Politiramin kao osnova senzorske površine

Marcinek, Saša

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:149:248483

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Saša Marcinek

POLITIRAMIN KAO OSNOVA SENZORSKE POVRŠINE

ZAVRŠNI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:
izv. prof. dr. sc. Stjepan Milardović
doc. dr. sc. Marijana Kraljić Roković
dr. sc. Irena Kereković

Zagreb, srpanj 2015.

ZAHVALA

Prvenstveno zahvaljujem svom mentoru izv. prof. dr. sc. Stjepanu Milardoviću na vodstvu, trudu i strpljenu. Također zahvaljujem dr. sc. Marini Palčić na velikoj pomoći prilikom izrade ovog završnog rada.

Hvala i svim mojim prijateljima i prijateljicama, koji studiranje čine lakim i zabavnim. I na kraju najveću zahvalu dugujem svojoj obitelji, koja je uvijek tu uz mene i pruža mi podršku.

SAŽETAK

U ovom radu konstruiran je senzor za određivanje albumina iz humanog seruma (HSA) temeljen na politiraminom modificiranoj zlatnoj elektrodi.

Imobilizacija politiramina izvedena je elektropolimerizacijom 1 M otopine NaOH uz dodatak 0,1 M tiramina. Funkcionalizacija površine provedena je s nitrilotriocenom kiselinom (NTA). Amino skupine politiramina aktivirane su uranjanjem u 25%-tnu otopinu glutaraldehida, što omogućava stvaranje veza između politiramina i NTA. Nakon vezanja NTA, elektroda je dodatno modificirana s Cu^{2+} i Ni^{2+} ionima.

Karakterizacija zlatne elektrode provedena je cikličkom voltametrijom (CV) i elektrokemijskom impedancijskom spektroskopijom (EIS) u 0,08 M otopini KCl koja je sadržavala 1 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$. Postojanje slojeva na elektrodi dodatno je potvrđeno mjerenjem na kvarcnoj kristalnoj mikrovagi (QCM).

Analitička primjena modificirane elektrode testirana je s QCM-om. Rezultati su pokazali kako je NTA-Cu kompleks dobra osnova za određivanje HSA, dok se NTA-Ni kompleks nije pokazao kao optimalna senzorska konfiguracija za odabrani analit.

Ključne riječi:

Politiramin

Zlatna elektroda

Kemijsko umrežavanje

Ciklička voltametrija

Kvarcna kristalna mikrovaga

NTA

HSA

SUMMARY

The aim of this work was development of a sensor for human serum albumin determination (HSA) based on gold electrode modified with polytyramine.

Polytyramine immobilization was performed by electropolymerization in 1 M solution of NaOH containing 0.1 M of tyramine. Surface functionalization was carried out with nitrilotriacetic acid (NTA). Amino groups were activated by immersion in 25% glutaraldehyde solution. Subsequent to the NTA binding, electrode was additionally modified with Cu^{2+} and Ni^{2+} ions.

Characterization of gold electrode was performed with cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in the 0.08 M solution of KCl with 1 mM of $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$. Existence of the layers on the electrode was additionally confirmed with quartz Crystal Microbalance (QCM) measurements.

Analytical performance of modified electrode was carried out with QCM. Results had shown that NTA-Cu complex can be used for detection of HSA while NTA-Ni complex was not optimal sensor configuration for the selected analyte.

Key words:

Polytyramine

Gold electrode

Chemical grafting

Cyclic voltammetry

Quartz Crystal Microbalance

NTA

HAS

Sadržaj:

1. UVOD..... 1

2. OPĆI DIO 2

2.1. Voltametrija..... 2

2.1.1. Ciklička voltametrija..... 2

2.2. Kvarcna kristalna mikrovaga..... 9

2.3. Strategije kemijskog umrežavanja..... 12

2.4. Politiramin..... 14

2.5. Nikal..... 17

2.6. Bakar 18

2.7. Nitrilotrioctena kiselina..... 19

2.8. Albumin iz humanog seruma (HSA)..... 21

3. EKSPERIMENTALNI DIO 23

3.1. Kemikalije 23

3.2. Instrumentacija 24

3.3. Priprema otopina 24

3.3.1. Priprema otopina za karakterizaciju zlatne i AuQC elektrode 24

3.3.2. Priprema otopine tiramina 25

3.3.3. Priprema otopina za funkcionalizaciju AuQC elektrode..... 25

3.3.4. Priprema otopine HSA..... 25

3.4. Opis mjerenja 26

3.4.1. Priprema površine zlatne elektrode..... 26

3.4.2. Karakterizacija površine zlatne elektrode..... 26

3.4.3. Oslojavanje zlatne elektrode politiraminom..... 26

3.4.4. Karakterizacija površine zlatne elektrode oslojene politiraminom..... 26

3.4.5. Oslojavanje politiraminom i funkcionalizacija zlatne kvarcne kristalne elektrode..... 27

3.4.6. Modifikacija AuQC/politiramin/glutaraldehid elektrode Cu^{2+} ionima..... 27

3.4.7. Modifikacija AuQC/politiramin/glutaraldehid elektrode Ni^{2+} ionima..... 27

4. REZULTATI I RASPRAVA..... 28

4.1. Karakterizacija površine zlatne elektrode 28

4.2. Oslojavanje zlatne elektrode politiraminom..... 30

4.3. Karakterizacija površine zlatne elektrode oslojene politiraminom 31

4.4. Oslojavanje politiraminom kvarcne kristalne elektrode oslojene zlatom 33

4.5. Funkcionalizacija AuQC elektrode 35

4.6. Vezanje HSA na funkcionaliziranu AuQC elektrodu 36

5. ZAKLJUČAK..... 40

6. SIMBOLI 41

7. LITERATURA..... 43

8. ŽIVOTOPIS..... 45

1. UVOD

Tijekom posljednja dva desetljeća, polimeri su stekli veliku primjenu u tehnologiji izrade senzora. Bolja selektivnost i brza mjerenja postignuta su zamjenom klasičnih senzorskih materijala polimerima.

Elektrokemijska polimerizacija predstavlja pogodnu metodu za proizvodnju vrlo stabilnih polimera. Velika prednost elektrokemijskog taloženja polimernih filmova je u formiranju filmova precizno kontrolirane debljine te različite morfologije ovisno o primijenjenom potencijalu i broju voltametrijskih ciklusa. Ovako polimerom modificirane elektrode pokazuju posebna svojstva koja se mogu primijeniti za razne elektrokatalitičke i elektroanalitičke primjene.[1]

Biosenzor je dizajniran da reagira s određenim analitom kako bi proizveo mjerljiv signal. Velika selektivnost prema analitu je ključni zahtjev prilikom dizajniranja biosenzora. Takav senzor može određivati analite kao što su: protutijela/antigeni, enzimi, nukleinske kiseline/DNA ili stanične strukture. Biosenzori su pronašli najveću primjenu u medicinskoj dijagnostici i kontroli onečišćenja za mjerenje otrovnih plinova u atmosferi i otrovnih spojeva u vodama. [5]

Tiramin je zadnjih godina uporabljen kao idealan monomer za izradu biosenzora, zbog prisutnosti slobodne amino skupine koja omogućava imobilizaciju bioloških molekulnih vrsta. Povrh toga fenolna skupina se preferirano oksidira pokrećući reakciju polimerizacije. Također se može i upravljati svojstvima nastalog politiraminskog filma, primjenom različitih podloga i primjenom različitih eksperimentalnih uvjeta. Najveća prednost tiramina je ipak u njegovoj otpornosti prema raznim otapalima i elektrokemijskoj stabilnosti, kao i stabilnosti u velikom rasponu pH vrijednosti.[8]

Prednosti politiramina kao osnove senzorske površine su poznate, stoga je i njegova primjena u razvoju novih senzorskih površina sve veća.

2. OPĆI DIO

2.1. Voltametrija

Voltametrija (voltamperometrija) je vrsta elektroanalitičke metode kod koje se informacija o analitu dobiva mjerenjem ovisnosti struje o potencijalu, pri čemu je potencijal linearna funkcija vremena. Metodu su otkrili Matheson i Nichols 1938. godine, a teorijski opisali Randles i Ševčik 1948. godine.

Elektrokemijska ćelija u kojoj se odvija voltametrijsko mjerenje zahtijeva najmanje dvije elektrode. Radna (indikatorska) elektroda, koja ostvaruje kontakt s analitom, primjenjuje željeni potencijal i olakšava prijenos naboja do i od analita. Druga elektroda se naziva pomoćna elektroda ili protuelektroda i pomoću nje ostvarujemo tok električne struje kroz ćeliju. Kako je teško održati konstantan potencijal na pomoćnoj elektrodi prilikom odvijanja redoks reakcija, danas se najčešće primjenjuju troelektrodne ćelije u kojima je treća elektroda referentna s poznatim potencijalom i kroz nju ne teče struja. Referentna elektroda tada služi samo za mjerenje i regulaciju napona ili struje radne elektrode.[2]

Kao i sve elektrokemijske metode, voltametrija se temelji na Faraday-evim zakonima koji dovode u vezu prijenos mase i vrijeme s prijenosom naboja:

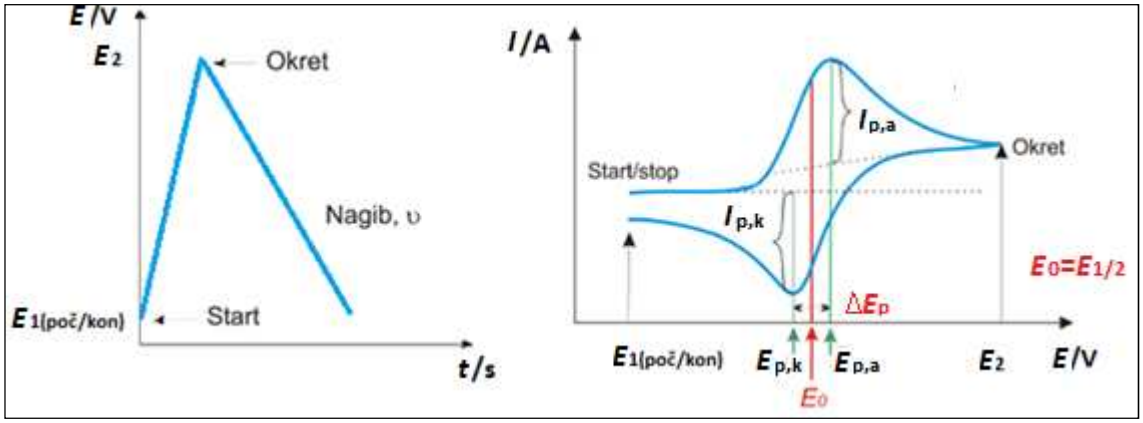
$$n = \frac{Q}{z \cdot F} \qquad (1.)$$

gdje je *z* broj elektrona koji se izmijeni u reakciji, a *F* Faraday-eva konstanta i iznosi 96 487 C mol^{-1} dok *n* predstavlja množinu tvari.

2.1.1. Ciklička voltametrija

Ciklička voltametrija je modifikacija voltametrije s linearnom promjenom potencijala. Napon se i kod cikličke voltametrije mijenja linearno, a razlika je u tome što se mijenja dvosmjerno, od početne do odabrane konačne vrijednosti i natrag, što na vremenskoj skali daje trokutasti oblik krivulji potencijal-vrijeme (*Slika 1a.*). Kao rezultat promjene napona na elektrodi odvija se elektrokemijska reakcija i dolazi do promjene jakosti struje koja protječe kroz elektrodu. Ovisnost struje o potencijalu

nazivamo ciklički voltamogram, koji ima dvije grane; početnu, anodnu i povratnu, katodnu (*Slika 1b.*).



Slika 1. Signal a) pobude i b) odziva u cikličkoj voltametriji.

Karakteristične veličine svakog voltamograma su:

$E_{p,\,k}$ i $E_{p,\,a}$ – potencijali katodnog i anodnog strujnog vrha,

$I_{p,\,k}$ i $I_{p,\,a}$ – visine katodnog i anodnog strujnog vrha,

ΔE_p – razlika potencijala strujnih vrhova.

Standardni elektrodni potencijal se određuje kao prosječna vrijednost jedne polovine razlike potencijala anodnog i katodnog vrha vala te se opisuje izrazom 2.

$$E^\circ = \frac{E_{p,a} - E_{p.\,k}}{2} \qquad (2.)$$

Obzirom na međusobni odnos brzina izmjene naboja i difuzije, procese na elektrodi možemo podijeliti u tri skupine; ireverzibilni, reverzibilni i kvazireverzibilni.

a) Reverzibilan proces

Kod reverzibilnih procesa prijenos naboja je puno brži od difuzije. Kako je difuzija sporija, proces je difuzijski kontroliran, što znači da struja ovisi samo o brzini difuzije reaktanta prema površini elektrode i brzini difuzije produkta od elektrode prema masi otopine. Na površini radne elektrode kod svakog potencijala se uspostavlja ravnotežni omjer koncentracija oksidiranog c_e(O) i reduciranog c_e(R) oblika redoks sustava. Taj se omjer opisuje Nernst-ovom jednadžbom:

$$\frac{c_e(O)}{c_e(R)} = \exp\left[\frac{z \cdot F}{R \cdot T}(E - v \cdot t - E^{0\prime})\right] \quad (3.)$$

gdje je: $E^{0'}$ – standardni elektrodni potencijal redoks sustava,

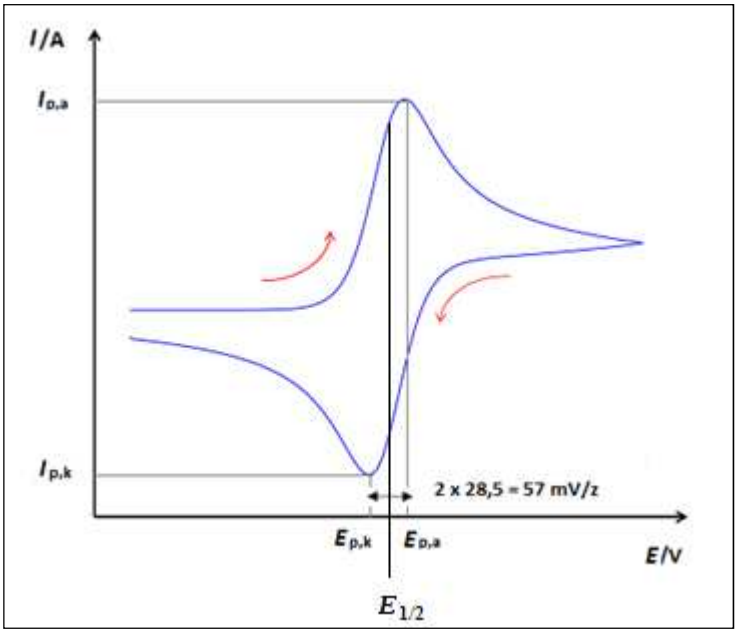
E – ravnotežni elektrodni potencijal,

v – brzina promjene potencijala,

R – opća plinska konstanta, koja iznosi 8,314 J K^{-1} mol^{-1}.

