tom slučaju ne može se primjeniti linearna ekstrapolacija za određivanje granične provodnosti jer bi ekstrapolacijom takve krivulje bila ostvarena velika pogreška. Provodnost slabih elektrolita svoju graničnu vrijednost ostvaruje pri znatno većim razrjeđenjima nego što je slučaj za jake elektrolite^[5].

U drugoj polovici 19. stoljeća Svante Arrhenius bavio se slabim elektrolitima te je nesposobnost slabih elektrolita da u potpunosti disociraju opisao stupnjem disocijacije:

$$\alpha = [A^-] / ([HA] + [A^-]) \quad (19)$$

Kohlrausch ustanovljuje da je ukupna provodnost jednaka sumi nezavisnog doprinosa svake ionske vrste prisutne u otopini elektrolita:

$$\lambda = \sum \lambda_i \quad (20)$$

Otkrio je da razlike u vrijednostima granične provodnosti za elektrolite koji sadrže zajednički ion ne ovise o zajedničkom ionu već o prirodi onog drugog^[5]. Dakle, pri beskonačnom razrjeđenju provodnost nekog elektrolita jednaka je zbroju provodnosti pri beskonačnom razrjeđenju iona koji čine taj elektrolit iz čega proizlazi II.Kohlrasuschov zakon:

$$\lambda(0, KA) = \lambda(0, K^+) + \lambda(0, A^-) \quad (21)$$

Taj zakon vrijedi i za jake i za slabe elektrolite te omogućava određivanje granične provodnosti za slabe elektrolite što ekstrapolacijom nije bilo moguće.

Konstanta disocijacije može direktno biti određena iz Ostwaldova zakona koji pokazuje da za njeno određivanje nije potrebna poznata pH vrijednost što je pogodno za netekuće sustave u kojima je određivanje pH nepraktično^[4].

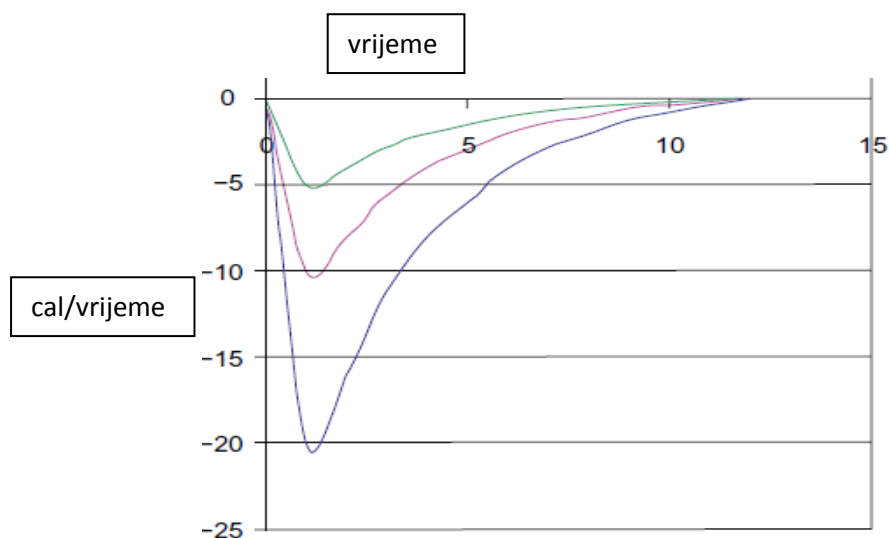
$$K = \lambda^2 \cdot c / (\lambda^0 \cdot (\lambda^0 - \lambda)) \quad (22)$$

Konduktometrijska metoda pruža relativno brzu i pouzdanu metodu za određivanje pK te je odlikuje visok stupanj preciznosti. Negativna strana metode je u tome što su konduktometrijska mjerenja nespecifična.

3.3. Kalorimetrija

Sve kalorimetrijske metode temelje se na mjerenju količine topline oslobođene pri nekom fizikalnom ili kemijskom procesu. Za mjerenje pK vrijednosti koristi se metoda izotermičke titracijske kalorimetrije ili skraćeno ITC kod koje se u kalorimetru provodi kiselo-baza titracija te se mjeri energija potrebna za održavanje konstantne temperature^[4].

Razvijena je i srodna tehnika za direktno mjerenje pH vrijednosti: Izotermalna titracijska kalorimetrija (ITM). Reagens se dodaje u ekvivalentnim količinama, a rezultirajuća toplina reakcije je mjerena u puferskim otopinama različitih pH vrijednosti. Na slici 5. su prikazane krivulje mjerenja pK vrijednosti kalorimetrijom za različite pH vrijednosti. Amplitude minimuma pri različitim pH vrijednostima proporcionalne su stupnju disocijacije.



Slika 5.: Određivanje pK vrijednosti kalorimetrijom. Minimumi dobivenih krivulja pri različitim pH proporcionalni su stupnju disocijacije.

3.4. Nuklearna magnetska rezonancija

Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) je spektroskopska metoda primjenjiva za određivanje molekulskih struktura organskih i anorganskih spojeva. Temelji se na stvaranju magnetskog polja kao posljedice vrtnje električki nabijenih atomskih jezgara. Jezgra podvrgnuta djelovanju magnetskog polja i elektromagnetskog zračenja obrće svoj spin, a apsorbirana energija se detektira NMR-spektrometrom. S obzirom na različite strukture molekula, protoni su u molekuli više ili manje zaklonjeni od utjecaja magnetskog polja zbog čega asporbiraju zračenja različitih jakosti. Stoga, NMR spektrometar mora varirati jakost

magnetskog polja i iscrtavati graf koji pokazuje ovisnost apsorpcije energije o jakosti magnetskog polja^[4].

Pionirski rad u određivanju pK vrijednosti širokog spektra funkcionalnih grupa izveo je Lee te definirao kemijski pomak kao položaj u NMR spektru pri kojem nastupa rezonancija pojedine jezgre ovisno o njenoj okolini. Na temelju njegovih spoznaja, zaključeno je da ukoliko ravnoteža kiselina-baza ovisi o pH, to znači da će i kemijski pomak ovisiti o pH. Vrijednost pK može se odrediti stavljanjem u ovisnost kemijskog pomaka komponente (δ) i pH. Dobiva se poznata sigmoidalna krivulja čija točka infleksije odgovara vrijednosti pK.

Glavna prednost NMR metode je mogućnost rada sa smjesama. Kada se proučava kemijski pomak pojedine funkcionalne grupe nijedna druga funkcionalna grupa nije uključena što omogućuje odvojeno određivanje pK vrijednosti jer se kemijski pomaci ne preklapaju.

3.5. Elektroforeza

Elektroforeza se temelji na razdvajanju nabijenih vrsta pod utjecajem električnog polja te njihovoj brzini migracije koja je proporcionalna veličini naboja^[4]. Omjer linearne brzine v_i i jakosti polja E , definira se kao elektroforetska pokretljivost m_i :

$$m_i = v_i / E \quad (23)$$

Uporaba elektroforeze za određivanje pK vrijednosti ovisi o različitoj pokretljivosti protoniranih i deprotoniranih oblika analita. Pri tome, mjerena pokretljivost ovisi o stupnju disocijacije (α) analita, a efektivna mobilnost opisuje se sljedećim izrazom:

$$m_{ef} = (1 - \alpha) m_o + \alpha m_d \quad (24)$$

pri čemu je: m_{ef} – elektivna pokretljivost, m_d – pokretljivost potpuno disociranih vrsta i m_o – pokretljivost nedisociranih vrsta.

Stavljanjem u ovisnost efektivne pokretljivosti m_{ef} i pH, dobiva se poznata sigmoidalna krivulja s točkom infleksije u kojoj je $\alpha = 0,5$ pri $pH = pK$. Elektroforeza kao metoda za određivanje pK ima brojne prednosti u odnosu na ostale metode. Za mjerenje je potrebna mala količina uzorka, granica detekcije je na razini 10^{-6} M što omogućuje obradu slabo

topljivih tvari bez puno poteškoća te budući da je elektroforeza separacijska tehnika, mogu se određivati pK nekih tvari u kompleksnim mjernim uzorcima a ne samo u čistim spojevima. Mogući problem vezan uz ovu metodu je potreba za pripremanjem puferskih otopina za svaki mjereni pH. Komponente pufera moraju biti odabrane pažljivo kako bi se izbjegla interakcija pufera i analita.

3.6. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

HPLC je vrsta kromatografije u stupcu koja se koristi za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. Postupak se temelji na unošenju malog volumena uzorka u tok pokretne faze i na temelju specifičnih kemijskih i fizikalnih interakcija, dolazi do različitog zadržavanja komponenata smjese^[4].

Jedna od prvih zapažanja kod HPLC-a bila je da se na brzinu eluiranja može utjecati prilagođavanjem pH vrijednosti zbog promjene polarnosti tvari. Razvojem kromatografije obrnutih faza koja koristi nepolarnu stacionarnu fazu i polarnu pokretnu fazu u obzir se uzima faktor kapaciteta (zadržavanja) (k) te stupanj disocijacije (α) pri čemu vrijedi:

$$k = (1 - \alpha) k_0 + \alpha k_{-1} \quad (25)$$

gdje su k_0 i k_{-1} faktori zadržavanja neionizirane i ionizirane tvari, a u HPLC-u obrnutih faza vrijedi da je $k_0 \gg k_{-1}$. Stavljenjem u odnos faktora zadržavanja (k) i pH dobiva se sigmoidalna krivulja s točkom infleksije u kojoj je $\alpha = 0,5$ pri $pH = pK$.

Budući da je HPLC separacijska metoda, uzorci ne moraju biti potpuno čisti. Neželjene komplikacije se stvaraju u slučaju da su vrijednosti k_0 neprihvatljivo velike. Dodatkom organskih modifikatora smanjuje se k_0 i k_{-1} vrijednost, no to uvelike otežava određivanje pK vrijednosti.

3.7. Odjeljivanje (ekstrakcija) i raspodjela

Značajne spoznaje o raspodjeli tvari između dva nemješljiva otapala otkrivene su već 1872. godine kada se dolazi do bitnog otkrića da je omjer koncentracija konstantan i da ne

ovisi o količinama tih otapala^[4]. Daljnja istraživanja pokazuju da za ionizirane komponente koeficijent odjeljivanja (P) ovisi o pH tekuće faze. U graničnim slučajevima gdje je je ionizacija u potpunosti potisnuta pH vrijednošću, koeficijent raspodjele (D) može se matematički definirati za baze:

$$D = [B]_o / [B]_w \quad (26)$$

odnosno, koeficijent odjeljivanja (P):

$$P = [B]_o / ([B]_w + [BH^+]_w) \quad (27)$$

Povezivanjem Henderson-Hasselbalchove jednadžbe te izraza (9) i (10) dobiva se izraz za određivanje pK vrijednosti poznavajući vrijednost pH, koeficijenta odjeljivanja i koeficijenta raspodjele:

$$pK_a = \log ((P - D)/D) + pH \quad (28)$$

3.8. Topljivost

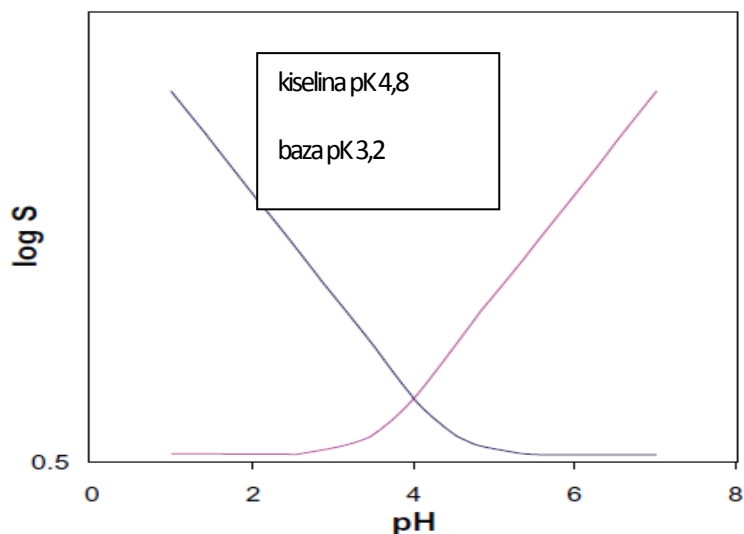
U današnje vrijeme podaci o topljivosti koriste se za određivanje pK vrijednosti posebice lijekova, gdje je pK vrijednost od velikog interesa. Značaj ove metode je u tome da slabo topljiv lijek može biti analiziran pri vrlo niskim koncentracijama, reda veličine μM . Mana metode je što je vrijeme određivanja topljivosti 1-24 sata dok, primjerice, spektroskopska mjerenja traju svega nekoliko minuta.

