

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Iva Bebek, Petra Šaler

**UPORABA POVRŠINSKI MODIFICIRANIH  
TITANATNIH NANOCJEVČICA U  
AMPEROMETRIJSKIM BIOSENZORIMA**

Zagreb, 2010.

---

***Ovaj rad izrađen je pri Zavodu za kemiju i biokemiju u Laboratoriju za opću i anorgansku kemiju i elektroanalizu pod vodstvom dr.sc. Damira Ivekovića, doc. I predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u ak.godini 2009./2010.***



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1.  Kemijski senzori- definicija i podjela.....	1
1.1.1. Amperometrijski biosenzori.....	3
1.2.  Enzimi.....	6
1.2.1. Glukozni biosenzori.....	7
1.3.  Voltometrija .....	8
1.3.1. Voltometrija s linearnom promjenom potencijala i ciklička voltometrija.....	10
1.3.1.1.  Utjecaj reverzibilnosti elektrodnog potencijala na struju vrha vala.....	11
<b>2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA</b> .....	13
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	15
3.1.  Kemikalije.....	15
3.2.  Aparature i mjerni uređaji.....	16
3.3.  Metode.....	17
3.3.1. Sinteza titanatnih nanocjevčica.....	17
3.3.2. Funkcionalizacija titanatnih nanocjevčica amino-skupinama.....	17
3.3.3. Depozicija berlinskog modrila na površinu titanatnih nanocjevčica.....	18
3.3.4. Analiza modificiranih titanatnih nanocjevčica.....	19
3.3.5. Elektrokemijska mjerenja.....	20
<b>4. REZULTATI</b> .....	22
4.1.  Površinske modifikacije titanatnih nanocjevčica.....	22
4.2.  Elektrokemijska svojstva modificiranih titanatnih nanocjevčica.....	24
4.3 . Karakterizacija amperometrijskog enzimskog biosenzora za glukozu.....	28
<b>5. RASPRAVA</b> .....	32
5.1.  Površinske modifikacije titanatnih nanocjevčica.....	32
5.2.  Elektrokemijska svojstva modificiranih nanocjevčica.....	34
5.3.  Karakterizacija amperometrijskog enzimskog biosenzora za glukozu.....	36
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	39
<b>7. ZAHVALE</b> .....	40
<b>8. LITERATURA</b> .....	41
<b>9. SAŽECI</b> .....	44

# 1. UVOD

## 1.1. Kemijski senzori - definicija i podjela

Kemijski senzor definira se kao mjerni pretvornik koji pretvara kemijsku informaciju o uzorku, u rasponu od koncentracije pojedine komponente uzorka, pa sve do ukupnog sastava uzorka, u analitički mjerljiv signal (Hulanicki i sur., 1991). Kemijska informacija o uzorku može potjecati od kemijske reakcije ispitivanog analita ili od fizikalnih svojstava ispitivanog sustava. Svaki se kemijski senzor sastoji od dvije osnovne funkcionalne jedinice: *receptorskog dijela* ("receptora") i *pretvorničkog dijela* ("pretvornika"). Neki senzori mogu sadržavati i separator; takvu funkciju ima, primjerice, membrana.

Receptorski dio odgovoran je za selektivno i osjetljivo prepoznavanje analita. Taj dio kemijskog senzora pretvara kemijsku informaciju u oblik energije mjerljiv na pretvorničkom dijelu senzora. U pretvorničkom dijelu kemijskog senzora energija oslobođena uslijed interakcije analita i receptora prevodi se u oblik pogodan za mjerenje, najčešće u električki signal.

Princip rada receptorskog dijela kemijskog senzora može biti:

1. **Fizikalni**, kod kojeg ne dolazi do kemijske promjene analita, ali prisustvo analita u analiziranom sustavu utječe na promjenu nekog fizikalnog svojstva receptorskog dijela senzora. Primjer mjerenja temeljenog na ovom principu je mjerenje apsorbancije, indeksa loma, električne ili toplinske vodljivosti, te promjene mase ili temperature.
2. **Kemijski**, kod kojeg je analitički signal posljedica kemijske reakcije u kojoj sudjeluje analit.
3. **Biokemijski**, kod kojeg je analitički signal posljedica biokemijskog procesa u kojem sudjeluje analit. Takvi kemijski senzori nazivaju se **biosenzorima**.

## Podjela kemijskih senzora

Iako postoji nekoliko podjela kemijskih senzora, najraširenija je ona s obzirom na princip rada pretvorničkog dijela senzora (Hulanicki i sur., 1991). Prema toj podjeli, kemijski se senzori dijele na:

1. **Optičke senzore**, kod kojih je mjerni signal posljedica promjene nekog od optičkih svojstava sustava kao posljedice međudjelovanja analita s receptorskim dijelom senzora. U ovu grupu ubrajaju se senzori temeljeni na mjerenju :
  - Apsorbancije
  - Refleksije
  - Luminescencije
  - Fluorescencije
  - Indeksa loma
  - Optotermalnog efekta
  - Raspršenja svjetlosti
2. **Elektrokemijske senzore**, kod kojih je mjerni signal posljedica elektrokemijske reakcije (uključujući i uspostavljanje elektrokemijske ravnoteže) analita na receptorskom dijelu senzora. Senzori iz te skupine dijele se na:
  - Voltometrijske senzore, u koje se ubrajaju i amperometrijski senzori
  - Potenciometrijske senzore
  - CHEMFET (*Chemically Sensitized Field Effect Transistor*) senzore
  - Plinske potenciometrijske senzore s čvrstim elektrolitom
3. **Električne senzore**, kod kojih je mjerni signal posljedica promjene nekog od elektroktričkih svojstava sustava uslijed prisustva analita. Senzori iz te skupine dalje se dijele na:
  - Poluvodičke senzore na bazi metalnih oksida
  - Organske poluvodičke senzore
  - Konduktometrijske senzore
  - Dielektričke senzore

4. **Senzore osjetljive na promjenu mase**, kod kojih je mjerni signal posljedica promjene mase uzrokovane vezanjem analita na površinu receptorskog dijela senzora. U tu se skupinu ubrajaju:
  - Piezoelektrični senzori
  - Senzori temeljeni na površinskim akustičkim valovima
5. **Magnetske senzore**, kod kojih je mjerni signal posljedica promjene nekog od magnetskih svojstava sustava uzrokovane prisustvom analita.
6. **Termometričke senzore**, kod kojih je mjerni signal posljedica promjene temperature uzrokovane toplinskim efektom specifične kemijske reakcije analita ili adsorpcije analita na površinu receptorskog dijela senzora.
7. Kemijske senzore koji se temelje na mjerenju drugih fizikalnih svojstava sustava, poput emisije rendgenskog,  $\beta$ - ili  $\gamma$ -zračenja.

#### 1.1.1. Amperometrijski biosenzori

Biosenzori su vrsta kemijskih senzora kod kojih ključnu ulogu u prepoznavanju analita ima neka biološki aktivna vrsta. Princip rada biosenzora općenito se temelji na specifičnom vezanju analita s komplementarnim biološki osjetljivim elementom koji je integriran ili je usko povezan s pretvorničkim dijelom biosenzora. Specifična interakcija analita i receptora rezultira promjenom jednog ili više fizikalnih, odn. kemijskih svojstava, poput promjene pH, prijenosa elektrona, promjene mase, promjene temperature, vezanja ili otpuštanja plinova ili specifičnih iona. Navedene promjene detektiraju se i mjere na pretvorničkom dijelu biosenzora.

S obzirom na vrstu pretvorničkog dijela biosenzori se dijele na optičke, piezoelektrične, elektrokemijske (amperometrijske ili potenciometrijske), termometrijske i magnetske biosenzore.

### *Teorijska načela rada amperometrijskih biosenzora*

Mjerenja u amperometriji temelje se na oksidaciji ili redukciji elektroaktivne vrste na radnoj elektrodi čiji je potencijal konstantan u odnosu na referentnu elektrodu uronjenu u analiziranu otopinu. Dobivena struja najčešće se mjeri troelektrodnim sustavom, kojeg čine radna, pomoćna i referentna elektroda, kako bi se kompenzirao pad potencijala kroz otopinu uzrokovan njenim otporom. Amperometrijski biosenzori konstruiraju se modificiranjem površine radne elektrode prikladnom biološki aktivnom vrstom, čijom interakcijom s analitom nastaje neka elektroaktivna vrsta, koja se potom oksidira ili reducira na elektrodi. Jakost struje uslijed te elektrokemijske reakcije funkcija je koncentracije analita u ispitivanoj otopini. Kao receptorski dio amperometrijskih biosenzora najčešće se koriste enzimi, pa se takvi biosenzori nazivaju **amperometrijskim enzimskim biosenzorima**.

Kod svih amperometrijskih senzora, mjerena struja mjera je brzine elektrokemijske reakcije koja se odvija na radnoj elektrodi, što proizlazi iz prvog Faradayevog zakona:

$$I = z \cdot F \cdot \frac{dn}{dt}$$

gdje je:  $z$  – broj izmjenjenih elektrona

$F$  – Faradayeva konstanta

$dn/dt$  – brzina oksidacije, odn. redukcije elektroaktivne vrste

Ukupna brzina elektrokemijske reakcije ovisi o brzini prijenosa elektrona i o brzini prijenosa tvari do površine elektrode. Brzina prijenosa elektroaktivne vrste do površine elektrode određena je prvim Fickovim zakonom :

$$\frac{dn}{dt} = D \cdot A \cdot \frac{dc}{dx}$$

gdje je:  $dn/dt$  – brzina difuzije elektroaktivne vrste

$D$  – difuzijski koeficijent promatrane elektroaktivne vrste

$A$  – geometrijska površina elektrode

$dc/dx$  – promjena koncentracije elektroaktivne vrste unutar difuzijskog sloja (tzv. koncentracijski gradijent)

Uz pretpostavku da je pad koncentracije unutar difuzijskog sloja linearan, za slučaj dinamičke ravnoteže izjednačavanjem prvog Faradayevog zakona i prvog Fickovog zakona dobije se :

$$I = z \cdot F \cdot A \cdot \frac{D}{L} \cdot c_0$$

gdje  $c_0$  predstavlja koncentraciju elektroaktivne vrste u masi otopine, a  $L$  debljinu difuzijskog sloja uz površinu elektrode. Navedena jednadžba predviđa linearnu ovisnost jakosti struje o koncentraciji analita, što predstavlja osnovu uporabe amperometrije u kemijskoj analizi.

#### *Generacije amperometrijskih enzimskih biosenzora*

Prvi amperometrijski biosenzor (Updike i Hicks, 1967) konstruiran je za analizu glukoze i temeljio se na enzimski kataliziranoj oksidaciji glukoze u glukonolakton pomoću enzima glukoza oksidaze. Enzim je bio imobiliziran na površinu Clarkove kisikove elektrode, koja je mjerila smanjenje koncentracije molekuskog kisika uz površinu elektrode uslijed enzimski katalizirane reakcije. Uskoro su se pojavile i druge izvedbe amperometrijskih biosenzora za glukozu, kod kojih se mjerila količina vodikova peroksida nastalog enzimski kataliziranom oksidacijom glukoze u prisustvu kisika. Takvi biosenzori, kod kojih se mjeri količina produkta nastalog u enzimskoj reakciji ili smanjenje koncentracije nekog od reaktanata u enzimskoj reakciji, nazivaju se **amperometrijskim biosenzorima prve generacije**.

**Drugu generaciju** amperometrijskih biosenzora čine biosenzori s medijatorima. Medijatori su elektrokemijski aktivne tvari koje olakšavaju prijenos elektrona između enzima i elektrode, najčešće na način da u enzimskoj reakciji sudjeluju kao drugi supstrat enzima.

Izravan prijenos elektrona između elektrode i aktivnog redoks-središta enzima, postignut električkim povezivanjem enzima i površine elektrode, prisutan je kod



takozvanih biosenzora bez medijatora, koji se smatraju **trećom generacijom** amperometrijskih biosenzora.

## 1.2. Enzimi

Enzimi su proteini s relativnom molekulskom masom od  $10^4$  do  $10^7$  Daltona, a djeluju kao selektivni katalizatori biološki važnih kemijskih reakcija. Za njihovo katalitičko djelovanje odgovorno je aktivno središte koje formiraju određeni dijelovi polipeptidnog lanca. Visoka selektivnost objašnjava se trodimenzijskom strukturom aktivnog središta koja uslijed steričkih i elektrostatskih interakcija omogućuje vezanje samo određene vrste molekula.

Prema tipu kemijske reakcije koju kataliziraju enzimi se svrstavaju u 6 skupina:

- Oksidoreduktaze – kataliziraju prijenos elektrona
- Transferaze – kataliziraju prijenos grupa
- Hidrolaze – kataliziraju hidrolitičko cijepanje supstrata
- Liaze – kataliziraju eliminacijske reakcije uz stvaranje dvostruke veze ili adicije na dvostruku vezu
- Izomeraze – kataliziraju pregradnja molekule supstrata
- Ligaze – kataliziraju stvaranje veze uz istovremeno cijepanje ATP-a

Enzimska reakcija općenito se može prikazati jednadžbom



gdje je: E - enzim

S - supstrat

[ES] – kompleks između enzima i supstrata

P - produkt

Ovisnost brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata iskazana je Michaelis-Menteninom jednadžbom:

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

gdje je :  $v$  - brzina enzimski katalizirane reakcije  
 $v_{\max}$  - maksimalna brzina enzimski katalizirane reakcije  
 $[S]$  - koncentracija supstrata  
 $K_M$  - Michaelis-Mentenina konstanta (definirana kao koncentracija supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine)

### 1.2.1. Glukoza oksidaza

Glukoza oksidaza je jedan od najvažnijih enzima korištenih u industrijskim procesima. Zbog izuzetne važnosti glukoznog biosenzora u medicinskoj dijagnostici, glukoza oksidaza je i enzim čija potrošnja za izradu biosenzora premašuje ukupnu potrošnju svih ostalih enzima korištenih u izradi biosenzora. S obzirom da je glukozni biosenzor zasigurno najistraženiji kemijski senzor dosad, glukoza oksidaza koristi se i kao modelni enzim prilikom istraživanja novih vrsta ili konstrukcija biosenzora.