U početku ne dolazi do elektrodne reakcije i kroz ćeliju protječe samo osnovna struja, sve dok potencijal radne elektrode ne dostigne standardni elektrodni potencijal, što na cikličkom voltamogramu vidimo kao ravan tok krivulje (*Slika 2.*). Kako raste potencijal elektrode raste i brzina elektrodne reakcije oksidacije i na voltamogramu nastaje uzlazni dio anodne krivulje. Kada potencijal dostigne određenu vrijednost dolazi do trenutačne oksidacije čestica pristiglih difuzijom na elektrodu i struja dostiže maksimalnu vrijednost, što formira anodni strujni vrh. Kako se iscrpljuje reaktant neposredno uz površinu elektrode tako se struja postupno smanjuje.

Proces redukcije ne počinje odmah nakon promjene smjera potencijala, koji je tada znatno negativniji od standardnog elektrodnog potencijala, nego kada se približi toj vrijednosti. Dolazi do redukcije produkta nastalog na elektrodi procesom oksidacije i formira se katodni strujni vrh. Katodni strujni vrh je veći što je veća koncentracija tvari, što se više elektrona izmjenjuje, što je veća površina elektrode i što je veća promjena potencijala u jedinici vremena. Daljnjim negativiranjem potencijala otopina uz površinu elektrode se iscrpljuje tj, smanjuje se koncentracija oksidiranog oblika redoks sustava i struja ćelije postupno opada na vrijednost osnovne struje.[3]



Slika 2. Ciklički voltamogram za reverzibilni elektrodni proces.

Sve navedeno se matematički može opisati Randles-Ševčik-ovom jednadžbom:

$$I_{\mathrm{P}} = 0{,}4463 \cdot z \cdot F \cdot c \cdot A \cdot \left(\frac{z \cdot F \cdot D \cdot v}{R \cdot T}\right)^{1/2} \qquad (4.)$$

gdje je: z – broj izmijenjenih elektrona,

F – Faraday-eva konstanta, C mol^{-1},

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

A – površina elektrode, cm^2,

D – difuzijski koeficijent, cm^2 s^{-1},

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

R – opća plinska konstanta, $J \cdot K^{-1}$ mol^{-1},

T – temperatura, K,

Ip – struja vrha vala, A.

Potencijal vrha katodnog vala je negativniji od polarografskog poluvalnog potencijala elektroaktivne vrste, što je pokazano jednadžbom 5.

$$E_{\mathrm{p}} = E_{1/2} - 1{,}109 \cdot \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \quad (5.)$$

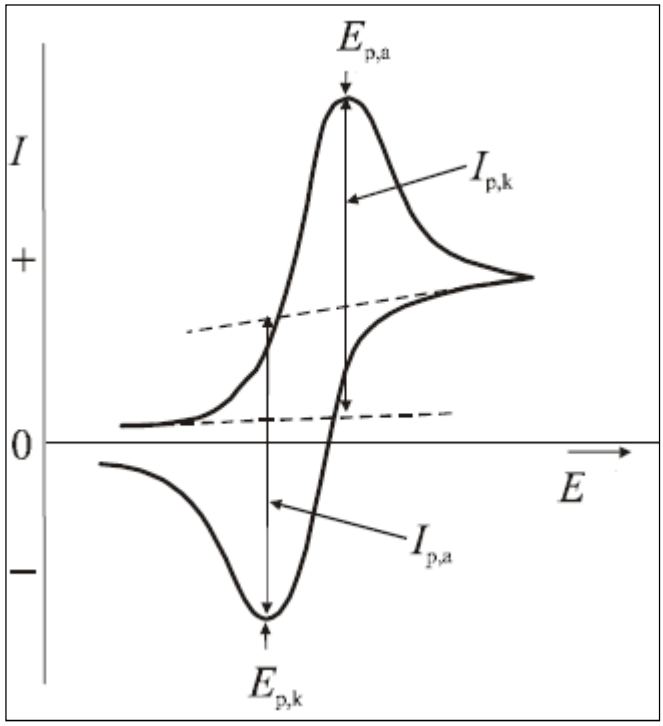
odnosno pri 25 ˚C:

$$E_{\mathrm{P}} = E_{1/2} - \frac{28{,}5}{z} \cdot m \cdot V \quad (6.)$$

Isto tako je potencijal vrha anodnog vala pozitivniji od polarografskog poluvalnog potencijala za 28,5 mV z^{-1} iz čega slijedi da razlika potencijala vrha katodnog i anodnog vala kod reverzibilnih procesa iznosi 57 mV z^{-1}, kod 25 ˚C i ne ovisi o brzini promjene potencijala (*Slika 2.*).

Omjer struja vrha vala, tj. odnos visine katodnog i anodnog vala cikličkog voltamograma, za reverzibilni elektrodni proces, uz uvjet da su obje vrste redoks sustava stabilne je $I_{\mathrm{p,\,k}}/I_{\mathrm{p,\,a}} = 1$ i ne ovisi o brzini promjene potencijala. Omjer struje odziva u bilo kojoj točki vala i drugog korijena brzine promjene potencijala je konstantan i također ne ovisi o brzini promjene potencijala.

Način obrade cikličkog voltamograma i mjerenje visine katodnog i anodnog vala pokazan je na *Slici 3.*



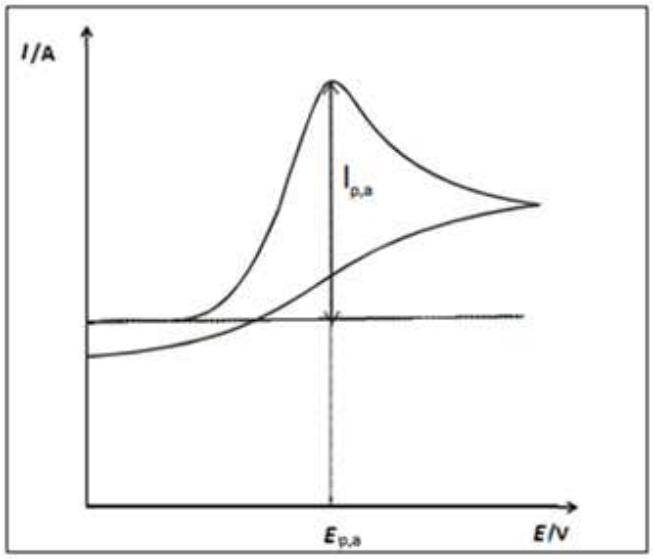
Slika 3. Način grafičke obrade i mjerenja visine katodnog i anodnog vala na cikličkom voltamogramu.[3]

b) Ireverzibilan proces

Kod ireverzibilnih procesa ne dolazi do povratnog procesa redukcije, pa ciklički voltamogram pokazuje samo polazni val (*Slika 4.*). Difuzija je brža i reakcija se odvija pod kontrolom izmjene naboja. Kako je elektrodna reakcija spora promjenu potencijala elektrode ne slijedi promjena omjera koncentracija oksidiranog i reduciranog oblika u skladu s Nernst-ovom jednadžbom.

Kao i kod reverzibilnog procesa omjer struje odziva u bilo kojoj točki vala i drugog korijena brzine promjene potencijala je konstantan i ne ovisi o brzini promjene potencijala, ali ovisi o koncentraciji tvari i kinetičkim parametrima elektrodne reakcije, odnosno standardnoj konstanti brzine elektrodne reakcije (k^0) i koeficijentu prijelaza elektrona (α).

Potencijal vrha vala znatno je pozitivniji od standardnog potencijala sustava. Kao i struja odziva ovisi o kinetičkim parametrima, ali i raste s povećanjem brzine promjene potencijala za 30 mV $\alpha^{-1} z_a^{-1}$, pri 25 ˚C, za svako deseterostruko povećanje brzine.



Slika 4. Ciklički voltamogram ireverzibilnog procesa.

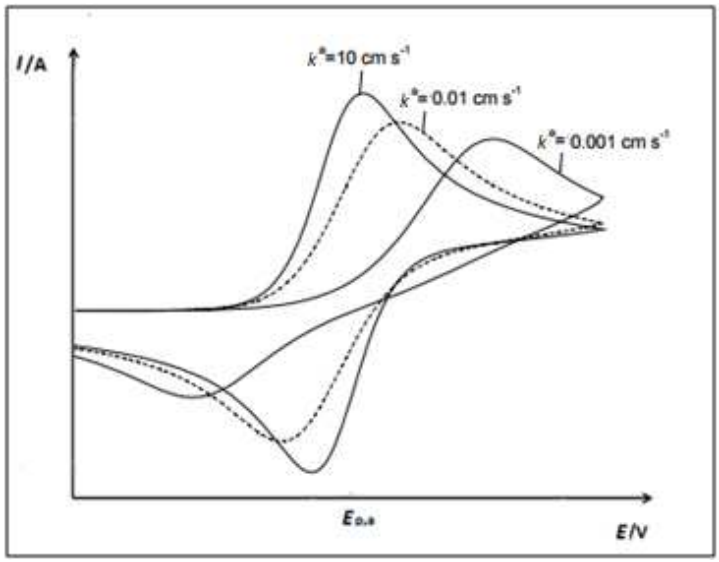
c) Kvazireverzibilan proces

Kod kvazireverzibilnih procesa brzina izmjene naboja i brzina difuzije su usporedive, stoga se procesi kod malih brzina promjene potencijala ponašaju

reverzibilno, dok porastom brzine pokazuju odstupanje od reverzibilnog ponašanja. Ciklički voltamogram pokazuje i katodni i anodni val (*Slika 5.*).

Struja odziva u kvazireverzibilnoj reakciji ovisi o kinetici redoks procesa. Oblik i visina strujnih vrhova ovise o brzini promjene potencijala (v), koeficijentu prijelaza elektrona (α), standardnoj konstanti brzine elektrodne reakcije (k^0) i o difuzijskim koeficijentima oksidirane i reducirane vrste (D_O, D_R). Za razliku od reverzibilnog i ireverzibilnog procesa, vršna struja kvazireverzibilnog vala se povećava s porastom drugog korijena brzine promjene potencijala.

Razlika između potencijala vrha katodnog i anodnog vala veća je od razlike za reverzibilni proces i raste s povećanjem brzine promjene potencijala, jer se potencijal katodnog vrha vala pomiče prema negativnijim vrijednostima.



Slika 5. Ciklički voltamogram kvazireverzibilnog procesa za različite vrijednosti standardnih konstanti izmjene naboja (k^0) (E_0 = 0 V, c_O = 5 mM, v = 1 V s^{-1}, $D_O = D_R = 10^{-5}$ cm^2 s^{-1}).

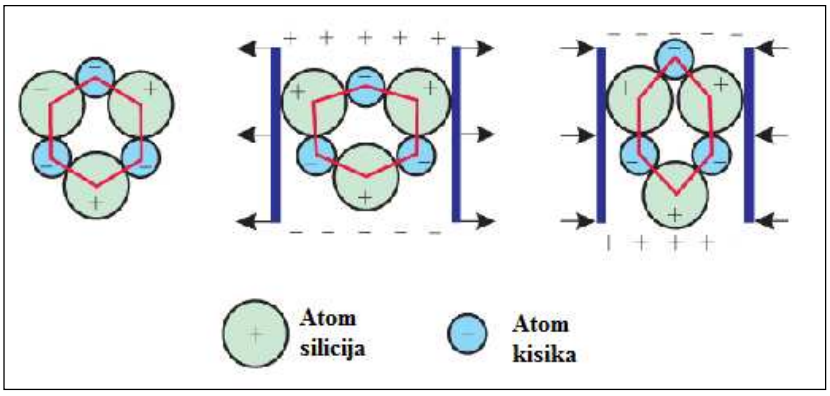
2.2. Kvarcna kristalna mikrovaga

Kvarcna kristalna mikrovaga (engl. *Quartz Crystal Microbalance*, QCM) je detektor mase koji ima mogućnost mjerenja malih promjena mase s osjetljivošću do 0,1 μg cm^{-2}. Rad QCM se temelji na obrnutom piezoelektričnom efektu u kojem pojava električnog polja na piezoelektričnom materijalu inducira njegovu deformaciju(grčki *piezo*; gurati).

Piezoelektrični efekt su, 1880. godine, otkrili Jacques i Pierre Curie. Utvrdili su da primjena mehaničkog naprezanja na površinu acentričnih materijala rezultira električnim potencijalom uzduž kristala, jednake jakosti kao primijenjena sila. Pod mehaničkim opterećenjem se odvija fizičko pomicanje atoma, pa dolazi i do odgovarajuće promjene u dipolnom momentu što uzrokuje električni naboj.