Derivacija Henderson-Hasselbalchove jednadžbe omogućava određivanje pK vrijednosti iz podataka o topljivosti:

$$\log S = \log S_o + \log (10^{-pK-pH} + 1) \quad (29)$$

gdje S_o odgovara unutrašnjoj topljivosti. U slučaju kada je $pH \gg pK$ ili $pH \ll pK$ pretpostavlja se linearan odnos $\log S$ i pH te u mjestu sjecišta se određuje pH iz čega se može izračunati pK:

$$\log S = (\log S_o - pK_a) + pH \quad (30)$$



Slika 6. Ovisnost pH o topljivosti za kiselinu s $\text{pK}=4,8$ i bazu s $\text{pK}=3,2$

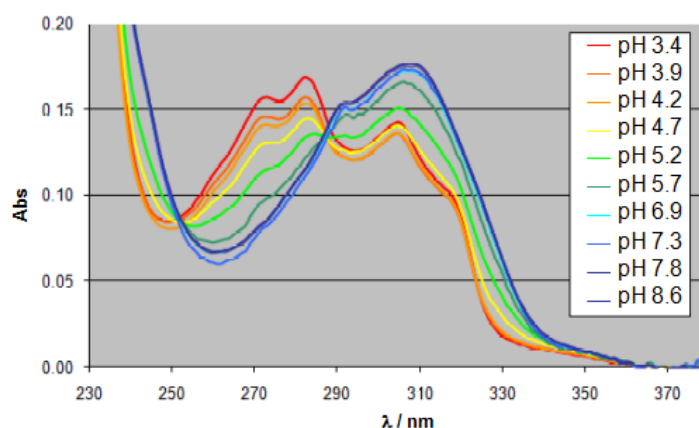
3.9. UV/Vis spektrometrija

Poznato da se bojanekih tvari mijenja s pH vrijednošću, a promjene koje se zbivaju u UV/Vis spektru nakon ionizacije, omogućavaju određivanje pK vrijednosti.

UV/Vis spektrometrija temelji se na Lambert-Beerovom zakonu prema kojem se intenzitet elektromagnetskog zračenja smanjuje prolaskom kroz otopinu koja može apsorbirati zračenje. Apsorbancija koja opisuje količinu apsorbiranog zračenja ovisi o koncentraciji tvari koja apsorbira zračenje (c), svjetlosnom putu kroz uzorak (b) te molarnom apsorpcijskom koeficijentu (ϵ) što se može prikazati Lambert-Beerovim zakonom^[6]:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot b \quad (31)$$

Korištenjem apsorbancijskih odziva u nizu puferских otopina različitih pH vrijednosti uz održavanje koncentracije ionizirajućih tvari konstantnima, moguće je odrediti vrijednost pK . Stavljanjem u odnos apsorbancije i pH, dobiva se sigmoidalna krivulja. Iz točke infleksije te krivulje može se odrediti pK . Ova metoda je problematična budući da i male promjene u koncentraciji mogu izazvati neželjene šumove u odzivima spektra^[4].



Slika 7. Primjer apsorbancijskih odziva na promjenjive vrijednosti pH za antikoagulus *varfarin*

4. Određivanje površinske pK vrijednosti

Površinska pK vrijednost neke tvari nanosene na površini može se razlikovati od pK vrijednosti te tvari u otopini što ima značajne posljedice na selektivnost i osjetljivost površine^[3]. Kao što je već navedeno u prethodnom poglavlju, postoje različite metode za mjerenje pK vrijednosti, a ovaj rad baziran je na određivanju površinske pK vrijednosti samoformirajućeg monosloja (SAM) elektrokemijskom metodom za koju je uporabljen ionski par ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$), te puferi različitih pH vrijednosti.

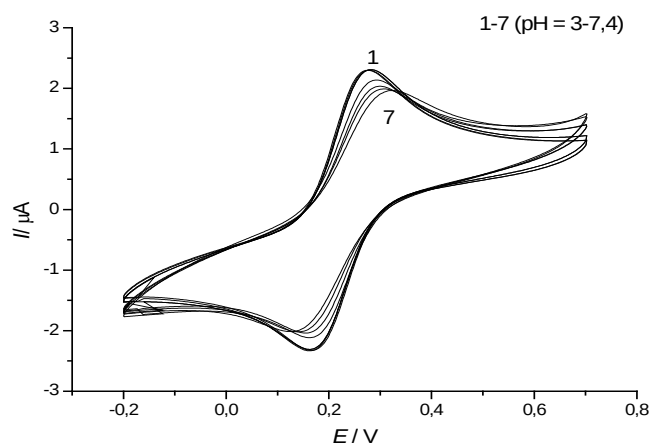
4.1. Određivanje površinske pK vrijednosti

Površinska pK vrijednost u ovom radu određivna je za tri samoformirajuća monosloja na Au elektrodi: DMSA, N-acetil cistein i cistein, a u ovom poglavlju objašnjenje će se bazirati na samoformirajućem monosloju DMSA. Dobivanjem niza cikličkih voltamograma $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ redoks para u puferkim otopinama različitih pH vrijednosti, mjeri se vršna struja (I_p) kao funkcija pH što omogućuje određivanje površinske pK vrijednosti. Ponašanje samoformirajućeg monosloja temelji se na teoriji kiselina i baza jer upravo zbog mogućnosti protoniranja i deprotoniranja površine, javljaju se razlike u cikličkom

voltamogramu. Za površine samoformirajućih monoslojeva s ionizirajućim završnim grupama, površinska pK je važno svojstvo jer određuje naboj površine kada je u ravnoteži s otopinom pri određenoj pH vrijednosti.

4.2. Određivanje površinske pK vrijednosti primjenom cikličke voltametrije

DMSA na Au elektrodi tvori samoformirajući monosloj. Dvije terminalne karboksilne skupine koje sadrži molekula DMSA pokazuju ovisnost o pH vrijednosti. Pri niskim pH vrijednostima karboksilna skupina je potpuno protonirana stoga nema elektrostatskih odbijanja između negativnog redoks para i samoformirajućeg monosloja što se očituje u visokoj vršnoj struji elektrode. Kako pH vrijednost raste, karboksilne skupine se počinju deprotonirati što utječe na povećanje elektrostatskog odbijanja zbog negativiranja površine, a rezultira u smanjenju strujnog odziva (slika 8.).



Slika 8. Ciklički voltamogrami za elektrodu sa samoformirajućim monoslojem DMSA pri različitim pH vrijednostima

Metoda za određivanje površinske pK vodi se sljedećim argumentom: ukoliko se pretpostavi da je ukupna struja kroz elektrodu sastavljena od dva neovisna dijela, jedan kroz disociran SAM $[A^-]$, a drugi kroz nedisociran SAM $[HA]$ struja se može opisati kao:

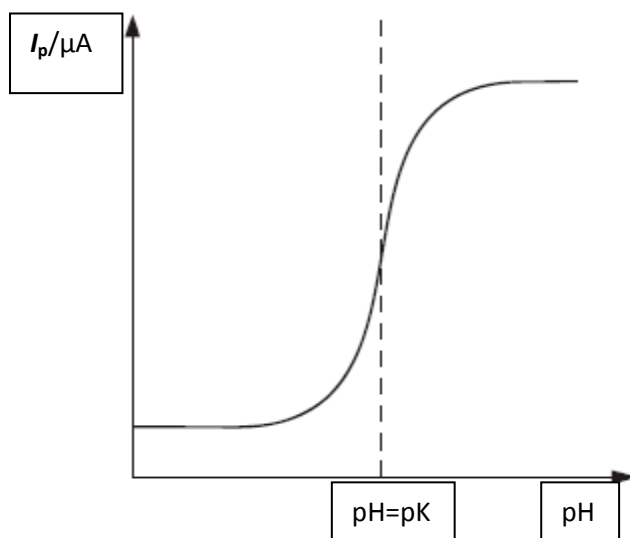
$$I = I_{A^-} [A^-] + I_{HA} [HA] \quad (32)$$

gdje [HA] odgovara pokrivenosti, odnosno dijelu protoniranih površinskih grupa^[3].

Određivanjem i_{A^-} i i_{HA} kao prosječne struje pri visokom (>6) i niskom (<4) pH, pK se može odrediti modifikacijom Henderson – Hasselbalchove jednačbe:

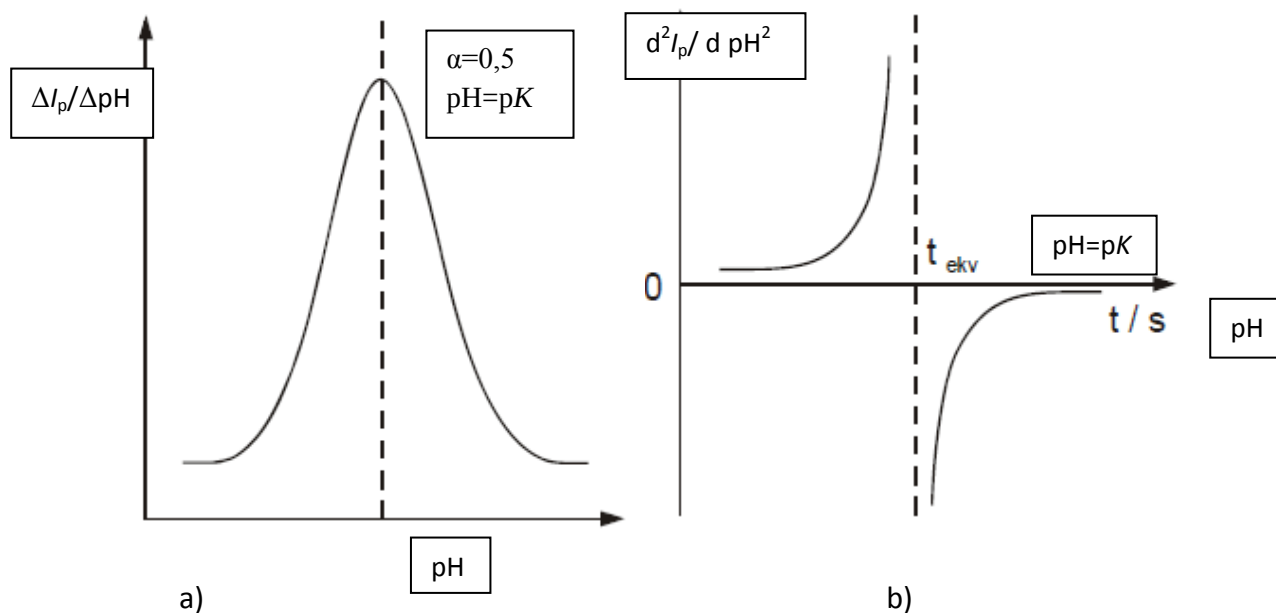
$$pK = pH - \log [(I_{HA} - I_{A^-}) / (I - I_{A^-}) - 1] \quad (33)$$

Ciklička voltametrija se provodi primjenom modificirane zlatne elektrode u otopini pufera pH vrijednosti bliske vrijednosti pK tvari kojom je elektroda modificirana. Razlika u vršnoj struji s promjenom pH vrijednosti može se koristiti za određivanje pK vrijednosti. Naime, izmjena naboja je otežana u uvjetima kada je površina negativno nabijena te što se više površina negativira, to je suprotstavljanje prijenosu naboja (željezovog heksacianoferata) sve veće. Stavljanjem u odnos dobivenih vršnih struja i pH vrijednosti, dobiva se sigmoidalna krivulja u kojoj točka infleksije odgovara polovičnom stupnju disocijacije $\alpha=0,5$ pri kojem vrijedi daje $pH=pK$.



Slika 9. Sigmoidalna krivulja odnosa vršne struje I_p i pH

Nakon što je utvrđen trend rasta ili pada vršne struje kao funkcije pH vrijednosti, pK se izračunava iz prve derivacije vršne struje oksidacijskog vala očitane iz cikličkih voltamograma prema ΔpH .



Slika 10. a)prva i b)druga derivacija vršne struje oksidacijskog vala cikličkog voltamograma kao funkcije pH

5. Samoformirajući monoslojevi (SAM)

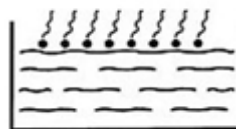
5.1. Uvod

Mogućnost modifikacije i kontrole svojstava površine kako bi se dobila razna poželjna površinska svojstva zaokupljala je rad mnogih znanstvenika. Organski spojevi s mogućnošću sinteze željene strukture i funkcionalnošću gotovo bez ograničenja, predstavljaju idealan sustav za modificiranje fizikalno-kemijskih svojstava površine. Mogućnost kontrolirane i reverzibilne aktivacije i pasivacije površina ključna je komponenta u području katalize i u razvoju senzora, detektora i komponenti elektroničkih sklopova.

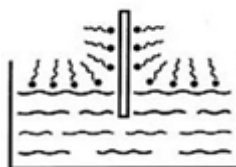
Prva saznanja o monoslojevima javljaju se krajem 19. stoljeća kada su izrađene prve aparature za proučavanje slojeva na granici površina zrak-voda. Golemi interes za razvoj spoznao o monoslojevima javlja se nakon što Langmuir i Blodgett utvrdili mogućnosti formiranja slojeva na površini supstrata. Langmuirov rad temeljio se na proučavanju stvaranja tankih slojeva na granici faza tekuće/plinovito (slika 11.(a)) dok je Blodgett film prenjela na krutu podlogu (slika 11.(b)). Temelj Langmuir- Blodgettove metode je da se u vodenom mediju rasprši netopljiva komponenta koja se želi nanijeti na površinu supstrata, a zatim slijedi kompresija tankog filma mehanički barijerama sve dok molekule u sloju nisu gusto pakirane i orijentirane s obzirom na hidrofobni i hidrofilni dio sloja. Konačno, monosloj se prenosi na čvrstu podlogu. Također, mogu nastati multislojevi ako se primjeni uzastopno močenje supstrata^[1]. Langmuir- Blodgettovi slojevi imaju nedostatak jer nisu termički stabilni niti kemijski vezani za supstrat zbog čega imaju tendenciju mijenjanja.

Samoformirajući monoslojevi (engl. self- assembled monolayer, SAM) predstavljaju drugačiju metodu dobivanja monosloja te su pokazali superiornost u odnosu na Langmuir-Blodgettovu tehniku.