Glukoza oksidaza može se izolirati iz različitih plijesni, većinom iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*, a komercijalno se kao izvor najčešće koristi plijesan *Aspergillus niger*. Glukoza oksidaza iz plijesni je homodimer, molekulske mase 130-175 kDa (Kalisz i sur., 1997). Sastoji se od dva identična polipeptidna lanca. Svaki lanac sadrži jednu molekulu nekovalentno vezanog koenzima flavin adenin dinukleotida (FAD) (Dai i sur., 2007). Ugljikohidrati čine 11-13 % ukupne mase enzima, od čega su najviše zastupljeni glukoza, manozna i heksozamin. Optimalni pH glukoza oksidaze porijeklom iz *A. niger* je 5,0-6,0, a optimalna temperatura se kreće od 40-60 °C (Kalisz i sur., 1991). Od dva anomera D-glukoze, glukoza oksidaza pokazuje specifičnost za  $\beta$ -anomer.

Glukoza oksidaza katalizira oksidaciju  $\beta$ -D-glukoze u D-glukono- $\delta$ -lakton i  $H_2O_2$  uz molekularni kisik kao akceptor elektrona (Pluschkell i sur., 1996; Hatzinikolaou i sur., 1996). Ta se reakcija odvija u dva stupnja. U prvom stupnju, koji se smatra reduktivnim djelom reakcije, glukoza oksidaza katalizira oksidaciju  $\beta$ -D-glukoze u D-glukono- $\delta$ -lakton koji se neenzimatski hidrolizira u glukonsku kiselinu. Slijedom toga

se FAD reducira u FADH<sub>2</sub>. U drugom stupnju, koji se naziva oksidacijski dio reakcije, reducirana glukoza oksidaza se reoksidira molekulskim kisikom uz nastajanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bankar i sur., 2009).

Posljednjih je godina glukoza oksidaza stekla veliku komercijalnu primjenu u kemijskoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, kliničkoj kemiji, biotehnologiji i drugim industrijama. Glukoza oksidaza je najviše korišten enzim kao analitički reagens za određivanje glukoze zbog svoje relativno niske cijene, visoke selektivnosti i dobre stabilnosti. Neke od najznačajnijih primjena glukoza oksidaze su :

- U proizvodnji biosenzora – glukozni biosenzori čine oko 85 % komercijalnih biosenzora.
- Kao aditiv u prehrambenoj industriji – uspješno se koristi za uklanjanje rezidualne glukoze i kisika iz hrane i pića, kako bi se produljila njihova trajnost.
- Kod proizvodnje vina s niskim udjelom alkohola – može se koristiti u proizvodnji vina gdje može smanjiti udio alkohola, tako što uklanja dio prisutne glukoze.
- U proizvodima za oralnu higijenu – pokazuje antimikrobno djelovanje zbog nastajanja vodikova peroksida kao produkta u enzimski kataliziranoj oksidaciji glukoze.
- U proizvodnji glukonske kiseline – koristi se kao komercijalni izvor glukonske kiseline, koja se može proizvoditi hidrolizom δ-glukono-1,5-laktone, krajnjeg produkta katalitičke oksidacije glukoze pomoću glukoza oksidaze.
- U tekstilnoj industriji – ima primjenu u proizvodnji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koji se koristi kao izbjeljivač.

### **1.3. Voltometrija**

Voltometrija obuhvaća grupu elektroanalitičkih metoda u kojima se informacija o koncentraciji analita dobiva mjerenjem struje uslijed oksidacije ili redukcije analita na radnoj elektrodi kao funkcije potencijala narinutog na radnu elektrodu (Skoog i sur., 1998).

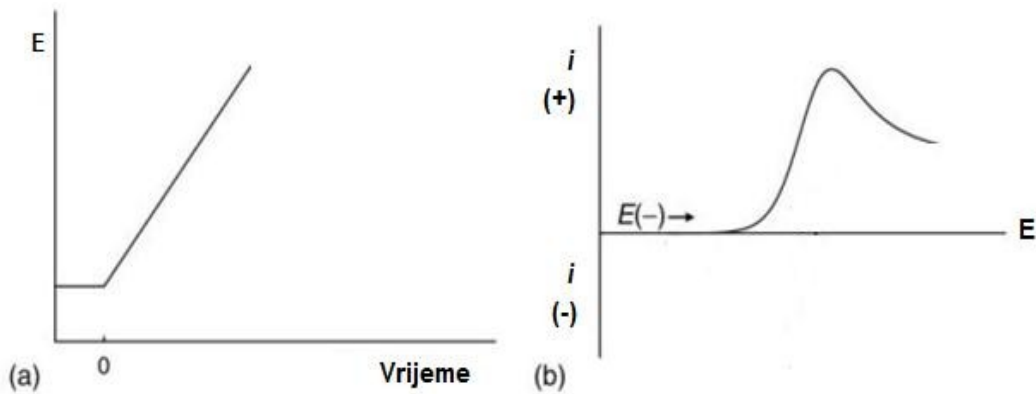
### *Teorijska načela voltametrije*

Ukoliko se na elektrodu uronjenu u otopinu koja sadrži neku elektroaktivnu vrstu narine određeni potencijal, ta se elektroda polarizira. Kada potencijal elektrode dosegne vrijednost kod koje dolazi do prijelaza elektrona između elektrode i u otopini prisutne elektroaktivne vrste, dolazi do oksidacije ili redukcije te elektroaktivne vrste, a kroz otopinu počinje teći struja. Jakost te struje ovisi o koncentraciji elektroaktivne vrste u graničnom sloju uz površinu elektrode, a time i o koncentraciji te elektroaktivne vrste u otopini. Oblik krivulje koja opisuje promjenu struje kao funkciju narinutog potencijala (tzv. *voltamograma*) za pojedinu voltametrijsku tehniku uvjetovan je oblikom naponske pobude i brzinom promjene potencijala.

U općenitom slučaju, elektrodni proces obuhvaća prijenos naboja između elektrode i elektroaktivne vrste, s time povezanu kemijsku reakciju, te difuziju elektroaktivne tvari prema elektrodi ili u masu otopine. Ovisno o brzini pojedinih procesa koji opisuju mehanizam elektrokemijske reakcije, elektrodni procesi mogu biti reverzibilni ili ireverzibilni. Reverzibilnim elektrodnim reakcijama smatraju se elektrodne reakcije kod kojih je granična struja određena jedino brzinom difuzije elektroaktivne vrste do površine elektrode. Kod takvih je reakcija prijelaz elektrona između elektrode i elektroaktivne vrste puno brži od prijenosa mase do elektrode, omjer koncentracija oksidiranog i reduciranog oblika elektroaktivne vrste uz površinu elektrode opisan je Nernstovom jednačbom za elektrodni potencijal, a vrijednost granične struje određena je difuzijskom jednačbom.

Ukoliko je prijelaz elektrona između elektrode i elektroaktivne vrste sporiji od difuzije te tvari prema elektrodi, elektrodni se proces naziva ireverzibilnim. U ovom slučaju granična struja više nije određena brzinom difuzije, a omjer koncentracija dvaju redoks-oblika elektroaktivne tvari uz površinu elektrode ne odgovara onome u Nernstovoj jednačbi.

Prijelaz između ta dva tipa reakcija čine tzv. kvaziireverzibilne reakcije.



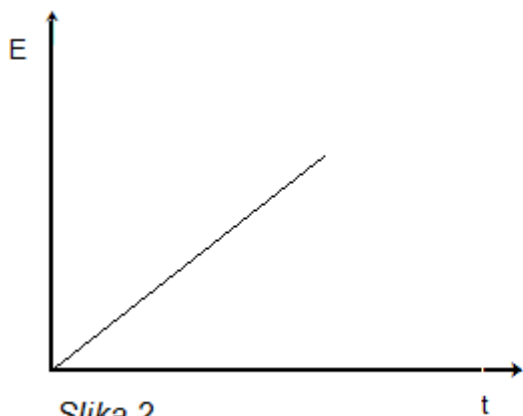
Slika 1.

### 1.3.1. Voltametrijia s linearnom promjenom potencijala i ciklička voltametrijia

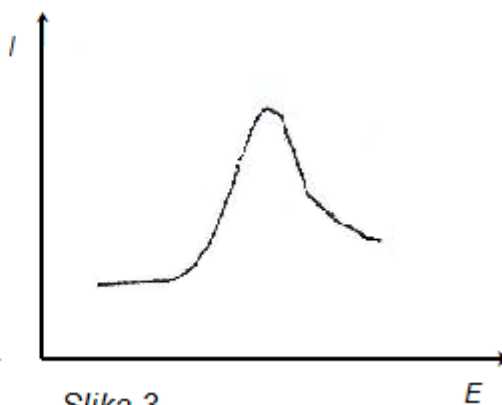
Voltametrijia s linearnom promjenom potencijala i ciklička voltametrijia su elektrokemijske tehnike kod kojih je potencijal stacionarne radne elektrode linearna funkcija vremena, dok se vrijednosti struje razmatraju kao funkcija brzine promjene potencijala.

#### *Teorijska načela*

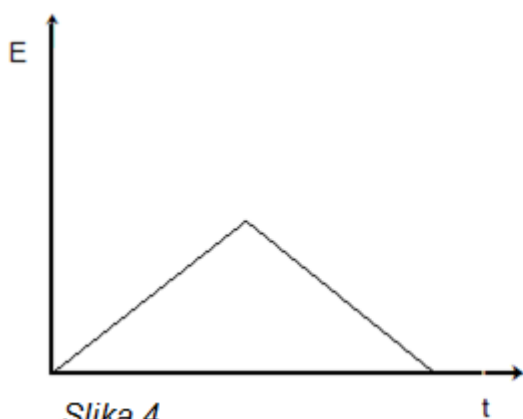
Ako se potencijal mirne elektrode, koja sadrži elektroaktivnu vrstu i osnovni elektrolit i miruje, brzo i kontinuirano mijenja u ispitivanom području potencijala dobije se krivulja struja-potencijal (slika 2. I 4.). Porast potencijala dovodi do porasta struje zbog povećanja brzine reakcije. Napredovanjem elektrolize, elektroaktivna vrsta se postepeno uklanja iz otopine te se nova količina doprema difuzijom iz mase otopine uslijed čega se difuzijski sloj širi sve dublje u otopinu. To dovodi do smanjenja koncentracijskog gradijenta i smanjenja struje. Utjecaj iscrpljenog sloja uz elektrodu preteže s vremenom i struja-potencijal krivulja (slika 3. I 5.) prolazi kroz maksimalnu vrijednost. Struja vrha vala (maksimalna struja) izravno je proporcionalna koncentraciji elektroaktivne vrste. Međutim, vrijednost struje vrha vala ovisi i o brzini kojom se mijenja potencijal. Pri većim brzinama promjene potencijala, za vrijeme ulaznog dijela I-E krivulje iscrpljuje se sloj otopine i vrijednost maksimalne struje je veća.



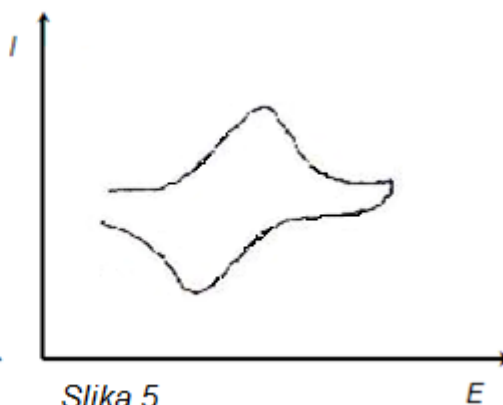
Slika 2.



Slika 3.



Slika 4.



Slika 5.

### 1.3.1.1. Utjecaj reverzibilnosti elektrodnog procesa na struju vrha vala

#### *Reverzibilni elektrodni proces*

Za reverzibilnu reakciju koja se odvija na elektrodi čiji je potencijallinearna funkcija vremena, struja vrha vala dana je Randles-Ševčikovom jednađbom :

$$I_p = 2,687 \cdot 10^5 \cdot z^{1.5} \cdot A \cdot D^{0.5} \cdot c \cdot \nu^{0.5}$$

Iz jednađbe proizlazi da je struja ovisi o :

- Koncentraciji elektroaktivne vrste  $c$ ,
- Difuzijskom koeficijentu  $D$ ,
- Broju izmjenjenih elektrona  $z$ ,
- Površini elektrode  $A$ ,

- Brzini promjene potencijala.

Promjenom naponske pobude u obliku trokutastog vala kao kod cikličke voltometrije, vrsta koja se reducira u prvom dijelu ciklusa odmah se u sljedećem oksidira i obratno. Posljedica je toga da su visine vrhova anodnog i katodnog vala jednakeza reverzibilni proces.

Daljnji kriterij reverzibilnosti izveden na temelju teorijskog razmatranja predviđa međusobnu udaljenost vrhova vala od  $57/n$  mV, gdje je  $n$  broj izmjenjenih elektrona

#### *Ireverzibilni elektrodni proces*

Jednadžba za struju vrha vala kod ireverzibilnih elektrodnih procesa dana je izrazom:

$$I_p = 2.985 \cdot 10^5 \cdot \alpha^{0.5} \cdot z \cdot z_a^{0.5} \cdot c \cdot \nu^{0.5}$$

U ovom slučaju struja ovisi i o koeficijentu prijenosa elektrona  $\alpha$  kao i o broju elektrona izmjenjenih u najsporijem stupnju procesa  $z_a$ . Budući da je koeficijent prijenosa elektrona za ireverzibilne procese veličina uvijek manja od 1, struja pri tim procesima manja je od one pri reverzibilnim procesima. Kod cikličke voltometrije ireverzibilnost procesa rezultira većom udaljenosti između vrhova anodnog i katodnog vala od teorijske vrijednosti za reverzibilni proces i različitom visinom vala, odnosno iščezavanjem jednog od njih u slučaju potpuno ireverzibilnog procesa.

