



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Abra Penezić

**RAZVOJ ELEKTROKEMIJSKOG SENZORA ZA  
DETEKCIJU POLIČIKLIČKIH AROMATSKIH  
UGLJIKOVODIKA U VODAMA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.





University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Abra Penezić

**DEVELOPMENT OF AN ELECTROCHEMICAL  
SENSOR FOR DETECTING POLYCYCLIC  
AROMATIC HYDROCARBONS IN WATER**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015.





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Abra Penezić

**RAZVOJ ELEKTROKEMIJSKOG SENZORA ZA  
DETEKCIJU POLIČIKLIČKIH AROMATSKIH  
UGLJIKOVODIKA U VODAMA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Blaženka Gašparović

Zagreb, 2015.





University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

Abra Penezić

**DEVELOPMENT OF AN ELECTROCHEMICAL  
SENSOR FOR DETECTING POLYCYCLIC  
AROMATIC HYDROCARBONS IN WATER**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: dr. sc. Blaženka Gašparović

Zagreb, 2015.





## Zahvale

Puno hvala dr. sc. Blaženki Gašparović na predloženoj temi, podršci i vodstvu kod izrade ovog rada, kao i na mnogobrojnim savjetima, zalaganjima i pruženim mogućnostima.

Zahvaljujem se Sanji Frki-Milosavljević, Slađani Strmečki, kao i svim ostalim članovima svog laboratorija, na pomoći, savjetima i diskusijama.

Zahvaljujem se dr. sc. Draženki Stipaničev na rezultatima GC-MS analize, dr. sc. Dariji Jurašin na rezultatima DLS analize, Jeleni Dautović i Ani Cvitešić za rezultate DOC i POC analize, te dr. sc. Damiru Đermiću iz Laboratorija za molekularnu mikrobiologiju Instituta Ruđer Bošković za posudbu antibiotika korištenih u radu.

Hvala dr. sc. Dubravku Risoviću na pomoći i savjetima, te korisnim diskusijama tijekom izrade rada. Također hvala dr. sc. Marini Mlakar i dr. sc. Nives Galić na korisnim opaskama i savjetima.

Hvala dr. sc. Andrewu Nelsonu i dr. sc. Zacharyu Coldricku na znanjima koja su mi prenijeli, pruženoj pomoći i prijateljstvu.

Hvala svim mojim prijateljima i Marku na podršci i

najviše hvala mami i tati, na svemu!



## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Geološki odsjek

Doktorska disertacija

### RAZVOJ ELEKTROKEMIJSKOG SENZORA ZA DETEKCIJU POLICIKLIČKIH AROMATSKIH UGLJIKOVODIKA U VODAMA

Abra Penezić

Institut Ruđer Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Bijenička cesta 54,  
10000 Zagreb

#### Sažetak:

Policiklički aromatski ugljikovodici (PAH) organska su zagađivala široko rasprostranjena u vodenom okolišu. Zbog opasnosti koju predstavljaju za zdravlje i život vodenih organizama i čovjeka, javlja se sve veća potreba za brzim i jeftinim metodama koje bi omogućile ranu detekciju ovih spojeva u okolišu. Policiklički aromatski ugljikovodici utječu na strukturu i organizaciju sloja lipida elektrostatski adsorbiranog na površini živine elektrode, a spomenuta se interakcija može pratiti metodom brze cikličke voltametrije. Ovaj rad opisuje razvoj elektrokemijskog senzora sa živinom mikroelektrodom modificiranom elektrostatski adsorbiranim miješanim slojem fosfolipida i triglicerida, kao dio djelomično automatiziranog protočnog sustava za ranu detekciju policikličkih aromatskih ugljikovodika u vodama.

**Ključne riječi:** policiklički aromatski ugljikovodici, živina mikroelektroda, ciklička voltametrija, fosfolipidi, trigliceridi.

**Rad sadrži:** 108 stranica, 52 slike, 7 tablica i 123 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Rad je pohranjen u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb

**Mentor:** Dr. sc. Blaženka Gašparović, znanstvena savjetnica

**Ocjenjivači:** Dr. sc. Marina Mlakar, znanstvena savjetnica  
Dr. sc. Nives Galić, izvanredna profesorica, PMF  
Dr. sc. Dubravko Risović, znanstveni savjetnik

**Rad prihvaćen:** 2015.



## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Geology

Doctoral Thesis

### DEVELOPMENT OF AN ELECTROCHEMICAL SENSOR FOR DETECTING POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN WATER

Abra Penezić

Ruder Bošković Institute, Division for Marine and Environmental Research, Bijenička cesta  
54, 10 000 Zagreb

#### Abstract:

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are organic pollutants ubiquitous in the aquatic environment. Considering the danger PAH-s pose to the health of aquatic organisms and humans, there is an increasing need for fast and reliable methods enabling early detection of these compounds in the environment. PAH-s influence the structure and organisation of a lipid layer electrostatically adsorbed on the surface of a mercury electrode, which can be monitored electrochemically using fast cyclic voltammetry. This work shows the development of an electrochemical sensor with a mercury microelectrode modified by a mixed lipid layer of phospholipids and triglycerides as a part of a semi-automated flow system for the early detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters.

**Keywords:** polycyclic aromatic hydrocarbons, mercury microelectrode, cyclic voltammetry, phospholipids, triglycerides.

**Thesis contains:** 108 pages, 52 figures, 7 tables and 123 references

**Original in:** Croatian

**Thesis deposited in:** National and University Library of Zagreb, Hrvatske bratske  
zajednice 4, Zagreb

**Supervisor:** Blaženka Gašparović, PhD, senior researcher

**Reviewers:** Marina Mlakar, PhD, senior researcher

Nives Galić, PhD, Associate professor, Faculty of Science

Dubravko Risović, PhD, senior researcher

**Thesis accepted:** 2015.



## POPIS SIMBOLA I KRATICA

- $A$  – površina po molekuli
- AC voltametrija – voltametrija izmjenične struje
- $C$  – kapacitet
- $C_s^{-1}$  – modul površinske kompresije
- CV – ciklička voltametrija
- DOC – otopljeni organski ugljik
- DOPC – 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilkolin; IUPAC nomenklatura: [(2R)-2,3-bis[[*(Z)*-oktadek-9-enoil]oksi]propil]2-(trimetilazaniumil)etil fosfat
- $E$  – elektrodni potencijal
- GC-MS – plinska kromatografija spregnuta sa masenom spektroskopijom
- IHP – unutarnja Helmholtzova ravnina
- $I_c$  – kapacitetna struja
- K – kruto stanje
- $K_{ow}$  – oktanol-voda particijski koeficijent
- LC-MS – tekućinska kromatografija spregnuta sa masenom spektroskopijom
- OHP – vanjska Helmholtzova ravnina
- P – plinovito stanje
- PAH – policiklički aromatski ugljikovodik
- POC – čestični organski ugljik
- POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilkolin; IUPAC nomenklatura: [(2R)-3-heksadekanoiloksi-2-[(*Z*)-oktadek-9-enoil]oksipropil] 2-(trimetilazaniumil)etil fosfat
- SVE – standardna vodikova elektroda
- TE – tekuće ekspanirano stanje
- TG – gliceril trioleat; IUPAC nomenklatura: 2,3-Bis[[*(Z)*-oktadek-9-enoil]oksi]propil (*Z*)-oktadek-9-enoat
- TK – tekuće kruto stanje
- UV-Vis-RS – refleksijska spektroskopija u ultraljubičastom i vidljivom spektru
- VŽKE – viseća živina kap elektroda
- ZKE – zasićena kalomel elektroda
- $\pi$  – površinski tlak
- $\sigma$  – površinska napetost





## Sadržaj

Zahvale .....	VII
Temeljna dokumentacijska kartica .....	IX
Basic documentation card .....	XI
Popis simbola i kratica .....	XIII
1. Uvod .....	1
1.1. Cilj i opseg rada .....	2
2. Literaturni pregled .....	3
2.1. Policiklički aromatski ugljikovodici .....	3
2.1.1. Policiklički aromatski ugljikovodici u vodenim sustavima .....	4
2.2. Elektrokemijski senzori .....	7
2.2.1. Stanična membrana kao model u konstrukciji biosenzora .....	7
2.3. Procesi na živinoj elektrodi .....	9
2.3.1. Kisik kod elektrokemijskih mjerenja .....	16
2.3.2. Adsorpcija amfifilnih molekula na živinoj elektrodi .....	16
2.4. Langmuirovi monoslojevi .....	21
2.4.1. UV – Vis refleksijska spektroskopija .....	29
3. Eksperimentalni dio .....	30
3.1. Kemikalije i otopine .....	30
3.2. Metodologija rada .....	31
3.2.1. Elektrokemijska mjerenja - viseća živina kap elektroda (VŽKE) .....	31
3.2.2. Živina mikroelektroda .....	32
3.2.3. Protočni sustav za analizu .....	35
3.2.4. Stvaranje modelne membrane na površini živine mikroelektrode .....	37
3.3. Analizirani PAH-ovi .....	39
3.3.1. Interakcija PAH-ova i modelne membrane – opis rada analitičkog sustava .....	40
3.3.1.1. Kalibracijske krivulje u $0,55 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ .....	40
3.3.1.2. Kalibracijske krivulje u čistom moru .....	41
3.4. Mjerenja na granici faza elektrolit/zrak .....	42
3.4.1. Mjerenja UV-Vis refleksijskim spektrometrom .....	43

4. Rezultati .....	44
4.1. Viseća živina kap elektroda (VŽKE).....	44
4.2. Prelazak na živinu mikroelektrodu .....	48
4.3. Optimiziranje eksperimentalnih uvjeta.....	54
4.4. Interakcija PAH-ova i miješanog lipidnog sloja POPC-TG .....	55
4.4.1. Kalibracija sustava .....	60
4.4.1.1. Kalibracijske krivulje u 0,55 mol dm <sup>-3</sup> NaCl, pH = 8,1 .....	60
4.4.1.2. Kalibracijske krivulje u čistom moru .....	62
4.4.1.2.1. Utjecaj morske vode na sloj.....	62
4.5. Utjecaj prirodnih organskih molekula na interakciju miješanog sloja i PAH-ova .....	66
4.5.1. Utjecaj huminskih tvari na analizu PAH-ova .....	68
4.5.2. Utjecaj odabranih zagađivala na miješani sloj.....	68
4.6. Testiranje sustava .....	70
4.6.1. Uzorak rijeke Save .....	70
4.6.2. Uzorak mora sjevernog Jadrana.....	71
4.7. Langmuir-Blodgett i sprega s refleksijskom spektroskopijom.....	72
5. Rasprava .....	78
5.1. Viseća živina kap elektroda (VŽKE).....	78
5.2. Prelazak na živinu mikroelektrodu .....	80
5.3. Optimiziranje eksperimentalnih uvjeta.....	81
5.4. Interakcije između PAH-ova i miješanog lipidnog sloja.....	82
5.4.1. Utjecaj smjese PAH-ova na miješani lipidni sloj .....	84
5.5. Interferencije.....	84
5.6. Testiranje stvarnih uzoraka.....	85
5.6.1. Uzorak rijeke Save .....	85
5.6.2. Uzorak sjevernog Jadrana .....	86
5.7. Mjerenja na granici faza elektrolit/zrak.....	87
6. Zaključak .....	90
7. Literatura .....	93
8. Životopis i popis znanstvenih radova.....	105

## **1. UVOD**

---



## 1. Uvod

U današnje doba ubrzanog tehnološkog razvoja i nedovoljnog poznavanja štetnog utjecaja čovjeka na okoliš, vodeni se sustavi sve više nekontrolirano zagađuju. Prema podacima iz 1983., godišnje se proizvede oko 1000 novih kemijskih spojeva koji najčešće završavaju u vodenim sustavima (Health protection, 1983), a danas je taj broj zasigurno mnogo veći. Od svih zagađivala koja završe u morskom okolišu 80 % dolazi s kopna, dok preostalih 20 % dolazi *in-situ*, većinom ispuštanjem zagađivala s naftnih platformi, otpadnim vodama te ispiranjem ekotoksičnih protuobraštajnih boja za brodove. Da bi neki spoj uopće bio smatran značajnim zagađivalom i imao značajan utjecaj na vodeni okoliš, mora zadovoljavati nekoliko uvjeta (Bayona i Albaiges, 2006):

- proizvodnja u velikim količinama, kao primarnog proizvoda ili kao popratnog spoja u proizvodnji kakve druge kemikalije, ili kontinuirano ispuštanje u okoliš
- otpornost na abiotičke i biotičke oblike razgradnje
- sklonost bioakumulaciji

Među najraširenijim organskim zagađivalima nalaze se postojana organska zagađivala (POP), kao što su poliklorirani bifenili (PCB-ovi), heksaklorocikloheksani, klordan, toksafen, te policiklički aromatski ugljikovodici (PAH-ovi). Navedeni spojevi predstavljaju opasnost za vodene ekosustave, posebno vodene organizme i ljude.

Analitičke metode koje se tradicionalno koriste u detekciji policikličkih aromatskih ugljikovodika uključuju plinsku ili tekućinsku kromatografiju spregnutu s masenom spektroskopijom (GC-MS, LC-MS), zbog velike točnosti i niske granice detekcije (Poster i sur., 2006; Ma i sur., 2010). Nedostatak ovih metoda je predobrada uzoraka te postupci ekstrakcije analita, što ih čini dugotrajnima i skupima. Spomenuti nedostaci potaknuli su razvoj različitih imunokemijskih i elektrokemijskih metoda za detekciju PAH-ova (Li i sur., 2000; Lin i sur., 2007). Međutim, mnoge razvijene metode imaju vrlo složen dizajn, i/ili nezadovoljavajuće granice detekcije (Wei i sur., 2009). Iz navedenih razloga javlja se nužnost razvoja brzih, jednostavnih i financijski prihvatljivih senzora za ranu detekciju policikličkih aromatskih ugljikovodika u okolišu.

## 1.1. Cilj i opseg rada

Cilj ovog rada je razviti elektrokemijski senzor sa živinom mikroelektrodom za primjenu u djelomično automatiziranom protočnom sustavu za ranu detekciju policikličkih aromatskih ugljikovodika u uzorcima prirodnih voda. Smatra se kako će lipofilna priroda PAH-ova omogućiti mjerljivu interakciju odabranih molekula PAH-ova i modelne membrane sastavljene od miješanog sloja lipida elektrostatski adsorbiranog na površini živine mikroelektrode. Razvoj senzora uključivat će upotrebu elektrokemijskih metoda za istraživanje svojstava živine mikroelektrode, od samog stvaranja elektrode, preko utvrđivanja njezine stabilnosti, dugotrajnosti, načina čišćenja, do pogodnosti za modifikaciju modelnom membranom. Elektrokemijske metode će se također koristiti i za pronalaženje modelne membrane pogodne za upotrebu u senzorskom sustavu koji se razvija. Očekuje se da će metoda brze cikličke voltametrije omogućiti kvantificiranje interakcija između analita i modelne membrane. Nadalje, istraživati će se potencijalni interferirajući spojevi koji bi mogli utjecati na kvalitetu analize kao i utjecaj kompleksnih matrica na izvedbu sustava, kako bi se procijenila mogućnost upotrebe senzora za analizu prirodnih uzoraka vode. Uz elektrokemijske metode, u istraživanju će se koristiti i spektroskopske metode, te tehnika Langmuir-Blodgett kade što će omogućiti bolje razumijevanje ponašanja odabranog miješanog sloja, ali i interakcija između odabranog miješanog sloja i molekula analita.

## **2. LITERATURNI PREGLED**

---





## 2. Literaturni pregled

### 2.1. Policiklički aromatski ugljikovodici

Policiklički aromatski ugljikovodici su organski spojevi koji su vrlo rasprostranjeni u okolišu, a sadrže dva ili više benzenskih prstenova. PAH-ovi su organska zagađivala koja nastaju kao nusprodukti nepotpunog gorenja fosilnih goriva i drugog organskog materijala, pri čemu dospijevaju u atmosferu. U vode, tlo i sedimente ulaze osim atmosferskim donosom, putem industrijskih i gradskih otpadnih voda, a često zbog havarija tijekom transporta i proizvodnje fosilnih goriva. PAH-ovi su hidrofobne/lipofilne molekule čija topljivost u vodi opada s porastom broja benzenskih prstenova i porastom particijskog koeficijenta između oktanol i vode ( $K_{ow}$ ) (Baumard i sur., 1999). Manje topljivi PAH-ovi, s većim vrijednostima  $K_{ow}$ , u vodi će većinom biti adsorbirani ili vezani na organsku tvar, dok će oni koji su topljiviji u vodi i imaju manje vrijednosti  $K_{ow}$ , u vodi biti prisutni i u otopljenom obliku, čime njihova biodostupnost za vodene organizme postaje bitno veća (Akkanen i sur., 2012). Neki PAH-ovi, poput benzo[a]pirena, imaju kancerogena svojstva, dok nusprodukti nekih PAH-ova koji nastaju tijekom metaboličkih procesa, pokazuju mutagena svojstva. U morskom okolišu koncentracije PAH-ova kreću se od nanograma po litri (Dachs i sur. 1997; Cripps, 1992; Wu i sur., 2011) do mikrograma po litri (Law i sur., 1997), a najviše koncentracije zabilježene su u priobalnim vodama uz velika naselja (ili veće gradove) kao posljedica ljudskih aktivnosti. Kako su skloni bioakumulaciji, ovi spojevi predstavljaju prijetnju za zdravlje vodenih organizama i čovjeka, pa je brzo i pouzdano praćenje njihove koncentracije u prirodnim vodama izuzetno važno. Prema Uredbi o standardu kakvoće vode, koju je donijela Vlada Republike Hrvatske 2013. godine (Vlada RH, 2013), PAH-ovi spadaju u prioritetne opasne tvari, a maksimalna dopuštena koncentracija u površinskim, prijelaznim i priobalnim vodama za PAH-ove navedene u Uredbi iznosi:

antracen –  $0,4 \mu\text{g dm}^{-3}$

benzo[a]piren –  $0,1 \mu\text{g dm}^{-3}$

fluoranten –  $1 \mu\text{g dm}^{-3}$ .

### 2.1.1. Policiklički aromatski ugljikovodici u vodenim sustavima

Prirodne vode sadrže kompleksnu smjesu organskih tvari različitog porijekla, sastava, te fizičko-kemijskih svojstava. Uloga organske tvari u vodenim sustavima od iznimne je važnosti jer utječe na kemijske (adsorpcija, kompleksiranje, fotokemijski procesi), biološke (produktivnost i razvoj organizama), geološke (sedimentacija, remobilizacija) te fizikalne procese (prigušenje valova). Organska tvar u prirodnim vodama dijeli se na čestičnu i otopljenu, pri čemu se čestična organska tvar obično označava kao ona organska tvar koja zaostaje na staklenom filteru određene veličine pora (primjerice 0,7  $\mu\text{m}$  ili 0,45  $\mu\text{m}$ ), a njihove se koncentracije izražavaju koncentracijama čestičnog (POC), odnosno otopljenog organskog ugljika (DOC). Materijal koji prolazi kroz pore korištenog staklenog filtera označava se kao otopljena organska tvar i čini oko 89 % ukupne organske tvari u morima (Duursma i Dawson, 1981), te između 10 i 90 % ukupne organske tvari u rijekama, ovisno o količini prisutne suspendirane tvari (Maybeck, 1982). Otopljena organska tvar uključuje koloidnu i otopljenu fazu (Libes, 2009). Organska tvar u moru dijeli se u nekoliko osnovnih skupina: ugljikohidrati, lipidi, proteini te huminske tvari (Romankevich, 1984).

Ugljikohidrati su spojevi općenite molekulske formule  $C_m(H_2O)_n$ , a osnovna im je jedinica monosaharid sastavljen od 3 do 9 atoma ugljika. Koncentracije ugljikohidrata u prirodnim vodama kreću se između 0,065 i 3  $\text{mg dm}^{-3}$ , te čine 5-10 % ukupne otopljene organske tvari, a najzastupljenija frakcija ugljikohidrata su polisaharidi (Thurman, 1985; Borsheim i sur, 1999; Panagiotopoulos i Sempere, 2005).

Lipidi se definiraju kao spojevi topljivi u organskim otapalim, a slabo topljivi u vodi za razliku od ostalih klasa prirodnih biomolekula kao što su proteini, aminokiseline, ugljikohidrati te monosaharidi, od kojih su i biološki otporniji. Lipidi čine oko 4-30,5 % otopljene organske tvari u različitim područjima oceana i taj se sadržaj ne mijenja bitno s udaljenošću od obale ili dubinom vodenog stupca (Romankevich, 1984, Derieux i sur., 1998; Penezić i sur., 2010), te 10-25 % čestične organske tvari u površinskim vodama (Duursma i Dawson, 1981).

Proteini su biološke makromolekule sastavljene od lanaca aminokiselina, koje obavljaju cijeli niz funkcija u živim organizmima. U vodene sustave dospijevaju kao izvanstanični metabolički produkti vodenih organizama, raspadanjem uginulih vodenih organizama, pri različitim stupnjevima polimerizacije ili razgrađenosti u obliku

aminokiselina. U prirodnim vodama polimerizirani proteini čine oko 2 % otopljene organske tvari, a njihove koncentracije u morskoj vodi kreću se između 50-200  $\mu\text{g dm}^{-3}$ , dok su koncentracije ukupnih otopljenih aminokiselinama, uključujući i proteine različitih stupnjeva polimerizacije, između 50-1000  $\mu\text{g dm}^{-3}$  (Thurman, 1985; Boge i sur., 2013).

Huminske tvari su složeni organski spojevi širokog raspona molekulskih masa koji nastaju procesima razgradnje, polimerizacije i kondenzacije otopljene organske tvari prisutne u prirodnim vodama te su otporne na daljnju razgradnju (Cacosian i Lee, 1981; Skopinštev, 1981). Huminske tvari predstavljaju najznačajniju komponentu otopljene organske tvari. S obzirom na njihovu topljivost u alkalnim, odnosno kiselim otopinama, dijele se na: huminske kiseline, koje precipitiraju u kiselim otopinama, fulvinske kiseline, koje su topljive u kiselom, te humine, netopljive huminske komponente (Thurman, 1985; Hayes, 2001). Fulvinske kiseline topljivije su u vodi od huminskih kiselina i nešto su manje molekulske mase. Huminske tvari čine oko 50 % ukupne otopljene organske tvari u prirodnim vodama, te su njihove koncentracije izražene kao vrijednosti DOC-a. U morskoj vodi te se koncentracije kreću u rasponu od 0,1-0,25  $\text{mg dm}^{-3}$ , dok su u rijekama znatno više i kreću se u rasponu od 1-4  $\text{mg dm}^{-3}$  (Thurman, 1985).

