

Primjena površinski modificiranih titanatnih nanocjevčica u elektrokemijskim senzorima

Sović, David

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:878490>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

David Sović

**PRIMJENA POVRŠINSKI MODIFICIRANIH
TITANATNIH NANOCJEVČICA U
ELEKTROKEMIJSKIM SENZORIMA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

David Sović

THE APPLICATION OF SURFACE MODIFIED TITANATE NANOTUBES IN ELECTROCHEMICAL SENSORS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015.



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

David Sović

**PRIMJENA POVRŠINSKI MODIFICIRANIH
TITANATNIH NANOCJEVČICA U
ELEKTROKEMIJSKIM SENZORIMA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Izv. prof. dr. sc. Damir Iveković

Zagreb, 2015.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

David Sović

THE APPLICATION OF SURFACE MODIFIED TITANATE NANOTUBES IN ELECTROCHEMICAL SENSORS

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Damir Iveković, associate professor

Zagreb, 2015.

Ova disertacija je izrađena u Laboratoriju za opću i anorgansku kemiju i elektroanalizu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Damira Ivekovića u sklopu Doktorskog studija kemije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Najveću zahvalnost dugujem izv. prof. dr. sc. Damiru Ivekoviću na odabiru zanimljive teme, stručnom vodstvu uz mnoge korisne savjete vezane uz temu i eksperimentalni rad.

Zahvaljujem dr. sc. Borisu Zimmermannu, znan. sur., Institut "Ruđer Bošković", na snimljenim FTIR spektrima.

Hvala dr. sc. Andreji Gajović, znan. savj., Institut "Ruđer Bošković", na snimljenim TEM i SEM mikrografijama te Ramanovim spektrima.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Gordani Matijašić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, na snimljenim adsorpcijsko-desorpcijskim izotermama dušika.

Najljepše zahvaljujem Jasni Barišić, oec., Marini Martinec, mr. sc. Miroslavu Mikšaju i dr. sc. Marini Palčić iz Laboratorija za opću i anorgansku kemiju i elektroanalizu PBF-a za prijateljsku atmosferu i za potporu u izazovnim trenucima.

Zahvaljujem dr. sc. Ireni Đapić na prijateljskim druženjima i živim diskusijama.

Neizrecivu zahvalnost dugujem doc. dr. sc. Branimiru Bertoši na neprocjenjivom dugogodišnjem prijateljstvu i nebrojenim savjetima.

Posebno zahvaljujem mami i bratu na pomoći i podršci tijekom cijelog svojeg života.

Hessov zakon kaže da su bitni samo početno i krajnje stanje dok sam put nije bitan. Suština života je upravo suprotna tom načelu. Njegov je početak poznat i ne možemo na njega utjecati, ali na svršetak djelujemo putem koji nas definira i opisuje i upravo se u putu nalazi naša esencija. S ovime što se nalazi unutar korica započinje nova dionica mog putovanja i od sveg srca zahvaljujem svima koji su na bilo koji dobar način utjecali na usmjeravanje i oblikovanje staze koja je iznjedrila ovu disertaciju.

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	X
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. Elektrokemijski senzori.....	6
2.1.1. Elektrokemijski biosenzori	7
2.1.2. Problem selektivnosti i ovisnosti odziva o koncentraciji kosupstrata kod amperometrijskih enzimskih biosenzora	9
2.1.3. Amperometrijski biosenzori za vodikov peroksid s peroksidazom iz hrena kao receptorom	13
2.1.4. Primjena nanomaterijala u amperometrijskim biosenzorima.....	19
2.2. Titanatne nanocjevčice	23
2.2.1. Sinteza, morfologija i mehanizam nastajanja titanatnih nanocjevčica.....	24
2.2.2. Struktura titanatnih nanocjevčica	28
2.2.3. Fizikalno-kemijska svojstva titanatnih nanocjevčica	30
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	33
3.1. Kemikalije i mjerni instrumenti	34
3.1.1. Kemikalije	34
3.1.2. Mjerni instrumenti.....	34
3.2. Metode.....	36
3.2.1. Sinteza titanatnih nanocjevčica.....	36
3.2.2. Modificiranje titanatnih nanocjevčica s (3-aminopropil)trimetoksisilanom	36
3.2.3. Kovalentno vezanje peroksidaze na površinu titanatnih nanocjevčica modificiranih s (3-aminopropil)trimetoksisilanom	38
3.2.4. Modificiranje titanatnih nanocjevčica s N-saliciliden-n-propilaminskim kompleksima bakra(II) i željeza(III)	41
3.3. Analitički postupci	45
3.3.1. Određivanje udjela primarnih amino skupina u titanatnim nanocjevčicama silaniziranim s (3-aminopropil)trimetoksisilanom	45
3.3.2. Određivanje specifične katalitičke aktivnosti titanatnih nanocjevčica s kovalentno vezanom peroksidazom	46
3.3.3. Raščinjavanje titanatnih nanocjevčica	47
3.3.4. Voltametrijsko određivanje titanijske i bakrene u modificiranim titanatnim nanocjevčicama	47
3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje željeza u modificiranim titanatnim nanocjevčicama.....	47

3.4. Priprema elektroda i biosenzora.....	48
3.4.1. Priprema elektroda od grafitne paste	48
3.4.2. Priprema elektroda od kompozita grafita i Nafiona	48
3.4.3. Priprema amperometrijskog biosenzora za određivanje vodikova peroksida	48
3.4.4. Priprema amperometrijskog biosenzora za određivanje glukoze	49
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	50
4.1. Karakterizacija titanatnih nanocjevčica.....	51
4.1.1. Morfološke značajke	51
4.1.2. Rendgenska difrakcija.....	52
4.1.3. Specifična površina, poroznost i raspodjela volumena pora	55
4.1.4. Infracrvena i Ramanova spektroskopija	59
4.1.5. Termogravimetrijska analiza i diferencijalna pretražna kalorimetrija	61
4.2. Površinsko modificiranje titanatnih nanocjevčica (3-aminopropil)trimetoksisilanom	64
4.2.1. Utjecaj reakcijskih uvjeta na morfološka svojstva produkata dobivenih silaniziranjem titanatnih nanocjevčica i količinu vezanog APTMS.....	66
4.2.2. Strukturna karakterizacija slojeva površinski vezanog APTMS	74
4.2.3. Kinetika vezanja APTMS na površinu titanatnih nanocjevčica	79
4.2.4. Utjecaj vremena trajanja reakcije s APTMS i količine APTMS vezanog na površinu titanatnih nanocjevčica na strukturu površinskog polisiloksanskog sloja	82
4.2.5. Utjecaj vremena trajanja reakcije s APTMS na specifičnu površinu i poroznost silaniziranih nanocjevčica.....	85
4.2.6. Termogravimetrijska i diferencijalna termička analiza titanatnih nanocjevčica silaniziranih s APTMS	87
4.2.7. Reaktivnost površinskih amino skupina titanatnih nanocjevčica silaniziranih s APTMS.....	91
4.3. Elektrokatalitička svojstva površinski modificiranih titanatnih nanocjevčica i njihova primjena u amperometrijskim senzorima	92
4.3.1. Kovalentna imobilizacija N-saliciliden-n-propilaminskih kompleksa bakra(II) i željeza(III) na titanatne nanocjevčice.....	93
4.3.2. Elektrokemijska i elektrokatalitička svojstva titanatnih nanocjevčica površinski modificiranih s N-saliciliden-n-propilaminskim kompleksom željeza(III).....	99
4.3.3. Kovalentna imobilizacija peroksidaze na titanatne nanocjevčice modificirane s APTMS	104
4.3.4. Elektrokemijska i bioelektrokatalitička svojstva titanatnih nanocjevčica s kovalentno imobiliziranom peroksidazom	108
4.3.5. Analitička svojstva elektroda modificiranih s titanatnim nanocjevčicama s imobiliziranom peroksidazom i N-saliciliden-n-propilaminskim kompleksom željeza(III)	118
4.3.6. Primjena titanatnih nanocjevčica s imobiliziranom peroksidazom u analizi realnih uzoraka ..	124
§ 5. ZAKLJUČAK	127
§ 6. LITERATURNI IZVORI.....	130
§ 7. ŽIVOTOPIS	XI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

PRIMJENA POVRŠINSKI MODIFICIRANIH TITANATNIH NANOCJEVČICA U ELEKTROKEMIJSKIM SENZORIMA

David Sović

Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, Zagreb

U radu je istražena mogućnost primjene titanatnih nanocjevčica kao čvrstog nosača za imobilizaciju katalizatora u elektrokemijskim (amperometrijskim) senzorima. Titanatne nanocjevčice površinski su modificirane (3-aminopropil)trimetoksisilanom (APTMS), pri čemu je istražen utjecaj reakcijskih uvjeta na strukturu siloksanskog sloja nastalog na površini titanatnih nanocjevčica. Površinske amino-skupine titanatnih nanocjevčica modificiranih s APTMS iskorištene se kao reaktivna mjesta za kovalentnu imobilizaciju redoks-enzima peroksidaze, odn. kovalentno vezanje katalitički aktivnog *N*-saliciliden-*n*-propilaminskog kompleksa željeza(III) na površinu titanatnih nanocjevčica. Titanatnim nanocjevčicama modificiranim peroksidazom, odn. *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III) istražena su elektrokemijska i elektrokatalitička svojstva. Ustanovljeno je da peroksidaza nakon imobilizacije na površinu titanatnih nanocjevčica zadržava katalitičku aktivnost te da molekule imobilizirane peroksidaze mogu sudjelovati u izravnom prijenosu elektrona između redoks-centra enzima i elektrode, odn. vodljive matrice u koju su nanocjevčice ugrađene. Titanatne nanocjevčice s imobiliziranom peroksidazom s uspjehom su uporabljene za izradu amperometrijskog biosenzora za detekciju vodikova peroksida i dvoenzimskog biosenzora za određivanje glukoze.

(138 stranica, 54 slika, 21 tablica, 255 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102A, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: amperometrijski biosenzori / bioelektrokataliza / peroksidaza / titanatne nanocjevčice

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Damir Iveković, PBF

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić, PMF

Izv. prof. dr. sc. Damir Iveković, PBF

Dr. sc. Vesna Svetličić, znan. savj., IRB

Rad prihvaćen: 29.4.2015.



University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

THE APPLICATION OF SURFACE MODIFIED TITANATE NANOTUBES IN ELECTROCHEMICAL SENSORS

David Sović

Faculty of Food Technology and Biotechnology, Pierottijeva 6, Zagreb

In this thesis, the possibility of application of titanate nanotubes as a solid substrate for immobilization of catalysts in electrochemical (amperometric) sensors was studied. Titanate nanotubes were surface modified with (3-aminopropyl)trimethoxysilane (APTMS) and the influence of reaction conditions on the structure of siloxane layer formed on the surface of titanate nanotubes was studied. Surface amino-groups of titanate nanotubes modified with APTMS were exploited as a reactive sites for covalent immobilization of the redox enzyme peroxidase and for covalent bonding of *N*-salicyliden-*n*-propylamino complex of iron(III) on the surface of titanate nanotubes. Titanate nanotubes modified with peroxidase or with *N*-salicyliden-*n*-propylamino complex of iron(III) were embedded into the conductive graphite composite and its electrocatalytic properties were examined. It was found that after immobilization on the surface of titanate nanotubes, peroxidase retains its catalytic activity and that the molecules of immobilized peroxidase can effectively participate in direct electron transfer between the enzyme redox center and electrode or the conductive matrix in which the nanotubes were embedded. Titanate nanotubes with immobilized peroxidase were successfully employed in the construction of amperometric hydrogen peroxide biosensors of the third generation and in the construction of the bi-enzyme biosensor for glucose detection.

(138 pages, 54 pictures, 21 tables, 255 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and
National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: amperometric biosensors / bioelectrocatalysis / peroxidase / titanate nanotubes

Supervisor: Dr. sc. Damir Iveković, associate professor, PBF

Rewievers: Dr. sc. Snežana Miljanić, associate professor, PMF

Dr. sc. Damir Iveković, associate professor, PBF

Dr. sc. Vesna Svetličić, senior scientist, IRB

Thesis accepted: 29.4.2015.

§ 1. UVOD

Potreba za brzim, jednostavnim i jeftinim metodama za osjetljivo i selektivno prepoznavanje i određivanje pojedinih analita u proteklih je nekoliko desetljeća potakla intenzivna istraživanja u području razvoja kemijskih senzora.¹ Na tržištu i u primjeni najzastupljenija vrsta kemijskih senzora su elektrokemijski senzori,²⁻⁴ koji se gotovo redovito pojavljuju u potenciometrijskoj ili amperometrijskoj izvedbi. Kod amperometrijskih senzora informacija o koncentraciji analita dobiva se mjerenjem jakosti električne struje uslijed oksidacije ili redukcije analita na površini senzora (elektrode) polariziranog na određeni potencijal. S obzirom da se na konvencionalnim elektrodnim materijalima izravna oksidacija ili redukcija mnogih analita zadovoljavajućom brzinom zbiva tek pri visokom prenaponu, pri kojem može doći i do oksidacije, odn. redukcije drugih tvari prisutnih u uzorku, izravno amperometrijsko mjerenje često nije dovoljno selektivno da bi se moglo koristiti u analizi realnih uzoraka kompleksnog sastava. Selektivnost amperometrijskog senzora moguće je povećati modificiranjem elektrodne površine senzora prikladnim katalizatorom, koji može biti elektrokemijski, u kom slučaju smanjuje prenapon za oksidaciju, odn. redukciju analita, ili može selektivno katalizirati kemijsku pretvorbu analita, pri čemu kao produkt katalizirane reakcije nastaje elektrokemijski aktivnija vrsta, u koju svrhu se najčešće rabe enzimi. Da bi se osigurao stabilan rad amperometrijskog senzora čija je selektivnost poboljšana uporabom katalizatora, katalizator je na površinu elektrode potrebno na prikladan način imobilizirati.

Glavnina istraživanja u području amperometrijskih senzora danas je usmjerena na razvoj novih i poboljšanje svojstava postojećih katalizatora. Značajni istraživački naponi ulažu se u razvoj biomimetskih katalizatora koji bi mogli poslužiti kao jeftina zamjena za enzime u enzimskim senzorima,^{5,6} dok u segmentu poboljšanja svojstava postojećih katalizatora dominiraju istraživanja vezana uz razvoj nanostrukturiranih katalizatora^{7(a),8,9} te pronalaženje novih, učinkovitijih metoda imobilizacije katalizatora na površinu senzora.^{7(b),9-11}

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnosti primjene titanatnih nanocjevčica kao čvrstog nosača za imobilizaciju katalizatora u amperometrijskim senzorima. Titanatne nanocjevčice^{12(a)} relativno su nov nanostrukturirani materijal koji se iz mnoštva danas poznatih nano-materijala izdvaja gotovo jedinstvenom kombinacijom fizikalno-kemijskih svojstava: velikom specifičnom površinom, stabilnošću u vodenoj otopini unutar širokog raspona vrijednosti pH, ionsko-izmjenjivačkim svojstvima, reaktivnošću površine uslijed postojanja površinskih Ti–OH skupina, protonskom vodljivošću i poluvodičkim svojstvima te katalitičkom i fotokatalitičkom aktivnošću. Pored toga, sinteza titanatnih nanocjevčica

relativno je jednostavna i jeftina, što omogućuje njihovu pripremu u proizvoljno velikim količinama. Zbog vrlo velikog aspektnog omjera titanatne nanocjevčice relativno brzo sedimentiraju pa je njihova izolacija iz suspenzija, i općenito manipulacija s njima, vrlo jednostavna. Dodatna prednost titanatnih nanocjevčica jest i njihova netoksičnost i dobra biokompatibilnost, svojstvena svim titanatnim materijalima i materijalima na bazi TiO_2 .

Osnovna zamisao rada bila je iskoristiti reaktivnost površinskih Ti-OH skupina titanatnih nanocjevčica kako bi se na površinu nanocjevčica kovalentno vezao prikladan katalizator te tako modificirane nanocjevčice ugraditi u električki vodljiv kompozit koji bi se upotrijebio u izradi amperometrijskih senzora. Pri tome je namjera bila iskoristiti veliku površinsku gustoću Ti-OH skupina i veliku specifičnu površinu nanocjevčica kako bi se maksimirala količina imobiliziranog katalizatora dostupnog za reakciju s analitom te na taj način ostvarile dobre analitičke karakteristike senzora. Kao modelni katalizatori odabrani su redoks-enzim peroksidaza te katalitički aktivan *N*-saliciliden-*n*-propilaminski kompleks željeza(III). Odabir peroksidaze u prvom je redu bio motiviran širinom primjene amperometrijskih biosenzora koji kao receptor koriste peroksidazu. Osim za izravno određivanje supstrata peroksidaze – vodikova peroksida, ti se biosenzori mogu upotrijebiti i kao izuzetno selektivni elektrokemijski pretvornici u biosenzorima temeljenim na oksidazama, u kojima kao produkt oksidazom katalizirane oksidacije analita s molekulskim kisikom nastaje vodikov peroksid. *N*-saliciliden-*n*-propilaminski kompleks željeza(III) odabran je zbog strukturne sličnosti sa salenskim kompleksima željeza(III), koji su široko primjenjivani i komercijalno važni katalizatori u reakcijama selektivne oksidacije niza organskih spojeva,¹³ a istražuju se i kao mimetici peroksidaze.¹⁴⁻¹⁶ Koordinacijsko okruženje željezovog(III) kationa u salenskim i *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksima gotovo je identično, pri čemu *N*-saliciliden-*n*-propilaminski kompleksi omogućuju veću fleksibilnost pri odabiru metode kovalentne imobilizacije liganda na čvrsti nosač no što je to slučaj kod analognih salenskih kompleksa.

Titanatne nanocjevčice sintetizirane su reakcijom praškastog TiO_2 (anatas) s koncentriranom vodenom otopinom NaOH , nakon čega su ionskom izmjenom prevedene u tzv. protonirani oblik ($\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$). Da bi se na titanatne nanocjevčice mogla imobilizirati peroksidaza, površina nanocjevčica najprije je funkcionalizirana primarnim amino skupinama reakcijom površinskih Ti-OH skupina s (3-aminopropil)trimetoksisilanom. Pritom je istražen utjecaj reakcijskih uvjeta na morfologiju dobivenog produkta i strukturu nastalog (3-aminopropil)siloksanskog površinskog sloja, s obzirom da u trenutku izrade ovog rada nije

postojala sistematska studija površinskog modificiranja titanatnih nanocjevčica funkcionaliziranim alkoksisilanima. Kovalentna imobilizacija peroksidaze potom je izvedena povezivanjem površinskih amino skupina modificiranih nanocjevčica s amino skupinama iz lizinskih ogranaka peroksidaze pomoću bifunkcionalnog reagensa, pri čemu je istraženo kako uporabljeni bifunkcionalni reagensi utječu na katalitičku aktivnost imobilizirane peroksidaze. Za imobilizaciju *N*-saliciliden-*n*-propilaminskog kompleksa željeza(III) na površinu titanatnih nanocjevčica razvijeno je nekoliko sintetskih postupaka temeljenih na reakciji liganda ili prethodno formiranog metalnog kompleksa s površinskim skupinama titanatnih nanocjevčica, odnosno na formiranju kompleksa *in situ*, reakcijom metalnog kationa s titanatnim nanocjevčicama površinski funkcionaliziranim odgovarajućim ligandom.

Za morfološku i strukturnu karakterizaciju polaznih i površinski modificiranih titanatnih nanocjevčica te za proučavanje strukture površinskih slojeva modificiranih nanocjevčica korištene su transmisijiska i pretražna elektronska mikroskopija, rendgenska difrakcija te Ramanova i FTIR spektroskopija. Dodatni zaključci o svojstvima površinskog siloksanskog sloja izvedeni su iz rezultata dobivenih termogravimetrijskim mjerenjima i diferencijalnom termičkom analizom. Specifična površina i poroznost nemodificiranih i modificiranih titanatnih nanocjevčica određeni su snimanjem adsorpcijsko-desorpcijskih izoterma dušika pri vrelištu tekućeg dušika. Za elektrokemijsku karakterizaciju modificiranih titanatnih nanocjevčica ugrađenih u električki vodljive kompozite (grafitnu pastu, grafitom modificiran silikatni gel ili kompozit grafita i sulfoniranog fluoropolimera *Nafiona*) korištene su ciklička voltimetrija i hidrodinamička voltimetrija na rotirajućoj disk-elektrodi. Posebna pozornost posvećena je istraživanju elektrokatalitičkih svojstava modificiranih nanocjevčica i određivanju kinetičkih parametara elektrokatalitičke reakcije. Modificirane nanocjevčice s najboljim elektrokatalitičkim svojstvima u konačnici su iskorištene za izradu amperometrijskog senzora za vodikov peroksid te u sprezi s glukozom-oksidadom za izradu amperometrijskog biosenzora za određivanje glukoze. Analitička primjenjivost konstruiranog biosenzora ispitana je njegovom primjenom u analizi realnih uzoraka te usporedbom dobivenih rezultata s rezultatima referentne metode.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Elektrokemijski senzori

Kemijski senzori¹⁷ su naprave koje kemijsku informaciju o uzorku, u rasponu od koncentracije pojedinog sastojka uzorka do ukupnog sastava uzorka, pretvaraju u analitički koristan signal. Kemijski senzor sastoji se od dva osnovna dijela – receptorskog (osjetilnog) i pretvorničkog. Receptorski dio senzora odgovoran je za selektivno i osjetljivo prepoznavanje analita i u njemu se kemijska informacija pretvara u prikladan oblik energije, koji se zatim u pretvorničkom dijelu prevodi u lako mjerljiv signal, najčešće električni. U slučaju da se kemijska informacija o uzorku može dobiti iz određenog fizikalnog svojstva uzorka (npr. apsorpcije, električne provodnosti, gustoće i sl.) koje se na karakterističan način mijenja ovisno o sadržaju analita u uzorku, rad receptorskog dijela senzora može se temeljiti isključivo na fizikalnom principu. No radi postizanja bolje selektivnosti kod kemijskih je senzora češći slučaj da kemijska informacija o uzorku potječe od kemijske ili biokemijske interakcije između analita i receptorskog dijela senzora, koja često uključuje i selektivnu kemijsku pretvorbu analita.

Veliku i s aspekta analitičke primjene važnu skupinu kemijskih senzora čine elektrokemijski senzori.^{1,18,19} Elektrokemijski senzori redovito se izvode u obliku elektrode s kojom analit stupa u elektrokemijsku interakciju, koja može biti spontana ili potaknuta vanjskim električnim izvorom. U prvom slučaju najčešće se radi o spontanom uspostavljanju elektrokemijske ravnoteže na površini elektrode, pri čemu se ravnoteža može uspostaviti između oksidiranog i reduciranog oblika nekog redoks-para, ili između jedne te iste električki nabijene vrste sadržane u dvije različite faze. Tipičan predstavnik takvih elektrokemijskih senzora su potenciometrijski senzori,²⁰ kod kojih se mjeri razlika potencijala između tzv. indikatorske elektrode (koja može biti ionsko-selektivna elektroda, redoks-elektroda ili elektroda metal/metalni oksid) i prikladne referentne elektrode u ravnotežnim (bestrujnim) uvjetima. U drugom se slučaju elektrokemijski senzor pomoću vanjskog električnog izvora polarizira na određeni potencijal u odnosu na otopinu, pri kojem kroz granicu faza senzor/otopina dolazi do neto prijenosa naboja uslijed heterogene elektrokemijske reakcije u kojoj sudjeluje analit. U općenitom slučaju kod takvih se elektrokemijskih senzora mjeri jakost struje kao funkcija narinutog potencijala pa se nazivaju voltametrijskim senzorima. No najčešće se jakost struje mjeri pri konstantnoj vrijednosti narinutog potencijala pa se prema analognoj elektrokemijskoj mjernoj tehnici – amperometriji – takvi senzori nazivaju amperometrijskim senzorima.

Posebna vrsta elektrokemijskih senzora su senzori temeljeni na kemijski osjetljivim tranzistorima s efektom polja (tzv. ChemFET, prema eng. *chemically sensitive field effect transistor*).²⁰ Kod tih je senzora aktivna površina tranzistora s efektom polja (FET) modificirana na način da stupa u kemijsku interakciju s analitom, pri čemu se mijenja potencijal na granici faza FET/otopina, što dovodi do promjene jakosti struje koja teče kroz FET.

2.1.1. Elektrokemijski biosenzori

Kemijski senzori kod kojih se prepoznavanje analita temelji na biokemijskoj interakciji, tj. kod kojih receptorski dio sadrži biokemijski aktivnu vrstu ili strukturu (enzim, DNK, antitijelo, organelu, cijelu stanicu, dio tkiva...) s kojom analit stupa u selektivnu interakciju, nazivaju se biosenzorima.²¹⁻²³ Ovisno o interakciji do koje dolazi između analita i receptora, biosenzori se obično dijele na katalitičke i afinitetne. Kod katalitičkih biosenzora biokemijski aktivna vrsta koja tvori receptorski dio senzora katalizira selektivnu kemijsku pretvorbu analita, dok kod afinitetnih biosenzora analit s biokemijski aktivnom vrstom u receptorskom dijelu tvori stabilan kompleks temeljen na molekulskom prepoznavanju. Tipičan primjer katalitičkih biosenzora su enzimski biosenzori, kod kojih enzim može biti izoliran ili sadržan u svom prirodnom okruženju (stanici ili tkivu), a primjeri afinitetnih biosenzora su biosenzori temeljeni na antitijelima ili DNK.

I katalitički, i afinitetni biosenzori često se pojavljuju u elektrokemijskoj inačici, kod koje je biokemijski aktivna vrsta na prikladan način imobilizirana na površinu elektrode koja ima ulogu pretvornika. Rad afinitetnih elektrokemijskih biosenzora vrlo se često temelji na mjerenju promjene impedancije uslijed vezanja analita na receptor koji je imobiliziran na površinu elektrode, pri čemu dolazi do promjene kapaciteta dvosloja i otpora prijenosu naboja (tzv. faradayskog otpora).^{24,25} Elektrokemijski afinitetni senzori koji kao receptor koriste antitijela (tzv. *imunosenzori*) mogu raditi i na principu ELISA testova:²⁶ na elektrodu se imobilizira antitijelo (AT1), na antitijelo se iz uzorka veže antigen (AG), zatim se dodaje enzimski označeno antitijelo (ATE) koje se veže na kompleks AT1-AG dajući kompleks AT1-AG-ATE vezan na elektrodu. Uranjanjem elektrode u otopinu koja sadrži supstrat enzima E dolazi do konverzije supstrata u elektrokemijski aktivan produkt, čija se koncentracija najčešće mjeri amperometrijski.

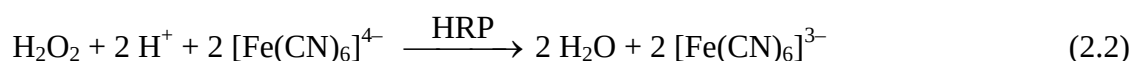
Od elektrokemijskih katalitičkih biosenzora svakako su najzastupljeniji elektrokemijski enzimski biosenzori,^{27,28} izvedeni kao potenciometrijski, amperometrijski ili ChemFET biosenzori. Rad potenciometrijskih i ChemFET enzimskih biosenzora temelji se na mjerenju promjene koncentracije ionske vrste koja kao reaktant ili produkt sudjeluje u enzimski kataliziranoj pretvorbi analita. Pretvornički dio takvih biosenzora je ili ionsko-selektivna elektroda, ili ChemFET, i u oba slučaja je osjetljiv na ionsku vrstu koja sudjeluje u enzimskoj reakciji. Ionske vrste uključene u enzimске reakcije kod potenciometrijskih i ChemFET biosenzora najčešće su ioni H_3O^+ , NH_4^+ , HCO_3^- i X^- ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$) s obzirom da su ti ioni uključeni u reakcije katalizirane različitim oksidazama, hidrolazama, liazama, lipazama i dehalogenazama.²⁹⁻³³ Rad amperometrijskih enzimskih biosenzora³⁴ temelji se na amperometrijskom mjerenju promjene koncentracije elektroaktivne vrste uključene u enzimski kataliziranu pretvorbu analita. Ta se elektroaktivna vrsta pri određenom potencijalu elektrokemijski oksidira ili reducira, a rezultirajuća jakost struje funkcija je koncentracije analita. Receptorski dio amperometrijskih enzimskih senzora u pravilu sadži oksidoreduktazu, najčešće enzim iz grupe oksidaza, dehidrogenaza ili peroksidaza.

S obzirom da oksidaze kataliziraju oksidaciju supstrata uz molekulski kisik kao kosupstrat i akceptor elektrona, pri čemu kao produkt nastaje vodikov peroksid, amperometrijski biosenzori koji u receptorskom dijelu sadrže oksidazu u svojoj najjednostavnijoj izvedbi najčešće mjere smanjenje koncentracije kisika ili povećanje koncentracije vodikova peroksida uz površinu biosenzora uzrokovano enzimski kataliziranom pretvorbom analita. Na primjer, amperometrijski biosenzor za glukozu (koji je ujedno i najčešće korišten elektrokemijski biosenzor) temelji se na enzimski kataliziranoj oksidaciji β -D-glukoze molekulskim kisikom u D-glukono-1,5-lakton. Amperometrijski se smanjenje koncentracije kisika uz površinu biosenzora može mjeriti kisikovom (Clarkovom) elektrodom (pri čemu se glukoza-oksidaza imobilizira na membranu Clarkove elektrode),³⁵ dok se porast koncentracije vodikova peroksida može mjeriti anodnom oksidacijom H_2O_2 do molekuskog kisika,³⁶ ili katodnom redukcijom H_2O_2 do vode.³⁷

Kod amperometrijskih biosenzora s dehidrogenazama, koje za katalitičku aktivnost zahtijevaju prisutnost slobodnog kofaktora ($\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ ili FAD/FADH_2) u otopini, rad biosenzora temelji se na mjerenju jakosti struje potrebne za elektrokemijsku konverziju kofaktora u početno oksidacijsko stanje. Primjerice, rad amperometrijskih biosenzora za alkohole temelji se na oksidaciji alkohola s enzimom alkohol-dehidrogenazom, pri čemu se

kofaktor NAD^+ reducira u NADH , a jakost struje oksidacije NADH u početno (oksidirano) stanje proporcionalna je koncentraciji alkohola u uzorku.³⁸

Rad amperometrijskih biosenzora s peroksidazama (od kojih je u senzorskoj primjeni najzastupljenija peroksidaza izolirana iz hrena, dalje u tekstu označena kraticom HRP) temelji se na katalitičkom ciklusu peroksidaze koji podrazumijeva dvoelektronsku redukciju vodikova peroksida (ili rijede organskog peroksida) u prisutnosti prikladnog kosupstrata, koji može biti donor vodika (AH, najčešće organski spoj iz skupine fenola) ili donor elektrona (najčešće heksacijanoferatni(II) ion):³⁹



Mjerenjem jakosti katodne struje uslijed redukcije nastalog radikala $\text{A}^\bullet$ ili heksacijanoferatnog(III) iona, takvim se biosenzorom može određivati vodikov peroksid (uz uvjet da je u uzorak dodan suvišak kosupstrata), odnosno kosupstrat AH (uz uvjet da je u uzorak dodan suvišak vodikova peroksida). Kao primjeri za potonje mogu se navesti amperometrijski biosenzori s peroksidazom za određivanje fenola i njegovih derivata, kao što su katehol, rezorcinol, *p*-krezol, nitrofenol te mono- i disupstituirani kloro-derivati fenola.⁴⁰

2.1.2. Problem selektivnosti i ovisnosti odziva o koncentraciji kosupstrata kod amperometrijskih enzimskih biosenzora

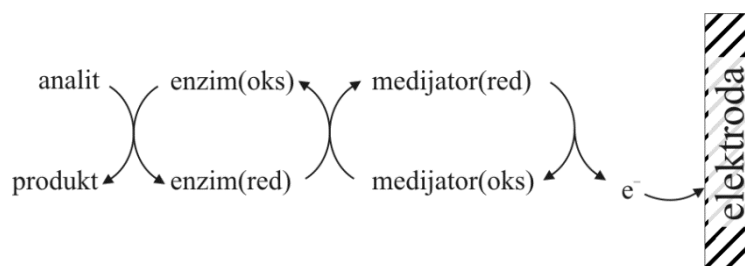
Odzivni strujni signal amperometrijskih enzimskih biosenzora opisanih u prethodnom poglavlju posljedica je izravne elektrokemijske oksidacije (ili redukcije) kemijske vrste koja u enzimski kataliziranoj pretvorbi analita sudjeluje kao kosupstrat ili se javlja kao produkt te enzimске reakcije. Na tom jednostavnom principu počivao je rad prvih amperometrijskih enzimskih biosenzora čiji je razvoj započeo još početkom osamdesetih godina prošlog stoljeća, zbog čega se takvi senzori nazivaju amperometrijskim enzimskim biosenzorima prve generacije. Iako jednostavni, takvi biosenzori u primjeni pokazuju nekoliko značajnih nedostataka. Primjerice, kod biosenzora temeljenih na oksidazama strujni odziv biosenzora uz istu koncentraciju analita mijenja se ovisno o koncentraciji molekuskog kisika otopljenog u uzorku, koja pak ovisi o temperaturi, parcijalnom tlaku kisika, ionskom sastavu uzorka,

porijeklu uzorka i sl. Nadalje, izravna oksidacija ili redukcija vodikova peroksida ($E^0(\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2) = -0,70 \text{ V}$, $E^0(\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}) = 1,78 \text{ V}$) na većini uobičajenih elektrodnih materijala (Pt, Au, grafit i staklasti ugljik, SnO_2 ...) vrlo je spora pa se zadovoljavajućom brzinom odvija tek uz prenapone veće od 1,5 V. To uvjetuje relativno visok anodni ili katodni radni potencijal biosenzora, na kojem može doći do pojave elektrokemijskih interferencija uslijed prisustva drugih elektroaktivnih tvari u uzorku. S obzirom da se izravna elektrokemijska oksidacija kofaktora NADH i FADH_2 , odn. redukcija kofaktora NAD^+ i FAD ($E^0(\text{NADH}/\text{NAD}^+) = 0,32 \text{ V}$; $E^0(\text{FADH}_2/\text{FAD}) = 0,22 \text{ V}$) na uobičajenim elektrodnim materijalima također odvija uz visok prenapon, sličan problem elektrokemijske interferencije pojavljuje se i kod amperometrijskih senzora prve generacije temeljenih na dehidrogenazama.

Iako se elektrokemijske interferencije kod amperometrijskih enzimskih biosenzora mogu značajno umanjiti ili čak u potpunosti ukloniti uporabom permselektivnih membrana⁴¹ koje u obliku tankog filma prekrivaju površinu biosenzora i na taj način sprečavaju pristup potencijalnih interferenata površini elektrode, na taj se način degradiraju analitičke karakteristike biosenzora (povećava se granica detekcije i smanjuje osjetljivost), a povećava se i vrijeme odziva biosenzora. Stoga se problem elektrokemijske interferencije kod amperometrijskih enzimskih biosenzora prve generacije već početkom devedesetih godina prošlog stoljeća pokušalo riješiti modificiranjem površine elektrode prikladnim katalizatorom koji smanjuje prenapon za elektrokemijsku reakciju na kojoj se temelji rad biosenzora. Time se omogućuje rad senzora pri nižem potencijalu, na kojem su elektrokemijske interferencije manje izražene ili u potpunosti eliminirane. Dobrim katalizatorom za elektrokemijsku redukciju vodikova peroksida pokazao se željezov(III) heksacijanoferat(II) (berlinsko modrilo),⁴² a za njegovu elektrokemijsku oksidaciju platinski metali dispergirani u obliku nanočestica u vodljivoj matrici.^{43,44} Dobra elektrokatalitička svojstva pri oksidaciji, odn. redukciji kofaktora koje koriste dehidrogenaze pokazali su redoks-indikatori na bazi fenotiazina i fenoksazina, derivati viologena, kompleksi osmija i rutenija te ferocen i njegovi derivati.^{45,46} Istraživanja u području razvoja učinkovitih, selektivnih i stabilnih elektrokemijskih katalizatora za primjenu u amperometrijskim biosenzorima intenzivna su i danas, pri čemu je fokus istraživanja uglavnom prebačen na razvoj nanostrukturiranih katalizatora.

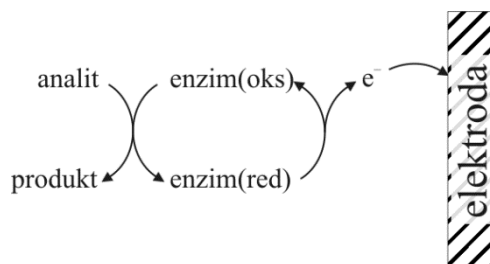
Ovisnost odziva biosenzora s oksidazom o koncentraciji otopljenog molekuskog kisika moguće je riješiti zamjenom kisika (kao prirodnog kosupstrata oksidaze) s odgovarajućim

akceptorom elektrona (tzv. *medijatorom*) koji također može funkcionirati kao kosupstrat oksidaze. Nakon što primi elektron od reduciranog oblika enzima, medijator se regenerira oksidacijom na elektrodi (slika 2.1.), a rezultirajuća jakost struje funkcija je koncentracije analita. Medijator se odabire takav da je reakcija između medijatora i redoks-centra enzima termodinamički moguća te da se njegov standardni potencijal nalazi unutar područja potencijala u kojem su elektrokemijske interferencije prilikom korištenja biosenzora minimalne. Medijator također mora biti elektrokemijski stabilan (tj. mora se moći podvrgnuti velikom broju ciklusa oksidacije i redukcije bez degradacije), mora pokazivati elektrokemijski reverzibilno ponašanje, treba brzo reagirati s enzimom, a reducirani oblik medijatora ne smije reagirati s molekulskim kisikom prisutnim u otopini. Neki od najčešće korištenih medijatora u amperometrijskim biosenzorima s oksidazama su ferocen i njegovi derivati, kinoni, tetracijanokinodimetan, tetratiafulvalen te heksacijanoferatni(II)/(III) ioni.⁴⁷ Biosenzori koji se temelje na uporabi medijatora nazivaju se amperometrijskim enzimskim biosenzorima druge generacije.



Slika 2.1. Shematski prikaz prijenosa elektrona između elektrode i enzima medijatorom kod amperometrijskih enzimskih biosenzora druge generacije.

Značajan nedostatak biosenzora druge generacije jest potreba dodavanja medijatora u uzorak, što dovodi do velike potrošnje medijatora pri analizi i povećanja cijene analize. To se, doduše, može izbjeći imobilizacijom medijatora u receptorski dio biosenzora, no u tom slučaju često se javlja problem vremenske stabilnosti medijatora, odnosno njegove postupne degradacije tijekom rada senzora. Navedeni nedostaci biosenzora druge generacije potakli su istraživanja u području amperometrijskih enzimskih biosenzora u pravcu razvijanja tzv. enzimskih biosenzora treće generacije,⁴⁸ kod kojih se enzim elektrokemijski reducira ili oksidira izravnim prijenosom elektrona između elektrode i aktivnog centra enzima, bez uporabe medijatora ili prirodnog kosupstrata enzima (slika 2.2.).



Slika 2.2. Shematski prikaz izravnog prijenosa elektrona između enzima i elektrode kod amperometrijskih enzimskih biosenzora treće generacije.

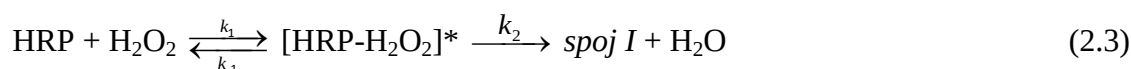
Pri izravnom prijenosu elektrona s elektrode na enzim, transport elektrona s površine elektrode do redoks-centra enzima odvija se pretežito tuneliranjem. S obzirom da brzina tuneliranja elektrona eksponencijalno opada s debljinom potencijalne barijere, koja je kod izravnog prijenosa elektrona s elektrode na enzim određena udaljenošću redoks-centra enzima od površine elektrode,⁴⁹ mjerljiva struja uslijed izravnog prijenosa elektrona opaža se samo kod enzima kod kojih je redoks-centar smješten na samoj površini globule enzima ili neposredno blizu njene površine. Na brzinu izravnog prijenosa elektrona između elektrode i redoks-centra enzima značajno utječe i orijentacija enzima u odnosu na površinu elektrode. U načelu, efikasno tuneliranje elektrona moguće je samo ako je smještaj redoks-centra u globuli enzima i njena orijentacija u odnosu na površinu elektrode takva da udaljenost redoks-centra od površine elektrode ne prelazi 10–15 Å.⁴⁹ Izravni prijenos elektrona kod enzima čiji je redoks-centar smješten dublje unutar proteinske globule može se pospješiti upotrebom metalnih nanočestica,⁵⁰ ugljikovih nanocjevčica,⁵¹ molekulskih žica⁵² ili dendritičnih organskih vodljivih soli na bazi tetracijanokinodimetana i tetratiafulvena⁵³ koje služe kao "mostovi" između elektrode i redoks-centra enzima.

U odnosu na amperometrijske enzimске biosenzore prve i druge generacije, biosenzori treće generacije ne zahtijevaju prisutnost medijatora ili kosupstrata pa su u izvedbi i korištenju jednostavniji i jeftiniji. Nažalost, poznat je tek relativno mali broj enzima koji mogu sudjelovati u učinkovitom izravnom prijenosu elektrona, s obzirom da se kod većine enzima aktivni centar nalazi predaleko od površine proteinske globule pa je brzina prijenosa elektrona između elektrode i redoks-centra enzima zanemarivo mala. Dosad je izravni prijenos

elektrona primijećen kod svega četrdesetak redoks-proteina i enzima,⁵⁴ od kojih su najviše istraživani redoks-proteini iz skupine citokroma, a od enzima peroksidaza iz hrena i lakaza.

2.1.3. Amperometrijski biosenzori za vodikov peroksid s peroksidazom iz hrena kao receptorom

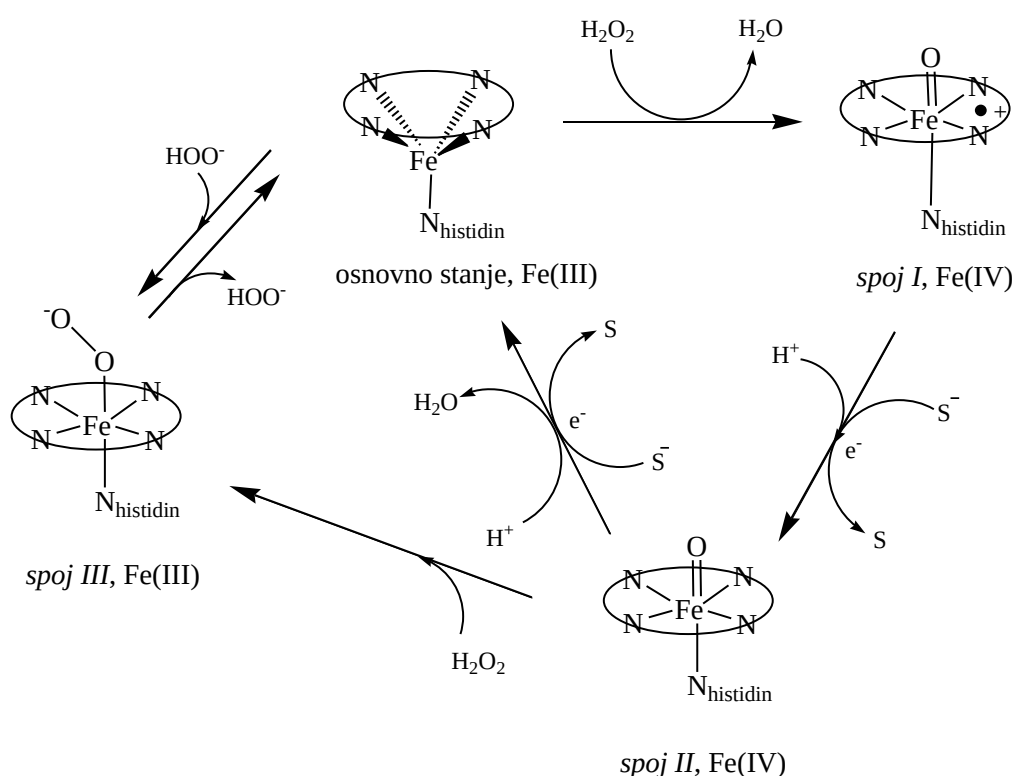
Peroksidaza izolirana iz hrena (*Armoracia rusticana*; za enzim se uobičajila kratica HRP, prema engl. *horseradish peroxidase*; u daljnjem tekstu samo *peroksidaza*) relativno je mali glikoprotein ($M_r \approx 44\,200$) koji, kako je već spomenuto u pogl. 2.1.1., katalizira oksidaciju različitih organskih i anorganskih supstrata (primjerice fenola i njegovih derivata, aromatskih amina, heksacijanoferatnog(II) iona, jodida...) uz H_2O_2 kao akceptor elektrona.⁵⁵ Aktivni centar peroksidaze smješten je blizu površine globule enzima (otprilike 0,41 nm od površine), a sadrži hem s histidinom kao ligandom u aksijalnom položaju.⁵⁶ Prirodni katalitički ciklus peroksidaze kompleksan je i uključuje veći broj međuprodukata, no u pojednostavljenom obliku može se opisati sa sljedeća tri osnovna stupnja:^{57(a)}



u kojima HRP predstavlja osnovno (nativno) stanje peroksidaze sa željezom iz hema u stupnju oksidacije +3, a *spoj I* i *spoj II* su oksidirani oblici peroksidaze koji se u katalitičkom ciklusu peroksidaze pojavljuju kao intermedijeri. Struktura hema u sve tri spomenute vrste shematski je prikazana na slici 2.3.^{57(a)} U prvom stupnju katalitičkog ciklusa peroksidaze (reakcija 2.3), koji u početnoj fazi obuhvaća nastajanje reverzibilnog Michaelisova kompleksa $[HRP-H_2O_2]^*$, vodikov peroksid reagira s peroksidazom dajući *spoj I*, oksidirani oblik peroksidaze u kojem se željezo nalazi u oksiferilnom obliku ($Fe(IV)=O$), a porfirinski prsten u obliku porfirinskog radikal-kationa (slika 2.3.). U prisustvu kosupstrata koji je donor vodika (AH, reakcija 2.4.a) ili donor elektrona (S^- , reakcija 2.4.b), porfirinski radikal-kation iz *spoja*

I se reducira, pri čemu nastaje oksidirani oblik kosupstrata ($A^{\bullet}$, odn. *S*), a *spoj I* prelazi u tzv. *spoj II* (reakcija 2.4). U *spoju II* željezo iz hema i dalje se nalazi u oksiferilnom obliku. Reakcijom *spoja II* s drugom molekulom kosupstrata (reakcije 2.5.a i 2.5.b) ponovo nastaje oksidirani oblik kosupstrata, a *spoj II* se reducira do osnovnog stanja peroksidaze, čime se zatvara katalitički ciklus enzima.

Osim *spoja I* i *spoja II*, kao međuprodukt u katalitičkom ciklusu peroksidaze može se pojaviti i tzv. *spoj III*. *Spoj III* sadrži okso-kompleks željeza(III) ($Fe(III)-O_2^-$), a najčešće nastaje oksidacijom *spoja II* u prisustvu velikog suviška vodikova peroksida.^{57(b),58} *Spoj III* je rezonancijski stabiliziran pa je katalitički slabo aktivan.^{57(b)} Pored toga, jedan od puteva raspada *spoja III* dovodi do degradacije tetrapirolskog prstena hema i nastajanja biliverdina, što uzrokuje ireverzibilnu inaktivaciju peroksidaze.^{57(b)} Iz tog razloga biosenzori s peroksidazom nisu prikladni za analizu uzoraka koji sadrže visoku koncentraciju vodikova peroksida.

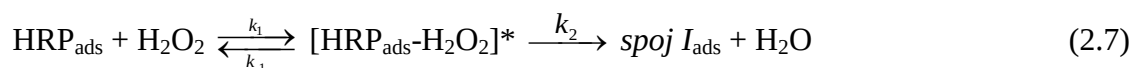


Slika 2.3. Shematski prikaz promjena na hemu u pojedinim stupnjevima katalitičkog ciklusa peroksidaze iz hrena.

Rad amperometrijskih biosenzora za vodikov peroksid s peroksidazom kao receptorom temelji se na mjerenju jakosti struje redukcije oksidiranog oblika kosupstrata nastalog u reakcijama 2.4 i 2.5. Kao osnova za izradu senzora može se koristiti bilo koja inertna elektroda (npr. elektroda od platine, zlata, grafita, staklastog ugljika ili dopiranog SnO_2) na čiju se površinu potom imobilizira peroksidaza. Za imobilizaciju peroksidaze (također i drugih enzima) razvijeno je mnoštvo postupaka,⁵⁹ pri čemu je najčešće riječ o fizičkom ugrađivanju ili kovalentnom vezanju peroksidaze u sloj polimera koji je u obliku tankog filma deponiran na površinu elektrode, a rijede o kovalentnom vezanju peroksidaze izravno na površinu elektrode. U prvom slučaju tipično se radi o filmovima na bazi hidrogela albumina,^{60,61} silikatnog gela,^{62,63} sulfoniranog fluoropolimera *Nafiona*⁶⁴ ili vodljivih polimera.^{65,66} Kako bi se prilikom određivanja vodikova peroksida izbjegla potreba dodavanja kosupstrata u uzorak, u polimernu matricu u koju se imobilizira peroksidaza najčešće se ugrađuje i prikladan medijator, koji preuzima ulogu donora elektrona u reakcijama 2.4.b i 2.5.b. Tipično korišteni medijatori u amperometrijskim sensorima s peroksidazom su ferocen i njegovi derivati,^{67,68} kompleksi osmija^{69,70} te organski redoks-indikatori na bazi fenazina i fenotiazina.^{64,71} Umjesto imobilizacije peroksidaze u polimerni film deponiran na površinu elektrode, peroksidaza (i po potrebi odgovarajući medijator) može se dodati u prikladnu vodljivu tintu dobivenu dispergiranjem grafitnog praha u silikatnom solu, čime se omogućuje izrada biosenzora tehnikom sitotiska.⁷² Nakon što otapalo iz vodljive tinte ispari, na podlozi na koju je bila nanijeta tinta zaostaje čvrsti, električki vodljiv kompozit u kojem su vodljive čestice međusobno povezane silikatnim gelom u koji su fizički uhvaćene molekule peroksidaze i molekule medijatora. U slučaju kovalentnog vezanja peroksidaze izravno na elektrodu, površinu elektrode najprije je potrebno funkcionalizirati, tj. na nju uvesti reaktivne skupine koje mogu poslužiti za kovalentno vezanje enzima.⁹ Za funkcionaliziranje su vrlo podesne elektrode od zlata, s obzirom da je njihovu površinu moguće lako modificirati samoorganizirajućim filmom alkantiola terminiranog željenom funkcionalnom skupinom, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{R}$. U slučaju tiola terminiranih karboksilnom skupinom, karboksilne se skupine najprije aktiviraju *N*-hidroksisukcinimidom, nakon čega se na njih peroksidaza može vezati preko amino skupina lizinskih ogranaka koje se nalaze na površini globule enzima.⁷³ Uporaba tiola terminiranih epoksidnom skupinom omogućuje kovalentno vezanje peroksidaze preko lizinskih amino skupina bez prethodne aktivacije, dok je uporabom tiola terminiranih boratnom skupinom peroksidazu na zlatnu elektrodu moguće vezati preko površinskih

šećera.⁷⁴ Površinska funkcionalizacija elektroda na bazi ugljika može se izvesti anodnom polarizacijom elektrode u oksidirajućem mediju, čime se na površinu uvode kisikove funkcionalne skupine, pretežito karboksilne i karbonilne.⁷⁵ Nakon aktivacije površinskih funkcionalnih skupina, na njih se peroksidaza može vezati izravno ili preko odgovarajućeg bifunkcionalnog reagensa, koji ujedno može služiti i kao medijator.⁷⁶

U specijalnom slučaju peroksidaze adsorbirane izravno na površinu elektrode, redukciju *spoja I* i *spoja II* u osnovno stanje peroksidaze moguće je izvesti i izravno, prijenosom elektrona s elektrode na redoks-centar peroksidaze.⁵⁴ U tom slučaju elektroda kao izvor elektrona preuzima ulogu elektron-donorskog kosupstrata (medijatora) pa se katalitički ciklus peroksidaze može, analogno reakcijama 2.4–2.6, prikazati sa:



gdje supskript *ads* uz pojedinu kemijsku vrstu označava da je odnosna vrsta adsorbirana na površinu elektrode, odn. da je u izravnom električnom kontaktu s elektrodom. S obzirom da reakcije 2.7–2.9 zapravo opisuju elektrokemijsku redukciju vodikova peroksida uz peroksidazu kao katalizator, uobičajilo se da se katalitički ciklus opisan reakcijama 2.7–2.9 naziva *bioelektrokatalitičkim* ciklusom peroksidaze. Reakcije 2.8 i 2.9 temelj su rada biosenzora s peroksidazom treće generacije, koji omogućuju određivanje vodikova peroksida bez prethodnog dodavanja medijatora (kosupstrata peroksidaze) u uzorak, odn. imobilizacije medijatora na elektrodu.