## 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Kod amperometrijskih senzora informacija o koncentraciji analita dobiva se mjerenjem jakosti električne struje uzrokovane elektrokemijskom reakcijom koja se odvija na površini senzora polariziranog na određeni potencijal. Važno područje primjene amperometrijskih senzora su enzimski biosenzori dobiveni imobilizacijom prikladnog enzima na površinu amperometrijskog senzora, čime se postiže visoka selektivnost senzora prema analitu koji je supstrat tog enzima. Većinu enzimskih biosenzora čine biosenzori temeljeni na enzimima oksidazama, kod kojih kao produkt enzimski katalizirane oksidacije analita nastaje vodikov peroksid. Kod takvih biosenzora informaciju o koncentraciji analita moguće je dobiti mjerenjem jakosti struje uslijed oksidacije ili redukcije nastalog vodikova peroksida. Problem pri tome predstavlja činjenica da na konvencionalnim elektrodnim materijalima (Pt, Au, C) do oksidacije ili redukcije vodikova peroksida dolazi tek pri visokom prenaponu, što za posljedicu ima visok katodni ili anodni radni potencijal biosenzora. Pri takvim radnim potencijalima može doći do oksidacije, odn. redukcije i drugih tvari prisutnih u uzorku, što za posljedicu ima smanjenje selektivnosti i osjetljivosti biosenzora. Taj se problem najčešće rješava uporabom prikladnog elektrokemijskog katalizatora, koji smanjuje prenapon redukcije ili oksidacije vodikova peroksida. Kao najbolji katalizator za tu se svrhu pokazao željezov(III) heksacijanoferat(II), tzv. berlinsko modrilo (Ricci i sur., 2005; Karyakin, A.A., 2001).

Cilj je istraživanja obuhvaćenih ovim radom priprava novih nanostrukturiranih katalizatora za elektrokemijsku redukciju vodikova peroksida, temeljenih na titanatnim nanocjevčicama površinski modificiranim berlinskim modrilom, te ispitivanje mogućnosti njihove primjene u amperometrijskim biosenzorima s oksidazama. S obzirom na veliku specifičnu površinu titanatnih nanocjevčica ( $200-300 \text{ m}^2/\text{g}$ ), deponiranjem nanočestica berlinskog modrila na njihovu površinu namjera je postići visok stupanj disperzije katalizatora i na taj način maksimirati njegovu katalitičku učinkovitost, te tako postići veću osjetljivost biosenzora.

Kako bi se postigla bolja kompatibilnost između površine titanatnih nanocjevčica (koje zbog prisustva protoniranih površinskih OH-skupina pokazuju relativno snažnu Brønstedovu kiselost) i enzima, ispitat će se mogućnost blokiranja površinskih OH skupina funkcionaliziranim silanima, pri čemu je kao logičan izbor odabran (3-aminopropil)trimetoksi silan, koji omogućuje funkcionaliziranje površine nanocjevčica amino-skupinama. Umješavanjem titanatnih nanocjevčica modificiranih berlinskim modrilom i funkcionaliziranim silanom u vodljivu matricu namjera je pripremiti katalitički modificirane elektrode i ispitati njihovu elektrokatalitičku aktivnost pri redukciji vodikova peroksida. Imobilizacijom modelnog



enzima, glukoza oksidaze, na površinu katalitički modificiranih elektroda pripravit će se glukozni biosenzori i ispitat će se njihova analitička svojstva, s ciljem utvrđivanja postiže li se uporabom razvijenih nanostrukturiranih katalizatora bolja osjetljivost biosenzora u odnosu na klasične načine pripreve katalizatora na bazi berlinskog modrila.

Nanostrukturirani katalizatori temeljeni na titanatnim nanocjevčicama površinski modificiranima berlinskim modrilom razvijeni u ovom radu, pored uporabe u glukoznim biosenzorima, mogli bi se primijeniti u izradi širokog spektra biosenzora s oksidazama za određivanje i drugih analita, kao što su niži alifatski alkoholi, oksalati, urati, laktati, askorbati, maleati i sl.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Kemikalije

Sve kemikalije korištene u ovom radu bile su *p.a.* čistoće te su bile korištene bez daljnjeg pročišćavanja, osim ako nije drugačije navedeno. Za pripremu otopina korištena je demineralizirana voda dodatno pročišćena Millipore sustavom za pročišćavanje vode.

Titanijev dioksid (anatas) korišten za sintezu titanatnih nanocjevčica dobavljen je od Aldricha (USA). (3-aminopropil)trimetoksi silan (APTMS) korišten za funkcionaliziranje titanatnih nanocjevčica dobavljen je od Fluke (Švicarska), a deklarirana čistoća bila mu je 98 %. Diklormetan je prije uporabe bio osušen s  $\text{CaCl}_2$  i potom predestiliran preko  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Za pripremu otopina  $\text{H}_2\text{O}_2$  korišten je vodikov peroksid masenog udjela  $w(\text{H}_2\text{O}_2) = 30 \%$ . Kao vezivo u smjesama za modificiranje elektroda korišten je kationski izmjenjivač Nafion (DuPont, USA), u obliku otopine Nafiona u smjesi vode i niskomolekularnih alkohola, masenog udjela  $w(\text{Nafion}) = 5 \%$ . Kao vodljivo punilo u smjesama za modificiranje elektrode korišten je grafitni prah čistoće 99,999 % i veličine čestica 5-50 nm (Aldrich, USA). Glukoza oksidaza izolirana iz *Aspergillus niger* (tip X-S) bila je dobavljena od Sigmee (USA), a deklarirana aktivnost bila joj je 153 U/(mg proteina). Albumin korišten za imobilizaciju glukoza oksidaze na površinu biosenzora dobavljen je od Sigmee, a bio je izoliran iz goveđeg seruma. Za umrežavanje albumina korištena je vodena otopina glutaraldehida dobivena razrjeđivanjem otopine glutaraldehida, masenog udjela  $w(\text{glutaraldehyd}) = 50 \%$  (Fluka, Švicarska)

Otopina NaOH korištena za hidrotermalnu sintezu titanatnih nanocjevčica pripremana je neposredno prije uporabe, kako bi se spriječila kontaminacija otopine karbonatima. Otopine vodikova peroksida također su pripremane neposredno prije uporabe.

Otopina kalijeva klorida korištena kao osnovni elektrolit u elektrokemijskim mjerenjima bila je koncentracije  $c(\text{KCl}) = 0,1 \text{ mol/L}$ , a pH joj je dodatkom razrijeđene otopine HCl bio podešen na vrijednost 3,0. U eksperimentima koji su zahtijevali podešavanje i kontrolu pH-vrijednosti otopine korišteni su fosfatni puferi pripremljeni

dodatkom zasićene otopine NaOH ili koncentrirane otopine H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> u otopinu kalijeva dihidrogenfosfata, koncentracije  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4)=0,1 \text{ mol/L}$ , do postizanja željenog pH.

### **3.2. Aparature i mjerni uređaji**

Sinteza titanatnih nanocjevčica provedena je u teflonskom reaktoru volumena 125 mL, koji je bio opremljen povratnim kuglastim hladilom otvorenim prema atmosferi. Zagrijavanje reaktora izvedeno je pomoću parafinske kupelji, dok se miješanje sadržaja provodilo magnetskom mješalicom.

Funkcionaliziranje titanatnih nanocjevčica (3-aminopropil)trimetoksi silanom izvedeno je u okrugloj tikvici volumena 100 mL. Pri tome je tikvica bila začepljena kako bi se spriječilo hlapljenje otapala i apsorpcija vlage u reakcijsku smjesu. Miješanje reakcijske smjese izvedeno je magnetskom mješalicom.

Za određivanje željeza vezanog na modificirane titanatne nanocjevčice korišten je atomski apsorpcijski spektrometar tvrtke Perkin-Elmer (USA), Model 2380. Za spektrofotometrijsko određivanje amino-skupina vezanih na površinu modificiranih nanocjevčica korišten je dvoznačni UV-VIS spektrofotometar BioSpecord 200, tvrtke AnalytikJenna (Njemačka).

Transmisijska elektronska mikroskopija titanatnih nanocjevčica izvedena je na visokorezolucijskom transmisijskom elektronskom mikroskopu JEM 100CX (Jeol, Japan), uz napon ubrzanja elektrona od 200 kV. Kao nosač uzorka korištene su bakrene mrežice s polimernim filmom na koji je bio naparen sloj ugljika. Uzorci su na mrežicu nanešeni u obliku suspenzije dobivene dispergiranjem titanatnih nanocjevčica u vodi pomoću ultrazvučne kupelji.

Za elektrokemijska mjerenja korišten je potenciostat MA 5840 tvrtke Iskra (Slovenija), koji je bio povezan s osobnim računalom pomoću elektroničkog sučelja i računalnog programa izrađenog u Laboratoriju za opću i anorgansku kemiju i elektroanalizu PBF-a. Mjerenja su izvedena u klasičnoj troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji volumena 10 mL, s elektrodama od spektroskopski čistog grafita kao radnim elektrodama, zasićenom kalomelovom referentnom elektrodom i platinskom žicom kao pomoćnom elektrodom.

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Sinteza titanatnih nanocjevčica

Titanatne nanocjevčice sintetizirane su reakcijom između  $\text{TiO}_2$  (anatas) i vodene otopine NaOH. U tipičnoj sintezi, u teflonski je reaktor stavljeno 1,1 g  $\text{TiO}_2$  i suspendirano u 50 mL svježe pripremljene otopine NaOH, koncentracije  $c(\text{NaOH})=10$  mol/L. Reaktor je zatvoren povratnim vodenim hladilom te je smjesa refluksirana tijekom 24 sata, uz neprestano miješanje. Nakon sinteze su titanatne nanocjevčice prebačene iz reaktora u deioniziranu vodu te su filtrirane vakuumskom filtracijom i ispirane vodom, sve dok pH filtrata nije iznosio otprilike 8. Nakon toga su nanocjevčice suspendirane u 50 mL otopine HCl, koncentracije  $c(\text{HCl})=0,1$  mol/L. Nakon jednog sata, nanocjevčice su filtrirane i isprane deioniziranom vodom te ponovo suspendirane u 50 mL svježe otopine HCl tijekom 20 minuta. Nakon toga su nanocjevčice ponovno filtrirane i obilno isprane deioniziranom vodom, sve dok pH filtrata nije iznosio približno 5. Svi uzorci su nakon ispiranja sušeni na  $80\text{ }^\circ\text{C}$  preko noći.

Dobivene titanatne nanocjevčice podijeljene su na dva jednaka dijela te su površinski modificirane na dva načina. Prvim načinom modifikacije ("Priprema 1") titanatne nanocjevčice su najprije funkcionalizirane amino-skupinama, reakcijom nanocjevčica s (3-aminopropil)trimetoksi silanom, a potom je na površinu  $\text{NH}_2$ -funkcionaliziranih nanocjevčica deponiran željezov(III) heksacijanoferat(II) (berlinsko modriilo, BM). Kod drugog načina modifikacije ("Priprema 2"), na površinu titanatnih nanocjevčica najprije je deponirano berlinsko modriilo, a zatim je površina funkcionalizirana amino-skupinama. Deponiranje berlinskog modrila i funkcionaliziranje  $\text{NH}_2$ -skupinama u oba su slučaja izvršena na identičan način, kako je opisano u nastavku teksta.

#### 3.3.2. Funkcionalizacija titanatnih nanocjevčica amino-skupinama

Masa od 250 mg nemodificiranih titanatnih nanocjevčica (Priprema 1) ili titanatnih nanocjevčica na čiju je površinu prethodno bilo deponirano berlinsko modriilo (Priprema 2) suspendirana je u 25 mL svježe destiliranog, bezvodnog diklormetana i u suspenziju je dodano 0,5 mL (3-aminopropil)trimetoksi silana. Smjesa je u zatvorenoj tikvici miješana tijekom 3 sata, nakon čega su modificirane nanocjevčice

odfiltrirane, isprane sa 25 mL diklormetana i 50 mL bezvodnog etanola, te sušene na 60 °C tijekom 3 sata.

### 3.3.3. Depozicija berlinskog modrila na površinu titanatnih nanocjevčica

Masa od 500 mg nemodificiranih titanatnih nanocjevčica (Priprema 2) ili 250 mg titanatnih nanocjevčica prethodno funkcionaliziranih amino-skupinama (Priprema 1) suspendirano je u 50 mL otopine  $\text{FeSO}_4$ , koncentracije  $c(\text{Fe}^{2+}) = 0,25 \text{ mol/L}$ , nakon čega je smjesa miješana na magnetskoj mješalici tijekom 45 minuta kako bi se omogućila adsorpcija i ionska izmjena iona  $\text{Fe}^{2+}$ . Dobivene titanatne nanocjevčice modificirane ionima  $\text{Fe}^{2+}$  od otopine su odijeljene centrifugiranjem i isprane vodom. Nakon toga su nanocjevčice suspendirane u 50 mL otopine  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , koncentracije  $c(\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]) = 0,25 \text{ mol/L}$ , te miješane na magnetskoj mješalici tijekom 45 minuta, kako bi se omogućila reakcija iona  $\text{Fe}^{2+}$  iz modificiranih nanocjevčica s ionima  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  iz otopine i taloženje nanočestica berlinskog modrila na površinu nanocjevčica. Dobivene titanatne nanocjevčice modificirane berlinskim modrilom od otopine su odijeljene centrifugiranjem i isprane vodom. Kako bi se povećala količina berlinskog modrila deponiranog na površinu nanocjevčica, opisan postupak ponovljen je još dva puta. Titanatne nanocjevčice modificirane berlinskim modrilom sušene su na 70 °C preko noći.

Uzorci nemodificiranih i modificiranih titanatnih nanocjevčica označeni su prikladnim kraticama, koje će se radi kratkoće koristiti u nastavku teksta. Značenje oznaka navedeno je u Tablici 1.