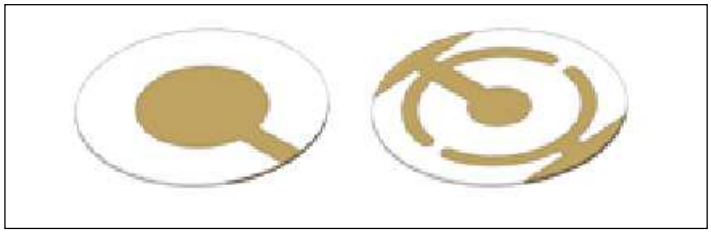
Otkriće piezoelektričnog efekta je dovelo do obrnute tvrdnje, u kojoj primjenom napona na takve tvari dolazi do odgovarajućeg mehaničkog naprezanja. Električno polje inducira preusmjeravanje dipola u acentričnim materijalima, što rezultira pritiskom rešetke i smičnom deformacijom. Smjer smicanja i opseg deformacije ovise o primijenjenom potencijalu. Obrnuti polaritet stvara identično naprezanje, ali u suprotnom smjeru (*Slika 6.*).

Najznačajniji piezoelektrični materijali su kvarc (SiO_2), Seignett-ova sol, turmalin, topaz, kost, svila, drvo, te umjetni materijali poput raznih vrsta keramike, plastike i kristala.



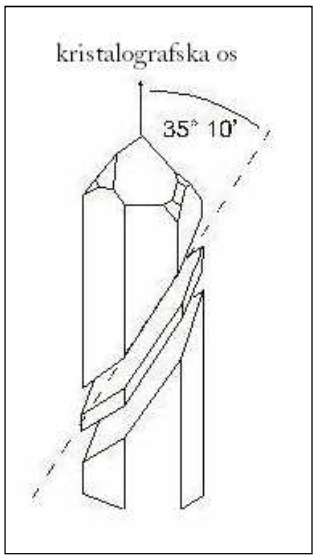
Slika 6. Prikaz obrnutog piezoelektričnog efekta u kristalu kvarca. Kristal a) prije primijenjenog električnog polja, b) u električnom polju i c) u električnom polju s obrnutim polaritetom.

Glavni dio kvarcne mikrovage je kvarcni kristal AT-reza smješten između dvije metalne elektrode (Au, Pt) i spojen na oscilator (*Slika 7.*).



Slika 7. Standardni QCM senzor, AT-reza. Kristal na desnoj prikazuje kontaktnu površinu, a na lijevoj strani senzornu površinu u kontaktu s plinom ili tekućinom.

Pojam AT-reza odnosi se na orijentaciju kristala s obzirom na početni kristal. Orijentacija reza utječe na starenje kristala, stabilnost frekvencije, temperaturne karakteristike i druge parametre. AT-kristal pripremljen je rezanjem kvarca pod kutom od 35° 10' u odnosu na kristalografsku x-os (*Slika 8.*).



Slika 8. Prikaz AT-reza.[4]

Sauerbrey je, 1965. godine prvi prepoznao mogućnosti primjene QCM tehnologije i pokazao kako je promjena mase direktno povezana s promjenom frekvencije kvarcnog kristalnog rezonatora jednostavnom jednadžbom :

$$\Delta f = -C_{\mathrm{f}} \cdot \Delta m \tag{7.}$$

gdje je: Δf – promjena frekvencije, Hz,

Δm – promjena mase, g cm^{-2},

C_f – faktor osjetljivosti kristala, koji iznosi 56.6 µg cm^{-2} za 5 MHz kvarcni kristal AT-reza na sobnoj temperaturi.

Prilikom određivanja promjene mase mjeri se promjena rezonantne frekvencije pa iz jednadžbe 7. proizlazi da porast mase uzrokuje smanjenje rezonantne frekvencije. Treba napomenuti kako je jednadžba 7. primjenjiva samo kada je nanesena masa kruta i jednoliko raspodijeljena, a mjerenja se provode u plinovitoj fazi.

QCM se dugo smatrala za detektor mase samo u plinovitoj fazi, ali njezina je primjena proširena kada su znanstvenici otkrili da se njome može upravljati i u kontaktu s tekućinama i viskoznim naslagama. To otkriće je omogućilo njenu primjenu u novim područjima, kao što je elektrokemija. U kontaktu s tekućinom dolazi do smanjenja frekvencije u ovisnosti o viskoznosti i gustoći (jednadžba 8.).[4]

$$\Delta f = f_0^{2/3} \left(\frac{\eta_L \cdot \rho_L}{\pi \cdot \eta_q \cdot \rho_q} \right)^{1/2} \quad (8.)$$

gdje je: Δf – promjena frekvencije, Hz,

f_0 – osnovna frekvencija kvarcnog kristala, Hz,

ρ_L – gustoća tekućine, g cm^{-3},

μ_L – modul smičnosti tekućine, g cm^{-1} s^{-2},

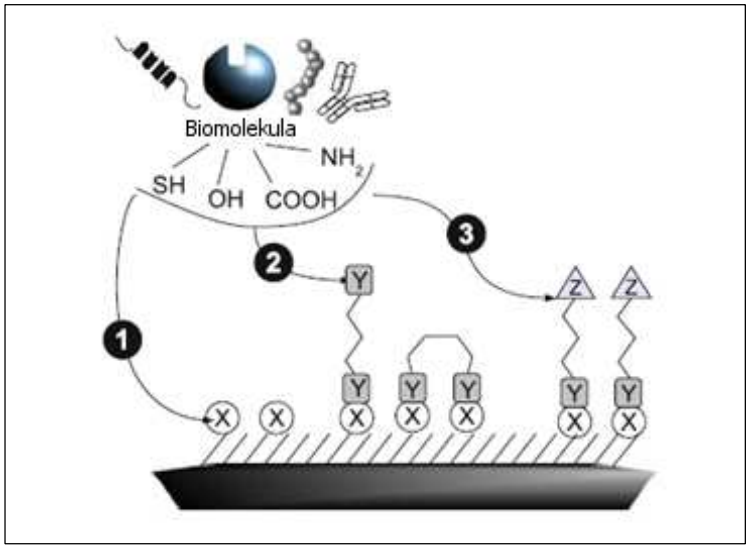
ρ_q – gustoća kvarca, koja iznosi 2,648 g cm^{-3},

μ_q – modul smičnosti kvarca, koji iznosi $2{,}947 \cdot 10^{11}$ g cm^{-1} s^{-2}.

2.3. Strategije kemijskog umrežavanja

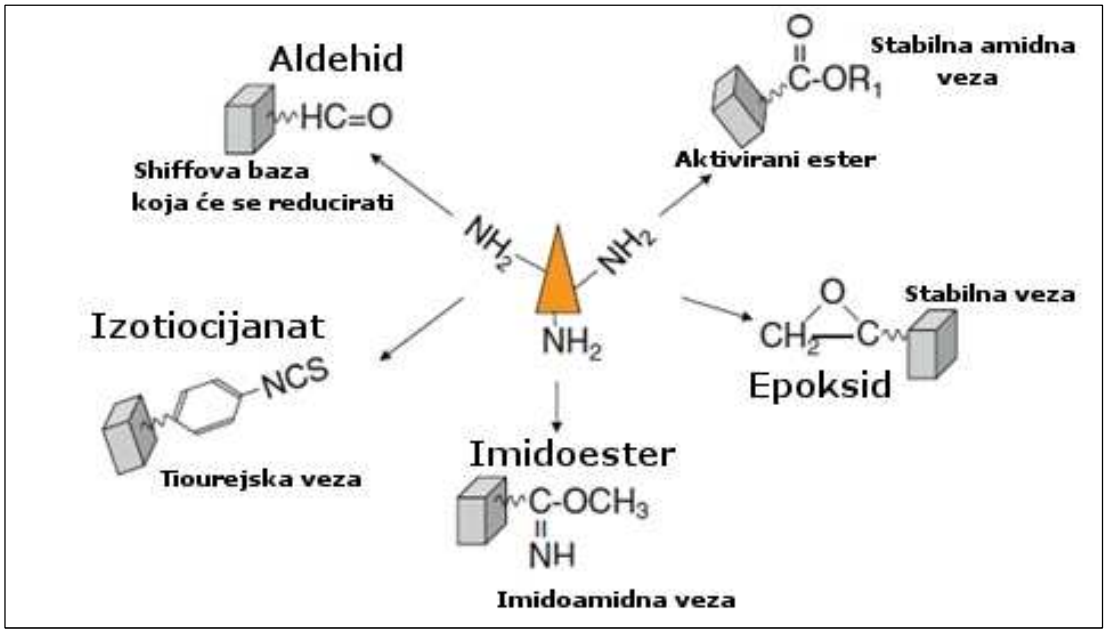
Biosenzori su karakterizirani kao uređaji koji pretvaraju fizički ili biološki događaj u mjerljivi električni signal. Sastoje se od dva elementarna dijela; osjetljivog dijela na kojem se odvija biološki događaj i prijenosnog sustava koji posreduje između biološkog događaja i mjerljivog signala. Učinak biosenzora ovisi o njegovoj sposobnosti imobiliziranja receptora zadržavajući njihovu prirodnu aktivnost, dostupnosti receptora ciljanim molekulama u otopini i što manjoj nespecifičnoj adsorpciji. To se može ostvariti odgovarajućom pripremom senzorske površine.[5]

Razlika između adsorbiranih i umreženih molekula je velika i važna u pogledu primjene za potrebe izrade senzora. Umrežene molekule su vezane na površinu s kojom stvaraju kemijske veze. Ne skidaju se s površine, dok su adsorbirane molekule u ravnoteži s otopinom. Biomolekule se ne mogu vezati direktno na površinu. Stoga se prije imobilizacije biomolekula provodi kemijska modifikacija površine. Modifikacija površine često uključuje nekoliko koraka. Strategija se sastoji najprije od odabira reakcije umrežavanja biomolekula i prilagođavanja površine tom izboru. Nakon što je odabrana kemijska funkcionalizacija površine, slijedi vezanje reaktivne skupine na površinu mjerne elektrode. Sama površina senzora predstavlja svojevrsno ograničenje u raznim izvedbama senzorskih površina. Tipične površine koje se koriste u senzorske svrhe su najčešće anorganske kao silicij, staklo, zlato, ugljik, grafen itd. Na takvoj anorganskoj površini nema prevelikog izbora mogućih kemijskih reakcija i reagensa za umrežavanje s organskim molekulama. Sredstva za povezivanje (*Slika 9.*) su ili homodifunkcionalna ako su dvije reaktivne skupine identične (glutaraldehid) ili heterodifunkcionalna ako su različite. Sredstvo za vezanje koristi se za funkcionalizaciju površine ili za kemijske modifikacije biomolekula.[6]



Slika 9. Glavne strategije kemijskog umrežavanja: (1) izravna reakcija na aktivnu površinu, (2) aktivacija površine homodifunkcionalnim poveznikom, (3) aktivacija površine heterodifunkcionalnim poveznikom.[6]

Najčešće korišten način za vezanje biomolekula na čvrstu podlogu koristi reakcije koje uključuju primarne amino skupine (-NH_2). Korisnost amina proizlazi iz njihovog visokog nukleofilnog karaktera i postojanja raznih načina za kemijsko vezanje amina prikladnih za upotrebu u otopinama. *Slika 10*. sažima glavne pravce vezanja amina. Mnoge reakcijske skupine podliježu reakcijama aciliranja koje dovode do stvaranja peptidne veze.

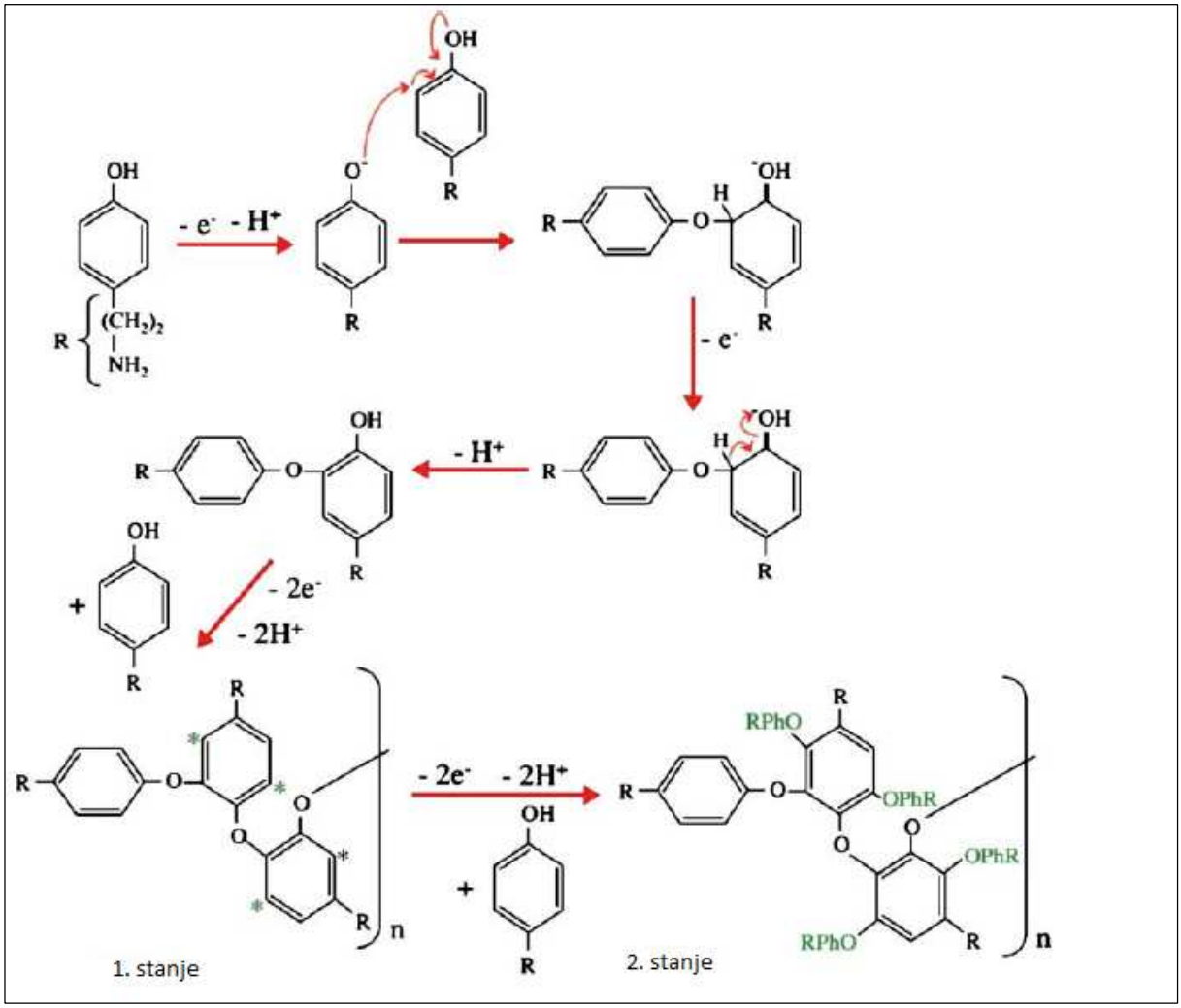


Slika 10. Glavne strategije kemijskog umrežavanja putem amino skupina.[6]