S obzirom da je redoks-centar peroksidaze vrlo blizu površine globule enzima, potencijalna barijera za tuneliranje elektrona između elektrode i redoks-centra enzima relativno je uska pa je vjerojatnost tuneliranja elektrona velika. Zbog toga reakcije 2.8 i 2.9 ne zahtijevaju veliki prenapon pa se redukcija *spoja I* i *spoja II* primjetnom brzinom može odvijati već pri potencijalima koji su vrlo bliski odgovarajućim redukcijskim potencijalima redoks-parova *spoj I* / *spoj II* i *spoj II* / HRP. Pri pH = 7 i ionskoj jakosti od 0,1 mol/dm³ redukcijski potencijal redoks-para *spoj I* / *spoj II* iznosi 700 mV prema Ag/AgCl/3M KCl elektrodi,⁷⁷ dok je pri istim uvjetima za redukcijski potencijal redoks-para *spoj II* / HRP dobivena vrijednost od 680 mV.⁷⁸ Zbog toga se kod biosenzora treće generacije s

peroksidazom iz hrena kao receptorom mjerljiva struja uslijed bioelektrokatalitičke redukcije vodikova peroksida opaža već pri potencijalima od otprilike 650 mV prema Ag/AgCl elektrodi, pri čemu se u hidrodinamičkim uvjetima granična jakost struje redukcije H₂O₂ postiže pri potencijalima od otprilike 250 do 300 mV prema Ag/AgCl elektrodi.⁷⁹⁻⁸²

S obzirom na laku dostupnost redoks-centra peroksidaze očekivalo bi se da se bioelektrokatalitička aktivnost peroksidaze opaža lako i na većini elektrodnih materijala. Činjenica je, međutim, da je do danas bioelektrokatalitička aktivnost peroksidaze opažena samo u slučaju peroksidaze adsorbirane na elektrode od ugljika (spektroskopski grafit i staklasti ugljik,^{79,81,83-85} pirolitički grafit,^{86,87} dijamant dopiran borom⁸⁸ i grafitna pasta^{87,89}), zlata^{80,90,91} i srebra,⁹² pri čemu je kod elektroda od zlata i srebra prije adsorpcije peroksidaze površinu elektrode potrebno oksidirati. Izravan prijenos elektrona između elektrode i redoks-centra peroksidaze primijećen je i na drugim elektrodnim materijalima te uz druge načine imobilizacije peroksidaze (recentni pregled dan je u ref. 59), no on se redovito odvijao tek pri potencijalima koji su značajno katodniji od potencijala pri kojima započinju procesi opisani reakcijama 2.8 i 2.9, tipično pri potencijalima nižim od –150 mV prema Ag/AgCl elektrodi. S obzirom da su ti potencijali bliski potencijalima pri kojima dolazi do redukcije željeza(III) u željezo(II) u hemu peroksidaze ($E(\text{HRP}_{\text{Fe(III)}}/\text{HRP}_{\text{Fe(II)}}) = -467 \text{ mV}$ prema Ag/AgCl/3M KCl elektrodi pri pH = 7,⁹³ no ta vrijednost varira za nekoliko stotina mV ovisno o okruženju hema u proteinu^{57(b)}), pretpostavlja se da je u spomenutim slučajevima tijekom imobilizacije peroksidaze na elektrodu došlo do značajnijih konformacijskih promjena u okolini aktivnog centra, zbog kojih je onemogućena normalna katalitička funkcija peroksidaze opisana jednadžbama 2.8 i 2.9.⁹⁴ Redukcija vodikova peroksida u tom se slučaju odvija mehanizmom koji u početnom stupnju uključuje redukciju željeza iz hema iz oksidacijskog stanja +3 u oksidacijsko stanje +2:



nakon čega započinje katalitički ciklus koji uključuje oksidaciju reducirane peroksidaze vodikovim peroksidom u *spoj II* i elektrokemijsku redukciju *spoja II* natrag do potpuno reducirane peroksidaze:⁹⁴



Pregledom literature vezane uz amperometrijske biosenzore za vodikov peroksid čiji se rad temelji na izravnom prijenosu elektrona između elektrode i redoks-centra peroksidaze lako se utvrđuje da rad većine opisanih biosenzora počiva na katalitičkom ciklusu kojeg prikazuju jednadžbe 2.10–2.12, a ne na bioelektrokatalitičkom ciklusu opisanom jednadžbama 2.7–2.9. Analitičku primjenjivost takvih biosenzora svakako treba kritički razmotriti u kontekstu njihovog radnog potencijala. Naime, pri analizi realnih uzoraka područje prihvatljivih radnih potencijala amperometrijskog senzora s anodne je strane ograničeno potencijalom pri kojem se primjetnom brzinom počinje odvijati oksidacija lako oksidabilnih interferenata (tipičan primjer su fiziološki antioksidansi u uzorcima biološkog porijekla), a s katodne strane potencijalom pri kojem se primjetnom brzinom počinje odvijati redukcija otopljenog molekuskog kisika. Za većinu uobičajenih elektrodnih materijala katodna granica tog područja leži između -100 i -150 mV, a anodna između 250 i 350 mV prema Ag/AgCl elektrodi. S obzirom da amperometrijski biosenzori za vodikov peroksid čiji se rad temelji na katalitičkom ciklusu prikazanom jednadžbama 2.10–2.12 gotovo redovito zahtijevaju radne potencijale negativnije od -100 mV prema Ag/AgCl elektrodi (usp. ref. 95-99), podložni su interferenciji molekuskog kisika otopljenog u uzorku. Ta se interferencija u načelu može izbjeći uklanjanjem kisika iz uzorka, no to analizu čini nepraktičnom i dugotrajnom, a u slučajevima u kojima biosenzor za vodikov peroksid ima ulogu amperometrijskog pretvornika u biosenzoru koji kao receptor koristi oksidazu, uklanjanje otopljenog kisika iz uzorka onemogućilo bi rad biosenzora.

Može se zaključiti da su za određivanje vodikova peroksida u realnim uzorcima te za primjenu kao amperometrijski pretvornici u biosenzorima s oksidazama prikladniji biosenzori čiji se rad temelji na bioelektrokatalitičkom ciklusu peroksidaze prikazanom jednadžbama 2.7–2.9. Nažalost, takvi su biosenzori dosad realizirani samo s peroksidazom fizički adsorbiranom na površinu elektrode, zbog čega se enzim s površine senzora relativno lako ispire tijekom analize, odn. skladištenja senzora, što za posljedicu ima gotovo potpun gubitak aktivnosti senzora unutar 2–8 dana korištenja.⁹² Stoga je pronalaženje prikladnog načina imobilizacije peroksidaze na površinu biosenzora, koji bi osigurao vremensku stabilnost biosenzora, ali istovremeno i očuvao bioelektrokatalitičku aktivnost peroksidaze, još uvijek važan i neriješen zadatak u području razvoja biosenzora za određivanje vodikova peroksida.

2.1.4. *Primjena nanomaterijala u amperometrijskim biosenzorima*

U posljednjih petnaestak godina kontinuirano raste interes za primjenu nanomaterijala i nanotehnologija u izradi kemijskih senzora, tako da ta istraživanja danas dominiraju područjem razvoja kemijskih senzora. Pri pokušaju sistematiziranja istraživanja vezanih uz razvoj kemijskih senzora temeljenih na primjeni nanomaterijala i nanotehnologija, čak i ako se fokus usmjeri na samo jedan tip kemijskih senzora, problem predstavlja izuzetno velik broj objavljenih znanstvenih radova i njihova raznovrsnost, pri čemu se često stječe dojam da je u pojedinim istraživanjima primjena nanomaterijala bila sama sebi svrhom. Ipak, u području razvoja amperometrijskih biosenzora relativno je lako identificirati dva glavna segmenta u kojima je primjena nanomaterijala dovela do značajnih poboljšanja u konstrukciji ili analitičkim karakteristikama biosenzora. Riječ je o uporabi nanomaterijala kao podloge za imobilizaciju enzima te uporabi nanomaterijala kao katalizatora u amperometrijskim pretvornicima signala.

U usporedbi s konvencionalnim metodama imobilizacije enzima korištenima kod izrade amperometrijskih biosenzora (ugrađivanje enzima u tanke polimerne filmove deponirane na površinu elektrode ili kovalentno vezanje enzima izravno na elektrodu), osnovna prednost nanomaterijala leži u njihovoj velikoj specifičnoj površini, koja je posljedica redukcije dimenzija čestica materijala. Zbog velike specifične površine nanomaterijala na određenu masu nanostrukturiranog nosača moguće je imobilizirati značajno veću količinu enzima nego na jednaku masu konvencionalnog nosača. Pored toga, deponirani na površinu elektrode nanostrukturirani materijali formiraju visokoporozne filmove kroz koje je difuzija analita (enzimskog supstrata) brža nego kroz polimerne filmove korištene kod klasičnih metoda imobilizacije enzima. Veća količina imobiliziranog enzima u kombinaciji s malim difuzijskim otporom sloja u kojem je enzim imobiliziran doprinosi povećanju osjetljivosti, smanjenju limita detekcije te skraćivanju vremena odziva biosenzora. Za imobilizaciju enzima najčešće se koriste nanomaterijali na bazi plemenitih metala, metalnih oksida te raznih modifikacija ugljika, pri čemu dimenzionalnost uporabljenih nanostrukture varira od nula-dimenzijskih nanočestica, preko jednodimenzijskih nanožica, nanoštapića i nanocjevčica do dvodimenzijskih nanoravnina i nanofilmova.¹⁰⁰⁻¹⁰⁴

Tipičan primjer nanočestica korištenih za imobilizaciju enzima su nanočestice plemenitih metala, od kojih su najčešće korištene nanočestice zlata.¹⁰⁵ S obzirom da je veličina nanočestica usporediva s veličinom globule enzima, imobilizacija enzima pomoću

nanočestica fleksibilnija je i rijede dovodi do konformacijskih promjena u strukturi enzima (a time i do smanjenja katalitičke aktivnosti enzima) u odnosu na imobilizaciju na rigidne, konvencionalne nosače.¹⁰⁶ Enzim se na nanočestice plemenitih metala može imobilizirati fizičkom adsorpcijom uslijed elektrostatskog privlačenja pozitivno nabijenih površinskih aminokiselnih ogranka enzima s negativno nabijenom površinom metalne nanočestice, no češće je riječ o kovalentnom vezanju enzima na nanočesticu čija je površina funkcionalizirana odgovarajućim tiolima.¹⁰²

Od jednodimenzijskih nanomaterijala za imobilizaciju enzima u amperometrijskim biosenzorima vrlo se često koriste ugljikove nanocjevčice.^{107,108} Fizička adsorpcija enzima na površinu ugljikovih nanocjevčica moguća je zbog hidrofobnih i π - π intrakcija površine nanocjevčica s hidrofobnim domenama, odnosno fenilnim skupinama aromatskih ogranka s površine enzima.¹⁰⁹ Oksidacijom ugljikovih nanocjevčica na njihovu se površinu uvode kisikove funkcionalne skupine koje je, nakon odgovarajuće aktivacije, potom moguće iskoristiti za kovalentno vezanje enzima.¹⁰⁸ Ugljikove nanocjevčice s imobiliziranim enzimom na površinu elektrode mogu se deponirati sa slučajnom orijentacijom, no razvijene su i metode za orijentiranu depoziciju ugljikovih nanocjevčica na površinu senzora. Porozni filmovi koji se sastoje od slučajno orijentiranih ugljikovih nanocjevčica najjednostavnije se dobivaju sušenjem suspenzije ugljikovih nanocjevčica nanijete na površinu biosenzora. Uređeniji filmovi vertikalno orijentiranih ugljikovih nanocjevčica dobivaju se samoorganiziranjem nanocjevčica površinski funkcionaliziranih nabijenim skupinama, pri čemu je promjenom površinske gustoće nabijenih skupina moguće utjecati na gustoću dobivenog uređenog sloja.¹¹⁰ Osim ugljikovih nanocjevčica, od jednodimenzijskih materijala za imobilizaciju enzima u amperometrijskim biosenzorima korištene su i nanožice, nanoštapići i nanocjevčice metalnih oksida, najčešće ZnO, Fe₂O₃ ili SnO₂.¹¹ Funkcionaliziranje površine nanostrukture izgrađenih od metalnih oksida radi kovalentnog vezanja enzima tipično se izvodi pomoću funkcionaliziranih alkoksisilana, (R'O)₃Si(CH₂)_nR, koji reagiraju s površinskim M-OH skupinama metalnih oksida dajući relativno čvrste Si-O-M veze, iako su za funkcionaliziranje prikladni i fosfonati, karboksilati te derivati katehola.¹¹¹ U slučajevima kad se imobilizacija enzima želi izvesti fizičkom adsorpcijom, jednodimenzijski nanomaterijali na bazi metalnih oksida pružaju više fleksibilnosti u smislu podešavanja interakcija enzim – nanostrukturirani nosač no ugljikove nanocjevčice. Točka nula-naboja metalnih oksida varira u širokim granicama (primjerice, točka nula-naboja kositrova(IV)

oksida nalazi se pri $\text{pH} \approx 4,4$, magnetita pri $\text{pH} \approx 6,8$, a cinkova oksida pri $\text{pH} \approx 9,4$)¹¹² pa je odabirom prikladnog metalnog oksida moguće fino podešavati elektrostatske interakcije između električki nabijene globule enzima i površine nanostrukturiranog nosača pri vrijednosti pH kod koje se provodi imobilizacija enzima. Primjerice, jednodimenzijske nanostrukture izgrađene od cinkova oksida ($\text{pH}_{\text{PZC}} \approx 9,4$) naročito su prikladne za imobilizaciju enzima čija se izoelektrična točka nalazi u području $\text{pH} < 7$ (npr. glukoza-oksida, kolesterol-oksida, urikaza), s obzirom da su u neutralnim otopinama ti enzimi negativno nabijeni i elektrostatski se adsorbiraju na pozitivno nabijenu površinu ZnO nanostrukture.¹¹³

Najčešće korišteni dvodimenzijski nanomaterijali za imobilizaciju enzima danas su svakako grafen i grafen oksid.¹¹⁴⁻¹¹⁷ Grafen je alotropska modifikacija ugljika koja se pojavljuje u formi dvodimenzijske heksagonalne rešetke u kojoj se na svakom čvoru nalazi atom ugljika. Prostorni raspored atoma ugljika u grafen oksidu jednak je njihovom rasporedu u grafenu, no približno jedna trećina do jedna polovina od ukupnog broja atoma ugljika je oksidirana i nosi kisikove funkcionalne skupine.¹¹⁸ Slično kao i kod ugljikovih nanocjevčica, za fizičku adsorpciju enzima na nemodificirani grafen odgovorne su hidrofobne i π - π intrakcije, dok je kovalentnu imobilizaciju enzima moguće izvršiti nakon kemijske oksidacije grafena i aktiviranja dobivenih kisikovih funkcionalnih skupina.¹¹⁹ Zbog toga je za kovalentnu imobilizaciju enzima prikladnije koristiti grafen oksid,¹²⁰ koji se prije ili nakon imobilizacije enzima može kemijskom ili elektrokemijskom redukcijom prevesti u formu sličnu grafenu.^{121,122} S obzirom na izrazitu dvodimenzionalnost grafena i grafen oksida, ti su nanomaterijali naročito prikladni za imobilizaciju enzima u "sendvič-strukture" dobivene naizmjeničnom depozicijom na elektrodu grafena (grafen oksida) i enzima tehnikom *sloj po sloj* (engl. *layer-by-layer*).^{123,124} Za imobilizaciju enzima tom tehnikom prikladne su i nanoravnine dobivene delaminacijom slojevitih alkalijских titanata, slojevitog cirkonijeva fosfata ili slojevitih dvostrukih hidroksida $[\text{M}^{\text{II}}_{1-x}\text{M}^{\text{III}}_x(\text{OH})_2]_x^+(A^-)_{x/n} \cdot m\text{H}_2\text{O}$.¹²⁵⁻¹²⁷ S obzirom da su nanoravnine dobivene delaminacijom spomenutih spojeva nabijene isključivo negativno, prikladne su za imobilizaciju enzima čija se izoelektrična točka nalazi u lužnatom području.

Kao što je ranije bilo spomenuto, osim za imobilizaciju enzima nanomaterijali se u amperometrijskim biosenzorima koriste i kao katalizatori u amperometrijskim pretvornicima biosenzora prve generacije. U usporedbi s klasičnim elektrokemijskim katalizatorima,

nanostруктурirani katalizatori odlikuju se značajno većom specifičnom površinom, a time i većim brojem katalitički aktivnih površinskih centara te većom katalitičkom aktivnošću. Stoga se uporabom nanostруктурiranih katalizatora u amperometrijskim pretvornicima biosenzora prve generacije može povećati osjetljivost biosenzora i sniziti njegova granica detekcije. Također, amperometrijski pretvornici s aktivnijim, nanostруктурiranim katalizatorom zahtijevaju niže radne potencijale biosenzora, što doprinosi povećanju selektivnosti biosenzora. S obzirom da su amperometrijski biosenzori prve generacije koji se temelje na dehidrogenazama i koriste medijator dodan u uzorak zbog nepraktičnosti i visoke cijene analize gotovo nestali iz uporabe, istraživanja vezana uz primjenu nanostруктурiranih katalizatora u biosenzorima prve generacije gotovo su redovito fokusirana na biosenzore temeljene na oksidazama, kod kojih se amperometrijski prati nastajanje vodikova peroksida kao produkta enzimske katalizirane oksidacije analita.¹²⁸ Kao dobri katalizatori za elektrokemijsku oksidaciju vodikova peroksida pokazale su se platinske nanočestice^{129,130} te neki nanostруктурirani metalni oksidi, primjerice CoO ¹³¹ i MnO_2 .¹³² Zanimljivo je spomenuti da se katalitička aktivnost pri oksidaciji vodikova peroksida pripisivala i ugljikovim nanocjevčicama, no detaljna istraživanja Comptona i suradnika pokazala su da su za opaženu katalitičku aktivnost odgovorne nečistoće zaostale nakon sinteze nanocjevčica te da pažljivo pročišćene ugljikove nanocjevčice nisu katalitički aktivne.¹³³ S obzirom da se i uz primjenu najboljih katalizatora za elektrokemijsku oksidaciju vodikova peroksida ne mogu postići radni potencijali biosenzora manji od 400 mV prema Ag/AgCl elektrodi, za primjenu u amperometrijskim biosenzorima zanimljiviji su nanostруктурirani katalizatori za elektrokemijsku redukciju vodikova peroksida. U tu se svrhu često rabe nanočestice zlata, srebra i platine¹³⁴⁻¹³⁶ te nanostруктурirani oksidi kao što su Fe_2O_3 ¹³⁷ i CuO .¹³⁸ Ipak, po katalitičkim svojstvima pri elektrokemijskoj redukciji vodikova peroksida dosad se najboljim pokazao željezov(III) heksacijanoferat(II) (berlinsko modriilo).¹³⁹ Amperometrijski senzori temeljeni na nanostруктурiranom berlinskom modrilu redovito pokazuju osjetljivost prema vodikovom peroksidu veću od $500 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, uz limit detekcije od otprilike $10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ te linearnost koja doseže i do 6 redova veličine koncentracije H_2O_2 .^{140,141}

Osim u navedene dvije svrhe, intenzivno se istražuje i primjena nanomaterijala za poboljšavanje elektronske komunikacije između elektrode i redoks-centra enzima radi razvoja enzimskih biosenzora treće generacije. U tu se svrhu, razumljivo, upotrebljavaju isključivo električki vodljivi nanomaterijali, najčešće zlatne nanočestice, grafen i ugljikove

nanocjevčice,^{105,142} za koje se pretpostavlja da se zbog nanometarskih dimenzija mogu približiti redoks-centru enzima i time smanjiti barijeru za tuneliranje elektrona, odnosno povećati brzinu izmjene elektrona između elektrode i enzima. Na taj se način efikasan izravan prijenos elektrona između elektrode i redoks-centra enzima pokušava postići i kod enzima koji su inače elektrokemijski inaktivni jer im je redoks-centar smješten daleko od površine. Većina istraživanja usmjerena je na pronalaženje prikladnog nanomaterijala koji bi omogućio ostvarivanje izavnog prijenosa elektrona između elektrode i redoks-centra glukoza-oksidade, s obzirom da glukoza-oksida pri uobičajenim uvjetima (tj. prilikom adsorpcije ili kovalentnog vezanja na konvencionalne elektrode od zlata, platine ili grafita) ne pokazuje elektrokemijsku aktivnost, a razvoj visokoselektivnih glukoznih biosenzora treće generacije od velikog je praktičnog i komercijalnog značaja.^{143,144} Iako se na elektrodama na koje je glukoza-oksida imobilizirana zajedno sa zlatnim nanočesticama, grafenom, ugljikovim nanocjevčicama ili nanocjevčicama od drugih vodljivih materijala najčešće uspjeva ostvariti izravna elektrokemijska oksidacija, odn. redukcija FAD/FADH₂ kofaktora glukoza-oksidade (usp. ref. 50 i 145-148), izuzetno su rijetki slučajevi da se istovremeno uspjeva zadržati i prirodna katalitička aktivnost enzima.^{149,150} Stoga je izgledno da opažena elektrokemijska aktivnost glukoza-oksidade na nanostrukturiranim elektrodama dolazi od molekula glukoza-oksidade čija je konformacija imobilizacijom promijenjena tako da rezultira većom dostupnošću redoks-aktivnog centra, ali koja ujedno dovodi do potpunog gubitka katalitičke funkcije enzima.^{151,152} Slično ponašanje tipično se opaža i kod drugih oksidoreduktaza, primjerice perokside^{153,154} i katalaze.¹⁵⁵

2.2. Titanatne nanocjevčice

Nanocjevčicama se nazivaju monokristalne nanostrukture tubularne morfologije čiji je vanjski promjer manji od 100 nm, a aspektni omjer (tj. omjer duljine i promjera) znatno veći od 1. S obzirom da je samo jedna dimenzija nanocjevčica – njihova duljina – usporediva s dimenzijama konvencionalnih, makroskopskih materijala, dok su preostale dvije dimenzije reducirane na nanoskalu, nanocjevčice se ubrajaju u jednodimenzijske nanomaterijale. Karakteristika koja nanocjevčice izdvaja u odnosu na druge jednodimenzijske nanomaterijale (primjerice nanovlakna, nanoštapiće ili nanovrpce) jest postojanje unutarnje šupljine (lumena), zbog čega se nanotubularni materijali odlikuju malom gustoćom i velikom

specifičnom površinom. S obzirom na veliku longitudinalnu čvrstoću i malu gustoću, nanocjevčice su idealan materijal za primjenu u ojačanim kompozitima, dok ih nanometarski promjer lumena i velika specifična površina čini vrlo atraktivnima za primjenu u katalizi te separacijskim procesima temeljenim na adsorpciji. Iako je glavnina istraživanja u području nanotubularnih materijala u proteklih dvadesetak godina bila vezana uz ugljikove nanocjevčice, intenzivno se istražuju i nanocjevčice građene od metalnih oksida, među kojima su posebnu pozornost privukle titanatne nanocjevčice.¹⁵⁶

2.2.1. *Sinteza, morfologija i mehanizam nastajanja titanatnih nanocjevčica*

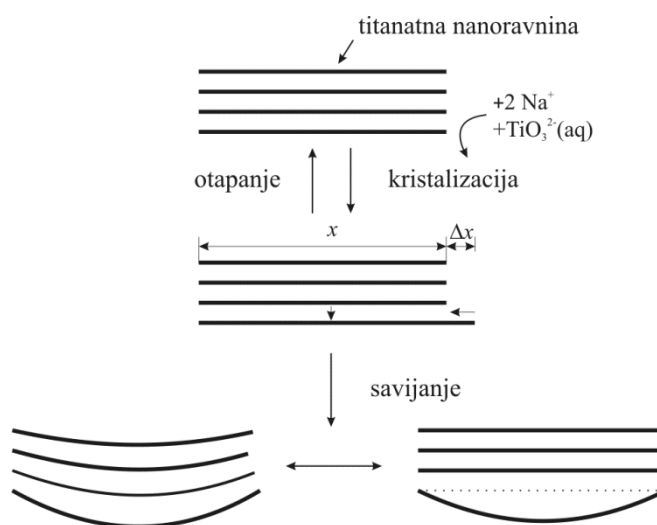
Titanatne nanocjevčice prvi su puta sintetizirane 1998. godine reakcijom praškastog TiO_2 s vodenom otopinom NaOH pri povišenoj temperaturi,¹⁵⁷ što je do danas ostala najčešća metoda njihove sinteze. Sinteza titanatnih nanocjevčica tipično se izvodi reakcijom kristalnog ili amornog TiO_2 s koncentriranom vodenom otopinom NaOH (najčešće $c(\text{NaOH}) = 10 \text{ mol dm}^{-3}$, čemu odgovara $w(\text{NaOH}) \approx 0,30$) pri temperaturi između 110 i 180 °C tijekom 24–72 sata, najčešće u hidrotermalnim uvjetima,^{158–165} a rijede pri atmosferskom tlaku, tj. u uvjetima refluksa.^{166,167} Nanotubularni produkt dobiven pri opisanim reakcijskim uvjetima sastoji se od titanija, kisika, natrija i vodika te varijabilne količine vode, a sastav mu odgovara formuli $\text{Na}_{2-x}\text{H}_x\text{Ti}_3\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$.¹⁶⁸ Titanatne nanocjevčice tipično su dugačke nekoliko stotina nanometara, otvorene su na krajevima i imaju jednolik vanjski promjer između 7 i 15 nm te unutarnji promjer između 3 i 10 nm.^{158–166} Stijenka titanatnih nanocjevčica redovito je višeslojna, sastavljena od tipično 3–5 slojeva međusobno udaljenih između 0,7 i 0,8 nm.^{158,161,162,164}

Iz reakcijske smjese koja se sastoji od praškastog TiO_2 i vodene otopine u kojoj množinska koncentracija NaOH iznosi $c(\text{NaOH}) = 10 \text{ mol dm}^{-3}$ titanatne nanocjevčice nastaju kao isključivi ili dominantni produkt ako se sinteza provodi pri temperaturi između 110 i 140 °C tijekom 24–48 sati.^{161,169} Na temperaturama nižima od 100 °C nastaju uglavnom amorfni, morfološki nedefinirani produkti, a iznad 170 °C titanatne nanožice,^{161,170} koje su dominantni produkt i ako se sinteza provodi tijekom 72 sata pri nižoj temperaturi^{161,171} te ako se umjesto natrijeva hidroksida koristi kalijev hidroksid.^{172,173} Pri koncentraciji natrijeva hidroksida od 5 mol dm^{-3} kao glavni produkt u području temperatura od 120 do 160 °C nastaju titanatne nanovrpce i nanoravnine,¹⁷⁴ dok su produkti nastali pri 140 °C i

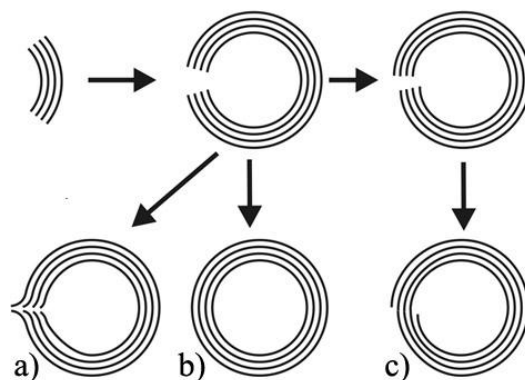
koncentracijama NaOH većima od 15 mol dm^{-3} uglavnom amorfni.¹⁷⁵ Pri uvjetima sinteze koji dovode do nastajanja titanatnih nanocjevčica kao glavnog produkta opaženo je da prosječni unutarnji promjer nanocjevčica raste s porastom reakcijske temperature, s otprilike 4 nm pri 125°C , na otprilike 10 nm pri 150°C .¹⁶¹ Duljina titanatnih nanocjevčica uglavnom ovisi o hidrodinamičkim uvjetima tijekom njihove sinteze. U stacionarnoj reakcijskoj smjesi tipično nastaju nanocjevčice čija duljina ne prelazi nekoliko stotina nanometara, dok u konvekcijskim uvjetima ostvarenima miješanjem reakcijske smjese ili rotacijom autoklava u kojem se provodi reakcija nastaju nanocjevčice duljine i do nekoliko mikrometara.^{176,177} Soniciranje reakcijske smjese ultrazvukom također dovodi do nastajanja duljih nanocjevčica.¹⁷⁸

Detaljan slijed događaja koji se zbivaju tijekom hidrotermalne konverzije TiO_2 u titanatne nanocjevčice još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, no strukturna i morfološka analiza sastojaka reakcijske smjese u različitim fazama sinteze nedvojbeno ukazuje da ključnu ulogu u tom procesu imaju dvodimenzijske titanatne nanostrukture u formi pojedinačnih titanatnih nanoravnina ili slogova nekoliko paralelnih titanatnih nanoravnina.¹⁷⁹ Opaženo je da tijekom prvih nekoliko minuta reakcije dolazi do bubrenja čestica TiO_2 , s čije se površine potom počinju odvajati dvoslojni ili višeslojni segmenti.¹⁸⁰ Ti segmenti u otopini dalje rastu u tanke, nekoliko nanoravnina debele pločaste titanatne nanostrukture, koje se potom zakrivljuju, odnosno spiralno namotavaju dajući titanatne nanocjevčice s višeslojnom stijenkom.^{180,181} Pretpostavlja se da je zakrivljavanje pojedinačnih titanatnih nanoravnina uzrokovano asimetričnim kemijskim okruženjem, koje se u viskoznoj reakcijskoj smjesi može lako pojaviti zbog različitog ionskog sastava otopine s gornje i donje strane titanatne nanoravnine.¹⁶¹ Asimetrija u kemijskom okruženju rezultira različitom površinskom energijom gornje i donje strane nanoravnine, što dovodi do njenog zakrivljavanja i spiralnog namatanja. DFT proračunima dobiveno je da se minimum potencijalne energije opisanog sustava postiže pri polumjeru zakrivljenost titanatnih nanoravnina od 4 nm,¹⁶² što se dobro slaže s opaženim promjerom titanatnih nanocjevčica, no ne objašnjava utjecaj uvjeta sinteze na promjer nanocjevčica.¹⁶¹ Druga je mogućnost da titanatne nanocjevčice nastaju zakrivljavanjem višeslojnih, lamelarnih nanostrukture nastalih paralelnim slaganjem dviju ili više titanatnih nanoravnina. Pretpostavlja se da u tom slučaju do zakrivljavanja dolazi uslijed razlike u duljinama pojedinih nanoslojeva koji tvore opisanu dvodimenzijску lamelarnu nanostrukturu.¹⁸² Naime, te nanostrukture u ravnotežu s otopinom dolaze uslijed otapanja, odnosno kristalizacije koja se preferirano zbiva na rubovima nanoravnina. Zbog različite

brzine kristalizacije ili otapanja, nanoravnine unutar lamelarne strukture mogu postati različite duljine (slika 2.4.), što uzrokuje razliku u njihovoj površinskoj energiji. Smanjenje površinske energije duljih nanoravnina može se postići njihovim zakrivljavanjem, što za posljedicu ima zakrivljavanje cijele lamelarne nanostrukture i dovodi do formiranja nanocjevčica, kako to shematski prikazuje slika 2.5. Opisani model dobro objašnjava postojanje nekoliko različitih tipova titanatnih nanocjevčica, koji se često pronalaze u istom uzorku.¹⁶¹ Naime, ako se zakrivljene nanoravnine na krajevima ne uspiju u potpunosti spojiti, nastaju nanocjevčice sa spojem u stijenci koji podsjeća na šav (slika 2.5.a). Spajanjem zakrivljenih nanoravnina koje se idealno poklapaju nastaju "bešavne" nanocjevčice čije se stijenke sastoje od koncentričnih, cilindrično zakrivljenih nanoravnina (slika 2.5.b), dok spajanjem nanoravnina koje se ne poklapaju mogu nastati nanocjevčice sa spiralnom strukturom stijenke (slika 2.5.c).



Slika 2.4. Shematski prikaz pretpostavljenog mehanizma nastajanja titanatnih nanocjevčica zakrivljavanjem titanatnih nanoravnina uslijed razlike u širini slojeva (Δx) u višeslojnim slogovima nanoravnina (za detalje v. tekst).



Slika 2.5. Shematski prikaz mogućih mehanizama nastajanja nanocjevčica iz višeslojnih dvodimenzijskih titanatnih nanostrukture. Pod a) prikazane su nanocjevčice na čijem je presjeku vidljiv spoj rubova nanoravnina, pod b) nanocjevčice s koncentričnom stijenkom, a pod c) nanocjevčice sa spiralnom stijenkom.

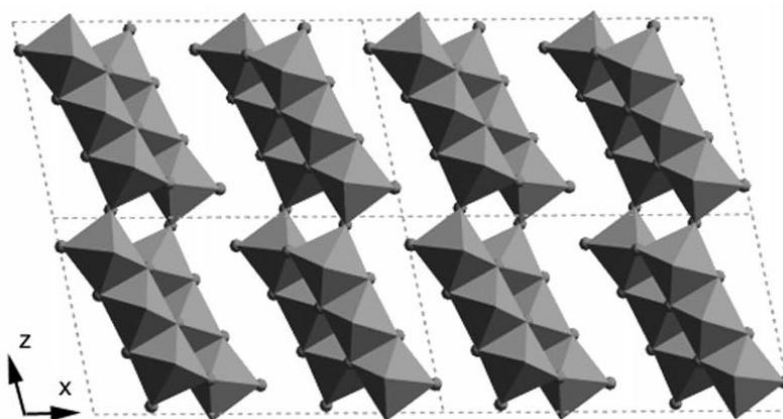
Kako bi se opisani modeli nastajanja titanatnih nanocjevčica uskladili s opaženim utjecajima uvjeta sinteze na morfologiju produkata dobivenih reakcijom TiO_2 s koncentriranom vodenom otopinom NaOH , pretpostavlja se da su titanatne nanocjevčice metastabilan međuprodukt koji u jako lužnatom vodenom mediju nastaje pri konverziji titanijeva(IV) oksida u stabilnije jednodimenzijske titanatne nanostrukture – titanatna nanovlakna i titanatne nanoštapiće.^{166,183} Pritom je koncentracija titanija(IV) u reakcijskom mediju ključan parametar koji određuje hoće li pri danim uvjetima sinteze nastati titanatne nanocjevčice ili druge jednodimenzijske titanatne nanostrukture (npr. titanatna nanovlakna).^{166,183} Istraživanja koja su proveli Bavykin i suradnici¹⁸³ pokazala su da titanatne nanocjevčice nastaju samo pri koncentraciji otopljenog Ti(IV) između 1 i 3 mmol dm^{-3} , dok pri većim koncentracijama kao dominantan produkt sinteze nastaju titanatna nanovlakna.¹⁶⁶ Povećanju koncentracije otopljenog Ti(IV) doprinose viša reakcijska temperatura te djelomična ili potpuna zamjena NaOH s KOH , što su sve faktori koji pogoduju nastajanju titanatnih nanovlakana.^{161,170,172,173} Također, produljivanjem vremena sinteze metastabilne titanatne nanocjevčice prelaze u titanatna nanovlakna, koja imaju manju specifičnu površinu pa su stoga i termodinamički stabilnija od nanocjevčica, što je također eksperimentalno opaženo.^{161,171}

2.2.2. Struktura titanatnih nanocjevčica

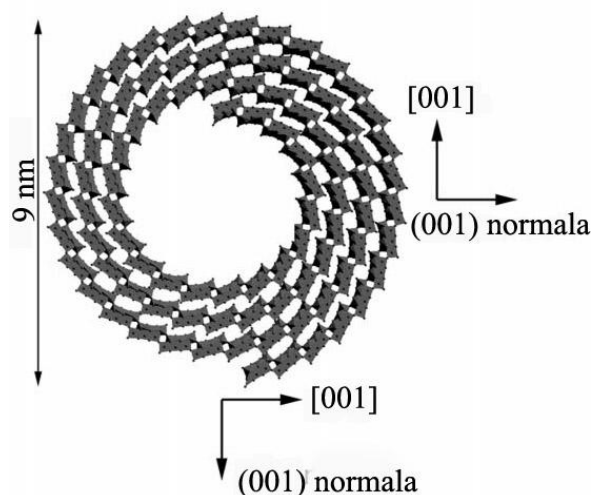
Struktura titanatnih nanocjevčica bila je predmet rasprave cijelo desetljeće nakon njihova otkrića, a niti danas nije postignut potpun konsenzus o njihovoj strukturi. Istraživanja provedena visokorezolucijskom transmisijском elektrоnskom mikroskopijom, rendgenskom i elektrоnskom difrakcijom te Ramanovom spektroskopijom nedvojbeno su pokazala da kristalna struktura titanatnih nanocjevčica odgovara strukturi slojevitih titanata,^{158,167,184-188} no postojanje mnoštva strukturno vrlo sličnih titanata znatno je otežalo određivanje točnije strukture titanatnih nanocjevčica. Nanometarska veličina nanocjevčica i velika zakrivljenost ravnina koje formiraju stijenku nanocjevčice otežavaju interpretaciju rezultata dobivenih rendgenskom difrakcijom jer uzrokuju proširenje difrakcijskih maksimuma te izostanak pojedinih refleksa u ionako vrlo sličnim difraktogramima koje pokazuju različite titanatne strukture. Termička nestabilnost titanatnih nanocjevčica uzrokuje relativno brzu strukturnu transformaciju nanocjevčica u fokusiranom snopu elektrоnskog mikroskopa, što znatno otežava strukturna istraživanja primjenom visokorezolucijske transmisijske mikroskopije. Ipak, kombinacijom navedenih tehnika uspjelo se prikupiti dovoljno vjerodostojnih podataka na temelju kojih se može zaključiti da struktura titanatnih nanocjevčica najvjerojatnije odgovara strukturi natrijeva trititanata ($\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$) u kojoj je dio Na^+ iona zamijenjen ionima H^+ ($\text{Na}_{2-x}\text{H}_x\text{Ti}_3\text{O}_7$), pri čemu u slučaju zamjene gotovo svih natrijevih kationa s ionima H^+ (v. pogl. 2.2.3.) struktura prelazi u strukturu trititanatne kiseline ($\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$).^{158,184} Obje strukture opisane su monoklinskom kristalnom rešetkom koja se sastoji od stepeničastih trititanatnih ravnina nastalih povezivanjem TiO_6 -oktaedara na način prikazan na slici 2.6.,^{189,190} pri čemu natrijevi kationi u $\text{Na}_{2-x}\text{H}_x\text{Ti}_3\text{O}_7$ zauzimaju prostor između trititanatnih ravnina. Savijanjem jedne ili više trititanatnih nanoravnina u skladu s modelom nastajanja titanatnih nanocjevčica opisanim u prethodnom poglavlju nastaju titanatne nanocjevčice s višeslojnom stijenkom, kako to prikazuje slika 2.7. Pri tome stijenku nanocjevčice formiraju ravnine (100) namotane u smjeru [001] tako da je os nanocjevčice paralelna sa smjerom [010], a razmak između dvaju susjednih slojeva u stijenci jednak razmaku između kristalografskih ravnina (200) (slika 2.7.).¹⁵⁸ Iako je zbog postojanja defekata opisana struktura titanatnih nanocjevčica vjerojatno idealizirana, većina autora danas je prihvaća kao točnu i polazi od nje u razmatranju svojstava titanatnih nanocjevčica.

S obzirom da infracrveni spektri titanatnih nanocjevčica jasno ukazuju na postojanje OH-skupina i molekula H_2O u strukturi titanatnih nanocjevčica,^{158,159} pretpostavlja se da je

prostor između slojeva koji formiraju stijenku titanatnih nanocjevčica okupiran molekulama vode. Te molekule mogu potjecati iz hidratacijske sfere iona Na^+ ili vodikovim vezama mogu biti vezane na Ti-OH skupine nastale zamjenom iona Na^+ s ionima H^+ u nanocjevčicama čiji sastav odgovara formuli $\text{Na}_{2-x}\text{H}_x\text{Ti}_3\text{O}_7$. U prilog pretpostavci o postojanju interkaliranih molekula vode govori i činjenica da je međuravninski razmak kristalografskih ravnina (200) u titanatnim nanocjevčicama određen rendgenskom difrakcijom ($d_{200} = 0,85\text{--}0,90\text{ nm}$) redovito malo veći od razmaka između ravnina (200) u trititanatnoj kiselini ($d_{200} = 0,790\text{ nm}$).¹⁹⁰ Zagrijavanjem titanatnih nanocjevčica dolazi do njihove dehidratacije, pri čemu je opaženo da se razmak između ravnina (200) postupno smanjuje i približava vrijednosti koju ima u trititanatnoj kiselini.¹⁹¹ Dehidratacija titanatnih nanocjevčica zbiva se i u visokom vakuumu ($p < 10^{-5}\text{ Pa}$) koji vlada u koloni transmisijskog elektronskog mikroskopa, što objašnjava neslaganje između vrijednosti koje za udaljenost slojeva koji formiraju stijenku nanocjevčica daju visokorezolucijska transmisijska elektronska mikroskopija ($d = 0,78\text{--}0,80\text{ nm}$) i rendgenska difrakcija.¹⁹¹



Slika 2.6. Kristalna struktura trititanatne kiseline. Stepeničaste trititanatne nanoravnine nastaju ponavljanjem jedinične ćelije (označena isprekidanom crtom) u smjeru osi z i okomito na ravninu papira. Slojevita struktura trititanata nastaje slaganjem nanoravnina u smjeru osi x. Preuzeto iz ref. 158.

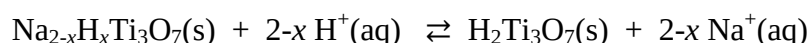


Slika 2.7. Struktura stijenke titanatne nanocjevčice nastale savijanjem titanatnih nanoravnina čija struktura odgovara strukturi trititanatne kiseline. Preuzeto iz ref. 158.

2.2.3. Fizikalno-kemijska svojstva titanatnih nanocjevčica

Iako su neka fizikalno-kemijska svojstva titanatnih nanocjevčica slična svojstvima ostalih slojevitih titanata, neka su svojstva titanatnih nanocjevčica specifična jer proizlaze iz njihove reducirane dimenzionalnosti. Kao i ostali slojeviti titanati, titanatne nanocjevčice pokazuju ionsko-izmjenjivačka i poluvodička svojstva, no specifične su po mezoporoznosti, velikoj specifičnoj površini te reaktivnosti površine.

Ionsko-izmjenjivačka svojstva titanatnih nanocjevčica posljedica su mobilnosti kationa (najčešće Na^+) smještenih između slojeva koji formiraju stijenku nanocjevčica. S obzirom da su ti kationi lako pokretljivi, mogu se relativno lako izmjenjivati s ionima iz otopine u kojoj su titanatne nanocjevčice suspendirane.^{159,192} Zbog toga je, primjerice, natrijeve katione iz strukture titanatnih nanocjevčica moguće gotovo u potpunosti zamijeniti s ionima H^+ suspendiranjem titanatnih nanocjevčica u razrijeđenoj vodenoj otopini jake kiseline:



S obzirom da se ionska izmjena opisana gornjom jednačbom zbiva i tijekom ispiranja titanatnih nanocjevčica vodom ili razrijeđenom kiselinom nakon njihove sinteze, kemijski sastav titanatnih nanocjevčica značajno ovisi o postupku njihove izolacije. Ako se titanatne nanocjevčice nakon sinteze ispiru samo vodom do neutralne reakcije, njihov kemijski sastav otprilike odgovara formuli $\text{Na}_{1,2}\text{H}_{0,8}\text{Ti}_3\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$.¹⁶⁸ Potpuno uklanjanje natrijevih kationa iz

strukture titanatnih nanocjevčica teško je postići, s obzirom da i nakon višekratnog ispiranja nanocjevčica razrijeđenom kiselinom maseni udio natrija u titanatnim nanocjevčicama iznosi oko 1 %.¹⁶⁸

Stupanj izmjene natrijeva kationa s ionom H^+ glavni je faktor koji određuje termičku stabilnost titanatnih nanocjevčica. Zagrijavanjem titanatnih nanocjevčica dolazi do njihove dehidratacije, koju prate promjene u kristalnoj strukturi i morfologiji nanocjevčica. Temperatura pri kojoj započinje fazna i morfološka transformacija titanatnih nanocjevčica u TiO_2 i kondenzirani heksatitanat opada sa smanjenjem udjela natrijevih iona.^{168,191,193} Titanatne nanocjevčice čiji sastav odgovara formuli $Na_{1,3}H_{0,7}Ti_3O_7 \cdot nH_2O$ termički su stabilne do temperature od otprilike 500 °C, dok titanatne nanocjevčice kod kojih je izmjena iona Na^+ s ionima H^+ gotovo potpuna faznoj i morfološkoj transformaciji podliježu već pri temperaturi od 150 °C.¹⁹³

Specifična površina titanatnih nanocjevčica relativno je velika i tipično iznosi između 200 i 350 m² g⁻¹, ovisno o uvjetima sinteze i stupnju post-sintetske izmjene iona Na^+ s ionima H^+ , pri čemu smanjenje udjela natrija dovodi do povećanja specifične površine nanocjevčica.¹⁶¹ S obzirom da lumen titanatnih nanocjevčica najčešće ima promjer između 3 i 15 nm, titanatne nanocjevčice su tipičan mezoporozni materijal. Prilikom sušenja titanatne nanocjevčice pokazuju veliku tendenciju stvaranja agregata koji se sastoje od većeg broja paralelno orijentiranih nanocjevčica. Ti se snopovi međusobno isprepliću i stvaraju veće, porozne aglomerate, zbog čega praškasti uzorci titanatnih nanocjevčica često pokazuju bimodalnu krivulju raspodjele veličina pora, s jednim maksimumom koji odgovara lumenu nanocjevčica i drugim maksimumom (pri većim promjerima pora) koji odgovara porama u poroznim aglomeratima nanocjevčica.¹⁶¹

Površina titanatnih nanocjevčica relativno je gusto zaposjednuta OH-skupinama; u prosjeku, na jednom kvadratnom nanometru površine titanatnih nanocjevčica nalazi se 5,8 OH-skupina.^{12(b)} Površinske OH-skupine titanatnih nanocjevčica ponašaju se kao Brönstedove kiseline¹⁹⁴ zbog čega je površina titanatnih nanocjevčica, osim u kiselom mediju, nabijena negativno. S obzirom da površinske OH-skupine titanatnih nanocjevčica lako stupaju u reakciju sa silanima, karboksilatima, fosfonatima i o-difenolima, izuzetno su prikladne kao reaktivna mjesta za površinske modifikacije titanatnih nanocjevčica.¹⁹⁵⁻¹⁹⁸

Od ostalih svojstava zanimljivo je spomenuti da se titanatne nanocjevčice, jednako kao i drugi slojeviti titanati, ponašaju kao poluvodič n-tipa zbog postojanja donorskih defekata u

obliku kisikovih vakancija i titanijevih intersticija. Širina zabranjene zone titanatnih nanocjevčica iznosi 3,87 eV,¹⁹⁹ zbog čega titanatne nanocjevčice apsorbiraju ultraljubičasto zračenje valnih duljina manjih od 325 nm. Titanatne nanocjevčice pokazuju relativno veliku protonsku vodljivost koja se pripisuje postojanju molekula vode i iona H_3O^+ interkaliranih između slojeva koji formiraju stijenku nanocjevčice.¹⁷¹ Zagrijavanjem titanatnih nanocjevčica i njihovom dehidracijom protonska vodljivost brzo se gubi. Titanatne nanocjevčice stabilne su u čistoj vodi te u lužnatom mediju, no u razrijeđenim kiselinama stabilnost im je mala.²⁰⁰

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i mjerni instrumenti

3.1.1. Kemikalije

Sve kemikalije korištene u ovom radu bile su najviše čistoće koja je komercijalno bila dostupna i korištene su bez daljnjeg pročišćavanja, osim ako nije drugačije navedeno. Titanijev dioksid ($w(\text{anatas}) = 99,8 \%$; promjer čestica, $d < 44 \mu\text{m}$), *p*-benzokinon (99 %), salicilaldehid (98 %), otopina glutaraldehida u vodi ($w(\text{glutaraldehid}) = 50 \%$), otopina ionomera Nafiona u smjesi vode i niskomolekulskih alkohola ($w(\text{Nafion}) = 5 \%$) i grafit u prahu ($w(\text{C}) = 99,99 \%$; promjer čestica, $d < 150 \mu\text{m}$) dobavljeni su od Aldricha. Glukoza-oksidaža (E.C. 1.1.3.4, izolirana iz *Aspergillus niger*, tip X-S, 100–250 U/mg, liofilizirana) i diamonijeva sol 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS, 98 %) nabavljeni su od *Sigme*. Etilendiamin (99,5 %), (3-aminopropil)trimetoksisilan (APTMS, 97 %) i peroksidaža (E.C. 1.11.1.7, 883 U/mg koristeći ABTS, izolirana iz hrena, tip VI-A, liofilizirana) pribavljeni su od *Fluke*. Ninhidrin (99 %) pribavljen je od Acros Organics, a tereftaloil-diklorid (98 %) od Mercka. Sve ostale kemikalije korištene u radu bile su *p.a.* čistoće.

Za pripremu vodenih otopina korištena je dvostruko deionizirana voda dodatno pročišćena nanofiltracijom i sustavom za pripravu ultračiste vode Millipore Synergy (EMD Millipore, USA). Diklormetan (*p.a.*, *Carlo Erba*) prije uporabe sušen je na kalcijevom kloridu preko noći i potom predestiliran preko fosforova(V) oksida pri atmosferskom tlaku. Toluen (*p.a.*, *Kemika*) nakon sušenja na kalcijevom kloridu predestiliran je preko elementarnog natrija pri atmosferskom tlaku, nakon čega je držan na molekulskim sitima.

3.1.2. Mjerni instrumenti

Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) i elektronska difrakcija uzoraka titanatnih nanocjevčica izvršena je na visokorezolucijskom transmisijskom elektronskom mikroskopu JEM-2000FX (*Jeol*, Japan), uz akcelerirajući napon od 200 kV. Za utvrđivanje morfoloških karakteristika dijela uzoraka korišten je i transmisijski elektronski mikroskop Zeiss 902A (*Zeiss*, Njemačka) koji je radio uz akcelerirajući napon od 80 kV. Pretražna elektronska mikroskopija uzoraka izvršena je na pretražnom elektronskom mikroskopu JSM-300 (*Jeol*, Japan).

Specifična površina i raspodjela volumena pora uzoraka izmjereni su pomoću uređaja ASAP 2000 (*Micromeritics*, USA), mjerenjem adsorpcije, odn. desorpcije N₂ pri temperaturi od –196 °C.

Spektroskopska karakterizacija uzoraka u infracrvenom području izvršena je pomoću FTIR spektrometra MB 102 (*ADD Bomem*, Njemačka). Uzorci za snimanje FTIR spektara pripremljeni su u obliku NaCl pastila u kojima je maseni udio uzorka iznosio 2 %. Za snimanje Ramanovih spektara korišten je Ramanov spektrometar Z24 (*Dilor*, Francuska) s trostrukim monokromatorom, opremljen argonskim pobudnim laserom Innova Coherent 400 ($\lambda = 514,5$ nm). Za snimanje spektara otopina u ultraljubičastom i vidljivom (UV/Vis) području elektromagnetskog spektra korišten je dvozračni spektrofotometar BioSpecord 200 (*Analytik Jena*, Njemačka). UV/Vis refleksijski spektri uzoraka snimljeni su pomoću spektrometra USB4000 (*Ocean Optics*, USA) opremljenog s refleksijskom probom s bifurkiranim optičkim vlaknom.

Za elektrokemijska mjerenja korišteni su potencijostati VoltaLab PST050 (*Radiometer Analytical*, Francuska) i MA 5450 (*Iskra*, Slovenija), od kojih je potonji bio opremljen generatorom pobude i elektroničkim sučeljem za povezivanje s računalom izrađenim u Laboratoriju za opću i anorgansku kemiju i elektroanalizu PBF. Sva mjerenja izvršena su u konvencionalnoj troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji s platinskom pomoćnom elektrodom i Hg|Hg₂Cl₂|3,5M KCl referentnom elektrodom ($E = 0,250$ V prema standardnoj vodikovoj elektrodi). Kao radne elektrode za cikličku voltametriju i amperometrijska mjerenja korištene su disk-elektrode ($A = 0,196$ cm²) izrađene od spektroskopskog grafitu ili grafitne paste. Za stacionarna voltametrijska mjerenja u hidrodinamičkim uvjetima korištena je rotirajuća disk-elektroda (RDE) izrađena od spektroskopskog grafitu ($A = 0,385$ cm²), pogonjena rotatorom Beckmann R-6000 (*Beckmann*, USA). Pri elektrokemijskom određivanju sadržaja metala (Ti, Cu) u uzorcima modificiranih titanatnih nanocjevčica kao radna elektroda korištena je stacionarna/statička živina elektroda s višećom kapi konstruirana u Laboratoriju za opću i anorgansku kemiju i elektroanalizu PBF.

3.2. Metode

3.2.1. *Sinteza titanatnih nanocjevčica*

Sinteza titanatnih nanocjevčica (TiNT) izvođena je u cilindričnoj reakcijskoj posudi ($d = 40 \text{ mm}$, $V = 100 \text{ cm}^3$) izrađenoj od Teflona i opremljenoj povratnim vodenim hladilom. Za sintezu je uzeto između 1,0 i 1,1 g praškastog TiO_2 , na kojeg je dodano 75 cm^3 vruće vodene otopine NaOH ($w(\text{NaOH}) = 0,30$), nakon čega je smjesa homogenizirana na magnetskoj miješalici. Reakcijska posuda je potom prebačena u parafinsku kupelj zagrijanu na $130 \text{ }^\circ\text{C}$ i refluksirana tijekom 22 sata uz miješanje (30 o/min). Nakon 22 sata smjesa je ohlađena i dobivene titanatne nanocjevčice (u obliku bijelog, voluminoznog mrežastog taloga) odijeljene su od ostatka reakcijske smjese vakuumskom filtracijom i ispirane s deioniziranom vodom sve dok filtrat nije pokazivao neutralnu reakciju. Da bi se iz strukture dobivenih titanatnih nanocjevčica uklonili ioni Na^+ i zamijenili s ionima H^+ i time nanocjevčice prevele u tzv. protonirani oblik, nanocjevčice su suspendirane u 100 cm^3 vodene otopine HCl ($c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i suspenzija je, uz povremeno miješanje, ostavljena stajati 3 sata. Nakon toga su titanatne nanocjevčice isprane vodom i postupak ionske izmjene je ponovljen još jednom, nakon čega su titanatne nanocjevčice obilno isprane s deioniziranom vodom (do neutralne reakcije filtrata) i sušene preko noći na $80 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.2. *Modificiranje titanatnih nanocjevčica s (3-aminopropil)trimetoksisilanom*

Vezanje (3-aminopropil)trimetoksisilana (APTMS) na površinu titanatnih nanocjevčica (silaniziranje)^{a)} izvedeno je izravnom reakcijom između APTMS i titanatnih nanocjevčica u protoniranom obliku suspendiranih u nepolarnom aprotičnom organskom otapalu (toluen ili diklormetan). U radu su korištena četiri postupka silaniziranja koji su se razlikovali u korištenom otapalu, temperaturi pri kojoj je provedena reakcija te stupnju dehidratacije titanatnih nanocjevčica. Polazne titanatne nanocjevčice u sva su četiri postupka bile u protoniranom obliku, sušene na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ i do daljnje uporabe čuvane pri sobnoj temperaturi na zraku.