**Tablica 1.** Oznake uzoraka nemodificiranih i modificiranih titanatnih nanocjevčica korištene u ovom radu

Oznaka	Opis
TiNT	nemodificirane titanatne nanocjevčice
TiNT-NH <sub>2</sub>	titanatne nanocjevčice površinski funkcionalizirane NH <sub>2</sub> -skupinama, dobivene reakcijom TiNT s (3-aminopropil)trimetoksi silanom
TiNT-BM	titanatne nanocjevčice površinski modificirane berlinskim modrilom, dobivene depozicijom nanočestica berlinskog modrila na površinu TiNT
TiNT-NH <sub>2</sub> -	modificirane titanatne nanocjevčice dobivene deponiranjem

BM	nanočestica berlinskog modrila na površinu titanatnih nanocjevčica prethodno funkcionaliziranih NH <sub>2</sub> -skupinama (Priprema 1)
TiNT-BM-NH <sub>2</sub>	modificirane titanatne nanocjevčice dobivene vezanjem (3-aminopropil)trimetoksi silana na površinu titanatnih nanocjevčica prethodno modificiranih s berlinskim modrilom (Priprema 2)

### 3.3.4. Analiza modificiranih titanatnih nanocjevčica

#### *Analiza Fe*

Sadržaj željeza određen je u uzorcima TiNT-BM, TiNT-NH<sub>2</sub>-BM i TiNT-BM-NH<sub>2</sub>. Za analizu je uzeto 20-25 mg uzorka (izvagano s točnošću od 0,1 mg) i otopljeno u smjesi 10 mL koncentrirane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 1,5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, masenog udjela  $w(\text{H}_2\text{O}_2) = 30 \%$ , uz zagrijavanje. Smjesa je zagrijavana na otprilike 120 °C tijekom 15 minuta, do potpunog obezbojenja otopine. Dobivene otopine kvantitativno su prebačene u odmjerne tikvice od 100 mL, koje su potom dopunjene deioniziranom vodom. Sadržaj željeza u otopinama određen je atomskom apsorpcijskom spektrometrijom. S obzirom na relativno visok sadržaj titanija u analiziranim otopinama, sadržaj željeza određen je metodom standardnog dodatka kako bi se izbjegla moguća interferencija titanija zbog nastajanja refraktornog TiO<sub>2</sub> u plamenu.

#### *Analiza amino-skupina*

Sadržaj površinskih NH<sub>2</sub>-skupina određen je u uzorcima TiNT-NH<sub>2</sub>, TiNT-NH<sub>2</sub>-BM i TiNT-BM-NH<sub>2</sub>. Za analizu je odvagano 10,0 mg uzorka i suspendirano u 5,0 mL fosfatnog pufera (pH = 6,5). U suspenziju je dodano 1,0 mL otopine ninhidrina, masenog udjela  $w(\text{ninhidrin}) = 5 \%$ , i suspenzija je zagrijavana na 80 °C na vodenoj kupelji, tijekom 60 minuta, uz povremeno miješanje. Nakon toga suspenzija je centrifugirana i supernatant te prebačen u odmernu tikvicu od 100 mL. Talog nakon centrifugiranja ispiran je vodom do potpunog obezbojenja otopine. Otopina nakon ispiranja združena je sa supernatantom u odmjernim tikvicama, nakon čega su tikvice do oznake dopunjene deioniziranom vodom. Otopinama u tikvicama izmjerena je apsorbancija na 565 nm. Sadržaj amino-skupina određen je iz baždarnog dijagrama dobivenog koristeći (3-aminopropil)trimetoksi silan kao standard.

### 3.3.5. Elektrokemijska mjerenja

#### *Priprema modificiranih elektroda*

Da bi se ispitala elektrokatalitička svojstva modificiranih titanatnih nanocjevčica, pripremljene su grafitne elektrode modificirane uzorcima TiNT-NH<sub>2</sub>-BM i TiNT-BM-NH<sub>2</sub>. Modificiranje elektroda izvedeno je deponiranjem smjese modificiranih titanatnih nanocjevčica i grafita na površinu elektrode. Smjese su priređene miješanjem 10 mg TiNT-NH<sub>2</sub>-BM ili TiNT-BM-NH<sub>2</sub> s 40 mg grafitnog praha i 50 µL otopine Nafiona u 400 µL bezvodnog etanola. Smjesa je homogenizirana na vorteks-mješalici te soniciranjem tijekom 5 minuta u ultrazvučnoj kupelji, nakon čega je na površinu grafitne disk-elektrode ( $d = 3$  mm) mikropipetom deponirano 5 µL suspenzije i ostavljeno sušiti na zraku.

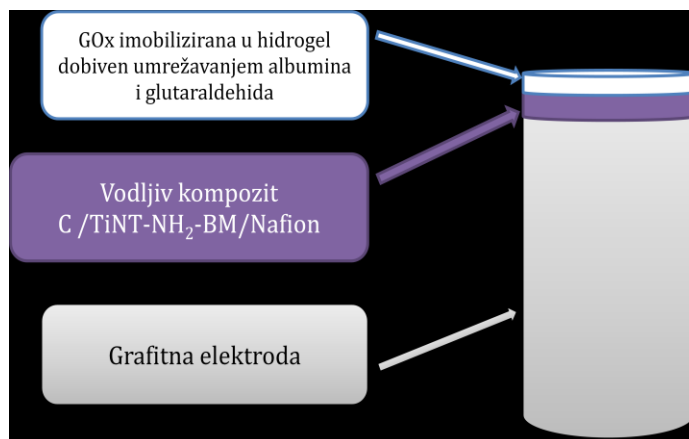
#### *Ispitivanje elektrokatalitičkih svojstava modificiranih nanocjevčica*

Elektrokemijska i elektrokatalitička svojstva elektroda modificiranih uzorcima TiNT-NH<sub>2</sub>-BM i TiNT-BM-NH<sub>2</sub> ispitivana su cikličkom voltametrijom. Kao osnovni elektrolit u voltometrijskim ispitivanjima korištena je otopina KCl koncentracije  $c(\text{KCl}) = 0,1$  mol/L, čiji je pH bio podešen na 3,0 dodatkom otopine HCl. Elektrokatalitička svojstva modificiranih elektroda ispitana su i amperometrijskim mjerenjima, praćenjem promjene katodne struje uslijed dodatka određene koncentracije vodikova peroksida u otopinu. Kako bi se tijekom amperometrijskih mjerenja osigurali hidrodinamički, otopina u elektrokemijskoj ćeliji miješana je tijekom mjerenja magnetskom mješalicom.

#### *Priprema glukoznog biosenzora*

Glukozni biosenzori priređeni su imobilizacijom glukoza oksidaze u hidrogel dobiven umrežavanjem albumina s glutaraldehidom, deponiran na površinu grafitnih elektroda modificiranih sa TiNT-NH<sub>2</sub>-BM. Smjesa za imobilizaciju glukoza oksidaze priređena je otapanjem 5,0 mg glukoza oksidaze i 12,0 mg albumina u 200 µL fosfatnog pufera (pH = 6,0). Nakon što je smjesa ostavljena stajati 45 minuta na sobnoj temperaturi (kako bi se omogućilo uspostavljanje ravnotežne konformacije enzima u otopini), u

otopinu je dodano 100  $\mu\text{L}$  razrijeđene otopine glutaraldehida, masenog udjela  $w(\text{glutaraldehyd}) = 2,5 \%$  i otopina je promiješana. Volumen od 5  $\mu\text{L}$  dobivene otopine mikropipetom je deponiran na površinu grafitnih elektroda prethodno modificiranih sa TiNT-NH<sub>2</sub>-BM i smjesa je ostavljena umrežavati na zraku i sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta. Nakon toga su elektrode isprane s fosfatnim puferom (pH = 6,0) i pohranjene uranjanjem u epruvete s fosfatnim puferom istog pH. Do uporabe biosenzori su držani u hladnjaku, na temperaturi od 4 °C.



Slika 6. Shematski prikaz izvedbe glukoznog biosenzora.

### *Analiza glukoze pomoću priređenog biosenzora*

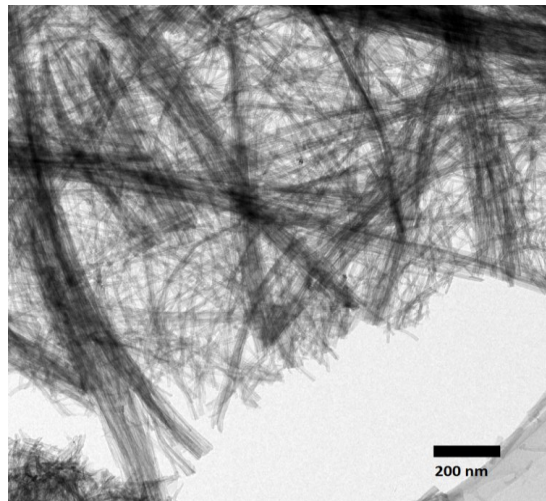
Svojstva priređenih biosenzora određena su određivanjem glukoze u čistim vodenim otopinama i realnim uzorcima voćnih sokova. Mjerenja su izvedena pri radnom potencijalu biosenzora od -100 mV, u fosfatnom puferu čiji je pH iznosio 6,0, praćenjem promjene katodne struje uslijed dodatka uzorka ili standardne otopine glukoze u otopinu. Određivanje koncentracije glukoze u uzorcima voćnih sokova izvedeno je metodom standardnog dodatka, iz omjera porasta katodne struje uslijed dodatka uzorka, odnosno standarda glukoze u otopinu osnovnog elektrolita (0,1 M fosfatni pufer, pH = 6,0) u koju je bio uronjen glukozni biosenzor polariziran na potencijal od -100 mV.. Rezultati analize realnih uzoraka dobiveni pomoću biosenzora uspoređeni su s rezultatima dobivenim primjenom referentne spektrofotometrijske enzimske metode određivanja glukoze, temeljene na reakciji glukoza oksidaze s glukozom u prisutnosti peroksidaze i kromogenog reagensa, amonijeve soli 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS).



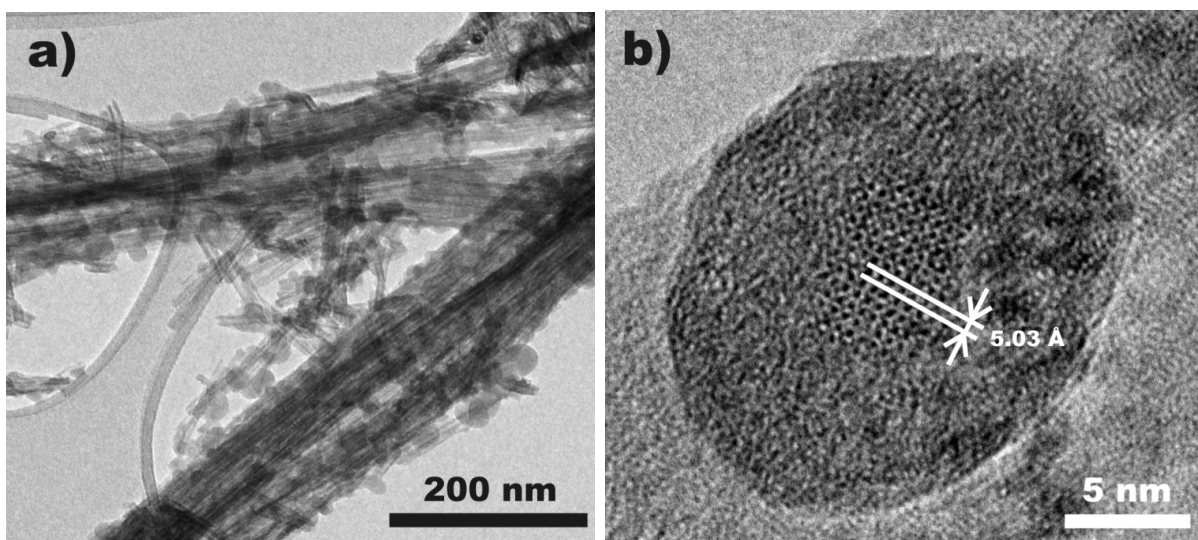
## 4. REZULTATI

### 4.1. Površinske modifikacije titanatnih nanocjevčica

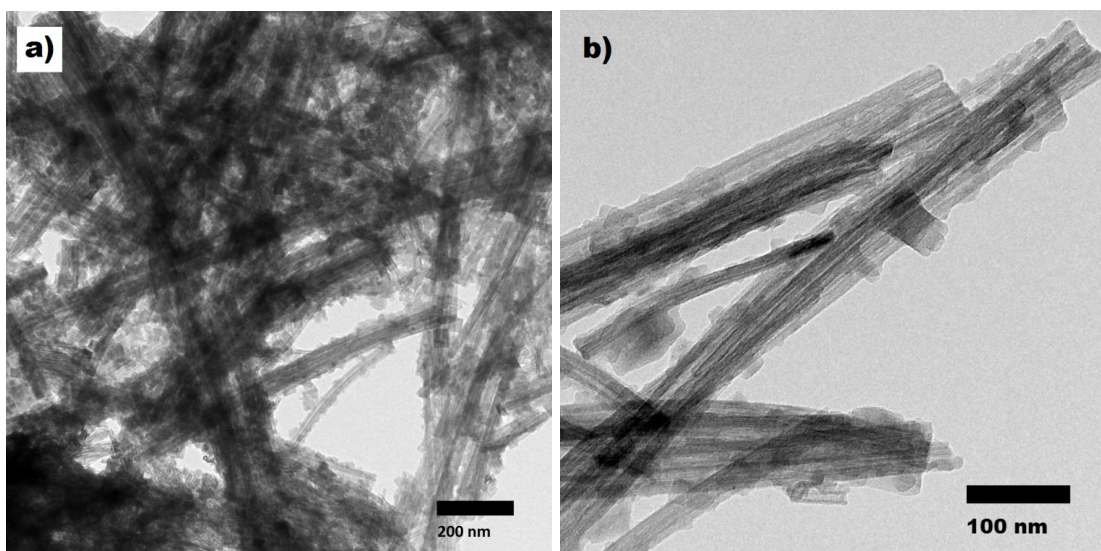
Morfološka svojstva titanatnih nanocjevčica sintetiziranih u ovom radu istražena su transmisivskom elektronskom mikroskopijom (TEM). Tipična TEM mikrografija nemođificiranih titanatnih nanocjevčica prikazana je na slici 7. Slika 8. prikazuje TEM mikrografije uzorka TiNT-BM-NH<sub>2</sub>, a slika 9 TEM mikrografije uzorka TiNT-NH<sub>2</sub>-BM. Mikrografije prikazane na slikama 8.a i 9.a snimljene su pri većem povećanju, kako bi se bolje uočila morfologija nanočestica berlinskog modrila deponiranih na površinu titanatnih nanocjevčica.