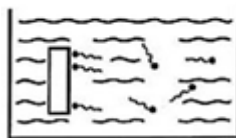
(a) Langmuirovi filmovi



(b) Langmuir-Blodgett filmovi



(c) Samoformirajući
monosloj (SAM)



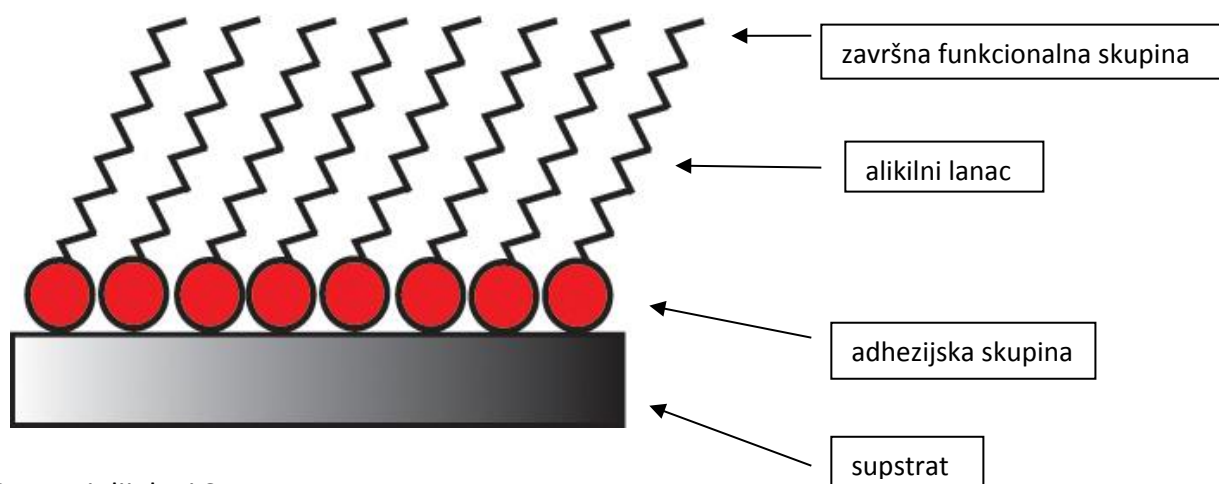
Slika 11. Prikaz Langmuirovih (a), Langmuir-Blodgettovih (b) i samoformirajućih monoslojeva (SAM) (c)

5.2 Samoformirajući monoslojevi (SAM)

5.2.1 Definicija i priprema

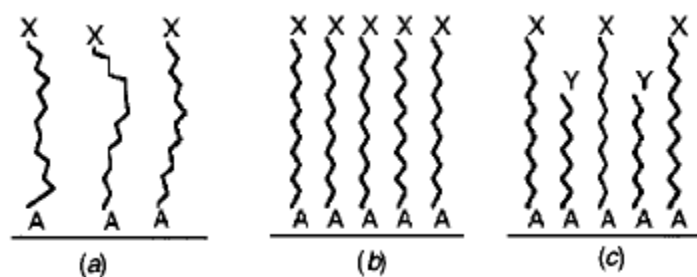
Samoformirajući monoslojevi (SAM) su stabilni, dobro uređeni i gusto pakirani monoslojevi koji nastaju spontanom adsorpcijom organskih molekula iz razrijeđene otopine na čvrsti supstrat i njihovom spontanom organizacijom (slika 11). Strukturu SAM-a čine tri strukturne podjedinice (slika 12):

- adhezijske skupine sa specifičnim afinitetom prema supstratu
- alkilni lanac koji određuje debljinu sloja i služi kao fizička barijera te mijenja vodljivost i optička svojstva površine
- završna funkcionalna skupina koja je odgovorna za kemijska svojstva sloja (reaktivnost, hidrofilnost/hidrofobnost, naboj itd.)



Slika 12. Osnovni dijelovi SAM-a

Osnovna pokretačka sila za formiranje ovih filmova je specifična interakcija između adhezijske “glave” površinski aktivnih tvari i površine supstrata. Te interakcije su jake što uzrokuje stabilnost samoformirajućih monoslojeva. Ovisno o strukturi površinski aktivnih tvari, filmovi mogu imati manji (kao tekućine) i veći (kao kristali) stupanj uređenosti (slika 13)^[7]. Uređenost ovisi o mnogim faktorima kao što su geometrijske karakteristike, elektrostatske i dipol-dipol interakcije u monoslojevima, afinitet “glave” površinski aktivne tvari prema površini itd.

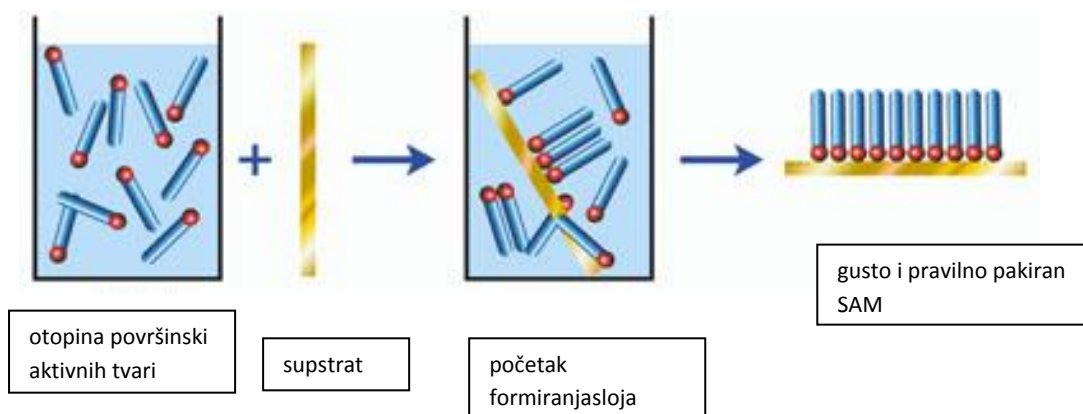


Slika 13.: Neuređeni (a), dobro pakirani (b) i miješani (c) SAM

Nastajanje samoformirajućih monoslojeva odvija se u dva koraka (slika 14.):

1. korak: Spontana adsorpcija organskih molekula iz razrijeđene otopine na čvrsti supstrat koja se odvija u nekoliko minuta.

2. korak: Stajanjem u otopini započinje spontana reorganizacija adsorbiranih molekula u gusto i pravilno uređen monosloj koja traje od nekoliko sati do nekoliko dana.



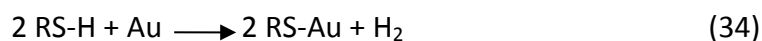
Slika 14. Nastajanje SAM-a

5.2.2 Samoformirajući monoslojevi tiola na zlatnoj površini

Samoformirajući monoslojevi tiola na zlatnoj površini pripadaju u skupinu najviše proučavanih SAM-ova. Pri sobnoj temperaturi i normalnim laboratorijskim uvjetima su stabilni i za formiranje monosloja ne zahtijevaju posebne uvjete. Tioli su kompatibilni s većinom organskih funkcionalnih skupina što omogućava veliku raznolikost završnih funkcionalnih skupina koji određuju “kemiju” u zlato-tiolnim monoslojevima. Priprema samoformirajućih monoslojeva tiola na zlatu je popularna iz nekoliko razloga:

- priprema SAM-ova je jednostavna, pouzdana i reproducibilna
- jednostavno se kontroliraju faktori koji utječu na gustoću površinskog sloja (funkcionalne skupine)
- osiguravaju mogućnost proizvodnje raznovidnih vrsta biosenzora

SAM-ovi alkilnih tiola na zlatu su formirani adsorpcijom lanca alkantiola (R-SH) iz otopine na zlatnu površinu. Zlato i sumpor stvaraju jaku vezu uz entalpiju formiranja od 167,5 kJ/mol, a veza S-H puca jer postoji veliki afinitet prema stvaranju veze između zlata i sumpora^[8]. Na zlatnoj površini odvija se sljedeća kemijska reakcija:



Veza između Au i S atoma je jaka na što ukazuje i visoka energija veze od 184 kJ/mol, stoga isključuje sve ostale adsorbate i tvori stabilan monosloj.

5.2.3 Reaktivnost monoslojeva

Najznačajnije reakcije koje se vežu uz reaktivnost SAM-ova odnose se na monoslojeve koji sadrže -NH_2 , -COOH i -OH kao terminalne funkcionalne skupine. Kao aktivacijski agens kod karboksilnih skupina se obično koristi dicikloheksil-karbodiimid (DDC) ili 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC). Amino skupine se aktiviraju acilirajućim agensima a hidroksilne skupine kiselim kloridima ili anhidridima.

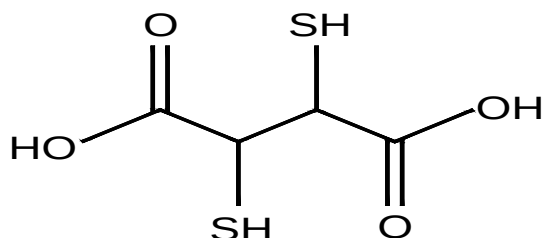
Na reaktivnost funkcionalnih skupina u monosloju može utjecati nekoliko faktora^[9]:

- utjecaj otapala- deprotonacija funkcionalnih skupina monosloja nabija površinu te su ionizirane površine više hidrofilne nego njihovi neutralni oblici
- sterički utjecaji- u monoslojevima su zapažene znatne brzine odvijanja reakcija što se obično pripisuje suprotstavljanju reaktivnih funkcionalnih grupa u uređenom sustavu ili zbog povoljne orijentacije reaktivnih grupa
- “utjecaj susjeda“- funkcionalne grupe svojim elektronskim parom mogu utjecati na reakcijski mehanizam susjednog reakcijskog centra monosloja

U ovom radu, zlatna površina će se modificirati slojem dimerkaptojantarne kiseline (DMSA) koja sadrži dvije karboksilne skupine, slojem N-acetil cisteina koji sadrži karboksilnu i acetilnu skupinu te slojem cisteina koji sadrži amino i karboksilnu skupinu. Iako vezanjem tih SAM-ova nastaju stabilni i dobro uređeni monoslojevi, oni ipak ne pokrivaju u potpunosti površinu elektrode. Na mjestima nepokrivenosti odvijaju se elektrodne reakcije koje se istražuju elektrokemijskim tehnikama.

5.3. Mezo-2,3-dimerkaptojantarna kiselina (DMSA)

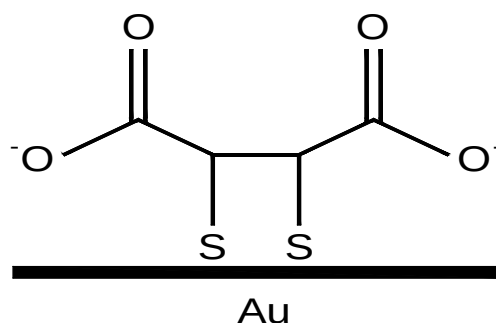
Mezo 2,3-dimerkaptojantarna kiselina (DMSA) je kratkolančani alkandiol molekulske formule $C_4H_6O_4S_2$. U svojoj strukturi sadrži dvije karboksilne i dvije tiolne skupine (slika 15.).



Slika 15. Struktura DMSA

Spoj je sintetiziran zbog potrebe pronalaženja lijeka koji će spriječiti trovanje radnika koji je konzumirao veliku količinu žive u jednom električnom poduzeću. Uspješnost njegovog djelovanja potaknula je daljnja istraživanja te je ustanovljeno da efektivno djeluje protiv trovanja antimonom, a pokazao se i uspješnim na zaštiti životinja od trovanja arsenom i živom jer s metalima pravi komplekse čime ih uspješno uklanja iz organizma. Danas se često koristi kao sredstvo protiv trovanja teškim toksičnim metalima kao što su živa, kadmij, olovo, arsen i molibden. Njegova velika vrijednost je u tome što do danas nije pronađen niti jedan drugi spoj toliko efikasan i siguran za tu uporabu zbog čega je dostupan kao lijek i dodatak prehrani.

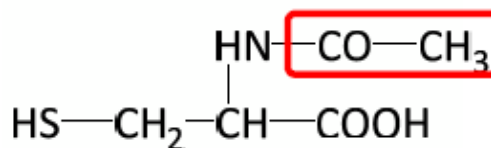
Priprema se reakcijom maleinske ili fumarne kiseline s natrijevim tiosulfatom nakon čega slijedi hidroliza. U ovom radu DMSA je korištena za modificiranje zlatne površine te je ustanovljeno da se na zlato veže s obje tiolne skupine, a dvije karboksilne skupine imaju mogućnost formiranja metalnog kompleksa (slika 16.)^[10]. Promjenom pH otopine u kojem je uronjena Au elektroda s DMSA slojem utječe se na stupanj protoniranosti, odnosno deprotoniranosti tih karboksilnih skupina što ima važnu ulogu na način odvijanja elektrokemijskih reakcija ($pK_1 = 2,71$, $pK_2 = 3,48$, $pK_3 = 8,89$, $pK_4 = 10,79$).