2.4. Politiramin

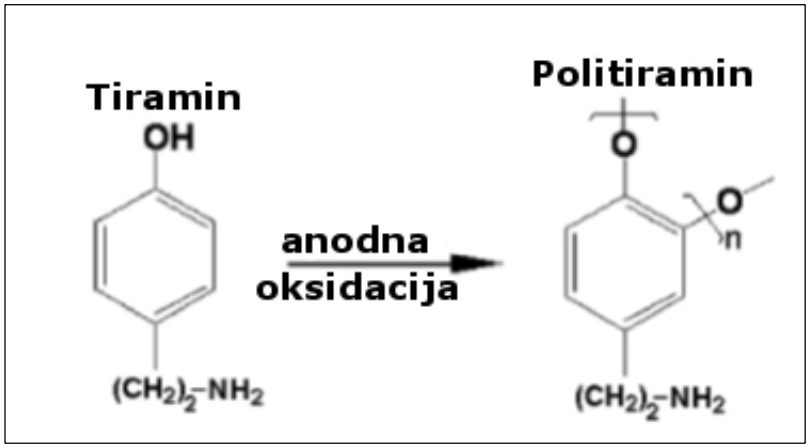
Zbog prisutnosti slobodne amino skupine koja olakšava imobilizaciju molekularnih vrsta, pri izradi senzora sve češće se primjenjuje elektrokemijska polimerizacija fenolnih derivata kao što je tiramin.

Tiramin ili 4-(2-aminoetil) fenol je biološki amin, derivat tirozina, koji nastaje prirodno u mnogim namirnicama, posebno u fermentiranoj hrani. Nije opasan, osim ako se ne uzima u velikim količinama ili u slučajevima kada su inhibirani normalni procesi metabolizma. Tiramin se također identificira kao svestran monomer za formiranje nevodljivih polimera i proizvodnju biosenzora. Postupak i mehanizam elektropolimerizacije tiramina prikazan je na *Slici 11*. Fenolnu skupinu je potrebno oksidirati kako bi se pokrenula reakcija polimerizacije. Prvi korak ovog postupka uključuje formiranje radikal-kationa i dimerizacijski proces koji uključuje 2 elektronsku izmjenu uz gubitak 2 protona. Linearna lančana polimerizacija daje kratke oligomere s malom provodnošću. Nakon toga slijedi rast oligomera koji je karakteriziran formiranjem glatkog filma. Oligomerni lanci su povezani putem reaktivnih mjesta koja su označena zvjezdicom, kao što je prikazano na *Slici 11*. Prisutnost slobodnih amino skupina na lancu polimera omogućuje kovalentno vezanje putem formiranja peptidne veze.[7]



Slika 11. Mehanizam polimerizacije tiramina.[7]

U slučajevima kada su nevodljivi polimeri, kao što je politiramin, korišteni za izradu biosenzora, proizvedeni su osjetljivi biosenzori s brzim odzivom, zbog samoograničavajućeg rasta nastalih polimera. Takvo ponašanje je omogućilo formiranje tanjeg filma s učinkovitijom difuzijom. Nevodljivi polimeri također imaju dodatnu prednost jer su selektivni i mogu spriječiti onečišćenje površine elektrode. Nadalje, debljina nevodljivog sloja je obično 10-100 nm te omogućava brzu difuziju supstrata na elektrodu i od elektrode. To također utječe na linearni odziv u širokom rasponu koncentracije te utječe na osjetljivost biosenzora.



Slika 12. Sloj politiramina sa slobodnim amino skupinama pogodnim za daljnju funkcionalizaciju.[7]

2.5. Nikal

Značaj nikla za živi svijet je otkriven tek sredinom prošlog stoljeća. Wacker i Valle su 1959. godine otkrili nikal u sastavu nukleinskih kiselina, poglavito ribonukleinske kiseline (RNK). Prije toga je nikal promatran samo kao toksičan element. Kako je relativno nedavno otkrivena, važnost nikla u ljudskom organizmu je i dalje malo poznata. Još nije definirana uloga nikla u nukleinskim kiselinama, ali se smatra kako ima strukturni utjecaj na proteine povezane s nukleinskim kiselinama.

Blakeley i Zerner su 1975. godine otkrili da enzim ureaza sadrži nikal u svojoj strukturi. Danas su osim ureaze poznati enzimi koji sadrže nikal hidrogenaza, metil koenzim M reduktaza, CO-dehidrogenaza, Ni-superoksid dismutaza, glioksalaza i cis-trans izomeraza.[9]

U ljudskom tijelu se nalazi oko 10 mg nikla. Najveći udio nikla se nalazi u bubrezima, kostima i tiroidnoj žlijezdi. U krvnoj plazmi se veže na proteine i amino kiseline koji ga transportiraju i raspoređuju u tijelu. U većim količinama svi niklovi spojevi smatraju se kancerogenim, a kod ljudi osjetljivih na nikal mogu izazvati alergijsku reakciju. S druge strane nedovoljna opskrba niklom može narušiti strukturu i ulogu stanične membrane i prekinuti metabolizam željeza.[10]

2.6. Bakar

Bakar je esencijalan metal za sve žive vrste kada je u sastavu enzima. U ljudskom tijelu ga, prema Cartwrightu i Wintrobu ima prosječno 80 mg, te je tako treći element po zastupljenosti, nakon željeza i cinka. Procijenjeno je kako se trećina bakra nalazi u mozgu i jetri, trećina u mišićnom tkivu, a ostatak je raspodijeljen drugim tkivima.

Važna je komponenta mnogih enzima u organizmu koji igraju veliku ulogu u stvaranju energije u stanici. Također se nalazi u enzimu bakar-cink superoksid dismutazi (Cu/Zn SOD) koji služi kao antioksidans značajan za očuvanje organizma od oštećenja nastalog djelovanjem slobodnih radikala. Održavanje prikladnog odnosa bakra i cinka je veoma važno za normalno funkcioniranje organizma. Pored toga, enzimi koji su odgovorni za stvaranje vezivnih proteina tkiva (kolagen i elastin) i enzimi odgovorni za stvaranje melanina (prirodnog pigmenta koji se nalazi u kosi i koži) zahtijevaju bakar. Bakar je također uključen u metabolizam masti i kolesterola, kao i normalnog funkcioniranja inzulina, koji regulira metabolizam šećera.[11]

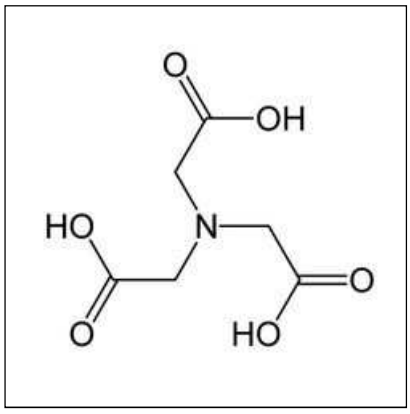
Za ljude su topljivi bakreni spojevi slabo otrovni, ali su zato ioni bakra vrlo snažni otrovi za niže organizme, posebno za bakterije, gljivice, alge, kukce i druge biljne nametnike. To je definiralo veliku upotrebu spojeva bakra kao fungicida. U ljudskom organizmu poremećaji u metabolizmu i mehanizmu izlučivanja bakra mogu dovesti do skupa simptoma poznatih kao Wilson-ova bolest (metabolički poremećaj koji je obilježen akumulacijom bakra u nekim organima, prije svega u jetri i mozgu).

2.7. Nitrilotrioctena kiselina

Kompleksi metalnih iona s organskim ligandima imaju veoma važno mjesto u različitim područjima današnje znanosti. Te organske molekule također sadrže razne nemetalne elemente, kao što su kisik, dušik, sumpor i fosfor, koje se mogu svojim elektronskim parom kovalentno vezati na metal.

Takve komplekse su Morgan i Drew nazvali kelatima. U suštini kelati su kompleksi liganada s metalnim ionom. Ligandi se donorskim atomima vežu na centralni metalni ion kovalentnim vezama. Najpoznatiji primjer je hemoglobin. Zahvaljujući svojoj prstenastoj strukturi glavno obilježje im je velika analitička i komercijalna primjena. Štoviše stabilnost im je za nekoliko redova veličine veća od ostalih kompleksa, zahvaljujući ne samo kelatnom već i entropijskom efektu. Nitrilotrioctena kiselina (NTA) je nakon etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) najčešći reagens za kelatiranje.

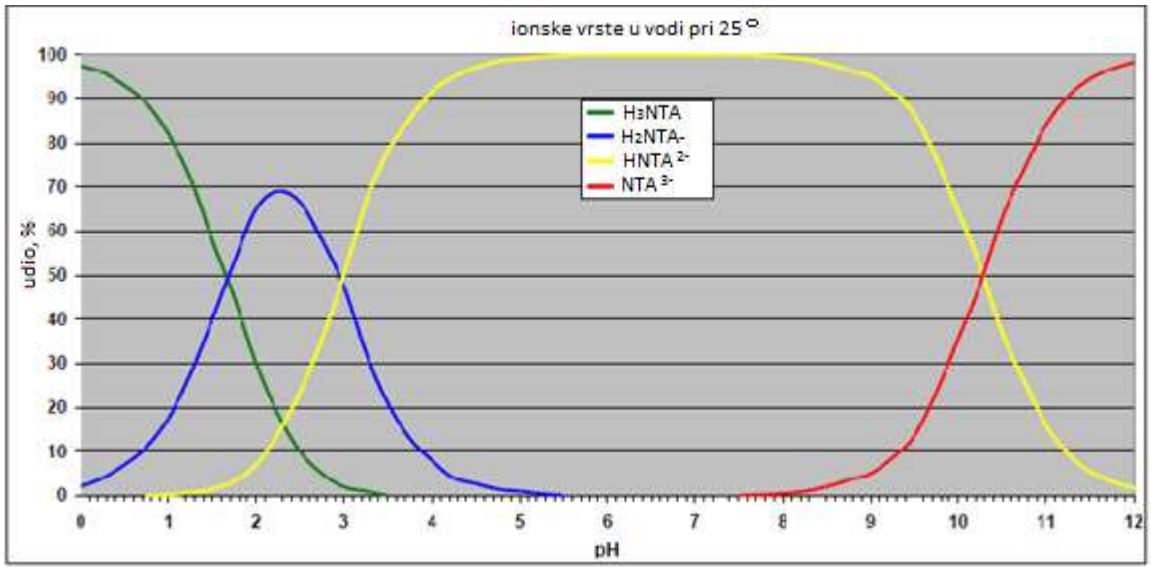
Nitrilotrioctena kiselina (engl. *Nitrilotriacetic acid*) ili skraćeno NTA je tetradentantni ligand empirijske formule $C_6H_9NO_6$ (*Slika 13.*). Koordinacijski broj NTA je 4. Negativni ion NTA^{3-} okruži metalni ion uspostavljajući koordinatne veze sa sva četiri koordinacijska mjesta, tri na kisikovom i jedno na dušikovom atomu.



*Slika 13.*Struktura nitrilotrioctene kiseline.

U nedisociranom obliku NTA je bezbojna krutina u obliku prizmatskih ili igličastih kristalića. U vodenoj otopini disocira u tri stupnja i podešavanjem pH u otopini mogu biti prisutni različiti ionski oblici. Od njih je jedan potpuno disociran, dok su pK_a vrijednosti ostalih redom 1,66, 2,95 te 10,28. Ionske vrste nastale disocijacijom u drugom stupnju su dominantne vrste u prirodnim vodama pri

pH = 3-10. (*Slika 14.*) Topljivost u vodi pri 22,5°C iznosi 1,28 mg mL^{-1}, a pH zasićene otopine je 2,3.[12]



Slika 14. Podaci prikazuju idealnu otopinu NTA u vodi, bez prisutnih metala.[12]

U okolišu se nalazi primarno kao rezultat ispuštanja otpadnih voda u obliku metalnih kompleksa. Za razliku od EDTA lako se razgrađuje i kod obrade otpadnih voda se može skoro u potpunosti ukloniti. Raspada se prvenstveno mikrobiološkim mehanizmom u masenoj koncentraciji od 1 do 100 µg L^{-1} i vremenu od 31 sat [13], a u određenim uvjetima se raspada fotokemijskim i kemijskim reakcijama.