^{a)} Kratkoće radi, titanatne nanocjevčice površinski modificirane reakcijom s (3-aminopropil)trimetoksisilanom u daljnjem će se tekstu nazivati *silaniziranim titanatnim nanocjevčicama*.

Postupak SI-1

Masa od 0,25 g titanatnih nanocjevčica suspendirana je na magnetskoj miješalici u 20 cm³ bezvodnog toluena i u suspenziju je dodano 0,50 cm³ APTMS, nakon čega je smjesa refluksirana tijekom tri sata. Nakon tri sata reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu, dobiveni produkt je od ostatka smjese odijeljen vakuumskom filtracijom, ispran sa 25 cm³ toluena i 80 cm³ bezvodnog etanola i sušen na 60 °C tijekom tri sata. Dobivenom produktu dodijeljena je oznaka **TiNT-R**.

Postupak SI-2

Masa od 0,25 g titanatnih nanocjevčica suspendirana je na magnetskoj miješalici u 35 cm³ bezvodnog toluena, nakon čega je suspenzija podvrgnuta azeotropnoj destilaciji²⁰¹ tijekom dva sata kako bi se iz nanocjevčica uklonila voda. Suspenzija, čiji je volumen nakon azeotropne destilacije iznosio otprilike 25 cm³, potom je ohlađena na sobnu temperaturu, u nju je dodano 0,50 cm³ APTMS i nastavljena je miješati na sobnoj temperaturi tijekom tri sata. Nakon tri sata dobiveni čvrsti produkt odijeljen je od ostatka reakcijske smjese vakuumskom filtracijom te ispran s 25 cm³ toluena i 80 cm³ bezvodnog etanola. Isprani produkt sušen je na 60 °C tijekom tri sata, a označen je kao **TiNT-A**.

Postupak SI-3

Masa od 0,25 g titanatnih nanocjevčica suspendirana je u 20 cm³ bezvodnog diklormetana i u suspenziju je dodano 0,50 cm³ APTMS. Dobivena suspenzija miješana je u začepljenoj tikvici na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi tijekom 20, 45, 90 ili 180 min, nakon čega je dobiveni čvrsti produkt odijeljen vakuumskom filtracijom, ispran sa 25 cm³ diklormetana i 80 cm³ apsolutnog etanola te sušen na 60 °C tijekom tri sata. Dobiveni produkt označen je kao **TiNT-NH₂-x**, gdje 'x' označava vrijeme silaniziranja u minutama (x = 20, 45, 90, 180).

3.2.3. Kovalentno vezanje peroksidaze na površinu titanatnih nanocjevčica modificiranih s (3-aminopropil)trimetoksisilanom

Enzim peroksidaza iz hrena^{b)} na površinu titanatnih nanocjevčica modificiranih s APTMS imobiliziran je pomoću bifunkcionalnog reagensa općenite strukture R–X–R, gdje R označava funkcionalnu skupinu koja reagira s primarnom amino skupinom. Za imobilizaciju su korišteni sljedeći bifunkcionalni reagensi: *p*-benzokinon, askorbinska kiselina, glutaraldehid i tereftaloil-diklorid,²⁰² čije su strukture prikazane na slici 3.1. Općenito, imobilizacija peroksidaze bila je izvedena u dva koraka. Najprije su silanizirane titanatne nanocjevčice podvrgnute reakciji s velikim suviškom bifunkcionalnog reagensa, čime je reakcijom površinskih NH₂-skupina s funkcionalnom skupinom R iz bifunkcionalnog reagensa postignuto kovalentno vezanje bifunkcionalnog reagensa na površinu silaniziranih titanatnih nanocjevčica. Na tako funkcionalizirane titanatne nanocjevčice potom je kovalentno vezana peroksidaza, reakcijom između NH₂-skupina iz lizinskih ogranaka peroksidaze i slobodnih reaktivnih funkcionalnih skupina površinski vezanog bifunkcionalnog reagensa. Kemizam imobilizacije peroksidaze pomoću svakog od četiri korištena bifunkcionalna reagensa prikazan je na slici 3.1.

Peroksidaza je na površinu silaniziranih titanatnih nanocjevčica imobilizirana i izravno, bez uporabe bifunkcionalnog reagensa. U tu su svrhu monosaharidne jedinice vezane na proteinski lanac peroksidaze oksidirane pomoću perjodata, pri čemu su vicinalne OH-skupine u susjedstvu glikozidne veze prevedene u aldehidne skupine (slika 3.1).²⁰³ Imobilizacija tako oksidirane peroksidaze na površinu titanatnih nanocjevčica postignuta je izravnom reakcijom dobivenih aldehidnih skupina s amino skupinama poli(3-aminopropilsiloksana) s površine silaniziranih titanatnih nanocjevčica (slika 3.1.). Titanatne nanocjevčice s imobiliziranom peroksidazom dalje su korištene odmah nakon priprave.

Imobilizacija peroksidaze pomoću bifunkcionalnih reagensa

Za vezanje bifunkcionalnih reagensa na površinu titanatnih nanocjevčica silaniziranih s APTMS korištene su otopine askorbinske kiseline u *N,N'*-dimetilformamidu (DMF) (γ (askorbinska kiselina) = 400 mg cm⁻³), otopina *p*-benzokinona u DMF (γ (*p*-benzokinon) =

^{b)} Kratkoće radi, u daljnjem tekstu: *peroksidaza* (skraćeno: HRP, prema engl. *horseradish peroxidase*).

50 mg cm⁻³), otopina glutaraldehida u fosfatnom puferu ($c(P) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,0)^{c)} volumnog udjela $\phi(\text{glutaraldehyd}) = 0,005$ te otopina tereftaloil-diklorida u DMF ($\gamma(\text{tereftaloil-diklorid}) = 10 \text{ mg cm}^{-3}$). U svim slučajevima vezanje bifunkcionalnog reagensa izvršeno je na silanizirane titanatne nanocjevčice priređene postupkom SI-4 uz vrijeme reakcije s APTMS od 180 min.

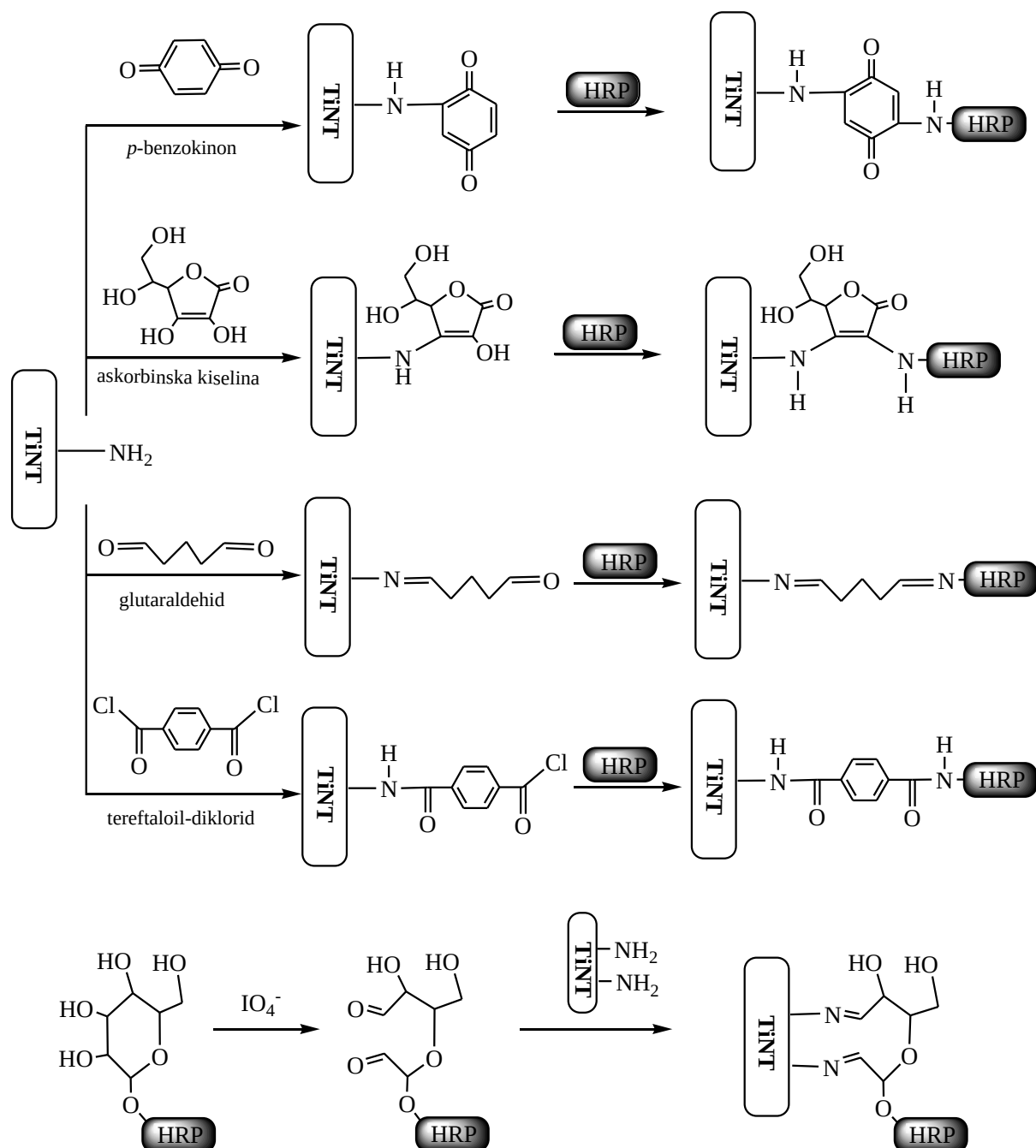
Masa od 10 mg silaniziranih titanatnih nanocjevčica dispergirana je u 1 cm³ otopine bifunkcionalnog reagensa i dobivena suspenzija miješana je na tresilici tijekom 15 minuta, nakon čega je suspenzija centrifugirana, a talog ispran s DMF (u slučaju vezanja askorbinske kiseline, benzokinona ili tereftaloil-diklorida), odnosno deioniziranom vodom (u slučaju vezanja glutaraldehida). Ispiranje je ponovljeno pet puta, pri čemu je za zadnje ispiranje u svim slučajevima korištena deionizirana voda.

Titanatne nanocjevčice modificirane bifunkcionalnim reagensom potom su dispergirane u 0,5 cm³ otopine peroksidaze ($\gamma(\text{HRP}) = 3,125 \text{ mg cm}^{-3}$) u fosfatnom puferu ($c(P) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,0) i miješane na tresilici tijekom dva sata. Nakon dva sata titanatne nanocjevčice s imobiliziranom peroksidazom su centrifugirane i isprane s fosfatnim puferom pet puta. Preliminarnim pokusom ustanovljeno je da nakon peterostrukog ispiranja puferom supernatant ne pokazuje pozitivnu reakciju na peroksidazu.

Imobilizacija peroksidaze izravnim vezanjem enzima na površinu silaniziranih titanatnih nanocjevčica

Masa od 2,5 mg peroksidaze otopljen je u 0,5 cm³ otopine kalijeva periodata ($\gamma(\text{KIO}_4) = 2,3 \text{ g dm}^{-3}$) u fosfatnom puferu ($c(P) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,0). Dobivena otopina ostavljena je stajati u mraku tijekom 20 min, nakon čega je u njoj dispergirano 10 mg silaniziranih titanatnih nanocjevčica priređenih postupkom SI-4 uz vrijeme reakcije s APTMS od 180 min. Suspenzija je držana u mraku tijekom daljnjih 40 min uz povremeno miješanje. Nakon tog vremena titanatne nanocjevčice s imobiliziranom peroksidazom su centrifugirane i isprane fosfatnim puferom pet puta.

^{c)} Sastav fosfatnog pufera svugdje u tekstu bit će iskazan ukupnom množinskom koncentracijom jedinki koje sadrže fosfor (H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}), označenom sa $c(P)$.



Slika 3.1. Strukture reagensa i kemizam imobilizacije peroksidaze (HRP) na titanatne nanocjevčice modificirane s APTMS (TiNT-NH₂).

3.2.4. Modificiranje titanatnih nanocjevčica s *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksima bakra(II) i željeza(III)

Titanatne nanocjevčice modificirane su kompleksom bakra(II), odnosno željeza(III) s *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim ligandom koji je na površinu nanocjevčica bio kovalentno vezan Si–O–Ti i Si–O–Si (siloksanskim) vezama, kako to predočava struktura **5** na slici 3.2. U svrhu vezanja *N*-saliciliden-*n*-propilaminskog kompleksa bakra(II) na površinu titanatnih nanocjevčica razvijena su tri sintetska postupka, od kojih se prvi temeljio na silaniziranju titanatnih nanocjevčica s bis(*N*-saliciliden-3-(trimetoksisilil)-*n*-propilaminato)bakrom(II) (struktura **2** i reakcijski slijed **A** na slici 3.2.), drugi na kovalentnom vezanju bis(salicilaldehido)bakra(II) (**1**) na površinu titanatnih nanocjevčica silaniziranih s APTMS (reakcija **B** na slici 3.2.), a treći na reakciji salicilaldehida s poli(3-aminopropilsiloksanom) s površine titanatnih nanocjevčica silaniziranih s APTMS (**3**) te reakciji nastalih površinskih *N*-saliciliden-*n*-propilaminskih skupina (**4**) s ionima Cu²⁺ (reakcijski slijed **C** na slika 3.2.). *N*-saliciliden-*n*-propilaminski kompleks željeza(III) na površinu titanatnih nanocjevčica vezan je na način analogan reakcijskom slijedu **C** sa slike 3.2.

Usporedbe radi, na površinu titanatnih nanocjevčica imobiliziran je i salenski kompleks bakra(II) (struktura **7** na slici 3.2.), strukturno sličan ranije opisanom *N*-saliciliden-*n*-propilaminskom kompleksu bakra(II). Kompleks je na površinu titanatnih nanocjevčica deponiran reakcijom salena s titanatnim nanocjevčicama u čiju su strukturu ionskom izmjenom uvedeni ioni Cu²⁺.

Sintetske procedure korištene prilikom modificiranja površine titanatnih nanocjevčica gore spomenutim kompleksima opisane su u nastavku teksta.

Sinteza bis(salicilaldehido)bakra(II) (**1**)

Kompleks bakrova(II) kationa sa salicilaldehidom pripremljen je reakcijom 0,60 g (3,3 mmol) bezvodnog bakrova(II) acetata sa 0,76 cm³ (7,0 mmol) salicilaldehida u 10 cm³ apsolutnog etanola.²⁰⁴ Otopina je pri sobnoj temperaturi miješana tijekom 24 sata, nakon čega je dobiveni zeleni produkt profiltriran, ispran s diklormetanom te sušen na 60 °C tijekom noći.

Vezanje bis(*N*-saliciliden-3-(trimetoksisilil)-*n*-propilaminato) bakra(II) (**2**) na površinu titanatnih nanocjevčica (slika 3.2., postupak **A**)

Masa od 420 mg (1,5 mmol) bis(salicilaldehido)bakra(II) (**1**) otopljena je u 20 cm³ diklorometana i u tu je otopinu dodano 0,5 cm³ (2,8 mmol) APTMS. Odmah po dodatku APTMS došlo je do stvaranja tamnozelenog kompleksa, bis(*N*-saliciliden-3-(trimetoksisilil)-*n*-propilaminato)bakra(II). U dobivenu je otopinu dodano 100 mg titanatnih nanocjevčica i suspenzija je miješana pri sobnoj temperaturi tijekom tri sata. Nakon tog vremena suspenzija je profiltrirana, titanatne nanocjevčice s vezanim kompleksom (**5**) isprane su s 50 cm³ diklorometana i sušene na 60 °C tijekom tri sata. Dobivenom uzorku pridijeljena je oznaka **TiNT-Cu(Salp)₂-A**.

Vezanje bis(salicilaldehido)bakra(II) na titanatne nanocjevčice površinski modificirane slojem poli(3-aminopropilsiloksana) (slika 3.2., postupak **B**)

U 10 cm³ diklorometana otopljeno je 28 mg bis(salicilaldehido)bakra(II) (**1**) i u tu je otopinu dodano 100 mg titanatnih nanocjevčica silaniziranih s APTMS uz vrijeme reakcije od 180 minuta. Dobivena suspenzija miješana je na magnetskoj miješalici tijekom tri sata, nakon čega su titanatne nanocjevčice s vezanim kompleksom (**5**) vakuumski profiltrirane, isprane s 50 cm³ diklorometana i sušene pri atmosferskom tlaku na 60 °C tijekom tri sata. Dobiveni uzorak označen je kao **TiNT-Cu(Salp)₂-B**.

Kompleksiranje bakra(II) i željeza(III) s *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim ligandom vezanim na površinu titanatnih nanocjevčica (slika 3.2., postupak **C**)

U 10 cm³ metanola dispergirano je 100 mg titanatnih nanocjevčica silaniziranih s APTMS uz vrijeme reakcije od 180 min i u dobivenu suspenziju dodano je 0,50 cm³ salicilaldehida, nakon čega je smjesa pri sobnoj temperaturi na magnetskoj miješalici miješana tijekom jednog sata. Titanatne nanocjevčice s površinski vezanim *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim ligandom (**4**) potom su vakuumski filtrirane, isprane s 50 cm³ metanola i suspendirane u 20 cm³ otopine bakrova(II) sulfata u vodi ($c(\text{Cu}^{2+}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$), odnosno 20 cm³ otopine željezova(III) klorida u metanolu ($c(\text{Fe}^{3+}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$). Dobivena suspenzija miješana je na magnetskoj miješalici tijekom dva sata, nakon čega su titanatne nanocjevčice s vezanim kompleksom profiltrirane, isprane s vodom (u slučaju kompleksa bakra(II)), odnosno

metanolom (u slučaju kompleksa željeza(III)) te sušene na 60 °C preko noći. Dobivenim uzorcima pridijeljene su oznake **TiNT-Cu(Salp)₂-C** i **TiNT-Fe(Salp)₂-C**.

Sinteza salena (6)

Salen (*N,N'*-etilenbis(salicilimin)), struktura **6** na slici 3.3.) priređen je reakcijom salicilaldehida s etilendiaminom.²⁰⁵ U 7 cm³ metanola dodano je 0,5 cm³ (4,6 mmol) salicilaldehida i 0,15 cm³ (2,2 mmol) etilendiamina, pri čemu je došlo do nastajanja žutog taloga salena. Reakcijska smjesa miješana je na magnetskoj miješalici tijekom 30 min pri sobnoj temperaturi, nakon čega je salen vakuumski filtriran, ispran s 60 cm³ apsolutnog etanola i sušen na 60 °C pri atmosferskom tlaku tijekom jednog sata. Izolirani produkt korišten je bez daljnjeg pročišćavanja.

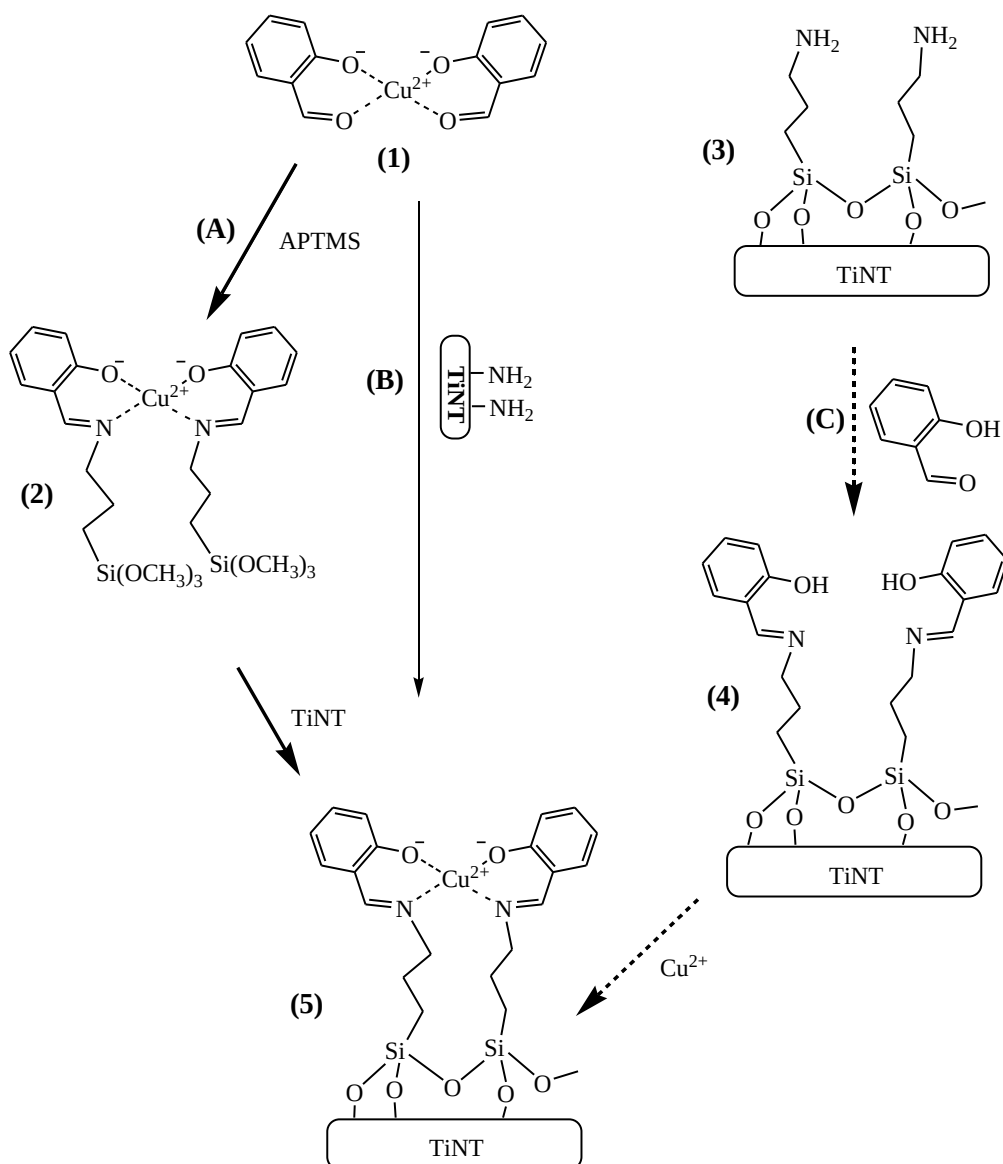
Sinteza salenskih kompleksa bakra(II) (7) i željeza(III) (8)

Salenski kompleksi bakra(II) i željeza(III), [*N,N'*-bis(saliciliden)etilendiaminato] bakar(II) (**7**) i [*N,N'*-bis(saliciliden)etilendiaminato] željezov(III) klorid (**8**), sintetizirani su reakcijom bakrova(II) acetata, odnosno željezova(III) klorida sa salenom.²⁰⁶⁻²⁰⁷ U vruću otopinu metalne soli, priređenu otapanjem 100 mg (0,6 mmol) bakrova(II) acetata, odnosno 135 mg (0,8 mmol) željezova(III) klorida u 10 cm³ apsolutnog etanola, dodano je 5 cm³ vruće otopine salena, dobivene otapanjem 134 mg (0,5 mmol) salena u bezvodnom etanolu. Miješanjem otopina došlo je do trenutnog taloženja tamnozelenog salenskog kompleksa bakra(II), odnosno crvenog salenskog kompleksa željeza(III). Nakon što je reakcijska smjesa ohlađena na sobnu temperaturu, dobiveni produkt vakuumski je filtriran, ispran tri puta s po 5 cm³ bezvodnog etanola i sušen na 60 °C preko noći.

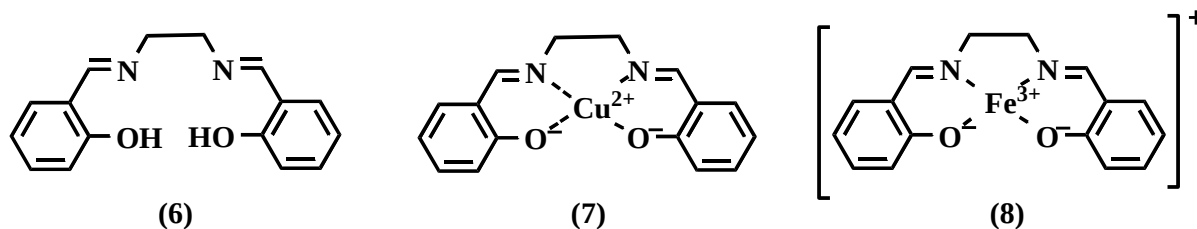
Modificiranje titanatnih nanocjevčica salenskim kompleksom bakra(II)

U 20 cm³ vodene otopine CuSO₄ ($c(\text{Cu}^{2+}) = 0,50 \text{ mol dm}^{-3}$) dispergirano je 200 mg titanatnih nanocjevčica i smjesa je na magnetskoj miješalici miješana dva sata, tijekom čega je došlo do djelomične izmjene iona H⁺ (H₃O⁺) iz strukture titanatnih nanocjevčica s ionima Cu²⁺ iz otopine te do adsorpcije iona Cu²⁺ na površinu nanocjevčica. Nanocjevčice su potom vakuumski filtrirane, isprane s vodom i sušene pri 80 °C preko noći. Dobivenim titanatnim nanocjevčicama modificiranim s ionima Cu²⁺ pridijeljena je oznaka **TiNT-Cu**.

Masa od 100 mg TiNT-Cu dispergirana je u 5 cm³ diklorometana u kojem je bilo otopljeno 100 mg salena. Dobivena suspenzija miješana je dva sata na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi, tijekom čega je na površini nanocjevčica došlo do nastajanja zelenog salenskog kompleksa bakra(II). Tako modificirane nanocjevčice od reakcijske su smjese odijeljene vakuumskom filtracijom, isprane s 50 cm³ diklorometana i sušene na 60 °C tijekom tri sata. Dobivenom produktu dodijeljena je oznaka **TiNT-Cu(Sal)**₂.



Slika 3.2. Metode kovalentnog vezanja *N*-saliciliden-*n*-propilaminskog kompleksa bakra(II) na površinu titanatnih nanocjevčica (TiNT). Za detalje sintetskih postupaka (A), (B) i (C) v. tekst.



Slika 3.3. Struktura salena i salenskih kompleksa bakra(II) i željeza(III).

3.3. Analitički postupci

3.3.1. Određivanje udjela primarnih amino skupina u titanatnim nanocjevčicama silaniziranim s (3-aminopropil)trimetoksisilanom

Udio primarnih amino skupina u uzorcima titanatnih nanocjevčica silaniziranih s APTMS određen je prilagođenom spektrofotometrijskom metodom²⁰⁸ koja se temelji na reakciji ninhidrina (2,2-dihidroksiindan-1,3-dion) s NH_2 -skupinom, u kojoj kao produkt nastaje intenzivno plavo obojena Schiffova baza s maksimum apsorpcije pri 565 nm.

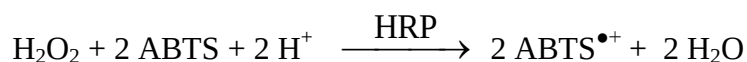
Za analizu je u kivetu odvagano 25 mg silaniziranih titanatnih nanocjevčica na koje je dodano 5,0 cm^3 fosfatnog pufera ($c(\text{P}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,50$) i 1,0 cm^3 otopine ninhidrina u etanolu ($\chi(\text{ninhidrin}) = 50 \text{ mg cm}^{-3}$). Dobivena suspenzija je u vodenoj kupelji zagrijavana na 80 °C tijekom jednog sata uz povremeno miješanje. Nakon hlađenja smjese na sobnu temperaturu, suspenzija je centrifugirana i bistri supernatant je prebačen u odmjernu tikvicu od 100 cm^3 . Čvrsti ostatak u kiveti resuspendiran je u 10 cm^3 vode zagrijane na 80 °C i suspenzija je na toj temperaturi držana 10 minuta, nakon čega je centrifugirana i supernatant je priključen supernatantu iz prethodnog centrifugiranja. Ispiranje sa zagrijanom vodom ponovljeno je pet puta, pri čemu je supernatant nakon svakog ispiranja združen s prethodnima. Nakon posljednjeg ispiranja, odmjerna tikvica sa združenim supernatantima do oznake je dopunjena deioniziranom vodom i dobivenoj je otopini izmjerena apsorbancija pri 565 nm prema vodi kao referenci. Sve analize provedene su u triplicatu.

Kao standard za izradu baždarnog dijagrama korišten je APTMS. U 5 cm^3 fosfatnog pufera ($c(\text{P}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,50$) dodano je između 100 i 800 μL otopine APTMS u

etanolu ($\gamma(\text{APTMS}) = 1,0 \text{ g dm}^{-3}$) i $1,0 \text{ cm}^3$ otopine ninhidrina u etanolu ($\gamma(\text{ninhidrin}) = 50 \text{ mg cm}^{-3}$). Smjesa je zagrijavana na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ u vodenoj kupelji tijekom jednog sata, nakon čega je razrijeđena vodom do 100 cm^3 i dobivenoj je otopini izmjerena apsorbancija pri 565 nm prema vodi kao referenci. Opisana metoda linearna je u području $18\text{--}75 \text{ }\mu\text{g NH}_2$.

3.3.2. Određivanje specifične katalitičke aktivnosti titanatnih nanocjevčica s kovalentno vezanom peroksidazom

Određivanje specifične katalitičke aktivnosti^{d)} titanatnih nanocjevčica modificiranih s peroksidazom temeljilo se na reakciji oksidacije ABTS s vodikovim peroksidom do ABTS radikal-kationa, koju katalizira enzim peroksidaza:



U 10 cm^3 fosfatnog pufera ($c(\text{P}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,0$) koji je sadržavao ABTS ($c(\text{ABTS}) = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$) suspendirano je 10 mg titanatnih nanocjevčica s kovalentno vezanom peroksidazom i u suspenziju je dodano $25 \text{ }\mu\text{L}$ vodene otopine H_2O_2 ($c(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$). Nastajanje ABTS radikal-kationa praćeno je amperometrijski, bilježenjem jakosti struje redukcije radikala pri 0 V na elektrodi od staklastog ugljika u hidrodinamičkim uvjetima. Na dobivenom amperogramu određen je nagib linearnog, početnog dijela I - t krivulje (a_1), i taj je nagib uspoređen s nagibom linearnog dijela amperograma (a_0) snimljenog pri identičnim uvjetima u otopini u koju je dodana određena količina peroksidaze (m_{HRP}) poznate katalitičke aktivnosti (S_{HRP}). Specifična katalitička aktivnost titanatnih nanocjevčica s imobiliziranom peroksidazom ($S_{\text{TiNT-HRP}}$) izračunata je prema formuli:

$$S_{\text{TiNT-HRP}} / (\text{U mg}^{-1}) = \frac{a_1 / (\mu\text{A s}^{-1})}{a_0 / (\mu\text{A s}^{-1})} \cdot \frac{m_{\text{HRP}} / \text{mg} \cdot S_{\text{HRP}} / (\text{U mg}^{-1})}{10 \text{ mg}}$$

^{d)} Pod specifičnom katalitičkom aktivnošću titanatnih nanocjevčica s kovalentno vezanom peroksidazom ovdje se podrazumijeva katalitička aktivnost izražena u internacionalnim jedinicama (U) po jedinici mase modificiranih nanocjevčica (1 U odgovara količini aktivnog enzima koji u jednoj minuti izvrši konverziju $1 \text{ }\mu\text{mol}$ supstrata).

3.3.3. Raščinjavanje titanatnih nanocjevčica

Da bi se u modificiranim titanatnim nanocjevčicama odredio udio metala (titanija, bakra ili željeza), nanocjevčice su prije analize raščinjene u koncentriranoj sumpornoj kiselini. U visoku i usku čašu od 50 mL odvagano je 25 mg uzorka modificiranih titanatnih nanocjevčica, na to je dodano 5,0 cm³ koncentrirane sumporne kiseline i smjesa je zagrijana do vrenja. Nakon što su se nanocjevčice otopile, otopina je ohlađena do približno sobne temperature i u nju je dodano 0,5 cm³ vodene otopine H₂O₂ ($w(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,30$). Otopina je potom ponovo zagrijana do vrenja i nastavljena je zagrijavati do potpunog raspada vodikova peroksida, indiciranog iščezavanjem crvene boje peroksotitanatnog kompleksa. Ohlađena otopina razrijeđena je vodom do volumena od 100 cm³.

3.3.4. Voltametrijsko određivanje titanija i bakra u modificiranim titanatnim nanocjevčicama

Da bi se u uzorcima modificiranih titanatnih nanocjevčica odredili udjeli titanija i/ili bakra, uzorci su najprije raščinjani u sumpornoj kiselini, a zatim su u dobivenim otopinama titanij i bakar određeni pravokutnovalnom voltametrijom ($f = 75 \text{ Hz}$, $\Delta E = 25 \text{ mV}$) na stacionarnoj živinoj elektrodi u oksalatnom mediju. Kao osnovni elektrolit pri analizama je korištena vodena otopina natrijeva oksalata ($c(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) zakiseljena sumpornom kiselinom ($c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$). U tom je mediju moguće simultano odrediti oba metala ($E_p(\text{Ti}^{4+}) = -0,332 \text{ V}$, $E_p(\text{Cu}^{2+}) = -0,068 \text{ V}$). Sve analize bile su izvršene u triplicatu, metodom standardnog dodatka.

3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje željeza u modificiranim titanatnim nanocjevčicama

Da bi se u uzorcima titanatnih nanocjevčica modificiranih s *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III) odredio udio željeza, nanocjevčice su najprije raščinjene u sumpornoj kiselini, a zatim je u dobivenoj otopini željezo određeno spektrofotometrijski s 1,10-fenantrolinom. U 10 cm³ otopine dobivene nakon raščinjavanja nanocjevčica dodano je redom 1,0 cm³ vodene otopine hidroksilamina ($w(\text{NH}_2\text{OH}) = 0,1$), 2,0 cm³ vodene otopine amonijaka ($V(\text{NH}_3, \text{ konc.}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 1$), 1,0 cm³ vodene otopine natrijeva acetata ($w(\text{NaAc}) = 0,25$) i 1,0 cm³ otopine 1,10-fenantrolina ($w(1,10\text{-fenantrolin}) = 0,005$) u smjesi

vode i etanola ($\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 0,50$). Dobivena otopina razrijeđena je s vodom do 25 cm^3 i izmjerena joj je apsorbancija pri 510 nm prema vodi kao referenci. Sve analize izvršene su u triplicatu, metodom standardnog dodatka.

3.4. Priprema elektroda i biosenzora

3.4.1. Priprema elektroda od grafitne paste

Grafitna pasta priređena je miješanjem grafitnog praha i parafinskog ulja u omjeru masa $m(\text{grafit}) : m(\text{parafinsko ulje}) = 8 : 2$. Radi ispitivanja elektrokemijskog ponašanja modificiranih titanatnih nanocjevčica u 95 mg grafitne paste dodano je 5 mg modificiranih titanatnih nanocjevčica i smjesa je dobro homogenizirana miješanjem spatulom na staklenoj pločici. Grafitna pasta utisnuta je u staklenu cjevčicu unutarnjeg promjera 5 mm, u kojoj se nalazio teflonski klip kroz čiju je sredinu bila provučena bakrena žica radi ostvarivanja električnog kontakta s grafitnom pastom. Grafitna pasta u cjevčici sabijena je pomoću klipa kako bi se iz nje istisnuo zrak. Prije uporabe elektrode površina grafitne paste zaglađena je na staklenoj pločici. Obnavljanje površine elektrode izvršeno je istiskivanjem malog volumena grafitne paste iz cjevčice, nakon čega je površina paste ponovo zaglađena.

3.4.2. Priprema elektroda od kompozita grafita i Nafiona

Masa od 10 mg modificiranih titanatnih nanocjevčica i 90 mg grafitnog praha suspendirana je u 400 μL otopine sulfoniranog fluoropolimera *Nafiona* ($w(\text{Nafion}) = 0,5 \%$) u vodi i dobivena suspenzija vorteksirana je 30 s. Volumen od 5 μL suspenzije jednoliko je razmazan po površini disk-elektrode od spektroskopskog grafita ($d = 5 \text{ mm}$) i elektroda je ostavljena stajati na zraku do sušenja sloja.

3.4.3. Priprema amperometrijskog biosenzora za određivanje vodikova peroksida

Za izradu amperometrijskog biosenzora za određivanje vodikova peroksida korištene su silanizirane titanatne nanocjevčice na čiju je površinu peroksidaza bila imobilizirana pomoću benzokinona, kako je opisano u pogl. 3.2.3. Titanatne nanocjevčice s kovalentno vezanom

peroksidazom ugrađene su u vodljivi kompozit grafita i Nafiona i deponirane na disk-elektrodu od spektroskopskog grafita na način opisan u prethodnom poglavlju, s razlikom što su nanocjevčice i grafitni prah umjesto u 400 μL otopine Nafiona u vodi suspendirane u 400 μL otopine Nafiona ($w(\text{Nafion}) = 0,5 \%$) u fosfatnom puferu ($c(\text{P}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,0$). Biosenzori su do uporabe skladišteni u fosfatnom puferu navedenog sastava pri temperaturi od 4 °C.

3.4.4. Priprema amperometrijskog biosenzora za određivanje glukoze

Biosenzori za određivanje glukoze priređeni su imobilizacijom glukoza-oksidadze u vodljivi kompozit grafita i silikatnog gela u koji su bile ugrađene silanizirane titanatne nanocjevčice na čiju je površinu peroksidaza bila imobilizirana pomoću benzokinona (pogl. 3.2.3.).

Silikatni sol pripremljen je miješanjem 2,2 cm^3 tetraetoksisilana s 0,05 cm^3 razrijeđene klorovodične kiseline ($c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i 0,7 cm^3 deionizirane vode. Dobivena emulzija miješana je na magnetskoj mješalici do potpunog razbistravanja (2,5 sati). Dobiveni silikatni sol do uporabe je čuvan u zatvorenoj posudici pri temperaturi od 4 °C. Pri navedenim uvjetima silikatni sol bio je stabilan najmanje 48 sati.

Masa od 2,5 mg glukoza-oksidadze otopljena je u suspenziji dobivenoj miješanjem 90 mg grafitnog praha, 10 mg titanatnih nanocjevčica s imobiliziranom peroksidazom i 400 μL fosfatnog pufera ($c(\text{P}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,0$). Dobivena suspenzija homogenizirana je vorteksiranjem tijekom 30 s, nakon čega je u nju dodano 200 μL prethodno priređenog silikatnog sola. Nakon kratkog miješanja na vorteks-mješalici, volumen od 5 μL dobivene suspenzije jednoliko je razmazan po površini disk-elektrode od spektroskopskog grafita ($d = 5 \text{ mm}$) i elektroda je ostavljena stajati na zraku do geliranja sloja.

Nakon geliranja silikatnog sola elektrode su dobro isprane s fosfatnim puferom ($c(\text{P}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,0$). Biosenzori su do uporabe skladišteni u fosfatnom puferu navedenog sastava pri temperaturi od 4 °C.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Istraživanja provedena u okviru ovog rada sadržajno se mogu podijeliti u tri cjeline, pa će i rezultati tih istraživanja biti prikazani u tri odvojena dijela. Prvi dio (pogl. 4.1.) sadržajno je vezan uz detaljnu karakterizaciju sintetiziranih titanatnih nanocjevčica, s ciljem utvrđivanja njihovih morfoloških i strukturnih svojstava, dok drugi dio (pogl. 4.2.) opisuje površinsko modificiranje titanatnih nanocjevčica (3-aminopropil)trimetoksisilanom (APTMS). U trećem dijelu (pogl. 4.3.) opisana su istraživanja vezana uz kovalentnu imobilizaciju enzima peroksidaze na titanatne nanocjevčice modificirane s APTMS, odn. kovalentno vezanje katalitički aktivnih *N*-saliciliden-*n*-propilaminskih kompleksa na površinu titanatnih nanocjevčica, istraživanja elektrokatalitičkih svojstava tako modificiranih nanocjevčica te njihova primjena u amperometrijskim senzorima. S obzirom na opseg i raznovrsnost eksperimentalnih rezultata opisanih u poglavljima koja slijede, na početku pojedinih poglavlja (gdje se to smatralo korisnim zbog lakšeg praćenja i snalaženja u tekstu) dodan je kratki uvod koji objašnjava svrhu provedenih istraživanja.

4.1. Karakterizacija titanatnih nanocjevčica

4.1.1. Morfološke značajke

Kao što je opisano u Eksperimentalnom dijelu (pogl. 3.2.1.), titanatne nanocjevčice sintetizirane su reakcijom praškastog TiO_2 (anatas) s koncentriranom vodenom otopinom NaOH ($w(\text{NaOH}) = 0,30$) u uvjetima refluksa ($T_V = 113\text{ }^\circ\text{C}$), nakon čega su ionskom izmjenom u razrijeđenoj vodenoj otopini HCl nanocjevčice prevedene u tzv. protonirani oblik^{e)}. Na TEM mikrografiji dobivenog produkta snimljenoj pri malom povećanju (slika 4.1.a) uočavaju se dva tipa morfološki različitih struktura: (i) mrežaste nakupine sačinjene od velikog broja slučajno orijentiranih nanostrukture malog promjera i duljine do nekoliko stotina nanometara te (ii) snopovi debljine od nekoliko desetaka do nekoliko stotina nanometara i duljine do nekoliko mikrometara, formirani od većeg broja paralelno orijentiranih tankih i dugačkih nanostrukture. Mikrografije snimljene pri većem povećanju

^{e)} U svim istraživanjima provedenima u ovom radu korištene su isključivo titanatne nanocjevčice u tzv. protoniranom obliku, tj. titanatne nanocjevčice u čijoj su strukturi ioni Na^+ ionskom izmjenom zamijenjeni ionima H^+ , što se dalje u tekstu više neće isticati. Uz pretpostavku trititanatne strukture nanocjevčica, opisana ionska izmjena odgovara konverziji $\text{Na}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ u $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ (v. pogl. 4.1.3. i 4.1.4.).

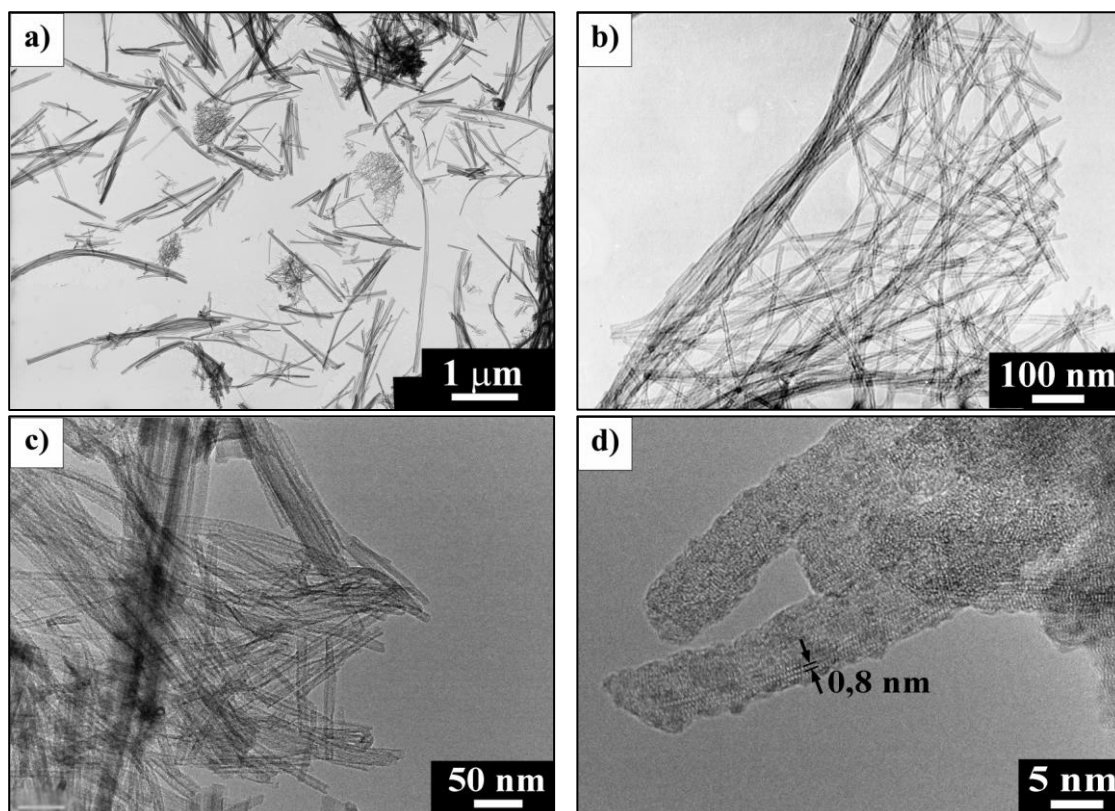
(slike 4.1.b i 4.1.c) pokazuju da su oba tipa struktura sačinjeni od nanocjevčica, pri čemu kraće nanocjevčice formiraju mrežaste nakupine, dok se dulje nanocjevčice orijentiraju paralelno i slažu u dulje i deblje snopove (sl. 4.1.b). Dobivene nanocjevčice uniformnog su vanjskog promjera između 8 i 10 nm te unutarnjeg promjera između 3 i 5 nm, otvorene su na svojim krajevima te imaju višeslojnu stijenku koja se sastoji od nekoliko paralelnih slojeva međusobno udaljenih otprilike 0,8 nm (slika 4.1.d). Sferične čestice polaznog TiO_2 nisu uočene niti nakon pomne pretrage uzorka, što upućuje na zaključak da je pri uvjetima sinteze korištenima u ovom radu postignuta potpuna konverzija titanijeva(IV) oksida u jednodimenzijske nanostrukture.

Mikrografije praškastog uzorka titanatnih nanocjevčica dobivene pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM), prikazane na slici 4.2., pokazuju da se uzorak sastoji od aglomerata nastalih isprepletanjem mnoštva nanocjevčica, odnosno njihovih snopova, u poroznu, mrežastu trodimenzijsku strukturu. Osim spomenutih mrežastih aglomerata, na SEM mikrografijama nisu uočene druge morfološke strukture, u skladu s ranije iznesenim zaključkom o kvantitativnoj konverziji titanijeva(IV) oksida u titanatne nanocjevčice pri korištenim uvjetima sinteze.

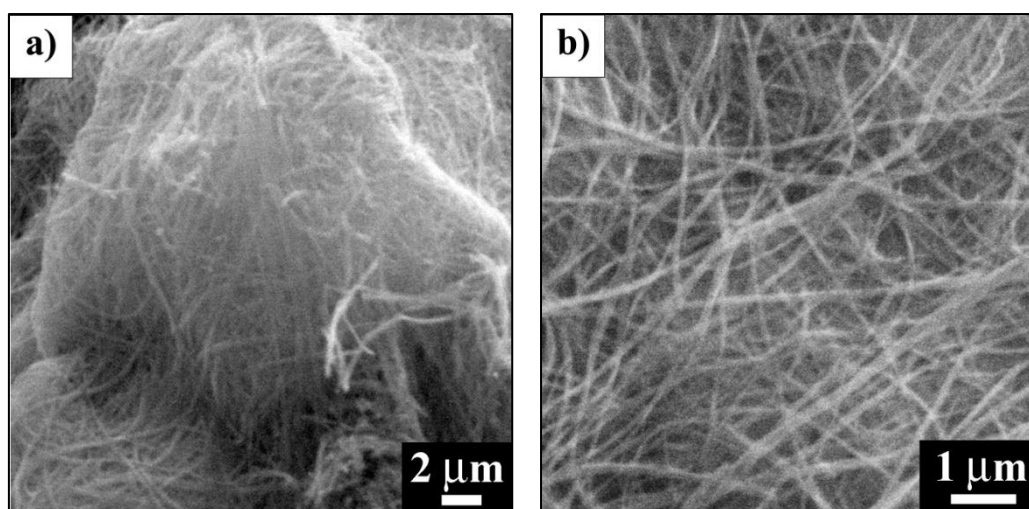
Opisane morfološke značajke sintetiziranih titanatnih nanocjevčica dobro se slažu s tipičnim morfološkim značajkama titanatnih nanocjevčica opisanima u literaturi¹⁵⁸⁻¹⁶⁶ i sumiranim u poglavlju 2.2.1. Relativno velik udio agregata nanocjevčica u uzorku (sl. 4.1.a i sl. 4.2.) može se objasniti velikom duljinom sintetiziranih nanocjevčica, pretežno većom od 1 μm (slika 4.1.a). Poznato je, naime, da se dugačke titanatne nanocjevčice preferirano orijentiraju paralelno jedna drugoj i slažu u deblje i duže snopove, koji potom formiraju veće porozne aglomerate.¹⁶¹ Relativno velika duljina titanatnih nanocjevčica sintetiziranih u ovom radu najvjerojatnije je posljedica miješanja reakcijske smjese tijekom njihove sinteze, čime je ostvarena efikasna, konvektivna doprema otopljenog Ti(IV) potrebnog za rast nanocjevčica.¹⁷⁶

4.1.2. Rendgenska difrakcija

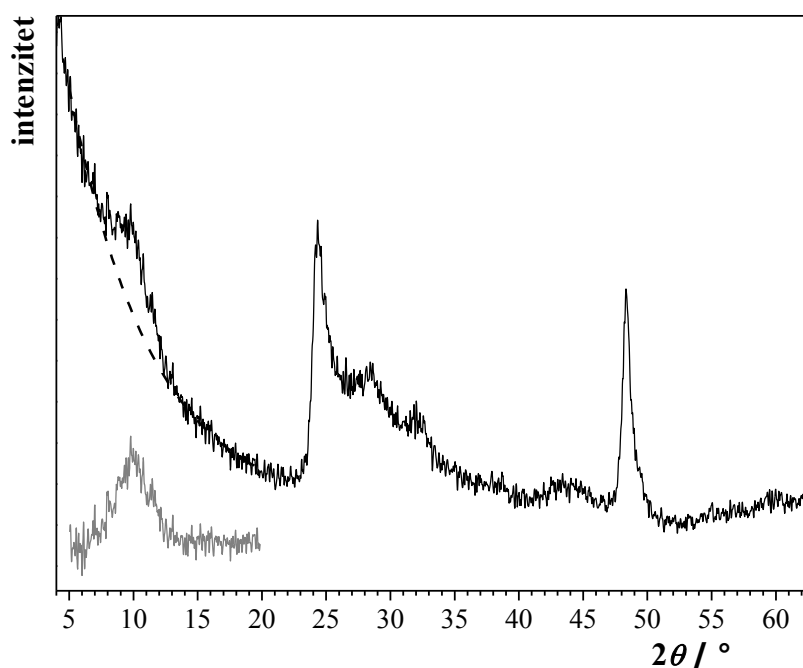
Tipičan rendgenski difraktogram titanatnih nanocjevčica sintetiziranih u ovom radu prikazan je na slici 4.3. U području kuteva 2θ od 5° do 65° na difraktogramu se uočava pet difrakcijskih maksimuma (tablica 4.1.), čije su pozicije karakteristične za titanatne nanocjevčice u pro-



Slika 4.1. TEM mikrografije produkta dobivenog reakcijom praškastog TiO_2 s vodenom otopinom NaOH ($w(\text{NaOH}) = 0,30$) u uvjetima refluksa.



Slika 4.2. SEM mikrografije titanatnih nanocjevčica dobivenih reakcijom praškastog TiO_2 s vodenom otopinom NaOH ($w(\text{NaOH}) = 0,30$) u uvjetima refluksa.



Slika 4.3. Rendgenski difraktogram titanatnih nanocjevčica. Sivom bojom prikazan je korigirani difraktogram dobiven nakon oduzimanja strme bazne linije (isprekidana crta) u području kuteva $2\theta < 20^\circ$.

Tablica 4.1. Difrakcijski maksimumi titanatnih nanocjevčica

$2\theta / ^\circ$ ^(a)	d / nm ^(a)	hkl ^(b)	d / nm ^(b)
9,8	0,903	200	0,790
24,3	0,366	110	0,365
28,6	0,312	211	0,308
32,0	0,280	112	0,277
48,3	0,188	020	0,188

^(a) eksperimentalno opaženo, koristeći Cu- K_α zračenje ($\lambda = 0,15418 \text{ nm}$)

^(b) za $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$, prema ref. 190

toniranom obliku^{158,159,163-166} i čije pojavljivanje upućuje na uređenu, kristalnu strukturu dobivenih nanocjevčica. Relativno velika širina difrakcijskih maksimuma (u usporedbi s tipičnom širinom difrakcijskih maksimuma mikrokristaliničnih uzoraka) ukazuje da je prostorna uređenost atoma u kristalnoj rešetki titanatnih nanocjevčica relativno kratkog dosega, što je i očekivano s obzirom na zakrivljenost i nanometarsku debljinu stijenki nanocjevčica. Izostanak pojedinih karakterističnih refleksa i slaba definiranost difrakcijskih maksimuma, kako je već spomenuto u literaturnom pregledu (pogl. 2.2.2.), onemogućuju jednoznačnu interpretaciju difraktograma prikazanog na slici 4.3. pa je asignacija difrakcijskih maksimuma u tablici 4.1. izvršena na temelju modela strukture titanatnih nanocjevčica kojeg su predložili Peng i suradnici¹⁵⁸ i kojeg danas prihvaća većina autora.