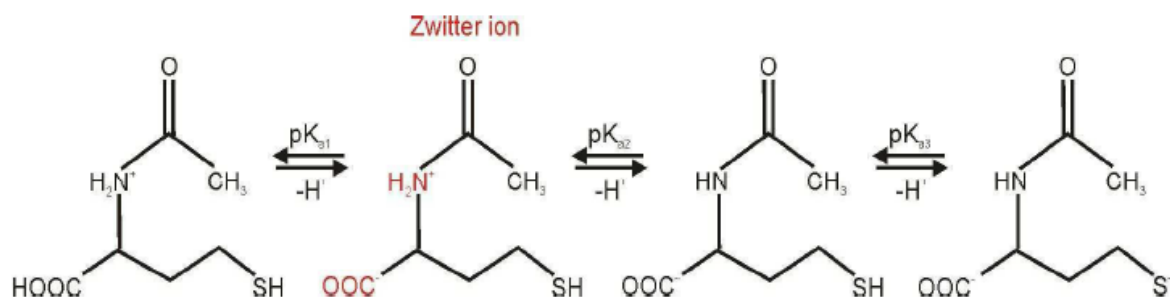
Slika 16. DMSA na površini Au

5.4. N-acetilcistein (NAC)

N-acetilcistein (acetilcistein ili N-acetil-L-cistein) je derivat aminokiseline cisteina. Posjeduje snažna antioksidativna svojstva stoga je osobito važan u detoksikaciji organizma i zaštiti jetre. Prekursor je glutationa, jednog od najjačih antioksidansa koji uklanja razorno djelovanje slobodnih radikala u organizmu. Ima značajnu ulogu u stvaranju bijelih krvnih stanica (leukocita) kojima je uloga jačanje imunološkog sustava organizma stoga je čest u uporabi kod sportaša u slučajevima kada je potrebno ojačati imunitet uslijed fizičkog napora i stresa. Posebno blagotvorno djeluje na dišni sustav jer eliminira sluz iz respiratornih organa zbog sposobnosti razlaganja disulfidnih veza u sluzi čime ju prevodi u tekući oblik i olakšava iskašljavanje. Radi tog svojstva poželjan je kod pacijenata oboljelih od upale pluća, bronhitisa, tuberkuloze, emfizema i sličnih dišnih oboljenja. Primjenjiv je i na području psihijatrije jer je dokazano da umanjuje simptome shizofrenije i bipolarnog poremećaja te posreduje stvaranju dopamina u mozgu koji je zadužen za reguliranje raspoloženja i nivoa energije, a njegov manjak uzrokuje depresiju.



Prisutne skupine -COOH , NH_2 i -SH u njegovoj strukturi pokazuju mogućnost disociranja. Ovisno o različitim pH područjima, NAC može biti ioniziran u četiri različita stanja, s pripadajućim pK vrijednostima:

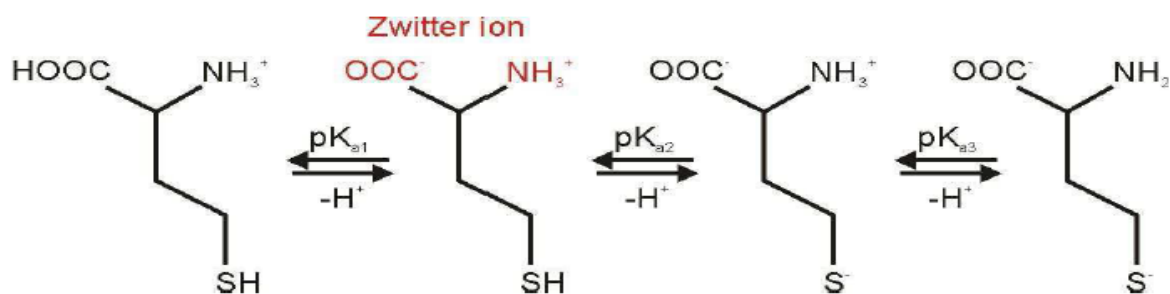


Slika 17. Ionizacija funkcionalnih skupina u molekuli NAC u ovisnosti o pH, uz $pK_1=3,1$; $pK_2=9,6$; $pK_3=11,9$

5.5. Cistein (Cys)

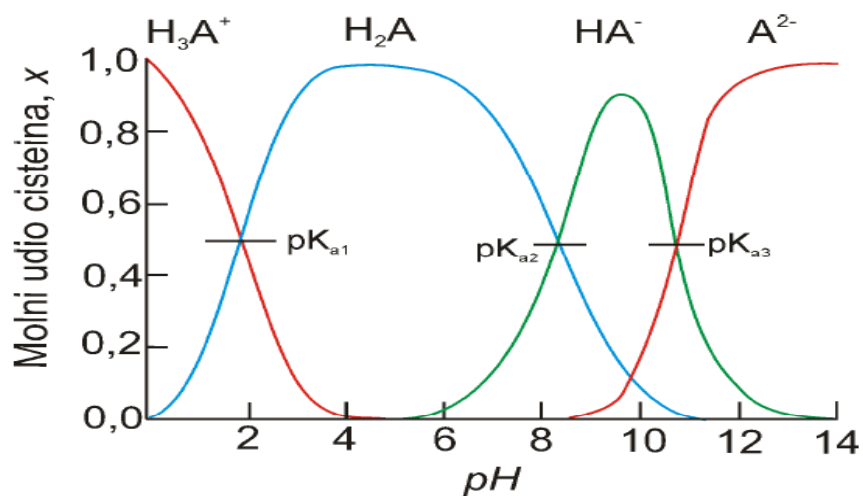
Cistein je neesencijalna aminokiselina koju ljudski organizam ne može sintetizirati. Karakterističan je sastojak keratina, proteina koji izgrađuje nokte, kosu, perje. Sadrži tiolnu skupinu uz što je vezano njegovo najvažnije svojstvo, a to je stvaranje disulfidne veze. Disulfidna veza ima važnu ulogu u stabilizaciji proteina zbog stvaranja čvrstih veza među lancima. Bočni tiolni lanac (-SH) cisteina je nepolaran stoga se cistein ponaša kao hidrofobna aminokiselina. Podliježe oksidaciji pri čemu nastaje cistin koji kada se metabolizira, pomaže detoksifikaciji organizma. Ima važnu ulogu u metabolizmu energije i sintezi masnih kiselina, a koristi se i kao preventiva za negativne efekte pretjerane konzumacije alkohola, oštećenja jetre, mozga i kod pušača. Moćan je razarač slobodnih radikala u organizmu, a u posljednje vrijeme otkriveno je i njegovo povoljno djelovanje na zaštitu od zračenja i negativnih posljedica liječenja kemoterapijom. U organizam se unosi putem visokoproteinske hrane kao što su meso, brokula, kelj, pšenica, češnjak i crvena paprika.

U različitim područjima pH njegova amino, karboksilna i tiolna skupina pokazuju svojstvo disociranja:



Slika 18.: Ionizacija funkcionalnih skupina u molekuli Cys u ovisnosti o pH, uz $pK_1=1,9$; $pK_2=8,4$; $pK_3=10,7$

Aktivnost njegovih ionizirajućih funkcionalnih skupina određuje se pomoću pK vrijednosti, a iz dijagrama raspodjele može se odrediti koncentracija pojedinih ionskih vrsta kao funkcije pH:

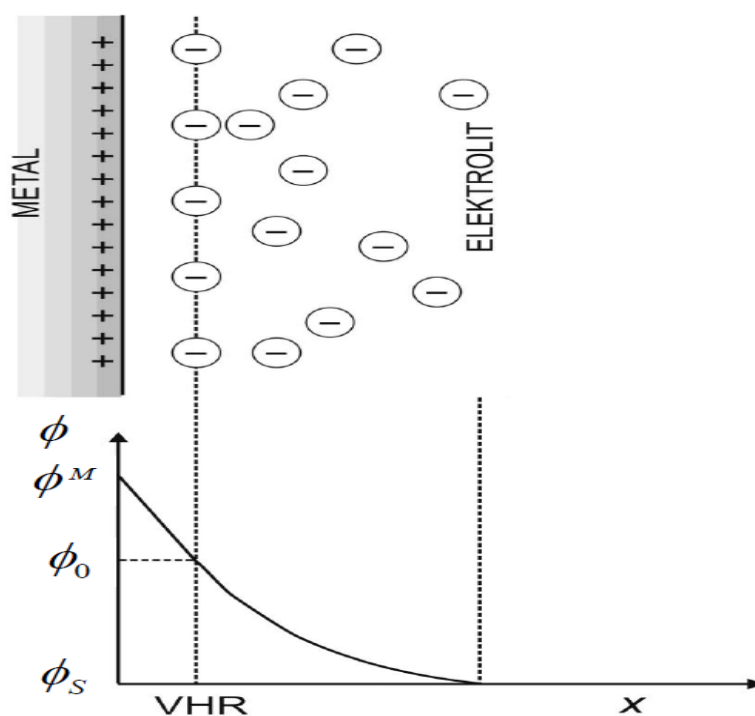


Slika 19. Dijagram raspodjele ionskih vrsta cisteina kao funkcija pH

6. Ciklička voltametrija

6.1. Elektrokemijski dvosloj

Kada se elektroda uroni u otopinu, uz površinu elektrode formira se struktura koja se naziva električni dvosloj. Naboj na elektrodnoj površini kompenzira se ionima suprotnog naboja u masi otopine, a količina naboja je funkcija elektrodnog potencijala. Elektrokemijski dvosloj se može podijeliti u nekoliko dijelova (slika 20.). Neposredno uz površinu čvrste faze (elektroda na kojoj se odvija reakcija) nalazi se tzv. Helmholtzov ili Sternov sloj u kojem su ioni priljubljeni uz površinu elektrode kombinacijom specifičnih adsorpcijskih sila i elektrostatičkih privlačnih sila. Debljina tog sloja odgovara radijusu adsorbiranih iona a sloj obuhvaća unutrašnju Helmholtzovu ravninu (UHR) i vanjsku Helmholtzovu ravninu (VHR). Vidljivo je da se u tom sloju potencijal mijenja linearno od elektrode do vanjske Helmholtzove ravnine. Nadovezuje se Gouy-Chapmanov sloj u kojem je naboj difuzno raspoređen u masi otopine te povećanjem udaljenosti od vanjske Helmholtzove ravnine eksponencijalno pada prema vrijednosti potencijala u masi otopine.^[11]



Slika 20. Prikaz elektrokemijskog dvosloja na granici faza elektroda/elektrolit

Odziv u cikličkoj voltametriji ovisit će o različitim zbivanjima kojima se ostvaruje elektrodna reakcija kao što je transport reaktanta koji sudjeluju u reakciji iz otopine do elektrode, izmjeni naboja na granici faza elektroda/elektrolit, adsorpciji, stvaranju nove faze na površini elektrode te transportu produkta reakcije od elektrode^[12].

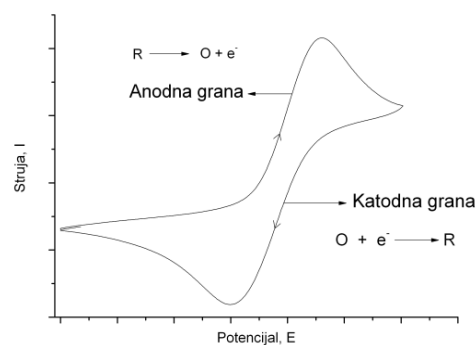
6.2. Ciklička voltametrija

Ciklička voltametrija je elektrokemijska eksperimentalna tehnika koja daje informaciju o kinetici i mehanizmu elektrodne reakcije. Signal pobude predstavlja linearno promjenjivi potencijal (slika 21.(a)), a signal odziva je struja koja se mjeri kao funkcija narinutog potencijala (slika 21.(b)). Krivulja ovisnosti struje o potencijalu sastoji se od anodne i katodne grane te ukazuje u kojim području potencijala se odvija reakcija oksidacije, odnosno redukcije. Ciklička voltametrija daje kvalitativnu informaciju o elektrokemijskom procesu jer svaka elektroaktivna tvar ima strujni vrh na točno određenom potencijalu, a razlika potencijala anodnog i katodnog strujnog vrha ukazuje na to koliko elektrona sudjeluje u reakciji.

(a)

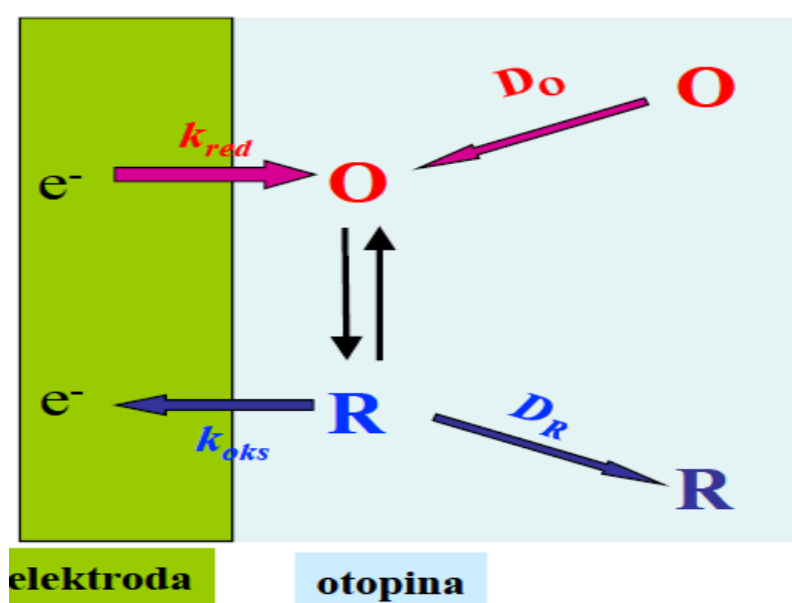


(b)



Slika 21.: Signal (a) pobude i (b) odziva u cikličkoj voltametriji

Kinetika elektrokemijske reakcije ovisi o brzini najsporijeg stupnja u ukupnoj reakciji. Ukoliko je izmjena naboja na granici faza spori stupanj, govori se o reakciji pod aktivacijskom kontrolom, a ukoliko je prijenos mase do elektrode spori stupanj, reakcija je pod difuzijskom kontrolom^[12]. Dakle, brzine pojedinih stupnjeva određuju difuzijski koeficijenti reaktanata i produkata (D_O , D_R) te konstante brzine prijelaza naboja (k_{red} i k_{oks}) što je prikazano na slici 22. To znači da prilagodbom odgovarajućih reakcijskih uvjeta se može utjecati na tijek elektrokemijske reakcije.