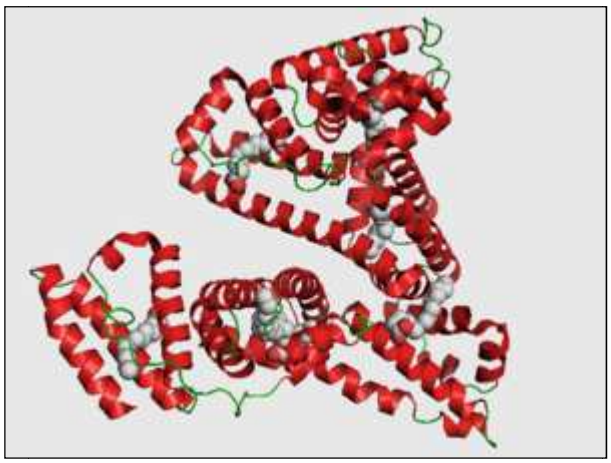
Zbog svoje sposobnosti kompleksiranja NTA se često koristi u deterdžentima za zamjenu natrijevih i kalijevih trifosfata. Kompleksiranjem kalcijevih i magnezijevih iona poboljšava moć pranja. U nekim zemljama je zabranjena ova primjena zbog njenog doprinosa eutrofikaciji. U laboratoriju se koristi kod kompleksiometrijskih titracija. U velikoj mjeri se koristi i kod tretmana napojne bojlerske vode, jer sprječava nastajanje kamenca. Manje se koristi u proizvodnji tekstila, papira i celuloze, u procesima rafiniranja, za uklanjanje sumporovodika iz prirodnog plina, kod obrade polimera, te za izolaciju i pročišćavanje proteina. Također se preporuča za liječenje trovanja manganom i kod trovanja željezom.

2.8. Albumin iz humanog seruma (HSA)

Albumin iz humanog seruma je jedan od najduže poznatih i vjerojatno najviše istražen od svih proteina. Neka njegova fiziološka svojstva su poznata od Hipokratovog vremena, imenovan je i po prvi put proučavan prije skoro dva stoljeća, a prvi put kristaliziran 1989. godine.

Stvara se u jetri i najvećim dijelom se nalazi u krvnoj plazmi (40 do 60 gL^{-1}). Molarna masa HSA iznosi 65 do 70 kDa. Zbog svoje veličine ne prolazi kroz većinu kapilarnih pora, tako da ostaje u plazmi i veže molekule vode. Njegov poluživot je 15 do 20 dana, a razgradnjom se oslobađaju aminokiseline, koje se mogu koristiti u raznim metaboličkim procesima stanica.[14]

Primarna sekvenca HSA je pojedinačan polipeptidni lanac s 585 aminokiselina čvrsto omotanih u tri homologne domene koje se spajaju u molekulu u obliku srca, pomoću 17 pari disulfidnih mostova, dok jedan cistein ostaje slobodan (*Slika 15*.). Unatoč mnogim istraživanjima, uključujući hidrodinamiku, difrakciju X-zrakama, elektronsku mikroskopiju, te strukturno predviđanje, trodimenzionalna struktura HSA je ostala premalo poznata.[15]



*Slika 15.*Struktura albumina.

Važna uloga albumina je regulacija volumena krvi održavanjem onkotskog tlaka, poznatog kao osmotski tlak Sudjeluje i u održavanju stalne pH vrijednosti krvi tj. funkcionira kao pufer krvi. Kod pH vrijednosti 7,4 što je i pH vrijednost venske krvi, albumin se nalazi u obliku aniona sa više od 200 negativnih naboja po molekuli. Upravo zbog tog velikog broja disociranih grupa u molekuli ima veliki kapacitet za

vezanje drugih liganada, a posebno pozitivnih iona, kao što su kalcij, bakar i nikal. Metali različito utječu na strukturu proteina i pridonose ukupnoj strukturnoj stabilnosti. Međutim, albumin veže i nepolarne molekule, kao što su masne kiseline, nekonjugirani bilirubin, zatim lijekovi i hormoni; tiroksin, tironin, kortizol, te aldosteron i transportira ih putem krvi.

U ljudskom tijelu može doći do poremećaja u koncentraciji albumina. Genetski poremećaji, kao što je analbuminemija su jako rijetki, ali zato do smanjene koncentracije albumina, hipoalbuminemije, može doći zbog smanjenog stvaranja ili prevelike razgradnje albumina. Povećanu koncentraciju albumina, hiperalbuminemiju, može izazvati dehidracija.

Duže vrijeme je poznato da se proteini ljudske krvi kao što je hemoglobin i albumin iz humanog seruma mogu podvrgnuti sporoj ne-enzimskoj glikozilaciji, uglavnom formiranjem Schiff-ove baze između ε-amino skupina lizina i molekule glukoze u krvi, što se naziva Maillard reakcija. Ova reakcija može biti inhibirana u prisutnosti antioksidansa. Glikozilacija ima potencijal da mijenja biološku strukturu i funkciju albumina iz humanog seruma. Povišeni glikoalbumin se opaža kod šećerne bolesti.[16]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

- Perklorna kiselina, 70%, $HClO_4$, Merck d.o.o.,
- Kalijev heksacianoferat(II) 3 hidrat, $K_4[Fe(CN)_6] \times 3H_2O$,Kemika d.d.,
- Kalijev heksacianoferat(III), $K_3[Fe(CN)_6]$, Merck d.o.o.,
- Kalijev klorid, KCl, Kemika d.d.,
- Tiramin hidroklorid, min. 98%, Sigma Aldrich,
- Natrijev hidroksid, NaOH, Kemika d.d.,
- Glutaraldehid, GA, ot. 25%, $C_5H_8O_2$, Sigma Aldrich,
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$, Kemika d.d.,
- Natrijev hidrogenfosfat dihidrat $NaHPO_4 \times 2H_2O$, Kemika d.d.,
- Bis (karboksimetil) – L – lizin – hidrat, NTA, Fluka,
- Natrijev borov hidrid, $NaBH_4$,
- Bakrov sulfat pentahidrat, $CuSO_4 \times 5H_2O$, Sigma Aldrich,
- Niklov klorid heksahidrat, $NiCl_2 \times 6H_2O$, Alkaloid Skopje,
- Hepes natrijeva sol, Sigma Aldrich,
- Boratni pufer, $Na_2B_4O_7$, podešen s HNO_3 na pH = 7,00,
- Albumin iz humanog seruma, HSA, Sigma Aldrich.

Sve otopine su pripremljene pri sobnoj temperaturi, otapanjem krutine ili razrjeđivanjem u dvostruko deioniziranoj vodi, osim ako nije drugačije navedeno.

3.2. Instrumentacija

Karakterizacija i modificiranje su provedeni na sljedećim instrumentima:

- Polarograf/striping voltametar model 264A (R&G *Princeton Applied Research*) povezan pomoću ecoder (Edaq, Australija) na osobno računalo
- Potenciostat/galvanostat model 263A (R&G *Princeton Applied Research*) u kombinaciji s detektorom odziva frekvencije model PAR 1025 (PAR, USA)
- Kvarcna mikrovaga (Quartz Crystal Microbalance Digital Controler) model QCM200 (SRS – *Stanford Research Systems*)

Za obradu eksperimentalnih podataka korišteni su programi eDAQ chart verzija v.5.5.5, PowerSuite i OriginPro 8.1.

Mjerenja su provedena u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji, gdje je kao radna elektroda korištena zlatna disk elektroda ili kvarcna kristalna elektroda oslojena zlatom, uz protuelektrodu od platine i Ag|AgCl|3 M KCl referentnu elektrodu.

3.3. Priprema otopina

3.3.1. Priprema otopina za karakterizaciju zlatne i AuQC elektrode

Vodena otopina $HClO_4$, koncentracije 0,01 M pripremljena je razrjeđivanjem 100 µL vodene otopine $HClO_4$, koncentracije 1 M do volumena od 10 mL.

Otopina rabljena za elektrokemijsku karakterizaciju površine elektrode prije i nakon oslojavanja pripremljena je dodavanjem 0,008 dm^3 vodene otopine KCl, koncentracije 0,1 M i po 1 mL otopina $K_4[Fe(CN)_6]$ i $K_3[Fe(CN)_6]$, koncentracija 10 mM.

Otopina kalijevog heksacianoferata(II), koncentracije 10 mM pripremljena je vaganjem 0,0422 g $K_4[Fe(CN)_6]\times 3H_2O$, te otapanjem u deaeriranoj, dvostruko deioniziranoj vodi u tikvici od 10 mL.

Otopina kalijevog heksacianoferata(III), koncentracije 10 mM pripremljena je otapanjem 0,0329 g $K_3[Fe(CN)_6]$ u odmjernoj tikvici volumena 10 mL.

3.3.2. Priprema otopine tiramina

0,1 M tiramin pripremljen je vaganjem 0,1736 g tiramin hidroklorida i otapanjem1 M NaOH u odmjernoj tikvici od 10 mL.

Vodena otopina NaOH, koncentracije 1 M pripremljena je razrjeđivanjem 2 mL vodene otopine NaOH, koncentracije 5 M u odmjernoj tikvici od 10 mL.

3.3.3. Priprema otopina za funkcionalizaciju AuQC elektrode

Otopina NTA, koncentracije 0,05 M pripremljena je otapanjem 0,0700 g bis (karboksimetil) – L – lizin – hidrata u odmjernoj tikvici volumena 5 mL.

Otopina natrijevog borovog hidrida koncentracije 0,04 M pripremljena je otapanjem 0,0080 g $NaBH_4$ u odmjernoj tikvici volumena 5 mL.

Otopina bakrovih iona, koncentracije 0,2 M pripremljena je otapanjem 0,4994 g $CuSO_4 \times 5H_2O$ u odmjernoj tikvici volumena 0,01 dm^3.

Otopina niklovih iona, koncentracije 0,2 M pripremljena je otapanjem 0,4754 g $NiCl_2 \times 6H_2O$ u odmjernoj tikvici volumena 10 mL.

3.3.4. Priprema otopine HSA

Otopina HSA, koncentracije 0,05 mM pripremljena je otapanjem 0,0038 g HSA u 1 mL 0,5 M Hepes pufera, pH = 8,60.

Otopina HSA, koncentracije 1 mM pripremljena je otapanjem 0,0670 g HSA u 1 mL 0,5 M Hepes pufera, pH = 8,60.

3.4. Opis mjerenja

3.4.1. Priprema površine zlatne elektrode

1. Mehanička obrada zlatne elektrode ($d = 1$ mm) provedena je poliranjem aluminijevim oksidom promjera čestica 0,35 μm i silicijevim karbidom promjera čestica 10,5 i 15 μm, nakon čega je elektroda isprana u demineraliziranoj vodi primjenom ultrazvučne kupelji.

2. Kemijski, uranjanjem u otopinu 3 mL koncentrirane H_2SO_4 i 1 mL koncentrirane H_2O_2 (*piranha* otopina).

3. Elektrokemijski, cikliziranjem u 0,1 M $HClO_4$ u rasponu potencijala od 0,0 do 1,5 V s brzinom promjene potencijala 50 mV s^{-1}.

3.4.2. Karakterizacija površine zlatne elektrode

Ciklički voltamogram zlatne elektrode snimljeni su u rasponu potencijala od 0,2 do 0,7 V različitim brzinama promjene potencijala. Mjerenja su provedena u vodenoj otopini KCl koja je sadržavala i 1 mM $[Fe(CN)_6]^{4-}$ i 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-}$.

Elektrokemijska impedancijska spektroskopija provedena u rasponu frekvencija od 100 kHz do 100 mHz u 0,08 M vodenoj otopini KCl koja je sadržavala i 1 mM $[Fe(CN)_6]^{4-}$ i 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-}$. Prilikom mjerenja primijenjena je amplituda pobudnog signala u iznosu ± 5 mV, uz DC potencijal od 200 mV.

3.4.3. Oslojavanje zlatne elektrode politiraminom

Oslojavanje zlatne elektrode politiraminom provedeno je cikličkom voltametrijom. Mjerenja su provedena u 1 M alkalnoj otopini (NaOH) koja je sadržavala i 0,1 M tiramina. Cikliziranje je izvedeno u rasponu potencijala od 0 do 0,8 V brzinom promjene potencijala 50 mV s^{-1}.

3.4.4. Karakterizacija površine zlatne elektrode oslojene politiraminom

Za karakterizaciju oslojene površine zlatne elektrode snimljen je ciklički voltamogram u rasponu potencijala od 0 do 0,6 V brzinom promjene potencijala od

50 mV s^{-1}. Snimanje je izvedeno u 0,08 M vodenoj otopini KCl koja je sadržavala 1 mM $[Fe(CN)_6]^{4-}$ i 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-}$.

3.4.5. Oslojavanje politiraminom i funkcionalizacija zlatne kvarcne kristalne elektrode

Nakon oslojavanja politiraminom slijedi vezanje glutaraldehida i amino skupine politiramina. Postupak vezanja izvodi se uranjanjem oslojene elektrode u otopinu glutaraldehida pripremljenog u 0,1 M fosfatnom puferu (fp), pH = 7,00, [*V*(GA)/*V*(fp) = 1/4] u trajanju od 2 sata.

Otopina NTA, koncentracije 0,05 M je pripremljena otapanjem 0,0700 g bis (karboksimetil) – L – lizin – hidrata u odmjernoj tikvici volumena 5 mL.

Vezanje NTA na površinu Au/politiramin/GA elektrodu izvedeno je uranjanjem u otopinu NTA u trajanju od 24 sata.