Kada dospiju u morsku vodu, policiklički aromatski ugljikovodici će se rasporediti između čestične i otopljene frakcije organske tvari ovisno o njihovim fizičko-kemijskim svojstvima (topljivost u vodi, tlak para, koeficijent sorpcije), kao i o parametrima promatranog okoliša (koncentracija čestične i otopljene organske tvari, količina suspendirane čestične tvari, vrsta prisutnog sedimenta (Shi i sur., 2007). PAH-ove u otopljenoj frakciji uzorka čine oni vezani na koloidnu i otopljenu organsku tvar, ali i oni potpuno otopljeni (Fernandes i sur., 1999). Zbog njihovog velikog afiniteta prema organskoj tvari, podatci o koncentracijama potpuno otopljenih PAH-ova su rijetki, no upravo je ovaj podatak vrlo značajan u procjeni njihove biodostupnosti u nekom sustavu (Xia i sur., 2013). Prema Borneffu, u površinskim se vodama trećina PAH-ova nalazi vezana na čestičnu organsku tvar, trećina je vezana na fino raspršene organske čestice, dok je trećina u otopljenom obliku (Borneff, 1977). Uz ovako grubu podjelu, u literaturi postoje različiti podatci o raspodjeli PAH-ova u vodenim sustavima, pa tako u radovima Hatzianestis i sur. (2002) te Maldonado i sur. (1999), gdje su mjerene koncentracije PAH-ova u morskim sustavima, udio PAH-ova u otopljenoj frakciji čini između 33 i 99 % njihove ukupne količine. U radu Wang i sur. (2008), gdje je koncentracija PAH-ova određivana u čestičnoj i otopljenoj frakciji uzoraka vode iz

riječne delte, otopljena frakcija PAH-ova činila je 73 % ukupne količine. Smatra se kako će samo potpuno otopljeni policiklički aromatski ugljikovodici biti biodostupni (Neff, 1979). U radu Wodzinski i sur. (1974), pokazano je da su bakterije iz roda *Pseudomonas* kao izvor ugljika mogle koristiti otopljeni oblik fenantrena.

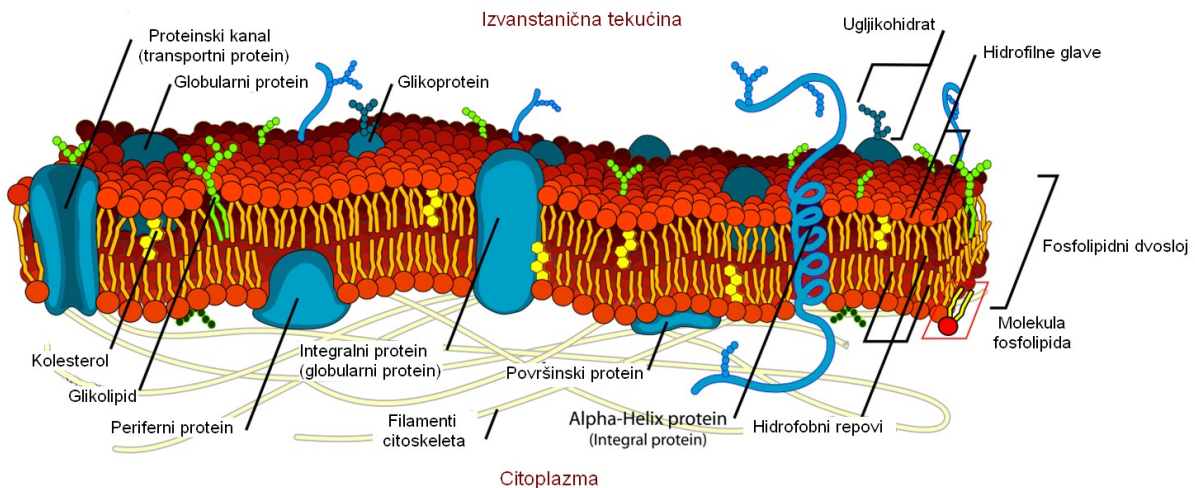
Stanična membrana je slabo propusna za polarne i nabijene molekule, no nepolarni spojevi, kao što su ciklički ugljikovodici te policiklički aromatski ugljikovodici, zbog male topljivosti u vodi i velikog koeficijenta particije između oktanola i vode, mogu ući u staničnu membranu, te se prijenos ovakvih molekula kroz membranu smatra pasivnim transportom duž koncentracijskog gradijenta između okoliša i stanice (Sikkema i sur., 1995; Chauhan i sur., 2008). Upravo zbog toga što postoji interakcija između stanične membrane i policikličkih aromatskih ugljikovodika, istraživanja su bila usmjerena ka razvoju elektrokemijskih sustava koji bi kao radni element uključivali modelnu biološku membranu.

## 2.2. Elektrokemijski senzori

Elektrokemijski senzori se u današnje vrijeme vrlo često koriste u analizama uzoraka iz okoliša te služe za detekciju postojećih organskih zagađivala (Centi i sur., 2008), toksina (Campas i sur., 2007), nutrijenata u svrhu praćenja eutrofikacije (Kirstein i sur., 1999), tragova metala (Cuculić i sur., 2009) i sl.. Razlozi njihove široke primjene su visoka osjetljivost, kratko vrijeme analize, mogućnost minijaturizacije i mjerenja *in situ*, kao i mala cijena instrumentacije. Signali koji se određuju obično su napon, struja, vodljivost, kapacitet ili neka njihova kombinacija. Najčešće korištene metode su ciklička voltametrija, kronoamperometrija, kronopotenciometrija te impedancijska spektroskopija (Grieshaber i sur., 2008).

### 2.2.1. Stanična membrana kao model u konstrukciji biosenzora

Stanična membrana koja predstavlja granicu između stanice i njezine okoline, sastoji se od fosfolipidnog dvosloja unutar kojeg su ugrađene funkcionalne molekule kao što su membranski proteini, ugljikohidrati, proteinski kanali, kolesterol, glikolipidi (Slika 1). One staničnoj membrani omogućavaju obavljanje različitih funkcija kao što je selektivna propusnost za ione i organske molekule.



Slika 1. Detaljni prikaz stanične membrane sa njezinim glavnim elementima. Preuzeto s [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cell\\_membrane\\_detailed\\_diagram\\_en.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cell_membrane_detailed_diagram_en.svg) i prilagođeno.

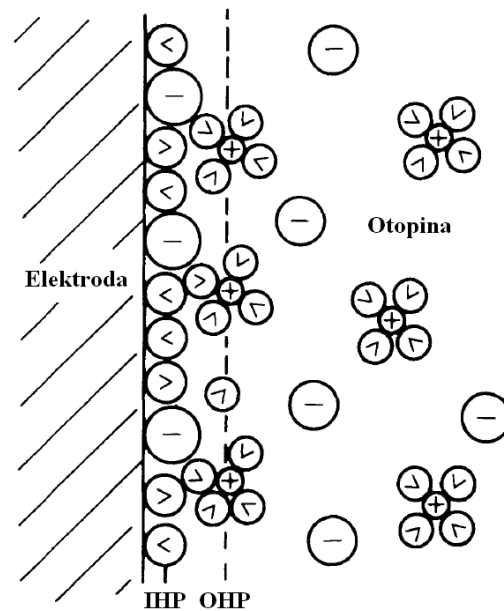
Stanična membrana je djelomično tekuća (fluidna) i molekule koje ju čine nisu učvršćene, a fosfolipidi difundiraju unutar membrane lateralno i transverzalno (mnogo sporiji proces). Za funkcionalne molekule ovakva struktura predstavlja vrlo specifično okruženje i može se koristiti u svrhu proučavanja procesa koji se događaju u membrani, ali i detekcije iona ili molekula koje interagiraju s membranom ili nekom funkcionalnom molekulom u/namembrani.

Modificiranje površina elektroda biološkim materijalima koji oponašaju stanične membrane, kako lipidnim dvoslojevima tako i monoslojevima, provodi se u svrhu povećanja specifičnosti, selektivosti i poboljšanja granica detekcije za željene analite. Na taj način dobiva se površina specifično prilagođena za interakcije s molekulom koja se analizira. Prve modelne membrane bile su tzv. „crne lipidne membrane” koje se izrađuju nanošenjem premaza lipida u organskom otapalu preko otvora u teflonskom držaču, pri čemu dolazi do spontanog stvaranja lipidnog dvosloja. Crne lipidne membrane korištene su u elektrokemijskim istraživanjima ugradnje proteina u modelne membranske spojeve, prijenosa protona kroz modelnu membranu, te kod proučavanja interakcija između modelnih membrana i organskih molekula (Micelli i sur., 2002; Gassa i sur., 1997; Brunaldi i sur., 2004). Thompson i sur. (1982) su koristili crnu lipidnu membranu u protočnom elektrokemijskom sustavu u svrhu detekcije interakcije lipidne membrane s antibiotikom valinomycinom. Problem kod korištenja crnih lipidnih membrana je njihova nestabilnost i krhkost. Daljnji korak u razvoju modelnih membrana su istraživanja Millera i sur. (Bach i sur., 1970; Miller i sur., 1970; Pagano i sur., 1973) u kojima se opisuje modelna biološka membrana sastavljena od monosloja lipida elektrostatski adsorbiranog na površinu živine elektrode, a koja se pokazala kao odličan izbor radne elektrode za istraživanja modelnih membrana. U spomenutim je radovima kapajuća živina elektroda s adsorbiranim monoslojem fosfolipida korištena za praćenje prijenosa iona kroz adsorbirani monosloj. Daljnja istraživanja svojstava modelnih bioloških membrana na površini živine elektrode te njihovih interakcija s organskim zagađivačima nastavili su Nelson i sur. (Nelson i Benton, 1986; Nelson i sur., 1990; Nelson i Auffret, 1988). U spomenutim radovima opisana je i živina elektroda modificirana elektrostatski adsorbiranim monoslojem fosfolipida za detekciju policikličkih aromatskih ugljikovodika.

### 2.3. Procesi na živinoj elektrodi

Živina elektroda odlikuje se velikim prenaponom izlučivanja vodika, pa zbog toga ima široku primjenu u analitičkoj kemiji. Primjerice, koristi se za određivanje metala kao što su bakar, kadmij i olovo u prirodnim vodama (posebno morskoj), čiji je elektrodni potencijal pozitivniji od elektrodnog potencijala vodika (Bond, 1980; Bruland i Cole, 1985; Gonzales i sur., 2003). Anodna granica radnog prozora živine elektrode u otopinama klorida je oko -0,1 V zbog stvaranja kalomela  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ , dok je katodna granica radnog prozora u vodenim otopinama između -1,1 V vs. ZKE pri pH 1, do -2,8V pri pH 13 (Lovrić, 2010). Živa je na sobnoj temperaturi tekuća, ima atomski glatku površinu i hidrofobna je. Zbog svoje glatke i homogene površine hidrofobnog karaktera osobito je pogodna za istraživanja koja uključuju adsorpcijske procese amfifilnih molekula poput fosfolipida uslijed komplementarnosti hidrofobnih lanaca fosfolipida s glatkom površinom žive. Adsorpcijski procesi na živinoj elektrodi događaju se pod utjecajem promjene elektrodnog potencijala koji utječe na gustoću površinskog naboja na površini elektrode. Promjenom potencijala na elektrodi nastaje električni dvosloj, odnosno uređuje se dvosloj nabijenih iona, orijentiranih dipola vode te hidratiziranih i nehidratiziranih iona u blizini površine elektrode. Prema Bockrisu i sur. (1963), električni dvosloj (Slika 2) čine:

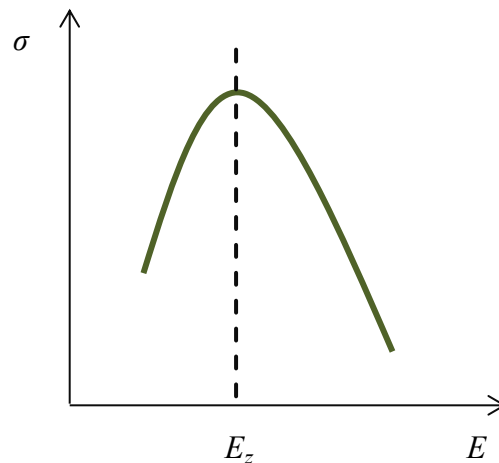
- metalni sloj - elektoda
- unutrašnja Helmholtzova ravnina (engl. *inner Helmholtz plane* (IHP)) - ravnina koja prolazi kroz sloj molekula otapala i specifično adsorbiranih iona na samoj površini elektrode te čine prvi solvatacijski sloj
- vanjska Helmholtzova ravnina (engl. *outer Helmholtz plane* (OHP)) – ravnina koja prolazi kroz sloj solvatiziranih iona adsorbiranih na prvi solvatacijski sloj
- difuzni sloj – dolazi nakon vanjske Helmholtzove ravnine i uključuje ione i molekule otapala od vanjske Helmholtzove ravnine do unutrašnjosti otopine



Slika 2. Prikaz električnog dvosloja prema Bockrisu koji pokazuje površinu elektrode s orijentiranim dipolima vode, ionima i solvatiranim ionima, te unutarnju (IHP) i vanjsku Helmholtzovu ravninu (OHP) i otopinu (preuzeto i prilagođeno iz Brett i Brett, 1993).

Kapacitet električnog dvosloja konstanta je proporcionalnosti između naboja koji se stvara zbog slaganja vrsta u otopini u blizini površine elektrode i potencijala koji se primjenjuje na elektrodu (Brett i Brett, 1993). Za proučavanje kapaciteta električnog dvosloja pri različitim naponima narinutim na elektrodu koriste se impedancijske tehnike ili elektrokapilarna mjerenja. Elektrokapilarna mjerenja temelje se na mjerenjima površinske napetosti žive u ovisnosti o narinutom naponu. Time dolazi do mijenjanja naboja na površini elektrode, pa se mijenja i površinska napetost ( $\sigma$ ) na granici elektroda/elektrolit. Krivulja ovisnosti površinske napetosti i primjenjenog napona naziva se elektrokapilarna krivulja (Slika 3), a njezin maksimum naziva se elektrokapilarnim maksimumom ili izoelektričnom točkom i predstavlja područje u kojem je naboj na površini elektrode jednak nuli.





Slika 3. Elektrokapilarna krivulja, ovisnost površinske napetosti o potencijalu primjenjenom na elektrodi.  $E_z$  predstavlja izoelektričnu točku, u kojoj je naboj na elektrodi jednak nuli.

Elektrokapilarna krivulja opisana je Lippmannovom jednadžbom (Adamson i Gast, 1997):

$$(\partial\sigma/\partial E)_\mu = -Q_A \quad (1.1.)$$

iz koje je moguće izraziti kapacitet kondenzatora koji čini električni dvosloj na živinoj elektrodi, odnosno diferencijalni kapacitet električnog dvosloja:

$$(\partial^2\sigma/\partial E^2)_\mu = -\partial Q_A/\partial E = C \quad (1.2.)$$

gdje je:

$\sigma$  = površinska napetost

$E$  = elektrodni potencijal

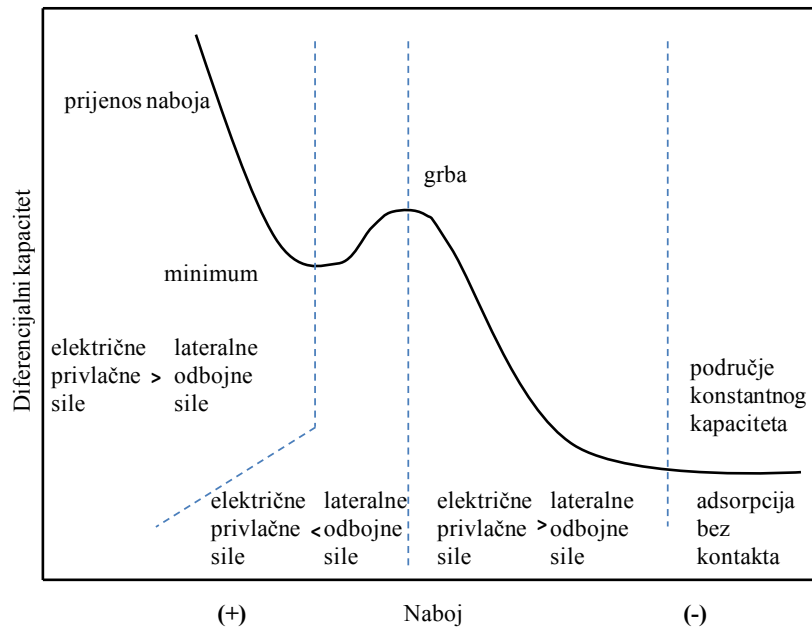
$Q_A$  = naboj na površini elektrode po jedinici površine

$C$  = diferencijalni kapacitet električnog dvosloja,

desni donji indeks, kemijski potencijal  $\mu$ , označava da su sastav otopine i metalne faze konstantni.

Ovisnost diferencijalnog kapaciteta o primjenjenom naponu objašnjena je Bockrisovim modelom lateralnog odbijanja (Slika 4). Prema ovom modelu, za napone pozitivnije od

izoelektrične točke diferencijalni kapacitet raste i postiže lokalni maksimum, tzv. „grbu“. Do toga dolazi zbog toga što elektroda postaje pozitivnije nabijena, količina adsorbiranih iona raste i postiže lokalni maksimum nakon čega kapacitet počinje padati zbog odbijanja iona istog naboja koji se akumuliraju oko elektrode. Primjenom još pozitivnijeg napona na elektrodu, električne će privlačne sile postati jače od lateralnih odbojnih sila i diferencijalni kapacitet ponovno će početi rasti.



Slika 4. Prikaz modela lateralnog odbijanja prema Bockrisu.

Kod potencijala negativnijih od izoelektrične točke formira se područje konstantnog kapaciteta uslijed akumuliranja iona i hidratiziranih iona u području vanjske Helmholtzove ravnine koji ne ovisi o ionskom sastavu otopine. Kapacitet ovog područja analogan je kapacitetu pločastog kondenzatora te se definira jednačbom:

$$C = A\varepsilon_0/d \quad (1.3.)$$

gdje je:

$A$  = površina kondenzatora

$\varepsilon_0$  = dielektrična konstanta vakuuma,  $8,854 \times 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$

$d$  = udaljenost ploča kondenzatora

Hidratizirani i ostali ioni u ovom području nisu u direktnom doticaju s površinom elektrode pa govorimo o adsorpciji bez kontakta. Po analogiji s pločatim kondenzatorom i imajući na umu Bockrisov model električnog dvosloja, ukupni diferencijal kapacitet električnog dvosloja, jednak je zbroju kapaciteta dvaju serijski spojenih kondenzatora:

$$1/C = 1/C_1 + 1/C_2 \quad (1.4.)$$

$C_1$  = kapacitet unutrašnjeg Helmholtzovog sloja

$C_2$  = kapacitet vanjskog Helmholtzovog sloja

$C$  = ukupni diferencijalni kapacitet

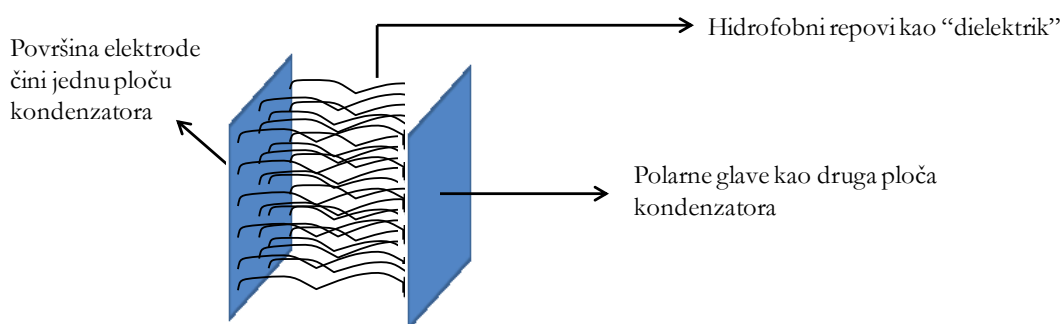
Adsorpcijom organskih molekula na površini elektrode, dolazi do mjenjaanja diferencijalnog kapaciteta dvosloja, i sloj adsorbiranih amfifilnih molekula opisuje se trećim kondenzatorom, koji je također analogan pločastom kondenzatoru (Slika 5), a čiji je kapacitet dan sa:

$$C = (\epsilon_0 \epsilon_{\text{org}})/d_1 \quad (1.5.)$$

gdje je:

$\epsilon_{\text{org}}$  = dielektrična konstanta adsorbiranih organskih molekula

$d_1$  = debljina adsorbiranog sloja



Slika 5. Shematski prikaz monosloja amfifilnih molekula na površini žive elektrode kao model jednostavnog pločastog kondenzatora.

Ukupni kapacitet električnog dvosloja definira se kao kapacitet dva serijski spojena kondenzatora paralelno spojena s trećim koji predstavlja površinu prekrivenu adsorbiranim

molekulama. U slučaju potpune pokrivenosti elektrode organskom tvari, ukupni je kapacitet u potpunosti određen ovim trećim kondenzatorom. Struja koja nastaje zbog punjenja ili pražnjenja električnog dvosloja bez elektrodne reakcije odnosno prijenosa naboja, naziva se kapacitetnom ili ne-faradayskom strujom:

$$I_c = dQ/dt \quad (1.6.)$$

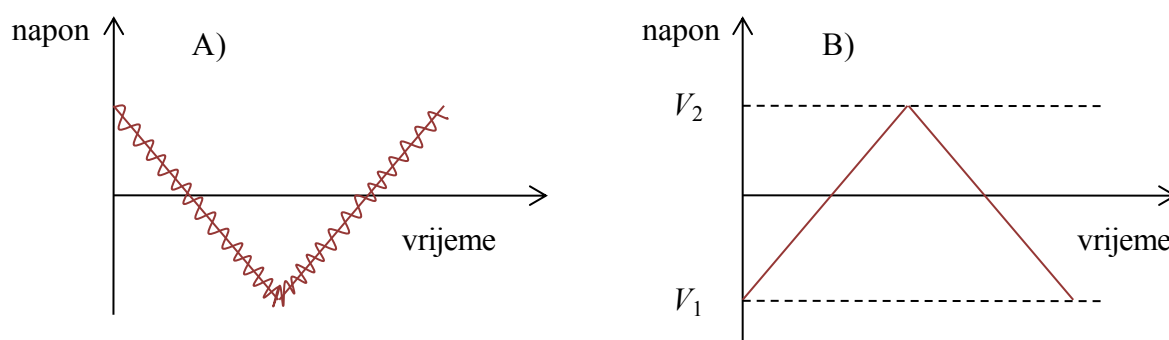
gdje je:

$Q$  = naboj

$t$  = vrijeme

Kapacitetna struja ovisi o vremenu nabijanja električnog dvosloja, odnosno o brzini promjene potencijala elektroda i zajedno s faradayskom strujom, koja se javlja kao posljedica oksidacije ili redukcije elektroaktivnih vrsta na elektrodi, čini ukupnu struju koja teče kroz elektrolit. Iako se kapacitetna struja u većini elektrokemijskih metoda pokušava izbjeći jer je često nepoželjna komponenta u mjerenom odzivu struje, kod proučavanja ne-faradayskih procesa (adsorpcija organskih molekula na površinu elektrode) upravo je kapacitetna struja ona komponenta odziva struje koja se mjeri.