Slika 7. TEM mikrografija nemođificiranih titanatnih nanocjevčica.



Slika 8. a) TEM mikrografija uzorka TiNT-BM-NH<sub>2</sub>, b) visokorezolucijska TEM mikrografija čestice berlinskog modrila deponirane na površinu titanatnih nanocjevčica.



Slika 9. TEM mikrografije uzorka TiNT-NH<sub>2</sub>-BM snimljene pri a) manjem povećanju i b) većem povećanju.

Rezultati analize sadržaja željeza u uzorcima TiNT-BM, TiNT-BM-NH<sub>2</sub> i TiNT-NH<sub>2</sub>-BM, iskazani kao maseni udio željeza u modificiranim nanocjevčicama, prikazani su u tablici 2. Na temelju stehiometrije berlinskog modrila (Fe<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sub>3</sub>), iz podataka o masenom udjelu željeza izračunat je maseni udio berlinskog modrila u modificiranim nanocjevčicama, prema formuli:

$$w(\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3) = w(\text{Fe}) * \frac{M_r(\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3)}{7 * M_r(\text{Fe})} = 2,20 * w(\text{Fe})$$

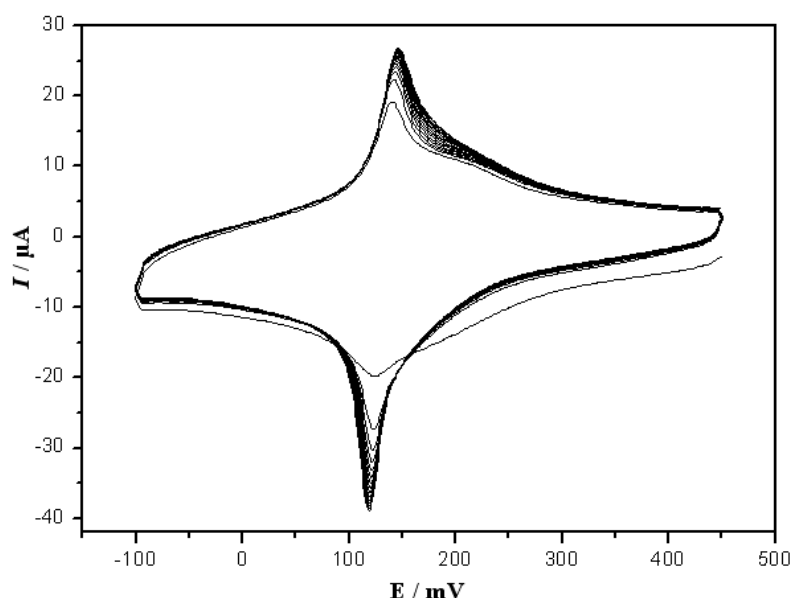
Izračunati maseni udjeli berlinskog modrila također su prikazani u tablici 2. U istoj su tablici prikazani i rezultati analize sadržaja amino-skupina u uzorcima TiNT-NH<sub>2</sub>, TiNT-BM-NH<sub>2</sub> i TiNT-NH<sub>2</sub>-BM, iskazani kao maseni udio NH<sub>2</sub>-skupina u modificiranim titanatnim nanocjevčicama.

Tablica 2. Rezultati analize sadržaja Fe, NH<sub>2</sub>-skupina i berlinskog modrila (BM) u uzorcima modificiranih titanatnih nanocjevčica.

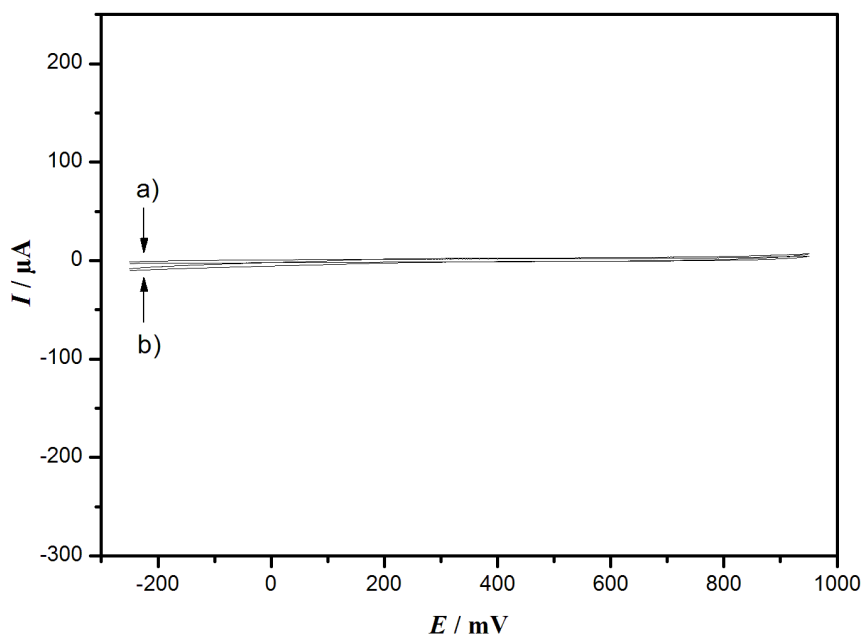
Uzorak	w(Fe) / %	w(NH <sub>2</sub> ) / %	w(BM) / %
TiNT-BM	6,14	---	13,5
TiNT-NH <sub>2</sub>	---	1,33	---
TiNT-BM-NH <sub>2</sub>	4,99	1,15	11,0
TiNT-NH <sub>2</sub> -BM	12,9	0,67	28,4

## 4.2. Elektrokemijska svojstva modificiranih titanatnih nanocjevčica

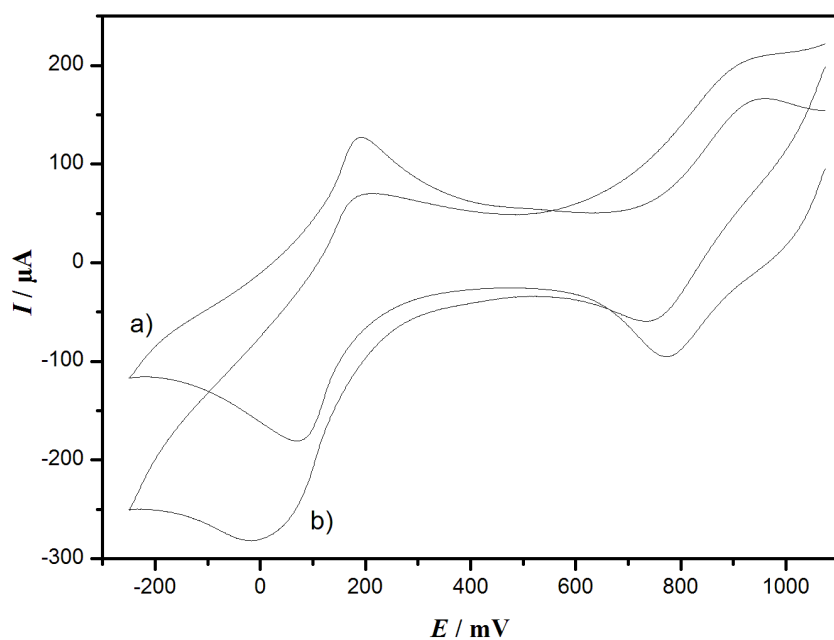
Da bi se omogućila usporedba elektrokemijskih i elektrokatalitičkih svojstava titanatnih nanocjevčica modificiranih s berlinskim modrilom s elektrokemijskim i elektrokatalitičkim svojstvima berlinskog modrila pripremljenog na konvencionalan način, priređena je grafitna elektroda na koju je berlinsko modrilo deponirano klasičnim postupkom, elektrodepozicijom berlinskog modrila na površinu elektrode cikličkom voltametrijom iz otopine koja je sadržavala ione  $\text{Fe}^{3+}$  i  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ . Ciklički voltamogrami snimljeni tijekom depozicije berlinskog modrila tim načinom prikazani su na slici 10. Da bi se dobio općeniti uvid u elektrokemijska i elektrokatalitička svojstva uzoraka TiNT-BM-NH<sub>2</sub> i TiNT-NH<sub>2</sub>-BM, snimljeni su ciklički voltamogrami elektroda modificiranih s navedenim uzorcima u čistom osnovnom elektrolitu te u osnovnom elektrolitu koji je sadržavao vodikov peroksid u koncentraciji od 10 mmol/L. Dobiveni ciklički voltamogrami prikazani su na slikama 11. i 12., pri čemu su skale na osi y jednake na obje slike, kako bi se olakšala vizualna usporedba voltamograma. Usporedbe radi, pri identičnim uvjetima snimljeni su i ciklički voltamogrami na nemođificiranoj grafitnoj elektrodi (slika 13.) i grafitnoj elektrodi modificiranoj berlinskim modrilom konvencionalnim elektrodepozicijskim postupkom (slika 14.).



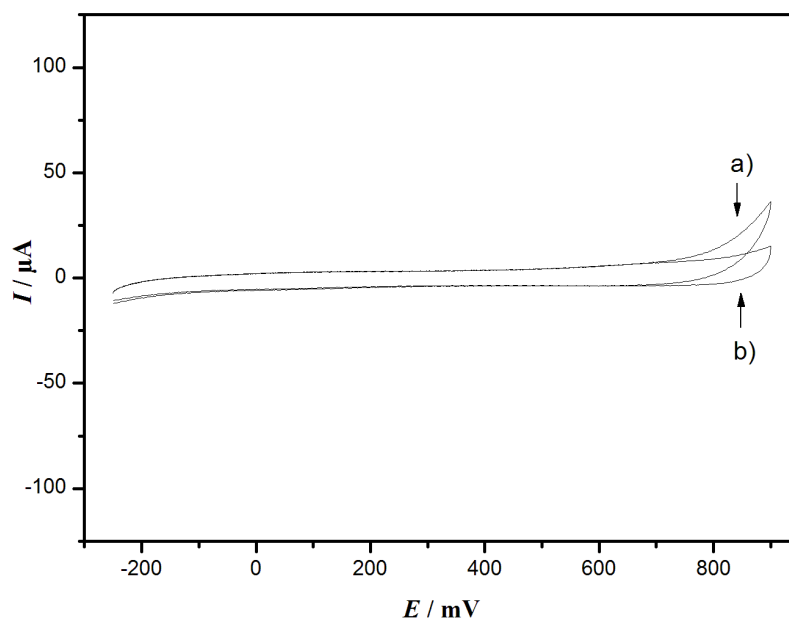
Slika 10. Ciklički voltamogram (25 ciklusa) snimljen tijekom depozicije berlinskog modrila na površinu grafitne elektrode iz otopine koja je sadržavala 5 mM  $\text{Fe}^{3+}$  i 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ . Osnovni elektrolit: 0,1 M KCl, 1 mM HCl (pH = 3). Brzina promjene potencijala: 50 mV/s.



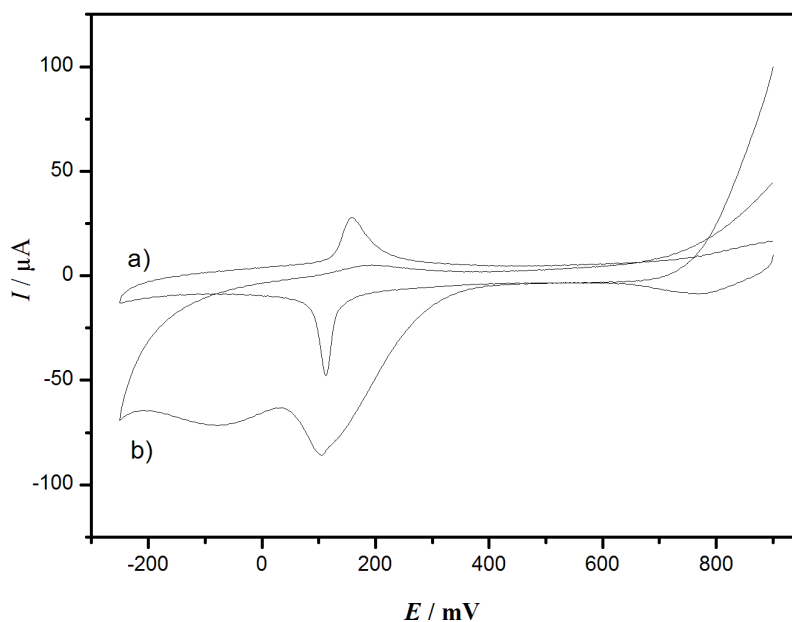
Slika 11. Ciklički voltamogram snimljen na elektrodi modificiranoj uzorkom TiNT-BM-NH<sub>2</sub> u a) čistom osnovnom elektrolitu i b) osnovnom elektrolitu koji je sadržavao 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Osnovni elektrolit: 0,1 M KCl, 1 mM HCl (pH = 3). Brzina promjene potencijala: 50 mV/s.



Slika 12. Ciklički voltamogram snimljen na elektrodi modificiranoj uzorkom TiNT-NH<sub>2</sub>-BM u a) čistom osnovnom elektrolitu i b) osnovnom elektrolitu koji je sadržavao 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Osnovni elektrolit: 0,1 M KCl, 1 mM HCl (pH = 3). Brzina promjene potencijala: 50 mV/s.



Slika 13. Ciklički voltamogram snimljen na nemodificiranoj grafitnoj elektrodi u a) čistom osnovnom elektrolitu i b) osnovnom elektrolitu koji je sadržavao 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Osnovni elektrolit: 0,1 M KCl, 1 mM HCl (pH = 3). Brzina promjene potencijala: 50 mV/s.