Redukcija dvostruke CN veze izvedena je pomoću 0,04 M otopine natrijevog borovog hidrida pripremljene otapanjem 0,0080 g $NaBH_4$ u odmjernoj tikvici volumena 5 mL.

3.4.6. Modifikacija AuQC/politiramin/glutaraldehid elektrode Cu^{2+} ionima

AuQC elektroda uronjena je u1 mL boratnog pufera, pH = 7,00 te je dodano 25 µL 0,2 M otopine bakrovih iona. Nakon vezanja bakra (*t* = 5 min) elektroda je isprana deioniziranom vodom. Tako je izvedeno funkcionaliziranje AuQC elektrode NTA-Cu kompleksom.

3.4.7. Modifikacija AuQC/politiramin/glutaraldehid elektrode Ni^{2+} ionima

AuQC elektroda uronjena je u 1 mL boratnog pufera, pH = 7,00 te je dodano 25 µL 0,2 M otopine niklovih iona. Nakon vezanja nikla (*t* = 5 min) elektroda je isprana deioniziranom vodom. Tako je izvedeno funkcionaliziranje AuQC elektrode NTA-Ni kompleksom.

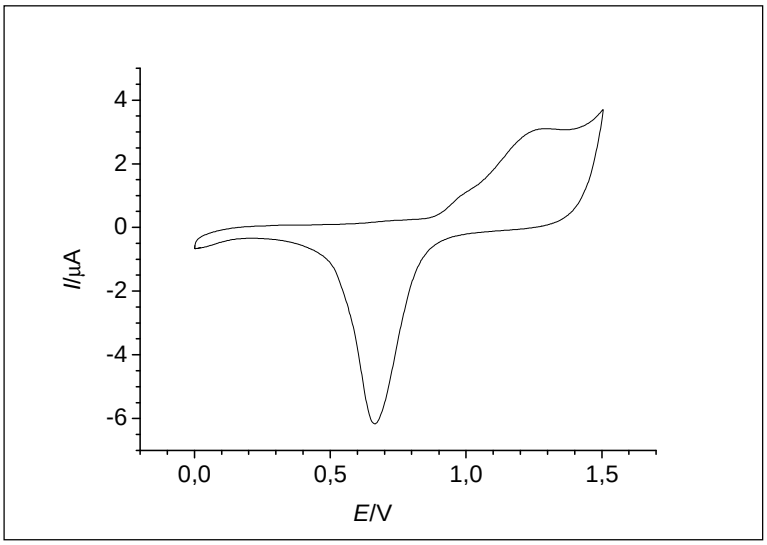
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Karakterizacija površine zlatne elektrode

Na *Slici 16*. prikazan je ciklički voltamogram zlatne elektrode u 0,1 M otopini perklorne kiseline ($HClO_4$). Voltamogram je snimljen brzinom promjene potencijala od 50 mV s^{-1}. Vidljivi su karakteristični oksidacijski i redukcijski valovi zlata. Karakterističan val koji je vidljiv pri potencijalu od 0,68 V odgovara redukciji monosloja zlatnog oksida. Budući da je količina naboja za redukciju monosloja zlatnog oksida poznata i iznosi 482 µC cm^{-2}, integriranjem redukcijskog vala odredili smo ukupnu količina naboja utrošenog za redukciju. Određena je ukupna količina naboja snimljene elektrode u iznosu od 10,6 µC cm^{-2} i iz toga možemo izračunati stvarnu površinu zlatne elektrode.

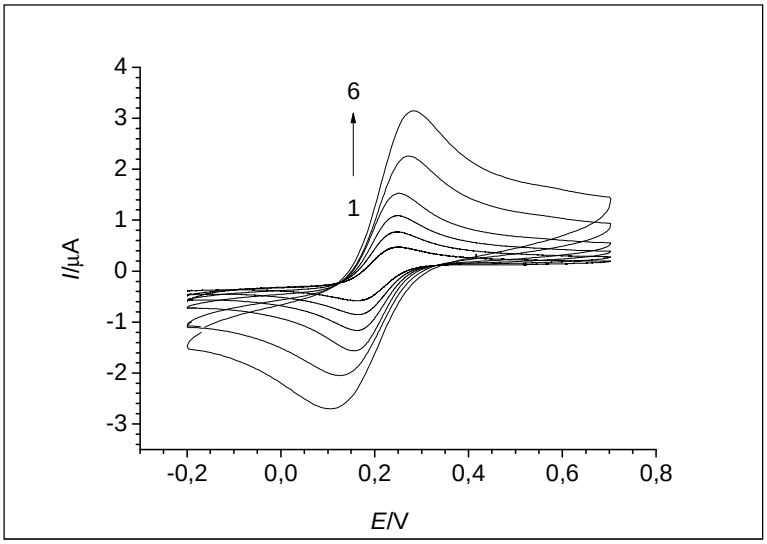
$$A = \frac{10{,}6\ \mu C\ cm^{-2}}{482\ \mu C\ cm^{-2}} \cdot 1\ cm^2 = 0{,}0207\ cm^2 \qquad (9)$$

Iz poznate geometrijske površine elektrode od 0,00785 cm^2 izračunali smo faktor hrapavosti koji iznosi 2,64.

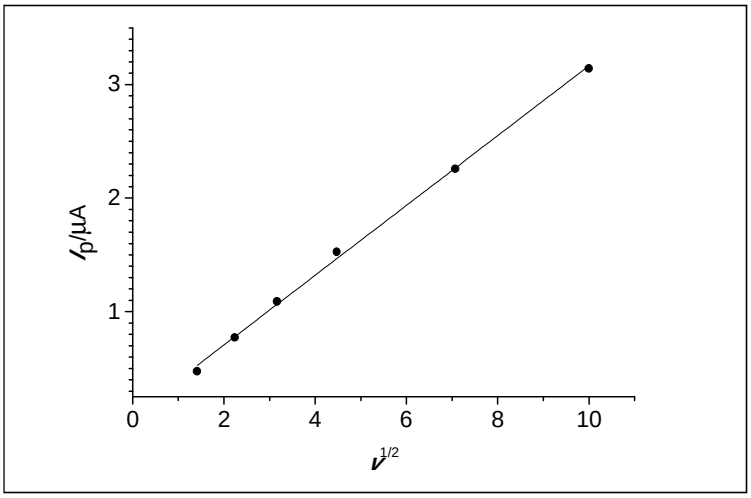


Slika 16. Ciklički voltamogram Au elektrode snimljen u 0,1 M $HClO_4$. Kao referentna elektroda uporabljena je Ag|AgCl|3 M KCl elektroda. Voltamogram je snimljen brzinom promjene potencijala od 50 mV s^{-1}.

Slika 17. pokazuje cikličke voltamograme Au elektrode snimljene u 0,08 M vodenoj otopini KCl koja sadrži 1 mM $[Fe(CN)_6]^{4-}$i 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-}$. Voltamogrami su snimljeni različitim brzinama promjene potencijala: 2, 5, 10, 20, 50 i 100 mV s^{-1} u intervalu potencijala od –0,2 do 0,7 V. Na slici je vidljivo kako s porastom brzine potencijala raste visina katodnog i anodnog strujnog vrha. Također se potencijal katodnog strujnog vrha pomiče prema negativnijim vrijednostima, a potencijal anodnog strujnog vrha prema pozitivnijim vrijednostima. Na taj način raste i razlika potencijala strujnih vrhova. Na *Slici 18.* Možemo vidjeti kako se vršna struja oksidacijskog vala linearno povećava porastom drugog korijena brzine promjene potencijala, što je dokaz da je difuzija kontrolirajući mehanizam.



Slika 17. Ciklički voltamogrami Au elektrode snimljeni u 0,08 M vodenoj otopini KCl koja sadrži 1 mM $[Fe(CN)_6]^{4-}$i 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-}$. Kao referentna elektroda uporabljena je Ag|AgCl|3 M KCl elektroda. Voltamogrami su snimljeni brzinom promjene potencijala od: 2 (1); 5 (2); 10 (3); 20 (4); 50 (5) i 100 mV s^{-1} (6).

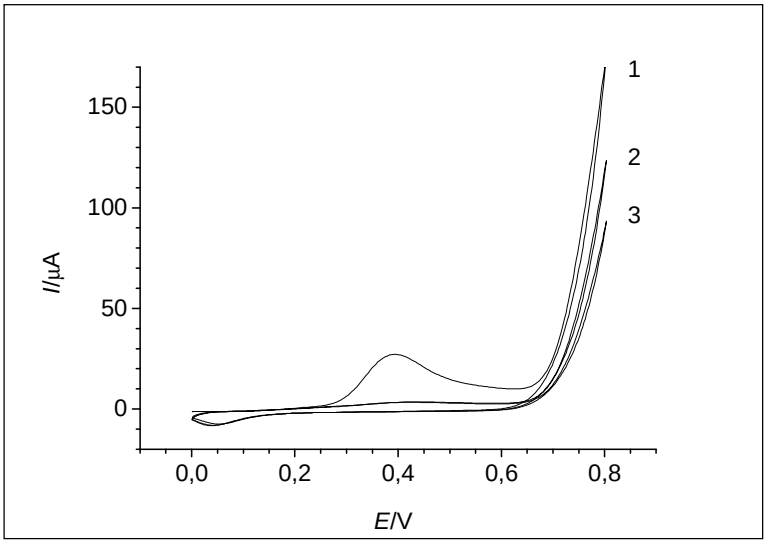


Slika 18. Ovisnost vršne struje oksidacijskog vala cikličkih voltamograma Au elektrode o drugom korijenu brzine promjene potencijala. Ciklički voltamogrami snimljeni su primjenom istih eksperimentalnih parametara kao i na *Slici 17*.

Na *Slici 18*. prikazana je linearna ovisnost vršne struje oksidacijskog vala cikličkih voltamograma Au elektrode o drugom korijenu brzine promjene potencijala (Ip = – 0,0547 + 0,3641 $v^{1/2}$). Linearnost je potvrđena iznosom R^2 tj. sume kvadrata odstupanja koji iznosi 0,99969.

4.2. Oslojavanje zlatne elektrode politiraminom

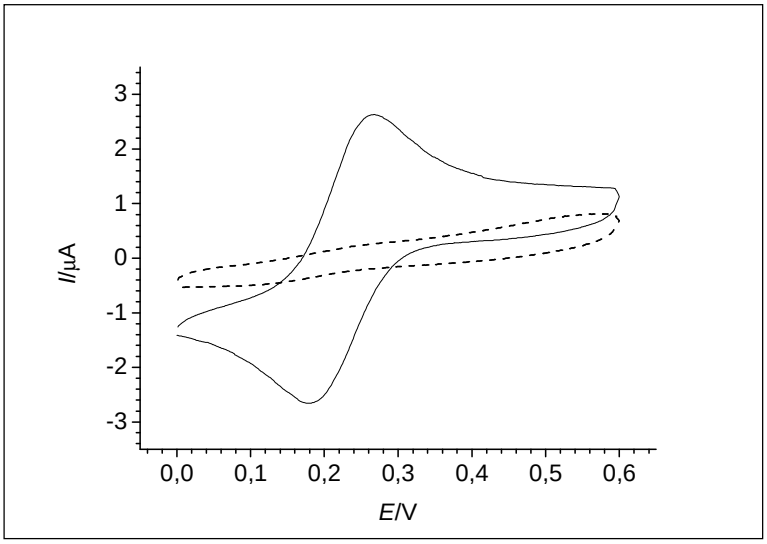
Slika 19. prikazuje oslojavanje zlatne elektrode politiraminom cikličkom voltametrijom iz otopine koja sadrži 1 M NaOH i 0,1 M tiramina. Cikliziranje je provedeno brzinom promjene potencijala od 50 mV s^{-1}. Kako ne dolazi do redukcije nastalog sloja politiramina, ovaj proces je potpuno ireverzibilan i ciklički voltamogram pokazuje samo anodni val. Oksidacija počinje pri potencijalu od 0,25 V i dostiže maksimum struje pri 0,4 V. Kako raste broj ciklusa opada propusnost elektrode zbog veće količine politiramina pohranjenog na elektrodi, stoga dolazi do znatnog opadanja struje. Najveći pad struje je nakon prvog ciklusa iz čega je vidljivo da je najveća količina politiramina nastala u prvom ciklusu.



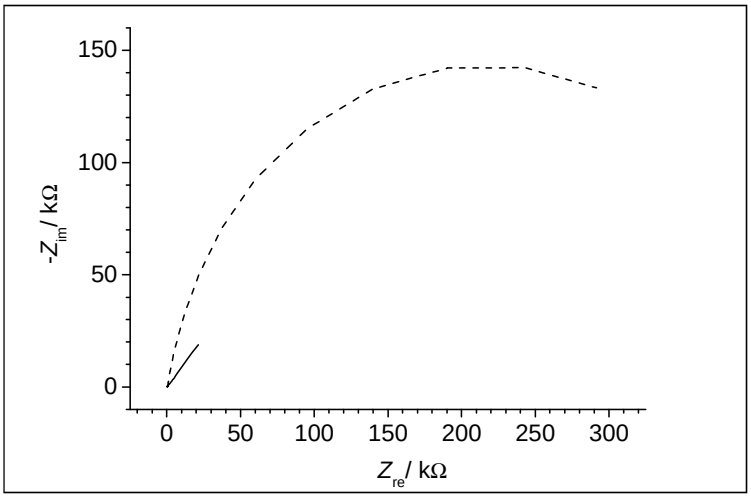
Slika. 19. Ciklički voltamogrami (ciklusi od 1 do 3) Au elektrode snimljeni u otopini 1 M NaOH i 0,1 M tiramina. Kao referentna elektroda uporabljena je Ag|AgCl|3 M KCl elektroda. Voltamogrami su snimljeni uz brzinu promjene potencijala od 50 mV s^{-1}.