Elektrokemijske metode za proučavanje adsorpcijskih procesa organskih molekula i mjerenje kapacitetne struje su voltametrija izmjenične struje izvan faze (AC voltametrija) te brza ciklička voltametrija (Slika 6).



Slika 6. Shematski prikaz signala pobude kod voltametrije izmjenične struje (A) i kod cikličke voltametrije (B).

Kod voltametrije izmjenične struje signal pobude je potencijal koji se linearno mijenja i na koji je superponiran sinusoidalni izmjenični potencijal male amplitude. Signal odziva je samo

izmjenična komponenta ukupne struje, prikazana u ovisnosti o primjenjenom, linearno promjenjivom potencijalu. Kako faradayska i kapacitetna struja imaju različite fazne kuteve u odnosu na primjenjeni izmjenični sinusoidalni potencijal, fazno osjetljiva mjerenja, ako se izvode izvan faze, odnosno pod faznim kutem  $\varphi = 90^\circ$ , omogućuju mjerenje samo kapacitetne komponente ukupne struje sustava.

Kod cikličke voltametrije, faradayska struja vrha vala proporcionalna je korijenu brzine promijene potencijala, dok je kapacitetna struja proporcionalna brzini promjene potencijala:

$$I_c = \nu C \quad (1.7.)$$

gdje je:

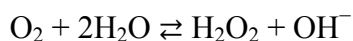
$I_c$  = kapacitetna struja

$\nu$  = brzina promjene potencijala ( $\text{V s}^{-1}$ )

Brzina promjene napona proporcionalna je kapacitetnoj struji, pa tako ciklička voltametrija s velikom brzinom promjene potencijala ( $\nu > 10 \text{ V s}^{-1}$ ) uzrokuje veću kapacitetnu struju i omogućava proučavanje kapacitetnih procesa na elektrodi, povezanih s punjenjem i pražnjenjem kondenzatora kojeg tvori sloj organskih molekula adsorbiran na površini elektrode. Stoga je ciklička voltametrija prikladna za karakteriziranje lipidnih slojeva, te za promatranje utjecaja interakcija između lipidnih slojeva i molekula analita na kapacitetnu struju promatranog sustava.

### 2.3.1. Kisik kod elektrokemijskih mjerenja

Prisutnost kisika predstavlja problem u elektrokemijskim mjerenjima sa živinom elektrodom zbog redukcije kisika u vodikov peroksid na površini elektrode. Taj proces se odvija u nekoliko koraka, a započinje adsorpcijom molekula vode na elektrodu i nastajanjem molekulskog iona kisika, a može se prikazati slijedećom jednačinom (Van Velzen i sur., 1982):



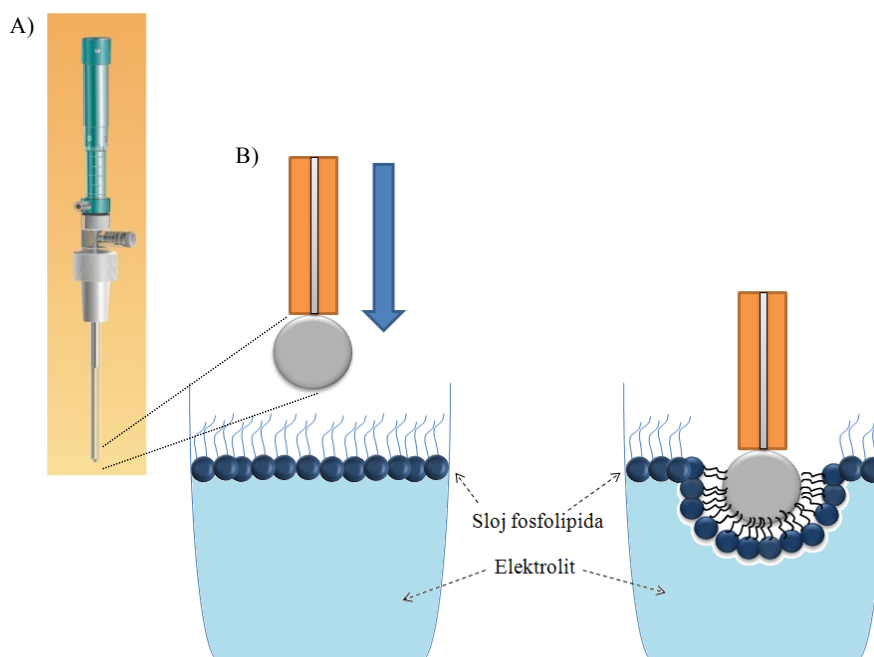
Pri kojim će se potencijalima dogoditi redukcija kisika ovisi o pH otopine, pa se tako pri pH = 7,4 redukcija odvija u rasponu potencijala od 0,015 do -0,105 V (vs. ZKE), a pri pH = 12,5 u rasponu potencijala od -0,130 do -0,22 V (vs. ZKE). Kada su na površini elektrode adsorbirane površinski aktivne molekule, poput sloja fosfolipida, redukcija kisika se pomiče prema negativnijim potencijalima. Primjerice, u radu Nelsona i Auffreta (1988) pokazano je kako se redukcija molekulskog kisika u ion superoksida događa na živinoj elektrodi s adsorbiranim slojem 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolipina (DOPC-a) na potencijalima između -0,4 i -0,7 V (vs. Ag/AgCl/3,5 mol dm<sup>-3</sup> KCl). Spomenute reakcije utječu na stabilnost slojeva fosfolipida na površini živine elektrode zbog čega je za rad na modificiranim elektrodama potrebno uklanjanje kisika iz elektrolitnih otopina.

### 2.3.2. Adsorpcija amfifilnih molekula na živinoj elektrodi

Adsorpcija amfifilnih molekula na površinu živine elektrode najizraženija je u području izoelektrične točke zbog nedostatka naboja na elektrodi u tom području. Kao što je već spomenuto, amfifilne molekule zamjenjujući molekule vode i hidratizirane ione adsorbirane na površini elektrode, mijenjaju sastav dvosloja, a samim time i kapacitet dvosloja, što posljedično utječe i na kapacitetnu struju.

Proučavanje fosfolipidnih slojeva na živinoj elektrodi započeo je Miller sa suradnicima (Miller, 1968; Bach i sur., 1970; Miller i Great, 1970; Pagano i Miller, 1973), korištenjem kapajuće živine elektrode s adsorbiranim slojem fosfolipida kao radne elektrode, za mjerenje prijenosa iona kroz lipidni sloj. Nelson i suradnici (Nelson i Benton, 1986; Nelson i Auffret, 1988; Nelson i sur., 1990; Nelson, 2001) proučavali su fosfolipidne

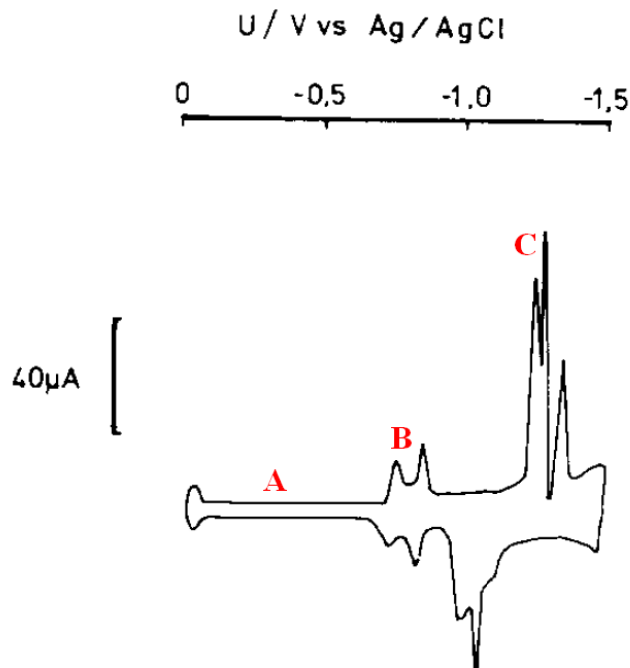
monoslojeve korištenjem viseće živine kapi elektrode (VŽKE). Adsorpcija fosfolipidnog sloja na viseću živinu kap elektrodu radi se mehanički, nanošenjem sloja fosfolipida otopljenih u lako hlapivom organskom otapalu (pentan, kloroform i sl.) na površinu elektrolita. Nakon što otapalo ispari amfifilni fosfolipidi se orijentiraju na granici faza elektrolit/zrak tako da je hidrofilni dio molekule fosfolipida u elektrolitu, a hidrofobni u zraku. Kroz tako orijentiran sloj molekula uranja se VŽKE, pri čemu dolazi do adsorpcije fosfolipida na površinu živine kapi (Slika 7).



Slika 7. Viseća živina kap elektroda (A) i shematski prikaz mehaničke adsorpcije sloja fosfolipida na površinu elektrode (B).

Zbog činjenice da fosfolipidne molekule zadržavaju svoju orijentaciju na granici površina živa/elektrolit uslijed njihove već spomenute komplementarnosti, često se koriste kao modelne biološke membrane.

Sloj fosfolipida adsorbiran na površinu živine elektrode stabilan je i može se karakterizirati AC voltametrijskim mjerenjima izvan faze te brzom cikličkom voltammetrijom (Slika 8).



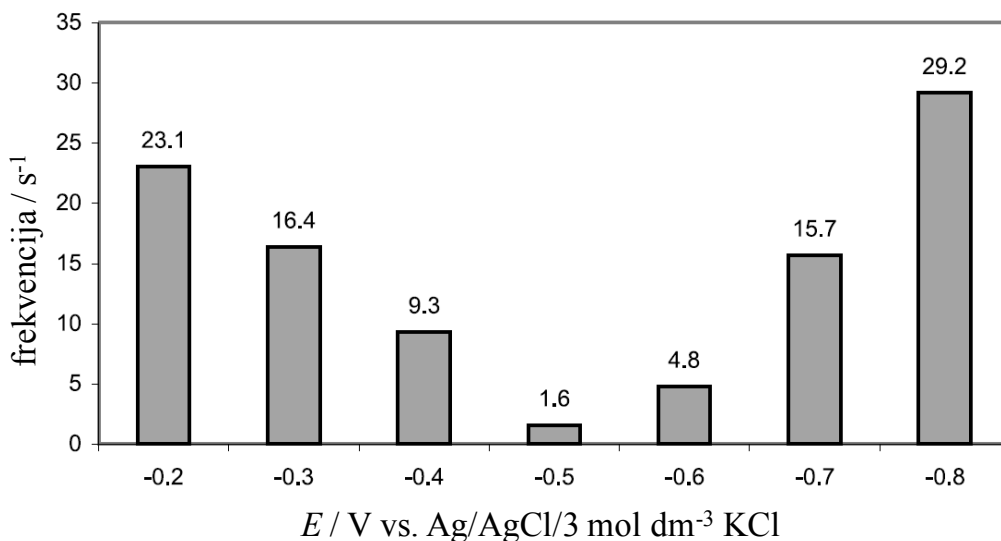
Slika 8. Ciklički voltamogram fosfokolina izoliranog iz goveđeg mozga na površini viseće živine elektrode (Nelson i Benton, 1986), kod kojeg se razlikuju tri područja: A – područje kapacitetnog minimuma, B – fazni prijelazi sloja pod utjecajem napona i C – desorpcijski vrhovi sloja. Brzina promjene potencijala =  $57,6 \text{ V s}^{-1}$ . Potencijali su izraženi u odnosu na referentnu elektrodu  $\text{Ag/AgCl}/3,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$ .

Na slici 8 razlikujemo tri područja: A, B i C. Područje A je oko izoelektrične točke elektrode, odnosno područje kapacitetnog minimuma, kada je površina elektrode potpuno prekrivena slojem fosfolipida. U ovom području adsorbirani sloj je nepropustan za metalne ione (Nelson i Benton, 1986; Moncelli i sur., 1994). Kako narinuti potencijal ide prema negativnijim vrijednostima, na površini elektrode dolazi do reorijentacije fosfolipida (Nelson i Benton, 1986), područje B na slici 8. Lijevo, prvi ili pozitivniji kapacitetni vrh predstavlja prvi fazni prijelaz adsorbiranog sloja, a povezan je sa stvaranjem pora u samom sloju, pri čemu sloj postaje propustan za ione prisutne u otopini. Desno, drugi ili negativniji kapacitetni vrh, odnosno drugi fazni prijelaz, povezan je s procesima nukleacije i rasta spomenutih defekata pri čemu se na površini elektrode stvaraju područja dvosloja. U području C dolazi do desorpcije lipidnog materijala s površine elektrode što je okarakterizirano desorpcijskim kapacitetnim vrhovima. Spomenuti procesi potvrđeni su i korištenjem metode samokonzistentnog polja te Monte Carlo simulacije u radu Brukhno i sur. (2011), ali i direktnim mjerenjima uz korištenje mikroskopije atomskih sila na površini živine elektrode



pod naponom (Vakurov i sur., 2014). Reproducibilni fazni prijelazi karakteristični za pojedini sloj omogućeni su fluidnošću fosfolipidnih monoslojeva čija se struktura mijenja pod utjecajem promjenjivog električnog polja. Upravo ta karakteristika fosfolipidnih slojeva, kao i osjetljivost spomenutih strukturnih promjena na promjene u monosloju (Nelson, 2010), omogućila je njihovu upotrebu u razvoju senzora. Ovako modificirana elektroda korištena je za proučavanje funkcioniranja ionskih kanala, prijenosa iona kroz fosfolipidni monosloj (Nelson i Benton, 1986; Nelson i Auffret, 1988; Nelson, 2001), te interakcije između fosfolipidnog monosloja i hidrofobnih organskih molekula (Nelson i sur., 1990; Stoodley i sur., 2002). Također, u radu Nelsona i Auffreta (1988) promatran je i utjecaj različitih iona na ponašanje kapacitetnih vrhova fosfolipidnog monosloja DOPC-a. Primjećeno je kako morska voda, te magnezij i kalcij, koji su uz ione natrija i klora u morskoj vodi u najvećoj mjeri (oko 87 %) zastupljeni u obliku hidratiziranih iona (Bryne, 2008), pokazuju značajan utjecaj na kapacitetne vrhove DOPC-a. Divalentni kationi interagiraju s fosfatnim grupama fosfolipida uzrokujući na taj način strukturne promjene u monosloju i čineći ga gušće složenim i kompaktnijim (Chen i Huang, 2000).

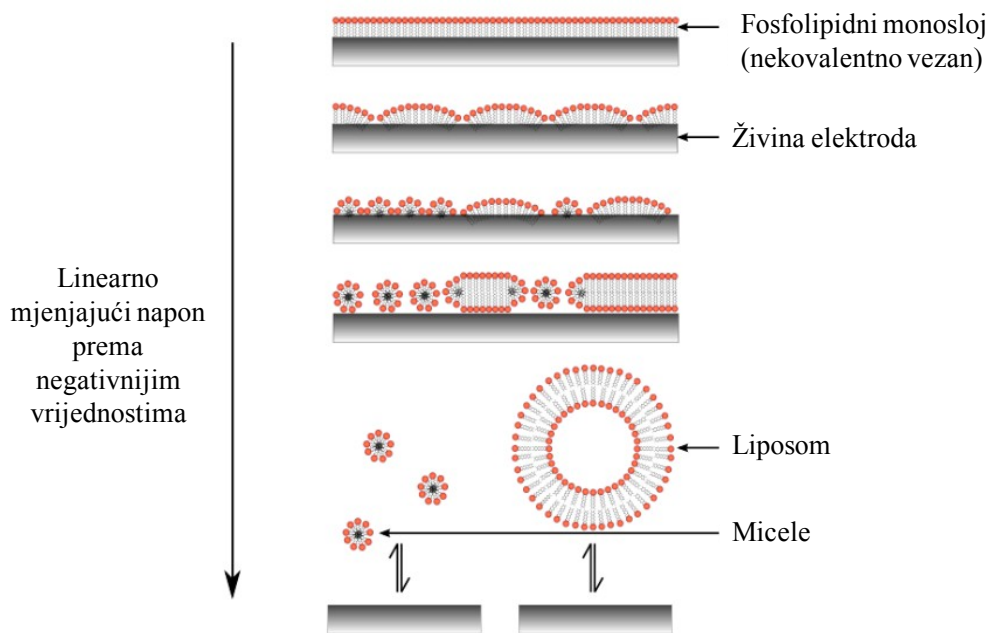
Površinu živine elektrode moguće je modificirati slojem fosfolipida i elektrokemijskim putem iz suspenzije liposoma fosfolipida. U slučaju liposoma fosfolipida modificiranje elektrode fosfolipidnim slojem je proces koji se sastoji od više koraka. Liposom prvo dolazi u doticaj s površinom elektrode gdje se pod utjecajem napona raspukne i tada dolazi do formiranja sloja fosfolipida na površini elektrode. Tako je u radu Hellberga i sur. (2002) opisana interakcija između liposoma sastavljenih od fosfatidilkolina i miješanih masnih kiselina sa statičnom živinom elektrodom, pri čemu su pucanje liposoma i adsorpcija lipidnog monosloja na površini elektrode zabilježeni kronoamperometrijskim mjerenjima, u obliku strujnih vrhova. Slika 9 pokazuje odnos frekvencije strujnih vrhova i napona primjenjenog na elektrodu iz kojeg je vidljivo kako je interakcija između liposoma i živine elektrode najslabija upravo u području izoelektrične točke gdje je uočeno najmanje kapacitetnih procesa.



Slika 9. Ovisnost frekvencije strujnih vrhova detektiranih kronoamperometrijom uslijed adsorpcije liposoma na površinu elektrode i napona primjenjenog na živinu elektrodu. Preuzeto iz Hellberg i sur., 2002, i prilagođeno.

Razlog tome je što je za pucanje liposoma potrebno polarizirati elektrodu, jer u protivnom ne dolazi do adsorpcije fosfolipida iz liposoma na površinu elektrode.

Iako viseća živina kap elektroda pokazuje veliki potencijal u razvoju senzora, ograničenja poput krhkosti i velikih količina žive koje koristi, čine je neupotrebljivom za senzorsku upotrebu. Iz tog je razloga razvijena živina mikroelektroda kod koje je živa elektrodeponirana na platinsku podlogu na čipu od silicija (Coldrick i sur., 2009). U spomenutom radu pokazano je kako je cikličkom voltametrijom od područja oko izoelektrične točke do područja iza desorpcijskog potencijala fosfolipida DOPC-a, moguće na površini živine mikroelektrode adsorbirati stabilan i reproducibilan monosloj iz vodene suspenzije lipida, prema shemi na Slici 10.



Slika 10. Predloženi mehanizam adsorpcije monosloja fosfolipida iz lipidne suspenzije molekula DOPC-a. Preuzeto iz Brukhno i sur., (2011) i prilagođeno.

Opisani sustav pokazao se nespecifično osjetljivim na prisutnost membranski aktivnih spojeva uključujući i piren koji spada u grupu policikličkih aromatskih ugljikovodika (Mohamadi i sur., 2014).

U želji da se dalje razvije senzorski sustav s mikroelektrodom modificiranom modelnom membranom, ovaj rad obuhvaća daljnja istraživanja koja su provedena kako bi se povećala specifičnost i osjetljivost sustava na policikličke aromatske ugljikovodike.

## 2.4. Langmuirovi monoslojevi

Kao izvrsni modeli za biološke membrane često se koriste Langmuirovi monoslojevi, odnosno monoslojevi sastavljeni od jednog sloja površinski aktivnih (amfifilnih) molekula na granici faza zrak/tekućina. Proučavanje Langmuirovih monoslojeva može dati podatke o orijentaciji molekula u monosloju, gustoći slaganja molekula, interakciji između molekula monosloja te o interakciji između molekula monosloja i molekula koje se nalaze u tekućini na čijoj je površini Langmuirov sloj (Dynarowicz-Latka i sur., 2001; Toimil i sur., 2010; Crawford i Leblanc, 2014). Saznanja proizašla iz proučavanja Langmuirovih slojeva imaju značajnu primjenu u područjima znanosti i tehnologije, kao što su kemija, fizika, znanost o materijalima i biologija (Dynarowicz-Latka i sur., 2001).

Za proučavanje svojstava modelnih membrana sastavljenih od fosfolipida ili mješavina različitih lipida, koristi se Langmuir-Blodgett kada (Slika 11). Kod proučavanja monoslojeva amfifilnih molekula, u Langmuir-Blodgett kadu se na površinu željene tekućine, odnosno subfaze, (vode, elektrolita) nanosi otopina amfifilnih molekula u lako hlapivom otapalu te nakon što otapalo ishlapi, amfifilne molekule ostaju na površini tekućine čineći netopljivi sloj debljine jedne molekule, odnosno Langmuirov monosloj.



Slika 11. Langmuir Blodgett kada od teflona s dvije pomične pregrade.

Zbog amfifilnog karaktera lipidnih molekula na granici faza voda/zrak, hidrofilni dijelovi molekula bit će uronjeni u vodenu fazu, a hidrofobni će stajat u zraku. Ponašanje amfifilnih molekula na granici faza voda/zrak moguće je donekle usporediti s onim na granici faza živina elektroda/elektrolit. Amfifilne molekule su na površini živine kapi orijentirane tako da su hidrofobni dijelovi molekula okrenuti prema živi, a hidrofilni prema elektrolitu.

Langmuir-Blodgett kada omogućava zbijanje lipidnih monoslojeva na površini tekućine što daje bolji uvid u njihova svojstva, kao što su međusobna mješljivost komponenata koje čine monosloj te površina koju zauzima pojedina molekula unutar monosloja, ali može dati i informacije o interakciji između promatranog monosloja i molekula analita prisutnih u vodenoj otopini na kojoj se monosloj nalazi.