Slika 22. Mehanizam elektrodne reakcije

Kinetika elektrokemijske reakcije opisuje se Butler-Volmerovom jednadžbom u kojoj prvi član predstavlja anodnu, a drugi član katodnu komponentu struje:

$$j = j_0 \left(e^{\frac{(1-\alpha)nF(E-E_r)}{RT}} - e^{-\frac{\alpha nF(E-E_r)}{RT}} \right) \quad (35)$$

pri čemu je:

E - narinuti potencijal, V

E_r - ravnotežni potencijal, V

α - koeficijent prijelaza naboja

n -broj izmijenjenih elektrona

j_o - struja izmjene u ravnotežnom stanju, A cm⁻²

T -apsolutna temperatura, K

F - Faradayeva konstanta, C mol⁻¹

S obzirom na različitu kinetiku pojedinih stupnjeva elektrokemijske reakcije, razlikuju se tri vrste procesa koji se odvijaju na elektrodi:

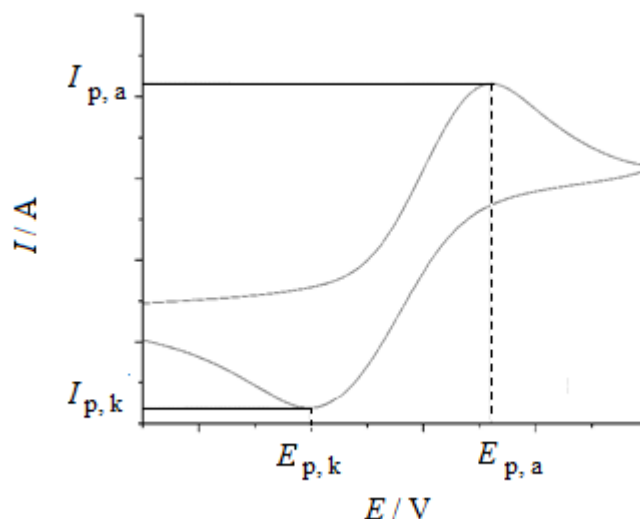
➤ **reverzibilan proces**



Prijelaz elektrona je jako brz, a koncentracije oksidansa i reducensa na površini elektrode su ravnotežne i pokoravaju se Nernstovoj relaciji:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[O]_{x=0}}{[R]_{x=0}} \quad (37)$$

Javlja se difuzijska struja koja nastaje zbog difuzije reaktanata iz mase otopine do površine elektrode što je sporiji stupanj reakcije pa je proces pod difuzijskom kontrolom. Tipičan voltamogram za reverzibilan proces prikazan je na slici 23.:



Slika 23. Ciklički voltamogram za reverzibilni proces

Kako bi se ostvarila mjerljiva struja, za reakciju oksidacije potrebno je pozitivirati početni negativni potencijal elektrode. Princip po kojem nastaje anodni strujni vrh je da pozitiviranjem potencijala struja raste te raste i koncentracijski gradijent tvari uz elektrodu i u otopini. Kada koncentracija reaktanta uz površinu elektrode padne na nulu, dakle reaktant se potroši, postignemo maksimalnu vrijednost struje i javlja se strujni vrh kao posljedica maksimalnog koncentracijskog gradijenta. Nakon toga struja pada po Cotellovoj relaciji jer više ne dolazi do reakcije te slijedi približavanje ravnotežnom potencijalu i negativiranje potencijala što dovodi do redukcije koja također u jednom trenutku ostvaruje svoj strujni maksimum nakon čega pada na vrijednost osnovne struje čime se zatvara ciklički voltamogram.

Strujni vrh vala moguće je matematički opisati Randles-Ševčikovom jednadžbom:

$$I_p = 0,4463 \cdot z \cdot F \cdot c \cdot A \cdot \left(\frac{z \cdot F \cdot D \cdot v}{R \cdot T} \right)^{1/2} \quad (38)$$

gdje je:

I_p - strujni vrh, A

D - difuzijski koeficijent oksidirane vrste redoks sustava, $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$

c - koncentracija elektroaktivne vrste, mol cm^{-3}

v - brzina promjene potencijala, V s^{-1}

z - broj elektrona

T -termodinamička temperatura, K

R - opća plinska konstanta $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$

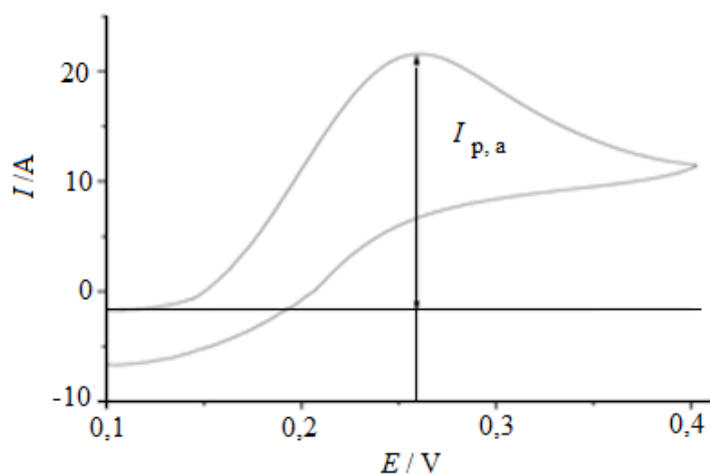
F - Faradayeva konstanta, C mol^{-1}

Ciklički voltamogram je za reverzibilan proces karakteriziran sljedećim eksperimentalnim parametrima:

- za razliku od strujnih vrhova, potencijali vrhova vala ($E_{p,k}$ i $E_{p,a}$) ne ovise o brzini promjene potencijala
- $\Delta E_p = 59/n \text{ mV}$
- $I_{p,a} / I_{p,k} = 1$
- $E^0 = (E_{p,a} + E_{p,k})/2$

ireverzibilan proces

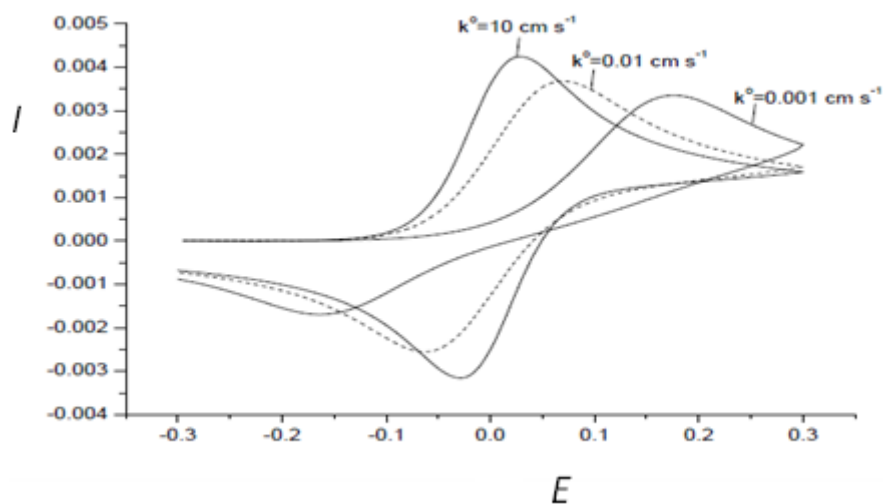
Ireverzibilnu redoks reakciju $R \longrightarrow O + ne^-$ karakterizira ciklički voltamogram s jednim valom jer se ne odvija povratna reakcija (slika 24.). Smanjenjem brzine izmjene naboja, taj stupanj budući da je sporiji postaje sve dominantniji u kontroli kinetike odvijanja elektrokemijske reakcije stoga je proces sve više pod kontrolom izmjene naboja. Budući da u elektrodnoj reakciji sudjeluje samo reducirani oblik redoks sustava, odvija se samo oksidacija jer kod potencijala kod kojeg započinje proces oksidacije nema povratne reakcije redukcije nastalog produkta. Povećanjem brzine promjene potencijala, potencijal vrha pomiče se prema pozitivnijim vrijednostima.



Slika 24. Ciklički voltamogram ireverzibilnog procesa

➤ kvazireverzibilan proces

Kvazireverzibilan proces je pod mješovitom kontrolom što znači da kod malih brzina promjene potencijala proces se ponaša reverzibilno dok povećanjem brzine proces se ponaša ireverzibilno što je vidljivo i u sve većoj udaljenosti među strujnim vrhovima jer koncentracije reaktanta i produkta na površini elektrode ne slijede Nernstovu jednadžbu što za posljedicu ima pomak katodnog strujnog vrha u katodnom smjeru, a anodnog strujnog vrha u anodnom smjeru. Ukoliko reakcija ide sporo, više reaktanta dolazi do elektrode. Dakle, što više reaktanta dolazi do elektrode to znači da je proces pod aktivacijskom kontrolom te se ostvaruje manji strujni vrh jer je izmijenjeno manje naboja. Povećanjem otpora prijelazu naboja reakcija ulazi u područje kvazireverzibilnosti i vrijeme potrebno da se kod određene brzine promjene potencijala dođe do vrha je veće. Navedeno je i prikazano na slici 25.



Slika 25. Ciklički voltamogram za kvazireverzibilnu reakciju kod različitih konstanti brzine prijelaza naboja, k^0

Matsuba i Ayabe^[13] s obzirom na vrijednost standardne konstante brzine prijenosa naboja, k^0 (cm s^{-1}) i brzine promjene potencijala, v (V s^{-1}) postavili su uvjet reverzibilnosti:

- reverzibilan proces $k^0 > 0,30 v^{1/2}$
- ireverzibilan proces $k^0 < 2 \cdot 10^5 v^{1/2}$
- kvazireverzibilan proces $0,30 v^{1/2} \geq k^0 \geq 2 \cdot 10^5 v^{1/2}$

7. Eksperimentalni dio

7.1. Kemikalije

Perklorna kislina (HClO_4)- Kemika, Hrvatska

Kalijev klorid (KCl) – Kemika, Hrvatska

Natrijev hidroksid (NaOH)- Kemika, Hrvatska

Kalij(II)heksacianoferat ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)- Kemika, Hrvatska

Kalij(III)heksacianoferat ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)- Kemika, Hrvatska

Borna kislina (H_3BO_3)- Kemika, Hrvatska

Ledena octena kislina (CH_3COOH)- Alkaloid, AD-Skopje

Fosforna kislina (H_3PO_4 , w= 85 %)- T.T.T. d.o.o. Sveta Nedjelja

Mezo-2-merkapotojantarna kislina (DMSA)- Sigma-Aldrich

N-acetil-cistein (NAC)- Sigma-Aldrich, USA

Cistein (Cys)- Merck, Njemačka

Sve korištene kemikalije su analitičke čistoće te se nisu dodatno pročišćavale. Otopine su pripremane otapanjem krutina ili razrjeđivanjem koncentriranih otopina u deioniziranoj vodi pripremljenoj na Milipore-Miliq uređaju.

7.2. Instrumentacija

Sva elektrokemijska mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi u rasponu od 20 do 25 °C u klasičnoj troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji. Korištena je radna elektroda od zlata, protuelektroda od platine te referentna $\text{Ag}|\text{AgCl}|3 \text{ M KCl}$ elektroda. Prije provođenja mjerenja, otopine su deaerirane provođenjem dušika.

Za mjerenja cikličkom voltametrijom (CV) korišten je potenciostat model 263A i 264. Potenciostat (PAR 264, USA) spojen je međusklopnikom EDAQ (Australia) na osobno računalo radi prikupljanje podataka.

Korišteni su i pH metar- model MA 5740 (Iskra, Slovenija), vaga- Kern ALJ 120-4 (Njemačka) te ultrazvučno miješalo Bandelin Sonorex (Njemačka).

7.3. Priprema radne elektrode

Prije početka mjerenja zlatna elektroda je mehanički obrađivana prahom Al_2O_3 , promjera čestica od $0,35\ \mu\text{m}$ kako bi se postigao zrcalni površinski sjaj. Nakon poliranja elektroda je isprana destiliranom vodom i odmašćena etanolom. Slijedi kemijsko čišćenje koje podrazumijeva stajanje radne elektrode 2 minute u otopini koncentrirane sumporne kiseline i vodikovog peroksida (piranja otopina) koje su pripremljene mješanjem koncentriranih otopina u volumnom omjeru 3:1. Konačno slijedi elektrokemijsko čišćenje u otopini HClO_4 , $c = 0,1\ \text{mol dm}^{-3}$ u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji. Višestrukim cikliziranjem osigurano je da na površini elektrode ne može postojati oksid zlata koji bi mogao utjecati na kvalitetu monosloja. Cikliziranje je izvedeno u područje potencijala je od 0 do $+1,5\ \text{V}$ uz brzinu promjene potencijala od $50\ \text{mV/s}$.

Budući da su karakterizirani monoslojevi za tri različita spoja, DMSA, NAC i L-cistein, modificirana elektroda priprema se močenjem Au elektrode 24 sata u otopini odgovarajućeg spoja. Prije svakog mjerenja u elektrokemijskoj ćeliji provodi se propuhivanje dušikom u trajanju od 5 minuta. Nakon završetka mjerenja za jedan spoj, monosloj se mehanički skida prahom Al_2O_3 i ispire destiliranom vodom čime se elektroda priprema za nanošenje idućeg sloja.