Uz navedenu asignaciju, kao dijagnostički važan difrakcijski maksimum treba istaknuti maksimum koji se na difraktogramu javlja pri kutu $2\theta = 9,8^\circ$ ($d = 0,903$ nm). Taj maksimum odgovara refleksiji s kristalografskih ravnina (200) koje u titanatnim nanocjevčicama formiraju višeslojnu stijenku nanocjevčice¹⁵⁸ pa je njegovo pojavljivanje jasna indikacija slojevite titanatne strukture stijenki nanocjevčica. Zbog interkalacije molekula vode između slojeva koji tvore stijenku nanocjevčica,^{191,192} razmak između ravnina (200) određen rendgenskom difrakcijom nešto je veći od odgovarajućeg razmaka kod trititanatne kiseline ($d_{200} = 0,790$ nm,¹⁹⁰ tablica 4.1.) i razmaka između ravnina (200) opaženog na visokorezolucijskim TEM mikrofografijama (slika 4.1.d), tijekom čijeg snimanja nužno dolazi do dehidratacije nanocjevčica uslijed zagrijavanja uzorka pod elektronskim snopom i visokog vakuumu u koloni elektronskog mikroskopa.

Na difraktogramu uzorka titanatnih nanocjevčica ne uočavaju se difrakcijski maksimumi koji bi se mogli pripisati anatasu (JCPDS 84-1286), što još jednom potvrđuje zaključak o kvantitativnoj konverziji anatasa u titanatne nanocjevčice pri uvjetima sinteze korištenima u ovom radu.

4.1.3. Specifična površina, poroznost i raspodjela volumena pora

Specifična površina te volumen i raspodjela veličina pora sintetiziranih titanatnih nanocjevčica određeni su mjerenjem adsorpcijskih i desorpcijskih izoterma dušika pri standardnom vrelištu dušika ($T_v^\circ(\text{N}_2) = 77$ K). Dobivena adsorpcijsko-desorpcijska izoterma prikazana je na slici 4.4. U području relativnih tlakova $p/p_0 < 0,7$ adsorpcijska i desorpcijska

grana izoterme se poklapaju i pokazuju gotovo konstantan te relativno mali nagib, dok u području većih relativnih tlakova dolazi do porasta nagiba izoterme i pojave histereze. Izoterma po svom obliku odgovara tipu IV klasifikacije koju preporučuje IUPAC²⁰⁹ i tipična je za uzorke s mezoporoznom strukturom, kod kojih je adsorpcijsko-desorpcijska histereza uzrokovana kapilarnom kondenzacijom dušika u porama uzorka. Histereza na adsorpcijsko-desorpcijskoj izotermi sa slike 4.4. kombinacija je histereze tipa H1, koja je karakterizirana strmim i gotovo paralelnim adsorpcijskim i desorpcijskim granama te koja je karakteristična za materijale s uniformnim tubularnim mezoporama otvorenima na oba kraja, i histereze tipa H3, koju karakterizira izostanak granične adsorpcije pri relativnim tlakovima $p/p_0 \approx 1$ i koja je svojstvena materijalima koji nastaju aglomeracijom čestica i sadrže pore nepravilna oblika.²⁰⁹ Izostanak granične adsorpcije pri relativnim tlakovima $p/p_0 \approx 1$ ukazuje na relativno široku raspodjelu veličina pora u uzorku, pri čemu se najšire pore popunjavaju kapilarno kondenziranim dušikom tek pri relativnom tlaku $p/p_0 = 1$.

S obzirom na tip dobivene adsorpcijsko-desorpcijske izoterme, specifičnu površinu titanatnih nanocjevčica moguće je izračunati primjenom Brunauer-Emmett-Tellerove (BET) izoterme:²¹⁰

$$\frac{1}{V_a \cdot \left(\frac{p_0}{p} - 1 \right)} = \frac{C-1}{V_m \cdot C} \cdot \frac{p}{p_0} + \frac{1}{V_m \cdot C} \quad (4.1.)$$

gdje je V_a specifični volumen adsorbiranog dušika, p_0 tlak para dušika pri $T_v^\circ(\text{N}_2)$, p parcijalni tlak dušika u ravnoteži s adsorbensom pri $T_v^\circ(\text{N}_2)$, V_m specifični volumen adsorbiranog dušika potreban za stvaranje monosloja adsorbata, a C bezdimenzijska konstanta čija vrijednost ovisi o entalpiji adsorpcije dušika na promatranu površinu. Za obje grane izoterme sa slike 4.4. ovisnost veličine $1/[V_a(p_0/p - 1)]$ o p/p_0 linearna je u području relativnih tlakova od 0,05 do 0,35 ($r^2 = 0,9998$), pri čemu su za nagib (a) i odsječak (b) regresijskog pravca dobivene vrijednosti:

$$a = (C - 1) / (V_m \cdot C) = (1,621 \pm 0,007) \cdot 10^{-2} \text{ g cm}^{-3} \quad \text{i}$$

$$b = 1 / (V_m \cdot C) = (1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-4} \text{ g cm}^{-3}.$$

Odatle slijedi da specifični volumen dušika potreban za stvaranje monosloja molekula N_2 na površini promatranog uzorka titanatnih nanocjevčica iznosi $V_m = 61,2 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Iz specifičnog volumena dušika potrebnog za formiranje monosloja adsorbiranih molekula N_2 , specifična površina (S_{BET}) uzorka izračunata je prema relaciji:

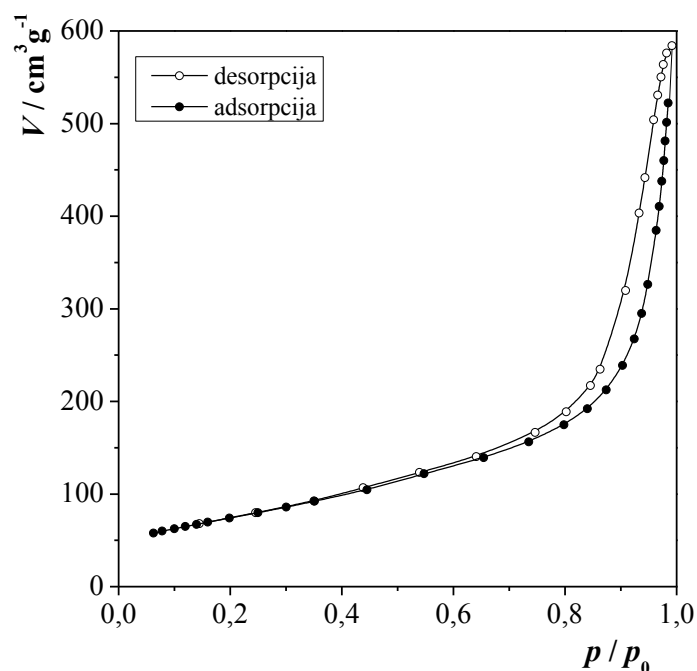
$$S_{\text{BET}} = \frac{V_m \cdot N_A \cdot S_a(\text{N}_2)}{v_m} \quad (4.2.)$$

gdje je N_A Avogadrova konstanta, $S_a(\text{N}_2)$ efektivna površina adsorbirane molekule dušika, $S_a(\text{N}_2) = 0,162 \text{ nm}^2$, a v_m molarni volumen idealnog plina pri istim uvjetima tlaka i temperature pri kojima je izražen V_m . Specifična površina ispitivanog uzorka titanatnih nanocjevčica, izračunata primjenom relacije 4.2., iznosi $S_{\text{BET}} = 266,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

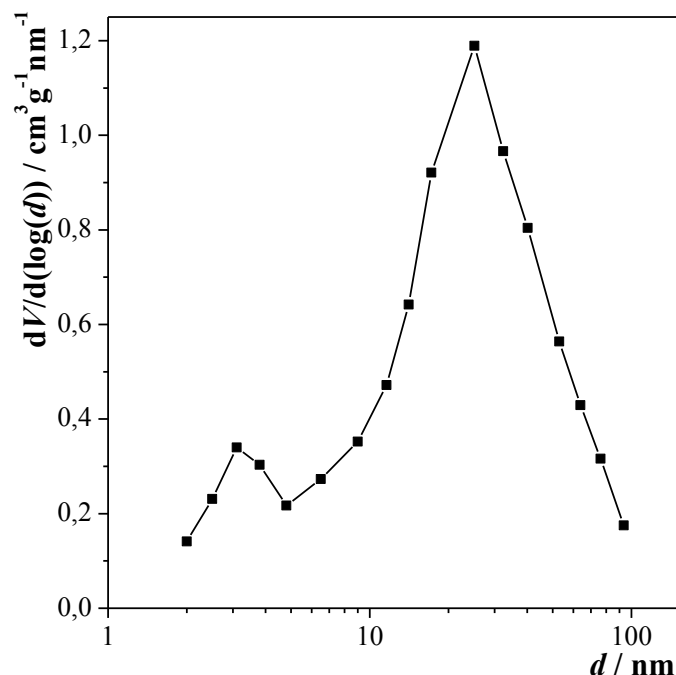
S obzirom da pri relativnom tlaku $p/p_0 = 1$ dolazi do potpunog popunjavanja pora kondenziranim dušikom, ukupni volumen pora uzorka dan je sa:

$$V_p = \frac{V_{a,\text{max}} \cdot v_{m,l}}{v_m} \quad (4.3.)$$

gdje je $V_{a,\text{max}}$ specifični volumen apsorbiranog dušika pri $p/p_0 = 1$, a $v_{m,l}$ molarni volumen tekućeg dušika pri $T_v^\circ(\text{N}_2)$ ($v_{m,l} = 34,68 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$). Ekstrapolacijom desorpcijske grane izoterme sa slike 4.4. na vrijednost $p/p_0 = 1$ za titanatne nanocjevčice određena je vrijednost $V_{a,\text{max}} = 584,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, što za ukupni specifični volumen pora praškastog uzorka titanatnih nanocjevčica prema relaciji 4.3. daje $V_p = 0,90 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Dobivena vrijednost ukazuje na relativno veliku poroznost uzorka, tj. na postojanje velikog broja otvorenih pora.



Slika 4.4. Izoterme adsorpcije i desorpcije dušika ($T = 77 \text{ K}$) na titanatne nanocjevčice.



Slika 4.5. Raspodjela specifičnog volumena pora titanatnih nanocjevčica u ovisnosti o promjeru (d) pora.

Raspodjela volumena pora mezoporoznog uzorka može se izračunati iz desorpcijske grane izoterme primjenom metode koju su razvili Barrett, Joyner i Halenda.²¹¹ Za proračun je korišten komercijalni računalni program tvrtke Micromeritics isporučen uz porozimetar, a dobiveni rezultati prikazani su na slici 4.5. Uočljivo je da je raspodjela bimodalna, s uskim maksimumom pri promjeru od otprilike 3 nm i širokim maksimumom pri 25 nm, koji se proteže do promjera od otprilike 100 nm. Uzimajući u obzir morfološke karakteristike sintetiziranih titanatnih nanocjevčica i njihovih agregata opisane u pogl. 4.1.1., pore promjera manjeg od 5 nm mogu se pripisati unutarnjim porama (lumen, nanotubularnim šupljinama) titanatnih nanocjevčica te porama između pojedinih nanocjevčica uređenih u snopove, dok se veće pore mogu pripisati porama između snopova titanatnih nanocjevčica u mrežastim aglomeratima vidljivim na SEM mikrofografijama prikazanim na slici 4.2. Sličnu bimodalnu raspodjelu veličina pora praškastih uzoraka titanatnih nanocjevčica opazili su i drugi autori te je interpretirali na jednak način.¹⁶¹

Integriranjem površina ispod maksimuma pri 3 nm na krivulji razdiobe volumena pora izračunato je da specifični volumen pora s promjerom manjim od 5 nm iznosi $0,18 \text{ cm}^3 \text{g}^{-1}$, iz čega proizlazi da 80 % poroznosti praškastog uzorka sintetiziranih titanatnih nanocjevčica

otpada na pore u aglomeratima snopova nanocjevčica, a tek manji dio (<20 %) na pore koje odgovaraju lumenu nanocjevčica. Karakteristična svojstva titanatnih nanocjevčica vezana uz specifičnu površinu i poroznost praškastog uzorka nanocjevčica sumarno su prikazana u tablici 4.2.

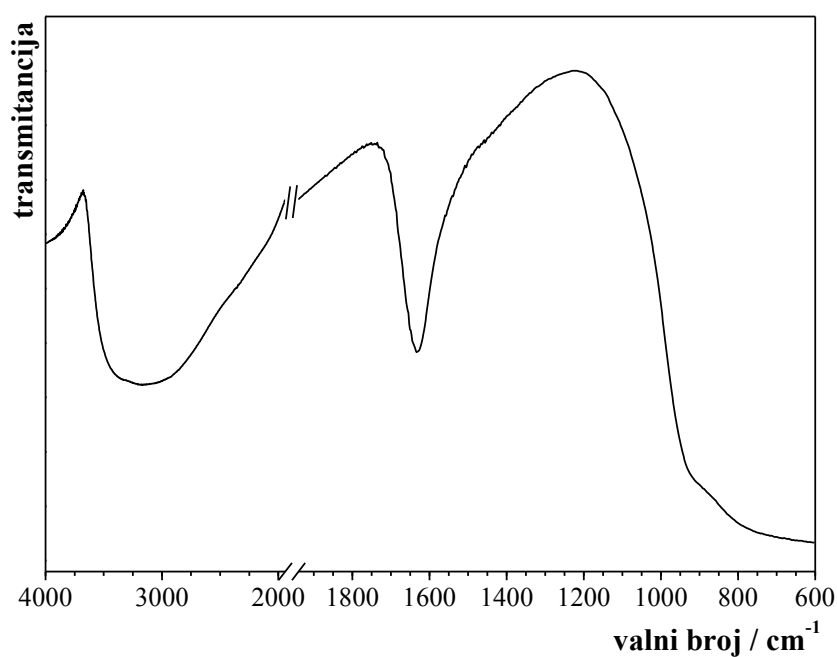
Tablica 4.2. Karakteristične značajke vezane uz specifičnu površinu i poroznost praškastog uzorka titanatnih nanocjevčica sintetiziranih u ovom radu

specifična površina	$S_{\text{BET}} = 266,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$
ukupni specifični volumen pora	$V_p = 0,90 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$
specifični volumen pora s promjerom manjim od 5 nm	$V_p^{(d < 5 \text{ nm})} = 0,18 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$
udio volumena pora s promjerom većim od 5 nm u ukupnom volumenu pora uzorka	$V_p^{(d > 5 \text{ nm})} / V_p = 0,80$

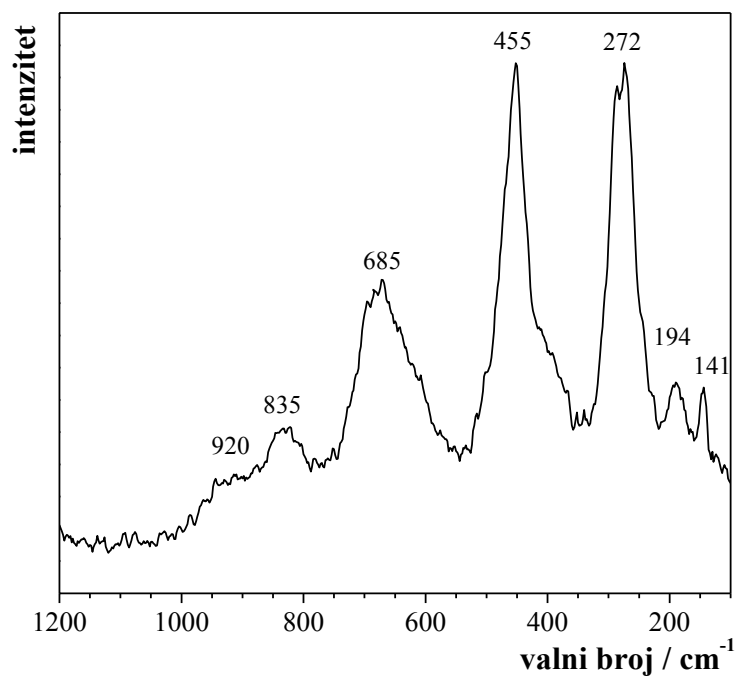
4.1.4. Infracrvena i Ramanova spektroskopija

Infracrveni (FTIR) spektar sintetiziranih titanatnih nanocjevčica u srednjevalnom infracrvenom području prikazan je na slici 4.6. Spektar nije bogat detaljima i tipičan je za titanatne nanocjevčice.^{158,159} U području valnih brojeva manjih od 1000 cm^{-1} titanatne nanocjevčice pokazuju izrazitu apsorpciju zbog postojanja nekoliko intenzivnih, preklapljenih vrpce uslijed vibracija Ti–O veza u strukturi $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$. Intenzivna vrpca pri 1627 cm^{-1} može se pripisati vibracijama savijanja H–O–H veza, a vrlo široka vrpca pri otprilike 3150 cm^{-1} , čije je granice teško odrediti zbog izražena Christiansenova efekta, istezanju O–H veza. Te dvije vrpce posljedica su postojanja površinskih OH-skupina i fizički vezane vode u titanatnim nanocjevčicama.^{158,159}

U Ramanovom spektru titanatnih nanocjevčica sintetiziranih u ovom radu (slika 4.7.) u području valnih brojeva manjih od 1000 cm^{-1} opaženo je šest vibracijskih vrpce (tablica 4.3.) koje su, za razliku od vrpce u analognom području FTIR spektra titanatnih nanocjevčica, znatno bolje definirane i većinom dobro razlučene. Vrpce pri 835, 685, 455, 272 i 194 cm^{-1} te rame pri 920 cm^{-1} odgovaraju vibracijama veza Ti–O i Ti–O–M (M = Na ili H) u trititanatnoj strukturi^{212,213} i po obliku te relativnom intenzitetu karakteristične su za titanatne



Slika 4.6. FTIR spektar titanatnih nanocjevčica sintetiziranih u ovom radu.



Slika 4.7. Ramanov spektar titanatnih nanocjevčica sintetiziranih u ovom radu.

Tablica 4.3. Pozicije i asignacije vibracijskih vrpca u Ramanovom spektru titanatnih nanocjevčica (prema ref. 193,212-215)

valni broj / cm^{-1} (a)	asignacija
194	Ti–O···M ⁺ savijanje (M ⁺ = Na ⁺ , H ⁺)
272, 455, 685	Ti–O–Ti savijanje (TiO ₆ oktaedri povezani bridovima)
835	Ti–O istezanje (Ti–O–H)
920 (w, b)	Ti–O istezanje (Ti–O···Na ⁺)

(a) w = slaba vrpca, b = široka vrpca, sh = rame.

nanocjevčice kojima se pripisuje struktura H₂Ti₃O₇.^{193,214} Slabo izražena Ramanova vrpca pri 920 cm^{-1} odgovara istezanju kratkih Ti–O veza u kojima je atom kisika koordiniran s ionom Na⁺ smještenim između titanatnih nanoravnina u slojevitoj strukturi trititanata^{213,215} pa njeno pojavljivanje u Ramanovom spektru titanatnih nanocjevčica ukazuje da je u njihovoj strukturi i nakon ionske izmjene Na⁺ sa H⁺ zaostala mala količina natrijevih kationa.¹⁶⁸ Slaba, ali oštra vrpca koja je u Ramanovom spektru titanatnih nanocjevčica opažena pri 143 cm^{-1} može se pripisati E_g vibracijskom modu anatasa.²¹⁶ Iako ta vrpca može potjecati od tragova anatasa koji tijekom sinteze nije preveden u titanatne nanocjevčice, vjerojatnije je da je riječ o tragovima anatasa nastalog *in situ* tijekom snimanja Ramanovog spektra uslijed zagrijavanja i dehidracije titanatnih nanocjevčica u laserskom snopu.¹⁹³

4.1.5. Termogravimetrijska analiza i diferencijalna pretražna kalorimetrija

Da bi se odredio udio fizički vezane vode u titanatnim nanocjevčicama, a ujedno dobio i uvid u njihovu termičku stabilnost, praškasti uzorak titanatnih nanocjevčica uravnotežen s atmosferom pri sobnoj temperaturi podvrgnut je diferencijalnoj termičkoj i termogravimetrijskoj analizi (DTA/TG) u području temperatura od 25 do 600 °C (slika 4.8.). Dobivena termogravimetrijska krivulja pokazuje monoton pad sve do temperature od otprilike 465 °C, nakon čega ne dolazi do daljnje promjene mase uzorka. Na DTA krivulji titanatnih nanocjevčica opisanom smanjenju mase odgovara nekoliko endotermnih minimuma, od kojih

se prva dva pojavljuju u području temperatura od 25 do otprilike 250 °C i jače su izražena, dok su ostali endotermni minimumi slabijeg intenziteta (umetak na slici 4.8.) i pojavljuju se u području temperatura od otprilike 265 do 465 °C. Granice temperaturnih intervala u kojima se odvijaju pojedini procesi te pripadajuće promjene mase prikazane su u tablici 4.4.

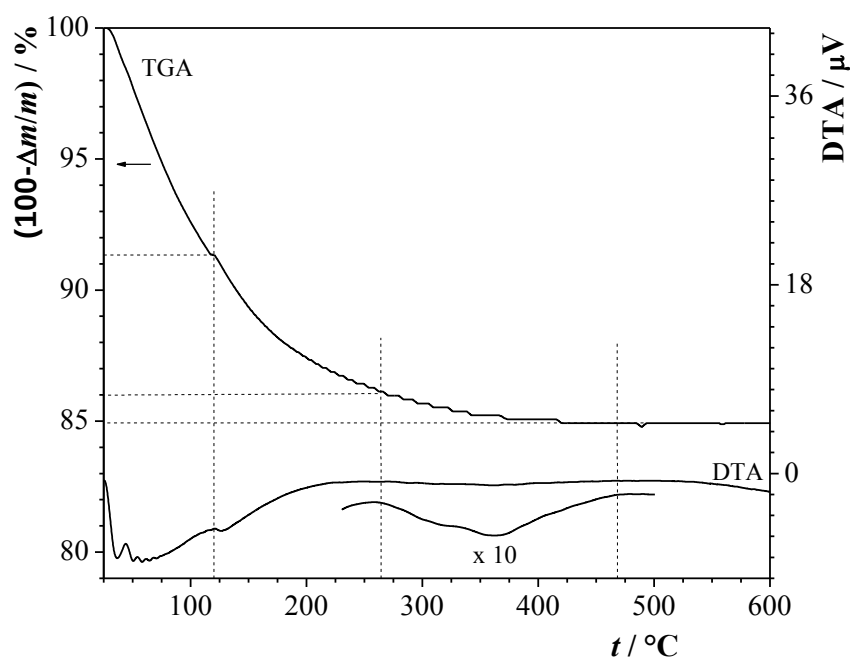
Da bi se opisani procesi interpretirali, potrebno je uzeti u obzir da titanatne nanocjevčice sadrže molekule vode interkalirane između slojeva koji formiraju njihove stijenke,^{158,159} te da uzorak titanatnih nanocjevčica uravnotežen s atmosferom nužno sadrži i molekule vode adsorbirane na površinu nanocjevčica. S obzirom na postojanje relativno uskih ($d < 5$ nm) mezopora u uzorku titanatnih nanocjevčica (pogl. 4.1.4.), može se pretpostaviti da titanatne nanocjevčice uravnotežene s atmosferom sadrže i kapilarno kondenziranu vodu. Ravnotežni tlak para (p_v) iznad tekućine u cilindričnoj pori polumjera r čije stijenke tekućina moći potpuno može se procijeniti iz Kelvinove jednadžbe:

$$\ln \frac{p_v}{p_0} = -\frac{2 \cdot \gamma \cdot V_m}{r \cdot R \cdot T}$$

u kojoj je p_0 ravnotežni tlak pare slobodne tekućine pri temperaturi T , a γ i V_m su napetost površine i molarni volumen tekućine. Za cilindričnu poru promjera 5 nm koja je djelomično ispunjena vodom pri 25 °C ($\gamma = 0,072$ N/m i $V_m = 1,805 \cdot 10^{-5}$ m³/mol) Kelvinova jednadžba za omjer p_v/p_0 daje vrijednost 0,658. Za realnu poru, čije stijenke voda ne moći potpuno pa je zakrivljenost meniskusa tekućine veća od polumjera pore, vrijednost p_v/p_0 nešto je veća od izračunate, no može se zaključiti da je pri sobnoj temperaturi i uobičajenoj prosječnoj relativnoj vlažnosti zraka od 70 do 85 % barem dio najmanjih pora u praškastom uzorku titanatnih nanocjevčica ispunjen kapilarno kondenziranim vodom. S obzirom da specifični volumen pora s promjerom manjim od 5 nm u ispitivanom uzorku titanatnih nanocjevčica iznosi 0,18 cm³ g⁻¹ (tablica 4.2.), maseni udio kapilarno kondenzirane vode u praškastom uzorku titanatnih nanocjevčica uravnoteženih s atmosferom u uvjetima potpune kondenzacije u pore mogao bi doseći vrijednosti od 15-20 %, no iz prethodno spomenutih razloga taj je udio vjerojatno manji.

Za isparavanje kapilarno kondenzirane i fizički vezane vode potrebna je relativno mala energija pa se tim procesima može pripisati gubitak mase koji se tijekom zagrijavanja titanatnih nanocjevčica opaža u području temperatura od 25 do otprilike 120 °C. Iz podataka prikazanih u tablici 4.4. proizlazi da titanatne nanocjevčice uravnotežene s atmosferom pri sobnoj temperaturi sadrže 8,7 % kapilarno kondenzirane i fizički vezane vode. Daljnje

smanjenje mase od 6,4 % u području temperatura između 120 i 465 °C dobro se slaže s teorijskim smanjenjem mase tijekom pretvorbe $\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$ u TiO_2 ($\Delta m/m = 7,0 \%$), što upućuje na zaključak da u spomenutom području temperatura dolazi do dehidracije Ti–OH skupina i promjene strukture nanocjevčica iz titanatne u strukturu TiO_2 . S obzirom da se u temperaturnom području od 120 do 465 °C na DTA krivulji titanatnih nanocjevčica pojavljuju barem tri minimuma, proces dehidracije titanatnih nanocjevčica i njihove strukturne pretvorbe u TiO_2 očito je složen i obuhvaća nekoliko endotermnih stupnjeva s različitim energijama aktivacije. Značajno je za primijetiti da se endotermni minimumi koji odgovaraju dehidraciji titanatnih nanocjevčica do TiO_2 , odnosno isparavanju kapilarno kondenzirane i fizički vezane vode preklapaju pa je očito da strukturna pretvorba titanatnih nanocjevčica u TiO_2 započinje prije no što se iz nanocjevčica ukloni sva kapilarno kondenzirana i fizički vezana voda.



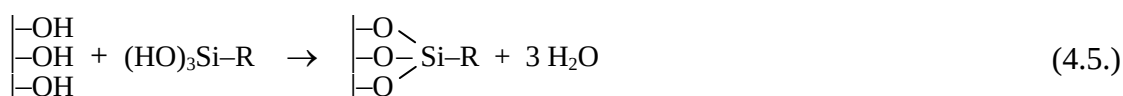
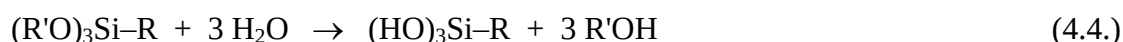
Slika 4.8. Termogravimetrijska (TG) krivulja i krivulja diferencijalne termičke analize (DTA) titanatnih nanocjevčica snimljena uz brzinu promjene temperature od $5\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Sa 'x10' označen je isječak DTA krivulje prikazan s ordinatom uvećanom 10 puta.

Tablica 4.4. Temperaturni intervali u kojima se odvijaju pojedini endotermni procesi tijekom zagrijavanja i dehidracije titanatnih nanocjevčica i pripadajuće relativne promjene mase ($\Delta m/m_0$) uzorka

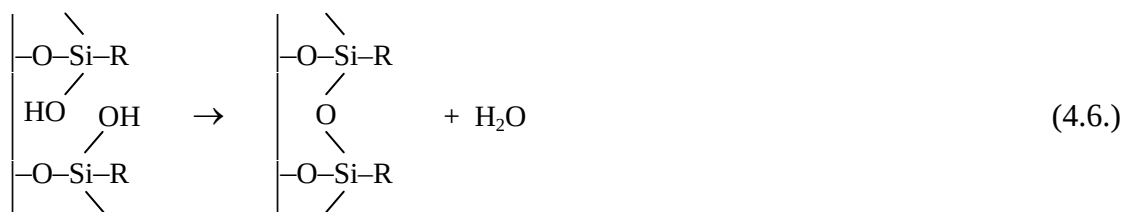
temperaturni interval / °C	$\Delta m/m_0$ / %
25–120	–8,7
120–265	–5,2
265–335	
335–465	–1,2

4.2. Površinsko modificiranje titanatnih nanocjevčica (3-aminopropil)trimetoksisilanom

Silaniziranje – površinsko modificiranje materijala koje se temelji na reakciji reaktivnih površinskih OH-skupina s organosilanima (X_3Si-R , gdje je R alkilni lanac, a X odlazeća skupina) – jedna je od najčešće korištenih metoda za površinsko funkcionaliziranje materijala na bazi metalnih oksida i oksida polumetala.²¹⁷ S obzirom da je alkoksidna skupina dobra odlazeća grupa, za silaniziranje se najčešće koriste metoksi- ili etoksisilani ($X = OCH_3$ ili OCH_2CH_3), gotovo redovito otopljeni u prikladnom aprotičnom otapalu. Već u prisutnosti tragova (1–2 ppm) vode u reakcijskoj smjesi silaniziranje oksidnih materijala alkoksisilanima odvija se mehanizmom koji u početnom stupnju uključuje hidrolizu alkoksidnih skupina i nastajanje silanola (reakcija 4.4.) te daljnju kondenzacijsku reakciju silanola s površinskim OH-skupinama uz nastajanje veze Me–O–Si (reakcija 4.5.):^{218,219}



Nastali silanol vrlo je reaktivan pa može reagirati i sa OH-skupinama susjednih molekula površinski vezanog silanola, pri čemu dolazi do njihove kondenzacije i povezivanja siloksanskim (Si–O–Si) vezama (reakcija 4.6.):^{217,218}



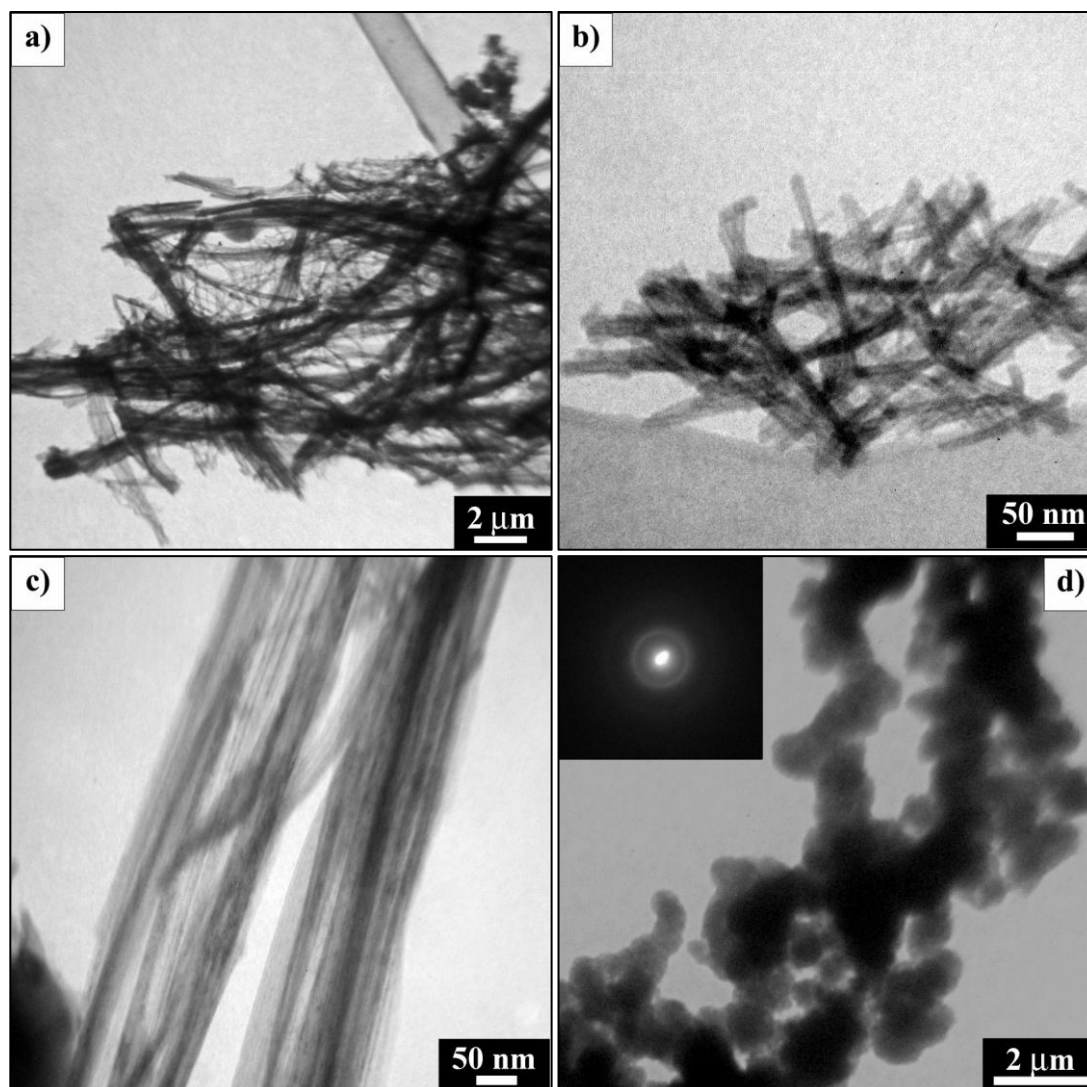
U prisutnosti više od desetak ppm vode u reakcijskoj smjesi do hidrolize alkoksisilana i kondenzacije nastalog silanola dolazi već u otopini, pri čemu nastaju linearni i razgranati oligomerni, odn. polimerni kondenzacijski produkti koji se potom vežu na površinu oksidnog materijala, stvarajući kondenziranije i razgranatije površinske siloksanske slojeve.^{217,218,219}

U ovom radu titanatne nanocjevčice površinski su funkcionalizirane (3-aminopropil)-trimetoksisilanom (APTMS, R = CH₂CH₂CH₂NH₂) kako bi se na njihovu površinu uvele NH₂-skupine i time omogućilo njihovo daljnje modificiranje. S obzirom da u trenutku izrade ovog rada nije postojala sistematska studija silaniziranja titanatnih nanocjevčica te s obzirom da je pretpostavljeno da bi se titanatne nanocjevčice zbog značajnog sadržaja fizički vezane vode i termičke nestabilnosti (pogl. 4.1.5.) tijekom silaniziranja mogle ponašati specifično u odnosu na ostale oksidne materijale, reakcija titanatnih nanocjevčica s APTMS istražena je detaljnije, s naglaskom na utvrđivanje utjecaja reakcijskih uvjeta na morfološka svojstva dobivenih produkata te na strukturu nastalih slojeva površinski vezanog silana. Da bi se utvrdilo kako na ishod silaniziranja titanatnih nanocjevčica utječe prisutnost fizički vezane vode u nanocjevčicama, provedeni su eksperimenti u kojima su silaniziranju podvrgnute (i) nanocjevčice uravnotežene s atmosferom, tj. nanocjevčice koje su sadržavale ravnotežnu količinu fizički vezane vode određenu parcijalnim tlakom vodene pare u zraku (uzorak **T-R** dobiven postupkom SI-1, v. pogl. 3.2.2.), te (ii) nanocjevčice iz kojih je fizički vezana voda prethodno uklonjena azeotropnom destilacijom u toluenu (uzorak **T-A** dobiven postupkom SI-2), uobičajenim postupkom za uklanjanje vlage iz uzoraka oksidnih materijala prije silaniziranja.¹¹¹ U oba slučaja kao aproitični reakcijski medij u kojem je provedeno silaniziranje korišten je toluen, pri čemu je reakcija titanatnih nanocjevčica s APTMS u slučaju uzorka T-R bila provedena u uvjetima refluksa ($T_v = 110\text{ }^\circ\text{C}$), a kod uzorka T-A pri sobnoj temperaturi. Silaniziranje titanatnih nanocjevčica provedeno je i pri vrlo blagim

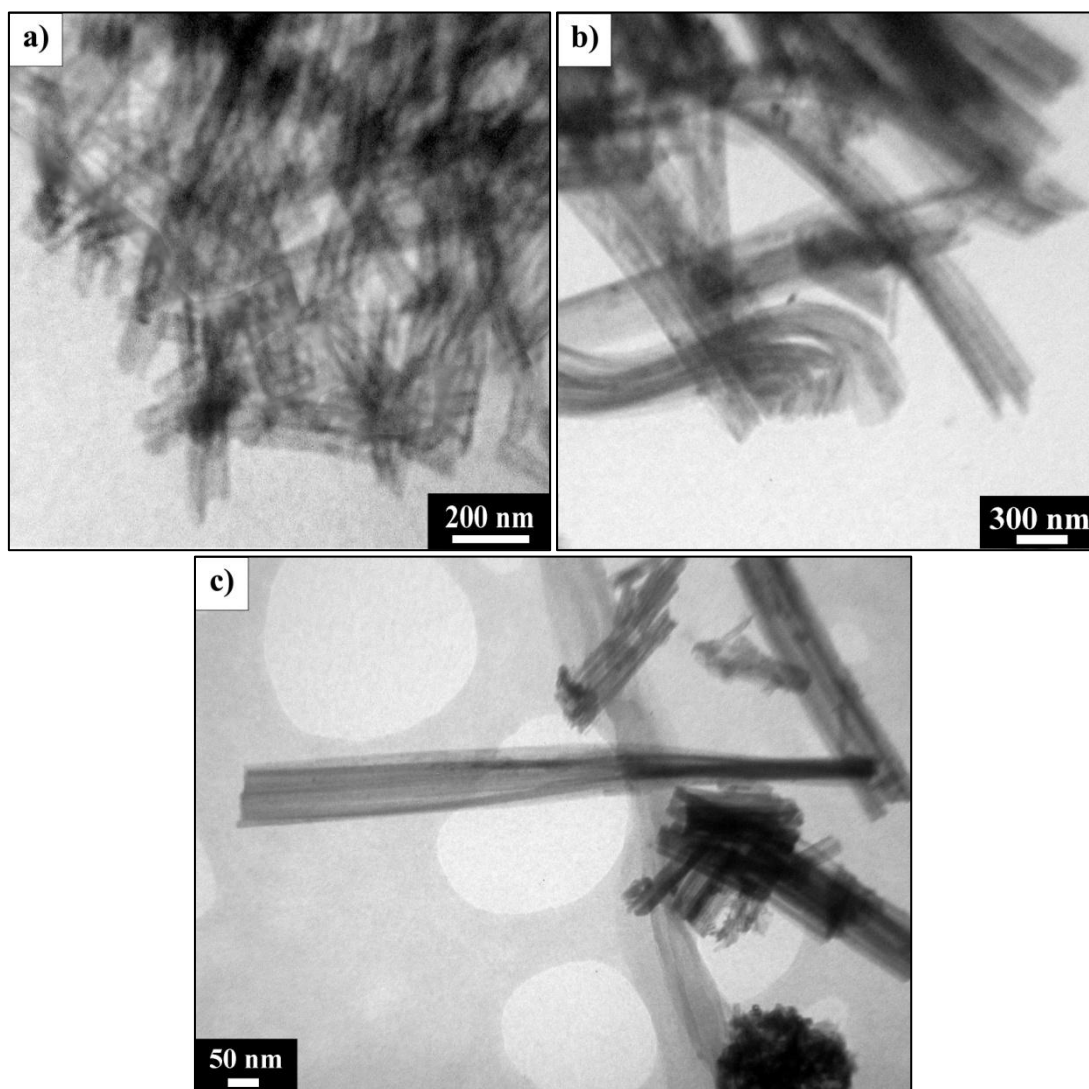
reakcijskim uvjetima, reakcijom nanocjevčica uravnoteženih s atmosferom s APTMS pri sobnoj temperaturi u diklormetanu kao reakcijskom mediju (uzorak **TiNT-NH₂** dobiven postupkom SI-3).

4.2.1. Utjecaj reakcijskih uvjeta na morfološka svojstva produkata dobivenih silaniziranjem titanatnih nanocjevčica i količinu vezanog APTMS

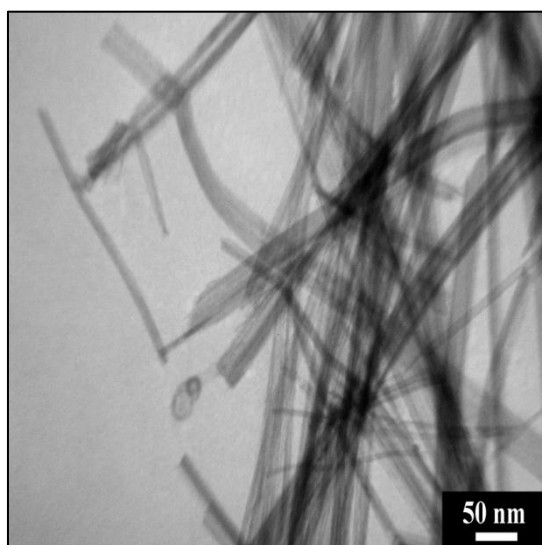
TEM mikrografija uzorka T-R prikazana je na slici 4.9. Pri manjem povećanju (slika 4.9.a) u uzorku se uočava prisutnost izduženih agregata koji morfološki podsjećaju na snopove titanatnih nanocjevčica uočene u nemodificiranim uzorcima (sl. 4.1.a) te prisutnost finijih mrežastih nakupina koje se sastoje od individualnih nanocjevčica duljine između 50 i 250 nm (slika 4.9.b). Pri većem povećanju (slika 4.9.c) uočava se da se izduženi agregati sastoje od paralelnih nakupina međusobno više ili manje sljubljenih izduženih tvorevina koje po cijelom presjeku pokazuju jednoliki kontrast. Iako po aspektnom omjeru opisane nanostrukture očito potječu od titanatnih nanocjevčica, njihov homogen kontrast navodi na zaključak da je riječ o nanovlaknima ili nanovrpama pa proizlazi da tijekom silaniziranja u toluenu pri uvjetima refluksa dolazi do morfološke transformacije dijela titanatnih nanocjevčica. Osim opisanih struktura, u uzorku T-R opažena je prisutnost još jedne faze, koja se pojavljuje u obliku nakupina sferičnih čestica izrazito homogenog kontrasta i promjera između 0,5 i 1 μm (slika 4.9.d). Difrakcijska slika tih sferičnih čestica (umetak na slici 4.9.d), dobivena elektronskom difrakcijom na odabranom području (SAED), pokazuje samo jedan difrakcijski prsten, čija difuznost i slab intenzitet upućuju na amorfnu strukturu promatranih čestica. Ta se faza može pripisati poli(3-aminopropilsiloksanu), amorfnom kondenzacijskom produktu APTMS, što upućuje na zaključak da tijekom silaniziranja titanatnih nanocjevčica koje sadrže ravnotežnu količinu fizički vezane vode dolazi i do hidrolize, odn. kondenzacije APTMS u otopini, ako se silaniziranje provodi u toluenu u uvjetima refluksa. To je i očekivano, budući da titanatne nanocjevčice uravnotežene s atmosferom sadrže otprilike 8,5 % fizički vezane vode (pogl. 4.1.5.). S obzirom na sastav reakcijske smjese za silaniziranje (pogl. 3.2.2.), proizlazi da se s titanatnim nanocjevčicama u reakcijsku smjesu unosi otprilike 21 mg vode na 235 mg APTMS, što odgovara množinskom omjeru vode i APTMS, $n(\text{H}_2\text{O})/n(\text{APTMS}) \approx 0,90$, te udjelu vode u otapalu od otprilike 0,085 %. U skladu s rečenim u uvodu ovog poglavlja, za očekivati je da pri takvim uvjetima APTMS hidrolizira i kondenzira već u otopini.



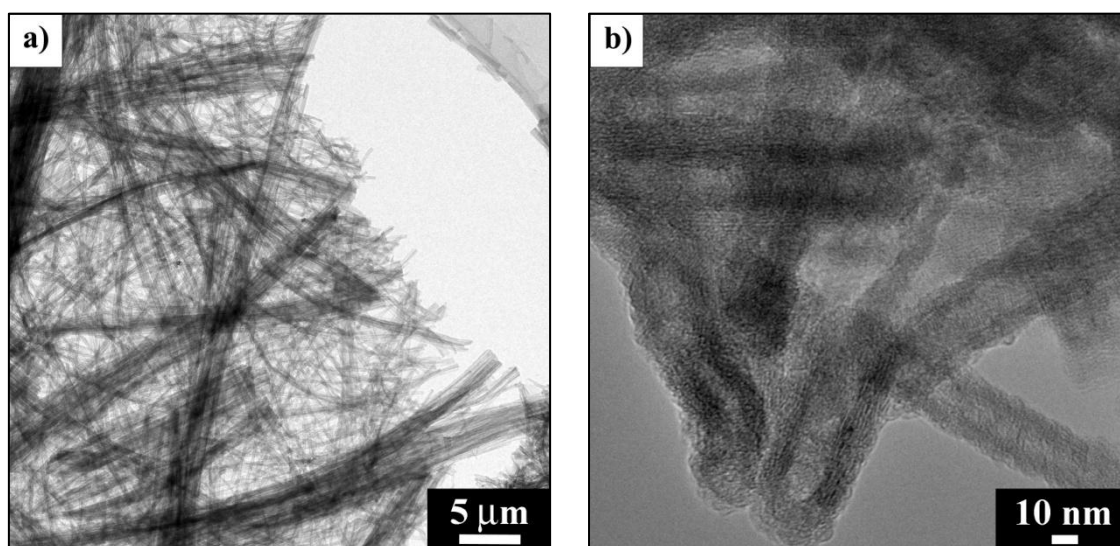
Slika 4.9. TEM mikrografije uzorka dobivenog reakcijom titanatnih nanocjevčica s APTMS u toluenu pri uvjetima refluksa (uzorak T-R). Umetak na slici d) prikazuje elektronsku difrakciju odabranog područja (SAED) struktura prikazanih na slici.



Slika 4.10. TEM mikrografije uzorka dobivenog reakcijom titanatnih nanocjevčica s APTMS u toluenu pri sobnoj temperaturi, nakon provedene azeotropne destilacije (uzorak T-A).



Slika 4.11. TEM mikrografija uzorka titanatnih nanocjevčica izuzetog neposredno nakon azeotropne destilacije u toluenu.



Slika 4.12. TEM mikrografije produkta dobivenog reakcijom titanatnih nanocjevčica s APTMS u diklormetanu pri sobnoj temperaturi.

Da bi se spriječila neželjena hidroliza i kondenzacija APTMS u otopini, te na taj način spriječilo onečišćenje silaniziranih titanatnih nanocjevčica poli(3-aminopropilsiloksanom), reakciju silaniziranja pokušalo se provesti nakon što je iz uzorka titanatnih nanocjevčica azeotropnom destilacijom uklonjena fizički vezana voda te pri blažim reakcijskim uvjetima, tj. pri sobnoj temperaturi (postupak SI-2). Morfologija dobivenog produkta (uzorak T-A) prikazana je na slici 4.10. U uzorku je uočena pojava gustih mrežastih nakupina koje se sastoje od nanocjevčica duljine 50–300 nm (slika 4.10.a) i izduženih agregata kod kojih je očito došlo do gubitka tubularne morfologije (slika 4.10.b), čemu u prilog govori i činjenica da spomenuti agregati mjestimice pokazuju izrazite deformacije (slika 4.10.b), nespojive s tubularnom strukturom. Pojedini agregati pokazuju nejednoliku širinu, pri čemu povećanje širine prati smanjenje kontrasta (slika 4.10.c). S obzirom na relativno nisku rezoluciju snimljenih mikrografija, opažene morfološke promjene nije moguće jednoznačno interpretirati, no čini se da njihov uzrok leži u djelomičnom ili potpunom razmotavanju slojeva nanoravnina od kojih se sastoje stijenke nanocjevčica. Za razliku od uzorka T-R, u uzorku T-A mikroskopijskom pretragom nije uočena pojava amorfnih kondenzacijskih produkata APTMS.

Da bi se ustanovilo je li djelomični gubitak tubularne morfologije titanatnih nanocjevčica kod uzoraka T-R i T-A posljedica reakcije nanocjevčica s APTMS ili je uzrokovan zagrijavanjem nanocjevčica u toluenu, titanatne nanocjevčice uravnotežene s atmosferom podvrgnute su azeotropnoj destilaciji u toluenu pri identičnim uvjetima kao kod postupka SI-2. Transmisijskom elektronskom mikroskopijom produkta izoliranog nakon azeotropne destilacije (slika 4.11.) utvrđeno je da su njegove morfološke značajke vrlo slične morfološkim značajkama uzorka T-A (slika 4.10.), uz značajan udio izduženih, zakrivljenih agregata homogenog kontrasta i bez naznaka nanotubularne morfologije. Očito je, stoga, da je do djelomičnog gubitka tubularne morfologije nanocjevčica kod uzorka T-A došlo prije no što su nanocjevčice podvrgnute reakciji s APTMS.

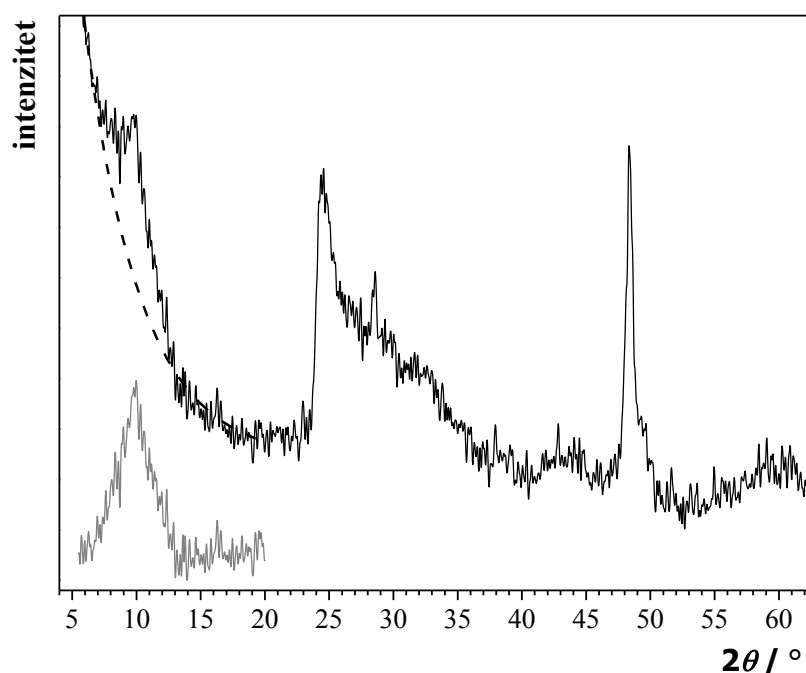
Rezultati opisani u prethodna tri odjeljka jasno pokazuju da je pri uobičajeno korištenim uvjetima silaniziranja s APTMS teško istovremeno postići faznu čistoću i očuvati nanotubularnu morfologiju produkta dobivenog reakcijom titanatnih nanocjevčica s APTMS. Ako se reakciji s APTMS podvrgnu titanatne nanocjevčice uravnotežene s atmosferom, u reakcijsku smjesu unosi se značajna količina vode, što u uvjetima refluksa u toluenu rezultira hidrolizom APTMS u masi otopine i njegovom kondenzacijom u zasebnu čvrstu fazu pa se

silaniziranjem dobiva fazno heterogeni produkt. Nastajanje siloksanskih kondenzacijskih produkata moguće je spriječiti uklanjanjem vlage iz titanatnih nanocjevčica azeotropnom destilacijom u toluenu, no pritom dolazi do djelomičnog gubitka tubularne morfologije uzorka. S obzirom da su titanatne nanocjevčice u protoniranom obliku termički nestabilne i da već pri temperaturama od 100 do 150 °C dolazi do njihove strukturne i morfološke promjene,^{193,220} može se pretpostaviti da su opisane morfološke promjene uočene kod uzorka T-A termički uvjetovane, tj. da su rezultat zagrijavanja nanocjevčica u toluenu pri temperaturi vrenja ($T_v(\text{toluen}) = 110\text{ °C}$) te da su vjerojatno potpomognute dehidratacijom nanocjevčica tijekom azeotropne destilacije. Slične morfološke promjene uočili su Du i suradnici²²¹ pri pokušaju modificiranja titanatnih nanocjevčica *n*-oktadeciltriklorsilanom u toluenu u uvjetima refluksa.

U nastavku istraživanja reakciju titanatnih nanocjevčica s APTMS pokušalo se provesti pri blažim reakcijskim uvjetima, pri sobnoj temperaturi u diklormetanu (postupak SI-3, uzorak TiNT-NH₂). Provođenjem reakcije pri sobnoj temperaturi pokušalo se očuvati tubularnu morfologiju titanatnih nanocjevčica te istovremeno spriječiti hidrolizu i kondenzaciju APTMS u otopini, dok je odabir diklormetana kao reakcijskog medija bio motiviran prvenstveno njegovim niskim vrelištem ($T_v(\text{CH}_2\text{Cl}_2) = 38\text{ °C}$), čime je omogućeno efikasno sušenje silaniziranih uzoraka pri relativno niskoj temperaturi (60 °C) kako bi se izbjegla eventualna dehidratacija silaniziranih nanocjevčica. Morfologija produkta dobivenog reakcijom titanatnih nanocjevčica s APTMS pri sobnoj temperaturi u diklormetanu (uzorak TiNT-NH₂) prikazana je na slici 4.12. Mikrografija prikazana na slici 4.12.a pokazuje da su morfološke karakteristike titanatnih nanocjevčica ostale očuvane i nakon reakcije s APTMS. Očuvanje nanotubularne morfologije naročito je dobro vidljivo na visokorezolucijskoj mikrografiji prikazanoj na slici 4.12.b, na kojoj se također može uočiti da tijekom silaniziranja dolazi do zatvaranja krajeva kod barem dijela nanocjevčica. Osim struktura koje morfološki nedvojbeno pripadaju titanatnim nanocjevčicama, mikroskopijskom pretragom u uzorku nisu primijećene nikakve druge strukture koje bi ukazivale na nastajanje kondenzacijskih produkata APTMS kao zasebne faze.