Na molekule tekućine koje se nalaze na površini uz privlačne sile između ostalih molekula na površini, djeluje i privlačna sila prema unutrašnjosti otopine, pa tako povećanje površine

povećava slobodnu energiju sustava. Ovo povećanje slobodne energije po jedinici površine ekvivalentno je povećanju sile po jedinici duljine i naziva se površinskom napetošću ( $\sigma$ ), a definira se kao promjena Gibbsove slobodne energije sustava po jedinici površine pri uvjetima konstantnog volumena, vanjskog tlaka i temperature:

$$\sigma = (dG/dA)_{V,p,T} \quad (1.8.)$$

pri čemu je:

$G$  = Gibbsova slobodna energija

$A$  = površina

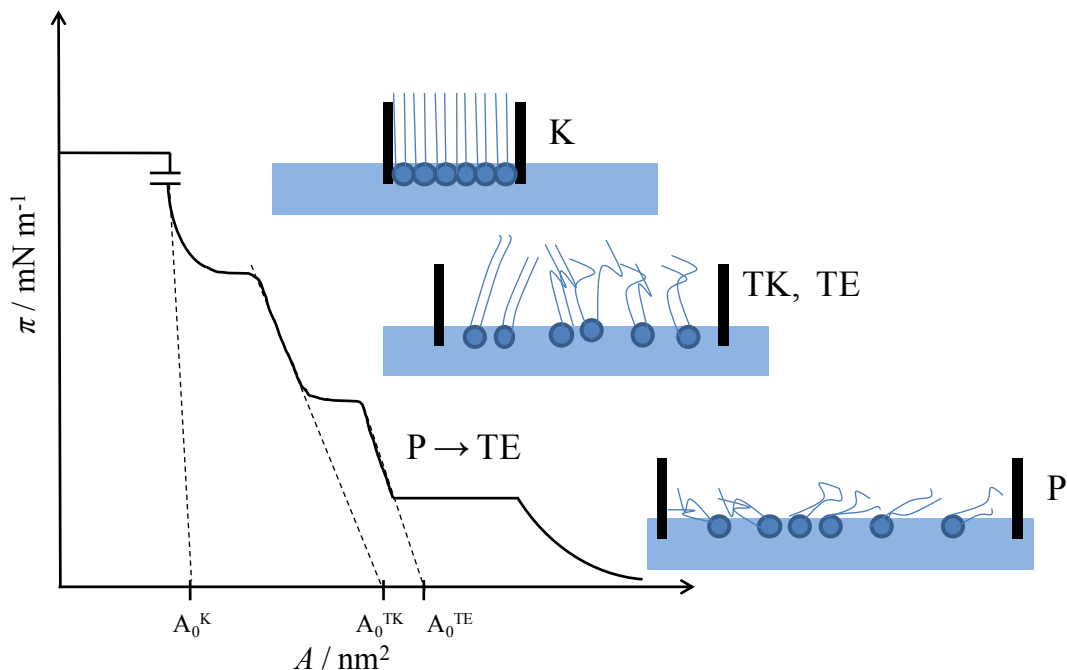
donji desni indeksi  $V, p, T$ , označavaju uvjete konstantnog volumena, vanjskog tlaka, odnosno temperature.

Kada se nanese na površinu željene otopine, amfifilne molekule će smanjiti površinsku napetost. Površinski tlak ( $\pi$ ) koji amfifilne molekule vrše na stijenke kade definiran je upravo razlikom između površinske napetosti čiste tekućine ( $\sigma_0$ ) i površinske napetosti tekućine na čijoj se površini nalaze amfifilne molekule ( $\sigma_1$ ) i opisuje se jednadžbom:

$$\pi = \sigma_0 - \sigma_1 \quad (1.9.)$$

Površinski tlak mjeri se korištenjem Wilhelmyeve vage čiji se princip rada temelji na mjerenju razlike težine tanke pločice od platine, stakla ili papira na zraku te uronjene u tekućinu. Kada je pločica do pola uronjena u tekućinu na nju će djelovati gravitacijska sila te sile površinske napetosti, a razlika težine suhe i uronjene pločice proporcionalna je sili površinske napetosti. Kompresijom monosloja amfifilnih molekula na površini tekućine površinski tlak se mijenja, a molekule monosloja nalaze se u različitim stanjima koja su analogna stanjima trodimenzionalnih plinova, tekućina i krutina (Gaines, 1966). Stanja monosloja prate se mjerenjem  $\pi$ - $A$  izoterma, odnosno dijagrama koji prikazuju ovisnost površinskog tlaka o površini koju zauzimaju molekule monosloja tijekom kompresije (Slika 12). Odmah po nanošenju na površinu tekućine, molekule se nalaze polegnute na granici faza otopina/zrak, interakcije među njima su slabe i ovakvo se stanje naziva plinovitim (P). Komprimiranjem monosloja molekule se počinju međusobno približavati te dolazi do faznog

prijelaza iz plinovitog u tekuće ekspanzirano (TE) stanje, što se obično očituje pojavom platoa u  $\pi$ - $A$  dijagramu. Ovakvi platoi predstavljaju ravnotežu između dva stanja sloja, gdje tlak uslijed daljnje kompresije ostaje gotovo nepromijenjen (P $\rightarrow$ TE).



Slika 12. Prikaz  $\pi$ - $A$  izoterme sa shematskim prikazima stanja sloja pri različitim tlakovima.

P = plinovito stanje, TE = tekuće ekspanzirano stanje, TK = tekuće kondenzirano stanje, K = kondenzirano stanje.

U tekuće ekspanziranom stanju hidrofilni su dijelovi molekula vezani za otopinu, dok se hidrofobni repovi uzdižu iznad površine, a njihova je orijentacija nasumična. Ekstrapolacijom linearnog dijela izoterme do  $\pi = 0$ , dobiva se podatak o graničnoj površini po molekuli u tekućem ekspanziranom stanju ( $A_0^{TE}$ ) (Gaines, 1966). Daljnjom kompresijom, kako se molekule još više približavaju, sloj dolazi u metastabilno stanje prelazeći iz tekućeg ekspanziranog u tekuće kondenzirano stanje (TK). Tekuće kondenzirano stanje i kondenzirana faza (K) kod koje su polarne glave gušće složene nego u TK stanju, su stanja u kojima je sloj slabo stlačiv zbog pojave međumolekulskih sila uslijed pravilnog i gustog slaganja molekula. Ekstrapolacijom linearnih dijelova izoterme mogu se dobiti podatci o graničnim površinama po molekuli u tekuće kondenziranoj ( $A_0^{TK}$ ) i kondenziranoj fazi ( $A_0^K$ ), koje su bliske vrijednostima presjeka amfifilne molekule okomito orijentirane na površinu.

Nakon postizanja kondenzirane faze, u kojoj su molekule vrlo gusto i pravilno pakirane, daljnja će kompresija dovesti monosloj do tlaka kolapsa, odnosno najvećeg tlaka do kojeg se monosloj može komprimirati, nakon čega, daljnjim povećanjem tlaka, slijedi raspad sloja u izolirane nakupine ili višeslojne strukture uzrokovane istiskivanjem molekula iz monosloja. Kod  $\pi$ - $A$  izotermi miješanih slojeva, kod kojih se tlakovi kolapsa pojedinih komponenti razlikuju, pri određenom se tlaku nazvanom tlakom ovojnice (*engl.* envelope pressure), pojavljuje netipičan fazni prijelaz iz tekuće ekspaniranog u tekuće kondenzirano stanje pri kojem se sastav miješanog sloja mijenja. Naime, komprimiranjem miješanih slojeva pri tlaku većem od tlaka kolapsa jedne od komponenti u sloju, dolazi do istiskivanja te komponente iz sloja, te se tako mijenja sastav sloja u odnosu na prvotni omjer komponenti (Mitsche i sur., 2010). Dakle, tlak ovojnice predstavlja maksimalni tlak pri kojem je sastav monosloja još uvijek jednak sastavu nekomprimiranog monosloja. Kao i kod monoslojeva sastavljenih od jedne komponente, ekstrapolacijom linearnog dijela  $\pi$ - $A$  izoterme do  $\pi = 0$  moguće je odrediti koliku površinu zauzima pojedina molekula u miješanom sloju ( $A_{12}$ ), s tom razlikom što će se kod miješanog sloja ekstrapolirati dio izoterme neposredno prije tlaka ovojnice, dok sastav sloja još uvijek odgovara sastavu sloja nanesenom na površinu otopine. Parametar  $A_{12}$  omogućava određivanje površinskog suviška ( $A^E$ , *engl.* excess area) miješanog monosloja pomoću kojeg se utvrđuje mješljivost komponenata koje čine monosloj. Površinski suvišak definira se kao razlika eksperimentalno dobivenog podatka za površinu po molekuli miješanog monosloja ( $A_{12}$ ) i izračunate površine po molekuli za idealno mješanje dviju komponenata koje čine monosloj ( $A_{id}$ ):

$$A^E = A_{12} - A_{id} \quad (1.10.)$$

Površina po molekuli kod idealnog mješanja komponenata sloja računa se po slijedećoj jednadžbi:

$$A_{id} = A_1 N_1 + A_2 N_2 \quad (1.11.)$$

pri čemu su:

$A_1$  i  $A_2$  - površine po molekuli slojeva pojedinih komponenti;

$N_1$  i  $N_2$  - molarni udjeli komponenata u miješanom sloju koji se ispituje.

U slučaju idealnog miješanja ili potpunog ne-miješanja komponenti, vrijednosti  $A_{id}$  i  $A_{12}$  biti će jednake,  $A^E$  će biti nula, a krivulja ovisnosti  $A_{12}$  o  $N_1$  biti će predstavljena ravnom linijom. Svaka devijacija od ove krivulje značit će da su komponente koje čine sloj samo djelomično mješljive, a ovisno o tome je li devijacija od krivulje u pozitivnom ( $A_{12} > A_{id}$ ;  $A^E > 0$ ) ili negativnom smjeru ( $A_{12} < A_{id}$ ;  $A^E < 0$ ), moguće je zaključiti jesu li sile između komponenata miješanog sloja odbojne ( $A^E > 0$ ) ili privlačne ( $A^E < 0$ ), budući da vrijednost  $A^E$  ovisi upravo o intermolekulskim silama komponenata miješanog sloja (Handa, 1993).

Još jedan parametar koji se koristi za karakterizaciju lipidnih monoslojeva jest modul površinske kompresije  $C_s^{-1}$ . Iz modula površinske kompresije moguće je preciznije odrediti tlak kolapsa i fizičko stanje sloja, a definira se slijedećom jednadžbom:

$$C_s^{-1} = -A(d\pi/dA) \quad (1.12)$$

gdje je:

$A$  = površina po molekuli pri određenom tlaku

$\pi$  = površinski tlak

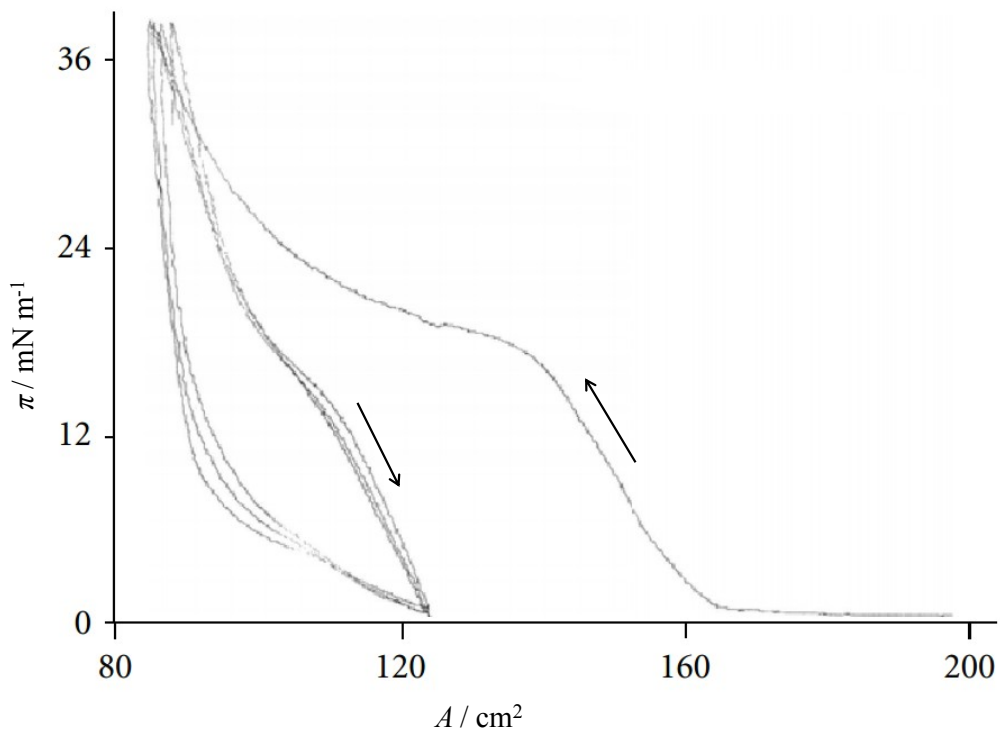
Tako je za slojeve koji se nalaze u tekuće ekspaniranom stanju modul površinske kompresije između 12,5 i 50 mN m<sup>-1</sup>, kod slojeva u tekuće kondenziranoj fazi te vrijednosti su veće od 50 mN m<sup>-1</sup>, a za slojeve koji se nalaze u kondenziranoj fazi vrijednosti modula površinske kompresije veći su od 250 mN m<sup>-1</sup> (Davies i Rideal, 1963; Broniatowski i Dynarowicz-Łatka, 2004). Upravo je iz krivulje ovisnosti modula površinske kompresije o površinskom tlaku moguće točnije odrediti fazne prijelaze pojedinog sloja jer se modul kompresije kod faznih prijelaza naglo mijenja uslijed promjene orijentacije molekula u monosloju. Ako monosloj prijeđe u fazu u kojoj su molekule gušće složene, modul površinske kompresije početak će naglo rasti i dostići će vrijednosti karakteristične za fazu u kojoj se nalazi. Pri tlaku kolapsa monosloja vrijednosti modula površinske kompresije također će se promijeniti, no u ovom slučaju te će vrijednosti naglo pasti na nulu.

Kao što je spomenuto, Langmuir-Blodgett tehnika koristi se i za proučavanje interakcija između molekula analita u tekućini i Langmuirovog monosloja na površini tekućine pri čemu se koriste dva pristupa, pristup konstante površine, te pristup konstantnog tlaka (Ter-Minassian-Saraga, 1986). Kod pristupa konstantne površine, mjeri se promjena površinskog



tlaka. U slučaju ugrađivanja molekula u monosloj s vremenom će doći do porasta površinskog tlaka zbog dotoka novog materijala na granicu faza tekućina/zrak. Drugi pristup temelji se na održavanju površinskog tlaka na željenoj vrijednosti pri čemu se mjeri promjena površine kade. Kod ovog pristupa ugradnjom molekula u monosloj dolazi do povećanja površine koju monosloj zauzima, također zbog dotoka novog materijala na granicu faza tekućina/zrak. U slučaju da se molekule analita ne ugrađuju u monosloj, nego se samo adsorbiraju na molekule monosloja, parametar koji se prati (promjena površinskog tlaka ili promjena površine) ostat će konstantan.

Kompresijom i ponovnim širenjem monosloja na granici faza tekućina/zrak, odnosno zatvaranjem i otvaranjem barijera Langmuirove kade, dobiva se kružna  $\pi$ -A izoterma koja predstavlja još jedan parametar u karakterizaciji monoslojeva. Tako se kod monoslojeva kod kojih kompresija i ponovno širenje nisu procesi u ravnoteži, javlja fenomen histereze. Prilikom kompresije i nakon toga širenja monoslojeva DOPC-a javlja se blaga histereza širenja koja je uvijek malo ispod izoterme kompresije (Notter i sur., 1982). Ovakvo ponašanje znači da je za proces kompresije potreban veći površinski rad nego za proces širenja (Cotisel i sur., 1989). Komprimiranjem monosloja preko tlaka kolapsa i njegovim ponovnim širenjem doći će do pojave značajne histereze, a kod monoslojeva kod kojih kompresijom dolazi do gubitka materijala iz monosloja u tekućinu, histereze će sukcesivnim snimanjem kružnih izoterma biti značajno pomaknute prema sve manjim vrijednostima površine. Tako je u radu Sudheesh sa sur. (2012) pokazano kako se komprimiranjem i širenjem monosloja sastavljenog od stearinske kiseline i *N*-oktadecil-*N'*-feniltiouree sastav monosloja značajno mijenja uslijed istiskivanja molekula *N*-oktadecil-*N'*-feniltiouree iz monosloja (Slika 13).

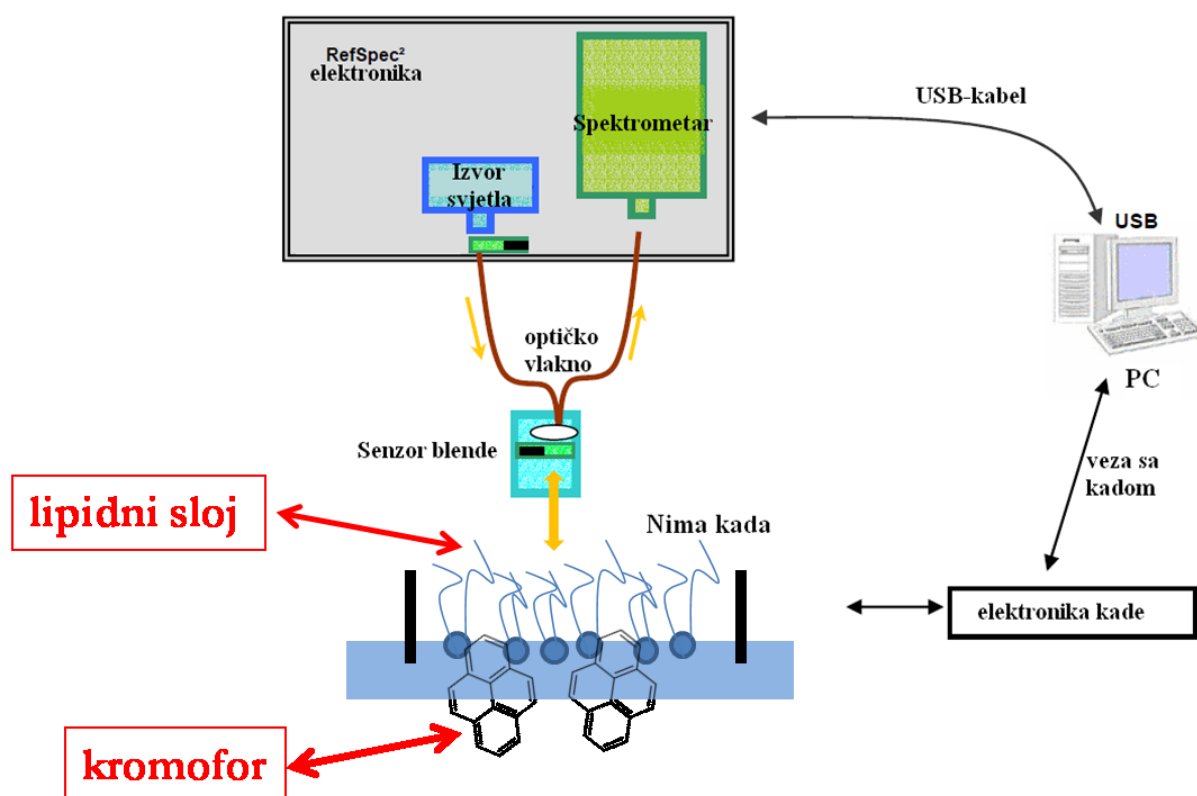


Slika 13. Histereza monosloja sastavljenog od stearinske kiseline i *N*-oktadecil-*N'*-feniltiouree u molarnom omjeru 0,496 : 0,504. Preuzeto i prilagođeno iz Sudheesh i sur., 2012.

Ovisno o obliku histereze, moguće je okarakterizirati tip interakcije između monosloja na granici faza tekućina/zrak i molekula analita koja se nalaze u subfazi, tj. postoji li ugradnja molekula analita u monosloj ili je interakcija adsorpcijskog karaktera.

### 2.4.1. UV – Vis refleksijska spektroskopija

Za karakterizaciju Langmuirovih monoslojeva koriste se i spektroskopske metode, kao što su infracrvena spektroskopija (Widayati i sur., 1997), fluorescencijska spektroskopija (Itoh i sur., 1991), apsorpcijska spektroskopija (Tuskanova i sur., 2002) te UV-Vis refleksijska spektroskopija (Grüniger i sur. 1983; Roldan-Carmona i sur., 2014). Metoda UV-Vis refleksijske spektroskopije (UV-Vis-RS) temelji se na mjerenju razlike refleksije upadajućeg svjetla od granice faza tekućina na kojoj se nalazi Langmuirov sloj koji sadrži kromoforne molekule/zrak i refleksije upadajućeg svjetla od granice faza čista tekućina/zrak ( $\Delta R$ ) (Grüniger i sur., 1983). Ova metoda korištena je najviše za proučavanje interakcija između kromofornih molekula u otopini i monosloja na površini otopine (Ohnishi i sur. 1995; Kozarac i sur., 1997), budući da omogućava detektiranje kromofornih molekula koje su ili ugrađene ili adsorbirane na Langmuirov monosloj (Slika 14).



Slika 14. Shematski prikaz dijelova refleksijskog spektrometra kao dijela Langmuir-Blodgett kade.



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

---



### 3. Eksperimentalni dio

#### 3.1. Kemikalije i otopine

Lipidi korišteni za formiranje miješanog sloja na površini Hg elektrode, 1,2- dilinoleoil-*sn*-glycero-3-fosfatidilkolin (DLPC), 1,3-bis (*sn*-3'-fosfatidil)-*sn*-glicerol (kardiolipin), N-oleoil-D-eritro-sfingozin (ceramid), N-acil-Dsfingozin-1-fosfatidilkolin (sfingomijelin), gliceril tristearat, gliceril trioleat (TG), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicerol-3-fosfatidilkolin (POPC) kupljeni su preko tvrtke Sigma Aldrich. Analizirani policiklički aromatski ugljikovodici, piren, fenantren, antracen te fluoranten, analitičke čistoće, kupljeni su preko tvrtke Sigma Aldrich. Modelne tvari korištene u ovom radu, polisaharid dekstran T-500 (Sigma Aldrich, SAD), protein albumin iz govedeg seruma (Sigma Aldrich, SAD), Na-humat (Ega Chemie, Steinheim, Njemačka), čistoće 99 % i više, korištene su kako su kupljene. Također, modelna zagađivala, 2,4,4'-triklorobifenil, čistoće minimalno 99 % (LGC Standard, GmbH, Wesel, Njemačka), 2-nitrofenol, čistoće minimalno 99 % (Sigma Aldrich, SAD), okadaična kiselina u obliku amonijeve soli, čistoće minimalno 90 % (Sigma Aldrich, SAD) te klorooctena kiselina čistoće minimalno 99 % (Sigma Aldrich, SAD), kao i antibiotici streptomycin (Calbiochem, EMD Chemicals, SAD), kanamicin (Gibco, Life Technologies, UK) i sulfametoksazol (Sigma-Aldrich, SAD) korišteni su kako su kupljeni. Elektrolitne otopine korištene u radu su 0,55 mol dm<sup>-3</sup> otopina NaCl, i morska voda uzeta u zimi na sjevernom Jadranu i očišćena od tragova organske tvari, tzv. čista morska voda. Prezasićena otopina NaCl pripremljena je otapanjem NaCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska) prethodno žarenog u mufolnoj peći (450 °C/4 h), u ultra čistoj vodi (Mili-Q voda, Direct-Q, Millipore system, Massachusetts) nakon čega je u otopinu dodan aktivni ugljen koji na sebe adsorbira eventualno zaostale tragove organske tvari. Nakon što aktivni ugljen stoji u otopini preko noći, otopina se filtrira korištenjem sinteriranog lijevka za filtriranje 4. stupnja (Duran, Wertheim/Main, Njemačka). Opisanim postupkom dobiva se 5,5 mol dm<sup>-3</sup> otopina NaCl, koja se razrjeđuje do koncentracije od 0,55 mol dm<sup>-3</sup>, te joj se dodaje NaHCO<sub>3</sub> (0.252 g NaHCO<sub>3</sub> u 100 cm<sup>-3</sup> 0.55 mol dm<sup>-3</sup> otopine NaCl) kako bi se postigla pH vrijednost morske vode od 8,1. Čista morska voda pripremljena je fitriranjem morske vode kroz stakleni GF/F filter veličine pora od 0,7 μm (Whatman, Maidstone, Engleska), nakon čega je obrađena UV zračenjem 24 h (živina lampa 150 W, Hanau, Njemačka). Potom se u tako obrađenu morsku

vodu dodaje aktivni ugljen koji se ostavlja preko noći i otopina se prije upotrebe filtrira korištenjem sinteriranog lijevka za filtriranje 4. stupnja (Duran, Wertheim/Main, Njemačka). Uzorku rijeke Save dodana je  $5,5 \text{ mol dm}^{-3}$  otopina NaCl kako bi se dobila  $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$  otopina, te uzorak nije obrađivan ni na koji drugi način.