7.4. Priprema otopina

7.4.1. Priprema otopina za karakterizaciju monoslojeva na površini elektrode

Pripremani su Britton-Robinsonovi puferi u širokom pH području. Izvagano je 2,04 g H_3BO_3 te kvantitativno preneseno u tikvicu od 100 mL, zatim je dodano 2,3 mL ledene CH_3COOH i 2,8 mL H_3PO_4 , ($w = 85\%$). U tako pripremljenu otopinu otopinom NaOH , $c = 5 \text{ mol dm}^{-3}$ uz pomoć pH-metra podešena je pH vrijednost pufera na željenu vrijednost.

Otopina 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ pripremljena je otapanjem 42,2 mg kalijeva heksacianoferata(II) trihidrata u odmjerne tikvici od 10 mL dodatkom deionizirane vode. Nakon pripreme otopina je držana na tamnom mjestu kako bi se što više izbjegla oksidacija.

Otopina 10 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ pripremljena je otapanjem 32,9 mg kalijeva heksacianoferata(III) u odmjerne tikvici od 10 mL.

0,1 M otopina KCl priprema se u tikvici od 100 mL kvantitativnim prenošenjem odvage kalijevog klorida od 745,6 mg te dopunjavanjem do oznake deioniziranom vodom.

Otopina za karakterizaciju monosloja pripremana je miješanjem 8 mL pufera, 1 mL 10 mM otopine kalijeva heksacianoferata(II) i 1 mL 10 mM otopine kalijeva heksacianoferata(III).

5mM otopina DMSA pripremljena je kvantitativnim prenošenjem odvage od 0,0046 g DMSA u tikvicu od 5 mL te dopunom do oznake deioniziranom vodom.

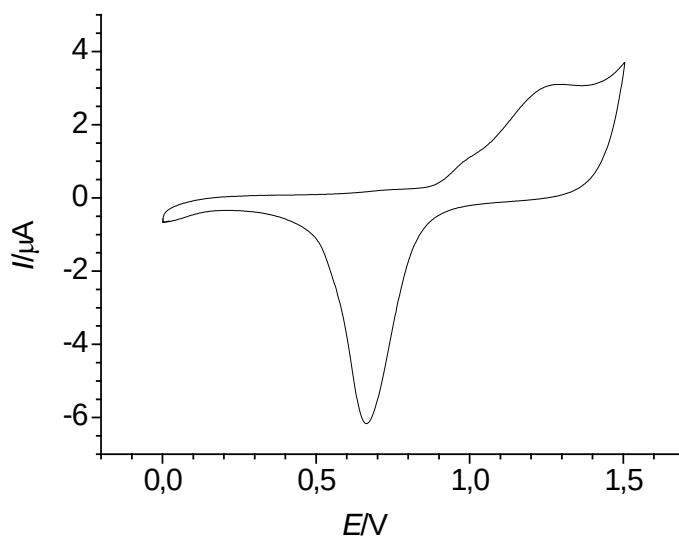
10 mM otopina NAC-a pripremljena je otapanjem 0,0163 g NAC-a u deioniziranoj vodi u tikvici od 10 mL.

10 mM otopina L-cisteina pripremljena je otapanjem 0,0121 g L-cisteina u deioniziranoj vodi u tikvici od 10 mL.

8. Rezultati i rasprava

8.1. Karakterizacija Au elektrode

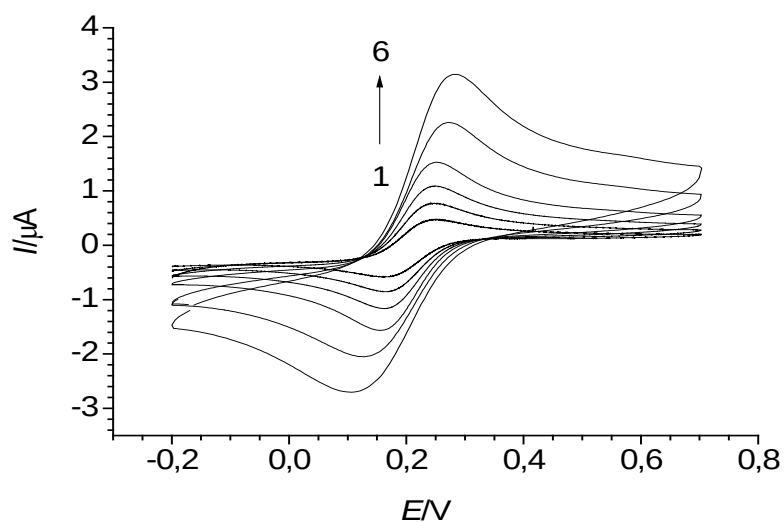
Na slici 26. prikazan je ciklički voltamogram Au elektrode u 0,1 M otopini perklorne kiseline u području potencijala od 0,0 V do 1,5 V. Vidljivi su karakterističan anodni i katodni strujni vrh koji ukazuju na oksidaciju i redukciju Au u perklornoj kiselini. Dobiven katodni val pri 0,68 V karakterističan je za redukciju Au (I) oksida. Integriranjem katodnog vala određena je stvarna površina zlatne elektrode u iznosu od 0,01979 cm² te je određen faktor hrapavosti u iznosu od 2,57 kao omjer stvarne i geometrijske površine zlatne elektrode (0,00785 cm²). Stvarnu površinu elektrode bilo je moguće odrediti jer je poznata količina naboja (482 μC/cm²) koja je potrebna za redukciju monosloja zlatnog oksida.



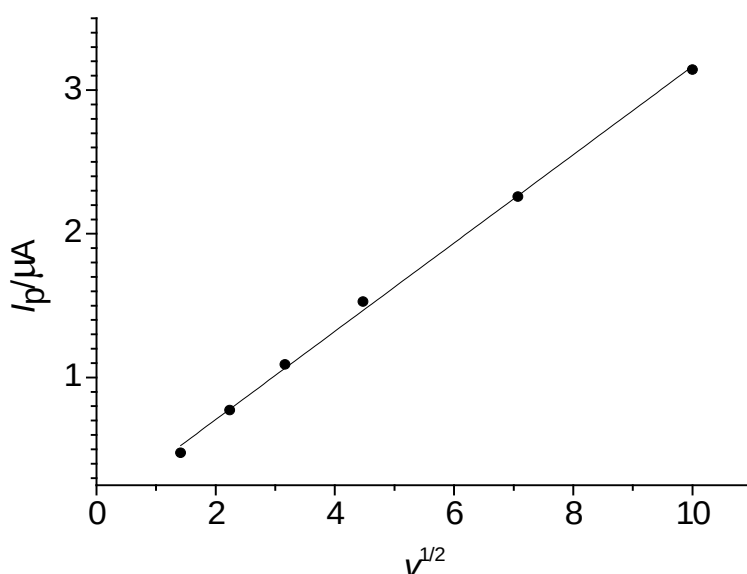
Slika 26. Ciklički voltamogram Au elektrode snimljen u 0,1 M HClO₄, referentna elektroda Ag/AgCl|3 M KCl, brzina promjene potencijala = 50 mV/s.

Na slici 27. prikazani su ciklički voltamogrami Au elektrode snimljeni u otopini koja sadrži 0,8 M KCl, 1 mM [Fe(CN)₆]⁴⁻ i 1 mM [Fe(CN)₆]³⁻ uz različite brzine promjene potencijala. Prikaz ukazuje da se porastom brzine sve više pozitivira vrijednost anodnog

strujnog vrha, odnosno, negativira se vrijednost katodnog strujnog vrha. Porast vrha strujnog vala s povećanjem brzine promjene potencijala je posljedica sve kraćeg odvijanja oksidacije odnosno redukcije heksacianoferata na elektrodi. Ako se vrijeme trajanja oksidacije odnosno redukcije smanji (a manje je jer je brzina promjene potencijala veća) tako se sve manje mijenja koncentracija elektroaktivne tvari neposredno uz elektrodnu površinu.



Slika 27. Ciklički voltamogrami Au elektrode snimljeni u 0,08 M vodenoj otopini KCl koja sadrži 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ i 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Mjerena izvedena uz Ag|AgCl| 3 M KCl referentnu elektrodu te platinsku protuelektrodu. Brzine promjene potencijala: 2 mV/s (1); 5 mV/s (2); 10 mV/s (3); 20 mV/s (4); 50 mV/s (5) i 100 mV/s (6).



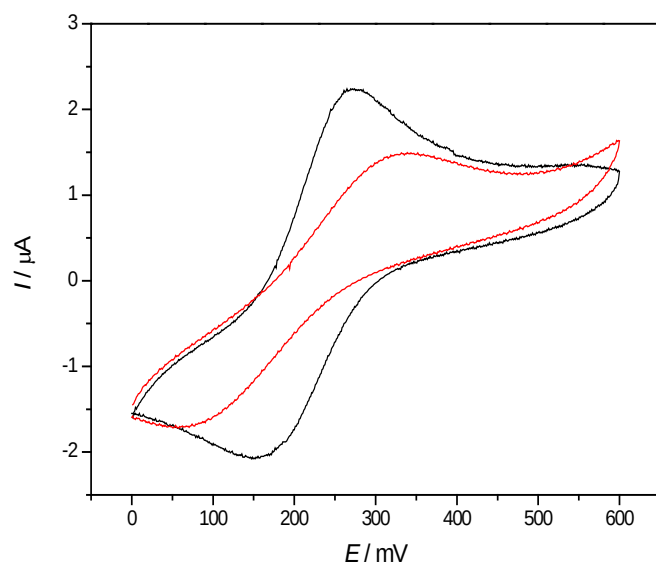
Slika 28. Ovisnost vršne struje oksidacijskog vala cikličkih voltamograma Au elektrode o drugom korijenu brzine promjene potencijala. Ciklički voltamogrami snimljeni su u uz iste eksperimentalne parametre kao i na prethodnoj slici.

Linearni odnos struje vrha vala s drugim korjenom brzine promjene potencijala ($I_p = -0,0547 + 0,3641v^{1/2}$, $R^2 = 0,99969$) pokazuje da je proces oksidacije i redukcije željezovih heksacianofera kontroliran samo difuzijom. Pojava strujnih valova na istom potencijalu također je posljedica procesa koji se odvijaju difuzijom.

8.2. Karakterizacija Au/Au DMSA modificirane elektrode

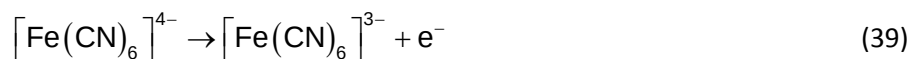
Karakterizacija se provodila u 100 mM otopini KCl uz 1mM otopinu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ / $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ pri neutralnom pH (pH=7) i bazičnom pH (pH= 10). Vrijednost pH mora biti dovoljno bazična da bi karboksilne skupine DMSA bile deprotonirane i na sebi nosile negativan naboj što se očituje kao sniženje struje na voltamogramu. Stoga ciklički voltamogram s nižom vrijednosti struje prikazuje modificiranu Au-DMSA elektrodu, a onaj s višom strujom odgovara nemodificiranoj Au elektrodi (Slika 29.). Smanjenje struje može se objasniti i činjenicom da u području visoko bazičnog pH dolazi do odbijanja između negativno nabijenog DMSA na površini i negativnog redoks para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ što uzrokuje otpor prijenosu naboja i konačno rezultira nižom strujom. Razlika potencijala između

anodnog i katodnog strujnog vrha za Au elektrodu iznosi 107 mV, a za modificiranu Au-DMSA elektrodu iznosi 233 mV. Formiranjem monosloja na površini elektrode stvara se elektrostatska barijera između otopine i elektrode što usporava prijenos elektrona, a samim time i elektrokemijsku reakciju. To se očituje povećanjem razmaka anodnog i katodnog vrha vala (ΔE_p) i u smanjenju maksimuma struje oksidacije i redukcije.



Slika 29. Ciklički voltamogrami Au elektrode snimljeni u 100 mM otopini KCl uz 1mM[Fe(CN)₆]³⁻/ [Fe(CN)₆]⁴⁻ pri pH=7 (Au) i pH=10 (Au/DMSA). Snimljeno uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s. Crno-Au, crveno-Au-DMSA

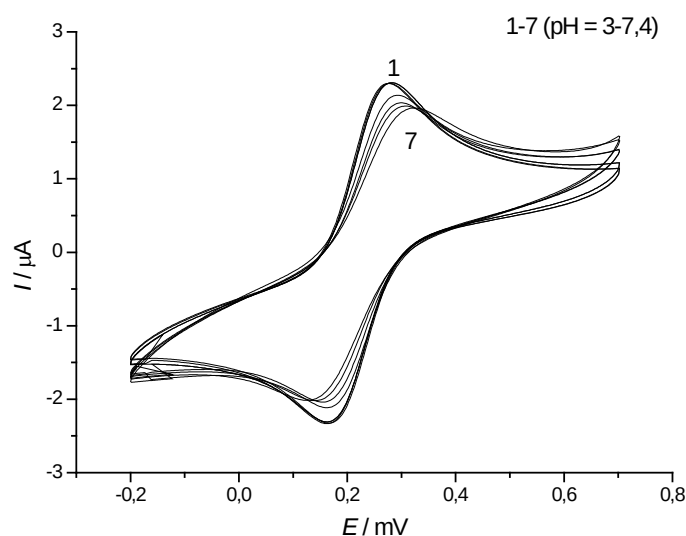
Au i Au/DMSA elektroda u prisutnosti redoks para [Fe(CN)₆]³⁻/ [Fe(CN)₆]⁴⁻ pokazuje elektrokemijsku aktivnost koja se temelji na sljedećoj reakciji koja se zbiva na površini elektrode:



Kao što je već navedeno, promjene koje se zamjećuju u izgledu cikličkog voltamograma nakon vezanja monosloja DMSA na površinu zlatne elektrode ukazuju da dolazi do otežane reakcije redoks para jer nastali monosloj blokira površinu elektrode na kojoj bi se ta reakcija odvijala. Kako je površina blokirana, smanjena je i brzina prijelaza naboja. To ukazuje da je

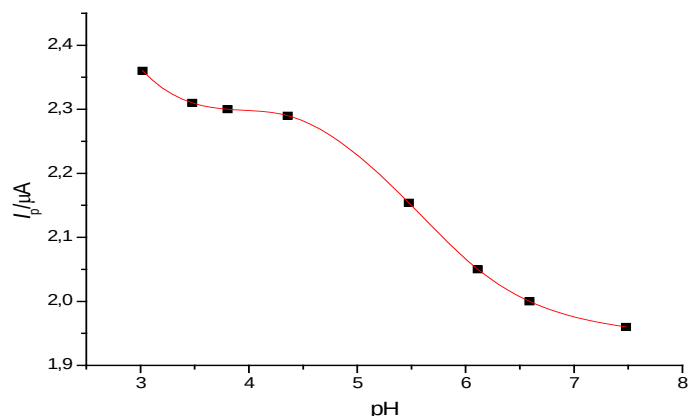
riječ o kvazireverzibilnoj reakciji, dakle, odvija se i oksidacija i redukcija, ali je prijelaz heksacianoferatnog ion otežan.