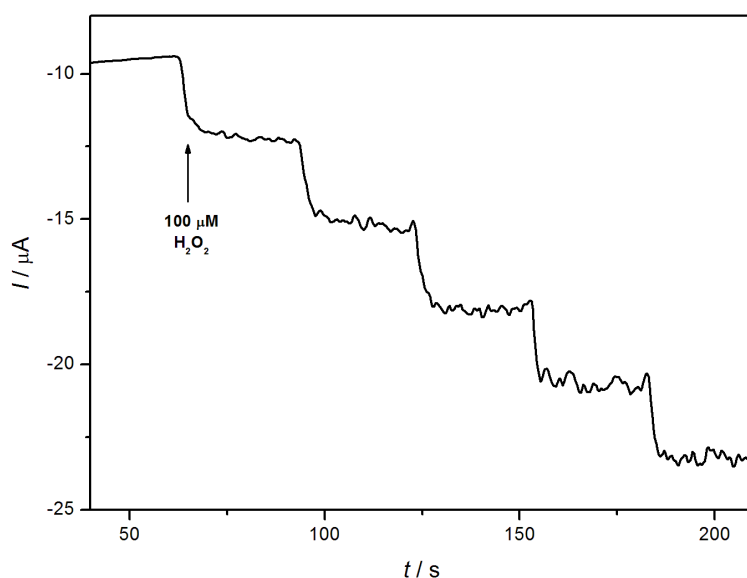
Slika 14. Ciklički voltamogram snimljen na grafitnoj elektrodi modificiranoj s elektrokemijski deponiranim slojem berlinskog modrila u a) čistom osnovnom elektrolitu i b) osnovnom elektrolitu koji je sadržavao 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Osnovni elektrolit: 0,1 M KCl, 1 mM HCl (pH = 3). Brzina promjene potencijala: 50 mV/s.

S obzirom da su provedena elektrokemijska istraživanja jasno pokazala da su elektrokatalitička svojstva uzorka TiNT-NH<sub>2</sub>-BM u redukciji vodikova peroksida značajno bolja od elektrokatalitičkih svojstava uzorka TiNT-BM-NH<sub>2</sub>, u svim daljnjim eksperimentima korištene su elektrode modificirane uzorkom TiNT-NH<sub>2</sub>-BM.

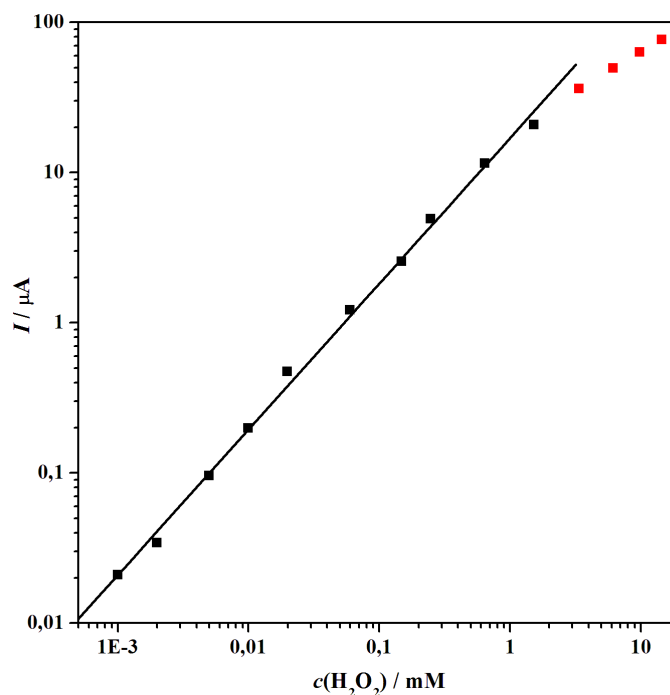
Da bi se odredile analitičke karakteristike elektroda modificiranih uzorkom TiNT-NH<sub>2</sub>-BM, korištenih kao amperometrijski senzori za određivanje vodikova peroksida, elektrode su polarizirane na -100 mV i snimljeni su amperogrami u osnovnom elektrolitu u kojem je uzastopnim dodacima standardne otopine vodikova peroksida koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mijenjana unutar područja od 1 μmol/L do 15 mmol/L. Tipičan amperogram prikazan je na slici 15. Na temelju ovisnosti katodne struje o koncentraciji vodikova peroksida u otopini konstruiran je baždarni dijagram prikazan na slici 16. Linearnom regresijom određena je jednadžba baždarnog pravca:

$$I / \mu\text{A} = (18,0 \pm 0,3) \cdot c(\text{H}_2\text{O}_2) / \text{mM} + (0,06 \pm 0,07)$$

s pripadnim koeficijentom korelacije,  $r^2 = 0,9981$ .



Slika 15. Amperogram snimljen na elektrodi modificiranoj uzorkom TiNT-NH<sub>2</sub>-BM tijekom uzastopnih dodavanja 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Osnovni elektrolit: 0,1 M KCl, 1 mM HCl (pH = 3). Radni potencijal: -100 mV.



Slika 16. Baždarni dijagram za određivanje vodikova peroksida na elektrodi modificiranoj uzorkom TiNT-NH<sub>2</sub>-BM. Uvjeti mjerenja kao na slici 14.

#### 4.3. Karakterizacija amperometrijskog enzimskog biosenzora za glukozu

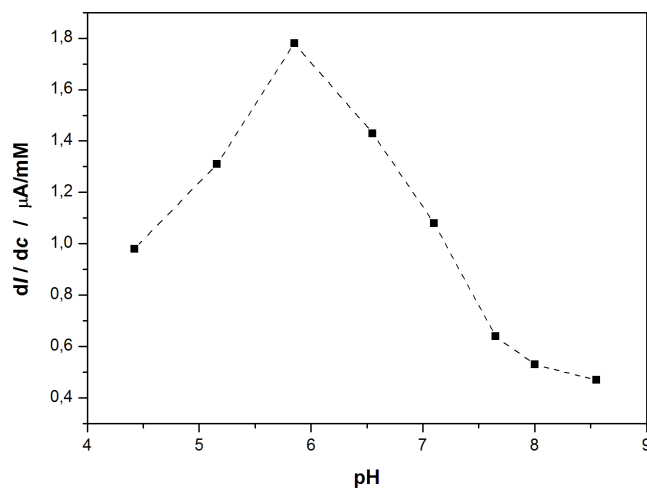
Primjenjivost titanatnih nanocjevčica modificiranih berlinskim modrilom kao katalizatora u amperometrijskim enzimskim biosenzorima temeljenim na oksidazama ispitana je korištenjem elektroda modificiranih uzorkom TiNT-NH<sub>2</sub>-BM kao osnove za izradu amperometrijskog glukoznog biosenzora. Da bi se odredila optimalna vrijednost pH, pri kojoj izrađeni senzori pokazuju najveću osjetljivost, istraženo je kako se osjetljivost biosenzora mijenja u području vrijednosti pH od 4,0 do 8,5. Osjetljivost je određena mjerenjem promjene katodne struje pri -100 mV uslijed promjene koncentracije glukoze za 0,25 mM. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 17.

Linearnost i osjetljivost priređenih glukoznih biosenzora ispitana je mjerenjem promjena katodne struje pri -100 mV u otopini u kojoj je koncentracija glukoze

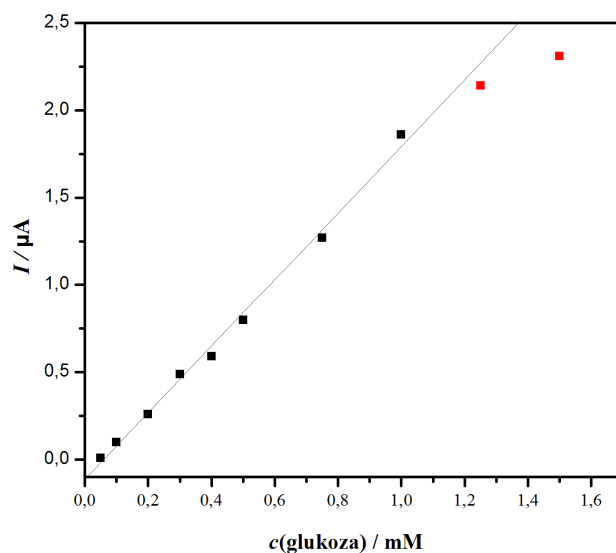
postupno povećavana od 50  $\mu\text{mol/L}$  do 1,5  $\text{mmol/L}$ . Dobiveni baždarni dijagram prikazan je na slici 18. Linearnom regresijom određena je jednačba baždarnog pravca:

$$I / \mu\text{A} = (1,91 \pm 0,06) \cdot c(\text{glukoza}) / \text{mM} - (0,11 \pm 0,03)$$

s pripadnim koeficijentom korelacije,  $r^2 = 0,9949$ .



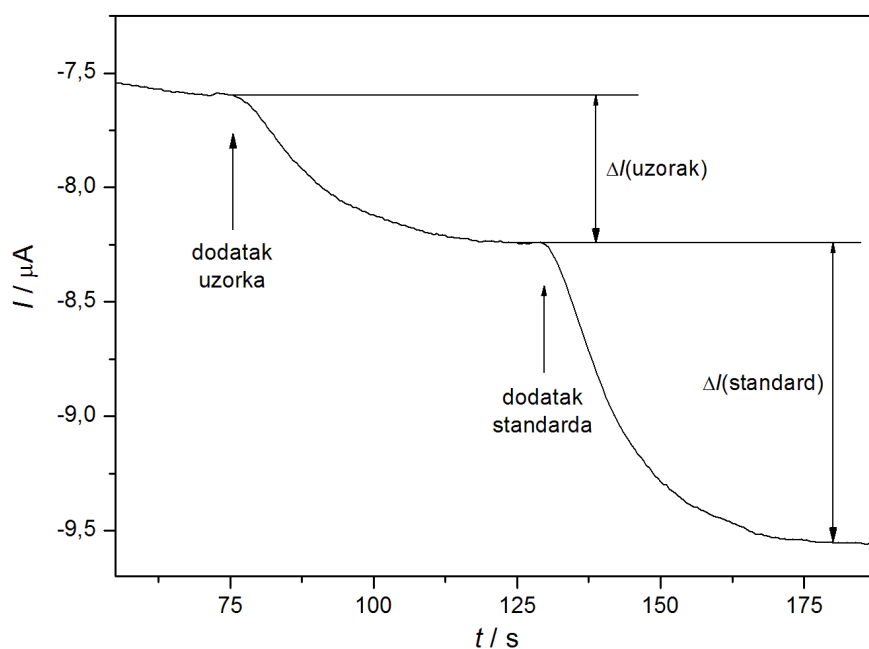
Slika 17. Ovisnost osjetljivosti glukoznog biosenzora o pH-vrijednosti otopine. Osnovni elektrolit: 0,1 M fosfatni pufer. Radni potencijal biosenzora: -100 mV



Slika 18. Baždarni dijagram za glukozu. Osnovni elektrolit: 0,1 M fosfatni pufer, pH = 6,0. Radni potencijal biosenzora: -100 mV.



Da bi se ispitala primjenjivost izrađenih biosenzora u analizi realnih uzoraka, određena je koncentracija glukoze u uzorcima komercijalnih voćnih sokova. Analiza je izvedena pri vrijednosti pH osnovnog elektrolita od 6,0, mjerenjem promjene katodne struje uslijed dodatka uzorka, odnosno dodatka standardne otopine glukoze. Tipičan izgled dobivenog amperograma prikazan je na slici 19., a rezultati analize uzoraka prikazani su u tablici 3. Usporedbe radi, u tablici 3. prikazani su i rezultati analize glukoze u istim uzorcima, dobiveni određivanjem koncentracije glukoze pomoću referentne spektrofotometrijske enzimske metode.



Slika 19. Tipičan amperogram snimljen tijekom određivanja koncentracije glukoze u realnom uzorku metodom standardnog dodatka. Osnovni elektrolit: 0,1 M fosfatni pufer, pH = 6,0. Radni potencijal biosenzora: -100 mV.

Tablica 3. Usporedba rezultata određivanja koncentracije glukoze u uzorcima voćnih sokova maperometrijskim glukoznim biosenzorom i referentnom spektrofotometrijskom metodom.

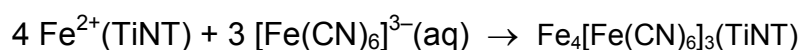
UZORAK	c(glukoza)/mM		Rel.pogreška/%
	BIOSENZOR	REF. METODA	
Voćni sok 1.	460,1307	443,1438	3,833272
Voćni sok 2.	407,8431	398,4899	2,347162
Voćni sok 3.	428,7582	419,0574	2,314908
Voćni sok 4.	454,902	473,6498	-3,95817

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Površinske modifikacije titanatnih nanocjevčica

Kao što se može vidjeti iz TEM mikrografije prikazane na slici 7., titanatne nanocjevčice dobivene reakcijom između titanijeva dioksida i koncentrirane otopine NaOH karakterizira jednoliki vanjski promjer od otprilike 7-10 nm i duljina od nekoliko stotina nm do nekoliko  $\mu\text{m}$ . Nanocjevčice uglavnom formiraju snopove koji se sastoje od nekoliko desetaka nanocjevčica i dugački su po nekoliko  $\mu\text{m}$ . Niti detaljnim pregledom snimljenih TEM mikrografija nije uočeno postojanje nikakvih drugih čestica u uzorku osim nanocjevčica, što navodi na zaključak da je konverzija  $\text{TiO}_2$  u nanocjevčice pri navedenim uvjetima sinteze bila potpuna.