Uzorak sjevernog Jadrana prije analize je filtriran korištenjem staklenog GF/F filtera veličine pora od  $0,7 \mu\text{m}$ .

Iz svih je otopina prije elektrokemijskih mjerenja uklonjen kisik korištenjem struje čistog dušika.

### **3.2. Metodologija rada**

#### **3.2.1. Elektrokemijska mjerenja - viseća živina kap elektroda (VŽKE)**

Prva istraživanja lipidnih monoslojeva rađena su metodom voltametrije izmjenične struje (AC voltametrije) korištenjem VŽKE u standardnoj troelektrodnoj ćeliji volumena  $50 \text{ cm}^3$  s Ag/AgCl referentnom elektrodom s unutarnjim punjenjem  $3 \text{ mol dm}^{-3}$  KCl i vanjskim  $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl te platinskom žicom kao protuelektrodom. Za mjerenja je korišten  $\mu\text{Autolab}$  tipa III (Methrom Autolab, Utrecht, Nizozemska) kontroliran programom GPES 4,9 (General Purpose Electrochemical System, Methrom Autolab, Utrecht, Nizozemska). Mjerenja metodom AC voltametrije provedena su pri faznom kutu od  $\varphi = 90^\circ$ , frekvenciji pobudnog izmjeničnog napona od  $75,12 \text{ Hz}$  i amplitudi izmjeničnog napona od  $5 \text{ mV}$ . VŽKE je mehanički modificirana lipidnim slojem, a preliminarno proučavanje interakcija između molekula analita i lipidnih monoslojeva rađeno je kombiniranjem metode AC voltametrije i cikličke voltametrije s brzinom promjene potencijala  $> 10 \text{ Vs}^{-1}$  koju omogućava Ivium Compactstat potencijostat (Ivium Technologies, Eindhoven, Nizozemska).

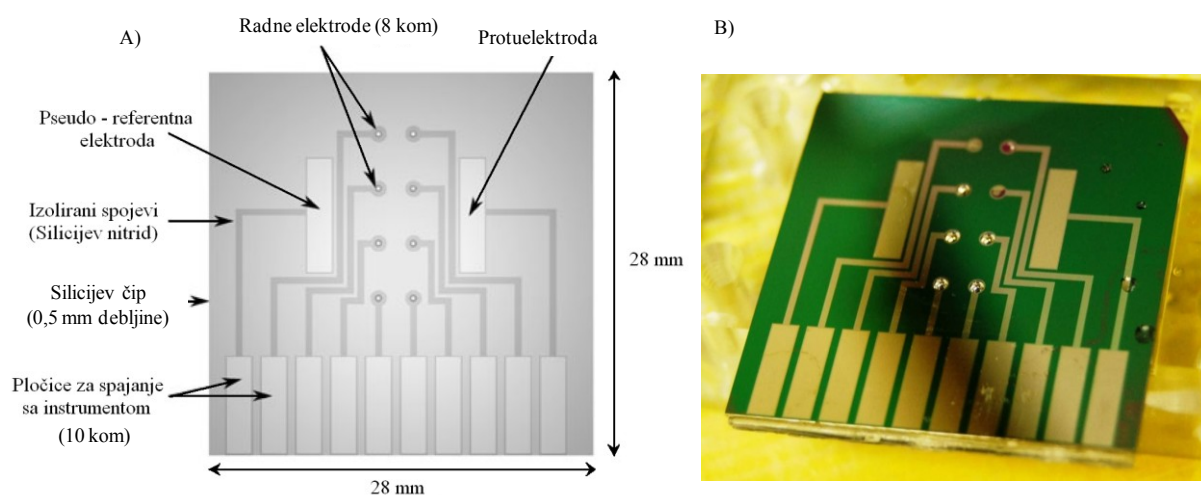
Korištenjem metode AC voltametrije u kombinaciji s cikličkom voltametrijom na Ivium Compactstatu interakcija između monosloja i analita provodi se na način da se monosloj tijekom željenog vremenskog perioda drži na potencijalu kapacitetnog minimuma (oko  $-0,4 \text{ V vs. Ag/AgCl/3 mol dm}^{-3} \text{ KCl}$ ), uz miješanje kako bi analit interagirao s monoslojem. Nakon toga se snima AC voltamogram ili ciklički voltamogram kako bi se utvrdilo je li došlo do interakcije između monosloja i analita. Za analizu hidrofobnih membranski aktivnih molekula ovakav pristup ima vrlo ograničene mogućnosti jer ne omogućava praćenje interakcija između analita i monosloja u realnom vremenu, a interakcija između monosloja i analita događa se pri točno određenom potencijalu. Unatoč



ograničenjima, kombinacija cikličke i AC voltametrije pokazala se korisnom u preliminarnoj karakterizaciji lipidnih monoslojeva, na temelju čega je i procijenjeno da se provedu daljnja i detaljnija istraživanja pojedinih slojeva.

### 3.2.2. Živina mikroelektroda

Živine mikroelektrode koje se u ovom radu koriste kao radne elektrode, dio su troelektrodnog sustava na čipu od silicija koji je opisan u radu Coldricka i sur. (2011) i izrađen na Tyndall National Institute, Cork, Velika Britanija. Na čipu od silicija dimenzija  $28 \cdot 28$  mm, nalazi se osam platinskih podloga u obliku diskova radijusa  $500 \mu\text{m}$ , te dvije pravokutne platinske elektrode ( $1,8 \cdot 8,3$  mm) od kojih jedna služi kao referentna elektroda, a druga kao protuelektroda (Slika 15).



Slika 15. Shematski prikaz silicijevog čipa sa troelektrodnim sustavom (A) preuzeto iz Coldrick i sur., 2011 i prilagođeno. Fotografija silicijevog čipa sa osam neovisnih radnih elektroda i elektrodeponiranom Hg (B).

Platinska se elektroda može koristiti kao referentna elektroda u slučajevima kada konvencionalna referentna elektroda nije dobar izbor, kao što su primjerice elektrokemija pri visokim temperaturama ili kod upotrebe rastaljenih elektrolita, ali i kod običnih vodenih elektrolitnih otopina (Kasem i sur. 2008). Potencijal platinske referentne elektrode je stabilan i ovisi o sastavu i koncentraciji otopine, a ove se elektrode još nazivaju i pseudo-referentnim elektrodama (Bott, 1995). U radu Coldrick i sur. (2011) primjećeno je kako kod upotrebe

platinske pseudo-referentne elektrode može doći do pomaka potencijala elektrode uslijed kontaminacije površine platine organskim molekulama, zbog čega je potrebno ispitati mogućnost upotrebe pseudo-referentne elektrode u ovom radu.

Osam platinskih diskova na čipu služi za elektrodepoziciju filma žive čime se dobiva osam neovisnih radnih elektroda. Metalni spojevi koji povezuju elektrode s pločicama za spajanje s instrumentom sastavljeni su od sloja Ti debljine oko 30 nm i sloja Pt debljine oko 100 nm, a napravljeni su procesom uklanjanja metala (engl. *lift-off process*), te izolirani slojem Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> debljine 500 nm, koji je nanešen postupkom kemijskog taloženja para pojačanog plazmom (engl. *plasma enhanced chemical vapour deposition (PECVD)*). Preko 10 pločica za spajanje od platine širine 2,54 mm, čip je spojen s instrumentom kartičnim modulom s 8 prekidača (Velleman VM129-8-Channel Relay Card Module), dok je aktiviranje željene elektrode kontrolirano računalom pomoću USB eksperimentalnog sučelja (Velleman VM110-Assembled USB Experiment Interface Board).

Hg mikroelektrode dobivaju se kronokulometrijskom elektrodepozicijom žive iz otopine Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> na platinske diskove. Količina naboja koja je potrebna kako bi se formirala radna elektroda izračunava se korištenjem Faradayevog zakona elektrolize prema kojem je količina naboja izmjenjena kroz međupovršinu elektroda-otopina proporcionalna masi tvari izlučenoj na elektrodi:

$$m = QM_r/zF \quad (1.13.)$$

pri čemu je:

$m$  = masa materijala izlučena na elektrodi

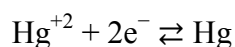
$Q$  = količina izmjenjenog naboja

$z$  = broj elektrona koji sudjeluju u reakciji

$F$  = Faradayeva konstanta, 96487 C mol<sup>-1</sup>

$M_r$  = molarna masa izlučene tvari

Redukcija žive proces je koji uključuje prijenos 2 elektrona:



Zbog oblika platinske podloge, procjenjuje se da će volumen žive koji se deponira na platinski disk biti za faktor 0.3 manji od volumena polovine kugle:

$$V_{\text{Hg}} = (4/6 r^3 \pi) \cdot 0,3 \quad (1.14.)$$

gdje je:

$V_{\text{Hg}}$  = volumen žive

$r$  = radijus elektrode

Korištenjem jednadžbi 1.13. i 1.14. dobivamo slijedeći izraz:

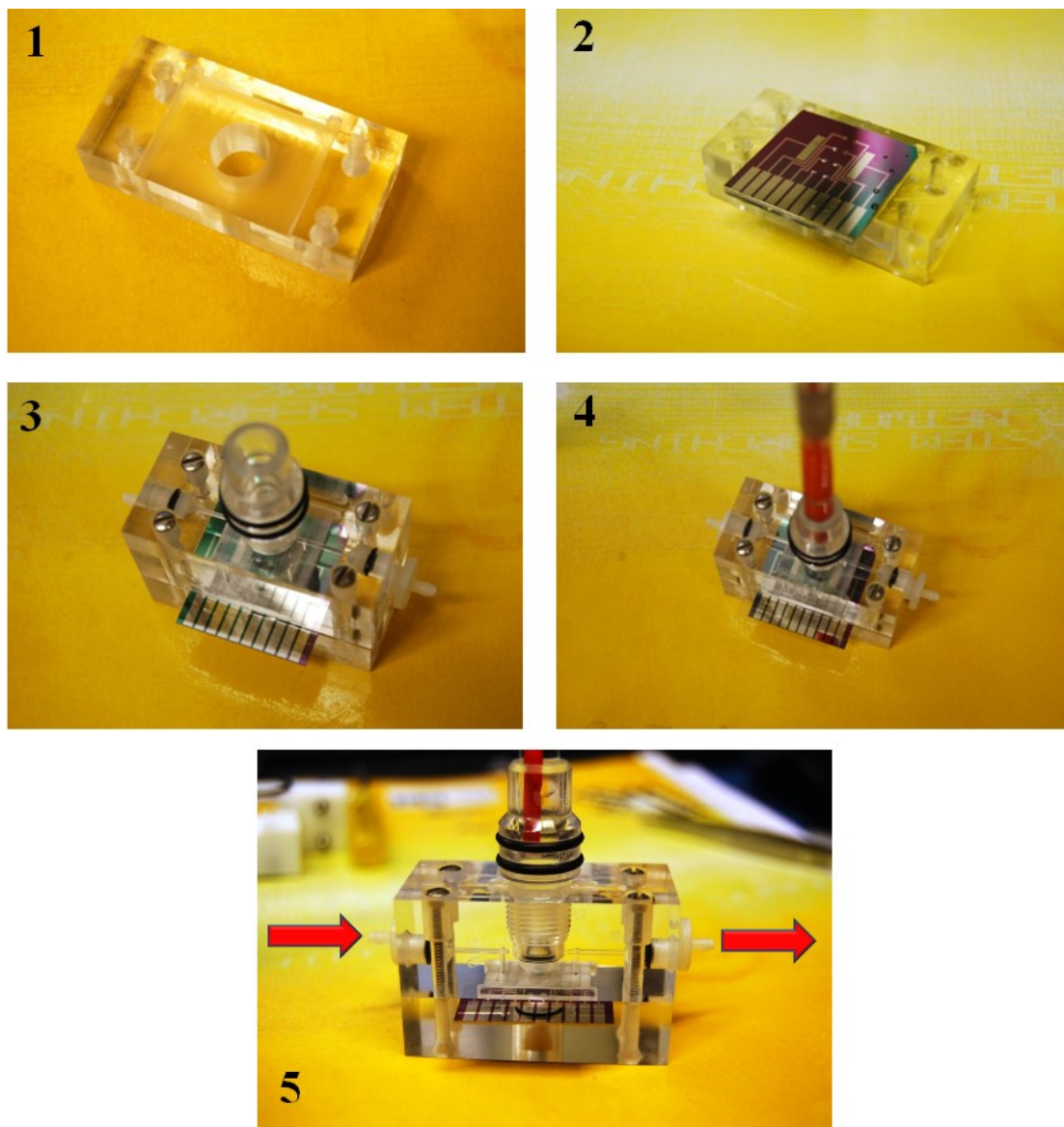
$$Q = z F \gamma_{\text{Hg}} V_{\text{Hg}} / Mr \quad (1.15.)$$

Kako je radijus živine elektrode 500  $\mu\text{m}$ , iz izraza 1.15. moguće je izračunati da naboj koji je potreban za elektrodepoziciju jedne elektrode iznosi 1,02 C, odnosno, za elektrodepoziciju 8 elektroda potreban je naboj od 8,16 C.

Prije izrade mikroelektroda, čip je očišćen krom-sulfatnom kiselinom i acetonom te ispran Mili-Q vodom. Elektrodepozicija je rađena u teflonskoj ćeliji s otvorenim vrhom, korištenjem  $\mu\text{Autolaba}$  tipa III kontroliranog programom GPES 4,9. Kao referentna elektroda korištena je Ag/AgCl elektroda s unutarnjim punjenjem 3 mol  $\text{dm}^{-3}$  KCl i vanjskim punjenjem 0,1 mol  $\text{dm}^{-3}$  perklorne kiseline, dok je kao protuelektroda korištena platinska protuelektroda na samom čipu. Otopina za depoziciju bila je 66,5 mmol  $\text{dm}^{-3}$  otopina živinog nitrata u 0,1 mol  $\text{dm}^{-3}$  perklornoj kiseline. Nakon što je kroz radne elektrode prošlo ukupno 8,16 C naboja, postupak je prekinut i čip s deponiranim elektrodama izvađen je iz teflonske ćelije te višekratno ispran acetonom i Mili-Q vodom. Ovako pripremljen čip s 8 radnih elektroda može se koristiti oko 8 mjeseci, ovisno o uspješnosti elektrodepozicije Hg kod pojedine mikroelektrode.

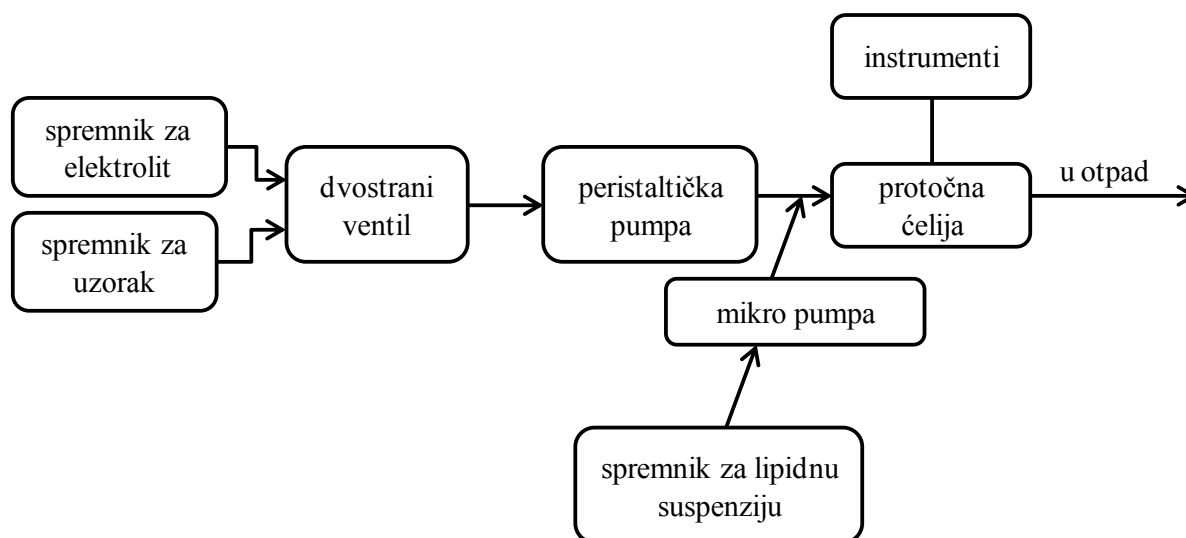
### 3.2.3. Protočni sustav za analizu

Nakon izrade živinih mikroelektroda, čip se stavlja u protočnu ćeliju od pleksiglasa (Slika 16) sastavljenu od podloška na koji se stavlja čip i poklopca koji sadrži otvor koji omogućava umetanje držača za vanjsku referentnu elektrodu Red Rod 201 ( $E = 0,194$  vs. SVE) (Radiometer Analytical SAS, Villeurbanne Cedex, Francuska).



Slika 16. Sastavljanje protočne ćelije. 1 – donji podložak od pleksiglasa; 2 – stavljanje čipa na podložak; 3 – zatvaranje ćelije poklopcem od pleksiglasa; 4 – umetanje vanjske referentne elektrode u ćeliju; 5 – potpuno složena protočna ćelija sa prikazom smjera protoka elektrolita (crvene strelice).

Protok tekućine kroz protočnu ćeliju omogućen je prolazima u poklopcu protočne ćelije, koji su smješteni prije i poslije elektrokemijske ćelije volumena oko  $0,5 \text{ cm}^3$ , a curenje tekućine iz ćelije sprječava gumeni prsten promjera 18 mm koji okružuje radne elektrode, pseudo-referentnu i protuelektrodu. Protočna ćelija dio je posebno dizajniranog djelomično automatiziranog sustava (Slika 17) koji služi za modificiranje elektrode slojem lipida i analizu uzoraka.



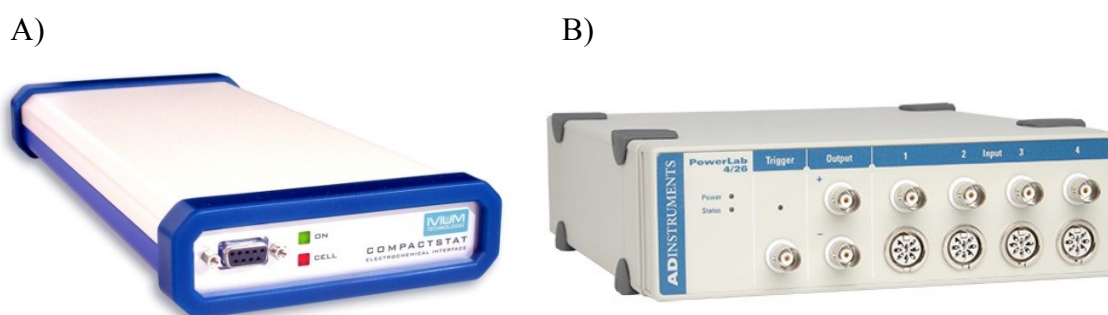
Slika 17. Shematski prikaz djelomično automatiziranog sustava za analizu.

Djelomično automatizirani sustav za analizu sastoji se od spremnika za elektrolit, spremnika za uzorak, spremnika za suspenziju lipida, protočne ćelije, peristaltičke pumpe, zavojnicom kontroliranog razvodnika i mikropumpe. Spremnici za elektrolit i uzorak su cjevčicama od teflona i tygona<sup>®</sup> povezani s protočnom ćelijom preko zavojnicom kontroliranog razvodnika (Bio Chem Fluidics, Boonton, New Jersey) koji omogućava kontrolu nad protokom elektrolita ili uzorka kroz sustav, te peristaltičke pumpe (Ismatec, Wertheim, Njemačka) kojom se kontrolira protok otopina kroz sustav. Spremnik koji sadrži lipidnu suspenziju povezan je s protočnom ćelijom preko mikro pumpe (Bio Chem Fluidics, Boonton, New Jersey).

Prelazak na protočnu elektrokemijsku ćeliju zahtijevao je i promjenu do tada korištenih instrumenata. Tako je daljnji razvoj metode uključivao spajanje potenciostata s instrumentom Powerlab 4/26 (ADInstruments, Sydney, Australija), koji je omogućio kontroliranje brzine promjene potencijala brze cikličke voltametrije i prikupljanje velikih količina podataka, odnosno snimanje velikog broja uzastopnih voltamograma, pomoću programa SCOPE

(ADInstruments, Sydney, Australija). SCOPE program korišten je i za uklanjanje šumova nastalih prilikom mjerenja. Uvođenjem Powerlaba 4/26 omogućeno je praćenje interakcije između monosloja i analita u realnom vremenu, a time i prelazak na sustav protočne elektrokemijske ćelije sa živinom mikroelektrodom.