Na slici 30. prikazana je ovisnost stuje o potencijala snimljena u otopinama pH vrijednosti u rasponu pH = 3 do pH = 7,4. Karboksilne skupine DMSA molekule pri niskim vrijednostima pH su potpuno protonirane te dolazi do elektrostatskih privlačenja između DMSA monosloja na elektrodi i negativno nabijenog $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ / $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ionskog para. Takvom ponašanju odgovara visok strujni vrh na cikličkom voltamogramu označen brojem 1. Kako se pH povećava, karboksilne skupine se počinju deprotonirati, povećava se koncentracija negativnog naboja na površini zlatne elektrode te je veće elektrostatsko odbijanje što konačno rezultira postepenim padom vrijednosti strujnog vrha. Dakle, na kraju nakon što su odbojne sile između DMSA i ionskog para maksimalne, strujni odziv elektrode će se minimalizirati.



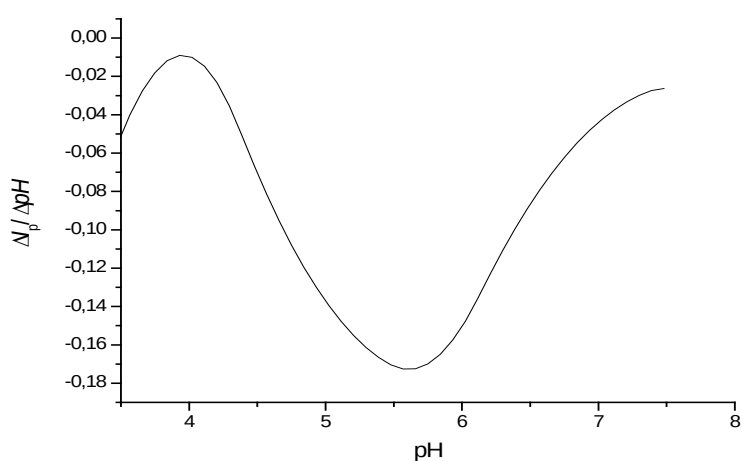
Slika 30. Ciklički voltamogrami Au-DMSA elektrode snimljeni u elektrolitu Britton-Robinson pufera pH = 3 – 7,4, uz 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ i 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Brzina promjene potencijala = 50 mV/s.

Navedeni pad anodnog strujnog vrha kod visokog pH prikazan je i na slici 31. koja daje ovisnost strujnog odziva kao funkcije pH. U kiselom području male su promjene u visini strujnog vrha jer su mali doprinosi elektrostatskog privlačenja dok u području višeg pH deprotoniranje i negativiranje površine uzrokuju znatan pad struje.



Slika 31. Ovisnost vršne struje oksidacijskog vala cikličkih voltamograma Au/DMSA elektrode o pH. Ostali eksperimentalni parametri su isti kao i na prethodnoj slici.

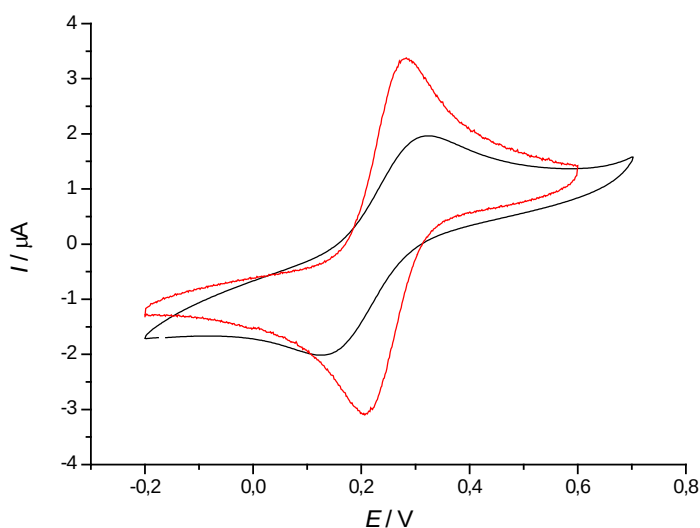
Aktivnosti funkcionalnih skupina pristunih u samoformirajućem monosloju mogu se definirati pomoću njihovih konstanti disocijacije, K_a , odnosno negativnim logaritmom konstante disocijacije pK_a . Konstanta disocijacije, pK , DMSA monosloja na površini Au elektrode određena je pomoću prve derivacije krivulje (slika 32.). Vrijednost pK je definirana kao pH vrijednost pri kojoj krivulja postiže minimum. Izmjereni je minimum određen pri $pH = 5,60$, stoga je $pK(\text{DMSA}) = 5,60$.



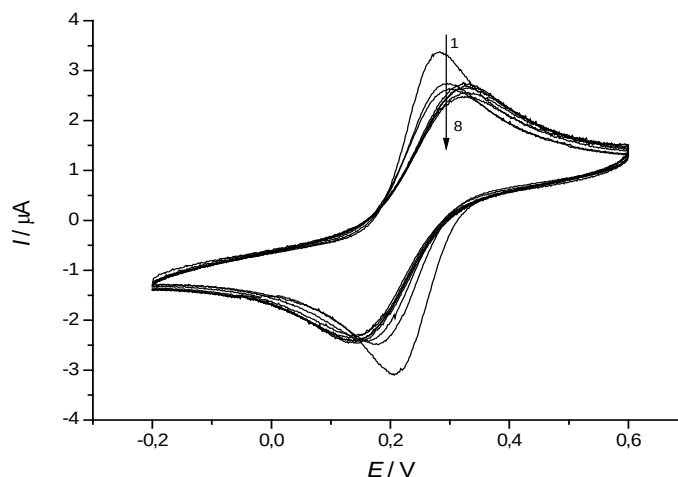
Slika 32. Prva derivacija vršne struje oksidacijskog vala cikličkog voltamograma kao funkcije pH

8.3. Karakterizacija Au/Au-NAC modificirane elektrode

Karakterizacija se provodi u 0,05 M otopini KCl uz 1 mM otopinu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ pri pH= 2,543 (Britton-Robinson puffer). N-acetil cistein sa svojom amino skupinom ($-\text{NH}_2$) na koju je vezana acetilna skupina i karboksilnom skupinom $-\text{COOH}$ pokazuju mogućnost protoniranja, odnosno deprotoniranja. Kako je već prikazano, NAC može biti ioniziran u četiri različita stanja ovisno o pH. Na slici 33., viši anodni strujni vrh odgovara elektrodi modificiranoj NAC-om jer u kiselom pH pri kojem je provedeno mjerenje dolazi najprije do protoniranja aminoskupine u $-\text{NH}_3^+$ čime površina modificirane elektrode postaje pozitivno nabijena. Zbog pozitivno nabijene površine Au-NAC elektrode, redoks paru će biti olakšan pristup površini elektrode što rezultira višom vršnom strujom modificirane elektrode s obzirom na nemodificiranu elektrodu za 1,3 μA . Razmak između oksidacijskog i redukcijskog vrha vala modificirane elektrode je 70 mV što približno odgovara Nernstovom reverzibilnom ponašanju. Čista Au elektroda pokazuje razliku anodnog i katodnog stujnog vrha od 180 mV što ukazuje na znatno odstupanje od Nernstovog ponašanja.



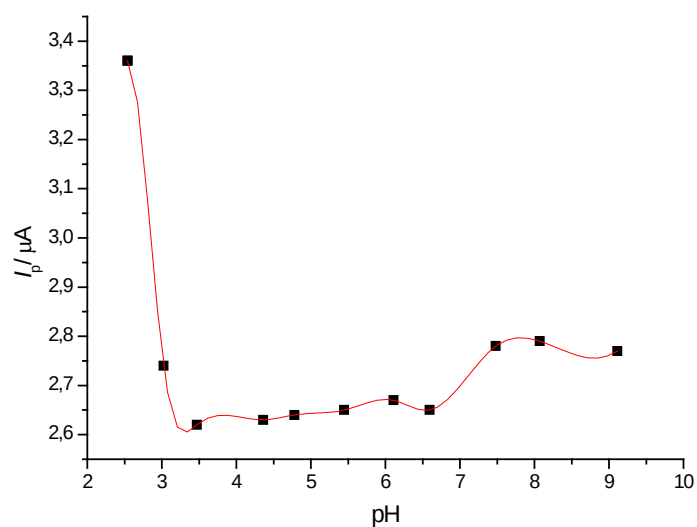
Slika 33. Ciklički voltamogrami Au i Au-Nac elektrode snimljeni u 0,05 M otopini KCl uz 1mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ prema Ag|AgCl| 3 M KCl referentnoj elektrodi. Mjerenje je provedeno pri pH=2,543 brzinom promjene potencijala 50 mV/s. Crno- čista Au, crveno- Au-NAC



Slika 34. Ciklički voltamogrami Au-NAC elektrode snimljeni u elektrolitu sastavljenom od Britton-Robinson pufera u rasponi pH = 1 – 9, uz 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ i 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Brzina promjene potencijala = 50 mV/s.

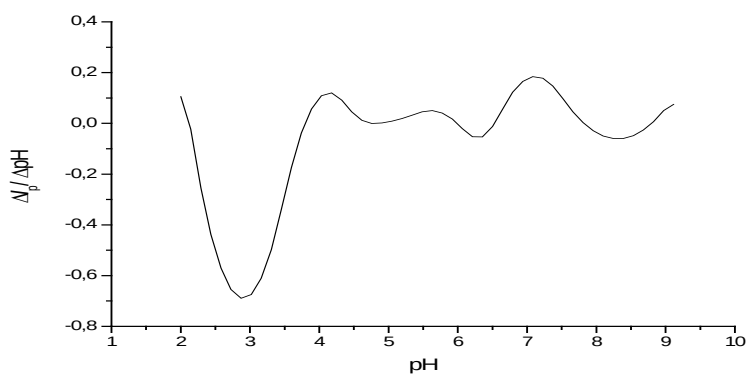
Na slici 34. prikazana je ovisnost struje i potencijala pri vrijednostima pH = 1 – 8. Do vrijednosti pH=3 u molekuli NAC protonirana je amino skupina u $-\text{NH}_3^+$ što pridonosi pozitivnom naboju površine elektrode, međutim na većim vrijednostima pH osim što je amino skupina protonirana, javlja se i postepeno deprotoniranje karboksilne skupine. To za posljedicu ima stvaranje površine bez naboja. Zbog toga se javljaju različite elektrostatske interakcije između monosloja (NAC-a) na elektrodi i $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ionskog para. Smanjenjem pozitivnog naboja na površini povećava se otpor prijenosa naboja (heksacianoferata) prema površini elektrode što rezultira padom vrijednosti vršne struje u otopinama više pH vrijednosti. Približavanjem vrijednosti pH=6,5 uočava se kraj pada i blagi rast vršne struje.

Ovisnost vršne struje anodnog vala o pH prikazan je i na slici 35. U prikazu je moguće jasno uočiti tri različita područja koja karakteriziraju promjenu naboja monosloja na površini elektrode. U području pH<3 protonirana je amino skupina što rezultira porastom vršne struje, zatim znatan pad vršne struje anodnog vala za pH>3 zbog utjecaja deprotoniranosti karboksilne skupine što se održava do pH=6,5 a nadalje se uočava blagi porast vršne struje.



Slika 35. Ovisnost vršne struje oksidacijskog vala cikličkih voltamograma Au/NAC elektrode o pH. Ciklički voltamogrami snimljeni su u otopini Britton-Robinson pufera u rasponu pH vrijednosti od 1 do 8, uz 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ i 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Snimljeni su uz brzinu promjene potencijala od 50 mV/s.

Na slici 36. prikazan je prva derivacija vršne struje o pH. Minimum krivulje postignut je pri $\text{pH} = 2,91$ te je tako određena i vrijednost $\text{pK}(\text{NAC}) = 2,91$. Izmjerena vrijednost dobro slaže s vrijednoću $\text{pK}_1 = 3,1$ koja je određena disocijacijom NACa u vodenoj otopini.