4.3. Karakterizacija površine zlatne elektrode oslojene politiraminom

Slika 20. prikazuje usporedbu cikličkog voltamograma same zlatne elektrode i elektrode oslojene politiraminom. Voltamogrami su snimljeni u 0,08 M vodenoj otopini KCl koja sadrži 1 mM $[Fe(CN)_6]^{4-}$i 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3}$ brzinom promjene potencijala od 50 mV s^{-1}. Ciklički voltamogram elektrode oslojene politiraminom pokazuje znatno smanjenje struje, što je dokaz nastalog sloja politiramina. *Slika 21*. prikazuje Nyquistov prikaz elektrokemijske impedancijske spektroskopije (EIS) za mjerenja provedena u rasponu frekvencija od 100 kHz do 100 mHz u istoj otopini. Iz nje, isto tako možemo primijetiti znatno veći otpor prijenosu naboja kod elektrode oslojene politiraminom.



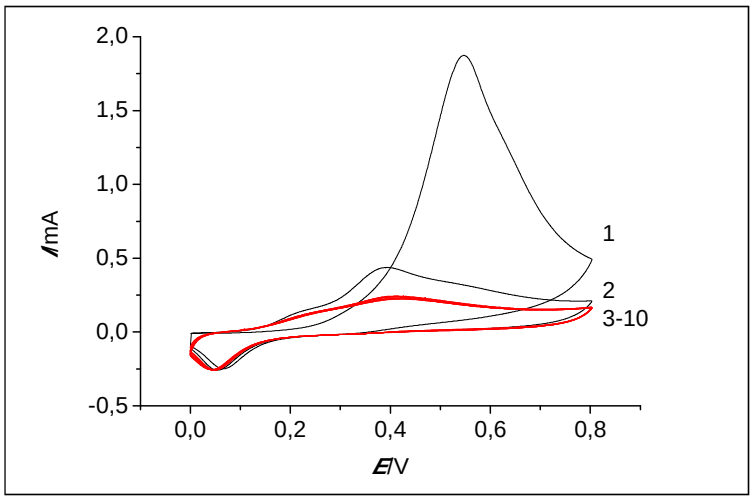
Slika 20. Ciklički voltamogram Au (—) i Au/pTyr (- - -) elektrode snimljeni su u 0,08 M vodenoj otopini KCl koja sadrži 1 mM $[Fe(CN)_6]^{4-}$ i 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-}$. Kao referentna elektroda uporabljena je Ag|AgCl|3 M KCl elektroda. Cikliziranje provedeno brzinom promjene potencijala 50 mV s^{-1}.



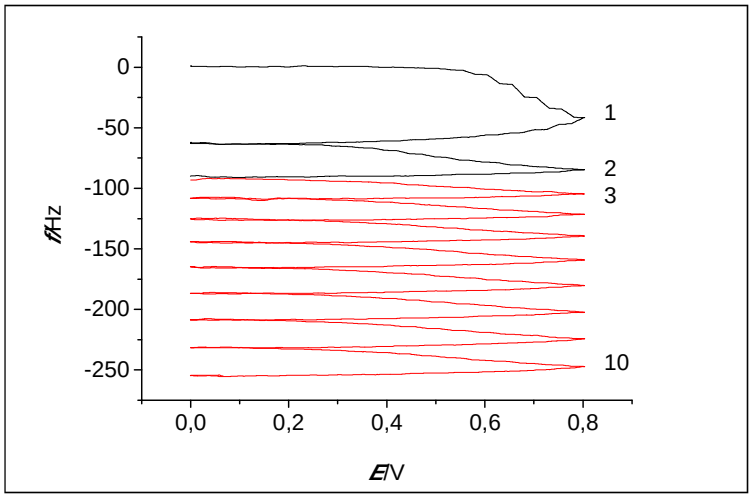
*Slika 21.*Elektrokemijska impedancijska spektroskopija (Nyquistov prikaz) prikazuje mjerenja provedenih u rasponu frekvencija od 100 kHz do 100 mHz s Au (—) i Au/pTyr (- - -) elektrodom. Mjerenja su izvedena u 0,08 M vodenoj otopini KCl koja sadrži 1 mM $[Fe(CN)_6]^{4-}$ i 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-}$. Prilikom mjerenja primijenjena je amplituda pobudnog signala u iznosu ± 5 mV, pri DC potencijalu od 200 mV.

4.4. Oslojavanje politiraminom kvarcne kristalne elektrode oslojene zlatom

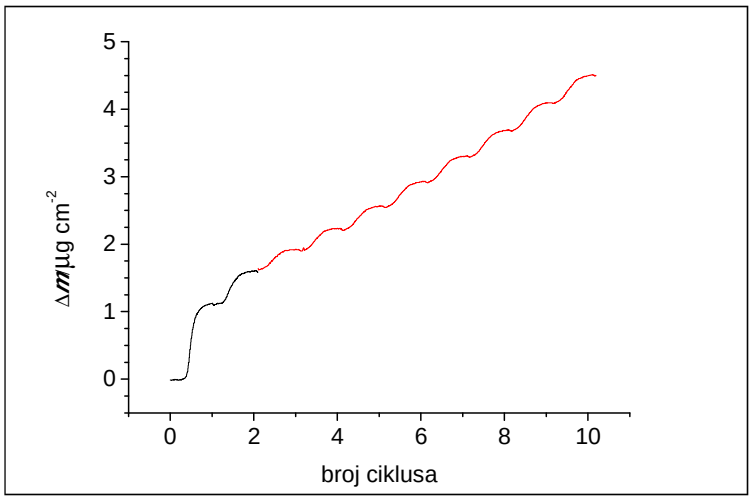
Slika 22. prikazuje oslojavanje kvarcne kristalne elektrode (AuQCE) na kojoj su provedena daljnja mjerenja. Kao i kod zlatne disk elektrode oslojavanje politiraminom provedeno je cikličkom voltametrijom u otopini 1 M NaOH i 0,1 M tiramina brzinom promjene potencijala od 50 mV s^{-1}. Prikazani su ciklusi od 1 do 10. Ponovno je vidljivo kako je najveći pad struje nakon prvog ciklusa, nakon čega se formira sve manji sloj politiramina. Isto tako na *Slici 23*. možemo vidjeti kako se frekvencija titranja AuQC elektrode smanjuje nastajanjem sloja politiramina iz čega se može izračunati i masa nastalog sloja u svakom ciklusu, (*Slika 24*.) primjenom jednadžbe 7.



Slika. 22. Ciklički voltamogrami (ciklusi od 1 do 10) snimljeni na zlatom oslojenom kvarcnom kristalu u 1 M NaOH i 0,1 M tiramina. Kao referentna elektroda uporabljena je Ag|AgCl|3 M KCl elektroda. Cikliziranje je provedeno brzinom promjene potencijala od 50 mV s^{-1}.



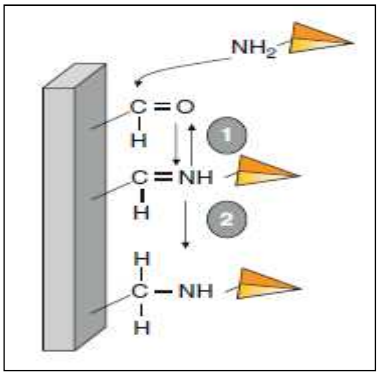
Slika. 23. Promjena frekvencije titranja zlatom oslojene kvarcne kristalne elektrode prilikom snimanja 10 ciklusa cikličkom voltametrijom u 1 M NaOH i 0,1 M tiraminu. Eksperimentalni parametri su identični parametrima na *Slici 22*.



Slika. 24. Promjena mase uslijed elektropolimerizacije tiramina na zlatom oslojenom kvarcnom kristalu. Eksperimentalni parametri su identični parametrima na *Slici 23*.

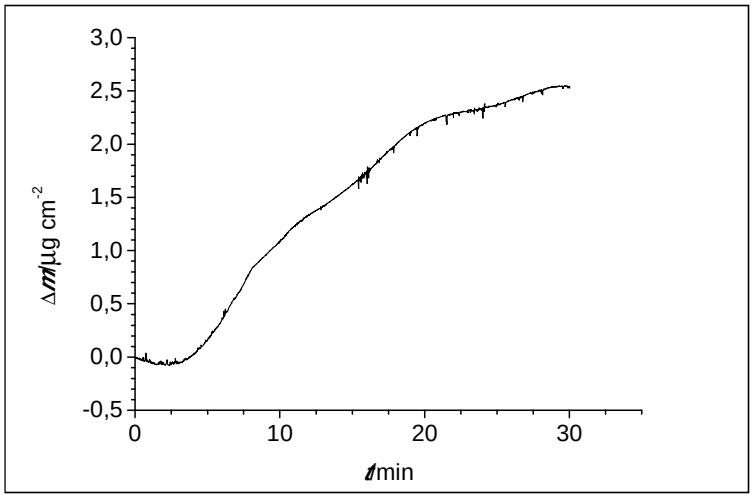
4.5. Funkcionalizacija AuQC elektrode

Kako bi vezali NTA na AuQC elektrodu modificiranu politiraminom potrebno je stvoriti peptidnu vezu, reakcijom amino skupine politiramina i glutaraldehida. Funkcionalizacija amino skupine pomoću aldehida odvija se formiranjem Schiff-ove baze (imino skupine). Kako bi održali imobilizaciju, imino skupina se mora reducirati u stabilan sekundarni amin pomoću borovog hidrida. Ova reakcija, također deaktivira preostale neizreagirane aldehidne skupine u alkoholne skupine koje ne uzrokuju nespecifičnu imobilizaciju. Sve navedeno je shematski prikazano na *Slici 25*.

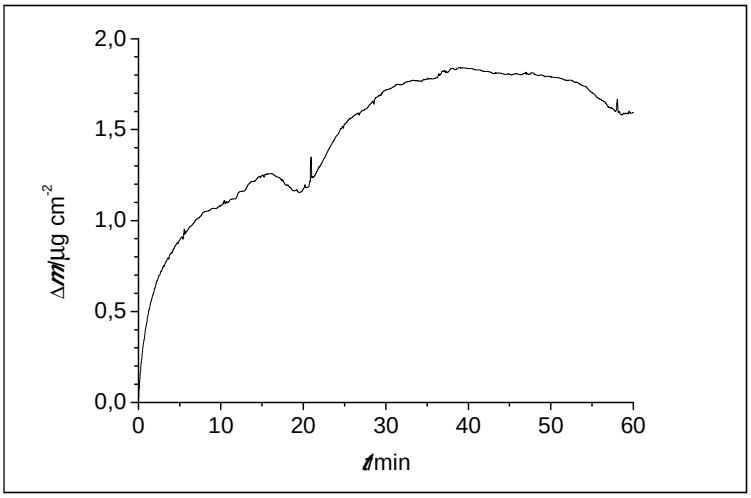


Slika 25. 1) Reakcija aldehida i amino skupine i 2) prateća stabilizacija kemijskom redukcijom.[6]

Porast mase AuQC elektrode prilikom vezanja glutaraldehida prikazana je na *Slici 26.*, a prilikom vezanja NTA na *Slici 27.*



Slika. 26. Promjena mase uslijed vezanja glutaraldehida na AuQC elektrodu prethodno oslojenu politiraminom.



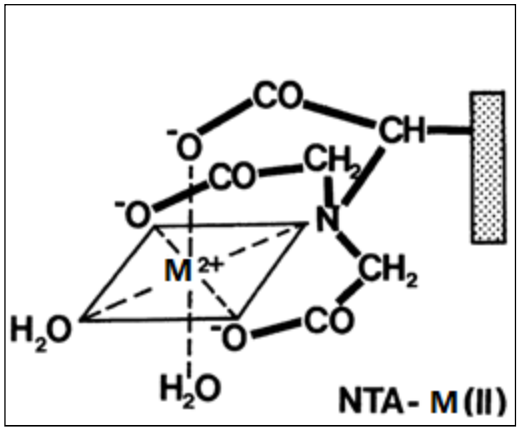
Slika. 27. Promjena mase uslijed vezanja NTA glutaraldehidom na AuQC elektrodu prethodno oslojenu politiraminom.

Na *slici 26.* zamjećuje se početan porast mase uslijed vezanja glutaraldehida. Međutim, već nakon 20 minuta ne dolazi do daljnjeg povećanja mase što upućuje na završetak kemijske reakcije odnosno da su amino skupine politiramina izreagirale s aldehidom.

Na slici 27. se isto tako zamjećuje početan porast mase uslijed vezanja NTA. NTA pokazuje usporenje u porastu mase nakon 35 minute. Kasnije zasićenje površine molekulama NTA može se pripisati razlici u veličini molekule NTA i glutaraldehida.

4.6. Vezanje HSA na funkcionaliziranu AuQC elektrodu

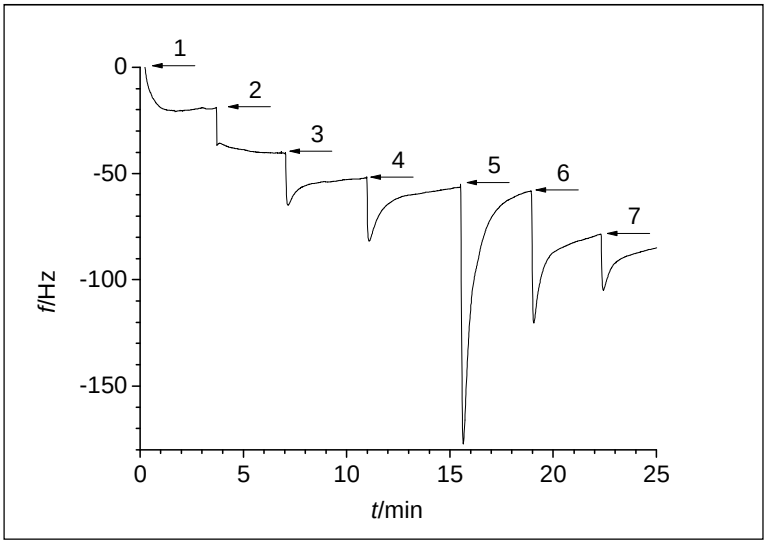
Imobilizirana NTA je prikladna za kompleksiranje metalnih iona koordinacijskog broj šest, budući da su tada dvije valencije dostupne za reverzibilno vezanje biopolimera. Takav metalni kompleks je posebno pogodan za vezanje proteina označenih histidinom. Metalni ioni koji dolaze s funkcionalne površine formiraju oktaedarski koordiniran kompleks sa šest liganada (*Slika 28.*).