Očuvanje strukture titanatnih nanocjevčica kod uzorka TiNT-NH₂ potvrđeno je i rendgenskom difrakcijom (slika 4.13.). Dobiveni difraktogram gotovo je identičan difraktogramu nemodificiranih titanatnih nanocjevčica (slika 4.3.) pa se može zaključiti da tijekom reakcije titanatnih nanocjevčica s APTMS pri sobnoj temperaturi u diklormetanu

pored morfologije ostaje očuvana i kristalna struktura nanocjevčica. Značajno je primijetiti da položaj difrakcijskog maksimuma koji odgovara refleksiji s kristalnih ravnina (200) ostaje gotovo nepromijenjen ($2\theta = 9,9^\circ$) i nakon reakcije titanatnih nanocjevčica s APTMS. To ukazuje da tijekom reakcije s APTMS ne dolazi do interkaliranja APTMS između slojeva koji sačinjavaju stijenku nanocjevčica, što bi dovelo do povećanja njihova razmaka, niti do izlaska molekula vode interkaliranih između tih slojeva, zbog čega bi se razmak između slojeva smanjio.¹⁹¹



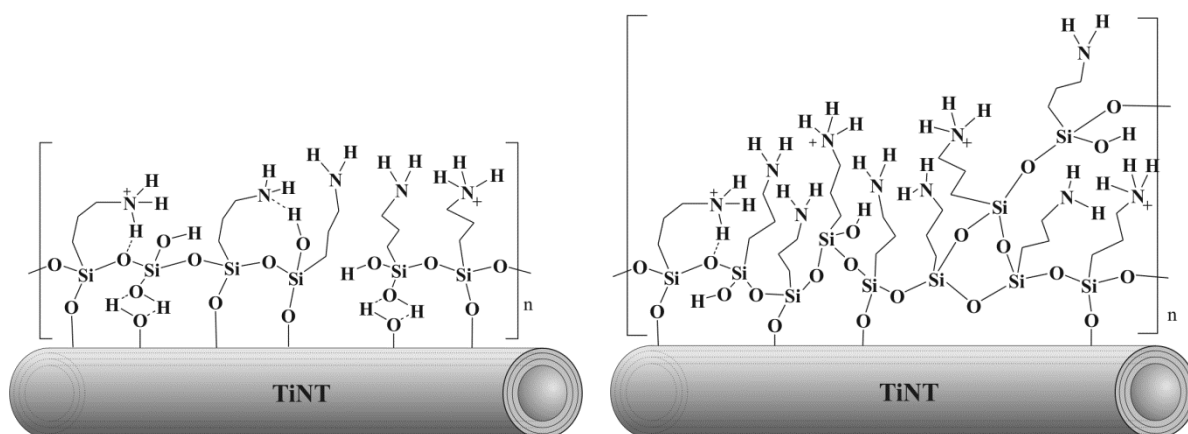
Slika 4.13. Rendgenski difraktogram titanatnih nanocjevčica modificiranih s APTMS u diklormetanu (uzorak TiNT-NH₂) uz vrijeme reakcije s APTMS od 180 minuta. Sivom bojom prikazan je korigirani difraktogram dobiven nakon oduzimanja strme bazne linije (isprekidana crta) u području kuteva $2\theta < 20^\circ$.

Da bi se u uzorcima opisanim u ovom poglavlju kvantitativno odredila količina vezanog APTMS, uzorci su podvrgnuti reakciji s ninhidrinom, nakon čega je spektrofotometrijski određena količina primarnih amino skupina u uzorku (pogl. 3.3.1.). Rezultati analiza prikazani su u tablici 4.5. Ako se izuzme uzorak T-R, za kojeg je mikroskopijom ustanovljeno da sadrži kondenzacijske produkte APTMS kao zasebnu fazu te je stoga u uzorku i očekivan povećan udio amino skupina, preostala dva uzorka pokazuju sličan sadržaj primarnih amino

skupina: $0,77 \text{ mmol g}^{-1}$ u slučaju titanatnih nanocjevčica silaniziranih nakon što je iz njih azeotropnom destilacijom uklonjena fizički vezana voda (uzorak T-A), te nešto više ($0,83 \text{ mmol g}^{-1}$) u slučaju titanatnih nanocjevčica silaniziranih u diklormetanu, bez prethodnog uklanjanja fizički vezane vode (uzorak TiNT-NH₂). S obzirom da u uzorcima T-A i TiNT-NH₂ mikroskopijskom pretragom nije uočena pojava kondenzacijskih produkata APTMS kao zasebne faze, analitički podaci o sadržaju primarnih amino skupina dobiveni za ta dva uzorka dopuštaju zaključak da je kod oba uzorka došlo do vezanja APTMS na površinu titanatnih nanostrukture.

Tablica 4.5. Sadržaj amino skupina u uzorcima silaniziranih titanatnih nanocjevčica ($N = 3$)

Uzorak	$n(\text{NH}_2)/m / \text{mmol g}^{-1}$
T-R	$2,02 \pm 0,04$
T-A	$0,77 \pm 0,05$
TiNT-NH ₂	$0,83 \pm 0,01$



Slika 4.14. Simboličan prikaz strukture uređenog (slika lijevo) i neuređenog (slika desno) siloksanškog sloja dobivenog vezanjem APTMS na titanatne nanocjevčice.

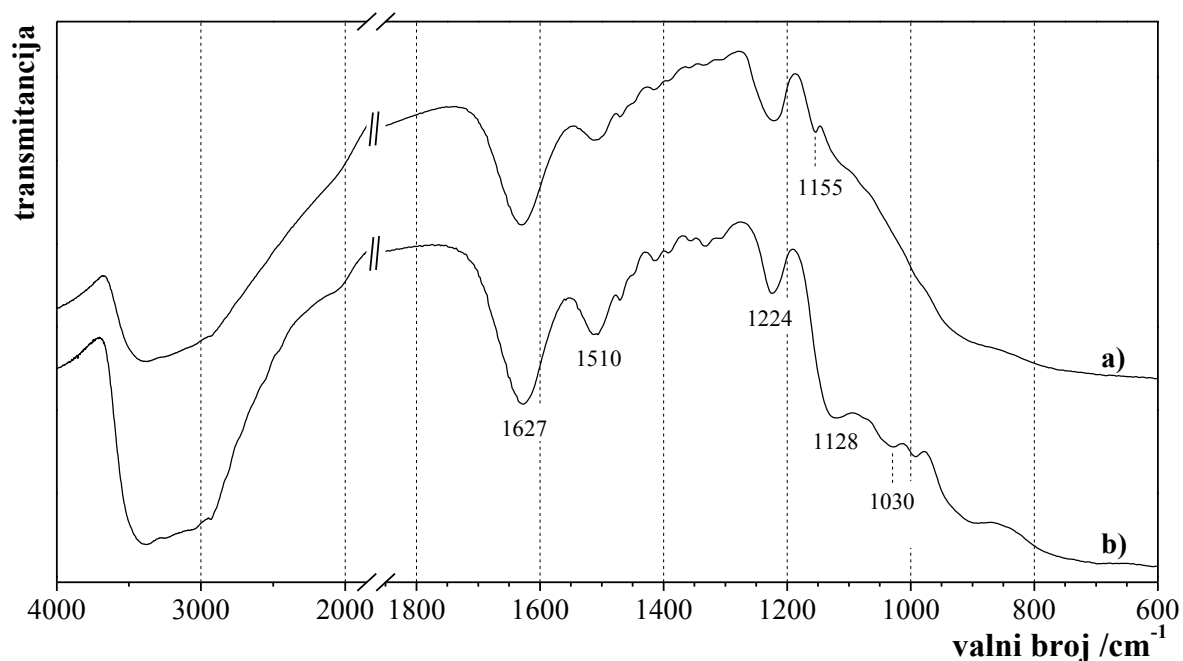
4.2.2. Strukturna karakterizacija slojeva površinski vezanog APTMS

Istraživanja opisana u prethodnom poglavlju pokazala su da se površinsko modificiranje titanatnih nanocjevčica s APTMS može provesti bez gubitka nanotubularne morfologije samo ako se silaniziranje provodi pri blagim reakcijskim uvjetima i bez prethodne dehidracije nanocjevčica. S obzirom da se u reakcijsku smjesu u tom slučaju unosi značajna količina vode, postavilo se pitanje u kojoj mjeri to utječe na strukturu sloja dobivenog vezanjem APTMS na površinu titanatnih nanocjevčica. Naime, kako je već spomenuto u uvodnom dijelu poglavlja 4.2., ovisno o sadržaju vode u reakcijskoj smjesi za silaniziranje, na površinu oksidnog materijala mogu se vezati monomerne jedinice hidroliziranog organosilana koje se potom mjestimično povezuju površinskom kondenzacijom, ili se na površinu vežu siloksanski oligomeri i polimeri nastali prethodnom hidrolizom i kondenzacijom organosilana u otopini. U skladu s tim, pretpostavljeno je da struktura površinskog sloja dobivenog vezanjem APTMS na titanatne nanocjevčice može varirati od relativno uređene, kako to predočava slika 4.14.a, do neuređene, karakterizirane prisustvom razgranatih oligomera i polimera APTMS (slika 4.14.b). Također, količina vode prisutna u reakcijskoj smjesi može utjecati i na stupanj protoniranja amino skupina vezanog APTMS, što je također predočeno na slici 4.14. S obzirom da je vezanje APTMS na površinu titanatnih nanocjevčica kod uzoraka T-A i TiNT-NH₂ provedeno pri reakcijskim uvjetima koji su se značajno razlikovali s obzirom na sadržaj vode u reakcijskoj smjesi, nastali površinski slojevi vezanog APTMS kod ta su dva uzorka karakterizirani infracrvenom i Ramanovom spektroskopijom kako bi se komparativnom analizom snimljenih spektara ustanovilo u kojoj se mjeri razlikuju njihove strukture.

FTIR spektri uzoraka TiNT-NH₂ i T-A prikazani su na slici 4.15., a asignacija opaženih vibracijskih vrpca dana je u tablici 4.6. Kao i kod nemodificiranih titanatnih nanocjevčica (pogl. 4.1.4.), na oba se spektra uočava intenzivna vibracijska vrpca uslijed savijanja H–O–H veza pri 1627 cm⁻¹ te široka vrpca uslijed istezanja O–H veza u području od 3600 do 2500 cm⁻¹. Na spektrima se uočava i veći broj slabih vrpca u području valnih brojeva od 1450 do 1300 cm⁻¹, koje se mogu pripisati deformacijskim vibracijama CH₂-skupina u aminopropilnom segmentu APTMS,²²² te vrpca srednjeg intenziteta pri 1224 cm⁻¹ uslijed simetričnog savijanja izvan ravnine CH₂-skupine vezane na atom Si.²²³ Na spektrima oba uzorka pojavljuje se i vibracijska vrpca pri 1510 cm⁻¹, koja odgovara simetričnom savijanju NH₃⁺-skupina²²⁴ i koja ukazuje da su amino skupine vezanog APTMS kod oba uzorka

djelomično ili u potpunosti protonirane. Eventualne vibracijske vrpce neprotonirane NH_2 -skupine (pri otprilike $3350\text{--}3450$ i 1630 cm^{-1})²²⁵ na FTIR spektrima uzoraka nije moguće opaziti zbog preklapanja s jakim vrpćama uslijed vibracija veza O-H i H-O-H .

Značajnije razlike u FTIR spektrima uzoraka T-A i TiNT-NH_2 uočavaju se u području valnih brojeva od 1200 do 1000 cm^{-1} . U navedenom području na FTIR spektru uzorka T-A pojavljuje se vrpca srednjeg intenziteta pri 1155 cm^{-1} i slaba vrpca pri 1128 cm^{-1} . Na spektru uzorka TiNT-NH_2 vrpca pri 1155 cm^{-1} nije uočljiva, vrpca pri 1128 cm^{-1} vrlo je intenzivna, a dodatno se uočava i slaba vrpca pri 1030 cm^{-1} . Sve tri vrpce odgovaraju vibracijama siloksanskih (Si-O-Si) veza, pri čemu je vrpca pri 1155 cm^{-1} karakteristična za vibracije asimetričnog istezanja veza Si-O-Si u linearnim oligomerima APTMS koji su slabo umreženi,²²⁶ vrpca pri 1128 cm^{-1} karakteristična je za vibracije istezanja Si-O-Si veza u dužim linearnim i razgranatim polisiloksanskim strukturama,²²⁷ a vrpca pri 1030 cm^{-1} za vibracije istezanja Si-O-Si veza u cikličkim APTMS tetramerima koji nastaju kondenzacijom APTMS u otopini.²²⁶



Slika 4.15. FTIR spektri uzoraka dobivenih reakcijom titanatnih nanocjevčica s APTMS u a) toluenu pri sobnoj temperaturi, nakon azeotropne destilacije (uzorak T-A) i b) diklormetanu pri sobnoj temperaturi (uzorak TiNT-NH_2). Spektri su pomaknuti duž y-osi radi bolje preglednosti.

Tablica 4.6. Assignacije karakterističnih vibracijskih vrpca u FTIR spektrima uzoraka dobivenih silaniziranjem titanatnih nanocjevčica s APTMS (prema ref. 222-227)

valni broj / cm^{-1} ^(a)	Assignacija
900-920	Ti–O–Si istezanje
1030	Si–O–Si istezanje (ciklički tetramer)
1128	Si–O–Si istezanje (duže linearne i razgranate polisiloksanske strukture)
1155	Si–O–Si asimetrično istezanje (slabo umrežene linearne siloksanske strukture)
1224	CH ₂ simetrično savijanje izvan ravnine (CH ₂ -skupine vezane na Si)
1510	NH ₃ ⁺ simetrično savijanje
1627 (s)	H–O–H savijanje
3200 (vb)	O–H istezanje

^(a)vb = vrlo široka vrpca, s = jako izražena vrpca, sh = rame.

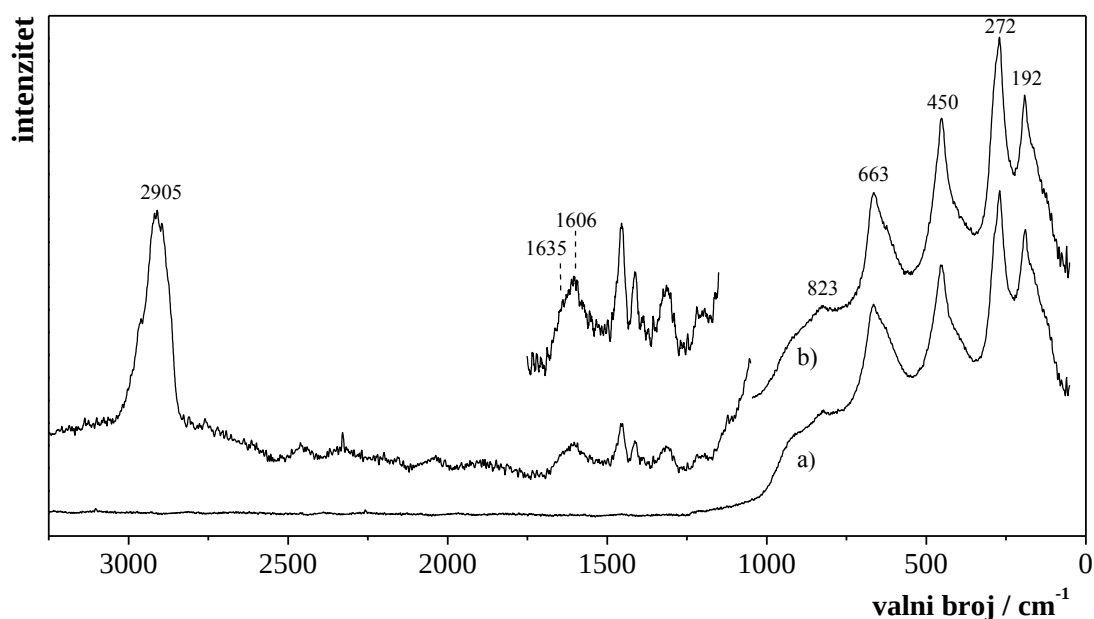
U području valnih brojeva manjih od 1000 cm^{-1} u FTIR spektrima silaniziranih uzoraka uočava se slabije definirana, široka vrpca pri otprilike $920\text{--}900 \text{ cm}^{-1}$. S obzirom da se u infracrvenim spektrima silaniziranih metalnih oksida u području valnih brojeva između 900 i 1000 cm^{-1} obično pojavljuju vibracijske vrpce uslijed istezanja veza Me–O–Si,²²³ ta je vrpca pripisana vibracijama istezanja Ti–O–Si veza nastalih kondenzacijom Si–OH skupina hidroliziranog APTMS i površinskih Ti–OH skupina titanatnih nanocjevčica. Pozicija te vrpce slična je poziciji vrpce uslijed vibracija istezanja Ti–O–Si veza kod APTMS vezanog na metalni titanij ($925\text{--}950 \text{ cm}^{-1}$),²²³ odnosno na rutil (920 cm^{-1}).²²⁸

Značajno je za primjetiti da se u području valnih brojeva od 1200 do 1000 cm^{-1} u FTIR spektrima uzoraka T-A i TiNT-NH₂ ne uočavaju vrpce koje bi se mogle pripisati vibracijama Si–OCH₃ skupina, a koje se u spektru čistog APTMS pojavljuju pri 1195 i 1092 cm^{-1} i vrlo su intenzivne. Izostanak tih vrpca ukazuje da je površinski vezan APTMS kod oba uzorka u potpunosti hidrolizirao, bez obzira na to je li reakcija titanatnih nanocjevčica s APTMS provedena u bezvodnim uvjetima, ili su titanatne nanocjevčice silaniziranju bile podvrgnute bez prethodne dehidratacije. Međutim, s obzirom na ranije opisane razlike u intenzitetima vrpca pri 1155 cm^{-1} i 1128 cm^{-1} u FTIR spektrima uzoraka T-A i TiNT-NH₂, može se zaključiti da se strukture površinskih siloksanskih slojeva tih uzoraka ipak razlikuju. U sloju površinski vezanog APTMS kod uzorka T-A dominiraju slabije umrežene linearne

siloksanske strukture (vibracijska vrpca pri 1155 cm^{-1}), dok je sloj površinski vezanog APTMS nastao silaniziranjem titanatnih nanocjevčica bez njihove prethodne dehidracije (uzorak TiNT-NH_2) značajno polimeriziraniji te u njemu dominiraju duže linearne i razgranate polisiloksanske strukture (vrpca pri 1128 cm^{-1}). U sloju površinski vezanog silana kod uzorka TiNT-NH_2 zastupljeni su i ciklički APTMS tetrameri (vrpca pri 1030 cm^{-1}), za čije postojanje kod uzorka T-A nema spektralnih naznaka. Takva struktura slojeva površinski vezanog APTMS kod uzoraka T-A i TiNT-NH_2 u skladu je s očekivanjima koja proizlaze iz udjela vode u reakcijskoj smjesi tijekom njihova silaniziranja, kako je opisano na početku ovog poglavlja.

Prisutnost vode tijekom silaniziranja utječe i na stupanj protoniranja amino skupina površinski vezanog APTMS. Kako bi se udjeli protoniranih amino skupina u uzorcima T-A i TiNT-NH_2 mogli kvantitativno usporediti, za oba uzorka izračunat je omjer intenziteta vrpce pri 1510 cm^{-1} i intenziteta vrpce pri 1224 cm^{-1} , I_{1510}/I_{1224} . S obzirom da se može pretpostaviti da je intenzitet vrpce pri 1224 cm^{-1} (pripisane deformacijskim vibracijama CH_2 -skupine vezane na atom silicija) proporcionalan količini vezanog APTMS, dobiveni omjer I_{1510}/I_{1224} zapravo proporcionalan je omjeru broja molekula vezanog APTMS u kojima su amino skupine protonirane i ukupnog broja molekula APTMS vezanih na površinu titanatnih nanostrukture u pojedinom uzorku. Za uzorak T-A izračunato je da vrijednost omjera I_{1510}/I_{1224} iznosi 0,37, a za uzorak TiNT-NH_2 0,68 pa se može zaključiti da je u uzorku TiNT-NH_2 , dobivenom reakcijom titanatnih nanocjevčica s APTMS bez prethodne dehidracije nanocjevčica, udio protoniranih amino skupina značajno veći no u uzorku T-A, dobivenom u bezvodnim uvjetima.

Zaključke iznesene u ovom i prethodnom poglavlju dodatno potvrđuju i rezultati dobiveni Ramanovom spektroskopijom. U Ramanovom spektru uzorka TiNT-NH_2 , prikazanom na slici 4.16., uočavaju se tri karakteristična područja: područje valnih brojeva od 3000 do 2800 cm^{-1} , u kojem se pojavljuju vibracijske vrpce uslijed istezanja C–H veza u metilenskim skupinama aminopropilnog segmenta, područje od 1700 do 1200 cm^{-1} , u kojem se pojavljuju vrpce povezane s deformacijama skupina CH_2 , NH_2 i NH_3^+ , te područje od 1000 do 100 cm^{-1} , karakteristično za vibracije titanatne rešetke (tablica 4.7.). Pozicije vibracijskih vrpca koje se u Ramanovom spektru uzorka TiNT-NH_2 pojavljuju u području valnih brojeva od 1000 do 100 cm^{-1} vrlo se dobro slažu s pozicijama vrpca u Ramanovom spektru nemodificiranih titana-



Slika 4.16. Ramanov spektar (a) nemodificiranih titanatnih nanocjevčica i (b) titanatnih nanocjevčica modificiranih s APTMS (uzorak TiNT-NH₂). Kao umetak prikazan je isječak iz spektra u području valnih brojeva od 1750 do 1150 cm⁻¹ uvećan po y-osi.

Tablica 4.7. Assignacije karakterističnih vibracijskih vrpca u Ramanovom spektru titanatnih nanocjevčica silaniziranih s APTMS pri sobnoj temperaturi (prema ref. 193,212-215,225)

valni broj / cm ⁻¹ (a)	Assignacija
192	Ti-O···M ⁺ savijanje (M ⁺ = Na ⁺ , H ⁺)
272, 450, 663	Ti-O-Ti savijanje (TiO ₆ oktaedri povezani bridovima)
823	Ti-O istezanje (Ti-O-H)
930 (sh)	Ti-O istezanje (Ti-O···Na ⁺)
1311	CH ₂ asimetrično savijanje izvan ravnine
1412, 1454	CH ₂ simetrično savijanje u ravnini
1606	NH ₂ simetrično savijanje u ravnini
1635 (sh)	NH ₃ ⁺ asimetrično savijanje
2905 (složena vrpca)	C-H istezanja (aminopropilni segment APTMS)

(a) b = široka vrpca; sh = rame

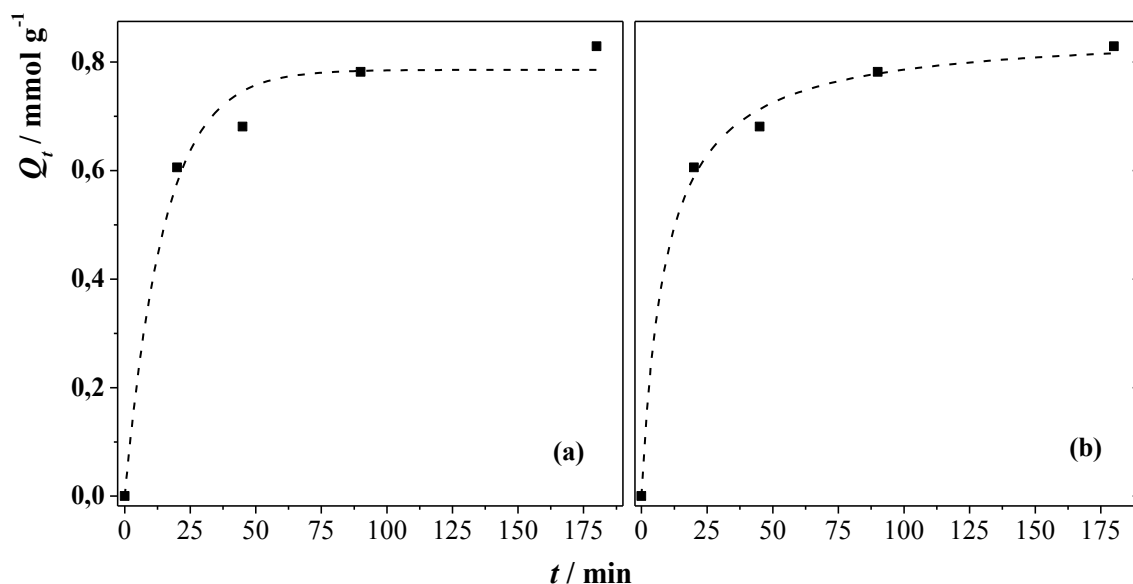
tnih nanocjevčica (tablica 4.3.), što dodatno potvrđuje prethodno iznesen zaključak o očuvanju kristalne strukture titanatnih nanocjevčica tijekom reakcije s APTMS pri sobnoj temperaturi. U području valnih brojeva karakterističnom za vibracije istezanja C–H veza u Ramanovom spektru uzorka TiNT-NH₂ uočava se strukturirana vrpca pri 2905 cm⁻¹. Iz slabo razlučenih maksimuma pri 2912 i 2897 cm⁻¹ te izbočine pri 2965 može se zaključiti da je spomenuta vrpca složene strukture, odn. da se sastoji od nekoliko pojedinačnih vibracijskih vrpce, koje se mogu pripisati simetričnim i asimetričnim vibracijama istezanja C–H veza u CH₂-skupinama aminopropilnog segmenta površinski vezanog APTMS.²²⁵ Na spektru se ne uočava vibracijska vrpca koja bi odgovarala istezanju C–H veza u metoksi-skupinama APTMS (a koja se u ramanskom spektru čistog APTMS pojavljuje kao oštra i intenzivna vrpca pri 2840 cm⁻¹), što još jednom potvrđuje zaključak o potpunoj hidrolizi molekula APTMS vezanih na površinu titanatnih nanocjevčica. U području valnih brojeva od 1700 do 1500 cm⁻¹ na spektru se uočava slaba i široka vrpca s maksimumom pri 1606 cm⁻¹ i ramenom pri otprilike 1635 cm⁻¹. Ta je vrpca očito složene strukture, pri čemu se vrpca pri manjim valnim brojevima može pripisati vibracijama asimetričnog savijanja neprotoniranih amino skupina površinski vezanog APTMS (1608 cm⁻¹),²²⁵ a vrpca pri višim valnim brojevima deformacijskim vibracijama protonirane amino skupine (1630–1635 cm⁻¹),²²⁹ što pokazuje da su amino skupine u sloju APTMS vezanom na površinu titanatnih nanocjevčica samo djelomično protonirane.

4.2.3. Kinetika vezanja APTMS na površinu titanatnih nanocjevčica

Kinetika reakcije APTMS s površinskim OH-skupinama titanatnih nanocjevčica istražena je na način da je uzorak titanatnih nanocjevčica uravnotežen s atmosferom podvrgnut reakciji s otopinom APTMS u diklormetanu ($\phi(\text{APTMS}) = 0,02$) pri sobnoj temperaturi tijekom 20, 45, 90, odn. 180 minuta (uzorci TiNT-NH₂-20, TiNT-NH₂-45, TiNT-NH₂-90 i TiNT-NH₂-180), nakon čega je reakcijom s ninhidrinom spektrofotometrijski određena količina primarnih amino skupina prisutnih na površini nanocjevčica. Rezultati analize (tablica 4.8.) pokazuju da se pri opisanim uvjetima na titanatne nanocjevčice veže između 0,61 i 0,83 mmol g⁻¹ APTMS te da se nakon 90 minuta reakcije količina vezanog APTMS gotovo i ne povećava, što ukazuje na zasićenje površine titanatnih nanocjevčica molekulama APTMS. Podaci prikazani

Tablica 4.8. Ovisnost količine APTMS vezanog na titanatne nanocjevčice, $Q_t = n(\text{NH}_2)/m(\text{TiNT-NH}_2)$, o vremenu trajanja reakcije s APTMS ($N = 3$)

Uzorak	t/min	$Q_t / \text{mmol g}^{-1}$
TiNT-NH ₂ -20	20	$0,606 \pm 0,006$
TiNT-NH ₂ -45	45	$0,681 \pm 0,011$
TiNT-NH ₂ -90	90	$0,782 \pm 0,009$
TiNT-NH ₂ -180	180	$0,829 \pm 0,008$



Slika 4.17. Regresijske krivulje dobivene usklađivanjem teorijskih izraza za kinetiku pseudo-prvog, odnosno pseudo-drugog reda (izrazi 4.9. i 4.10.) s eksperimentalnim podacima o količini APTMS vezanog na titanatne nanocjevčice u ovisnosti o vremenu trajanja reakcije s APTMS.

u tablici 4.8. testirani su u skladu s Lagergrenovim modelom kinetike pseudo-prvog reda:²³⁰

$$\frac{dQ_t}{dt} = k_1 \cdot (Q_{\max} - Q_t) \quad (4.7.)$$

odnosno modelom kinetike pseudo-drugog reda:²³¹

$$\frac{dQ_t}{dt} = k_2 \cdot (Q_{\max} - Q_t)^2 \quad (4.8.)$$

gdje Q_t i $Q_{\max}$ označavaju količinu APTMS vezanog na određenu masu titanatnih nanocjevčica u vremenu t i maksimalnu količinu APTMS koju je pri danim uvjetima moguće vezati na površinu titanatnih nanocjevčica, a k_1 i k_2 su konstante brzine reakcije pseudo-prvog i pseudo-drugog reda. Integriranjem izraza (4.7.) i (4.8.) uz početne uvjete $t = 0$ i $Q_t = 0$, odn. konačne uvjete t i Q_t te preuređivanjem, dobiju se integralni izrazi:

$$Q_t = Q_{\max} \cdot [1 - \exp(-k_1 \cdot t)] \quad (4.9.)$$

$$Q_t = \frac{t}{\frac{1}{k_2 \cdot Q_{\max}^2} + \frac{t}{Q_{\max}}} \quad (4.10.)$$

Vrijednosti kinetičkih parametara k_1 , k_2 i Q_t izračunati su usklađivanjem izraza (4.9.) i (4.10.) s eksperimentalnim podacima o brzini vezanja APTMS na titanatne nanocjevčice (tablica 4.8.) nelinearnom regresijom. Dobivene regresijske krivulje prikazane su na slici 4.17., a regresijske vrijednosti kinetičkih parametara u tablici 4.9. Kako je sa slike 4.17. jasno vidljivo, eksperimentalni podaci mogu se vrlo dobro opisati izrazom (4.10.), dok je slaganje eksperimentalnih podataka s izrazom (4.9.) znatno lošije. Može se zaključiti da se reakcija vezanja APTMS na površinu titanatnih nanocjevčica koje sadrže ravnotežnu količinu fizički vezane vode zadovoljavajuće može opisati kinetikom pseudo-drugog reda, pri čemu se zasićenje^{f)} površine nanocjevčica s APTMS postiže pri količini vezanog APTMS od 0,86 mmol g⁻¹.

Tablica 4.9. Regresijske vrijednosti kinetičkih parametara k_1 , k_2 i $Q_{\max}$ za reakciju titanatnih nanocjevčica s APTMS uz pretpostavku kinetike pseudo-prvog, odnosno pseudo-drugog reda (prema izrazima 4.9. i 4.10.)

Parametar	Kinetika pseudo-prvog reda	Kinetika pseudo-drugog reda
k_1 / min^{-1}	$0,07 \pm 0,01$	---
$k_2 / \text{g mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$	---	$0,13 \pm 0,02$
$Q_{\max} / \text{mmol g}^{-1}$	$0,79 \pm 0,03$	$0,86 \pm 0,02$

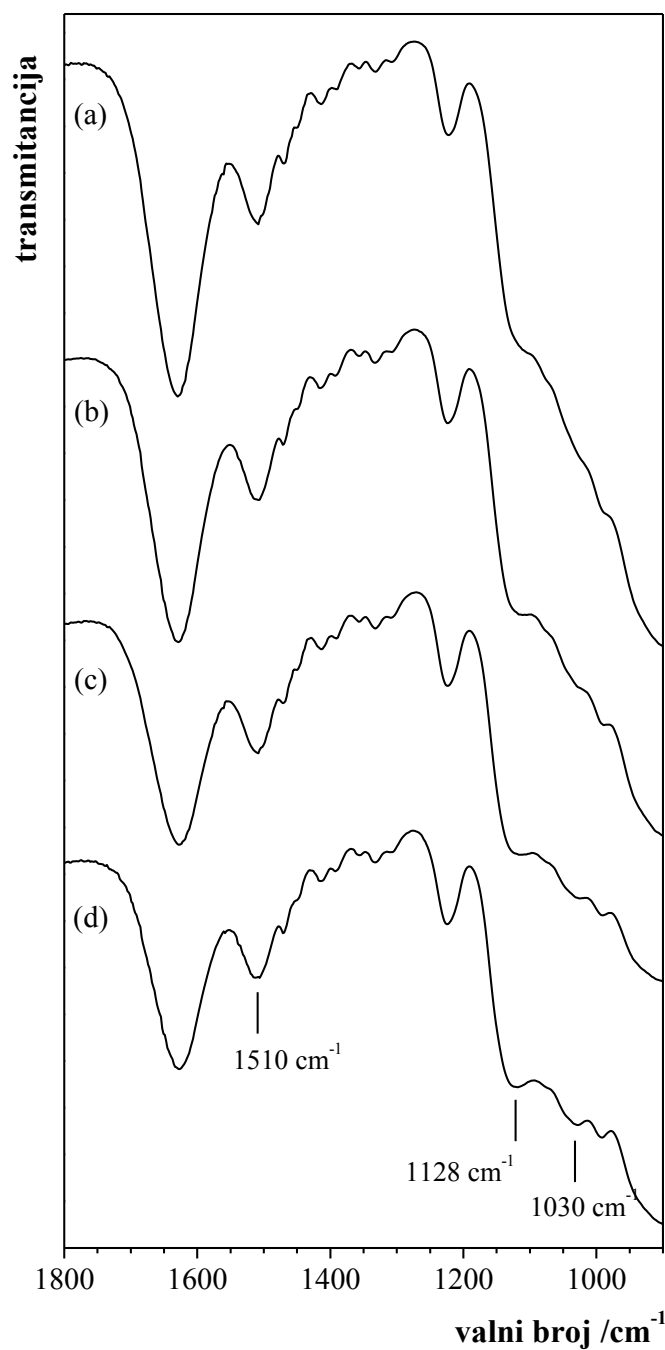
^{f)} Može se govoriti o zasićenju površine, s obzirom da su eksperimenti opisani u ovom poglavlju provedeni u uvjetima velikog suviška APTMS u otopini te da su rezultati provedenih istraživanja pokazali da tijekom reakcije titanatnih nanocjevčica s APTMS dolazi do ireverzibilnog vezanja APTMS na površinu nanocjevčica.

Iznenadujuće, pri opisanim je uvjetima reakcija vezanja APTMS na površinu titanatnih nanocjevčica vrlo brza, kako to zorno ilustrira vrijeme polureakcije (vrijeme pri kojem se na površinu titanatnih nanocjevčica veže upravo pola od maksimalno moguće količine APTMS, $t_{0,5} = (k_2 \cdot Q_{\max})^{-1}$), za koje se na temelju podataka iz tablice 4.9. može izračunati da iznosi $t_{0,5} = 8,9$ min. Brzina vezanja APTMS na druge oksidne materijale višestruko je sporija i do zasićenja površine vezanim silanom tipično dolazi tek nakon što se reakcija provodi nekoliko sati pri povišenoj temperaturi.²¹⁷ Povećana reaktivnost titanatnih nanocjevčica prema reakciji s APTMS može se objasniti relativno velikim sadržajem vode u nanocjevčicama te izraženom Brønstedovom kiselosti površinskih OH-skupina.^{194,232} Porastom udjela vode u reakcijskom mediju brzina hidrolize APTMS (jednadžba 4.4.) značajno raste, a dodatno se ubrzava u prisutnosti kiseline kao katalizatora,²¹⁷ što rezultira relativno visokom koncentracijom silanola uz površinu nanocjevčica. Zbog toga raste i brzina vezanja silanola na površinu nanocjevčica, ali povećava se i brzina kondenzacije silanola u složenije oligomerne ili polimerne siloksanske strukture, čime se može objasniti veća neuređenost sloja površinski vezanog APTMS kod uzorka TiNT-NH₂ u usporedbi s uzorkom T-A, na što ukazuju rezultati prikazani u prethodnom poglavlju.

4.2.4. Utjecaj vremena trajanja reakcije s APTMS i količine APTMS vezanog na površinu titanatnih nanocjevčica na strukturu površinskog polisiloksanskog sloja

Da bi se utvrdilo kako vrijeme trajanja reakcije titanatnih nanocjevčica s APTMS i količina APTMS vezanog na površinu titanatnih nanocjevčica utječu na strukturu površinskog siloksanskog sloja, snimljeni su FTIR spektri uzoraka opisanih u prethodnom poglavlju (uzorci TiNT-NH₂-20, TiNT-NH₂-45, TiNT-NH₂-90 i TiNT-NH₂-180) te je analizirano kako se s produljenjem vremena reakcije, odnosno povećanjem količine površinski vezanog APTMS na snimljenim spektrima mijenja intenzitet vibracijske vrpce pripisane protoniranim amino skupinama (vrpca pri 1510 cm⁻¹) te intenziteti vrpce pripisanih vibracijama Si–O–Si veza u linearnim ili razgranatim polimernim siloksanskim strukturama (vrpca pri 1128 cm⁻¹), odn. površinski vezanom APTMS tetrameru (vrpca pri 1030 cm⁻¹). Da bi se intenziteti spomenutih vrpce mogli uspoređivati, snimljeni FTIR spektri normalizirani su na jedinični intenzitet vrpce pri 1224 cm⁻¹ (pripisane vibracijama CH₂-skupine vezane na atom silicija,

pogl. 4.2.2.), čime je postignuto da intenziteti ostalih vrpca u spektru reflektiraju udio pojedine skupine, odn. strukture u sloju molekula APTMS vezanih na površinu titanatnih nanocjevčica.



Slika 4.18. Normalizirani FTIR spektri uzoraka: a) TiNT-NH₂-20, b) TiNT-NH₂-45, c) TiNT-NH₂-90 i d) TiNT-NH₂-180.

Tablica 4.10. Ovisnost normaliziranih intenziteta vibracijskih vrpce pri 1510, 1128 i 1030 cm^{-1} o vremenu trajanja reakcije titanatnih nanocjevčica s APTMS, odnosno o količini APTMS vezanog na površinu nanocjevčica (Q_t)

Uzorak	t / min	$Q_t / \text{mmol g}^{-1}$	I_{1510} / I_{1224} (NH_3^+)	I_{1128} / I_{1224} (APTMS polimer)	I_{1030} / I_{1224} (APTMS tetramer)
TiNT-NH ₂ -20	20	0,606	0,936	3,57	0,088
TiNT-NH ₂ -45	45	0,681	0,831	3,37	0,109
TiNT-NH ₂ -90	90	0,782	0,734	3,05	0,120
TiNT-NH ₂ -180	180	0,829	0,682	2,99	0,158

Na normaliziranim spektrima (slika 4.18.) uočava se da s porastom vremena trajanja reakcije titanatnih nanocjevčica s APTMS intenzitet vibracijske vrpce pri 1128 cm^{-1} lagano opada, a intenzitet vrpce pri 1030 cm^{-1} raste (tablica 4.10.), odnosno da u sloju molekula APTMS vezanih na površinu titanatnih nanocjevčica opada udio kondenziranih, polimernih siloksanskih struktura, a raste udio površinski vezanih APTMS tetramera. Smanjenje intenziteta s produljenjem vremena trajanja reakcije pokazuje i vrpca pri 1510 cm^{-1} (tablica 4.10.) pripisana vibracijama NH_3^+ -skupina, pa proizlazi da pri duljem vremenu trajanja reakcije APTMS s titanatnim nanocjevčicama u sloju površinski vezanih molekula APTMS opada udio molekula s protoniranom NH_2 -skupinom. Takvo ponašanje može se objasniti uz pretpostavku da neuređene polimerne siloksanske strukture nastaju hidrolizom i kondenzacijom APTMS uz površinu titanatnih nanocjevčica, koja je vrlo brza zbog prisutnosti površinski adsorbirane vode i kiselih površinskih OH-skupina. Napredovanjem reakcije vezanja APTMS na površinu titanatnih nanocjevčica smanjuje se broj kiselih površinskih OH-skupina, čime se ujedno smanjuje i brzina hidrolize, odn. kondenzacije APTMS uz površinu nanocjevčica, a time i brzina nastajanja siloksanskog površinskog sloja (slika 4.17.). Smanjenjem brzine nastajanja i vezanja polimernih siloksanskih struktura, konkurentna reakcija postaje vezanje APTMS tetramera nastalih hidrolizom i kondenzacijom APTMS u masi otopine, zbog čega udio APTMS tetramera u površinskom siloksanskom sloju raste, a relativni udio polimernih siloksanskih struktura opada (tablica 4.10.). Razumno je pretpostaviti i da se smanjenjem broja kiselih površinskih skupina smanjuje i udio protoniranih amino skupina u nastalom površinskom siloksanskom sloju.

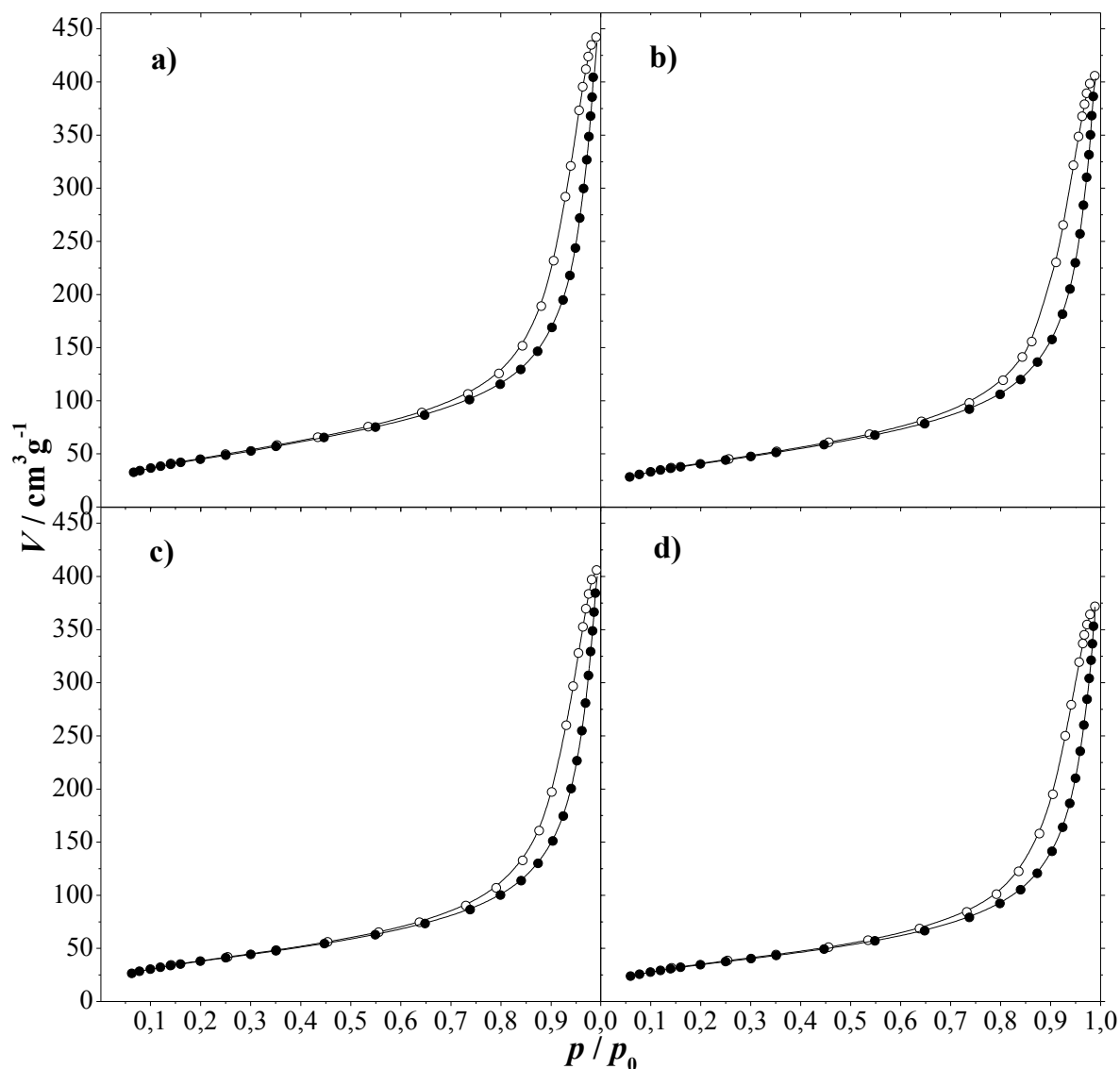
4.2.5. Utjecaj vremena trajanja reakcije s APTMS na specifičnu površinu i poroznost silaniziranih nanocjevčica

Specifična površina uzoraka TiNT-NH₂-20, TiNT-NH₂-45, TiNT-NH₂-90 i TiNT-NH₂-180 opisanih u poglavlju 4.2.3. određena je mjerenjem adsorpcijsko-desorpcijskih izoterma dušika pri 77 K uz primjenu BET modela adsorpcije. Dobivene adsorpcijsko-desorpcijske izoterme, prikazane na slici 4.19., pripadaju tipu IV prema klasifikaciji IUPAC-a i pokazuju histerezu tipa H3, pa se može zaključiti da titanatne nanocjevčice zadržavaju mezoporoznu strukturu i nakon silaniziranja s APTMS. Specifična površina i ukupni specifični volumen pora uzoraka silaniziranih titanatnih nanocjevčica, izračunati na način opisan u pogl. 4.1.3., prikazani su u tablici 4.11. Ako se ti podaci usporede s analognim vrijednostima za nemodificirane titanatne nanocjevčice ($S_{\text{BET}} = 267,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ i $V_p = 0,90 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, pogl. 4.1.3.), uočava se da se tijekom prvih 20 minuta reakcije s APTMS specifična površina nanocjevčica smanjuje za otprilike $100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, a ukupni specifični volumen pora za $0,22 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Daljnje smanjenje specifične površine i specifičnog volumena pora pri duljim vremenima reakcije s APTMS značajno je manje, kako je vidljivo iz činjenice da se produljenjem vremena silaniziranja sa 20 na 180 minuta specifična površina i ukupan specifični volumen pora silaniziranih nanocjevčica smanjuju samo za dodatnih $37,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, odnosno $0,10 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$.

Iz diferencijalne raspodjele volumena pora silaniziranih titanatnih nanocjevčica, prikazanih na slici 4.20., vidljivo je da tijekom prvih 20 minuta reakcije s APTMS dolazi do skoro potpunog iščeznuća pora s promjerom manjim od 5 nm, što indicira da već pri relativno kratkim vremenima reakcije titanatnih nanocjevčica s APTMS dolazi do gotovo potpunog začepljenja lumena nanocjevčica polimeriziranim APTMS, kako je i opaženo na visokorezolucijskim TEM mikrografijama silaniziranih titanatnih nanocjevčica (slika 4.12.b).

Tablica 4.11. Ovisnost specifične površine i specifičnog volumena pora titanatnih nanocjevčica silaniziranih s APTMS o vremenu trajanja reakcije s APTMS.

Uzorak	t / min	$S_{\text{BET}} / \text{m}^2 \text{ g}^{-1}$	$V_p / \text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$
TiNT-NH ₂ -20	20	168,8	0,68
TiNT-NH ₂ -45	45	153,0	0,63
TiNT-NH ₂ -90	90	143,6	0,61
TiNT-NH ₂ -180	180	131,3	0,58



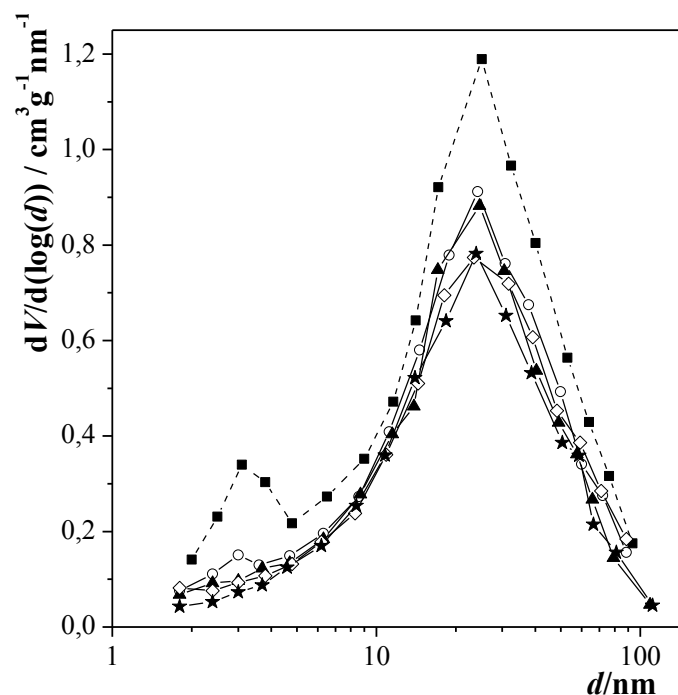
Slika 4.19. Izoterme adsorpcije i desorpcije dušika ($T = 77\text{ K}$) na titanatne nanocjevčice modificirane s APTMS. Vrijeme trajanja reakcije s APTMS: (a) 20 min, (b) 45 min, (c) 90 min i (d) 180 min.

S obzirom da se omjer specifičnih površina silaniziranih titanatnih nanocjevčica dobivenih nakon 20 minuta reakcije s APTMS i nemodificiranih titanatnih nanocjevčica ($168,8\text{ m}^2\text{ g}^{-1} : 267,5\text{ m}^2\text{ g}^{-1} = 2 : 3,17$) vrlo dobro slaže s omjerom vanjske i ukupne površine titanatnih nanocjevčica, koji je na temelju podataka o prosječnom vanjskom i unutarnjem promjeru nanocjevčica od 10 i 5 nm (pogl. 4.1.1.) procijenjen da iznosi 2:3, može se zaključiti da je začepljivanje lumena nanocjevčica polimeriziranim APTMS primarni razlog

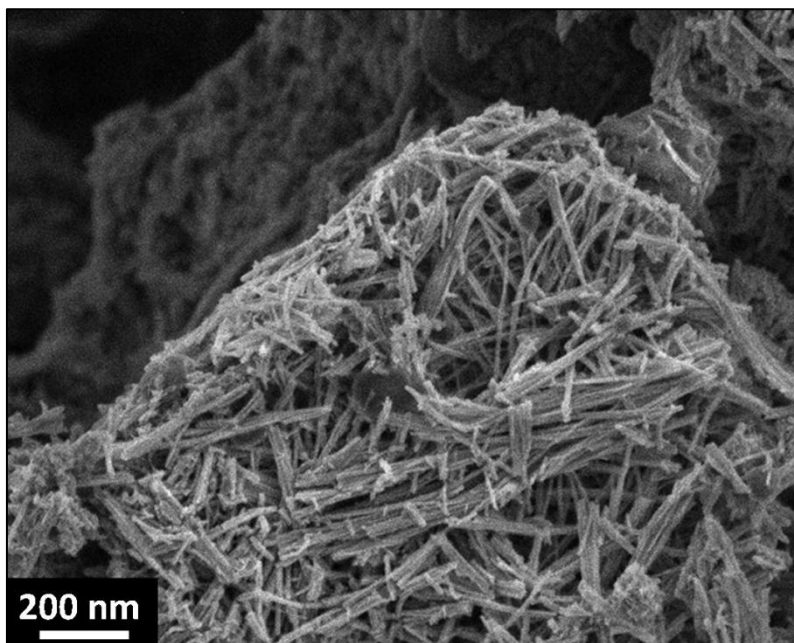
velikom smanjenju specifične površine titanatnih nanocjevčica pri kraćim vremenima silaniziranja, te ujedno i glavni razlog smanjenju specifične površine nanocjevčica tijekom silaniziranja uopće. Izgleda da je začepljivanje lumena nanocjevčica polimeriziranim APTMS ujedno i glavni razlog smanjenja volumena pora tijekom prvih 20 minuta reakcije titanatnih nanocjevčica s APTMS: specifični volumen lumena nemodificiranih titanatnih nanocjevčica iznosi $0,18 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (pogl. 4.1.3.), a smanjenje specifičnog volumena pora opaženo tijekom prvih 20 minuta silaniziranja nanocjevčica iznosi $0,22 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Do smanjenja specifičnog volumena pora kod silaniziranih titanatnih nanocjevčica dolazi i zbog smanjenja volumena pora u aglomeratima koje u praškastom uzorku titanatnih nanocjevčica formiraju snopovi nanocjevčica, za koji je u pogl. 4.1.3. pokazano da ukupnom specifičnom volumenu nemodificiranih titanatnih nanocjevčica doprinosi s otprilike 80 %. Potvrdu tom zaključku daju krivulje diferencijalne raspodjele volumena pora silaniziranih nanocjevčica (slika 4.20.), na kojima je jasno uočljivo smanjenje maksimuma pri 25 nm, koji odgovara porama između snopova nanocjevčica. Usporedbom SEM mikrografije silaniziranih titanatnih nanocjevčica (slika 4.21.) sa SEM mikrografijom nemodificiranih titanatnih nanocjevčica (slika 4.2.) jasno se uočava da uzrok opisanom smanjenju specifičnog volumena pora kod silaniziranih titanatnih nanocjevčica leži u različitom načinu pakiranja snopova nanocjevčica u veće aggregate. Kao najvjerojatniji razlog promjene u načinu pakiranja snopova nanocjevčica nameće se izrazita razlika u njihovoj duljini, koja kod nemodificiranih nanocjevčica iznosi i do desetak mikrometara (slika 4.2.a), dok su kod silaniziranih nanocjevčica snopovi znatno kraći, najčešće kraći od $1 \text{ }\mu\text{m}$ (slika 4.21.), najvjerojatnije zbog mehaničkog loma nanocjevčica uslijed intenzivnog miješanja reakcijske smjese tijekom silaniziranja.