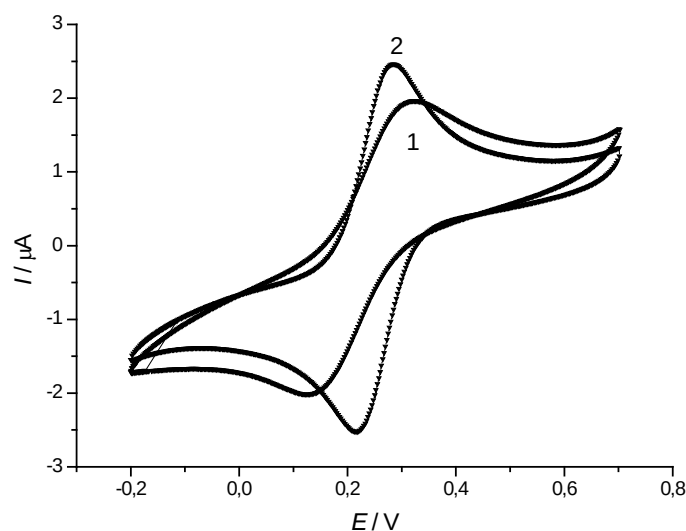


Slika 36. Prva derivacija vršne struje oksidacijskog vala cikličkog voltamograma kao funkcije pH.

Preostali minimumi na krivulji koju prikazuje slika su posljedica eksperimentalnih grešaka i malih odstupanja u određivanju vršne struje.

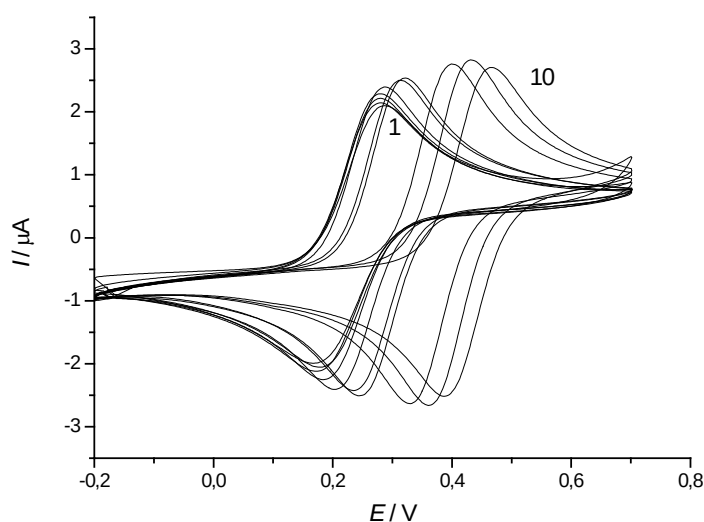
8.4. Karakterizacija Au/Au-Cys modificirane elektrode

Karakterizacija se provodi u 0,05 M otopini KCl uz 1 mM otopinu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ pri pH= 2,303 (Britton-Robinson pufer). Cistein sa svojom amino i karboksilnom skupinom pokazuje mogućnost ioniziranja što se odražava u izgledu cikličkog voltamograma. Mjerenjem pri pH= 2,303 u molekuli cisteina amino skupina je protonirana u NH_3^+ što rezultira višom vršnom strujom oksidacijskog vala modificirane Au-Cys elektrode u odnosu na čistu Au elektrodu. Zbog pozitivno nabijene površine modificirane elektode, olakšan je pristup elektrodi negativnom redoks paru što rezultira višom vršnom strujom za oko 1,5 μA u odnosu na čistu Au elektrodu. Udaljenost oksidacijskog i reduksijskog vrha vala za modificiranu Au-Cys elektrodu iznosi oko 70 mV što je vrlo blisko Nernstovoj ravnotežni, dok za čistu Au elektrodu iznosi oko 200 mV što ukazuje na znatno odstupanje od ravnoteže.



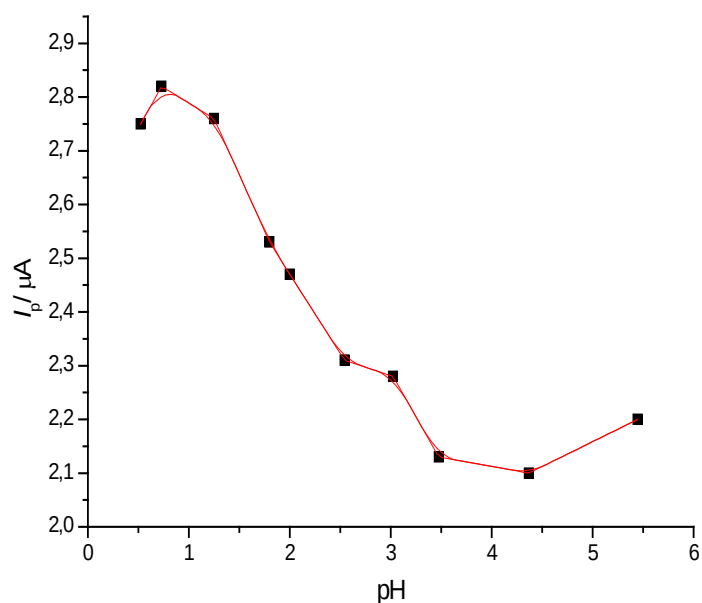
Slika 37. Ciklički voltamogrami Au i Au-Cys elektrode snimljeni u 0,05 M otopini KCl uz 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ pri pH=2,543 (Britton Robinson pufer). Brzina promjene potencijala 50 mV/s. 1-Au elektroda, 2- Au/Cys elektroda

Na slici 38. prikazana je ovisnost struje i potencijala pri vrijednostima u području pH= 0,5 – 5,5. Do oko pH=1,5 pristupa je trend blagog rasta vršne struje zbog protoniranosti amino skupine u -NH_3^+ nakon čega slijedi trend pada vršne struje jer dolazi i do deprotoniranja karboksilne skupine i negativiranja površine. Zbog toga se javljaju elektrostatske interakcije između Cys monosloja na elektrodi i $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ionskog para te se povećava otpor prijenosu naboja zbog odbojnih sila što rezultira padom vrijednosti vršne struje kod većeg pH.



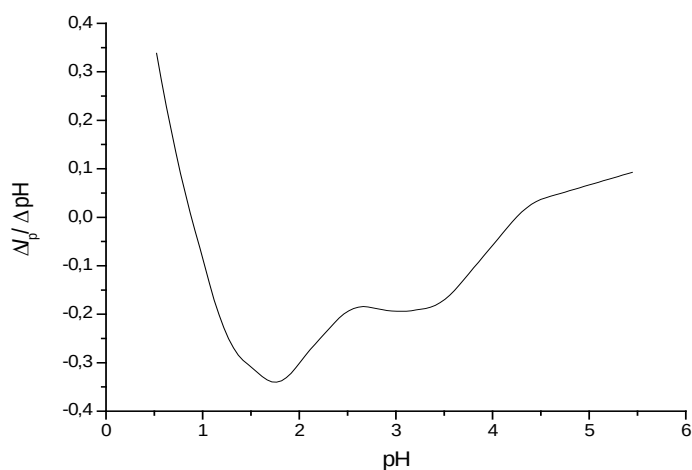
Slika 38. Ciklički voltamogrami Au-Cys elektrode snimljeni u elektrolitu sastavljenom od Britton-Robinson pufera pH = 0,5 – 5,5, 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ i 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Snimljeni brzinom promjene potencijala od 50 mV/s

Trend pada vršne struje anodnog vala kod pH >1,5 prikazan je i na slici 39. koja daje ovisnost stujnog odziva kao funkcije pH. Iz krivulje je moguće očitati da u točki infleksije gdje je pH= pK, vrijednost pK_1 iznosi oko 1,8 što se dobro slaže s njenom teorijskom vrijednošću $pK_1= 1,9$ koja je određena disocijacijom u vodenoj otopini. Usporedbom cisteina s kemijski sličnim N-acetil cisteinom, acetilna skupina kod NAC-a nešto umanjuje afinitet otpuštanja protona tiola u usporedbi sa cisteinom. Utjecaj acetilne skupine vidljiv je i kod dobivenih vrijednosti pK koja je kod cisteina $pK_1= 1,8$, a kod NAC-a $pK_1=2,9$.



Slika 39. Ovisnost vršne struje oksidacijskog vala cikličkih voltamograma Au/Cys elektrode o pH. Eksperimentalni uvjeti su isti kao i na prethodnoj slici.

Preciznije određivanje pK vrijednosti može se ostvariti pomoću prve derivacije prikazane na slici 40. čiji najveći val ukazuje da je za Cys $pK_1=1,8$ što se dobro slaže s njegovom teorijskom vrijednoću od $pK_1=1,9$.



Slika 40.: Prva derivacija vršne struje oksidacijskog vala cikličkog voltamograma kao funkcije pH u svrhu određivanja pK samoformiranog monosloja Cys na površini Au elektrode.

9. Zaključak

U ovom radu modifikacija zlatne elektrode provedena je trima spojevima i to: DMSA, NAC i Cys. Pri dokazivanju prisutnosti samoformirajućeg monosloja na površini elektrode koristilo se činjenicom da promjena pH vrijednosti otopina u kojima je metal uronjen rezultira promjenom površinskog naboja modificiranih metalnih površina. Navedena pojava omogućavala je određivanje pK vrijednosti površinskog samoformirajućeg monosloja što je bio glavni cilj ovog rada.

Primjenom cikličke voltametrije pratila se vršna struja anodnog vala u različitim područjima pH. Pomoću prve derivacije vršne struje po promjeni pH vrlo precizno je bilo moguće odrediti pK_1 vrijednost za sva tri ispitivana spoja iz najvećeg minimuma na krivulji. Preostali minimumi na krivulji posljedica su eksperimentalnih pogrešaka, između ostalog, u pripremi otopina heksacianoferata koje su pripremane za svako pojedinačno mjerenje.

Uočeno je dobro slaganje eksperimentalno određene pK_1 vrijednosti za Nac i Cys s njihovom teorijskom vrijednošću. DMSA pokazuje potpuno drugačiju površinsku vrijednost pK od onih dobivenih mjerenjem u otopini. Usporedbom kemijski sličnih NAC i Cys s obzirom na dobivenu vrijednost $pK_1=1,8$ kod cisteina, odnosno, $pK_1=2,9$ kod NAC-a vidljivo je da acetilna skupina kod NAC-a smanjuje kiselost u usporedbi s cisteinom koji je bez acetilne skupine u svojoj strukturi.

Budući da su testirani spojevi po svojoj strukturi razgranate molekule, to predstavlja ograničavajući faktor u stupnju pokrivenosti elektrode nego što bi bilo u slučaju lančanih molekula kod kojih se zbog manjih steričkih smetnji omogućuje veća pokrivenost elektrode.

Konačno, ciklička voltametrija pokazala se kao prilično praktična i brza metoda za određivanje površinske pK vrijednosti u odnosu na ostale analitičke metode. Tom metodom je između ostalog dokazano da modificirana elektroda ima bolja svojstva od čiste Au elektrode na što ukazuje razlika strujnih vrhova bliska Nernstovoj ravnoteži kod modificirane elektrode, odnosno, znatno odstupanje kod čiste elektrode. Elektrokemijska metoda pokazala se uspješnom u određivanju površinske pK vrijednosti za sva tri testirana spoja.

10.Simboli

E - narinuti potencijal, V

E_r - ravnotežni potencijal, V

α - koeficijent prijelaza naboja

n -broj izmijenjenih elektrona

j_o - struja izmjene u ravnotežnom stanju, A cm⁻²

T -apsolutna temperatura, K

F - Faradayeva konstanta, C mol⁻¹

I_p - strujni vrh, A

D_o - difuzijski koeficijent oksidirane vrste redoks sustava, cm² s⁻¹

c - koncentracija elektroaktivne vrste, mol cm⁻³

v - brzina promjene potencijala, V s⁻¹

z - broj elektrona

R - opća plinska konstanta J K⁻¹ mol⁻¹

11. Literatura

- [¹] S Varathajaran, Sheela Berchmans, V Yegnaraman, *Tailoring self-assembled monolayers at the electrochemical interface*, J.Chem. Sci., 121 (2009)
- [²] Štefica Cerjan- Stefanović, *Osnove analitičke kemije*, Zagreb, 1983
- [³] Penny S.Hale, Leone M. Maddox, Joe G. Shapter, J. Justin Gooding, *Surface pK_a of self-assembled monolayers*, Journal of chemical education, 2005
- [⁴] Jetse Reijenga, Arno van Hoof, Antonie van Loon, Bram Teunissen, *Development of methods for the determination of pK_a values*, Analytical chemistry insights
- [⁵] Krešimir Košutić, *Fizikalna kemija 2*, Interna skripta, Zagreb, 2013
- [⁶] A.J.M.Horvat, K.Margeta, *Instrumentalna analiza*, Radni materijal za internu uporabu, Zagreb, 2009
- [⁷] Victor Chechik, Richard M.Crooks, Charles J.M. Stirling, *Reactions and reactivity in self-assembled monolayers*, Advanced materials, 2000
- [⁸] L.H. Dubois , R.G. Nuzzo, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **43** (1992) 437-463
- [⁹] Quin Wang, *Self-assembled monolayers as platform for biosensors*, Auburn, Alabama, 2005
- [¹⁰] N. Bing Li, L. Mei Niu , H. Qun Luo, *Microchim. Acta*, **153** (2006) 37-44
- [¹¹] *Praktikum iz elektrokemije*, Interna skripta
- [¹²] Zoran Mandić, Interna skripta
- [¹³] D. Manojlović, *Instrumentalna analiza*, Univerzitet u Beogradu

12. Životopis

Mia Zaračko, rođena je 05. 05. 1993. u Zagrebu. Nakon osnovne škole, upisuje Gimnaziju Lucijana Vranjanina, Opći smjer, koju završava 2012.godine s odličnim uspjehom. Iste godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Primijenjena kemija.