Suspendiranjem nemodificiranih titanatnih nanocjevčica ili titanatnih nanocjevčica modificiranih (3-aminopropil)trimetoksi silanom u otopini iona  $\text{Fe}^{2+}$  dolazi do specifičnog vezanja (adsorpcije) iona željeza na površinu titanatnih nanocjevčica te do ugrađivanja iona željeza u strukturu titanatnih nanocjevčica ionskom izmjenom, analogno ranije opaženim ionsko-izmjenjivačkim svojstvima titanatnih nanocjevčica (Bavykin i sur., 2006; Ma i sur., 2004) Depozicija berlinskog modrila na površinu titanatnih nanočestica modificiranih ionima željeza temelji se na reakciji iona  $\text{Fe}^{2+}$  iz modificiranih nanocjevčica s heksacijanoferatnim(III) ionima iz otopine, kako to prikazuje slijedeća jednadžba:



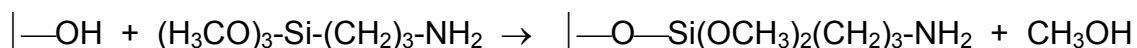
Depozicijom berlinskog modrila na površinu nemodificiranih titanatnih nanocjevčica (uzorak TiNT-BM-NH<sub>2</sub>, Priprema 2) dobivaju se nanočestice berlinskog modrila kuglastog ili polukuglastog oblika, veličine uglavnom između 5 i 30 nm, koje su nasumice raspoređene po površini titanatnih nanocjevčica (slika 8.a). Na visokorezolucijskoj TEM mikrografiji pojedinačne nanočestice berlinskog modrila (slika 8.b) jasno se uočavaju obrisi atoma u kristalnoj rešetki. Razmak između ravnina atoma, određen iz prikazane TEM mikrografije, iznosi 5,03 Å. Taj razmak odgovara razmaku kristalnih ravnina u kristalnoj rešetki berlinskog modrila (5,06 Å, JCPDS no. 73-0687), čime je nedvojbeno potvrđeno da su nanočestice deponirane na površinu titanatnih nanocjevčica zaista berlinsko modrilo. Za razliku od uzorka TiNT-BM-NH<sub>2</sub>, kod uzorka TiNT-NH<sub>2</sub>-BM, dobivenog najprije funkcionaliziranjem

površine titanatnih nanocjevčica (3-aminopropil)trimetoksi silanom, a tek potom depozicijom berlinskog modrila na tako modificirane nanocjevčice (Priprema 1), uočavaju se nanočestice berlinskog modrila uglavnom kubičnog oblika (slika 9.b) i jednolikije raspodjele veličina. Promjena morfologije nanočestica berlinskog modrila može se pripisati promjeni površinskih svojstava podloge na koju je berlinsko modrilo deponirano (površinske OH-skupine u slučaju uzorka TiNT-BM-NH<sub>2</sub>, naspram površinskih NH<sub>2</sub>-skupina kod uzorka TiNT-NH<sub>2</sub>-BM). Iz TEM mikrografija uzorka TiNT-NH<sub>2</sub>-BM može se također uočiti da je gustoća nanočestica berlinskog modrila (tj. brojnost nanočestica po jedinici površine nanocjevčica) veća kod uzorka TiNT-NH<sub>2</sub>-BM, nego kod uzorka TiNT-BM-NH<sub>2</sub> (slike 8.a i 9.a).

Rezultati analize sadržaja željeza (tablica 2) pokazuju da je sadržaj željeza (a time i berlinskog modrila, BM) zaista veći kod uzorka TiNT-NH<sub>2</sub>-BM (28,4 % BM), nego kod uzorka TiNT-BM-NH<sub>2</sub> (11,0 % BM). Takav značajan porast sadržaja željeza kod uzorka TiNT-NH<sub>2</sub>-BM može se pripisati većoj količini iona Fe<sup>2+</sup> adsorbiranoj na površinu titanatnih nanocjevčica tijekom depozicije berlinskog modrila uslijed kompleksiranja iona Fe<sup>2+</sup> s površinskim NH<sub>2</sub>-skupinama. S obzirom da je kod uzorka TiNT-BM-NH<sub>2</sub> površina nanocjevčica modificirana amino-skupinama tek nakon depozicije berlinskog modrila, takav pozitivan efekt kompleksiranja je izostao, pa je i količina deponiranog berlinskog modrila bila manja nego u slučaju uzorka TiNT-NH<sub>2</sub>-BM. Da je za povećanje količine deponiranog berlinskog modrila kod uzorka TiNT-NH<sub>2</sub>-BM zaista odgovorno površinsko kompleksiranje iona Fe<sup>2+</sup> s NH<sub>2</sub>-skupinama (a ne da je manja količina deponiranog berlinskog modrila kod uzorka TiNT-BM-NH<sub>2</sub> posljedica, primjerice, mehaničkog otkidanja nanočestica s površine nanocjevčica tijekom daljnje modifikacije nanocjevčica silanom) potvrđuje i usporedba sadržaja berlinskog modrila deponiranog na nemodificirane titanatne nanocjevčice (uzorak TiNT-BM, 13,5 % BM) i sadržaja berlinskog modrila kod uzorka TiNT-NH<sub>2</sub>-BM. I u ovom slučaju je sadržaj berlinskog modrila u uzorku TiNT-NH<sub>2</sub>-BM veći, iako uzorak TiNT-BM nakon depozicije berlinskog modrila nije bio dalje modificiran.

S obzirom da titanatne nanocjevčice pokazuju veliku površinsku koncentraciju OH-skupina koje su u vodenoj otopini protonirane (tj. djelomično postoje u obliku –OH<sub>2</sub><sup>+</sup>) i pokazuju kiselost svojstva, površinske OH-skupine pokušalo se blokirati reakcijom sa silanom, kako bi se spriječio njihov eventualni negativni učinak na aktivnost

imobiliziranog enzima. Reakciju površinskih OH-skupina s (3-aminopropil)trimetoksi silanom prikazuje slijedeća jednadžba:



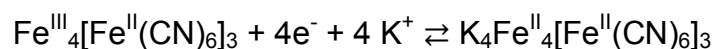
pri čemu kondenzacija može napredovati i dalje, dok ne reagiraju sve tri metoksi-skupine.

Kod uzoraka modificiranih (3-aminopropil)trimetoksi silanom, rezultati analize iskazani u tablici 2 pokazuju da je sadržaj amina manji kod uzorka TiNT-NH<sub>2</sub>-BM (0,67 %), nego kod uzorka TiNT-BM-NH<sub>2</sub> (1,15 %). Takav bi se rezultat mogao pripisati dvama faktorima: većoj specifičnoj površini uzorka TiNT-BM-NH<sub>2</sub> (zbog deponiranja nanočestica na površinu nanocjevčica), zbog čega bi porasao i sadržaj površinski vezanog silana, te zasjenjenju amino-skupina nanočesticama berlinskog modrila kod uzorka TiNT-NH<sub>2</sub>-BM, uslijed čega dio amino-skupina prestaje biti dostupan tijekom analize (tj. molekule ninhidrina prisutne u otopini ne mogu s njima reagirati). Usporedba sadržaja amino-skupina kod titanatnih nanocjevčica modificiranih samo sa (3-aminopropil)trimetoksi silanom (uzorak TiNT-NH<sub>2</sub>, 1,33 % NH<sub>2</sub>) sa sadržajem amino-skupina kod uzorka TiNT-BM-NH<sub>2</sub> i TiNT-NH<sub>2</sub>-BM upućuje na zaključak da je smanjenje sadržaja amino-skupina kod uzorka TiNT-NH<sub>2</sub>-BM zapravo prividno, tj. posljedica zasjenjenja površinskih NH<sub>2</sub>-skupina deponiranim nanočesticama berlinskog modrila.

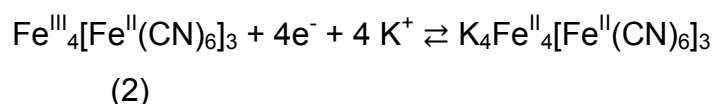
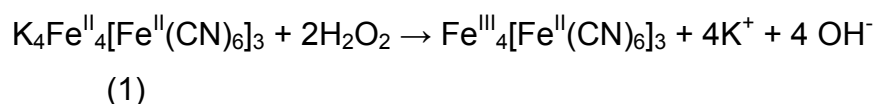
Navedeni rezultati i izvedeni zaključci omogućuju zaključak da oba katalitička materijala, i TiNT-BM-NH<sub>2</sub>, i TiNT-NH<sub>2</sub>-BM sadrže dovoljnu količinu berlinskog modrila (> 10 %) da bi se mogli upotrijebiti kao efikasni katalizatori za modificiranje površine elektroda. Uspješno vezanje (3-aminopropil)trimetoksi silana na oba uzorka osigurava efikasno blokiranje površinskih OH-skupina titanatnih nanocjevčica.

## 5.2. Elektrokemijska svojstva modificiranih titanatnih nanocjevčica

Berlinsko modrilo elektrokemijski je aktivno i u području potencijala između 0 i 250 mV pokazuje dva voltametrijska vala (slika 14.), koji se mogu pripisati reverzibilnoj oksidaciji, odnosno redukciji berlinskog modrila prema jednadžbi (Karyakin i sur., 2001; Ricci i sur. 2005):



Elektrokatalitička svojstva berlinskog modrila jasno su vidljiva iz usporedbe slika 13. i 14. U području potencijala između -200 i +900 mV na nemodificiranoj grafitnoj elektrodi do redukcije vodikova peroksida praktički ne dolazi, dok njegova oksidacija započinje tek pri potencijalima iznad +750 mV (slika 13.). Na grafitnoj elektrodi čija je površina modificirana slojem elektrokemijski deponiranog berlinskog modrila (slika 14.) redukcija vodikova peroksida započinje već pri potencijalu od +450 mV, a oksidacija pri +650 mV. Katalitički efekt berlinskog modrila očito je daleko više izražen za reakciju redukcije vodikova peroksida, a temelji se na reakcijama (Karyakin i sur., 2001; Ricci i sur. 2005):



Vodikov peroksid prisutan u otopini oksidira reducirani oblik berlinskog modrila ( $\text{K}_4\text{Fe}^{\text{II}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$ , reakcija 1), a nastalo berlinsko modrilo elektrokemijski se natrag reducira do  $\text{K}_4\text{Fe}^{\text{II}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$  (reakcija 2), uslijed čega dolazi do porasta katodne struje. Sumarna reakcija koja se odvija na elektrodi prikazana je jednadžbom:



Katalitički efekt uzoraka TiNT-BM-NH<sub>2</sub> i TiNT-NH<sub>2</sub>-BM pri elektrokemijskoj redukciji vodikova peroksida predočavaju slike 11. i 12. Već jednostavna vizualna usporedba voltamograma upućuje na zaključak kako elektroda modificirana s uzorkom TiNT-BM-NH<sub>2</sub> pokazuje zanemarivu elektrokemijsku aktivnost i gotovo nikakav elektrokatalitički efekt pri redukciji vodikova peroksida (slika 11.). Nasuprot tome, na voltamogramima snimljenim na elektrodi modificiranoj s uzorkom TiNT-NH<sub>2</sub>-BM jasno se uočavaju voltametrijski valovi berlinskog modrila, a u otopini koja sadrži vodikov peroksid uočljiv je znatan porast katodne struje (slika 12.). Usporedbom voltamograma snimljenih u otopini koja je sadržavala 10 mM vodikova peroksida na elektrodi modificiranoj s uzorkom TiNT-NH<sub>2</sub>-BM (slika 12.) i elektrodi modificiranoj konvencionalnom elektrokemijskom depozicijom berlinskog modrila (slika 14.), jasno se uočava da je porast katodne struje pri istoj koncentraciji vodikova peroksida

značajno veći kod elektrode modificirane uzorkom TiNT-NH<sub>2</sub>-BM (otprilike 125 μA pri -100 mV), nego kod konvencionalno modificirane elektrode (otprilike 70 μA pri -100 mV). navedeni rezultati upućuju na zaključak da elektrode modificirane sa TiNT-NH<sub>2</sub>-BM pokazuju bolja elektrokatalitička svojstva pri redukciji vodikova peroksida nego elektrode modificirane konvencionalnim postupkom, elektrokemijskom depozicijom berlinskog modrila.

Zbog navedenih svojstava elektrode modificirane s TiNT-NH<sub>2</sub>-BM mogu se iskoristiti kao amperometrijski senzor za selektivno i osjetljivo određivanje vodikova peroksida. Iz nagiba baždarnog pravca prikazanog na slici 16. može se izračunati osjetljivost tako modificiranog senzora koja, uzimajući u obzir geometrijsku površinu elektrode od 0,0707 cm<sup>2</sup>, iznosi 0,255 A M<sup>-1</sup>cm<sup>-2</sup>. Senzor postiže linearan odziv u području koncentracija vodikova peroksida od 50 μM do 1 mM.

### **5.3. Karakterizacija amperometrijskog enzimskog biosenzora za glukozu**

Opisana svojstva elektroda modificiranih s TiNT-NH<sub>2</sub>-BM omogućuju njihovu primjenu kao pretvorničkog dijela amperometrijskog enzimskog senzora temeljenog na enzimu oksidazi. U ovome radu takav je senzor konstruiran koristeći enzim glukoza oksidazu kao modelni enzim. Optimalni pH, pri kojem je senzor pokazivao najveću osjetljivost, utvrđeno je da iznosi 6,0 (slika 17.), što se uglavnom poklapa s optimalnom vrijednošću slobodne glukoza oksidaze u otopini (Kalisz i sur., 1991). S obzirom na visoku elektrokatalitičku učinkovitost TiNT-NH<sub>2</sub>-BM pri redukciji vodikova peroksida, razvijeni senzor pokazivao je vrlo visoku osjetljivost na glukozu. Iz nagiba baždarnog pravca prikazanog na slici 18. može se izračunati osjetljivost biosenzora, koja iznosi 27,0 mA M<sup>-1</sup>cm<sup>-2</sup>. U usporedbi s rezultatima publiciranim u literaturi (tablica 4.), može se zaključiti da je takva osjetljivost biosenzora vrlo visoka, te da razvijeni senzor omogućuje osjetljivo i selektivno određivanje glukoze. Relativno široko linearno područje biosenzora, od 50 μM do 1 mM glukoze, omogućuje fleksibilnost u analizi i pojednostavljuje postupak pripreme uzorka, smanjujući potrebu za čestim promjenama faktora razrjeđenja uzorka.

**Tablica 4.** Usporedba osjetljivosti razvijenog biosenzora s osjetljivošću sličnih biosenzora opisanih u literaturi

OSJETLJIVOST /mA M <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	REFERENCA
27,0	Ovaj rad
0,136	Wang, H. i sur., (2009)
12,6	Pan, D. I sur. (2005)
113,1	Ming- Chieh, T. (2009)
5,4	Dai, Z. I sur. (2007)

Razvijeni biosenzor pokazao se pouzdanim i u analizi realnih uzoraka. Na temelju usporedbe rezultata analize sadržaja glukoze u uzorcima voćnih sokova dobivenih primjenom biosenzora i referentnom spektrofotometrijskom metodom (tablica 3.) može se zaključiti da je slaganje rezultata vrlo dobro, s obzirom da je relativna pogreška analize u svim slučajevima bila manja od 4 %. Iz amperograma prikazanog na slici 14. može se uočiti još jedno poželjno svojstvo razvijenog biosenzora. Naime, biosenzor pokazuje vrlo brzi odziv, s obzirom da do stabilizacije katodne struje dolazi u periodu od 30-40 s nakon dodatka uzorka, odnosno standarda. To je svojstvo izuzetno poželjno pri analizi velikog broja uzoraka, s obzirom da značajno skraćuje vrijeme analize, odnosno omogućuje analizu većeg broja uzoraka po jedinici vremena, čineći analizu na taj način i jeftinijom.



## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju istraživanja provedenih u ovome radu, može se zaključiti sljedeće:

- Titanatne nanocjevčice su prikladan supstrat za površinsko modificiranje s nanočesticama berlinskog modrila i funkcionaliziranim silanima.
- Depozicijom nanočestica berlinskog modrila na titanatne nanocjevčice površinski funkcionalizirane s  $\text{NH}_2$ -skupinama moguće je postići gotovo dvostruko veću površinsku gustoću nanočestica nego u slučaju depozicije berlinskog modrila na nemodificirane titanatne nanocjevčice.
- Nanočestice berlinskog modrila deponirane na površinu titanatnih nanocjevčica funkcionaliziranih s  $\text{NH}_2$ -skupinama pokazuju gotovo dvostruko bolja elektrokatalitička svojstva pri redukciju vodikova peroksida nego berlinsko modrilo pripravljeno konvencionalnim postupkom, elektrokemij-skom depozicijom na površinu elektrode.
- Spomenute titanatne nanocjevčice modificirane s berlinskim modrilom mogu se s uspjehom uporabiti za izradu kompozitnih, katalitički aktivnih elektroda za redukciju vodikova peroksida i amperometrijskih senzora za njegovo selektivno i osjetljivo određivanje.
- Takve kompozitne elektrode mogu se s uspjehom primijeniti kao pretvornički element kod biosenzora temeljenih na oksidazama. S obzirom na visoku katalitičku učinkovitost titanatnih nanocjevčica modificiranih berlinskim modrilom, pripremljeni biosenzori odlikuju se vrlo visokom osjetljivošću, kao što je demonstrirano u slučaju pripremljenog biosenzora za glukozu, koji je pokazivao osjetljivost od  $27,0 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ .

## **7. ZAHVALE**

Zahvaljujemo se dr.sc. Damiru Ivekoviću, doc., našem mentoru, dipl.ing. Davidu Soviću, kao i ostalim djelatnicima Laboratorija za opću i anorgansku kemiju i analizu, na strpljenju, velikoj pomoći i vrijednim savjetima koji su nam uvelike olakšali izradu ovog rada.

## 8. LITERATURA

Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., Ananthanarayan, L. (2009) Glucose oxidase-An overview. *Biotechnology Advances* **27**, 489-501.

Bavykin, D. V., Lapkin, A. A., Plucinski, P. K., Torrente-Murciano, L., Friedrich, J. M., Walsh, F. C. (2006) Deposition of Pt, Pd, Ru and Au on the surfaces of titanate nanotubes, *Topics in Catal.*, **39**, 151-160.

Dai, Z., Fang, M., Bao, J., Wang, H., Lu, T. (2007) An amperometric glucose biosensor constructed by immobilizing glucose oxidase on titanium-containing mesoporous composite material of no. 41 modified screen-printed electrodes. *Anal. Chim. Acta* **591**, 195-199.

Hatzinikolaou, D. G., Hansen, O. C., Macris, B. J., Tingei, A., Kekos, D., Goodenough, P. (1996) A new glucose oxidase from *Aspergillus niger* – Characterization and regulation studies of enzyme and gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 371-381.

Hulanicki, A., Glab, S. J., Ingman, F. (1991) Chemical sensors definitions and classification. *Pure and Appl. Chem.* **83**(9), 1247-1250.

JCPDS no. 73-0687, Joint Committee on Powder Diffraction Standards, International Centre for Diffraction Data, Cambridge, Engleska, kartica br. 73-0687

Kalisz, H., Hendlej, J., Schmid, R. (1997) Structural and biochemical properties of glycosylated and deglycosylated glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 502-507.

Kalisz, H. M., Hecht, H. J., Schomburg, D., Schmid, R. D. (1991) Effects of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta* **1080**(2), 138-142.

Karyakin, A. A. (2001) Prussian Blue and Its Analogues: Electrochemistry and Analytical Applications. *Electroanalysis* **13**, 813-819.

- Ma, R., Sasaki, T., Bando, Y. (2004) Layer-by-Layer Assembled Multilayer Films of Titanate Nanotubes, Ag- or Au-Loaded Nanotubes, and Nanotubes/Nanosheets with Polycations, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 10382-10388.
- Pan, D., Chen, J., Yao, S., Nie, L., Xia, J., Tao, W. (2005) Amperometric glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized o-aminophenol film at copper-modified gold electrode. *Sens. Actuators B.* **104**, 68-74.
- Pluschkell, S., Hellmuth, K., Rinas, U. (1996) Kinetics of glucose oxidase excretion by recombinant *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Bioeng.* **51**, 215-220.
- Ricci, F., Paleschi, G. (2005) Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes, *Biosens. Bioelectron.* **21**, 389-407.
- Skoog, D. A., Holler, J. F., Nieman, T. A. (1998) Principles of Instrumental Analysis, 5. izd., Saunders College Publishing, Philadelphia, str. 639-670.
- Tsai, M-C., Tsai, Y-C. (2009) Adsorption of glucose oxidase at platinum-multiwalled carbon nanotubes-alumina-coated silica nanocomposite for amperometric glucose biosensor. *Sens. Actuators B: Chem*, doi: 10.1016/j.snb.2009.06.016.
- Urdike, S. J. i Hicks, G. P. (1967) Enzyme electrode. *Nature* **214**(5092), 986-988.
- Wang, H., Wang, X., Zhang, X., Qin, X., Zhao, Z., Miao, Z., Huang, N., Chen, Q. (2009.) A novel biosensor based on the immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles-modified Pb nanowires. *Biosens. Bioelectron.* Doi: 10.1016/j.bios.2009.06.022

## 9. SAŽETAK

### UPORABA POVRŠINSKI MODIFICIRANIH TITANATNIH NANOCJEVČICA U AMPEROMETRIJSKIM BIOSENZORIMA

Iva Bebek i Petra Šaler

(Mentor: dr.sc. Damir Iveković, doc.)

Razvoj elektrokemijskih senzora za osjetljivu i selektivnu detekciju vodikova peroksida od velike je praktične važnosti s obzirom da je amperometrijski senzor za vodikov peroksid bitan sastavni dio biosenzora koji se temelje na enzimima oksidazama. On u tim biosenzorima služi kao elektrokemijski pretvornik koji generira struju proporcionalnu koncentraciji vodikova peroksida nastalog tijekom enzimske oksidacije supstrata (tj. analita). Pri amperometrijskoj detekciji vodikova peroksida najviše poteškoća stvara visok prenapon potreban za njegovu oksidaciju, odn. redukciju na većini konvencionalnih elektrodnih materijala, zbog čega senzor mora raditi pri relativno visokom anodnom, odn. katodnom potencijalu. Pri tim radnim potencijalima senzora mnogi interferenti, koji su obično prisutni u realnim uzorcima, također mogu elektrokemijski reagirati na elektrodi, uzrokujući smanjenje selektivnosti senzora, a time i smanjenje točnosti analize. Jedna od najprikladnijih metoda za smanjenje potencijala potrebnog za detekciju vodikova peroksida jest uporaba katalizatora koji olakšavaju njegovu elektrokemijsku oksidaciju, odn. redukciju.

U ovom radu istražena je mogućnost uporabe titanatnih nanocjevčica kao podloge za depoziciju nanočestica željezova(III) heksacijanoferata(II) (berlinskog modrila), jednog od najboljih elektrokemijskih katalizatora za redukciju vodikova peroksida. Namjera je bila iskoristiti veliku specifičnu površinu titanatnih nanocjevčica (otprilike  $250 \text{ m}^2/\text{g}$ ) i njihova kemijska svojstva (mogućnost ionske izmjene te veliku gustoću površinskih OH-skupina) za dobivanje novog katalitičkog materijala velike površine, kod kojeg je postignut visok stupanj disperzije nanočestica katalizatora, te na taj način osigurana velika kontaktna površina između čestica katalizatora i otopine. Pored toga, ispitana je mogućnost površinske modifikacije titanatnih nanocjevčica funkcionaliziranim silanima, te su ispitana svojstva tako dobivenog materijala kao nosača katalizatora. Dobiveni nanostrukturirani katalitički materijali

iskorišteni su za izradu kompozitnih elektroda na bazi grafita i ispitana su njihova elektrokatalitička svojstva u redukciji vodikova peroksida. Elektrode s najboljim elektrokatalitičkim svojstvima iskorištene su za izradu amperometrijskog senzora za glukozu, temeljenog na enzimu glukozna-oksidadzi.

Depozicija berlinskog modrila na površinu titanatnih nanocjevčica izvedena je postupkom izravne ionske izmjene iona  $Fe^{2+}$ , odnosno depozicijom berlinskog modrila na površinu titanatnih nanocjevčica modificiranih (3-aminopropil)trimetoksi silanom, na koje su prethodno adsorbirani ioni  $Fe^{2+}$ . Pokazalo se da je učinkovitost depozicije nanočestica berlinskog modrila gotovo dvostruko veća u slučaju depozicije na titanatne nanocjevčice površinski modificirane amino-skupinama, nego u slučaju depozicije na nemodificirane nanocjevčice. Kompozitne grafitne elektrode koje su sadržavale 10-20 % titanatnih nanocjevčica modificiranih berlinskim modrilom pokazivale su i do deset puta veću katalitičku aktivnost pri elektrokemijskoj redukciji vodikova peroksida, nego elektrode pripravljene na konvencionalan način, elektrokemijskom depozicijom berlinskog modrila na površinu grafitne elektrode. Pripravljene kompozitne elektrode s uspjehom su iskorištene za izradu amperometrijskog biosenzora za glukozu, čija je primjenjivost ispitana analizom realnih uzoraka voćnih sokova i osvježavajućih napitaka. Zahvaljujući visokoj osjetljivosti kompozitnih elektroda na bazi modificiranih titanatnih nanocjevčica, priređeni biosenzori pokazivali su izuzetno visoku osjetljivost na glukozu, 20–30 mA  $M^{-1} cm^{-2}$ .

**Ključne riječi :** Berlinsko modrilo, titanatne nanocjevčice, vodikov peroksid, elektrokataliza, glukozni biosenzor

# SUMMARY

## THE APPLICATION OF SURFACE-MODIFIED TITANATE NANOTUBES IN AMPEROMETRIC BIOSENSORS

Iva Bebek, Petra Šaler

Development of electrochemical sensors for sensitive and selective determination of hydrogen peroxide has a great practical importance because the amperometric hydrogen peroxide sensor is an essential part of oxidase enzyme-based biosensors. It serves as an electrochemical transducer that generates current proportional to the concentration of hydrogen peroxide, formed during the enzyme-catalyzed oxidation of enzymatic substrate (i.e. the analyte). The major problem in amperometric hydrogen peroxide detection is that at ordinarily employed electrode materials oxidation or reduction of hydrogen peroxide requires a high overpotential. Consequently, the sensor must be operated at a relatively high anodic or cathodic potential. At these potentials, many interfering species, usually present in real samples, may react at the electrode simultaneously with hydrogen peroxide, causing the loss of sensitivity and decreasing the accuracy of analysis. One of the most promising strategies to lower the potential for detection of hydrogen peroxide is the use of catalysts for electrochemical oxidation or reduction of hydrogen peroxide.

In this study, the possibility of application of titanate nanotubes as a substrate for deposition of iron(III) hexacyanoferrate(II) (Prussian blue) nanoparticles, one of the best electrochemical catalysts for hydrogen peroxide reduction, has been investigated. The aim of this work was to take advantage of both the high specific surface area of titanate nanotubes (around 250 m<sup>2</sup>/g) and their chemical properties (ion-exchange properties, high density of surface OH-groups) in order to obtain a new, high specific surface area catalytic material with enhanced electrocatalytic properties, high dispersion of catalytic nanoparticles, and consequently, a high contact surface area between the catalyst and surrounding solution. The possibility of surface modifications of titanate nanotubes with functionalized silanes and the properties of obtained materials as a substrate for deposition of catalyst were investigated as well. Synthesized catalytic materials were employed for preparation of graphite-based composite electrodes and their electrocatalytic activity toward the

reduction of hydrogen peroxide was tested. Electrodes with best electrocatalytic properties were used as transducers in amperometric glucose oxidase-based biosensors for determination of glucose.

Prussian blue-modified titanate nanotubes were prepared in two ways: through the reaction of  $\text{Fe}^{2+}$  ion-exchanged titanate nanotubes with ferricyanide ions, or by deposition of Prussian blue nanoparticles onto the surface of (3-aminopropyl)trimethoxy silane-modified titanate nanotubes. It was demonstrated that Prussian blue nanoparticles deposited on titanate nanotubes surface-modified with (3-aminopropyl)trimethoxy silane exhibit almost two times higher catalytic efficiency toward the reduction of hydrogen peroxide, than Prussian blue nanoparticles deposition on unmodified nanotubes. Composite graphite electrodes that contained 10 – 20 % Prussian blue-modified titanate nanotubes showed up to two times higher catalytic activity for electrochemical reduction of hydrogen peroxide, than Prussian blue-modified electrodes prepared conventionally, by electrochemical deposition of Prussian blue on the surface of graphite electrode. Fabricated composite electrodes were successfully employed in construction of amperometric glucose biosensors. The applicability of biosensors in analysis of real samples was tested by determining the glucose concentration in samples of commercial fruit juices. Due to the high sensitivity of composite electrodes based on Prussian blue-modified titanate nanotubes, biosensors developed in this work exhibited high sensitivity for glucose, in the range of 20-30  $\text{mA M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ .

**Keywords** : Prussian blue, titanate nanotubes, hydrogen peroxide, electrocatalysis, glucose biosensor