4.2.6. Termogravimetrijska i diferencijalna termička analiza titanatnih nanocjevčica silaniziranih s APTMS

Da bi se istražila stabilnost sloja APTMS vezanog na površinu titanatnih nanocjevčica, uzorak titanatnih nanocjevčica silaniziranih s APTMS pri sobnoj temperaturi u diklormetanu (uzorak TiNT-NH₂-180) podvrgnut je termogravimetrijskoj i diferencijalnoj termičkoj analizi u području temperatura od 25 do 600 °C, u struji zraka. Dobivena termogravimetrijska krivulja (TG) i krivulja diferencijalne termičke analize (DTA) prikazane su na slici 4.22. Na DTA krivulji uočavaju se dva slabije izražena endotermna minimuma u području od sobne



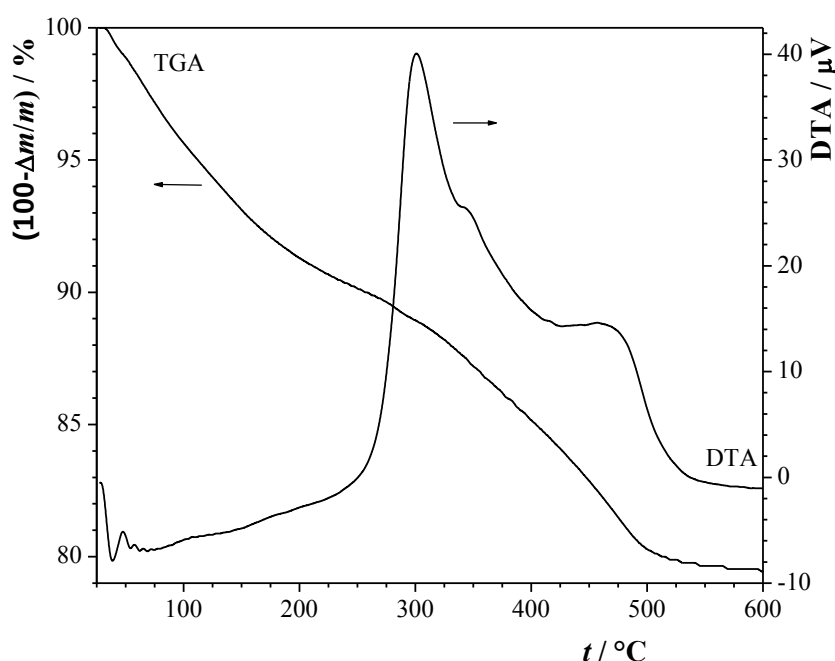
Slika 4.20. Ovisnost raspodjele veličina pora titanatnih nanocjevčica modificiranih s APTMS o vremenu trajanja reakcije s APTMS: (○) 20 min, (▲) 45 min, (○) 90 min i (★) 180 min. Usporedbe radi, isprekidanom crtom prikazana je raspodjela veličina pora nemodificiranih titanatnih nanocjevčica.



Slika 4.21. SEM mikrografija titanatnih nanocjevčica modificiranih s APTMS.

temperature do 120 °C, odnosno od 120 do 250 °C, kojima na termogravimetrijskoj krivulji odgovaraju relativne promjene mase ($\Delta m/m_0$) od 5,4 %, odnosno 4,4 % (tablica 4.12.).

Po analogiji s termičkim procesima koji se u identičnom temperaturnom području odvijaju kod nemodificiranih titanatnih nanocjevčica (pogl. 4.1.5.), navedene promjene mase mogu se pripisati izlasku fizički vezane vode iz silaniziranih titanatnih nanocjevčica (proces u području temperatura do 120 °C), odnosno gubitku strukturne vode (proces u području temperatura iznad 120 °C). U području temperatura od 250 do 550 °C na DTA krivulji uzorka pojavljuju se tri izrazita, preklopljena egzotermna maksimuma, koji se mogu pripisati izgaranju aminopropilnog segmenta molekula APTMS vezanih na površinu titanatnih nanocjevčica. Tijekom odvijanja tog egzoternog procesa masa uzorka smanjuje se za dodatnih 10,4 %, nakon čega se daljnjim zagrijavanjem više ne mijenja. Treba napomenuti da u području temperatura od 25 do 250 °C na TG i DTA krivulji uzorka TiNT-NH₂-180 nije uočena pojava endoternog procesa koji bi se mogao povezati s otpuštanjem s površine titanatnih nanocjevčica molekula labilno vezanog (fizički adsorbiranog) APTMS, što dodatno potvrđuje pretpostavku da su molekule APTMS na površinu titanatnih nanocjevčica vezane kovalentno.



Slika 4.22. Termogravimetrijska krivulja (TG) i krivulja diferencijalne termičke analize (DTA) titanatnih nanocjevčica modificiranih s APTMS, dobivenih uz vrijeme trajanja reakcije s APTMS od 180 minuta.

Tablica 4.12. Temperaturni intervali u kojima se odvijaju pojedini endotermni procesi tijekom zagrijavanja i dehidracije titanatnih nanocjevčica s površinski vezanim APTMS (uzorak TiNT-NH₂-180) i pripadajuće relativne promjene mase ($\Delta m/m_0$).

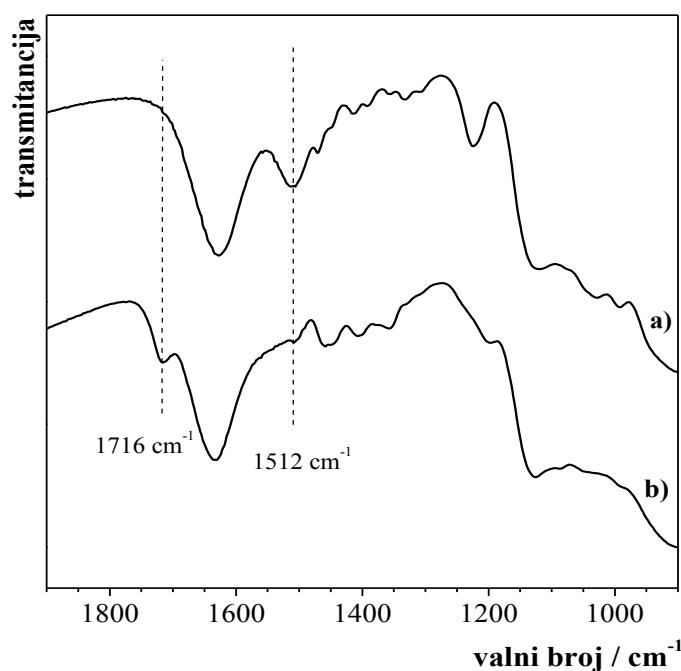
temperaturni interval / °C	$\Delta m/m_0$ / %
25 - 120	-5,4
120 - 250	-4,4
250 - 550	-10,4

Kvantitativna interpretacija termogravimetrijskih podatka o smanjenju mase uzorka TiNT-NH₂-180 tijekom njegova zagrijavanja otežana je zbog činjenice da je lumen silaniziranih titanatnih nanocjevčica začepjen polimeriziranim APTMS (kako je to pokazano u prethodnom poglavlju) pa voda iz lumena nanocjevčica može ispariti (i time dovesti do smanjenja mase uzorka) tek nakon raspada nanocjevčica. Pored toga, u poglavlju 4.1.5. pokazano je da do otpuštanja strukturne vode iz titanatnih nanocjevčica i njihove fazne pretvorbe u TiO₂ dolazi u relativno širokom području temperatura, od 120 do 465 °C. To se područje dobrim dijelom preklapa s temperaturnim područjem u kojem dolazi do izgaranja aminopropilnog segmenta molekula APTMS vezanih na površinu titanatnih nanocjevčica (250–550 °C), pa je smanjenje mase uzorka TiNT-NH₂-180 u području temperatura od 250 do 465 °C rezultat istovremenog odvijanja oba spomenuta procesa. Stoga je jasno da termogravimetrijske podatke prikazane u tablici 4.12. treba interpretirati krajnje oprezno. Ako se pretpostavi da je pri sobnoj temperaturi ravnotežni udio fizički vezane vode u uzorku silaniziranih titanatnih nanocjevčica jednak ravnotežnom udjelu fizički vezane vode u nemodificiranim titanatnim nanocjevčicama, te da je fazna pretvorba tijekom dehidratizacije silaniziranih titanatnih nanocjevčica jednaka onoj kod nemodificiranih titanatnih nanocjevčica, tada proizlazi da ukupnom gubitku mase tijekom zagrijavanja uzorka TiNT-NH₂-180 do 600 °C ($\Delta m/m_0 = 20,2$ %) isparavanje fizički vezane vode i oslobađanje strukturno vezane vode doprinose s vrijednošću $\Delta m/m_0 = 15,1$ % (pogl. 4.1.5.), odnosno da gubitak mase uzorka uslijed izgaranja aminopropilnog segmenta površinski vezanih molekula APTMS iznosi $\Delta m/m_0 = 5,1$ %. Uzimajući u obzir da molarna masa aminopropilnog segmenta iznosi 58 g mol⁻¹, vrijednost $\Delta m/m_0 = 5,1$ % odgovara množini aminopropilnih

skupina od 0,879 mmol po jednom gramu silaniziranih titanatnih nanocjevčica, što se dobro slaže s vrijednošću od 0,829 mmol g⁻¹, dobivenom analizom površinskih NH₂-skupina u uzorku TiNT-NH₂-180.

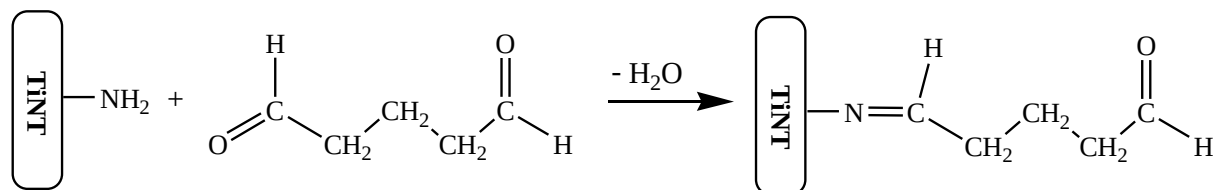
4.2.7. Reaktivnost površinskih amino skupina titanatnih nanocjevčica silaniziranih s APTMS

S obzirom da je silaniziranje titanatnih nanocjevčica s APTMS bilo provedeno s ciljem uvođenja NH₂-skupina na površinu nanocjevčica u svrhu njihova daljnjeg modificiranja (npr. kovalentnog vezanja enzima), u okviru karakterizacije silaniziranih nanocjevčica istražena je i reaktivnost amino skupina površinski vezanog APTMS, odn. njihova raspoloživost za daljnje kemijske reakcije. U tu su svrhu silanizirane titanatne nanocjevčice (uzorak TiNT-NH₂-180) podvrgnute reakciji s vodenom otopinom glutaraldehida ($w(\text{glutaraldehyd}) = 0,02$) pri pH 6,0 tijekom 15 minuta, nakon čega su nanocjevčice isprane i osušene te je snimljen njihov infracrveni spektar. Usporedbom FTIR spektara uzorka TiNT-NH₂-180 snimljenih prije reakcije s glutaraldehydom i nakon reakcije (slika 4.23.) uočava se da nakon reakcije s glutaraldehydom vrpca pri 1512 cm⁻¹ pripisana simetričnom savijanju NH₃⁺-skupina gotovo u potpunosti iščezava iz spektra, te da se u spektru pojavljuje nova vrpca pri 1716 cm⁻¹, karakteristična za C=O istezanje u aldehidnoj skupini.



Slika 4.23. FTIR spektri uzorka TiNT-NH₂ prije (a) i nakon reakcije s glutaraldehydom (b).

Opisane spektralne promjene odgovaraju očekivanom ishodu kemijske reakcije između titanatnih nanocjevčica silaniziranih s APTMS i glutaraldehida, u kojoj površinske NH_2 -skupine silaniziranih titanatnih nanocjevčica reagiraju s aldehidnom skupinom glutaraldehida uz nastajanje imina:



pri čemu jedna aldehidna skupina glutaraldehida ostaje slobodna. Činjenica da tijekom 15 minuta reakcije s glutaraldehydom dolazi do gotovo potpunog nestanka vibracijske vrpce pri 1510 cm^{-1} pokazuje da su površinske amino skupine titanatnih nanocjevčica silaniziranih s APTMS lako dostupne drugim molekulama te da lako stupaju u kemijske reakcije.

4.3. Elektrokatalitička svojstva površinski modificiranih titanatnih nanocjevčica i njihova primjena u amperometrijskim senzorima

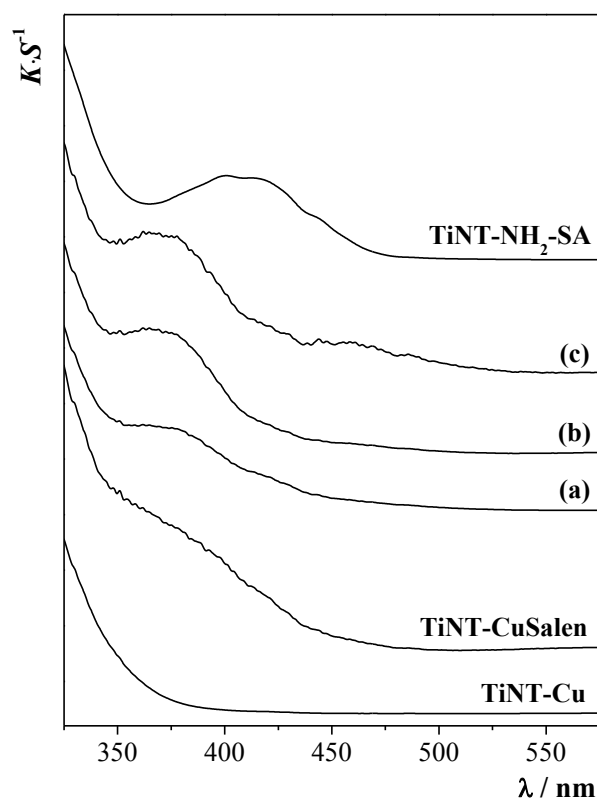
U poglavlju 4.2. pokazano je da su površinske OH-skupine titanatnih nanocjevčica vrlo reaktivne te da lako i brzo reagiraju s APTMS, pri čemu na površini nanocjevčica nastaje sloj sastavljen od oligomernih i polimernih siloksanskih jedinica s velikom gustoćom amino skupina lako dostupnih za daljnje reakcije. Pokazano je također da je silaniziranje titanatnih nanocjevčica s APTMS moguće provesti bez da se naruši tubularna morfologija nanocjevčica i time umanju njihova vanjska površina. Stoga se u nastavku istraživanja titanatne nanocjevčice pokušalo iskoristiti kao nanostrukturirani nosač velike specifične površine za imobilizaciju katalizatora prikladnih za primjenu u amperometrijskim senzorima. Kao modelni katalizatori odabrani su enzim peroksidaza i *N*-saliciliden-*n*-propilaminski kompleks željeza(III), strukturni analog salenskog kompleksa željeza(III) s katalitičkom aktivnošću sličnom peroksidazi.^{14,233} Provedena istraživanja za cilj su imala pronalaženje metoda kovalentnog vezanja katalizatora na površinu titanatnih nanocjevčica koje rezultiraju najvećom količinom imobiliziranog katalizatora, odnosno titanatnim nanocjevčicama s najvećom specifičnom katalitičkom aktivnošću, s obzirom da su ti parametri od ključne

važnosti za potencijalnu senzorsku primjenu modificiranih titanatnih nanocjevčica. Titanatne nanocjevčice s imobiliziranom peroksidazom, odnosno *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III) potom su ugrađene u kompozitnu vodljivu matricu na bazi grafita i istražena su njihova elektrokemijska i elektrokatalitička, odnosno bioelektrokatalitička svojstva. U konačnici su titanatne nanocjevčice s najboljim elektrokatalitičkim svojstvima iskorištene za izradu amperometrijskih senzora za određivanje vodikova peroksida i glukoze.

4.3.1. Kovalentna imobilizacija *N*-saliciliden-*n*-propilaminskih kompleksa bakra(II) i željeza(III) na titanatne nanocjevčice

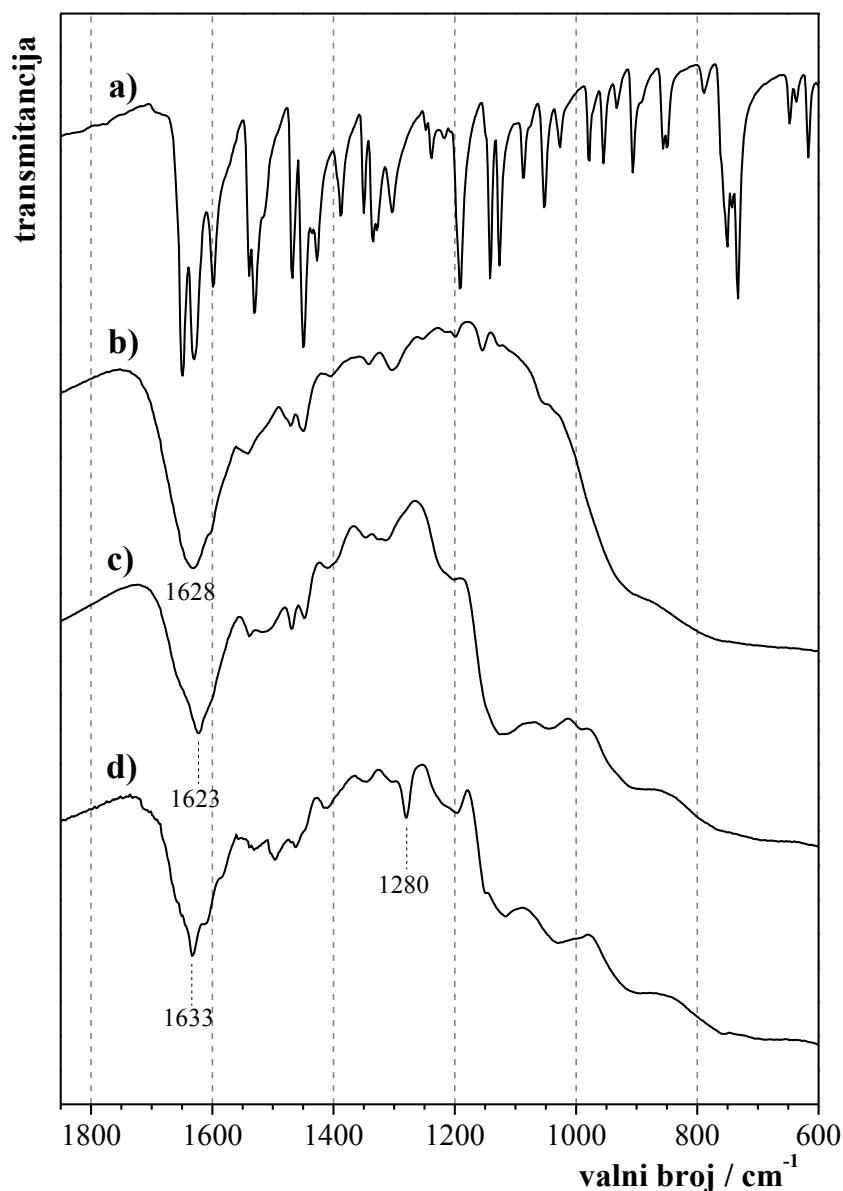
S obzirom da *N*-saliciliden-*n*-propilamin nema funkcionalnih skupina koje bi bile prikladne za njegovo kovalentno vezanje na površinu titanatnih nanocjevčica, razvijena su tri sintetska postupka čiji su krajnji rezultat bile titanatne nanocjevčice površinski funkcionalizirane *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim skupinama koje su funkcionirale kao ligand za kompleksiranje s metalnim kationom (pogl. 3.2.4.). Prvi sintetski postupak (čiji je produkt označen sa **TiNT-Me(Salp)₂-A**) temeljio se na reakciji površinskih OH-skupina titanatnih nanocjevčica s bis(*N*-saliciliden-3-(trimetoksisilil)-*n*-propilaminatnim) kompleksom metala (Me) i po svom je kemizmu bio identičan kemizmu vezanja APTMS na titanatne nanocjevčice. Preostala dva sintetska postupka polazila su od titanatnih nanocjevčica površinski funkcionaliziranih s APTMS i uključivala su reakciju NH₂-skupina iz aminopropilnih segmenata površinski vezanog APTMS sa salicilaldehidnim kompleksom metala (uzorak **TiNT-Me(Salp)₂-B**), odnosno nekompleksiranim salicilaldehidom, nakon čega je slijedilo kompleksiranje metalnog kationa (uzorak **TiNT-Me(Salp)₂-C**). U početnoj fazi istraživanja su bila usmjerena na utvrđivanje koji od navedenih sintetskih postupaka rezultira s najvećom količinom imobiliziranog kompleksa. Kako bi se pojednostavila analiza modificiranih titanatnih nanocjevčica, u toj je fazi istraživanja umjesto željezova(III) kompleksa korišten *N*-saliciliden-*n*-propilaminski kompleks bakra(II), s obzirom da se bakar i titanij u smjesi mogu simultano odrediti jednostavnim voltametrijskom analizom u oksalatnom mediju. Pored toga, uporabom bakrova(II) kompleksa u preliminarnim eksperimentima izbjegnute su poteškoće pri sintezi uzrokovane sklonošću željezova(III) kationa da hidrolizira.

S obzirom da je *N*-saliciliden-*n*-propilaminski kompleks bakra(II) intenzivno obojen ($\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ nm}$),²³⁴ modificiranim titanatnim nanocjevčicama dobivenim kao produkt gore opisanih sintetskih postupaka snimljeni su UV-Vis spektri, čime je na jednostavan i brz način provjerena uspješnost površinskog modificiranja nanocjevčica. Snimljeni refleksijski spektri prikazani su na slici 4.24. Usporedba prikazanih spektara pokazuje da je kod sva tri uzorka došlo do nastajanja željenog *N*-saliciliden-*n*-propilaminskog kompleksa bakra(II) (slika 4.24., spektri (a)–(c)) te da modificirane nanocjevčice sadrže zanemariv udio slobodnog *N*-saliciliden-*n*-propilaminskog liganda, kojeg karakterizira snažna apsorpcija pri 420 nm (slika 4.24., uzorak TiNT-NH₂-SA) uzrokovana $n\text{-}\pi^*$ prijelazima.²³⁵



Slika 4.24. Spektri UV/Vis difuzne reflektancije uzoraka (a) TiNT-Cu(Salp)₂-A, (b) TiNT-Cu(Salp)₂-B i (c) TiNT-Cu(Salp)₂-C te spektri nemodificiranih titanatnih nanocjevčica u koje su ionskom izmjenom ugrađeni ioni Cu²⁺ (TiNT-Cu), na čiju je površinu adsorbiran salenski kompleks bakra(II) (TiNT-CuSalen) te koje su modificirane s APTMS i podvrgnute reakciji sa salicilaldehidom (TiNT-NH₂-SA). *K/S* je Kubelka-Munkova funkcija.

Iznesene zaključke potvrđuju i FTIR spektri uzoraka modificiranih titanatnih nanocjevčica prikazani na slici 4.25. U području valnih brojeva između 1700 i 1250 cm^{-1} FTIR spektar uzorka TiNT-Cu(Salp)₂-C gotovo je identičan spektru titanatnih nanocjevčica na čiju je površinu adsorbiran salenski kompleks bakra(II), strukturno vrlo sličan *N*-saliciliden-*n*-propilaminskom kompleksu bakra(II) (usp. sl. 3.2. i 3.3.).



Slika 4.25. FTIR spektri (a) salenskog kompleksa bakra(II), (b) titanatnih nanocjevčica s adsorbiranim salenskim kompleksom bakra(II), (c) uzorka TiNT-Cu(Salp)₂-C i (d) titanatnih nanocjevčica modificiranih s APTMS i podvrgnutih reakciji sa salicilaldehidom.

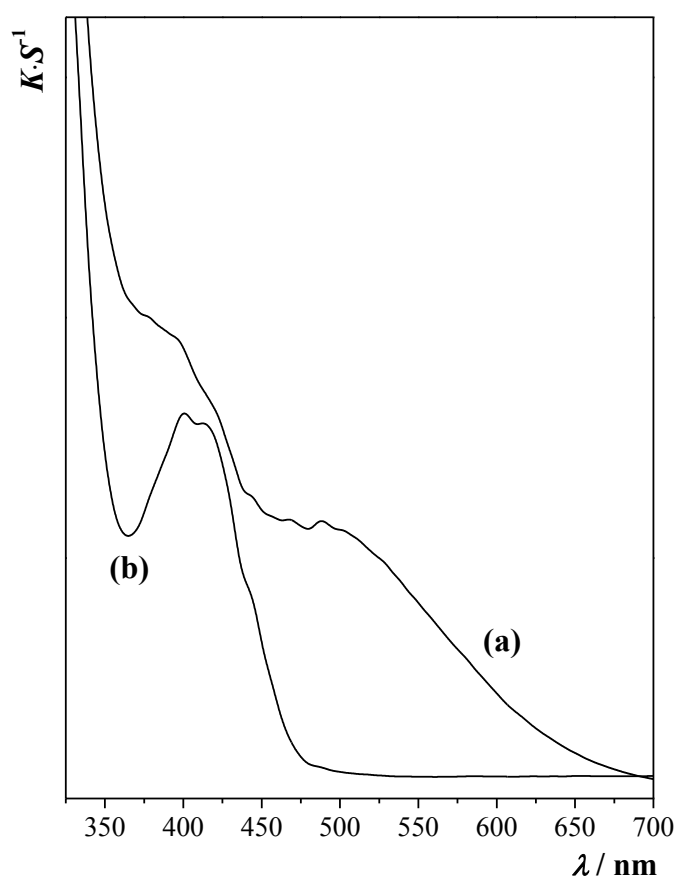
Kao indikacija kompleksiranja *N*-saliciliden-*n*-propilaminskog liganda s metalnim kationom obično se uzima pomak vibracijske vrpce istezanja C=N skupina, koja se u slobodnom ligandu javlja pri 1633 cm^{-1} , a kompleksiranjem se pomiče za otprilike desetak cm^{-1} prema manjim valnim brojevima.^{235,236} Kod titanatnih nanocjevčica modificiranih *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim ligandom, odnosno kompleksom, ta je vrpca preklapljen s vrpcom uslijed vibracija savijanja H–O–H veza, no primjetljiv je i indikativan pomak te preklapljene vrpce sa 1633 na 1623 cm^{-1} nakon vezanja iona Cu^{2+} na titanatne nanocjevčice modificirane *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim ligandom (slika 4.25.c i d). Kod spomenutih uzoraka signifikantno je i ponašanje vibracijske vrpce pri 1280 cm^{-1} , koja je karakteristična za vibracije istezanja C–O veza, a koja se nakon kompleksiranja iona Cu^{2+} pomiče prema većim valnim brojevima²³⁷ (slika 4.25.c i d).

Kemijskom analizom uzoraka titanatnih nanocjevčica modificiranih *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom bakra(II) određen je množinski omjer bakra i titanija u modificiranim nanocjevčicama prikazan u tablici 4.13. Vidljivo je da sva tri sintetska postupka rezultiraju otprilike jednakim udjelom vezanih iona Cu^{2+} , što navodi na zaključak da su u svim uzorcima sva raspoloživa mjesta za površinsko vezanje silana, odnosno sve raspoložive površinske NH_2 -skupine iskorištene za stvaranje *N*-saliciliden-*n*-propilaminskog liganda. Taj zaključak potvrđuju i rezultati kemijske analize modificiranih titanatnih nanocjevčica. Ako se uzme da titanatne nanocjevčice silanizirane s APTMS sadrže u prosjeku $0,83\text{ mmol}$ površinskih NH_2 -skupina po gramu nanocjevčica (tablica 4.5.), tada množina NH_2 -skupina u 25 mg nanocjevčica iznosi $20,8\text{ }\mu\text{mol}$. Uz pretpostavku da su sve površinske amino skupine prevedene u iminske skupine, za njihovo je kompleksiranje potrebno $10,4\text{ }\mu\text{mol}$ iona Cu^{2+} , što se izvrsno slaže sa sadržajem bakra u površinski modificiranim nanocjevčicama (tablica 4.13.).

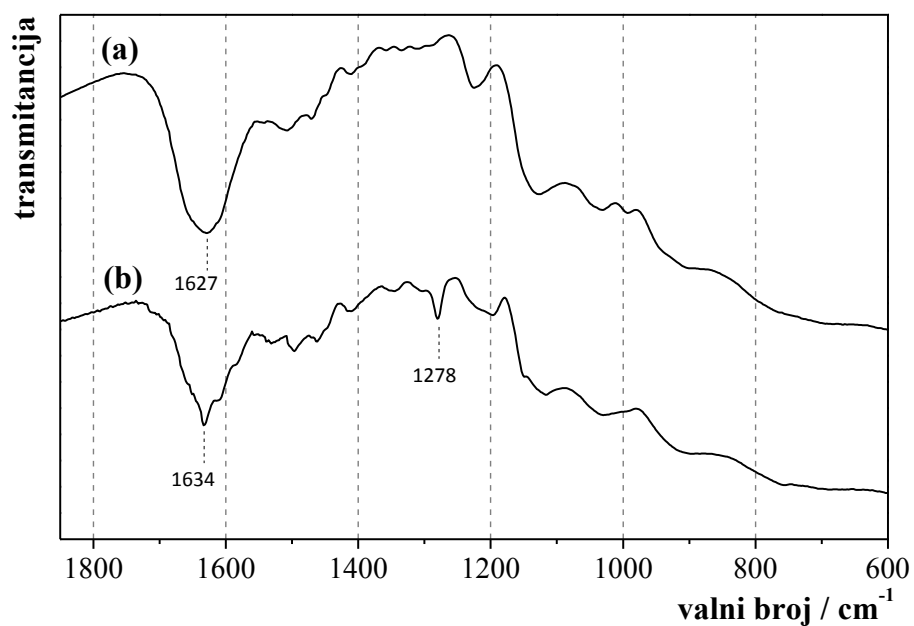
Tablica 4.13. Sadržaj bakra i titanija u uzorcima titanatnih nanocjevčica modificiranih *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom bakra(II) ($m(\text{uzorak}) = 25\text{ mg}$, $N = 3$)

	TiNT-Cu(Salp) ₂ -A	TiNT-Cu(Salp) ₂ -B	TiNT-Cu(Salp) ₂ -C
$n(\text{Ti}) / \mu\text{mol}$	209 ± 4	208 ± 2	195 ± 5
$n(\text{Cu}) / \mu\text{mol}$	$9,91 \pm 0,37$	$11,2 \pm 2$	$9,79 \pm 2,2$
$n(\text{Cu}) / n(\text{Ti})$	0,048	0,054	0,050

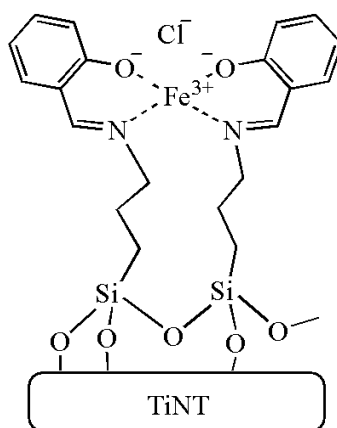
S obzirom da svi opisani imobilizacijski postupci dovode do približno jednake količine površinski vezanog kompleksa, za imobilizaciju *N*-saliciliden-*n*-propilaminskog kompleksa željeza(III) na površinu titanatnih nanocjevčica odabran je najjednostavniji postupak – na površinu titanatnih nanocjevčica modificiranih s APTMS vezan je salicilaldehid, nakon čega je na nastale *N*-saliciliden-*n*-propilaminske skupine vezan ion Fe^{3+} (sintetski slijed C sa slike 3.2., uzorak označen kao TiNT-Fe(Salp)₂-C). UV-Vis refleksijski spektri i FTIR spektri tako modificiranih titanatnih nanocjevčica prikazani su na slikama 4.26. i 4.27. Kao i u slučaju analognog kompleksa bakra(II), nakon vezanja iona Fe^{3+} na površinu titanatnih nanocjevčica funkcionaliziranih *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim ligandom vibracijska vrpca pri 1634 cm^{-1} pomiče se prema manjim valnim brojevima, a vrpca pri 1278 cm^{-1} prema većima, što ukazuje



Slika 4.26. Spektri UV/Vis difuzne reflektancije (a) uzorka TiNT-Fe(Salp)₂-C i (b) uzorka titanatnih nanocjevčica modificiranih s APTMS i podvrgnutih reakciji sa salicilaldehidom. *K/S* je Kubelka-Munkova funkcija.



Slika 4.27. FTIR spektri (a) uzorka TiNT-Fe(Salp)₂-C i (b) titanatnih nanocjevčica modificiranih s APTMS i podvrgnutih reakciji sa salicilaldehidom.

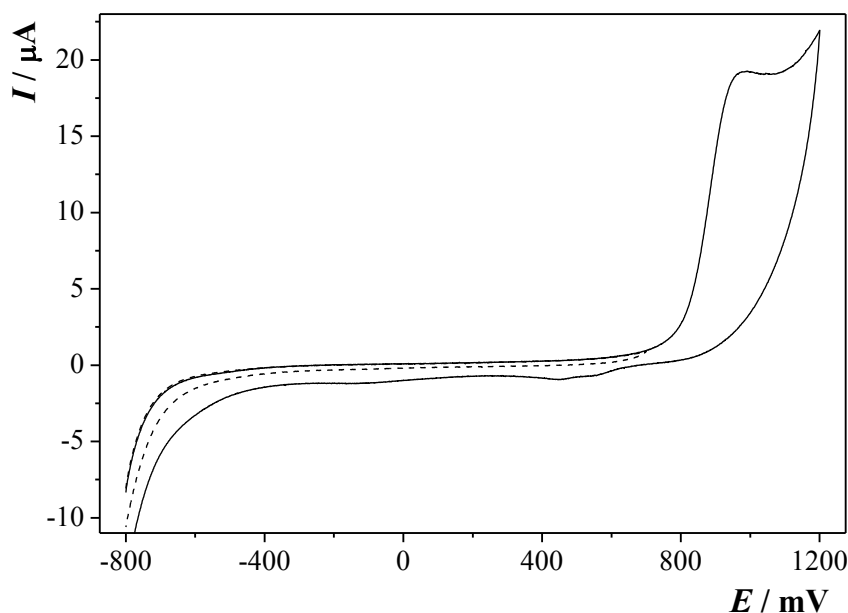


Slika 4.28. Struktura i način vezanja *N*-saliciliden-*n*-propilaminskog kompleksa željeza(III) na titanatne nanocjevčice.

na vezanje iona Fe^{3+} na sva raspoloživa ligandna mjesta. Kemijskom analizom modificiranih nanocjevčica za omjer množina $n(\text{Fe}) / n(\text{Ti})$ dobivena je vrijednost 0,051, gotovo identična prosječnoj vrijednosti omjera kompleksiranog metala i titanija u titanatnim nanocjevčicama površinski modificiranim *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom bakra(II) (tablica 4.13.). To znači da i u titanatnim nanocjevčicama površinski modificiranim *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III) na svaki ion željeza dolaze po dvije iminske skupine, što omogućuje zaključak da način vezanja kompleksa na titanatne nanocjevčice i njegova struktura odgovaraju slici 4.28.

4.3.2. Elektrokemijska i elektrokatalitička svojstva titanatnih nanocjevčica površinski modificiranih s N-saliciliden-n-propilaminskim kompleksom željeza(III)

S obzirom da titanatne nanocjevčice ne provode električnu struju, da bi se istražila elektrokemijska svojstva površinski modificiranih titanatnih nanocjevčica, bilo ih je potrebno ugraditi u vodljivu matricu. Kao vodljiva matrica odabrana je grafitna pasta dobivena umješavanjem male količine parafinskog ulja u grafitni prah, kako je opisano u pogl. 3.4.1. Budući da su salicilidenski ligandi elektroaktivni, pri čemu elektrokemijska redukcija liganda dovodi do raspada kompleksa, a oksidacija do njegove polimerizacije,^{206,238,239} prije elektrokemijskog ispitivanja titanatnih nanocjevčica modificiranih sa *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III) određeno je područje potencijala u kojem se modificirane nanocjevčice mogu polarizirati bez da dođe do degradacije ili polimerizacije površinski vezanog kompleksa. U tu je svrhu priređena elektroda od grafitne paste modificirane s titanatnim nanocjevčicama na čiju je površinu bio vezan samo *N*-saliciliden-*n*-propilaminski ligand, priređen reakcijom salicilaldehida s titanatnim nanocjevčicama silaniziranim s APTMS. Ciklički voltamogram tako priređene elektrode prikazan je na slici 4.29. Na voltamogramu se uočava ireverzibilni anodni val u području potencijala većem od 800 mV te nekoliko slabije izraženih katodnih valova u području potencijala od 700 do -400 mV, nakon kojih slijedi nagli porast katodne struje. Anodni val može se pripisati već spomenutoj oksidaciji salicilidenskog liganda, dok su katodni valovi očito povezani s redukcijom nastalih produkata, s obzirom da se skraćivanjem anodne granice voltamograma ti valovi u povratnom (katodnom) ciklusu više ne pojavljuju (slika 4.29., voltamogram prikazan isprekidanom crtom). Područje potencijala u kojem je salicilidenski ligand elektrokemijski inaktivan proteže se između -400 i 800 mV.

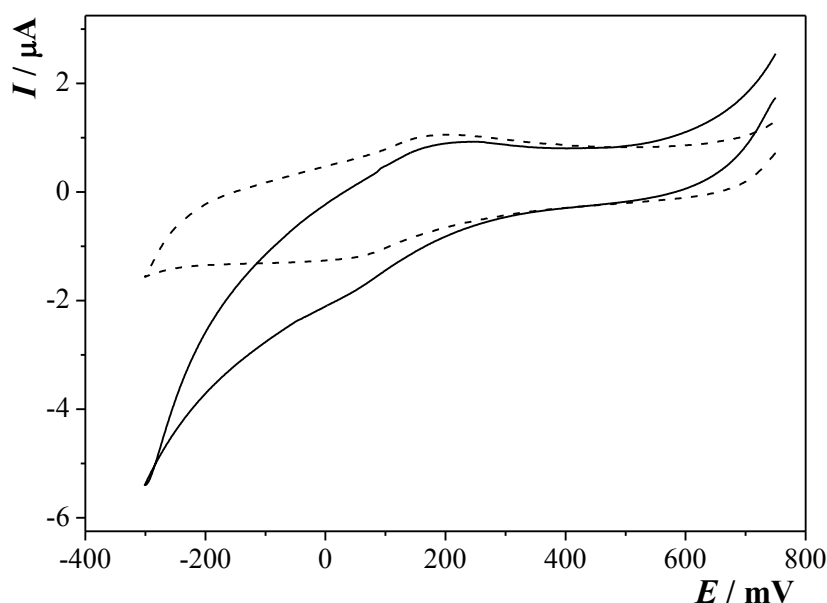


Slika 4.29. Ciklički voltamogrami titanatnih nanocjevčica modificiranih *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim ligandom. Isprekidanom crtom prikazan je voltamogram snimljen u kraćem području potencijala (v. tekst). Osnovni elektrolit: fosfatni pufer, $c(P) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,0$; brzina promjene potencijala: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Ciklički voltamogram titanatnih nanocjevčica s imobiliziranim *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III), snimljen u području potencijala između -300 i 700 mV , prikazan je na slici 4.30. Par voltametrijskih valova koji se na voltamogramu uočavaju pri potencijalima od otprilike 30 i 190 mV može se pripisati kvazireverzibilnoj redukciji, odnosno oksidaciji željezova kationa u *N*-saliciliden-*n*-propilaminskom kompleksu vezanom na površinu titanatnih nanocjevčica:



gdje Salp označava *N*-saliciliden-*n*-propilaminski ligand. Elektrokemijski proces opisan jednačbom 4.11. analogan je procesu reverzibilne oksidacije, odn. redukcije željezova iona u salenskom kompleksu,²⁴⁰ no u odnosu na njega odvija se pri gotovo 500 mV pozitivnijem potencijalu ($E_{p/2} \approx 110 \text{ mV}$). Takav anodni pomak može se objasniti većom fleksibilnošću *N*-saliciliden-*n*-propilaminskog kompleksa u odnosu na salenski kompleks. Naime, salenski



Slika 4.30. Ciklički voltamogrami titanatnih nanocjevčica modificiranih *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III) snimljen u čistom osnovnom elektrolitu (isprekidana crta) i u prisutnosti $5 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ H}_2\text{O}_2$ (puna crta). Ostali uvjeti kao na slici 4.29.

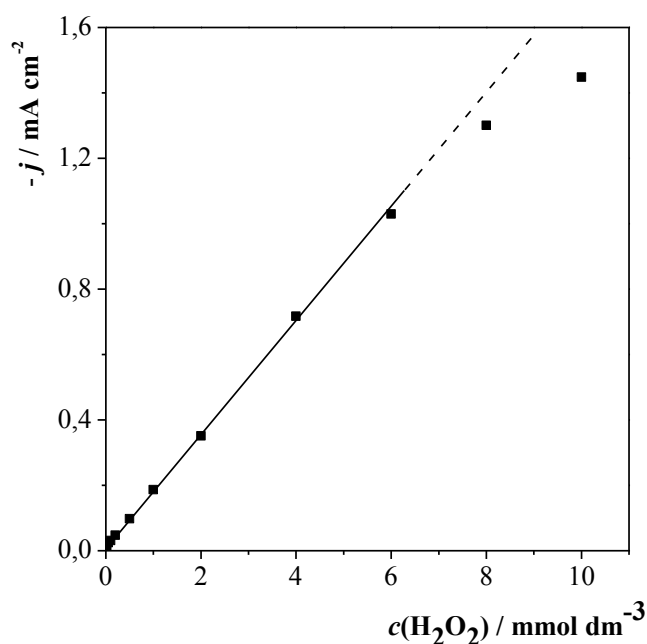
ligand (slika 3.3.) vrlo je krut i jako stabilizira oksidacijsko stanje +3 centralnog iona željeza, što standardni potencijal redoks para $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Salen})]^+ / [\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Salen})]$ pomiče u katodnom smjeru. Površinski vezani ligandi koji koordiniraju ion željeza u *N*-saliciliden-*n*-propilaminskom kompleksu željeza(III) vezanom na titanatne nanocjevčice (slika 4.28.) daleko su fleksibilniji i gibljiviji od salena. Zbog toga je redukcija centralnog kationa Fe(III) u površinski vezanom *N*-saliciliden-*n*-propilaminskom kompleksu lakša nego u analognom salenskom kompleksu pa je standardni potencijal redoks-para $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Salp})_2]^+ / [\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Salp})_2]$ pomaknut anodnije.

S obzirom na potencijal pri kojem se odvija proces opisan jednadžbom 4.11., za očekivati je da *N*-saliciliden-*n*-propilaminski kompleks željeza(III) pokazuje elektrokatalitička svojstva pri redukciji vodikova peroksida ($E^\ominus(\text{H}_2\text{O}_2 / \text{H}_2\text{O}) = 1,57 \text{ V}$ prema $\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{M KCl}$). Da je tome doista tako potvrđuje ciklički voltamogram titanatnih nanocjevčica s imobiliziranim *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III) snimljen u prisutnosti vodikova peroksida (slika 4.30.). Na voltamogramu se pri potencijalima na kojima započinje redukcija željeza(III) iz *N*-saliciliden-*n*-propilaminskog kompleksa ($E \approx 325 \text{ mV}$) opaža nagli porast jakosti katodne struje. S obzirom da se pri identičnim uvjetima redukcija vodikova peroksida

na elektrodi od nemodificirane grafitne paste primjetnom brzinom počinje zbivati tek pri potencijalima negativnijima od -350 mV, očito je da je opažena katodna struja posljedica elektrokatalitičke redukcije vodikova peroksida na titanatnim nanocjevčicama modificiranim *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III). Budući da se taj proces odvija pri relativno pozitivnim potencijalima, zanimljiv je s elektroanalitičkog aspekta jer omogućuje amperometrijsko određivanje vodikova peroksida pri umjerenim potencijalima na kojima su interferencije uslijed prisustva drugih elektroaktivnih tvari u uzorku minimalne.

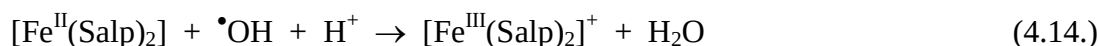
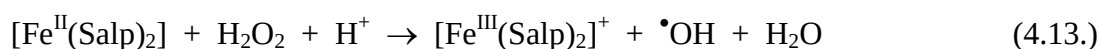
Ovisnost jakosti elektrokatalitičke struje redukcije vodikova peroksida pri 0 V na rotirajućoj disk-elektrodi modificiranoj s titanatnim nanocjevčicama na koje je imobiliziran *N*-saliciliden-*n*-propilaminski kompleks željeza(III) o koncentraciji H_2O_2 u otopini prikazana je na slici 4.31. U području koncentracija vodikova peroksida od $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$ do 6 mmol dm^{-3} strujni odziv elektrode je linearan ($r^2 = 0,9991$) i slijedi ovisnost:

$$j / \text{A cm}^{-2} = (0,171 \pm 0,001) \cdot [c(\text{H}_2\text{O}_2) / \text{mol dm}^{-3}] + 0,014 \pm 0,003$$



Slika 4.31. Ovisnost jakosti struje uslijed elektrokatalitičke redukcije H_2O_2 na rotirajućoj disk-elektrodi modificiranoj s titanatnim nanocjevčicama s površinski imobiliziranim *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III) o koncentraciji H_2O_2 u otopini. Elektroda pripremljena na način opisan u pogl. 3.4.2. Osnovni elektrolit: fosfatni pufer, $c(\text{P}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,0$; kutna brzina: $\omega = 94,4 \text{ s}^{-1}$; radni potencijal: $E = 0 \text{ V}$.

Iz dobivene ovisnosti elektrokatalitičke struje o koncentraciji H_2O_2 može se procijeniti brzina elektrokatalitičke redukcije vodikova peroksida na titanatnim nanocjevčicama s površinski imobiliziranim *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III). S obzirom da su salenski i *N*-saliciliden-*n*-propilaminski kompleks željeza(III) strukturno vrlo slični, može se pretpostaviti da elektrokemijsku redukciju vodikova peroksida kataliziraju na isti način. Uz tu pretpostavku katalitička redukcija vodikova peroksida na elektrodi modificiranoj s titanatnim nanocjevčicama na koje je imobiliziran *N*-saliciliden-*n*-propilaminski kompleks željeza(III) može se opisati sljedećom reakcijskom shemom:²³⁸



u kojoj je proces opisan jednadžbom 4.14. brz pa je ukupna brzina elektrokatalitičkog procesa određena brzinama procesa 4.12. i 4.13. Pri dovoljno velikoj katodnoj polarizaciji elektrode reakcija 4.12. također postaje brza pa kinetika heterogenog elektrokatalitičkog procesa opisanog reakcijama 4.12.–4.14. postaje određena brzinom kojom se odvija proces 4.13. Pri tim uvjetima jakost elektrokatalitičke struje redukcije vodikova peroksida dana je sa:

$$j = 2 \cdot F \cdot k_h \cdot I(\text{Fe}(\text{Salp})_2) \cdot c_{(x=0)} \quad (4.15.)$$

gdje je F Faradayeva konstanta, k_h je konstanta brzine heterogene reakcije 4.13., $I(\text{Fe}(\text{Salp})_2)$ je površinska koncentracija *N*-saliciliden-*n*-propilaminskog kompleksa željeza(III), a $c_{(x=0)}$ je koncentracija vodikova peroksida uz površinu elektrode. Ako se mjerenje provodi na rotirajućoj disk-elektrodi, koncentracija vodikova peroksida uz površinu elektrode određena je Levichevom jednadžbom:

$$c_{(x=0)} = c_b \left(1 - \frac{j}{j_L} \right) = c_b \left(1 - \frac{j}{-0,62 \cdot 2 F \nu^{-1/6} D^{2/3} \omega^{1/2} c_b} \right) \quad (4.16.)$$

gdje je c_b množinska koncentracija H_2O_2 u otopini, j_L granična struja, ν kinematička viskoznost otopine ($0,01 \text{ cm}^2/\text{s}$), D difuzijski koeficijent H_2O_2 ($1,6 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$), a ω kutna brzina elektrode. Koncentracije vodikova peroksida uz površinu elektrode izračunate pomoću relacije 4.16. iz podataka prikazanih na slici 4.30. dane su u tablici 4.14. Za svaku izračunatu koncentraciju $c_{(x=0)}$ pomoću relacije 4.15. izračunata je pripadna vrijednost konstante k_h koja je također prikazana u tablici 4.14., pri čemu je vrijednost $I(\text{Fe}(\text{Salp})_2)$ određena

integriranjem naboja ispod voltametrijskog maksimuma pri 190 mV na cikličkom voltamogramu modificirane elektrode ($Q = 2,10 \mu\text{C cm}^{-2}$, $I(\text{Fe}(\text{Salp})_2) = 2,18 \cdot 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$). Iz dobivenih podataka izračunata je srednja vrijednost konstante heterogene elektrokatalitičke reakcije 4.13., $k_h = 4,67 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Tako velika vrijednost konstante k_h pokazuje da *N*-saliciliden-*n*-propilaminski kompleks željeza(III) vrlo efikasno katalizira elektrokemijsku redukciju vodikova peroksida. Usporedbe radi, konstante heterogenih elektrokatalitičkih reakcija redukcije H_2O_2 reda veličine $10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ dosad su opažene samo na elektrodama modificiranim željezovim(III) heksacijanoferatom(II), trenutno najboljim poznatim anorganskim katalizatorom za elektrokemijsku redukciju vodikova peroksida.⁴²

Tablica 4.14. Koncentracija H_2O_2 uz površinu elektrode i pripadne vrijednosti konstante k_h za podatke sa slike 4.30. Izračunato prema relacijama 4.15. i 4.16.

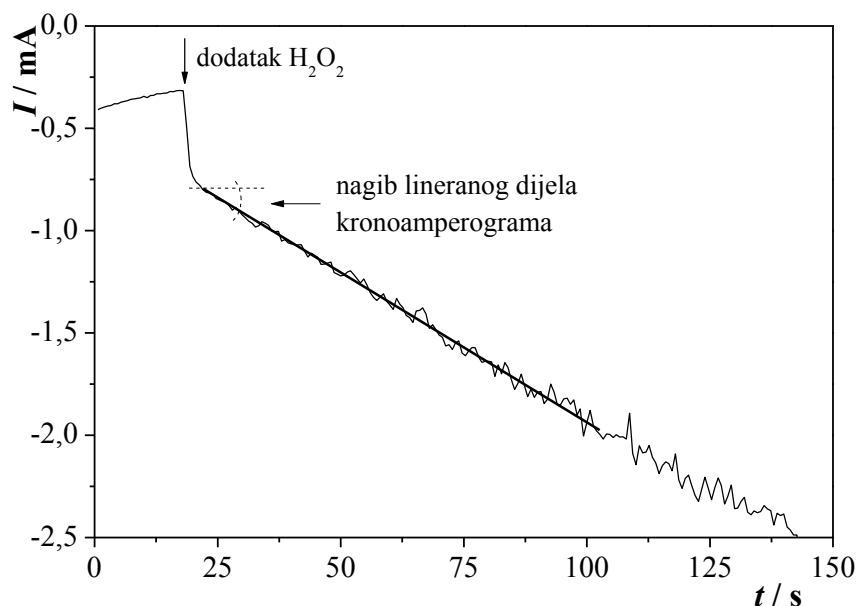
$c_b(\text{H}_2\text{O}_2) / \text{mmol dm}^{-3}$	$j / \text{mA cm}^{-2}$	$c_{x=0}(\text{H}_2\text{O}_2) / \text{mmol dm}^{-3}$	$k_h / \text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
0,1	0,0314	0,100	$5,45 \cdot 10^4$
0,2	0,0477	0,199	$5,66 \cdot 10^4$
0,5	0,0978	0,499	$4,64 \cdot 10^4$
1,0	0,1865	0,998	$4,43 \cdot 10^4$
2,0	0,3510	1,998	$4,17 \cdot 10^4$
4,0	0,7170	3,998	$4,26 \cdot 10^4$
6,0	1,0300	5,997	$4,08 \cdot 10^4$

4.3.3. Kovalentna imobilizacija peroksidaze na titanatne nanocjevčice modificirane s APTMS

Imobilizacija peroksidaze na titanatne nanocjevčice izvedena je na dva načina (pogl. 3.2.3.), metodama uobičajenim za kovalentno vezanje enzima na čvrste nosače.²⁰² (i) povezivanjem amino skupina perifernih lizinskih ogranaka peroksidaze s površinskim amino skupinama silaniziranih titanatnih nanocjevčica pomoću prikladnog bifunkcionalnog reagensa (glutaraldehida, tereftaloil diklorida, *p*-benzokinona ili askorbinske kiseline) te (ii) izravnim povezivanjem površinskih amino skupina silaniziranih titanatnih nanocjevčica s aldehidnim skupinama dobivenima selektivnom oksidacijom perifernih šećera peroksidaze perjodatom.

Nakon imobilizacije peroksidaze na silanizirane titanatne nanocjevčice, specifična katalitička aktivnost modificiranih nanocjevčica određena je amperometrijski, mjerenjem kinetike nastajanja ABTS radikal-kationa u peroksidazom kataliziranoj oksidaciji ABTS-a s vodikovim peroksidom, na način opisan u pogl. 3.3.2. Tipičan kronoamperogram redukcije ABTS radikal-kationa snimljen u suspenziji titanatnih nanocjevčica modificiranih s peroksidazom u otopini koja je sadržavala ABTS i vodikov peroksid prikazan je na slici 4.32. Usporedbom nagiba linearnog dijela kronoamperograma snimljenog u suspenziji titanatnih nanocjevčica modificiranih s peroksidazom s nagibom linearnog dijela kronoamperograma snimljenog u otopini peroksidaze poznate aktivnosti izračunate su specifične aktivnosti modificiranih nanocjevčica prikazane u tablici 4.15.