Slika 28. Shema kompleksiranja Ni^{2+} i imobilizirane NTA.

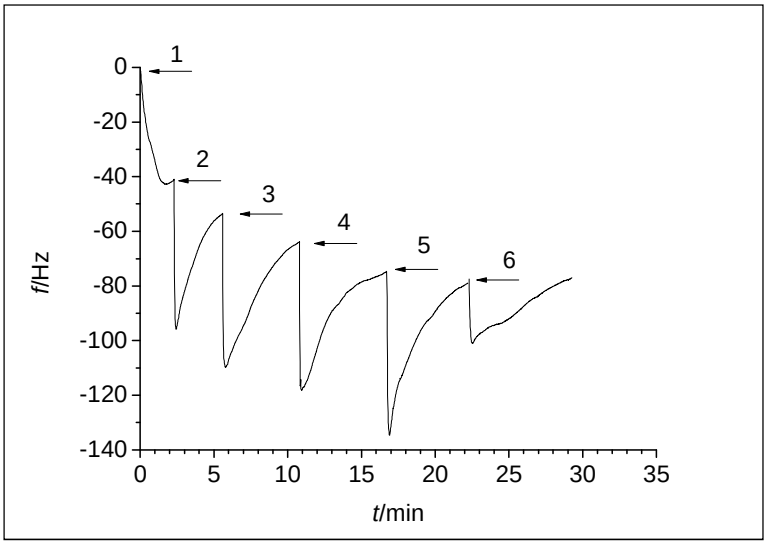
Imobilizacija HSA je provedena vezanjem Ni^{2+} i Cu^{2+} iona na površinu. Prije vezanja HSA otopini je dodan boratni pufer pH = 7,00.

Na *Slici 29.* i *30.* možemo vidjeti promjenu frekvencije titranja AuQCE prilikom vezanja HSA na kompleks NTA-Cu. Frekvencija se smanjuje što znači da masa na elektrodi raste. Na *Slici 29*. Prikazana je promjena prilikom dodavanja redom: 10, 10, 10, 10, 20, 20, 20 μL otopine HSA u 1 mL pufera, a na *Slici 30*. 2, 2, 2, 2, 4, i 4 μL otopine HSA u 1 mL pufera, *c*(HSA) = 1 mM.



Slika 29. Promjena frekvencije uslijed vezanja HSA na modificiranu AuQC elektrodu funkcionaliziranu s Cu^{2+} vezanim na sloj NTA. U 1 mL otopine 0,01 M boratnog pufera pH = 7,00 dodavano je redom: 10, 10, 10, 10, 20, 20, 20 μL 1 mM otopine HSA.

Na *Slici 29*. uočava se smanjenje frekvencije uzastopnim dodavanjem otopine HSA i to dodacima od 10 μL otopine HSA iste koncentracije. Međutim, već nakon četvrtog dodatka zapaža se značajno manja promjena frekvencije koja upućuje na prestanak kompleksnog vezanja HSA. Dakle, površina je zasićena analitom. Radi toga je eksperiment ponovljen dodacima otopina HSA pet puta manjeg volumena.

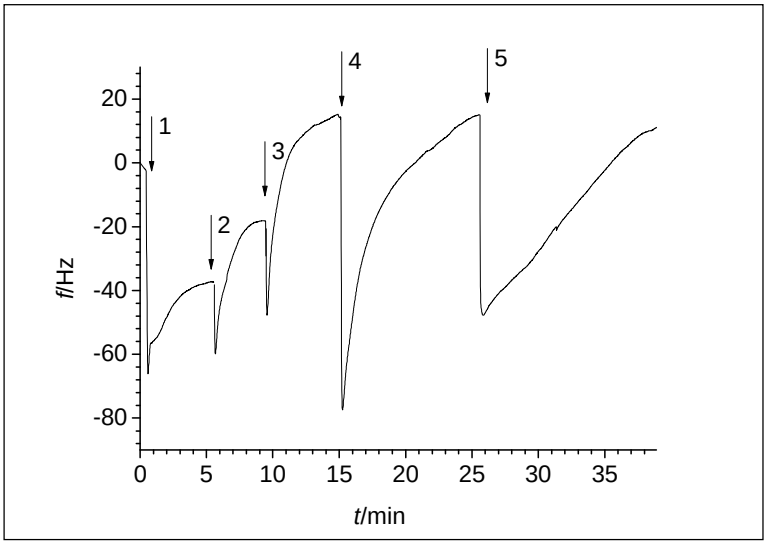


Slika 30. Promjena frekvencije uslijed vezanja HSA na modificiranu AuQC elektrodu funkcionaliziranu s Cu^{2+} vezanim na sloj NTA. U 1 mL otopine 0,01 M boratnog pufera pH = 7,00 dodavano je redom: 2, 2, 2, 2, 4, i 4 μL 1 mM otopine HSA.

Primjećuje se smanjenje frekvencije u otopini HSA pet puta manje koncentracije, međutim već nakon petog dodatka površina senzora je zasićena analitom te se odziv ne mijenja. Za očekivati je bilo da će se moći dodati veći broj dodataka s obzirom na ponašanje elektrode na *Slici 29*. Budući da se to nije dogodilo možemo pretpostaviti da je jedan dio HSA ostao vezan na površini odnosno da dekompleksiranje otopinom perklorne kiseline nije bilo provedeno u potpunosti.

Na *Slici 31*. prikazana je promjena frekvencije titranja AuQC elektrode prilikom pokušaja vezanja HSA na kompleks NTA-Ni. Dodavano je pet alikvota od 10 μL 0,05 mM otopine HSA. Možemo vidjeti kako frekvencija titranja raste, suprotno našim očekivanjima, što znači da se masa na elektrodi smanjuje. To se može objasniti stvaranjem jačeg kompleksa niklovih iona s HSA nego s NTA. Niklovi ioni stvaraju komplekse s HSA, napuštaju elektrodu i prelaze u otopinu.

Time se povećava frekvencija titranja elektrode zbog smanjenog masenog opterećenja.



Slika 31. Promjena frekvencije uslijed vezanja HSA na modificiranu AuQCE funkcionaliziranu s Ni^{2+} vezanim na sloj NTA. U 1 mL otopine 0,01 M boratnog pufera pH = 7,00 dodavano je pet alikvota od 10 μL 0,05 mM otopine HSA.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu pokazano je oslojavanje zlatne elektrode politiraminom. Prisutnost slobodnih amino skupina na lancu politiramina omogućuje kovalentno vezanje formiranjem peptidne veze. Peptidna veza je formirana reakcijom amino skupine i glutaraldehida i na taj način je omogućena specifična imobilizacija NTA. Stvaranjem metalnog kompleksa NTA-Cu moguća je imobilizacija HSA, dok je konstanta ravnoteže kompleksa NTA-Ni manja od HSA-Ni, zbog čega je vezanje HSA na NTA-Ni kompleks bilo neuspješno.

Dokaz nastalog politiramina je pad struje na odzivnom voltamogramu, jer nastali sloj usporava brzinu difuzije redoks para iz otopine do elektrode. Polimerizacija tiramina koja se odvija oksidacijom fenolne skupine je potpuno ireverzibilan proces, što na cikličkom voltamogramu vidimo kao anodni val. Prednost politiramina kod izrade senzora proizlazi upravo iz navedene irevrzibilnosti i njegove neprovodnosti.

Promjena mase prilikom modifikacije i funkcionalizacije elektrode, te analitičkog određivanja HSA promatrana je pomoću kvarcne kristalne mikrovage.

6. SIMBOLI

n – množina tvari, mol

Q – električni naboj, C

z – broj elektrona koji se izmjenjuju u redoks reakciji

F – Faradayeva konstanta, F = 9,64853399(24)$\cdot 10^4$ C mol^{-1}

E – elektrodni potencijal, V

E^o – standardni elektrodni potencijal, V

$E_{p,k}$ i $E_{p,a}$ – potencijali katodnog i anodnog strujnog vrha, V

$I_{p,k}$ i $I_{p,a}$ – visine katodnog i anodnog strujnog vrha, A

ΔE_p – razlika potencijala strujnih vrhova, V

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

R – opća plinska konstanta, R=8,314472(15) J K^{-1} mol^{-1}

T – apsolutna temperatura, K

$c_e(O)$, $c_e(R)$ – koncentracije oksidiranog i reduciranog oblika, mol dm^{-3}

t – vrijeme, s

A – površina elektrode, cm^2

D – difuzijski koeficijent, cm^2s^{-1}

$E_{1/2}$ – polarografski poluvalni potencijal elektroaktivne vrste

k^0 – standardna konstanta brzine elektrodne reakcije

α – koeficijent prijelaza elektrona

D_O, D_R – difuzijski koeficijent oksidirane i reducirane vrste redoks sustava, cm^2s^{-1}

Δf – promjena frekvencije, Hz

Δm – promjena mase, g cm^{-2}

C_f - faktor osjetljivosti kristala, koji iznosi 56,6 cm^2 μg^{-1} za 5 MHz kvarcni kristal AT-reza na sobnoj temperaturi

f_0 – osnovna frekvencija kvarcnog kristala, Hz

ρ_L – gustoća tekućine, g cm^{-3}

μ_L – modul smičnosti tekućine, g cm^{-1} s^{-2}

ρ_q – gustoća kvarca, koja iznosi 2,648 g cm^{-3}

μ_q – modul smičnosti kvarca, koji iznosi $2{,}947 \cdot 10^{11}$ g cm^{-1} s^{-2}

7. LITERATURA

[1] E. A. Khudaish, K. Y. Al-Ajmi, S. H. Al-Harthi, A. T. Al-Hinai, *A solid state sensor based polytyramine film modified electrode for the determination of dopamine and ascorbic acid in a moderately acidic solution*, Journal of Electroanalytical Chemistry 676 (2012) 27–34

[2] P. Zanello, *Inorganic electrochemistry: Theory, practice, and application (1 ed.)*, Royal Society of Chemistry, 2003

[3] I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Sveučilište u Zagrebu, 1969

[4] *Operation and service manual; QCM200 Quartz crystal microbalance digital controller; QCM25 5 MHz Crystal oscillator*, Stanford Research Sistem, Revision 2.4 (1/2011)

[5] A. A. Entezami, B. Massoumi, *Artificial muscles, biosensors and drug delivery systems based on conducting polymers: A review*, Iranian Polymer Journal 15 (1), 2006, 13-30

[6] V. Dugas, A. Elaissari, Y. Chevalier, *Surface sensitization techniques and recognition receptors immobilization on biosensors and microarrays*, M. Zourob (ed.), Recognition Receptors in Biosensors, se-2 PP. 47-13. Springer, New York, DOI 10.1007/978-1-4419-0919-0_2, 2010

[7] F. Ismail, S. B. Adeloju, *Galvanostatic entrapment of penicillinase into polytyramine films and its utilization for the potentiometric determination of penicillin*, Sensors 10 (2010) 2851-2868

[8] D. Losic, M. Cole, H. Thissen, N. H. Voelcker, *Ultrathin polytyramine films by electropolymerisation on highly doped p-type silicon electrodes*, Surface Science 584 245–257, 2005

[9] A. Siegel, H. Siegel, R. K. O. Siegel, *Nickel and its surprising imact in nature, Metal ions in life sciences Vol. 2*, Wiley ISSN 1559-0836

[10] K. K. Das, S. N. Das, S. A. Dhundasi, *Nickel, its adverse health effects & oxidative stress*, Indian J Med Res 128, pp 412-425, 2008

[11] K. E. Mason, *A conspectus of research on copper matabolism and requirementsof man*, The Jornal of Nutrition, vol. 109 no. 11, 1979-206, 1979

[12] *NTA – A safe, effective chelant for a variety of applications*, Ascend performance materials

[13] Y.K. Chau, M.T. Shiomi, *Complexing properties of nitrilotriacetic acid in the lake environment.* Water, Air, and Soil Pollution, pp 149-164, 1972

[14] T. Peters, Jr., *All about albumin, biochemistry, genetics, and medical applications*, Academic Press, 1995

[15] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, *Christal structure of human serum albumin at 2.5 A resolution*, Protein Engineering vol. 12 no. 6 pp. 439-446, 1999

[16] N. Iberg, R. Fliickiger, *Nonenzymatic glycosylation of albumin in Vivo; Identification of multiple glycosylated sites*, the Journal of Biological Chemistri pp. 13542-13545, 1986

8. ŽIVOTOPIS

Saša Marcinek rođena je 19. siječnja 1991. godine u Zagrebu, gdje je pohađala „Osnovnu školu Bartol Kašić“. Srednju „Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga“ u Zagrebu, smjer „Prirodoslovne gimnazije“ upisala je 2005. godine i maturirala s odličnim uspjehom 2009. godine. Nakon završene srednje škole, 2009. godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, smjer „Kemijsko inženjerstvo“, gdje 2012. godine prelazi na smjer „Ekoinženjerstvo“.