Za sve analize provedene korištenjem protočne elektrokemijske ćelije, kao i za formiranje lipidnog sloja na površini Hg mikroelektrode, korištena je metoda brze cikličke voltametrije upotrebom Ivium Compactstat potenciostata spojenog s instrumentom Powerlab 4/26 (Slika 18). Lipidni sloj na površini Hg mikroelektrode iz lipidne suspenzije formiran je brzom cikličkom voltametrijom s brzinom promjene potencijala  $> 10 \text{ V s}^{-1}$ , u području potencijala od  $-0,4$  do  $-3 \text{ V vs. Red Rod Ref 201}$ , dok je brzina promjene potencijala korištena u analizama bila  $34,4 \text{ V s}^{-1}$ , uz raspon potencijala od  $-0,38$  do  $-1,16 \text{ V}$ .



Slika 18. IVIUM potenciostat (A) i Powerlab 4/26 (B).

Po završetku analize, radna elektroda čisti se elektrokemijski upotrebom cikličke voltametrije, uz protok elektrolita, u istom rasponu potencijala koji se koristi pri stvaranju sloja, od  $-0,4$  do  $-3 \text{ V vs. Red Rod Ref 201}$ .

### 3.2.4. Stvaranje modelne membrane na površini živine mikroelektrode

Za modificiranje površine živine mikroelektrode korišten je mješani sloj 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfokolina (POPC) i gliceril trioleata (TG), triglicerida oleinske kiseline, u molarnom omjeru 3:1. Za proces adsorpcije koristila se elektrolitna suspenzija liposoma sastavljenih od POPC-a i TG-a. Suspenzija lipida priprema se tako da se odabrani lipidi pomjешaju u kloroformu u molarnom omjeru 3:1, nakon čega kloroform isparava pod strujom dušika. Tako osušenoj mješavini lipida dodaje se  $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$  otopina NaCl, nakon čega se

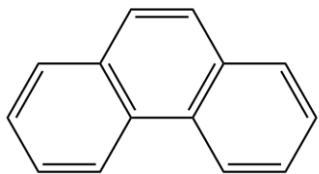
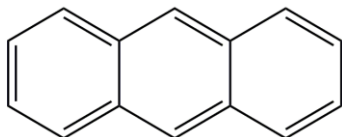
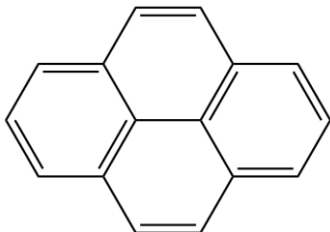
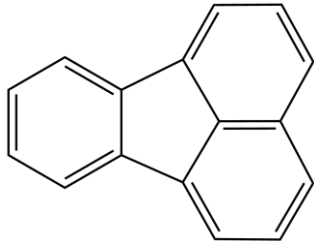
otopina miješa 4 h korištenjem laboratorijske treskalice. Ovim se postupkom dobiva elektrolitna suspenzija liposoma koncentracije  $1,3 \text{ mmol dm}^{-3}$  čija veličina niti debljina slojeva nije strogo određena. Raspodjela veličine liposoma koji se nalaze u dobivenoj suspenziji mjerena je instrumentom Zetasizer Nano ZS opremljenim zelenim laserom (532 nm) primjenom metode dinamičkog raspršenja svjetlosti.

Adsorpcija miješanog lipidnog sloja POPC-TG rađena je brzom cikličkom voltammetrijom nakon što je u elektrolitnu ćeliju uneseno 50  $\mu\text{L}$  suspenzije liposoma, od napona pri kojem je površina elektrode neutralna (-0,4 V vs. Red Rod Ref 201) do napona pri kojima dolazi do desorpcije sloja s elektrode (-3 V vs. Red Rod Ref 201). Pod utjecajem linearno promjenjivog cikličkog napona u tako širokom rasponu, liposomi u blizini površine elektrode se raspadaju uslijed vrlo negativno polarizirane elektrode (-3 V vs. Red Rod Ref 201) te dolazi do adsorpcije lipida na površinu elektrode, što se očituje smanjenjem kapacitetne struje pri manje negativnim vrijednostima potencijala (oko -0,4 V vs. Red Rod Ref 201). U trenutku pojave kapacitetnih vrhova miješanog sloja raspon napona se smanjuje kako bi obuhvatio samo dva spomenuta vrha nakon čega se može pristupiti analizi. Sve analize uzoraka rađene su u triplikatu, a vertikalne linije na slikama predstavljaju standardne devijacije izmjerenih vrijednosti. Analiza uzorka rijeke Save rađena je korištenjem metode standardnog dodatka (Kaštelan-Macan, 2003).

### 3.3. Analizirani PAH-ovi

U radu su analizirana četiri policiklička aromatska ugljikovodika: antracen, fenantren, piren i fluoranten. To su PAH-ovi molekulske mase do  $202,26 \text{ g mol}^{-1}$  i maksimalnim brojem od četiri benzenska prstena (Tablica 1), pri čemu se fluoranten sastoji od tri benzenska prstena spojena jednim peteročlanim prstenom.

**Tablica 1. Svojstva analiziranih PAH-ova**

Naziv spoja	Molekulska struktura	Broj prstenova	Topljivost u vodi (25 °C), $\mu\text{g dm}^{-3}$	Topljivost u moru (25 °C), $\mu\text{g dm}^{-3}$	$\log K_{ow}$ <sup>A</sup>
Fenantren		3	1002 <sup>B</sup>	663 <sup>B</sup>	4,52
Antracen		3	75 <sup>C</sup>	31 <sup>B</sup>	4,5
Piren		4	135 <sup>D</sup>	86 <sup>B</sup>	5,0
Fluoranten		4	265 <sup>C</sup>	podatci nisu pronađeni	5,2

<sup>A</sup>Preporučene vrijednosti iz LOGKOW<sup>®</sup> baze podataka procijenjenih particijskih koeficijenata oktanol-voda.

<sup>B</sup> May i sur., 1987; <sup>C</sup> Klevens, 1950; <sup>D</sup> Mackay i Shiu, 1977.



Navedena četiri spoja odabrana su zbog relativno dobre topljivosti u vodi u usporedbi s PAH-ovima veće molekulske mase i većeg broja prstenova, pri čemu se smatra kako će ove molekule prije biti prisutne u vodama u potpuno otopljenom obliku, što će ih činiti posebno opasnima zbog biodostupnosti.

Odabrani PAH-ovi pripremljeni su za analizu otapanjem u metanolu, nakon čega su alikvoti ove otopine dodavani u uzorke elektrolita tako da je postotak metanola u uzorku uvijek iznosio 0,1 %, što nije utjecalo na analizu.

### **3.3.1. Interakcija PAH-ova i modelne membrane – opis rada analitičkog sustava**

#### **3.3.1.1. Kalibracijske krivulje u $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl**

Nakon što je utvrđeno da ispitani PAH mijenja svojstva miješanog sloja POPC – TG, napravljene su kalibracijske krivulje za svaki PAH kao i za njihovu smjesu. Prvi korak u konstrukciji kalibracijskih krivulja za PAH-ove uključuje propuštanje puferirane otopine  $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl kroz protočnu ćeliju u trajanju od 700 uzastopnih snimanja voltamograma. U prvih 100 voltamograma adsorbiran POPC-TG sloj na površini elektrode postaje stabilan, a sav višak lipida ispire se iz sustava, dok se u slijedećih 600 voltamograma prati interakcija između puferirane otopine  $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl i adsorbiranog sloja kako bi se utvrdilo postoji li u sustavu neko onečišćenje. Nakon toga se na elektrodu adsorbiran novi sloj lipida i nakon propuštanja elektrolita u trajanju od 100 uzastopnih voltamograma, kroz sustav se pušta uzorak s određenom koncentracijom analiziranog PAH-a u rasponu od 0,25 do  $1,5 \mu\text{g dm}^{-3}$ , ponavljajući 600 uzastopnih cikličkih voltamograma. Rezultat ovakve analize obrađuje se tako da se mogući pomak potencijala kapacitetnog vrha zbog utjecaja čistog elektrolita oduzima od pomaka potencijala kapacitetnog vrha uzorka i na taj se način dobiva utjecaj isključivo analiziranog PAH-a na miješani lipidni sloj.

### 3.3.1.2. Kalibracijske krivulje u čistom moru

Kalibracijske krivulje u čistom moru konstruirane su tako da se kroz sustav prvo pušta čisti elektrolit u trajanju od 100 uzastopnih cikličkih voltamograma kako bi se sloj ustabilio i kako bi se sav višak lipida isprao iz sustava, a zatim se kroz sustav propušta čisto more u trajanju od 600 uzastopnih voltamograma. Nakon toga se cijeli sustav čisti, adsorbira se novi sloj lipida i ponovno se za stabilizaciju i ispiranje viška lipida kroz sustav pušta čisti elektrolit u trajanju od 100 uzastopnih voltamograma, da bi se zatim kroz sustav pustio uzorak, u ovom slučaju čisto more, koji sadržava određenu koncentraciju analiziranog PAH-a u rasponu koncentracija od 0,25 do 1,5  $\mu\text{g dm}^{-3}$  u trajanju od 600 uzastopnih voltamograma. Dobiveni rezultati analiziraju se tako da se utjecaj čistog mora na potencijal kapacitetnog vrha oduzima od utjecaja uzorka, odnosno čistog mora koje sadrži određenu koncentraciju analiziranog PAH-a, čime se dobiva utjecaj isključivo analiziranog PAH-a na miješani sloj lipida adsorbiranog na elektrodi.

### 3.4. Mjerenja na granici faza elektrolit/zrak

Mjerenja na granici faza elektrolit/zrak rađena su korištenjem NIMA Langmuir Blodgett Deposition kade (Nima Technology Ltd, Coventry, Ujedinjeno Kraljevstvo) površine  $975 \text{ cm}^2$  i zapremine oko  $800 \text{ cm}^3$ . Langmuir-Blodgett kada nalazi se unutar kutije koja se može zatvoriti kako bi se spriječilo onečišćenje prašinom tijekom mjerenja, a cijeli se instrument nalazi na antivibracijskom stolu s mramornom pločom (Slika 19).



Slika 19. NIMA Langmuir-Blodgett Deposition kada unutar kutije s poklopcem, na antivibracijskom stolu.

Prije svakog mjerenja unutrašnjost teflonske kade i pomične barijere detaljno su očišćeni kloroformom i pentanom te višestruko isprani Mili-Q vodom. Površinski tlak mjeren je Wilhelmijevom pločicom od filter papira dimenzija  $23 \cdot 10 \text{ mm}$ , s točnošću od  $0,1 \text{ mN m}^{-1}$ , koja je određena korištenjem kalibracijskog utega. Mjerenja su rađena tako da se u kadu površine  $868 \text{ cm}^2$  s maksimalno otvorenim barijerama dodaje otopina  $0,55 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ ,  $\text{pH} = 8,1$ , volumena  $800 \text{ cm}^3$  i ostavlja 10 minuta radi stabilizacije. Nakon toga se na površinu elektrolita pomoću injekcije (Hamilton, Microliter Syringe) nanosi  $86 \text{ }\mu\text{L}$  u kloroformu otopljenih POPC-a, TG-a ili POPC-TG u molarnom omjeru 3:1, ovisno o tome koji monosloj se proučava. Koncentracije svih navedenih otopina lipida iznosile su  $1 \text{ mg cm}^{-3}$ . Tako nanosena otopina ostavlja se 10 minuta kako bi sav kloroform ispario, a na površini ostao samo monosloj lipida, nakon čega se pristupa mjerenju  $\pi$ -A izoterma iz kojih se dobivaju

vrijednosti modula površinske kompresije. Dobiveni rezultati obrađeni su korištenjem *moving average* metode za izgladivanje krivulja, sa intervalom od 5 točaka. Lipidni monoslojevi komprimirani su brzinom od  $50 \text{ cm min}^{-1}$ . Daljnja su mjerenja napravljena s miješanim slojem POPC-TG nanesenim na elektrolitnu otopinu koja je sadržavala fenantren u koncentraciji od  $100 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$ . U ovom slučaju mjerena je promjena površinskog tlaka u vremenu te su napravljene histereze monosloja.

### **3.4.1. Mjerenja UV-Vis refleksijskim spektrometrom**

Paralelno s mjerenjima površinskog tlaka rađena su i mjerenja UV-Vis refleksijskim spektrometrom koji je dio Langmuir-Blodgett kade. Za spektroskopska mjerenja korišten je Accurion RefSpec<sup>2</sup> refleksijski spektrometar (Accurion GmbH, Goettingen, Njemačka) čiji se izvor svjetlosti FiberLight DTM 6/50, sastoji od deuterijeve i volframove žarulje. Spektrometar omogućava mjerenja s upadnim snopom svjetlosti pod pravim kutem u odnosu na površinu tekućine, odnosno monosloj. Refleksija svjetlosti s granice faza elektrolit/zrak detektira se u rasponu valnih duljina od 240 do 1000 nm. Dobiveni rezultati obrađeni su korištenjem *moving average* metode za izgladivanje krivulja sa intervalom od 10 točaka.

## **4. REZULTATI**

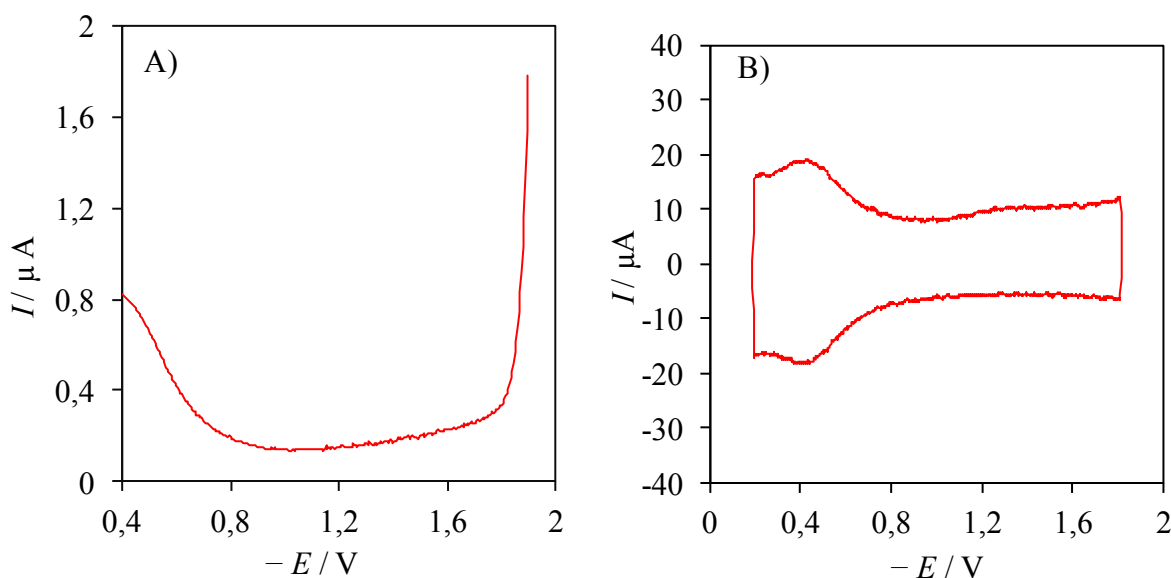
---



## 4. Rezultati

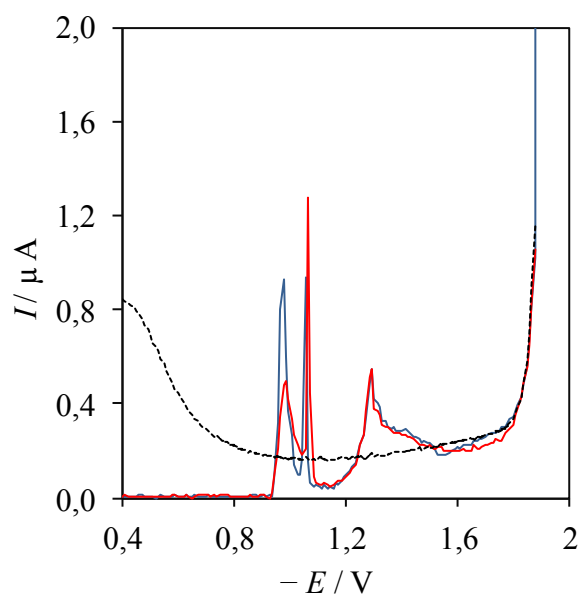
### 4.1. Viseća živina kap elektroda (VŽKE)

Početna istraživanja provedena su AC voltammetrijom i brzom cikličkom voltammetrijom korištenjem viseće živine kapi kao radne elektrode, (Slika 20) mehaničkim nanošenjem monoslojeva na površinu elektrode kako je to opisano u poglavlju 3.2.1.



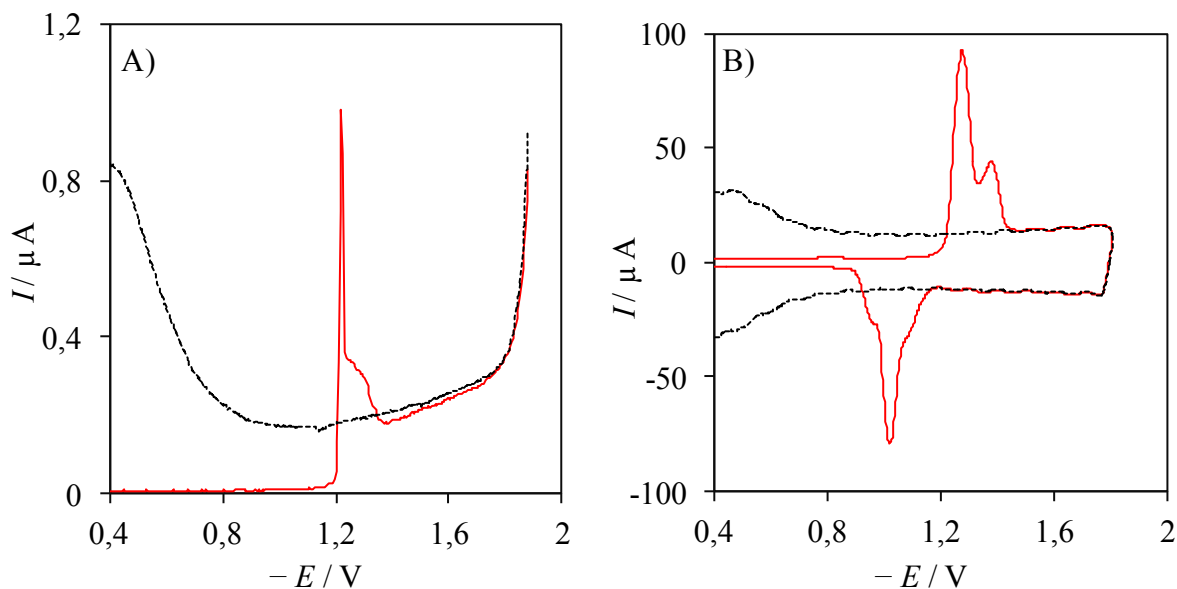
Slika 20. AC Voltamogram (A) i ciklički voltamogram (B) VŽKE u 0,55 mol dm<sup>-3</sup> NaCl, pH = 8,1. Potencijal je izražen u odnosu na Ag/AgCl/3 mol dm<sup>-3</sup> KCl referentnu elektrodu.

Tijekom istraživanja bilo je potrebno odabrati sloj točno određenih svojstava uključujući jasno izražene kapacitetne vrhove čija promjena ukazuje na promjenu u sloju te se koristi kao indikator interakcije, reproducibilnost, stabilnost i osjetljivost na niske koncentracije analita. Istražene su karakteristike slojeva sastavljenih od lipida kao što su 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilkolin (POPC), 1,2-dilinoleoil-sn-glycero-3-fosfatidilkolin (DLPC), 1,3-bis(sn-3'-fosfatidil)-sn-glicerol (kardiolipin), N-oleoil-D-eritro-sfingozin (ceramid), gliceril tristearat, gliceril trioleat (TG). Mnogi od istraživanih lipida nisu dali zadovoljavajuće rezultate, na primjer, monoslojevi DLPC-a pokazali se se nereproducibilnima (Slika 21).



Slika 21. AC voltamogrami dva različita sloja DLPC-a nakon mehaničkog prenošenja na VŽKE (—; —);  $0,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ ,  $\text{pH} = 8,1$  (---). Potencijal je izražen u odnosu na  $\text{Ag/AgCl}/3 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$  referentnu elektrodu.

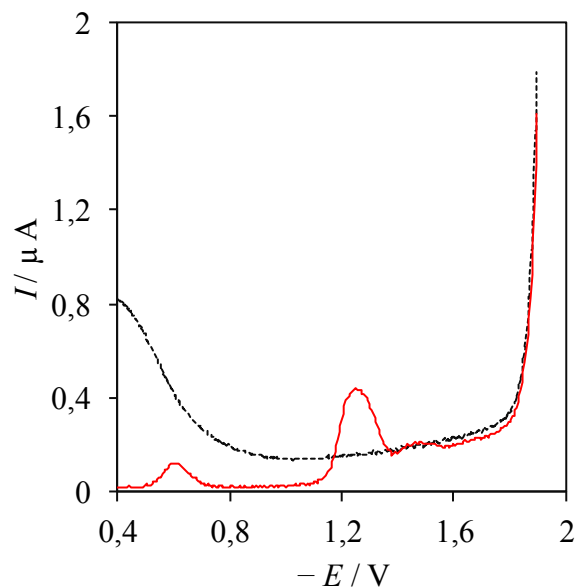
Nadalje, kod monoslojeva kardiolipina i gliceril tristearata primjećeno je da sloj ne pokazuje kapacitetne vrhove koji označavaju fazne prijelaze, već su zabilježeni samo desorpcijski (Slika 22).



Slika 22. AC voltamogram kardiolipina (A) te ciklički voltamogram kardiolipina (B) na VŽKE u  $0,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ ,  $\text{pH} = 8,1$  (---). Potencijal je izražen u odnosu na  $\text{Ag/AgCl}/3 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$  referentnu elektrodu.

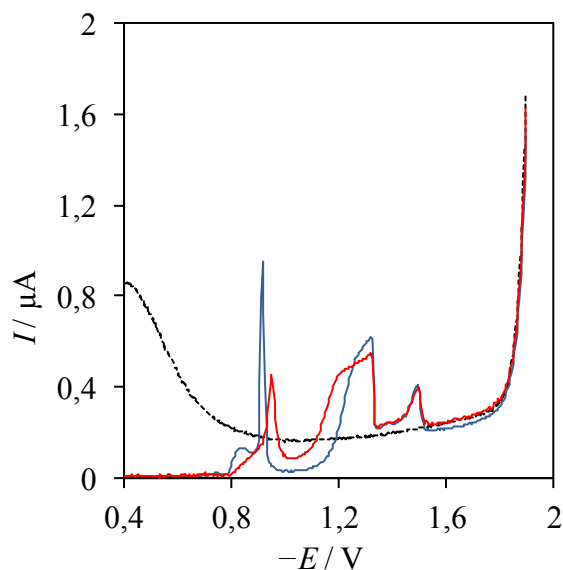


Ti su slojevi bili neupotrebljivi zbog svojih karakteristika (nestabilnost, neosjetljivost na analit, nereproducibilnost), a neki slojevi koji su pokazivali reproducibilnost i stabilnost, npr. ceramid (Slika 23), nisu dali dovoljnu osjetljivost za niske koncentracije analita.