Podaci prikazani u tablici 4.15. pokazuju da je specifična katalitička aktivnost titanatnih nanocjevčica na koje je peroksidaza imobilizirana pomoću *p*-benzokinona između 15 i 30 puta veća od specifične katalitičke aktivnosti titanatnih nanocjevčica na koje je peroksidaza imobilizirana pomoću drugih bifunkcionalnih reagensa (glutaraldehida, tereftaloil diklorida, askorbinske kiseline), otprilike 4,5 puta veća od specifične katalitičke aktivnosti titanatnih nanocjevčica na koje je peroksidaza imobilizirana izravno, nakon oksidacije perifernih šećera



Slika 4.32. Tipičan hidrodinamički kronoamperogram redukcije ABTS radikal-kationa snimljen u suspenziji titanatnih nanocjevčica s imobiliziranom peroksidazom u otopini ABTS i H₂O₂ ($c(\text{H}_2\text{O}_2) = 250 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $c(\text{ABTS}) = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$). Osnovni elektrolit: fosfatni pufer, $c(\text{P}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,0; potencijal: $E = 0 \text{ mV}$.

Tablica 4.15. Specifične katalitičke aktivnosti (A_{sp}) nemodificiranih titanatnih nanocjevčica ($TiNT-NH_2$), titanatnih nanocjevčica s fizički adsorbiranom peroksidazom ($TiNT-NH_2 \cdots HRP$) i titanatnih nanocjevčica s peroksidazom imobiliziranom pomoću različitih imobilizacijskih reagensa ($N = 3$)

Imobilizacijski reagens	$A_{sp} / U \text{ mg}^{-1}$
<i>p</i> -benzokinon	$4,0 \pm 0,3$
perjodat	$0,9 \pm 0,1$
glutaraldehyd	$0,24 \pm 0,06$
tereftaloil diklorid	$0,22 \pm 0,01$
askorbinska kiselina	$0,13 \pm 0,02$
.....	
$TiNT-NH_2 \cdots HRP$	$0,09 \pm 0,02$
$TiNT-NH_2$	0

perjodatom, te otprilike 45 puta veća od specifične katalitičke aktivnosti titanatnih nanocjevčica na koje je peroksidaza imobilizirana fizičkom adsorpcijom. Vrlo mala specifična katalitička aktivnost titanatnih nanocjevčica na koje je peroksidaza imobilizirana isključivo fizičkom adsorpcijom je očekivana, s obzirom da su pri vrijednosti pH od 6,0 (pri kojoj je izvršena imobilizacija enzima) molekule peroksidaze pozitivno nabijene ($pI = 8,8$),⁵⁵ jednako kao što su pozitivno nabijene (tj. protonirane) i površinske amino skupine titanatnih nanocjevčica modificiranih s APTMS ($pK_a = 8,5$) pa je zbog odbojnih elektrostatskih interakcija adsorpcija peroksidaze na površinu nanocjevčica slaba. Značajno veća specifična katalitička aktivnost titanatnih nanocjevčica na čiju je površinu peroksidaza imobilizirana pomoću *p*-benzokinona stoga potvrđuje polaznu pretpostavku o kovalentnom vezanju peroksidaze na površinu nanocjevčica funkcionaliziranih s amino skupinama.

S obzirom da se imobilizacija peroksidaze pomoću *p*-benzokinona pokazala superiornom u odnosu na druge metode imobilizacije iskušane u ovom radu, u nastavku istraživanja usredotočilo se isključivo na tu metodu imobilizacije. Budući da količina enzima imobiliziranog na čvrsti nosač ovisi o načinu slaganja makromolekula enzima na površinu nosača, što pak može ovisiti o koncentraciji enzima u otopini iz koje se provodi imobilizacija, istraženo je kako početna koncentracija peroksidaze u imobilizacijskoj otopini utječe na masu

peroksidaze imobilizirane po jediničnoj masi titanatnih nanocjevčica. Masa imobiliziranog enzima određena je amperometrijskim mjerenjem katalitičke aktivnosti otopine peroksidaze prije imobilizacije enzima te katalitičke aktivnosti supernatanta preostalog nakon imobilizacije enzima na određenu masu titanatnih nanocjevčica, na način analogan načinu opisanom u pogl. 3.3.2. Iz dobivenih rezultata, prikazanih u tablici 4.16., vidljivo je da količina imobilizirane peroksidaze, iskazana po jediničnoj masi titanatnih nanocjevčica, ostaje konstantna u području koncentracija peroksidaze od 2 mg/cm^3 do relativno visokih 10 mg/cm^3 te da u prosjeku iznosi $0,138 \pm 0,004 \text{ mg}$ peroksidaze po miligramu silaniziranih titanatnih nanocjevčica. To upućuje na zaključak da se pri opisanim uvjetima imobilizacije molekule peroksidaze na površini titanatnih nanocjevčica razmještaju na način da iskorištavaju, odn. zasjenjuju sva raspoloživa aktivna mjesta za kovalentno vezanje, što sugerira imobilizaciju peroksidaze u kompaktnom, gustom površinskom sloju. Iz tog razloga očito je da povećanje koncentracije peroksidaze u imobilizacijskoj otopini iznad vrijednosti od 2 mg/cm^3 ne bi imalo smisla jer bi rezultiralo povećanom potrošnjom enzima, a ne bi dovelo do povećanja količine imobilizirane peroksidaze.

Kinetika vezanja peroksidaze na titanatne nanocjevčice modificirane s APTMS i funkcionalizirane *p*-benzokinonom istražena je određivanjem količine HRP koja se vezala na površinu nanocjevčica tijekom određenog vremena imobilizacije, pri čemu je količina imobilizirane HRP određena na istovjetan način kao i prilikom određivanja količine imobilizirane peroksidaze pri različitim početnim koncentracijama peroksidaze u imobiliza-

Tablica 4.16. Masa peroksidaze (HRP) imobilizirane na 1 mg silaniziranih titanatnih nanocjevčica funkcionaliziranih s *p*-benzokinonom pri različitim početnim masenim koncentracijama peroksidaze u imobilizacijskoj otopini (fosfatni pufer, $c(\text{P}) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$, pH = 6,0; trajanje imobilizacije: 2 h)

$\gamma(\text{HRP}) / (\text{mg cm}^{-3})$	$m(\text{HRP}) / \text{mg}$
2,0	0,140
4,0	0,132
7,0	0,138
10,0	0,142

Tablica 4.17. Masa peroksidaze (HRP) imobilizirane na 1 mg silaniziranih titanatnih nanocjevčica funkcionaliziranih s *p*-benzokinonom pri različitim vremenima imobilizacije (početna masena koncentracija peroksidaze u otopini za imobilizaciju: $\gamma_0(\text{HRP}) = 2,0 \text{ mg/cm}^3$; ostali uvjeti kao kod tablice 4.16.)

<i>t</i> / h	<i>m</i> (HRP) / mg
0,5	0,136
1	0,141
2	0,130
4	0,146
7	0,135

cijskoj otopini, tj. na temelju razlike katalitičke aktivnosti otopine prije i nakon imobilizacije enzima. Iz dobivenih rezultata, prikazanih u tablici 4.17., može se uočiti da se povećanjem trajanja imobilizacije s 30 min na 7 sati ne utječe značajno na količinu imobilizirane peroksidaze, koja je u svim slučajevima iznosila otprilike 0,138 mg peroksidaze po miligramu titanatnih nanocjevčica. Stoga je u svim daljnjim eksperimentima imobilizacija peroksidaze na površinu titanatnih nanocjevčica provedena tijekom 60 minuta.

4.3.4. Elektrokemijska i bioelektrokatalitička svojstva titanatnih nanocjevčica s kovalentno imobiliziranom peroksidazom

Jednako kao i u slučaju titanatnih nanocjevčica modificiranih *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III) i titanatne nanocjevčice s kovalentno vezanom peroksidazom bilo je potrebno ugraditi u vodljivu matricu kako bi se nanocjevčice imobilizirale na elektrodu i kako bi im se mogla istražiti elektrokemijska svojstva. Kako bi se izbjeglo sušenje titanatnih nanocjevčica nakon imobilizacije peroksidaze (a s tim povezana i opasnost od denaturacije imobiliziranog enzima), kao matrica za ugradnju modificiranih nanocjevčica odabrana je "grafitna tinta" dobivena dispergiranjem grafitnog praha u puferiranoj vodenoj otopini sulfoniranog fluoropolimera *Nafiona* (pogl. 3.4.3.) U tu su suspenziju dodane titanatne nanocjevčice s imobiliziranom peroksidazom i dispergirane vorteksiranjem. Dobivena suspenzija lako se mikropipetom mogla prenijeti na površinu grafitne diske elektrode te

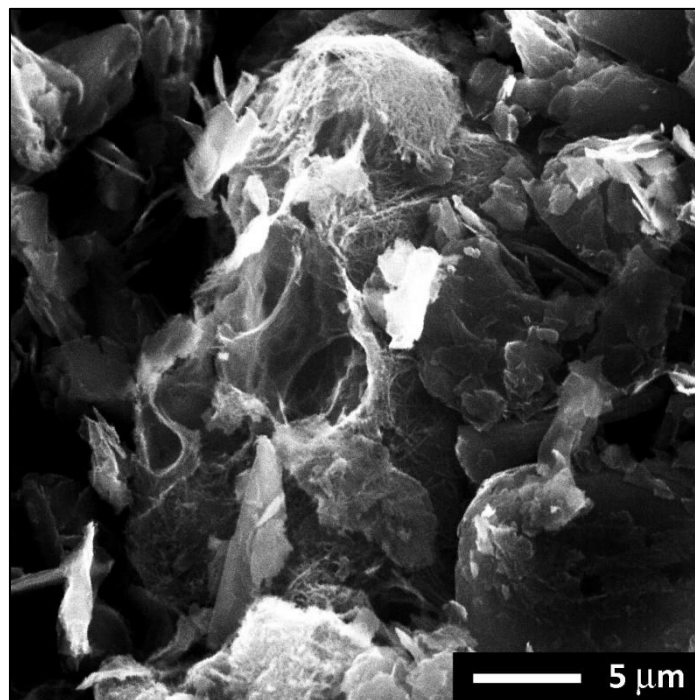
ostaviti da se osuši u tanak film. S obzirom da nakon isparavanja otapala iz otopine *Nafiona* dobiveni čvrsti polimer više nije topljiv u vodi, dobiveni vodljivi filmovi trajno su imobilizirali titanatne nanocjevčice na elektrodu.

Tipična SEM mikrografija kompozitnog filma grafita, titanatnih nanocjevčica i *Nafiona* prikazana je na slici 4.33. Uočava se da je film sastavljen od nepravilnih, pločastih čestica grafita, između kojih se nalaze pore promjera i do nekoliko mikrometara. Neke čestice grafita prekrivene su gustom mrežom titanatnih nanocjevčica, no neke su u potpunosti nepokrivene pa je očito da titanatne nanocjevčice nisu jednakomjerno raspoređene po kompozitu. Na veliku poroznost kompozitnog filma upućuju i ciklički voltamogrami snimljeni s elektrodama na koje je bio nanesen spomenuti kompozit. Na voltamogramima snimljenima u čistom osnovnom elektrolitu u području potencijala u kojem se na radnoj elektrodi ne odvija nikakav faradayski proces (slika 4.34) jasno se uočava izuzetno velika kapacitivna struja uzrokovana velikim kapacitetom elektrode. Specifični kapacitet elektrode može se izračunati iz linearne ovisnosti kapacitivne struje o brzini promjene potencijala:

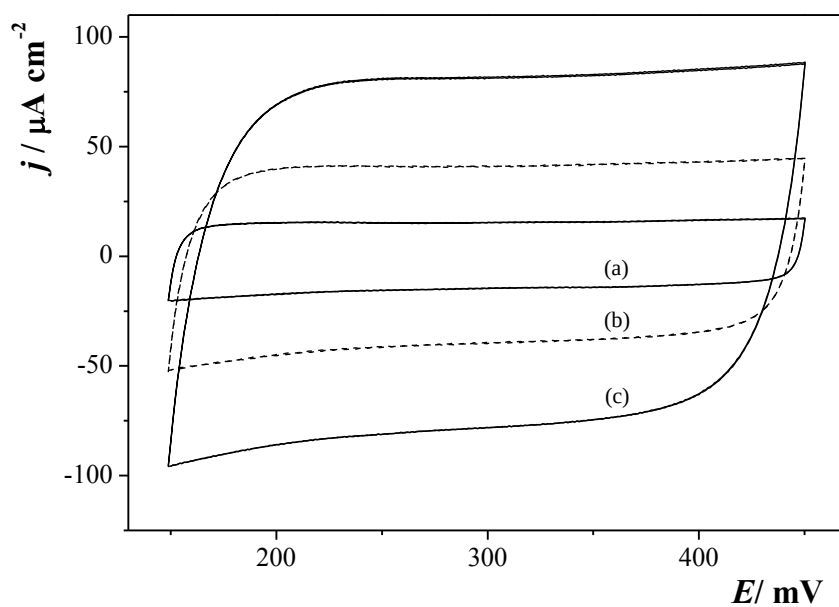
$$j_p = C_{\text{spec}}v$$

gdje je j_p srednja vrijednost gustoće kapacitivne struje, C_{spec} je specifični kapacitet elektrode, a v je brzina promjene potencijala. Kako je vidljivo sa slike 4.35., kapacitivna struja izmjerena na elektrodi modificiranoj s filmom kompozita grafita i *Nafiona* linearno ovisi o brzini promjene potencijala, pri čemu nagib dobivenog regresijskog pravca iznosi $C_{\text{spec}} = (570 \pm 10) \mu\text{F cm}^{-2}$, računato prema geometrijskoj površini elektrode. S obzirom da specifični kapacitet planarnih grafitnih elektroda iznosi $30\text{--}50 \mu\text{F cm}^{-2}$,²⁴⁰ procijenjeno je da kompozitni film deponiran na elektrodu ima stvarnu površinu između $11,5$ i 20 cm^2 . Ta je vrijednost pedeset do sto puta veća od geometrijske površine elektrode i jasna je indikacija poroznosti korištenog kompozita.

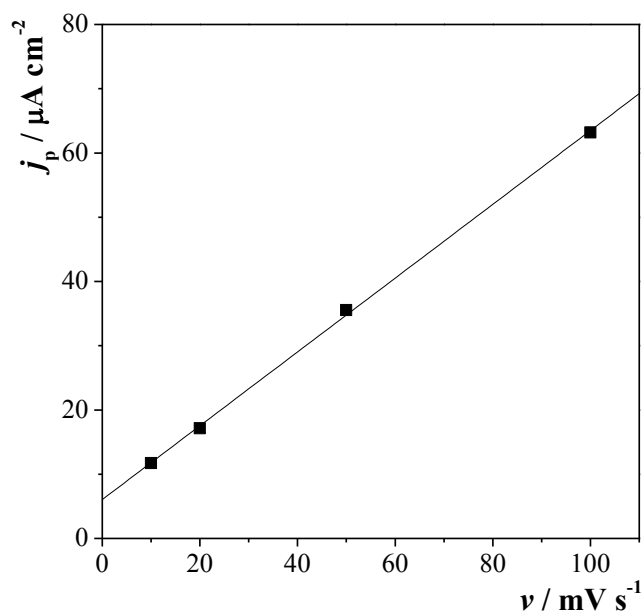
Ciklički voltamogram titanatnih nanocjevčica s imobiliziranom peroksidazom, ugrađenih u kompozit grafita i *Nafiona*, prikazan je na slici 4.36. U čistom osnovnom elektrolitu (voltamogram prikazan isprekidanom crtom) na voltamogramu se uočavaju dva para slabo definiranih voltametrijskih maksimuma superponiranih na visoku osnovnu (kapacitivnu) struju. Voltametrijski maksimumi koji se na voltamogramu pojavljuju pri potencijalu od otprilike 0 i 105 mV mogu se pripisati reverzibilnoj oksidaciji, odn. redukciji benzokinona^{241,242} kojim je površina silaniziranih titanatnih nanocjevčica bila funkcionalizirana.



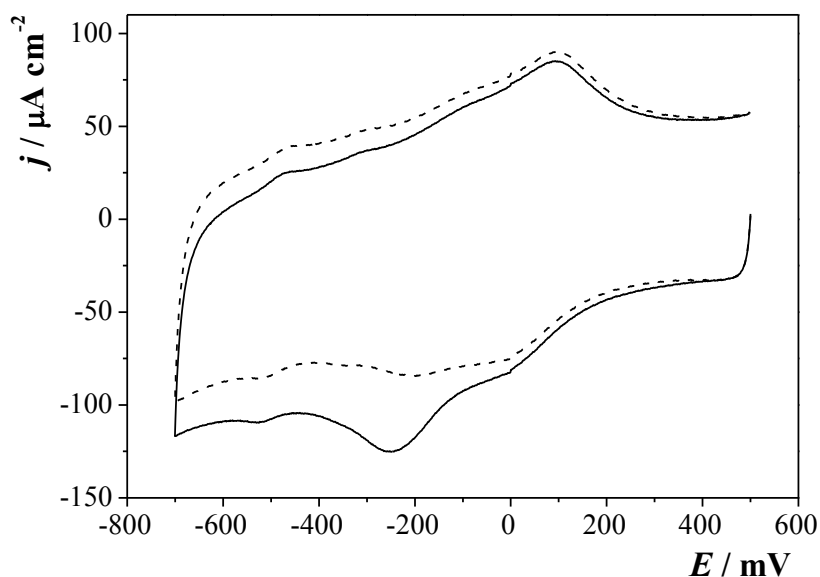
Slika 4.33. Tipična SEM mikrografija vodljivog kompozita grafita i Nafiona u koji su ugrađene titanatne nanocjevčice s imobiliziranom peroksidazom.



Slika 4.34. Osnovna struja na grafitnoj disk-elektrodi modificiranoj s kompozitom grafita i Nafiona snimljena pri brzini promjene potencijala od (a) 20, (b) 50 i (c) 100 mV/s. Osnovni elektrolit: fosfatni pufer, $c(\text{P}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,0$.



Slika 4.35. Ovisnost srednje vrijednosti gustoće kapacitivne struje (j_p) o brzini promjene potencijala (v) na grafitnoj disk-elektrodi modificiranoj s kompozitom grafita i Nafiona. Uvjeti kao na sl. 4.34.

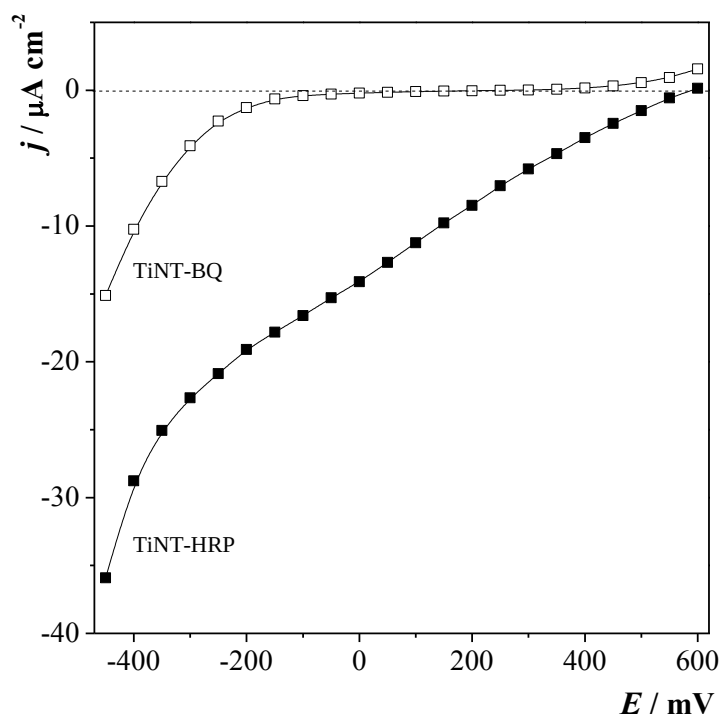


Slika 4.36. Ciklički voltamogram titanatnih nanocjevčica s imobiliziranom peroksidazom ugrađenih u kompozit grafita i *Nafiona*, snimljen u čistom osnovnom elektrolitu (isprekidana crta) i u prisutnosti $1 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ H}_2\text{O}_2$ (puna crta). Osnovni elektrolit: fosfatni pufer, $c(\text{P}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,0$; brzina promjene potencijala: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

rana kako bi se na nju mogla imobilizirati peroksidaza. Katodniji par voltametrijskih maksimuma, koji se javljaju pri otprilike -65 i -220 mV, može se pripisati redoks-prijelazima željeza iz hema peroksidaze između oksidacijskih stanja $+2$ i $+3$.⁹⁴ Posljednju pretpostavku potkrepljuje činjenica da u prisutnosti vodikova peroksida katodni maksimum pri -220 mV značajno poraste, dok se anodni maksimum pri -65 mV smanji (slika 4.36., voltamogram prikazan punom crtom), iz čega proizlazi da elektroaktivna vrsta povezana s navedenim parom voltametrijskih maksimuma katalizira elektrokemijsku redukciju vodikova peroksida. Opisani rezultati upućuju na zaključak da je peroksidaza imobilizirana na titanatne nanocjevčice elektrokemijski aktivna, odnosno da je ugradnjom titanatnih nanocjevčica s imobiliziranom peroksidazom u vodljivi kompozit grafita i *Nafiona* ostvaren efikasni elektronski kontakt između vodljive matrice i redoks-centra imobiliziranog enzima. Kako bi se ta pretpostavka provjerila, u nastavku istraživanja pozornost je usmjerena na elektrokemijsku aktivnost imobilizirane peroksidaze u području potencijala pozitivnijem od 0 V, u kojem dolazi do redukcije *spoja I* i *spoja II*, međuprodukata u prirodnom katalitičkom ciklusu peroksidaze (pogl. 2.1.3.).

Pri dinamičkim mjerenjima kakva su prikazana na slici 4.36. u području potencijala pozitivnijem od 0 mV nije uočena značajnija elektrokemijska aktivnost peroksidaze imobilizirane na titanatne nanocjevčice. Minorno povećanje jakosti katodne struje u području potencijala između 500 i 100 mV u prisutnosti vodikova peroksida moglo bi se pripisati redukciji *spoja I* i *spoja II*, no opažena promjena nalazi se unutar granica reproducibilnosti mjerenja na korištenim elektrodama pa je svaka interpretacija nesigurna. Stoga su daljnja elektrokemijska mjerenja izvedena na rotirajućoj disk-elektrodi, u hidrodinamičkim uvjetima, ali pri konstantnom potencijalu, pri kojem je kapacitivna struja eliminirana, tako da je mjereni strujni odziv elektrode isključivo posljedica faradayskog procesa koji se na njoj zbiva. Dobiveni hidrodinamički voltamogrami, snimljeni u prisutnosti $20 \mu\text{mol/dm}^3$ vodikova peroksida na elektrodi modificiranoj kompozitom grafita i *Nafiona* u koji su bile ugrađene titanatne nanocjevčice funkcionalizirane s *p*-benzokinonom, odn. titanatne nanocjevčice s imobiliziranom peroksidazom, prikazani su na slici 4.37.

Iz prikazanih je hidrodinamičkih voltamograma vidljivo da na elektrodi modificiranoj s titanatnim nanocjevčicama na koje je imobilizirana peroksidaza redukcija vodikova peroksida započinje već pri potencijalu od 500 mV. Pri istim uvjetima redukcija vodikova peroksida na elektrodi modificiranoj s titanatnim nanocjevčicama koje su funkcionalizirane samo s



Slika 4.37. Stacionarni hidrodinamički voltamogrami redukcije H_2O_2 , $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 20 \mu\text{mol dm}^{-3}$, na rotirajućoj disk-elektrodi modificiranoj s titanantnim nanocjevčicama funkcionaliziranima s *p*-benzokinonom (TiNT-BQ), odn. s kovalentno imobiliziranom peroksidazom (TiNT-HRP). Kutna brzina: $\omega = 94,4 \text{ s}^{-1}$. Ostali uvjeti kao na sl. 4.36.

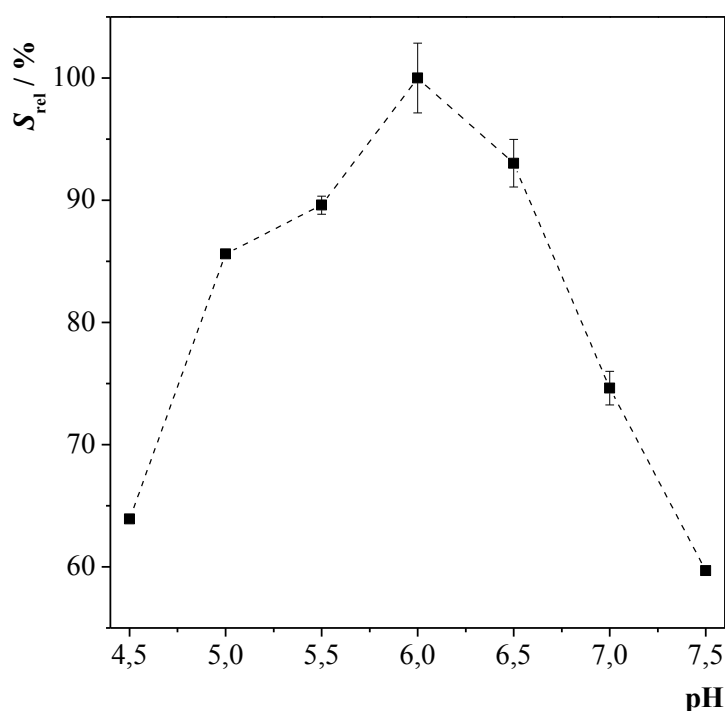
p-benzokinonom (tj. na koje nije imobiliziran enzim) mjerljivom brzinom započinje tek pri potencijalu od -200 mV , što je jasna indikacija da je za opaženi katalitički efekt pri redukciji vodikova peroksida odgovorna peroksidaza imobilizirana na titanatne nanocjevčice. S obzirom da se pri potencijalu od 500 mV od elektroaktivnih vrsti uključenih u katalitički ciklus peroksidaze reducirati mogu jedino *spoj I* i *spoj II*,⁹⁴ peroksidaza imobilizirana na titanatne nanocjevčice očito je zadržala svoju prirodnu katalitičku aktivnost. Stoga se može zaključiti da se redukcija vodikova peroksida na elektrodi modificiranoj s titanatnim nanocjevčicama na koje je imobilizirana peroksidaza odvija bioelektrokatalitičkim mehanizmom prikazanim jednadžbama 2.7.–2.9. (pogl. 2.1.3.), u kojem se redukcija *spoja I* i *spoja II* izvodi izravnim prijenosom elektrona s elektrode na redoks-centar peroksidaze.

S obzirom da na kinetiku izravnog prijenosa elektrona između elektrode i redoks-centra peroksidaze utječe pH,⁹⁴ u nastavku istraživanja određen je optimalni pH pri kojem imobilizirana peroksidaza pokazuje najveću katalitičku aktivnost, odnosno pri kojem je bioelektrokatalitička struja redukcije vodikova peroksida najveća. U tu je svrhu izmjereno kako se pri potencijalu od 0 V s promjenom pH mijenja jakost bioelektrokatalitičke struje redukcije 10 $\mu\text{mol/dm}^3$ vodikova peroksida. Rezultati tih mjerenja prikazani su u tablici 4.18. i na slici 4.38. Dobivena ovisnost bioelektrokatalitičke struje o pH ima karakterističan oblik obrnute parabole s maksimumom pri optimalnoj vrijednosti pH od 6,0. Pri toj su vrijednosti pH provedena sva daljnja mjerenja vezana uz određivanje bioelektrokatalitičkih svojstava peroksidaze imobilizirane na titanatne nanocjevčice.

Da bi molekule peroksidaze imobilizirane na površinu titanatnih nanocjevčica mogle sudjelovati u izravnom prijenosu elektrona, istovremeno moraju biti ispunjena tri uvjeta: (i) molekule peroksidaze imobilizirane na titanatne nanocjevčice trebaju biti u izravnom kontaktu s elektrodom (odn. vodljivom grafitnom matricom), (ii) imobilizacijom se konformacija enzima ne smije toliko promijeniti da se izgubi njegova katalitička aktivnost i (iii) redoks-aktivni centar enzima mora biti u odgovarajućoj orijentaciji prema vodljivom mediju (česticama grafita) koji ga okružuje. Jasno je da sve molekule peroksidaze koje su vezane na površinu titanatnih nanocjevčica ne mogu biti u izravnom kontaktu s česticama grafita koje ih okružuju zbog nehomogene raspodjele nanocjevčica u kompozitu. Stoga se postavlja pitanje u kojem udjelu molekule peroksidaze imobilizirane na površinu titanatnih

Tablica 4.18. Ovisnost jakosti bioelektrokatalitičke struje redukcije H_2O_2 pri potencijalu od 0 V o pH.

pH	$I / \mu\text{A}$	$I / I_{\text{max}} \cdot 100 / \%$
4,5	1,56	63,9
5,0	2,08	85,6
5,5	2,18	89,6
6,0	2,44	100,0
6,5	2,27	93,0
7,0	1,82	74,6
7,5	1,45	59,7



Slika 4.38. Ovisnost jakosti bioelektrokatalitičke struje redukcije H_2O_2 pri potencijalu od 0 V o pH. Na ordinati su prikazane relativne vrijednosti struje, normalizirane prema maksimalnoj struji izmjerenoj pri $pH = 6,0$. Prikazane su srednje vrijednosti i pripadajuće standardne devijacije triju nezavisnih mjerenja. Uvjeti kao na sl. 4.37.

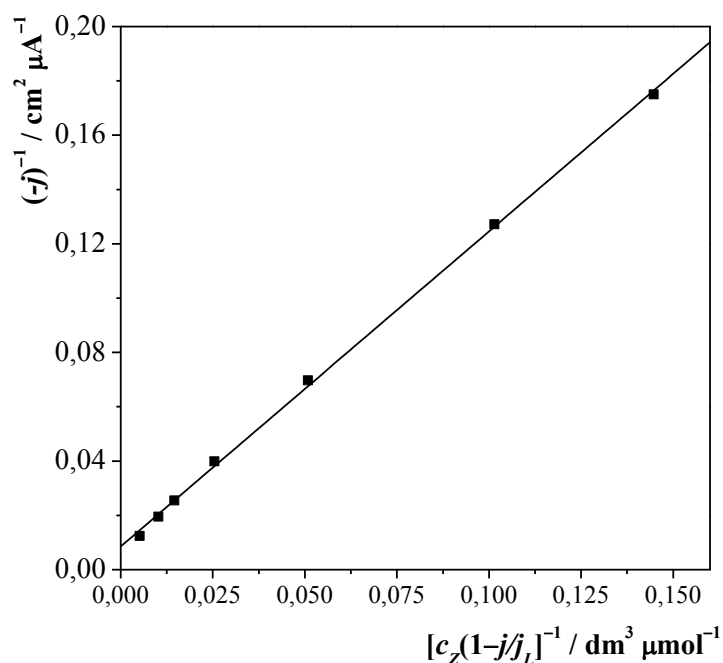
nanocjevčica sudjeluju u izravnom prijenosu elektrona s okolnim vodljivim medijem. Udio molekula peroksidaze aktivnih u izravnom prijenosu elektrona može se izračunati korištenjem modela kojeg su razvili Andreu i suradnici.²⁴³ Model je prvotno bio razvijen za elektrode s peroksidazom adsorbiranom na površinu elektrode u monosloju, no može se primijeniti i za slučaj peroksidaze imobilizirane na čvrsti nosač ugrađen u porozni vodljivi kompozit uz pretpostavku da se koncentracijska polarizacija unutar pora kompozita može zanemariti. Prema navedenom modelu, jakost bioelektrokatalitičke struje redukcije H_2O_2 (j) u stacionarnim uvjetima na rotirajućoj disk-elektrodi dana je relacijom:

$$\frac{2F}{-j} = \frac{K_M}{k_2 \Gamma_{DET}} \cdot \frac{1}{c_{(x=0)}} + \frac{1}{k_e \Gamma_{DET}} \quad (4.17.)$$

gdje je F Faradajeva konstanta, K_M je Michaelisova konstanta, Γ_{DET} je površinska koncentracija molekula peroksidaze koje sudjeluju u izravnom prijenosu elektrona, $c_{(x=0)}$ je

koncentracija H_2O_2 uz površinu elektrode, a k_e je konstanta brzine reakcije za CEC proces opisan jednačinama 2.7.–2.9. (pogl. 2.1.3.). Koncentraciju vodikova peroksida uz površinu elektrode moguće je izračunati iz jakosti stacionarne struje izmjerene na rotirajućoj disk-elektrodi prema relaciji 4.16., kako je objašnjeno u pogl. 4.3.2.

Prema izrazu 4.17., recipročna vrijednost gustoće struje ($1/j$) uslijed bioelektrokatalitičke redukcije H_2O_2 linearno će ovisiti o recipročnoj vrijednosti koncentracije H_2O_2 uz površinu elektrode. Kako bi se na temelju relacije 4.17. odredili parametri Γ_{DET} i k_e , na elektrodi modificiranoj s titanatnim nanocjevčicama na koje je imobilizirana peroksidaza izmjerene su jakosti struje redukcije vodikova peroksida u području koncentracija H_2O_2 od 7 do $195 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Dobiveni podaci prikazani su na slici 4.39. u recipročnim koordinatama prema jednačini 4.17. Kako se iz grafičkog prikaza vidi, ovisnost je linearna. Površinska koncentracija molekula peroksidaze angažiranih u izravnom prijenosu elektrona, Γ_{DET} , može se izračunati iz nagiba dobivenog pravca, koji je jednak $K_M/(2Fk_e\Gamma_{\text{DET}})$, dok se konstanta k_e može izračunati iz odsjeka regresijskog pravca, koji je jednak $1/(2Fk_e\Gamma_{\text{DET}})$.



Slika 4.39. Ovisnost recipročne vrijednosti gustoće struje redukcije H_2O_2 o recipročnoj vrijednosti koncentracije H_2O_2 uz površinu elektrode.

Da bi se moglo izračunati Γ_{DET} , omjer k_2/K_M bi trebao biti poznat. Kako ta vrijednost nije poznata za peroksidazu imobiliziranu na titanatne nanocjevčice ili neki drugi čvrsti nosač, preuzet je pristup Limogesa i suradnika²⁴⁴ koji se temelji na pretpostavci da je stvaranje *spoja I* adsorbiranog na površini elektrode, odnosno u ovom radu stvaranje *spoja I* kod molekula peroksidaze imobiliziranih na titanatne nanocjevčice, jednako brzo kao i u slučaju slobodne peroksidaze (tj. peroksidaze u otopini). Prema literaturnim podacima omjer k_2/K_M iznosi $1,7 \cdot 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$.²⁴³ Iz jednadžbe regresijskog pravca sa slike 4.39. izračunato je da uz navedenu vrijednost k_2/K_M površinska koncentracija molekula peroksidaze imobiliziranih na titanatne nanocjevčice koje sudjeluju u izravnom prijenosu elektrona iznosi $\Gamma_{\text{DET}} = (2,77 \pm 0,03) \cdot 10^{-13} \text{ mol cm}^{-2}$, dok konstanta k_e iznosi $(2,1 \pm 0,3) \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$.

S obzirom da vrijednost omjera k_2/K_M za imobiliziranu peroksidazu najvjerojatnije nije veća od vrijednosti tog omjera za slobodan enzim u otopini, izračunata vrijednost parametara Γ_{DET} predstavlja donju granicu tog parametra, a izračunata vrijednost parametra k_e gornju granicu. To bi značilo da je kod elektroda korištenih u ovom radu površinska koncentracija peroksidaze koja sudjeluje u izravnom prijenosu elektrona najvjerojatnije veća od $2,8 \cdot 10^{-13} \text{ mol cm}^{-2}$. Tu vrijednost svakako treba kritički razmotriti. Za peroksidazu adsorbiranu na planarne elektrode⁸⁰⁻⁸⁴ u literaturi se navode vrijednosti Γ_{DET} između 0,9 i $2,6 \cdot 10^{-13} \text{ mol cm}^{-2}$ pa izgleda nemoguće da se, uz sva ranije spomenuta ograničenja, komparabilna vrijednost površinske koncentracije bioelektrokatalitički aktivne peroksidaze dobije i u slučaju elektroda korištenih u ovom radu. Objašnjenje za tu prividnu nelogičnost najvjerojatnije leži u velikoj poroznosti kompozita grafita i *Nafiona* u koji su ugrađene titanatne nanocjevčice s imobiliziranim peroksidazom. Zbog poroznosti kompozita u bioelektrokatalitičkoj reakciji ne sudjeluju samo molekule peroksidaze koje se nalaze na površini elektrode, već u njoj mogu participirati i molekule smještene dublje u kompozitnom filmu. Stoga izračunata vrijednost parametra Γ_{DET} zapravo predstavlja ukupnu koncentraciju bioelektrokatalitički aktivnih molekula peroksidaze u poroznom filmu pa otuda njegova veća vrijednost od očekivane.

4.3.5. *Analitička svojstva elektroda modificiranih s titanatnim nanocjevčicama s imobiliziranom peroksidazom i N-saliciliden-n-propilaminskim kompleksom željeza(III)*

S obzirom da su elektrode korištene u kinetičkim mjerenjima prikazanim u poglavljima 4.3.2. i 4.3.4. bile priređene na identičan način, tj. u vodljivom kompozitu kojim je bila modificirana njihova površina sadržavale su jednaku količinu modificiranih nanocjevčica, rezultati prikazani u navedena dva poglavlja omogućuju izravnu usporedbu analitičkih svojstava titanatnih nanocjevčica modificiranih s kovalentno vezanom peroksidazom, odnosno N-saliciliden-n-propilaminskim kompleksom željeza(III). Pri niskim koncentracijama vodikova peroksida, pri kojima vrijedi $k_2 \cdot c_{(x=0)} \ll K_M \cdot k_e$, relacija 4.17. reducira se na:

$$j = 2 \cdot F \cdot \frac{k_2}{K_M} \cdot \Gamma_{\text{DET}} \cdot c_{(x=0)} \quad (4.18.)$$

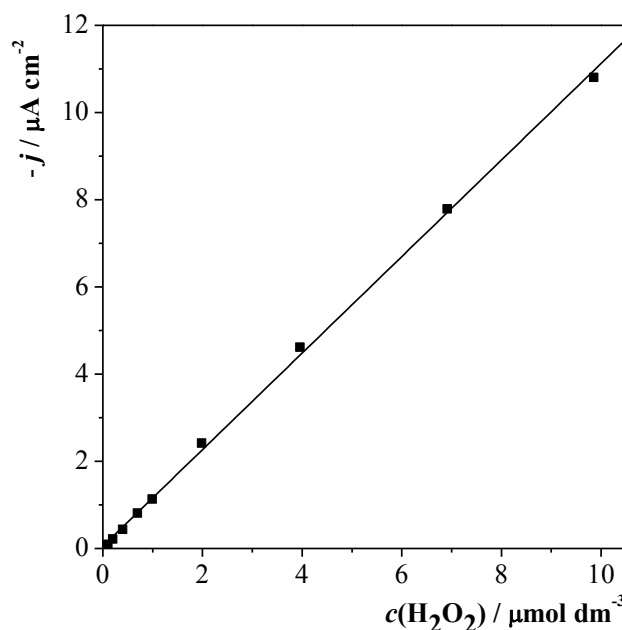
Izraz 4.18. analogan je izrazu 4.15., izvedenom za titanatne nanocjevčice modificirane N-saliciliden-n-propilaminskim kompleksom željeza(III). Usporedbom tih dvaju izraza lako se uočava da je u području linearnog odziva modificiranih elektroda ovisnost jakosti katalitičke struje o koncentraciji vodikova peroksida određena umnoškom konstante brzine reakcije drugog reda (k_h , odn. k_2/K_M) i površinske koncentracije katalizatora (Γ , odn. Γ_{DET}). Za titanatne nanocjevčice modificirane N-saliciliden-n-propilaminskim kompleksom željeza(III) taj umnožak pri potencijalu od 0 V iznosi $1,02 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, a za titanatne nanocjevčice modificirane peroksidazom $4,71 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pa proizlazi da je, prema izmjenjenim kinetičkim parametrima, elektrokatalitička efikasnost titanatnih nanocjevčica s kovalentno vezanom peroksidazom otprilike 4,6 puta veća od elektrokatalitičke efikasnosti titanatnih nanocjevčica modificiranih s N-saliciliden-n-propilaminskim kompleksom željeza(III).

Na slici 4.40. prikazana je ovisnost jakosti bioelektrokatalitičke struje redukcije vodikova peroksida pri 0 V na rotirajućoj disk-elektrodi modificiranoj s titanatnim nanocjevčicama na koje je imobilizirana peroksidaza o koncentraciji H_2O_2 u otopini. U skladu s izrazom 4.18., ovisnost je linearna ($r^2 = 0,9992$) u području množinskih koncentracija vodikova peroksida od 200 nmol dm^{-3} do $10 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ i slijedi ovisnost:

$$j / \text{A cm}^{-2} = (1,11 \pm 0,01) \cdot [c(\text{H}_2\text{O}_2) / \text{mol dm}^{-3}] + 0,05 \pm 0,04$$

Usporedbom s analognim izrazom danim u pogl. 4.3.2. vidljivo je da elektrode modificirane s titanatnim nanocjevčicama na koje je imobilizirana peroksidaza pokazuju 6,5 puta (tj. za faktor $11,1 / 0,171$) veću osjetljivost prema vodikovom peroksidu nego elektrode modificirane nanocjevčicama na koje je imobiliziran *N*-saliciliden-*n*-propilaminski kompleks željeza(III). Taj omjer relativno se dobro slaže s vrijednošću 4,6 predviđenom na temelju izmjerenih kinetičkih parametara.

S obzirom da podaci prikazani na slikama 4.31. i 4.40. zapravo predstavljaju baždarne pravce, njihov nagib odgovara analitičkoj osjetljivosti modificiranih elektroda prema vodikovom peroksidu, a omjer standardne devijacije točaka u odnosu na baždarni pravac i osjetljivosti odgovara granici detekcije (LOD) pri amperometrijskom određivanju vodikova peroksida priređenim elektrodama. Osnovne analitičke karakteristike elektroda modificiranih titanatnim nanocjevčicama s imobiliziranom peroksidazom, odnosno *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III) sumarno su prikazane u tablici 4.19.



Slika 4.40. Ovisnost jakosti struje uslijed elektrokatalitičke redukcije H_2O_2 na rotirajućoj disk-elektrodi modificiranoj s titanatnim nanocjevčicama s površinski imobiliziranom peroksidazom o koncentraciji H_2O_2 u otopini. Uvjeti mjerenja kao na slici 4.31.

Tablica 4.19. Analitičke karakteristike elektroda modificiranih s titanatnim nanocjevčicama s imobiliziranom peroksidazom (HRP), odn. *N*-salisiliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III) ($\text{Fe}(\text{Salp})_2$) pri amperometrijskom određivanju vodikova peroksida

	HRP	$\text{Fe}(\text{Salp})_2$
osjetljivost / $\text{A M}^{-1} \text{cm}^{-2}$	1,11	0,17
LOD / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	0,035	55
granica linearnosti	10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$	6 mmol dm^{-3}

Iz dosad prikazanih podataka jasno je da titanatne nanocjevčice modificirane s peroksidazom pokazuju bolja elektrokatalitička svojstva pri redukciji vodikova peroksida i superiornije analitičke karakteristike pri njegovom određivanju no titanatne nanocjevčice modificirane *N*-salisiliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III). Vrlo visoka osjetljivost prema vodikovom peroksidu i nizak limit detekcije od 35 nmol dm^{-3} čini ih naročito prikladnima za uporabu u amperometrijskim pretvornicima u biosenzorima temeljenim na oksidazama, s obzirom da je kod takvih biosenzora koncentracija vodikova peroksida kojeg je potrebno detektirati najčešće izuzetno mala. Analitičke karakteristike priređenih elektroda modificiranih s titanatnim nanocjevčicama s imobiliziranom peroksidazom uspoređene su u tablici 4.20. s analitičkim karakteristikama drugih reprezentativnih amperometrijskih senzora za vodikov peroksid opisanima u literaturi, kod kojih je peroksidaza bila imobilizirana na planarnu elektrodu ili neki drugi čvrsti nosač. Kao što je vidljivo iz tablice, elektrode izrađene u ovom radu pokazivale su otprilike jedan do tri reda veličine veću osjetljivost prema vodikovom peroksidu nego većina senzora prikazana u tablici 4.20. te jedan do dva reda veličine nižu granicu određivanja. Većina senzora prikazanih u tablici 4.20. zahtijevala je radne potencijale negativnije od -200 mV prema Ag/AgCl elektrodi, što je indicacija da se katalitički ciklus tih senzora temeljio na oksidaciji i redukciji željeza iz hema između oksidacijskih stanja $+2$ i $+3$, a ne na prirodnom katalitičkom ciklusu peroksidaze, koji uključuje nastajanje *spoja I* i *spoja II*. Iz razloga navedenih u Literaturnom pregledu (pogl. 2.1.3.), analitička primjenjivost takvih senzora je upitna zbog izražene interferencije molekulskog kisika otopljenog u uzorku pri radnom potencijalu senzora. Gubitak nativnih katalitičkih svojstava peroksidaze kod tih je senzora vjerojatno uzrokovan deformacijama globule enzima prilikom njegove imobilizacije na elektrodu, do čega ne dolazi u slučaju imo-

Tablica 4.20. Usporedba analitičkih karakteristika elektroda modificiranih s titanatnim nanocjevčicama s kovalentno imobiliziranom peroksidazom i drugih reprezentativnih amperometrijskih senzora za vodikov peroksid

Nosač za imobilizaciju HRP	Osjetljivost / $A\ dm^3\ mol^{-1}\ cm^{-2}$	Linearnost / $\mu mol\ dm^{-3}$	Granica detekcije / $\mu mol\ dm^{-3}$	E / V	Ref.
površinski modificirane titanatne nanocjevčice	1,01	do 10	0,035	0 ^a	Ova disertacija
polimerna mreža temeljena na Au-česticama	$4,98 \cdot 10^{-4}$	$5 - 1,1 \cdot 10^3$	1,5	0 ^b	245
mezoporozni SnO ₂ i TiO ₂	1,07	1 – 20	0,04 (SnO ₂) 1,0 (TiO ₂)	–0,2 ^c	246
nanosfere od organosilikat / kitozana	0,05	$0,7 - 2,8 \cdot 10^3$	0,25	–0,4 ^d	247
mezoporozne šuplje silikatne sfere	0,56	3,9 – 140	1,2	–0,2 ^c	99
mreža TiO ₂ nanocjevčica	--- ^g	0,5 – 10	0,10	–0,2 ^d	248
Kompozit aluminosilikat/kitozan	0,17	2 – 75	0,7	–0,4 ^d	249
SWCNT ^h	0,245	---	0,05	0 ^d	250
MWCNT ⁱ i N-dopirane CNT ^j	0,065 (MWCNT) 0,163 (N-CNT)	---	1 (MWCNT) 2 (N-CNT)	–0,6 ^e	251
CNT modificirane s metilenskim plavilom	0,661	20 – 400	0,1	–0,3 ^d	252
SWCNT modificirane s DNK	0,62	$0,6 - 1,8 \cdot 10^3$	0,3	–0,3 ^b	253
SWCNT modificirane s kationskim surfaktantom (CTAB)	1,88	12,3 – 145	3,7	–0,4 ^d	254
HRP adsorbirana na planarnu grafitnu elektrodu	0,41	---	0,05	0 ^b	255
N _{His} HRP adsorbirana na planarnu Au ili Ag elektrodu	2,0	---	0,01	–0,05 ^f	92

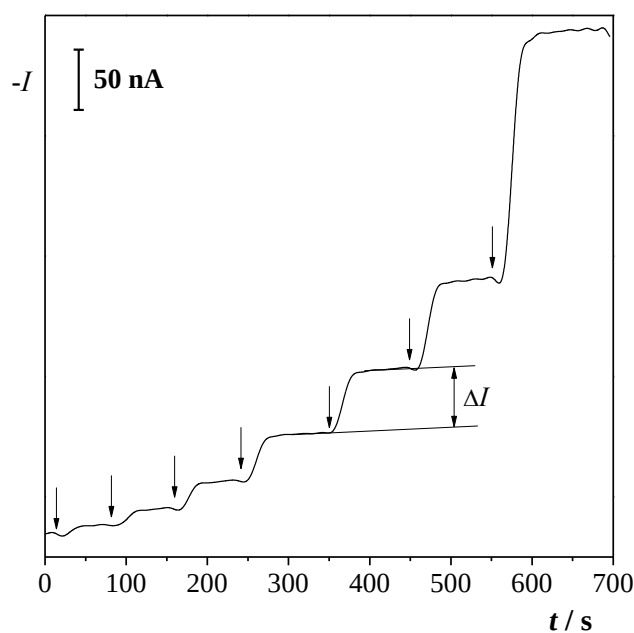
^a vs. Hg/Hg₂Cl₂/3.5M KCl ^b vs. Ag/AgCl/3M KCl ^c vs. Ag/AgCl (c(KCl) nije navedeno) ^d vs. SCE

^e vs. Hg/Hg₂SO₄/K₂SO₄, zas. ^f vs. Ag/AgCl/0.1M KCl ^g --- = nije navedeno ^h SWCNT = ugljikove nanocjevčice s jednom stijenkom ⁱ MWCNT = ugljikove nanocjevčice s više stijenki ^j CNT = ugljikove nanocjevčice

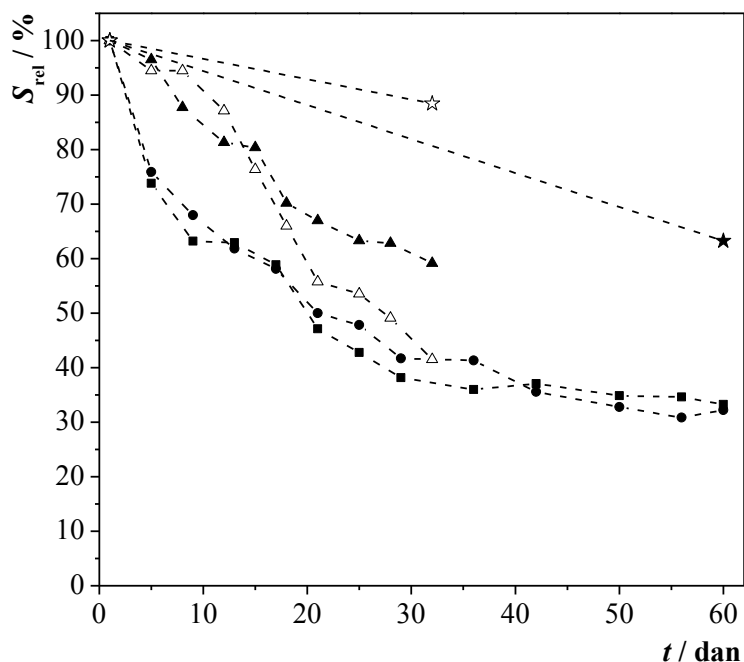
bilizacije peroksidaze na titanatne nanocjevčice na način opisan u ovome radu, kako su to pokazali rezultati kinetičkih istraživanja opisani u prethodnom poglavlju. Vrijedno je napomenuti da u pogledu analitičkih karakteristika elektrode priređene u ovom radu ulaze u sam vrh analitičkih performansi dosad ostvarenih s amperometrijskim senzorima za vodikov peroksid. Po osjetljivosti, granici određivanja i radnom potencijalu elektrode modificirane s titanatnim nanocjevčicama s kovalentno vezanom peroksidazom mogu se usporediti s elektrodama temeljenim na peroksidazi adsorbiranoj na planarnu grafitnu elektrodu te se približavaju analitičkim karakteristikama elektroda s N_{His}-rekombiniranom peroksidazom adsorbiranom na srebrnu elektrodu.^{92,255}

Osim dosad prikazanih analitičkih karakteristika, za primjenu u amperometrijskim biosenzorima bitna je i brzina odziva pretvornika te njegova vremenska stabilnost. Amperometrijski odziv elektrode modificirane s titanatnim nanocjevčicama na koje je imobilizirana peroksidaza na uzastopne dodatke vodikova peroksida u mjernu ćeliju prikazuje slika 4.41. Iz prikazanog amperograma vidljivo je da je odziv elektrode vrlo brz, tipično kraći od 15 s, čak i pri niskim mikromolarnim koncentracijama vodikova peroksida. Također, primjećuje se da je odziv elektrode stabilan, kako pri niskim koncentracijama H₂O₂, tako i u području koncentracija vodikova peroksida pri kojima je odziv već izrazito nelinearan. Vremenska stabilnost modificiranih elektroda praćena je na skupu od šest elektroda priređenih istovremeno i na jednak način te iz iste šarže titanatnih nanocjevčica s imobiliziranom peroksidazom. Elektrodama je u određenim vremenskim intervalima određivana osjetljivost snimanjem baždarnog dijagrama vodikovog peroksida, a između mjerenja elektrode su čuvane uronjene u fosfatni pufer, $c(P) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 6,0. Elektrode su skladištene u mraku, pri temperaturi od 4 °C. Promjena osjetljivosti ispitivanih elektroda tijekom dva mjeseca skladištenja prikazana je na slici 4.42. Vidljivo je da se elektrodama osjetljivost najbrže mijenja tijekom prvih 2-3 tjedna skladištenja, tijekom kojih im se osjetljivost smanji za otprilike 40–50 %. Nakon tog perioda osjetljivost senzora se sporije mijenja, da bi se nakon mjesec dana skladištenja ustabilila na otprilike 40 % početne vrijednosti. Elektrodama koje tijekom skladištenja nisu korištene osjetljivost se u istom periodu znatno manje promijenila, za svega 10 % tijekom prvih mjesec dana skladištenja, odnosno 30 % nakon dva mjeseca skladištenja.