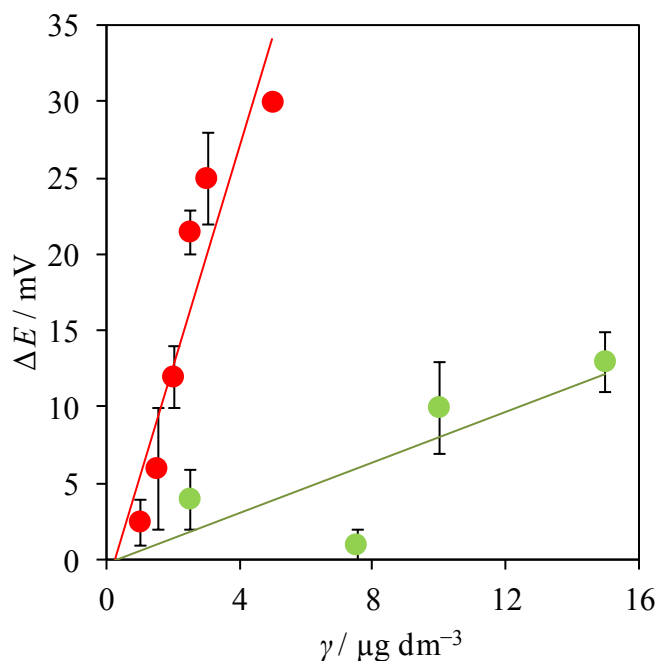
Slika 23. AC voltamogram ceramida na VŽKE u  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl,  $\text{pH} = 8,1$  (····).  
Potencijal je izražen u odnosu na Ag/AgCl/ $3 \text{ mol dm}^{-3}$  KCl referentnu elektrodu.

Kako bi se povećala osjetljivost monosloja na niske koncentracije analita istraživani su i različiti miješani monoslojevi sastavljeni od dvaju ili više različitih lipida. Kod miješanih slojeva često je uočen problem nereproducibilnosti slojeva, kao npr., kod miješanog sloja POPC-a s 30 % linoleinske kiseline (Slika 24).



Slika 24. AC voltamogrami dva različita sloja sastavljena od POPC-a i 30% linoleinske kiseline nakon mehaničkog prenošenja na VŽKE (—; —);  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl,  $\text{pH} = 8,1$  (---). Potencijal je izražen u odnosu na Ag/AgCl/ $3 \text{ mol dm}^{-3}$  KCl referentnu elektrodu.

Miješani sloj ceramida i gliceril tristearata u molarnom omjeru 10:1 na VŽKE pokazao je stabilnost i osjetljivost na fenantren u puferiranom elektrolitu pa se pristupilo izradi kalibracijske krivulje. Analiza interakcije između monosloja i analita provedena je korištenjem AC voltametrije u kombinaciji s cikličkom voltammetrijom. Interakcija između monosloja i analita uzrokovala je pomak potencijala kapacitnog vrha sloja prema negativnijim vrijednostima. Dobiveni rezultati, iako su pokazali postojanje interakcije između miješanog sloja ceramida i gliceril tristearata te molekula analita, nisu dali zadovoljavajuću osjetljivost na niske koncentracije analita. Sloj koji je u preliminarnim istraživanjima zadovoljavao tražene kriterije, od stabilnosti, preko reproducibilnosti i osjetljivosti, bio je miješani sloj POPC-a i TG-a, pri čemu se od različitih isprobavanih omjera dviju komponenti, najboljim pokazao molarni omjer 3:1. Na Slici 25 prikazane su kalibracijske krivulje interakcije fenantrena s miješanim slojem ceramida-gliceril tristearata u molarnom omjeru 10:1 i POPC-TG, u molarnom omjeru 3:1. Miješani sloj POPC-TG u omjeru 3:1 puno je osjetljiviji na fenantren od miješanog sloja ceramida-gliceril tristearata.

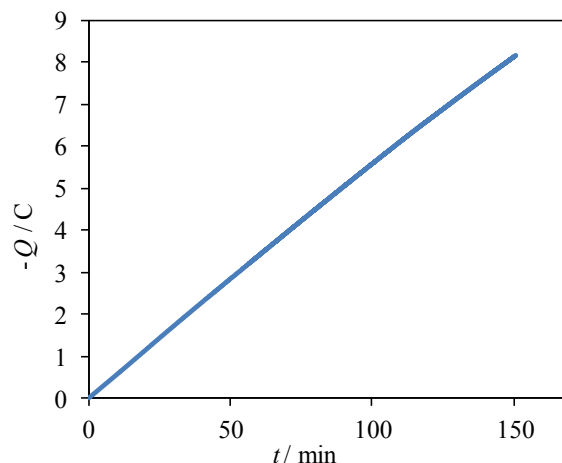


Slika 25. Kalibracijska krivulja na VŽKE za detekciju fenantrena sa ceramid-gliceril tristearatom molarnog omjera 10:1 (●) i POPC-TG molarnog omjera 3:1 (●).

Izračunata granica detekcije za fenantren u slučaju miješanog sloj ceramida-gliceril tristearata iznosi čak  $14,90 \mu\text{g dm}^{-3}$ , dok je izračunata granica detekcije za fenantren u slučaju miješanog sloja POPC-TG manja i iznosi  $1,99 \mu\text{g dm}^{-3}$ .

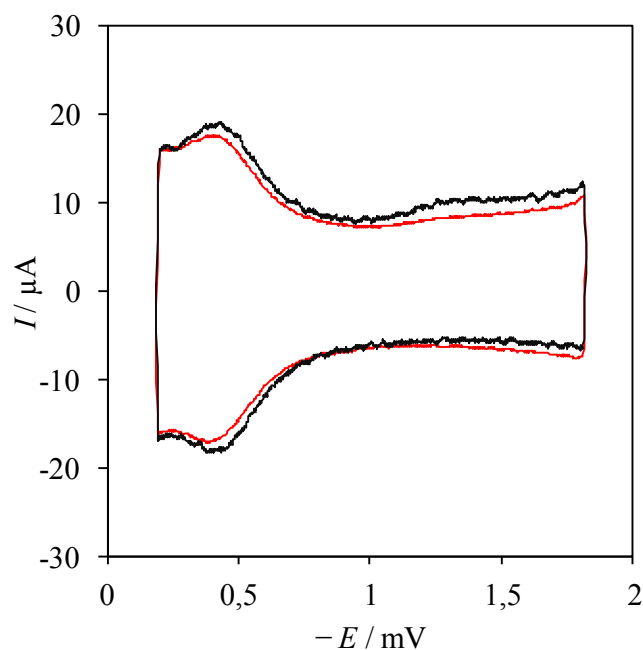
#### 4.2. Prelazak na živinu mikroelektrodu

Usljed velike osjetljivosti sloja POPC-TG (3:1) na fenantren na VŽKE, odlučeno je da se upravo ovaj sloj detaljnije istraži korištenjem živine mikroelektrode. Daljnja istraživanja provedena su korištenjem živine mikroelektrode koje su dobivene kronokulometrijskom elektrodepozicijom Hg na platinske podloge (Slika 26), iz otopine živina nitrata kao što je opisano u poglavlju 3.2.2.



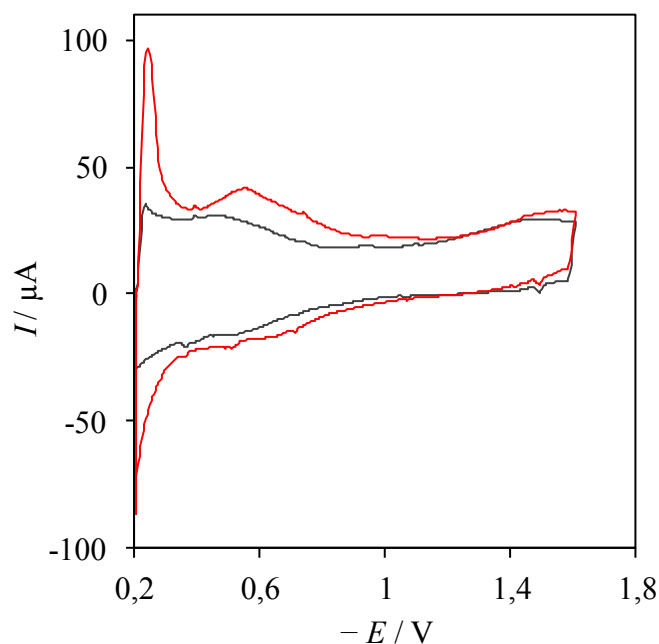
Slika 26. Kronokulometrijska depozicija Hg na platinske diskove na silicijevom čipu.

Kroz sustav je propušteno 8,16 C naboja što prema proračunima odgovara elektrodepoziciji količine Hg dovoljne za stvaranje 8 radnih elektroda promjera 500  $\mu\text{m}$  na čipu od silicija, od kojih se svaka koristi zasebno. Na Slici 27 prikazani su ciklički voltamogrami na VŽKE i mikroelektrodi iz kojih je vidljivo da ove dvije elektrode imaju jednake karakteristike (Coldrick i sur. 2009, 2011).



Slika 27. Ciklički voltamogram na VŽKE (—) (potencijal u odnosu na  $\text{Ag}/\text{AgCl}/3 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$ ) i na živinoj mikroelektrodi (—) (potencijal u odnosu na Red Rod Ref 201);  $0,55 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ ,  $\text{pH} = 8,1$ .

Korištenjem platinske elektrode na čipu kao pseudo-referentne elektrode primijećeno je da dolazi do pomaka potencijala uslijed kontaminacije površine elektrode organskim molekulama (Slika 28), te su daljnje analize provedene upotrebom vanjske Red Rod referentne elektrode u odnosu na koju su izraženi svi potencijali u nastavku, osim ako nije navedeno drugačije.

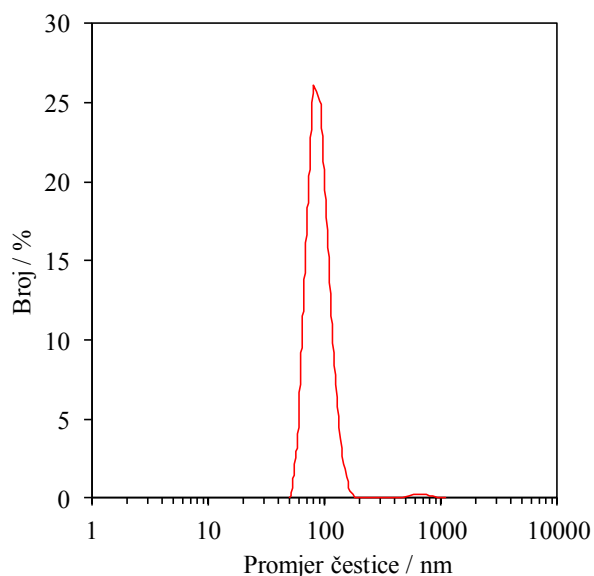


Slika 28. Ciklički voltamogrami na živinoj mikroelektrodi snimljeni na početku korištenja pseudo-referentne platinske elektrode (—), te nakon nekoliko sati korištenja (—). Potencijal je izražen u odnosu na pseudo-referentnu platinsku elektrodu.

Nakon što je početnim istraživanjima na visećoj živinoj kap elektrodi utvrđeno kako miješani sloj POPC-TG u molarnom omjeru 3:1 pokazuje mogućnost korištenja za detekciju policikličkih aromatskih ugljikovodika, započeta su prva istraživanja s ovim slojem u protočnoj elektrokemijskoj ćeliji sa živinim mikroelektrodama.

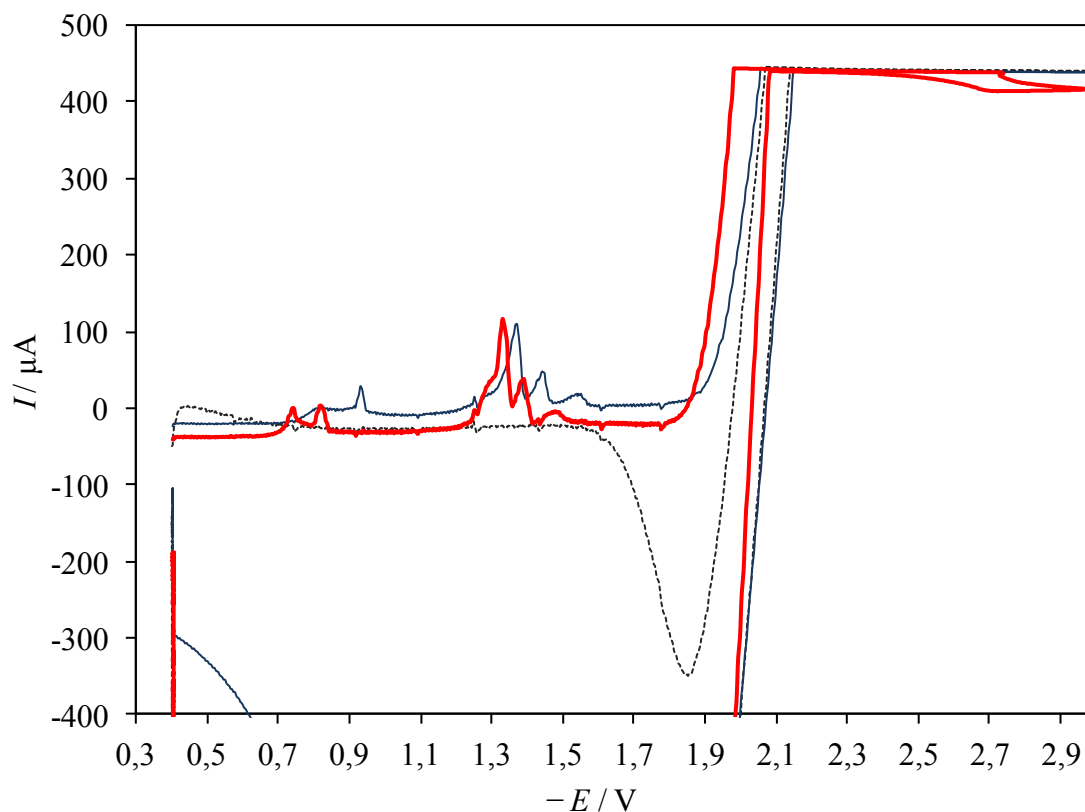
Najznačajnija razlika između upotrebe VŽKE i živine mikroelektrode je postupak modifikacije površine elektrode monoslojem lipida, koji se kod VŽKE radi mehanički, a kod mikroelektrode elektrokemijski. Kod mehaničkog modifikiranja otopljene molekule lipida u lako hlapivom organskom otapalu nanose se na površinu otopine u elektrolitnoj ćeliji. Kod elektrokemijske modifikacije molekule lipida čine miješane liposome pa je tako miješani sloj POPC-TG na površinu elektrode adsorbiran iz vodene suspenzije liposoma. Analiza veličine liposoma u vodenoj suspenziji POPC-a i TG-a provedena je metodom dinamičkog raspršenja

svjetlosti. Izmjerena raspodjela veličine liposoma, izražena je po broju, pokazujući postotni udio čestica određenog promjera u ukupnom broju čestica (Slika 29). Analizom je određeno da je promjer 98 % ukupnog broja liposoma između 89 i 134 nm, dok je promjer preostalih 2 % liposoma između 671 i 1075 nm.



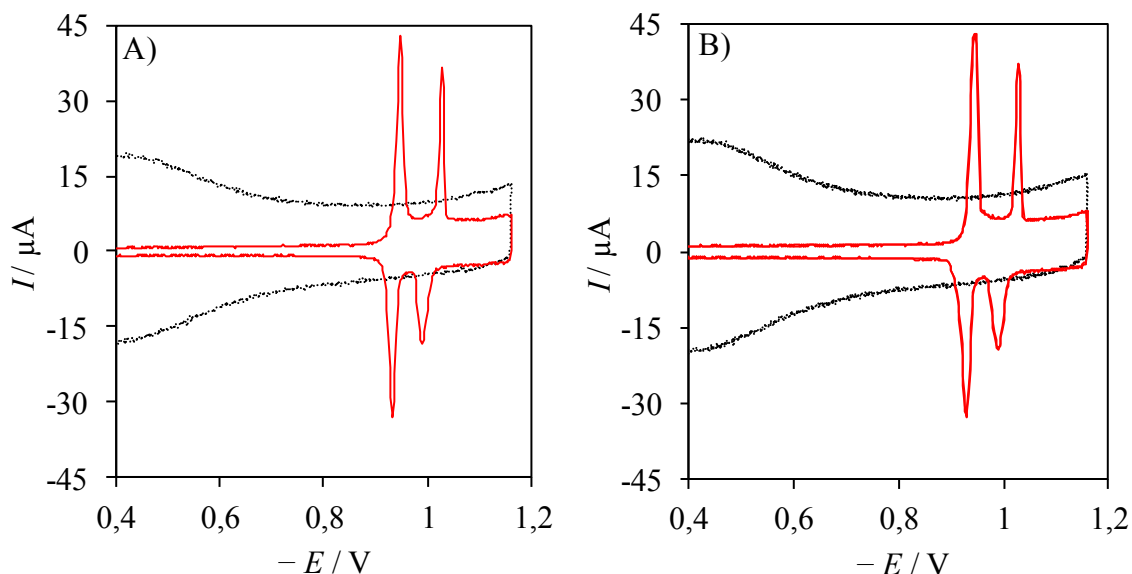
Slika 29. Raspodjela veličine liposoma po broju u vodenoj suspenziji POPC-a i TG-a, određena korištenjem metode dinamičkog raspršenja svjetlosti

Adsorpcija miješanog sloja POPC-TG iz vodene suspenzije rađena je uz linearno mijenjajući ciklički potencijal u rasponu od -0,4 do -3 V (vs. Red Rod Ref 201), prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.4., tijekom čega prvo dolazi do djelomične, a zatim i potpune adsorpcije lipidnog sloja (Slika 30).



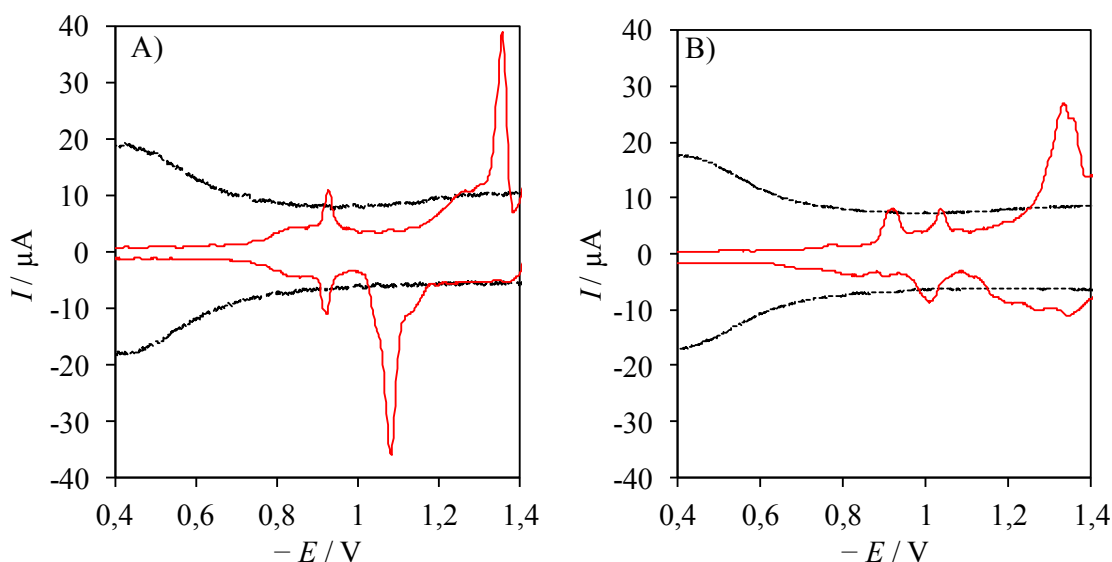
Slika 30. Proces adsorpcije miješanog sloja POPC-TG na živinu mikroelektrodu upotrebom cikličke voltametrije. Istaknuta su tri koraka. Prije same adsorpcije provjerava se čistoća živine mikroelektrode (····), nakon čega se u sustav pušta suspenzija liposoma i dolazi do djelomične adsorpcije lipidnog sloja (—), a u trenutku pojavljivanja dva karakteristična kapacitetna vrha na potencijalima oko  $-0,9$  V (—) adsorpcija se prekida.

Primjećena je razlika između monosloja sastavljenog od jedne vrste molekula, kao što je primjerice monosloj sastavljen od molekula 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfokolina (DOPC) i miješanog sloja sastavljenog od POPC-a i TG-a. Naime, monosloj DOPC-a ne mijenja svoje karakteristike u ovisnosti o načinu modifikacije elektrode, kako je vidljivo iz cikličkih voltamograma DOPC-a adsorbiranih na površinu živine elektrode, mehanički i elektrokemijski (Slika 31).



Slika 31. Ciklički voltamogrami DOPC na VŽKE (potencijal u odnosu na Ag/AgCl/3 mol dm<sup>-3</sup> KCl) (A) i na živinoj mikroelektrodi (potencijal u odnosu na Red Rod Ref 201) (B).

S druge strane, kod miješanog sloja POPC-TG uočena je razlika u karakteristikama slojeva adsorbiranih na dva spomenuta načina. Različitost mehaničkog i elektrokemijskog pristupa modifikacije elektrode miješanim slojem POPC-TG zabilježena je na cikličkim voltamogramima (Slika 32).



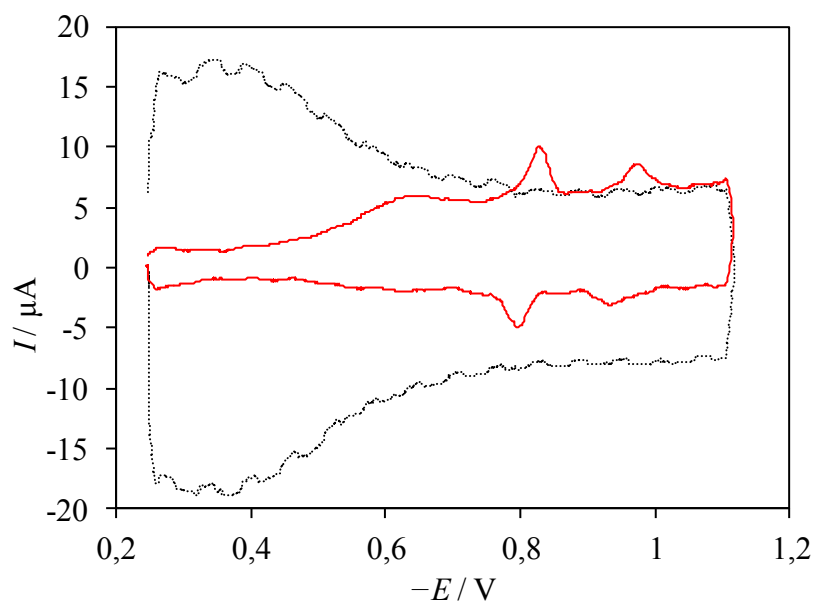
Slika 32. Ciklički voltamogram miješanog monosloja POPC-TG, 3:1 na VŽKE (potencijal u odnosu na Ag/AgCl/3 mol dm<sup>-3</sup> KCl) (A) i na živinoj mikroelektrodi (potencijal u odnosu na Red Rod Ref 201) (B) u 0,5 mol dm<sup>-3</sup> NaCl, pH=8,1 (····).