S obzirom da su elektrode s titanatnim nanocjevčicama na koje je kovalentno vezana peroksidaza pokazale analitičke karakteristike slične elektrodama s peroksidazom adsorbira-



Slika 4.41. Tipičan amperometrijski odziv na H_2O_2 elektrode modificirane s titanatnim nanocjevčicama s površinski imobiliziranom peroksidazom. Strelicama su označeni dodaci standarda H_2O_2 . Koncentracija H_2O_2 u mjernoj ćeliji: 1, 4, 10, 40, 100, 200 i 500 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Osnovni elektrolit: fosfatni pufer, $c(\text{P}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6,0$; radni potencijal: $E = 0 \text{ V}$.



Slika 4.42. Vremenska stabilnost amperometrijskog pretvornika za vodikov peroksid temeljenog na peroksidazi imobiliziranoj na titanatne nanocjevčice.

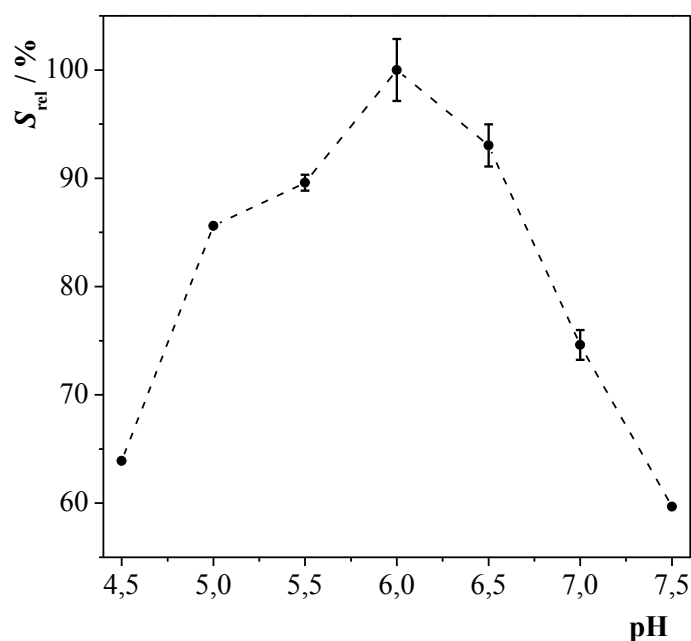
nom na grafitnu ili srebrnu elektrodu, zanimljivo je te elektrode usporediti s obzirom na njihovu vremensku stabilnost. Kao što je upravo opisano, elektrode izvedene u ovom radu uporabljiv odziv pokazivale su i nakon dva mjeseca skladištenja i uporabe. Kod elektroda s peroksidazom adsorbiranom na grafit opažen je gubitak osjetljivosti od otprilike 80 % tijekom samo dva dana skladištenja.²⁵⁵ Nešto bolju stabilnost pokazivale su elektrode s rekombiniranom peroksidazom adsorbiranom na srebrnu elektrodu, no i kod njih je primijećen gubitak osjetljivosti od 80 % tijekom prvih osam dana korištenja.⁹² Poboljšana vremenska stabilnost kod elektroda s peroksidazom imobiliziranom na titanatne nanocjevčice može se pripisati kovalentnoj imobilizaciji enzima, koja stabilizira enzim i sprečava njegovu degradaciju i ispiranje s površine elektrode.

4.3.6. Primjena titanatnih nanocjevčica s imobiliziranom peroksidazom u analizi realnih uzoraka

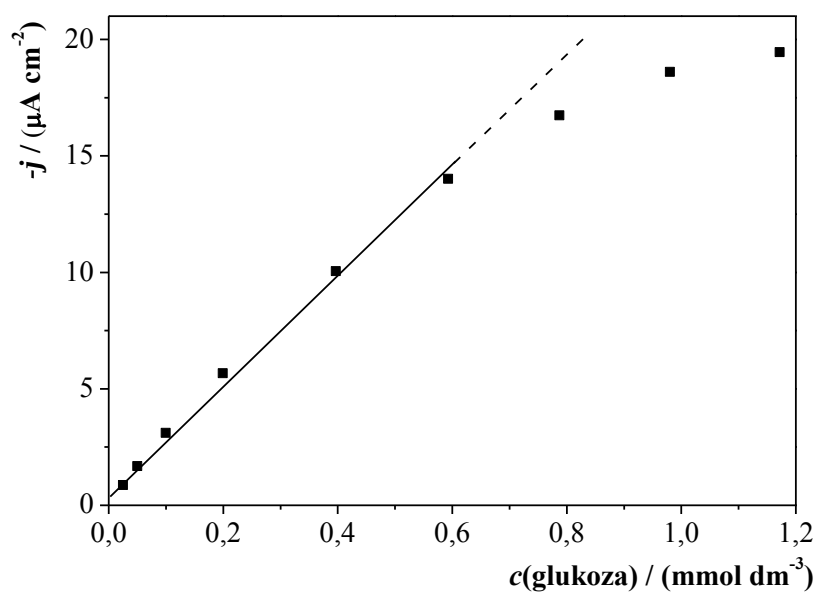
Kako bi se u konačnici istražila primjenjivost titanatnih nanocjevčica s kovalentno imobiliziranom peroksidazom u analizi realnih uzoraka, konstruiran je amperometrijski biosenzor za glukozu, na način da je u istu vodljivu matricu u koju su ugrađene titanatne nanocjevčice s imobiliziranom peroksidazom imobiliziran i enzim glukoza-oksida (pogl. 3.4.4.). Konstruirani biosenzor potom je uporabljen za analizu realnih uzoraka voćnih sokova i osvježavajućih napitaka. U opisanom biosenzoru titanatne nanocjevčice s imobiliziranom peroksidazom ugrađene u vodljivu matricu imale su funkciju amperometrijskog pretvornika osjetljivog na vodikov peroksid, a analize realnih uzoraka provedene su s ciljem provjere selektivnosti pretvornika, tj. njegove imunosti na prisutnost potencijalnih interferenata (npr. molekularni kisik, askorbinska kiselina, polifenoli...) u realnim uzorcima.

Prije provođenja analiza realnih uzoraka izvedenom biosenzoru određeno je optimalno radno područje pH, te osjetljivost i linearnost. Rezultati tih mjerenja prikazani su na slikama 4.43. i 4.44. Ovisnost odziva biosenzora o pH vrlo je slična opaženoj pH-ovisnosti odziva elektroda modificiranih samo s titanatnim nanocjevčicama s imobiliziranom peroksidazom (slika 4.38.) pa se može zaključiti da ovisnost odziva o pH kod izvedenog glukoznog biosenzora gotovo u potpunosti određuje pretvornik. Ovisnost odziva biosenzora o koncentraciji glukoze linearna je u području 25–600 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ($r^2 = 0,9986$) i slijedi relaciju:

$$I / \text{mA cm}^{-2} = (23,0 \pm 0,7) \cdot [c(\text{glukoza}) / \text{mol dm}^{-3}] + 0,7 \pm 0,2$$



Slika 4.43. Ovisnost katodne struje glukoznog biosenzora u prisutnosti $250 \mu\text{mol dm}^{-3}$ glukoze i pri potencijalu od 0 V o pH. Na ordinati su prikazane relativne vrijednosti struje, normalizirane prema maksimalnoj struji izmjerenoj pri $\text{pH} = 6,0$. Prikazane su srednje vrijednosti i pripadajuće standardne devijacije triju nezavisnih mjerenja. Osnovni elektrolit: fosfatni pufer, $c(\text{P}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$.



Slika 4.44. Baždarni dijagram glukoznog biosenzora pri radnom potencijalu od 0 V i pri pH 6,0. Ostali uvjeti kao na slici 4.43.

Za analizu su realni uzorci priređeni samo razrjeđivanjem s vodom, bez ikakve druge predobrade. Analiza je izvedena metodom standardnog dodatka, a kao referentna metoda za određivanje glukoze u uzorcima korištena je enzimska spektrofotometrijska metoda s komercijalnim kitovima koji su sadržavali glukoza-oksidazu, peroksidazu i prikladan kromogeni reagens. Sve analize izvedene su u triplicatu. Rezultati analiza prikazani su u tablici 4.21. Kao što je iz tablice vidljivo, relativna pogreška analize biosenzorom uglavnom se kretala unutar granica od $\pm 2,5$ %, osim kod uzoraka s vrlo niskom koncentracijom glukoze, kada je pogreška očekivano i bila veća, no niti tada, s izuzetkom jednog uzorka, nije premašila ± 5 %. S obzirom da odabrani realni uzorci sadrže askorbinsku kiselinu i polifenole, koji su lako oksidabilni i mogu interferirati pri određivanju vodikova peroksida s biosenzorima temeljenima na peroksidazi u slučaju da je aktivni centar peroksidaze uslijed imobilizacije ili adsorpcije eksponiran više no što je to slučaj u nativnom enzimu, opisano dobro slaganje rezultata analize provedenih glukoznim biosenzorom i referentnom metodom ukazuju kako je peroksidaza i nakon imobilizacije na titanatne nanocjevčice očuvala svoju prirodnu konformaciju i visoku selektivnost.

Tablica 4.21. Rezultati analiza realnih uzoraka voćnih sokova i osvježavajućih napitaka glukoznim biosenzorom i referentnom spektrofotometrijskom metodom

Uzorak	$\gamma(\text{glukoza})_{\text{biosenzor}} / \text{g dm}^{-3}$	$\gamma(\text{glukoza})_{\text{ref. metoda}} / \text{g dm}^{-3}$	relativna pogreška / %
1	$27,0 \pm 0,1$	$26,4 \pm 0,2$	-2,3
2	$40,0 \pm 0,3$	$40,8 \pm 0,6$	2,0
3	$57,4 \pm 0,5$	$57,0 \pm 1,0$	-0,7
4	$14,6 \pm 0,0$	$14,7 \pm 0,1$	0,7
5	$23,1 \pm 0,1$	$23,5 \pm 0,1$	1,7
6	$32,0 \pm 0,2$	$32,4 \pm 0,4$	1,2
7	$13,9 \pm 0,1$	$13,4 \pm 0,1$	-3,7
8	$22,8 \pm 0,0$	$22,2 \pm 0,1$	-2,7
9	$32,4 \pm 0,2$	$31,0 \pm 0,3$	-4,5
10	$1,9 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,4$	9,5
11	$3,4 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,4$	-3,0
12	$4,6 \pm 0,2$	$4,4 \pm 0,4$	-4,5

§ 5. ZAKLJUČAK

U radu su titanatne nanocjevčice s uspjehom sintetizirane reakcijom anatasa s koncentriranom vodenom otopinom NaOH u uvjetima refluksa i ionskom izmjenom prevedene u protonirani oblik. Sintetizirane nanocjevčice imale su višeslojnu stijenku, bile su vanjskog promjera između 8 i 10 nm i duljine između nekoliko stotina nm i nekoliko μm , specifične površine od $266 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ i ukupnog specifičnog volumena pora od $0,90 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Struktura dobivenih nanocjevčica odgovarala je strukturi trititanatne kiseline ($\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$), s molekulama vode interkaliranim između slojeva koji formiraju stijenku nanocjevčice.

Titanatne nanocjevčice moguće je funkcionalizirati površinskim amino skupinama reakcijom s (3-aminopropil)trimetoksisilanom (APTMS) u aprotičnom mediju, pri blagim reakcijskim uvjetima ($T \sim 298 \text{ K}$), bez prethodne dehidratacije nanocjevčica. Reakcija kondenzacije APTMS s površinskim OH-skupinama titanatnih nanocjevčica vrlo je brza ($t_{0,5} = 8,9 \text{ min}$) i rezultira s površinskom koncentracijom primarnih amino skupina, $\Gamma_{\text{max}}(\text{NH}_2) = 6,5 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$, odn. sadržajem NH_2 -skupina, $Q_{\text{max}}(\text{NH}_2) = 0,86 \text{ mmol g}^{-1}$.

Površinske amino skupine titanatnih nanocjevčica modificiranih s APTMS lako su dostupne za daljnje reakcije i mogu se iskoristiti kao reaktivna mjesta za kovalentnu imobilizaciju redoks-enzima peroksidaze (HRP), odn. kovalentno vezanje *N*-saliciliden-*n*-propilaminskog kompleksa željeza(III) na površinu titanatnih nanocjevčica. Imobilizacijom peroksidaze na površinu titanatnih nanocjevčica modificiranih s APTMS pomoću *p*-benzokinona kao bifunkcionalnog reagensa dobivaju se nanocjevčice čija je površina pokrivena gustim monoslojem peroksidaze ($\Gamma(\text{HRP}) = 2,4 \cdot 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$, $Q(\text{HRP}) = 140 \text{ mg g}^{-1}$), pri čemu peroksidaza zadržava svoju katalitičku aktivnost. Modificiranje titanatnih nanocjevčica *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III) moguće je postići kondenzacijom salicilaldehida s površinskim NH_2 -skupinama nanocjevčica modificiranih s APTMS te kompleksiranjem kationa metala s na taj način formiranim površinskim *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim ligandima. Modificiranjem titanatnih nanocjevčica na opisan način dobivaju se nanocjevčice s površinskom koncentracijom kompleksa, $\Gamma = 3,2 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$.

Ugrađivanjem titanatnih nanocjevčica s imobiliziranom peroksidazom u vodljivi kompozit grafita i Nafiona postiže se efikasna elektronska komunikacija između redoks-centra imobiliziranog enzima i okolne vodljive matrice, karakterizirana konstantom brzine prijelaza elektrona, $k_e = (2,1 \pm 0,3) \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ te prividnom površinskom koncentracijom elektrokemijski aktivnih molekula peroksidaze, $\Gamma_{\text{DET}}(\text{HRP}) = (2,77 \pm 0,03) \cdot 10^{-13} \text{ mol cm}^{-2}$.

Na taj je način moguće realizirati amperometrijski biosenzor treće generacije za određivanje vodikova peroksida, kojeg karakterizira vrlo visoka osjetljivost ($S = 1,1 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$), niska granica detekcije ($\text{LOD} = 0,035 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$), linearnost unutar područja koncentracija vodikova peroksida od preko dva reda veličine ($0,05\text{--}10 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$), brzi odziv ($t_{95\%} < 15 \text{ s}$) te izuzetno dobra vremenska stabilnost i trajnost ($t_{0,5} \sim 25 \text{ dana}$), po prvi puta ostvarena kod biosenzora treće generacije temeljenih na peroksidazi.

Područje analitičke primjene opisanog amperometrijskog biosenzora za vodikov peroksid može se proširiti ugrađivanjem enzima iz grupe oksidaza u polimernu matricu vodljivog kompozita u koji su ugrađene titanatne nanocjevčice s imobiliziranom peroksidazom. Na taj je način moguće realizirati dvoenzimski biosenzor za određivanje supstrata oksidaze, u kojem titanatne nanocjevčice s imobiliziranom peroksidazom preuzimaju funkciju amperometrijskog pretvornika za detekciju vodikova peroksida nastalog u oksidazom kataliziranoj pretvorbi analita. Glukozni biosenzor temeljen na glukoza oksidazi i izveden na opisan način pokazao je dobre analitičke karakteristike ($S = 23 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, linearno područje $20 - 600 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) i vrlo visoku selektivnost, koja omogućuje njegovu primjenu u analizi realnih uzoraka kompleksnog sastava.

Ugrađivanjem titanatnih nanocjevčica s površinski vezanim *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III) u vodljivu matricu ostvaruje se efikasan prijenos elektrona između vodljive matrice i centralnog metalnog iona kompleksa. *N*-saliciliden-*n*-propilaminski kompleks željeza(III) imobiliziran na površinu titanatnih nanocjevčica pokazao je izraženu katalitičku aktivnost pri elektrokemijskoj redukciji vodikova peroksida (konstanta brzine heterogene katalitičke reakcije, $k_h = 4,67 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) koja započinje već pri potencijalu od $0,3 \text{ V}$ prema Ag/AgCl elektrodi. Analitičke karakteristike amperometrijskog senzora za vodikov peroksid temeljenog na titanatnim nanocjevčicama s imobiliziranim *N*-saliciliden-*n*-propilaminskim kompleksom željeza(III) pokazale su se lošijima no u slučaju senzora temeljenog na peroksidazi ($S = 0,171 \text{ A M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, linearno područje $0,1 - 6 \text{ mmol dm}^{-3}$), no senzor je pokazivao stabilan odziv i pri vrlo visokim koncentracijama vodikova peroksida ($c \approx 5 \text{ mmol dm}^{-3}$), pri kojima rad biosenzora temeljenih na peroksidazi nije moguć.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. A. Hulanicki, S. Glab i F. Ingman, *Pure Appl. Chem.* **63** (1991) 1247-1250.
2. P. Gründler, *Chemical sensors: an introduction for scientists and engineers*, Springer, 2007.
3. D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst i G. S. Wilson, *Pure Appl. Chem.* **71** (1999) 2333-2348.
4. D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst i G. S. Wilson, *Biosens. Bioelectron.* **16** (2001) 121-131.
5. L. Vial i P. Dumy, *New J. Chem.* **33** (2009) 939-946.
6. M. Hussain, J. Wackerlig i P. A. Lieberzeit, *Biosensors* **3** (2013) 89-107.
7. (a) H. Ju, X. Zhang i J. Wang, u *NanoBiosensing: Principles, Development and Application*, Springer Science & Business Media, San Diego, 2011, str. 147-240; (b) *ibid.*, str. 1-34.
8. P. R. Solanki, A. Kaushik, V. V. Agrawal i B. D. Malhotra, *NPG Asia Materials* **3** (2011) 17-24.
9. A. Sassolas, L. J. Blum i B. D. Leca-Bouvier, *Biotechnol. Adv.* **30** (2012) 489-511.
10. D. Samanta i A. Sarkar, *Chem. Soc. Rev.* **40** (2011) 2567-2592.
11. S. A. Ansari i Q. Husain, *Biotechnol. Adv.* **30** (2012) 512-523.
12. (a) D. V. Bavykin i F. C. Walsh, *Titanate and Titania Nanotubes: Synthesis, Properties and Applications*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2009, (b) str. 100.
13. N. S. Venkataramanan, G. Kuppuraj i S. Rajagopal, *Coord. Chem. Rev.* **249** (2005) 1249-1268.
14. Y. W. Liou i C. M. Wang, *J. Electroanal. Chem.* **481** (2000) 102-109.
15. V. K. Sivasubramanian, M. Ganesan, S. Rajagopal i R. Ramaraj, *J. Org. Chem.* **67** (2002) 1506-1514.
16. A. M. Aslam, S. Rajagopal, M. Vairamani i M. Ravikumar, *Transition Met. Chem. (London)* **36** (2011) 751-759.
17. J. Fraden, *Chemical sensors*, Springer, 2010, str. 569-606.
18. B. J. Privett, J. H. Shin i M. H. Schoenfish, *Anal. Chem.* **82** (2010) 4723.
19. U. Guth, W. Vonau i J. Zosel, *Meas. Sci. Technol.* **20** (2009).
20. J. Janata, *Principles of chemical sensors*, Springer, 2009.
21. A. Sadana i N. Sadana, *Handbook of biosensors and biosensor kinetics*, Elsevier Science, 2010, str. 15-33.
22. P. D'Orazio, *Clin. Chim. Acta* **412** (2011) 1749-1761.
23. J. H. T. Luong, K. B. Male i J. D. Glennon, *Biotechnol. Adv.* **26** (2008) 492-500.
24. F. Lisdat i D. Schäfer, *Anal. Bioanal. Chem.* **391** (2008) 1555-1567.
25. M. I. Prodromidis, *Electrochim. Acta* **55** (2010) 4227-4233.
26. K. K. Mistry, K. Layek, A. Mahapatra, C. Roy Chaudhuri i H. Saha, *Analyst* **139** (2014) 2289-2311.
27. D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös i E. Reimhult, *Sensors* **8** (2008) 1400-1458.
28. D. W. Kimmel, G. LeBlanc, M. E. Meschievitz i D. E. Cliffel, *Anal. Chem.* **84** (2011) 685-707.
29. Y. C. Lee i M. H. Huh, *J. Food Biochem.* **23** (1999) 173-185.
30. T. Ahuja, I. A. Mir, D. Kumar i Rajesh, *Sens. Actuators B* **134** (2008) 140-145.
31. S. S. M. Hassan, A. F. El-Baz i H. S. M. Abd-Rabboh, *Anal. Chim. Acta* **602** (2007) 108-113.
32. S. Setzu, S. Salis, V. Demontis, A. Salis, M. Monduzzi i G. Mula, *Phys. Status Solidi A* **204** (2007) 1434-1438.

33. J. Peter, W. Hutter, W. Stöllnberger, F. Karner i W. Hampel, *Anal. Chem.* **69** (1997) 2077-2079.
34. S. Borgmann, A. Schulte, S. Neugebauer i W. Schuhmann, u R. E. Alkire, D. M. Kolb i J. Lipkowski (ur.), *Amperometric Biosensors*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, 2011, str. 1-83.
35. L. C. J. Clark i C. Lyons, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102** (1962) 29-45.
36. V. G. Prabhu, L. R. Zarapkar i R. G. Dhaneshwar, *Electrochim. Acta* **26** (1981) 725-729.
37. J. J. Lingane i P. J. Lingane, *J. Electroanal. Chem.* **5** (1963) 411-419.
38. S. Miyamoto, T. Murakami, A. Saito i J. Kimura, *Biosens. Bioelectron.* **6** (1991) 563-567.
39. H. B. Dunford i B. B. Hasinoff, *Biochemistry* **9** (1970) 4930-4939.
40. A. K. M. Kafi i A. Chen, *Talanta* **79** (2009) 97-102.
41. F. Palmisano, A. Guerrieri, M. Quinto i P. G. Zambonin, *Anal. Chem.* **67** (1995) 1005-1009.
42. A. A. Karyakin, O. V. Gitelmacher i E. E. Karyakina, *Anal. Chem.* **67** (1995) 2419-2423.
43. J. Wang, P. V. Pamidi, C. L. Renschler i C. White, *J. Electroanal. Chem.* **404** (1996) 137-142.
44. J. Wang, u A. Mulchandani i K. R. Rogers (ur.), *Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols*, Humana Press, 1998, str. 133-141.
45. M. J. Lobo, A. J. Miranda i P. Tuñón, *Electroanalysis* **9** (1997) 191-202.
46. I. Kataki i E. Domínguez, *Microchim. Acta* **126** (1997) 11-32.
47. A. Chaubey i B. D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.* **17** (2002) 441-456.
48. Y. Wu i S. Hu, *Microchim. Acta* **159** (2007) 1-17.
49. R. A. Marcus i N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **811** (1985) 265-322.
50. S. Liu i H. Ju, *Biosens. Bioelectron.* **19** (2003) 177-183.
51. A. Guiseppi-Elie, C. Lei i R. H. Baughman, *Nanotechnology* **13** (2002) 559-564.
52. T. Nöll i G. Nöll, *Chem. Soc. Rev.* **40** (2011) 3564-3576.
53. G. F. Khan, M. Ohwa i W. Wernet, *Anal. Chem.* **68** (1996) 2939-2945.
54. L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F. D. Munteanu, T. Ruzgas i I. Gazaryan, *Anal. Chim. Acta* **400** (1999) 91-108.
55. N. C. Veitch, *Phytochemistry* **65** (2004) 249-259.
56. M. Gajhede, D. J. Schuller, A. Henriksen, A. T. Smith i T. L. Poulos, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **4** (1997) 1032-1038.
57. (a) P. R. Ortiz de Montellano, u E. Torres i M. Ayala (ur.), *Biocatalysis based on heme peroxidases: peroxidases as potential industrial biocatalysts*, Springer Science & Business Media, Heidelberg, 2010, str. 80-86; (b) B. Valderrama, u *ibid.*, str. 291-298; (c) M. Ayala, u *ibid.*, str. 61-73.
58. I. Yamazaki i K.-n. Yokota, *Mol. Cell. Biochem.* **2** (1973) 39-52.
59. A. S. Ahammad, *J. Biosens. Bioelectron.* **S9:001** (2013) 1-11.
60. C. Lei i J. Deng, *Anal. Chem.* **68** (1996) 3344-3349.
61. V. S. Tripathi, V. B. Kandimalla i H. Ju, *Biosens. Bioelectron.* **21** (2006) 1529-1535.
62. J. Li, S. N. Tan i H. Ge, *Anal. Chim. Acta* **335** (1996) 137-145.
63. B. Wang, B. Li, Z. Wang, G. Xu, Q. Wang i S. Dong, *Anal. Chem.* **71** (1999) 1935-1939.
64. H. Liu, T. Ying, K. Sun, H. Li i D. Qi, *Anal. Chim. Acta* **344** (1997) 187-199.
65. S. S. Razola, B. L. Ruiz, N. M. Diez, H. Mark i J. Kauffmann, *Biosens. Bioelectron.* **17** (2002) 921-928.
66. N. G. Mathebe, A. Morrin i E. I. Iwuoha, *Talanta* **64** (2004) 115-120.
67. A. Mulchandani i S. Pan, *Anal. Biochem.* **267** (1999) 141-147.
68. M. Şenel, E. Çevik i M. F. Abasıyanık, *Sens. Actuators B* **145** (2010) 444-450.

69. M. Vreeke, R. Maidan i A. Heller, *Anal. Chem.* **64** (1992) 3084-3090.
70. S. Gaspar, K. Habermüller, E. Csöregi i W. Schuhmann, *Sens. Actuators B* **72** (2001) 63-68.
71. B. Wang i S. Dong, *Talanta* **51** (2000) 565-572.
72. J. Wang, P. V. Pamidi i D. S. Park, *Anal. Chem.* **68** (1996) 2705-2708.
73. M. Darder, K. Takada, F. Pariente, E. Lorenzo i H. Abruna, *Anal. Chem.* **71** (1999) 5530-5537.
74. J. M. Abad, M. Vélez, C. Santamaría, J. M. Guisán, P. R. Matheus, L. Vázquez, I. Gazaryan, L. Gorton, T. Gibson i V. M. Fernández, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 12845-12853.
75. J. O. Besenhard i H. P. Fritz, *Angew. Chem. Int. Ed. (English)* **22** (1983) 950-975.
76. J. C. Hoogvliet, P. J. H. J. van Os, E. J. van der Mark i W. P. van Bennekom, *Biosens. Bioelectron.* **6** (1991) 413-423.
77. B. He, R. Sinclair, B. R. Copeland, R. Makino, L. Powers i I. Yamazaki, *Biochemistry* **35** (1996) 2413-2420.
78. Z. S. Farhangrazi, M. E. Fossett, L. S. Powers i W. R. Ellis Jr, *Biochemistry* **34** (1995) 2866-2871.
79. E. Csöregi, G. Jönsson-Pettersson i L. Gorton, *J. Biotechnol.* **30** (1993) 315-337.
80. E. E. Ferapontova i L. Gorton, *Electrochem. Commun.* **3** (2001) 767-774.
81. E. Ferapontova i E. Puganova, *J. Electroanal. Chem.* **518** (2002) 20-26.
82. Z. Brusova, E. E. Ferapontova, I. Y. Sakharov, E. Magner i L. Gorton, *Electroanalysis* **17** (2005) 460-468.
83. G. Jönsson i L. Gorton, *Electroanalysis* **1** (1989) 465-468.
84. T. Ruzgas, L. Gorton, J. Emnéus i G. Marko-Varga, *J. Electroanal. Chem.* **391** (1995) 41-49.
85. A. Lindgren, M. Tanaka, T. Ruzgas, L. Gorton, I. Gazaryan, K. Ishimori i I. Morishima, *Electrochem. Commun.* **1** (1999) 171-175.
86. V. Bogdanovskay, V. Fridman, M. Tarasevich i F. Scheller, *Anal. Lett.* **27** (1994) 2823-2847.
87. U. Wollenberger, J. Wang, M. Ozsoz, E. Gonzalez-Romero i F. Scheller, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **26** (1991) 287-296.
88. T. Tatsuma, H. Mori i A. Fujishima, *Anal. Chem.* **72** (2000) 2919-2924.
89. L. Gorton, E. Csöregi, E. Dominguez, J. Emnéus, G. Jönsson-Pettersson, G. Marko-Varga i B. Persson, *Anal. Chim. Acta* **250** (1991) 203-248.
90. E. Ferapontova, K. Schmengler, T. Borchers, T. Ruzgas i L. Gorton, *Biosens. Bioelectron.* **17** (2002) 953-963.
91. E. Ferapontova i E. Domínguez, *Bioelectrochemistry* **55** (2002) 127-130.
92. E. Ferapontova i L. Gorton, *Electroanalysis* **15** (2003) 484-491.
93. H. A. Harbury, *J. Biol. Chem.* **225** (1957) 1009-1024.
94. E. E. Ferapontova, *Electroanalysis* **16** (2004) 1101-1112.
95. D. Sun, C. Cai, X. Li, W. Xing i T. Lu, *J. Electroanal. Chem.* **566** (2004) 415-421.
96. H. Chen i S. Dong, *Biosens. Bioelectron.* **22** (2007) 1811-1815.
97. X. Zhao, Z. Mai, X. Kang i X. Zou, *Biosens. Bioelectron.* **23** (2008) 1032-1038.
98. C. Xiang, Y. Zou, L.-X. Sun i F. Xu, *Sens. Actuators B* **136** (2009) 158-162.
99. Z. Cao, J. Zhang, J. Zeng, L. Sun, F. Xu, Z. Cao, L. Zhang i D. Yang, *Talanta* **77** (2009) 943-947.
100. S. Guo i S. Dong, *TrAC - Trends Anal. Chem.* **28** (2009) 96-109.
101. H. Seok i T. H. Park, *Biotechnol. J.* **6** (2011) 1310-1316.

102. W. Putzbach i N. J. Ronkainen, *Sensors* **13** (2013) 4811-4840.
103. A. Chen i S. Chatterjee, *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013) 5425-5438.
104. A. Hayat, G. Catanante i J. L. Marty, *Sensors* **14** (2014) 23439-23461.
105. J. Wang, *Microchim. Acta* **177** (2012) 245-270.
106. U. Hanefeld, L. Gardossi i E. Magner, *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009) 453-468.
107. L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño i J. M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta* **622** (2008) 11-47.
108. C. Gao, Z. Guo, J.-H. Liu i X.-J. Huang, *Nanoscale* **4** (2012) 1948-1963.
109. W. Feng i P. Ji, *Biotechnol. Adv.* **29** (2011) 889-895.
110. J. J. Gooding, R. Wibowo, J. Liu, W. Yang, D. Losic, S. Orbons, F. J. Mearns, J. G. Shapter i D. B. Hibbert, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 9006-9007.
111. S. P. Pujari, L. Scheres, A. Marcelis i H. Zuilhof, *Angew. Chem., Int. Ed.* **53** (2014) 6322-6356.
112. M. Kosmulski, *Adv. Colloid Interface Sci.* **152** (2009) 14-25.
113. S. K. Arya, S. Saha, J. E. Ramirez-Vick, V. Gupta, S. Bhansali i S. P. Singh, *Anal. Chim. Acta* **737** (2012) 1-21.
114. Y. Shao, J. Wang, H. Wu, J. Liu, I. A. Aksay i Y. Lin, *Electroanalysis* **22** (2010) 1027-1036.
115. M. Pumera, *Materials Today* **14** (2011) 308-315.
116. D. Chen, H. Feng i J. Li, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **112** (2012) 6027-6053.
117. I. V. Pavlidis, M. Patila, U. T. Bornscheuer, D. Gournis i H. Stamatis, *Trends Biotechnol.* **32** (2014) 312-320.
118. D. R. Dreyer, S. Park, C. W. Bielawski i R. S. Ruoff, *Chem. Soc. Rev.* **39** (2010) 228-240.
119. Y. Zhang, C. Wu, S. Guo i J. Zhang, *Nanotechnology Rev.* **2** (2013) 27-45.
120. J. Zhang, F. Zhang, H. Yang, X. Huang, H. Liu, J. Zhang i S. Guo, *Langmuir* **26** (2010) 6083-6085.
121. M. Zhou, Y. Zhai i S. Dong, *Anal. Chem.* **81** (2009) 5603-5613.
122. Z. Wang, X. Zhou, J. Zhang, F. Boey i H. Zhang, *J. Phys. Chem. C* **113** (2009) 14071-14075.
123. Q. Zeng, J. Cheng, L. Tang, X. Liu, Y. Liu, J. Li i J. Jiang, *Adv. Funct. Mater.* **20** (2010) 3366-3372.
124. G. Zeng, Y. Xing, J. Gao, Z. Wang i X. Zhang, *Langmuir* **26** (2010) 15022-15026.
125. L. Zhang, Q. Zhang i J. Li, *Adv. Funct. Mater.* **17** (2007) 1958-1965.
126. X. Yang, X. Chen, L. Yang i W. Yang, *Bioelectrochemistry* **74** (2008) 90-95.
127. X. Kong, X. Rao, J. Han, M. Wei i X. Duan, *Biosens. Bioelectron.* **26** (2010) 549-554.
128. W. Chen, S. Cai, Q.-Q. Ren, W. Wen i Y.-D. Zhao, *Analyst* **137** (2012) 49-58.
129. T. You, O. Niwa, M. Tomita i S. Hirono, *Anal. Chem.* **75** (2003) 2080-2085.
130. S. Chakraborty i C. R. Raj, *Biosens. Bioelectron.* **24** (2009) 3264-3268.
131. A. Salimi, R. Hallaj, S. Soltanian i H. Mamkhezri, *Anal. Chim. Acta* **594** (2007) 24-31.
132. S. Yao, J. Xu, Y. Wang, X. Chen, Y. Xu i S. Hu, *Anal. Chim. Acta* **557** (2006) 78-84.
133. B. Šljukic, C. E. Banks i R. G. Compton, *Nano Lett.* **6** (2006) 1556-1558.
134. K. Cui, Y. Song, Y. Yao, Z. Huang i L. Wang, *Electrochem. Commun.* **10** (2008) 663-667.
135. J. Wang, L. Wang, J. Di i Y. Tu, *Talanta* **77** (2009) 1454-1459.
136. X. Bo, J. C. Ndamaniha, J. Bai i L. Guo, *Talanta* **82** (2010) 85-91.
137. X. Hu, J. C. Yu, J. Gong, Q. Li i G. Li, *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **19** (2007) 2324-2329.
138. J. Ping, S. Ru, K. Fan, J. Wu i Y. Ying, *Microchim. Acta* **171** (2010) 117-123.

139. A. A. Karyakin i E. E. Karyakina, *Sens. Actuators B* **57** (1999) 268-273.
140. A. A. Karyakin, E. A. Puganova, I. A. Budashov, I. N. Kurochkin, E. E. Karyakina, V. A. Levchenko, V. N. Matveyenko i S. D. Varfolomeyev, *Anal. Chem.* **76** (2004) 474-478.
141. E. Puganova i A. Karyakin, *Sens. Actuators B* **109** (2005) 167-170.
142. Z. Zhu, L. Garcia-Gancedo, A. J. Flewitt, H. Xie, F. Moussy i W. I. Milne, *Sensors* **12** (2012) 5996-6022.
143. J. Wang, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **108** (2008) 814-825.
144. C. Chen, Q. Xie, D. Yang, H. Xiao, Y. Fu, Y. Tan i S. Yao, *RSC Advances* **3** (2013) 4473-4491.
145. C. Cai i J. Chen, *Anal. Biochem.* **332** (2004) 75-83.
146. C. Shan, H. Yang, J. Song, D. Han, A. Ivaska i L. Niu, *Anal. Chem.* **81** (2009) 2378-2382.
147. H. Zhang, Z. Meng, Q. Wang i J. Zheng, *Sens. Actuators B* **158** (2011) 23-27.
148. V. Mani, B. Devadas i S.-M. Chen, *Biosens. Bioelectron.* **41** (2013) 309-315.
149. Z. Wang, S. Liu, P. Wu i C. Cai, *Anal. Chem.* **81** (2009) 1638-1645.
150. V. Flexer, F. Durand, S. Tsujimura i N. Mano, *Anal. Chem.* **83** (2011) 5721-5727.
151. Y. Su, Q. Xie, C. Chen, Q. Zhang, M. Ma i S. Yao, *Biotechnol. Prog.* **24** (2008) 262-272.
152. M. Wooten, S. Karra, M. Zhang i W. Gorski, *Anal. Chem.* **86** (2014) 752-757.
153. S.-Q. Liu i H.-X. Ju, *Anal. Biochem.* **307** (2002) 110-116.
154. M. Li, S. Xu, M. Tang, L. Liu, F. Gao i Y. Wang, *Electrochim. Acta* **56** (2011) 1144-1149.
155. K.-J. Huang, D.-J. Niu, X. Liu, Z.-W. Wu, Y. Fan, Y.-F. Chang i Y.-Y. Wu, *Electrochim. Acta* **56** (2011) 2947-2953.
156. Y. Li, X.-Y. Yang, Y. Feng, Z.-Y. Yuan i B.-L. Su, *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **37** (2012) 1-74.
157. T. Kasuga, M. Hiramatsu, A. Hoson, T. Sekino i K. Niihara, *Langmuir* **14** (1998) 3160-3163.
158. Q. Chen, G. H. Du, S. Zhang i L. M. Peng, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.* **58** (2002) 587-593.
159. X. Sun i Y. Li, *Chem. Eur. J.* **9** (2003) 2229-2238.
160. C.-C. Tsai i H. Teng, *Chem. Mater.* **16** (2004) 4352-4358.
161. D. V. Bavykin, V. N. Parmon, A. A. Lapkin i F. C. Walsh, *J. Mater. Chem.* **14** (2004) 3370-3377.
162. S. Zhang, Q. Chen i L.-M. Peng, *Phys. Rev. B* **71** (2005) 014104.
163. Y.-J. Lin, L. Wang i W.-Y. Chiu, *J. Vac. Sci. Technol., B: Microelectron. Nanometer Struct.* **23** (2005) 2398-2402.
164. Y. Mao i S. S. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 8217-8226.
165. T. Kubo i A. Nakahira, *J. Phys. Chem. C* **112** (2008) 1658-1662.
166. D. V. Bavykin, B. A. Cressey, M. E. Light i F. C. Walsh, *Nanotechnology* **19** (2008) 275604.
167. J. J. Yang, Z. S. Jin, X. D. Wang, W. Li, J. W. Zhang, S. L. Zhang, X. Y. Guo i Z. J. Zhang, *Dalton Trans.* (2003) 3898-3901.
168. E. Morgado, M. A. de Abreu, O. R. Pravia, B. A. Marinkovic, P. M. Jardim, F. C. Rizzo i A. S. Araújo, *Solid State Sci.* **8** (2006) 888-900.
169. M. Hernández-Alonso, S. García-Rodríguez, B. Sánchez i J. Coronado, *Nanoscale* **3** (2011) 2233-2240.
170. Z.-Y. Yuan i B.-L. Su, *Colloids Surf, A: Physicochem. Eng. Aspects* **241** (2004) 173-183.

171. A. Thorne, A. Kruth, D. Tunstall, J. T. S. Irvine i W. Zhou, *J. Phys. Chem. B* **109** (2005) 5439-5444.
172. G. Du, Q. Chen, P. Han, Y. Yu i L.-M. Peng, *Phys. Rev. B* **67** (2003) 035323.
173. W. A. Daoud i G. Pang, *J. Phys. Chem. B* **110** (2006) 25746-25750.
174. Z. Chang, J. Liu, J. Liu i X. Sun, *J. Mater. Chem.* **21** (2011) 277-282.
175. E. Morgado, M. A. S. de Abreu, G. T. Moure, B. A. Marinkovic, P. M. Jardim i A. S. Araujo, *Chem. Mater.* **19** (2007) 665-676.
176. Á. Kukovecz, M. Hodos, E. Horváth, G. Radnóczy, Z. Kónya i I. Kiricsi, *J. Phys. Chem. B* **109** (2005) 17781-17783.
177. L. Torrente-Murciano, A. A. Lapkin i D. Chadwick, *J. Mater. Chem.* **20** (2010) 6484-6489.
178. N. Viriya-Empikul, N. Sano, T. Charinpanitkul, T. Kikuchi i W. Tanthapanichakoon, *Nanotechnology* **19** (2008) 035601.
179. R. Ma, Y. Bando i T. Sasaki, *J. Phys. Chem. B* **108** (2004) 2115-2119.
180. W. Chen, X. Guo, S. Zhang i Z. Jin, *J. Nanopart. Res.* **9** (2007) 1173-1180.
181. S. Zhang, L.-M. Peng, Q. Chen, G. Du, G. Dawson i W. Zhou, *Phys. Rev. Lett.* **91** (2003) 256103.
182. J.-C. Boyer, C.-J. Carling, B. D. Gates i N. R. Branda, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 15766-15772.
183. D. V. Bavykin, A. N. Kulak i F. C. Walsh, *Cryst. Growth Des.* **10** (2010) 4421-4427.
184. G. H. Du, Q. Chen, R. C. Che, Z. Y. Yuan i L. M. Peng, *Appl. Phys. Lett.* **79** (2001) 3702-3704.
185. D. Wu, J. Liu, X. Zhao, A. Li, Y. Chen i N. Ming, *Chem. Mater.* **18** (2006) 547-553.
186. A. Nakahira, W. Kato, M. Tamai, T. Isshiki, K. Nishio i H. Aritani, *J. Mater. Sci.* **39** (2004) 4239-4245.
187. R. Ma, Y. Bando i T. Sasaki, *Chem. Phys. Lett.* **380** (2003) 577-582.
188. R. Z. Ma, K. Fukuda, T. Sasaki, M. Osada i Y. Bando, *J. Phys. Chem. B* **109** (2005) 6210-6214.
189. S. Andersson i A. Wadsley, *Acta Crystallogr.* **14** (1961) 1245-1249.
190. T. P. Feist i P. K. Davies, *J. Solid State Chem.* **101** (1992) 275-295.
191. E. Morgado, M. A. de Abreu, G. T. Moure, B. A. Marinkovic, P. M. Jardim i A. S. Araujo, *Mater. Res. Bull.* **42** (2007) 1748-1760.
192. R. Z. Ma, T. Sasaki i Y. Bando, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* (2005) 948-950.
193. A. Gajovic, I. Friscic, M. Plodinec i D. Ivekovic, *J. Mol. Struct.* **924-926** (2009) 183-191.
194. M. Kitano, E. Wada, K. Nakajima, S. Hayashi, S. Miyazaki, H. Kobayashi i M. Hara, *Chem. Mater.* **25** (2013) 385-393.
195. M. T. Byrne, J. E. McCarthy, M. Bent, R. Blake, Y. K. Gun'ko, E. Horvath, Z. Konya, A. Kukovecz, I. Kiricsi i J. N. Coleman, *J. Mater. Chem.* **17** (2007) 2351-2358.
196. H.-J. Song, Z.-Z. Zhang i X.-H. Men, *Eur. Polym. J.* **44** (2008) 1012-1022.
197. Z. Shi, G. Xueping, S. Deying, Y. Zhou i D. Yan, *Polymer* **48** (2007) 7516-7522.
198. W. Wang, J. Zhang, H. Huang, Z. Wu i Z. Zhang, *Colloids Surf, A: Physicochem. Eng. Aspects* **317** (2008) 270-276.
199. D. V. Bavykin, S. N. Gordeev, A. V. Moskalenko, A. A. Lapkin i F. C. Walsh, *J. Phys. Chem. B* **109** (2005) 8565-8569.
200. D. V. Bavykin, J. M. Friedrich, A. A. Lapkin i F. C. Walsh, *Chem. Mater.* **18** (2006) 1124-1129.
201. E. W. Dean i D. D. Stark, *J. Ind. Eng. Chem.* **12** (1920) 486-490.

202. J. C. Tiller, R. Rieseler, P. Berlin i D. Klemm, *Biomacromolecules* **3** (2002) 1021-1029.
203. J. F. Robyt, *Essentials of carbohydrate chemistry*, Springer, 1998, str. 350-351.
204. V. D. Chaube, S. Shylesh i A. P. Singh, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **241** (2005) 79-87.
205. Y.-S. Kim, G. In, C.-W. Han i J.-M. Choi, *Microchem. J.* **80** (2005) 151-157.
206. T. R. L. Dadamos i M. F. S. Teixeira, *Electrochim. Acta* **54** (2009) 4552-4558.
207. H. Hamdan, V. Navijanti, H. Nur i M. N. M. Muhid, *Solid State Sci.* **7** (2005) 239-244.
208. I. Taylor i A. G. Howard, *Anal. Chim. Acta* **271** (1993) 77-82.
209. K. S. W. Sing, D. H. Everett, R. A. W. Haul, L. Moscou, R. A. Pierotti, J. Rouquerol i T. Siemieniowska, *Pure Appl. Chem.* **57** (1985) 603-619.
210. S. Brunauer, P. H. Emmett i E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.* **60** (1938) 309-319.
211. E. P. Barrett, L. G. Joyner i P. P. Halenda, *J. Am. Chem. Soc.* **73** (1951) 373-380.
212. S. Papp, L. Kőrösi, V. Meynen, P. Cool, E. F. Vansant i I. Dékány, *J. Solid State Chem.* **178** (2005) 1614-1619.
213. B. C. Viana, O. P. Ferreira, A. G. S. Filho, A. A. Hidalgo, J. M. Filho i O. L. Alves, *Vib. Spectrosc.* **55** (2011) 183-187.
214. M. Plodinec, I. Frišić, D. Iveković, N. Tomašić, D. S. Su, J. Zhang i A. Gajović, *J. Alloys Compd.* **499** (2010) 113-120.
215. A. Kudo i T. Kondo, *J. Mater. Chem.* **7** (1997) 777-780.
216. T. Ohsaka, F. Izumi i Y. Fujiki, *J. Raman Spectrosc.* **7** (1978) 321-324.
217. J. J. Pesek i M. T. Matyska, *Interface Science* **5** (1997) 103-117.
218. N. Impens, P. Van Der Voort i E. Vansant, *Microporous Mesoporous Mater.* **28** (1999) 217-232.
219. M. E. McGovern, K. M. Kallury i M. Thompson, *Langmuir* **10** (1994) 3607-3614.
220. N. Wang, H. Lin, J. Li, L. Zhang, C. Lin i X. Li, *J. Am. Ceram. Soc.* **89** (2006) 3564-3566.
221. C. Zhang, X. Jiang, B. Tian, X. Wang, X. Zhang i Z. Du, *Colloids Surf, A: Physicochem. Eng. Aspects* **257-258** (2005) 521-524.
222. L. Bisticic, V. Volovsek i V. Dananic, *J. Mol. Struct.* **834-836** (2007) 355-363.
223. J. P. Matinlinna, S. Areva, L. V. J. Lassila i P. K. Vallittu, *Surf. Interface Anal.* **36** (2004) 1314-1322.
224. P. Swiderek, M. C. Deschamps, M. Michaud i L. Sanche, *J. Phys. Chem. B* **107** (2002) 563-567.
225. L. Bisticic, V. Volovsek, V. Dananic i I. M. Sopic, *Spectrochim. Acta, Part A* **64** (2006) 327-337.
226. R. Pena-Alonso, F. Rubio, J. Rubio i J. Oteo, *J. Mater. Sci.* **42** (2007) 595-603.
227. E. T. Vandenberg, L. Bertilsson, B. Liedberg, K. Uvdal, R. Erlandsson, H. Elwing i I. Lundström, *J. Colloid Interface Sci.* **147** (1991) 103-118.
228. E. Ukaji, T. Furusawa, M. Sato i N. Suzuki, *Appl. Surf. Sci.* **254** (2007) 563-569.
229. T. Ogasawara, H. Yonehara, H. Okabayashi i C. J. O'Connor, *Colloids Surf, A: Physicochem. Eng. Aspects* **168** (2000) 147-158.
230. Y. S. Ho i G. McKay, *Process Saf. Environ. Prot.* **76** (1998) 332-340.
231. F.-C. Wu, R.-L. Tseng, S.-C. Huang i R.-S. Juang, *Chem. Eng. J. (Lausanne)* **151** (2009) 1-9.
232. M. Kitano, K. Nakajima, J. N. Kondo, S. Hayashi i M. Hara, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 6622-6623.
233. T. Kurahashi, Y. Kobayashi, S. Nagatomo, T. Tosha, T. Kitagawa i H. Fujii, *Inorg. Chem* **44** (2005) 8156-8166.

234. M. Martins, M. V. Boas, B. De Castro, A. R. Hillman i C. Freire, *Electrochim. Acta* **51** (2005) 304-314.
235. Y. Yang, Y. Zhang, S. Hao i Q. Kan, *Chem. Eng. J. (Lausanne)* **171** (2011) 1356-1366.
236. N. Malumbazo i S. F. Mapolie, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **312** (2009) 70-77.
237. H. Lampert, W. Mikenda i A. Karpfen, *J. Phys. Chem. A* **101** (1997) 2254-2263.
238. F. Miomandre, P. Audebert, M. Maumy i L. Uhl, *J. Electroanal. Chem.* **516** (2001) 66-72.
239. R. Zhang, J. Ma, W. Wang, B. Wang i R. Li, *J. Electroanal. Chem.* **643** (2010) 31-38.
240. J.-P. Randin i E. Yeager, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **58** (1975) 313-322.
241. K. Narasimhan i L. B. Wingard, *Enzyme Microb. Technol.* **7** (1985) 283-286.
242. T. Ikeda, T. Shibata i M. Senda, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **261** (1989) 351-362.
243. R. Andreu, E. E. Ferapontova, L. Gorton i J. J. Calvente, *J. Phys. Chem. B* **111** (2006) 469-477.
244. B. Limoges, J.-M. Savéant i D. Yazidi, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 9192-9203.
245. R. Villalonga, P. Díez, P. Yáñez-Sedeño i J. M. Pingarrón, *Electrochim. Acta* **56** (2011) 4672-4677.
246. Y. Astuti, E. Topoglidis, A. G. Cass i J. R. Durrant, *Anal. Chim. Acta* **648** (2009) 2-6.
247. S. Chen, R. Yuan, Y. Chai, B. Yin, W. Li i L. Min, *Electrochim. Acta* **54** (2009) 3039-3046.
248. F. Wu, J. Xu, Y. Tian, Z. Hu, L. Wang, Y. Xian i L. Jin, *Biosens. Bioelectron.* **24** (2008) 198-203.
249. X. Sun, Y. Zhang, H. Shen i N. Jia, *Electrochim. Acta* **56** (2010) 700-705.
250. X. Yu, D. Chattopadhyay, I. Galeska, F. Papadimitrakopoulos i J. F. Rusling, *Electrochem. Commun.* **5** (2003) 408-411.
251. J. L. Lyon i K. J. Stevenson, *Electrochim. Acta* **53** (2008) 6714-6721.
252. R. Palangsantikul, M. Somasundrum i W. Surareungchai, *Electrochim. Acta* **56** (2010) 470-475.
253. X. Zeng, X. Li, X. Liu, Y. Liu, S. Luo, B. Kong, S. Yang i W. Wei, *Biosens. Bioelectron.* **25** (2009) 896-900.
254. S. Wang, F. Xie i G. Liu, *Talanta* **77** (2009) 1343-1350.
255. A. Lindgren, T. Ruzgas, L. Gorton, E. Csöregi, G. Bautista Ardila, I. Y. Sakharov i I. G. Gazaryan, *Biosens. Bioelectron.* **15** (2000) 491-497.

§ 7. ŽIVOTOPIS

David Sović rođen je 17.10.1977. godine u Zagrebu gdje je završio srednju školu 1996. godine. Iste godine upisuje diplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu koji završava 2002. godine i stječe diplomu diplomiranog inženjera kemije. Godine 2003. zapošljava se u Laboratoriju za opću i anorgansku kemiju i elektroanalizu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao stručni suradnik, a zatim od 2005. do 2012. godine kao znanstveni novak. Od 2013. godine radi u Zavodu za ispitivanje kvalitete d.o.o. kao samostalni inspektor.

Sveučilišni poslijediplomski studij prirodnih znanosti, polje Kemija, smjer Analitička kemija upisao je na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu je jedan od prvih suradnika projekta "Merlin – sustav e-učenja" u organizaciji Sveučilišnog računalnog centra Sveučilišta u Zagrebu.

Koautor je jednog rada citiranog u bazi *Current Contents*, jednog stručnog rada te je sudjelovao s pet posterskih priopćenja na kongresima.

Kao vanjski suradnik izradio je multimedijske dodatke koji su pratili udžbenike iz kemije za sedmi i osmi razred osnovnih škola. Također je koautor dva srednjoškolska udžbenika iz kemije.

Znanstveni rad objavljen u časopisu indeksiranom u bazi *Current Contents*:

1. D. Sović, A. Gajović i D. Iveković, Bioelectrocatalytic and biosensing properties of horseradish peroxidase covalently immobilized on (3-aminopropyl)trimethoxysilane-modified titanate nanotubes, *Electrochim. Acta* **56** (2011) 9953-9960; DOI: 10.1016/j.electacta.2011.08.077

Stručni rad:

1. D. Sović i B. Bertoša, Methods Acronyms – The Witty Side of Science, *Kem. Ind.* **58** (2009); 337-341

Sudjelovanje na kongresima:

1. D. Iveković, D. Sović, B. Zimmermann i B. Pihlar, Površinski modificirane titanatne nanocjevčice za primjenu u kemijskim senzorima, XXI. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, 2009, Trogir, Hrvatska
2. D. Sović, D. Iveković i B. Zimmermann, Modification of titanate nanotubes with transition metals and transition metal-1,10-phenanthroline complexes, EUCMOS - European Congress on Molecular Spectroscopy, 2008, Opatija, Croatia

3. D. Sović i B.S. Grabarić, Animirana kemija - više od nastave?, XX. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, 2007., Zagreb, Hrvatska
4. D. Sović, K. Molčanov i G. Baranović, Ravnoteže i struktura kompleksa u sustavu 5,6-fenantrolin/trikloroetena kiselina, XX. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, 2007., Zagreb, Hrvatska
5. D. Sović, M. Roboz i B.S. Grabarić, Multimedijalno predstavljanje laboratorijskih pokusa iz opće i anorganske kemije, XIX. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, 2005., Opatija, Hrvatska

Udžbenici:

1. B. Tkalčec, A. Petreski i D. Sović, *Kemijski elementi i njihovi spojevi - udžbenik kemije za treći razred gimnazije*, G. Bukan(ur.), Školska Knjiga, Zagreb, 2009.
2. I. Lesić i D. Sović, *Kemija - udžbenik za prvi razred ekonomske škole*, A. Savić (ur.), Zagreb, Alka Script, 2008.