Naime, kod mehaničkog nanošenja monosloja pojavljuje se jedan kapacitetni vrh dok se kod miješanog sloja POPC-TG adsorbiranog iz suspenzije liposoma pojavljuju dva, jedan na potencijalu od oko  $-0,8$  V i drugi na potencijalu od oko  $-1$  V u odnosu na Red Rod Ref 201.

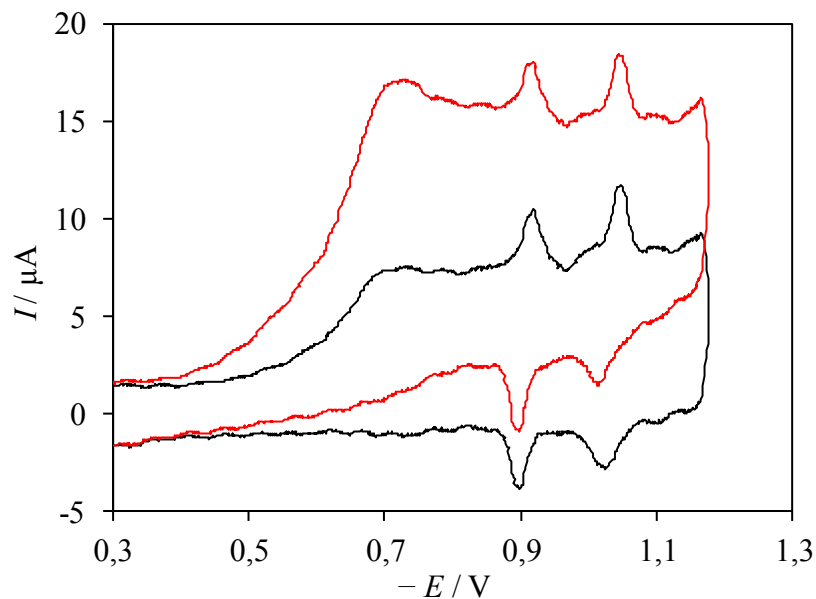
### 4.3. Optimiziranje eksperimentalnih uvjeta

Kako miješani sloj POPC-TG pokazuje dva kapacitetna vrha povezana s faznim prijelazima sloja, raspon potencijala pogodan za analizu je područje potencijala između kapacitetnog minimuma te oba kapacitetna vrha miješanog sloja (Slika 33).



Slika 33. Ciklički voltamogram miješanog sloja POPC-TG (—) u protočnoj ćeliji u  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl, pH=8,1 (⋯).

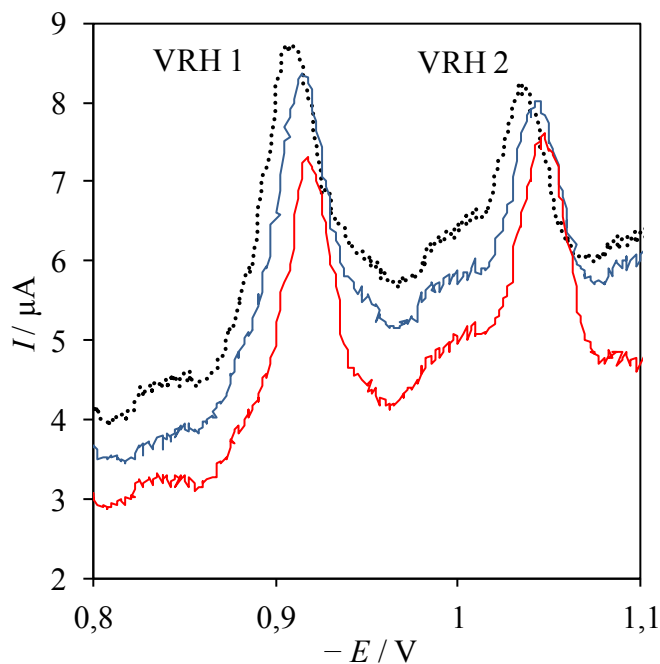
Nadalje, eksperimentalno je potvrđena pretpostavka o utjecaju kisika na kapacitetne vrhove miješanog sloja POPC-TG te su sve analize provedene nakon uklanjanja kisika iz elektrolitnih otopina (Slika 34).



Slika 34. Ciklički voltamogrami miješanog sloja POPC-TG u  $0,55 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ , bez kisika u otopini (—) i s kisikom u otopini (—).

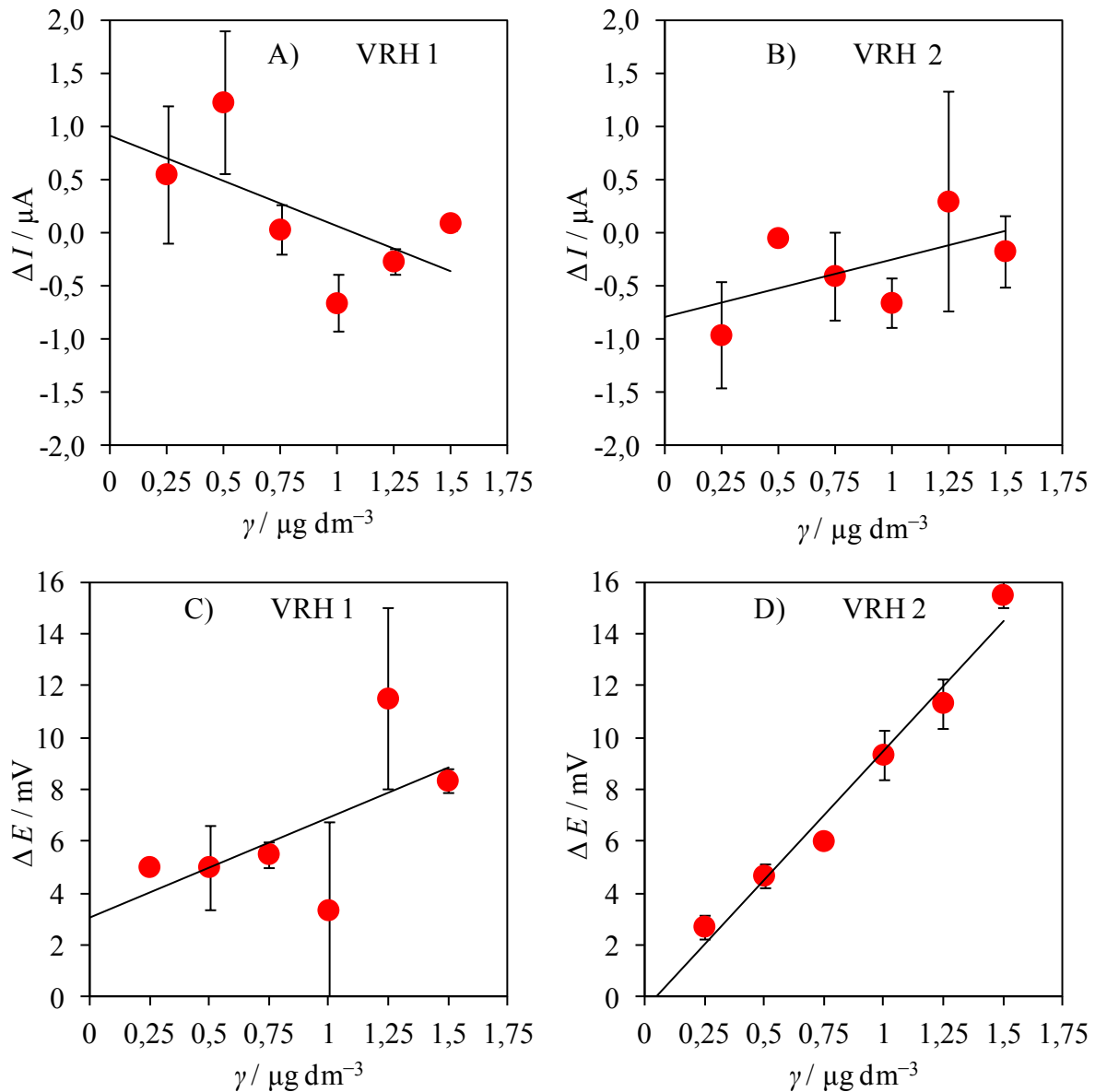
#### 4.4. Interakcija PAH-ova i miješanog lipidnog sloja POPC-TG

Interakcija između miješanog sloja POPC-TG i molekula PAH-ova očituje se u pomacima potencijala te promjeni visine kapacitetnih vrhova miješanog sloja (Slika 35). Kako se za miješani sloj bilježe dva kapacitetna vrha bilo je potrebno odrediti koji je od dva spomenuta parametra (promjena visine i potencijala dvaju vrhova) najpogodniji za praćenje interakcije između molekula analita i miješanog sloja.



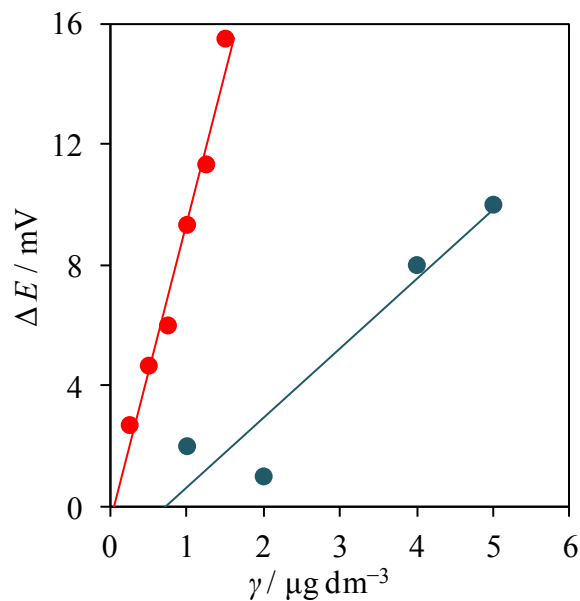
Slika 35. Kapacitetni vrhovi 1 i 2 miješanog sloja POPC-TG prije (····) i nakon propuštanja otopine  $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl, pH=8,1 s fenantrenom koncentracije  $0,75 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$  (—) i  $1,5 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$  (—).

Istraživanjem interakcije između miješanog sloja i rastućih koncentracija fenantrena, te praćenjem dva navedena parametra (Slika 36) zaključeno je kako je upravo pomak potencijala kapacitetnog vrha 2, povezanog s procesima nukleacije i rasta defekata u sloju (mjestimična pojava dvosloja i pora), najosjetljiviji na prisutnost analiziranih molekula PAH-ova. Zbog toga su sva istraživanja usmjerena na mjerenje pomaka potencijala kapacitetnog vrha 2 miješanog sloja u ovisnosti o koncentraciji prisutnog analita. Mjerenjem uzorka pirena koncentracije  $1,5 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$  u  $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl deset puta, određena je relativna standardna devijacija ponovljivosti od 8,06 %.



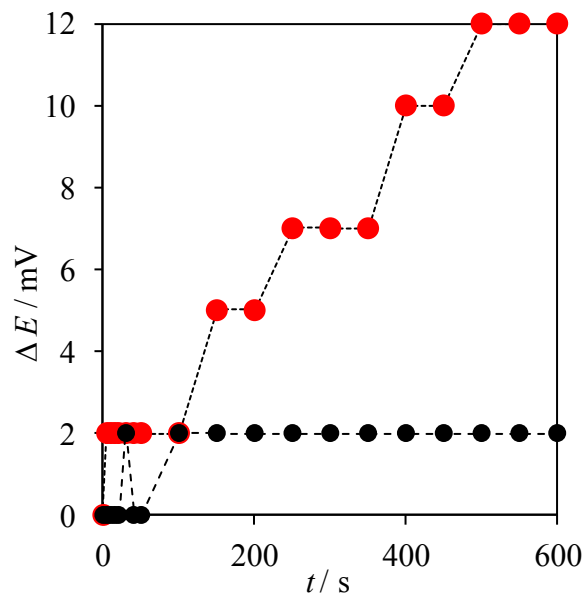
Slika 36. Promjena dva parametra kod dva kapacitetna vrha u odnosu na rastuću koncentraciju fenantrena. Promjena struje kapacitetnog vrha 1 (A) i kapacitetnog vrha 2 (B) te pomak potencijala kapacitetnog vrha 1 (C) i kapacitetnog vrha 2 (D).

Protok otopina kroz sustav za analizu kontrolira se peristaltičkom pumpom, pa je napravljena analiza utjecaja brzine protoka na analizu interakcije. Utvrđeno je kako brži protok povećava osjetljivost sustava na niže koncentracije analita (Slika 37). Optimalna brzina protoka pri kojem je miješani sloj stabilan tijekom vremena trajanja analize, iznosi  $5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ , te su sva daljnja mjerenja rađena pri ovom protoku.



Slika 37. Razlika između kalibracijskih krivulja za fenantren u  $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl,  $\text{pH} = 8,1$ , rađenih pri brzinama protoka od  $3,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  (●) i  $5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  (●).

Nadalje, jedan od važnih parametara analize jest i samo trajanje mjerenja. Kako bi se utvrdilo optimalno vrijeme mjerenja koje bi omogućilo veću osjetljivost sloja na niske koncentracije analita, a da pritom ne utječe na njegovu stabilnost, provedena su mjerenja utjecaja trajanja analize na učinkovitost sustava, pri protoku od  $5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . Na Slici 38 prikazan je utjecaj analita prisutnog u puferiranoj  $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl,  $\text{pH} = 8,1$ , na potencijal drugog kapacitetnog vrha miješanog sloja. Kako je vidljivo na Slici 38, produljenjem vremena analize utjecaj analita postaje sve izraženiji, dok čista puferirana otopina NaCl nema utjecaja na potencijal kapacitetnog vrha.



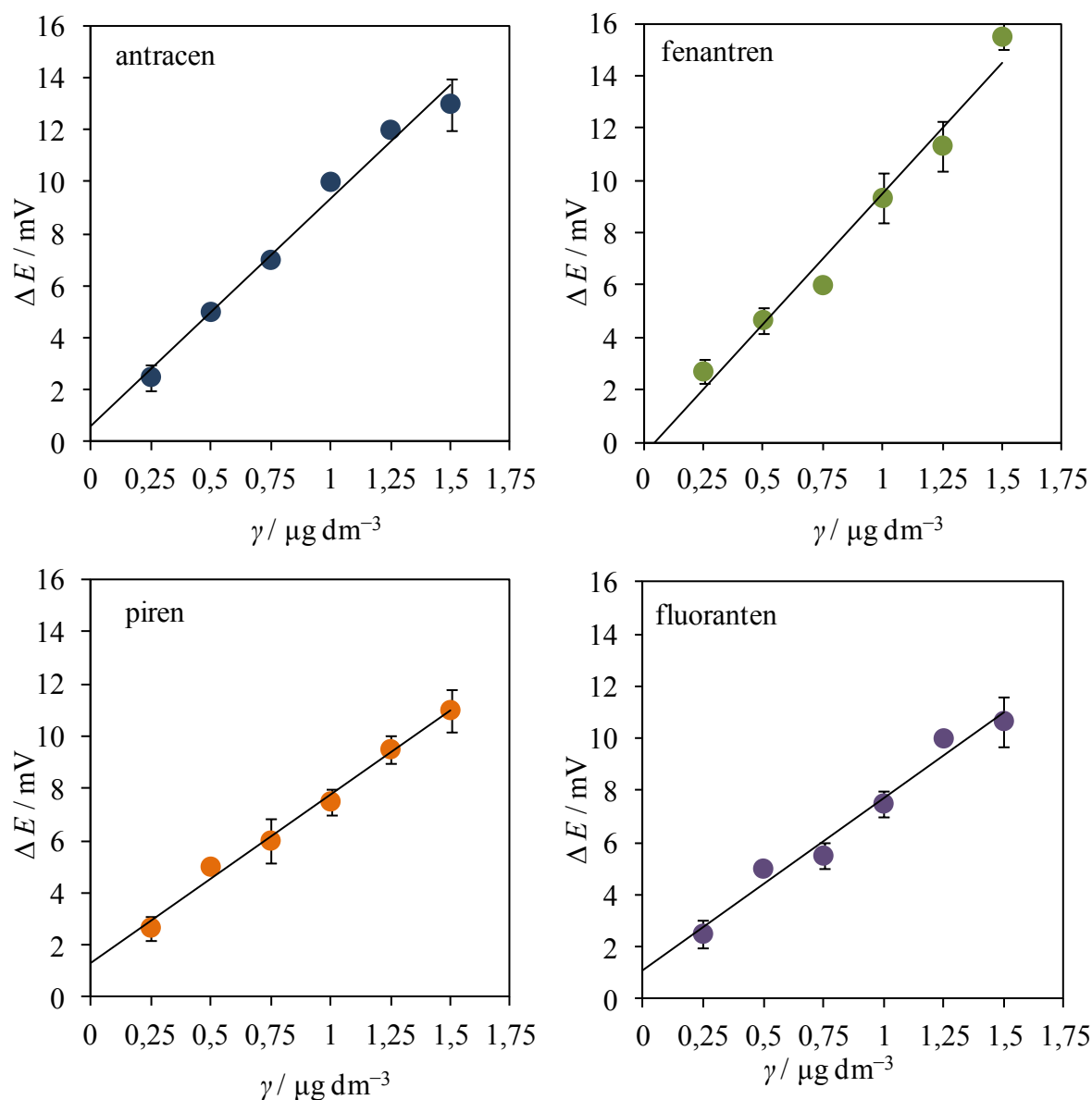
Slika 38. Utjecaj puferirane  $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$  otopine NaCl, (●) te pirena ( $\gamma = 1,5 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$ ) (●) na pomak potencijala kapacitnog vrha 2 miješanog sloja POPC-TG, u ovisnosti o trajanju analize, pri protoku od  $5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ .

Vrijeme analize u kojem je snimljeno 600 uzastopnih cikličkih voltamograma u trajanju oko 10 minuta, pokazalo se najpogodnijim za analizu, jer sloj u tom vremenskom periodu ostaje stabilan.

#### 4.4.1. Kalibracija sustava

##### 4.4.1.1. Kalibracijske krivulje u $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl, pH = 8,1

Nakon što su odabrani uvjeti za eksperimente u kojima je praćena interakcija između miješanog monosloja POPC-TG i molekula analita u modelnom elektrolitu, konstruirane su kalibracijske krivulje za odabrane PAH-ove. Kalibracijske krivulje za četiri policiklička aromatska ugljikovodika, antracen, fenantren, piren te fluoranten (Slika 39), dobivene su postupkom opisanim u poglavlju 3.3.1.1.



Slika 39. Kalibracijske krivulje za antracen, fenantren, piren i fluoranten u  $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl, pH = 8,1.

Iz regresijskih jednadžbi pravaca kalibracijskih krivulja određene su granice detekcije za pojedine PAH-ove (Tablica 2). Granice detekcije određene su korištenjem standardne greške linearne regresijske krivulje.

**Tablica 2. Regresijske jednadžbe i granice detekcije za antracen, fenantren, piren i fluoranten u  $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 8,1**

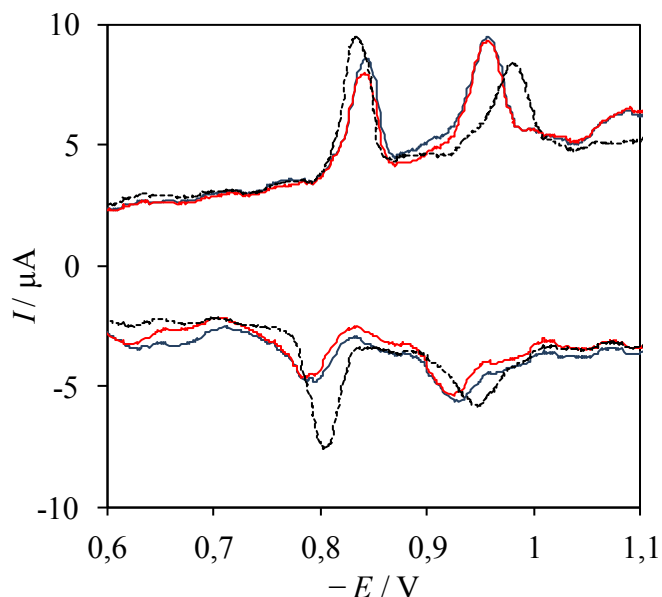
PAH	Regresijska jednadžba	granica detekcije / $\mu\text{g dm}^{-3}$
antracen	$\Delta V = 8,74 \times [\text{antracen}] + 0,6$ ( $R^2 = 0,98$ )	0,19
fenantren	$\Delta V = 9,98 \times [\text{fenantren}] - 0,4$ ( $R^2 = 0,97$ )	0,26
piren	$\Delta V = 6,47 \times [\text{piren}] + 1,2$ ( $R^2 = 0,99$ )	0,14
fluoranten	$\Delta V = 6,61 \times [\text{fluoranten}] + 1,0$ ( $R^2 = 0,97$ )	0,26



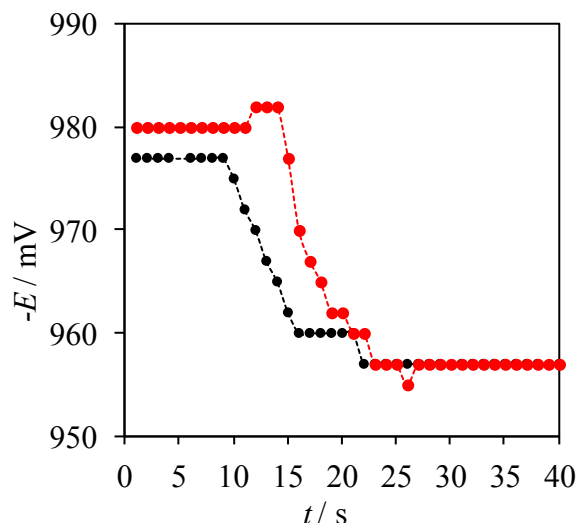
#### 4.4.1.2. Kalibracijske krivulje u čistom moru

##### 4.4.1.2.1. Utjecaj morske vode na sloj

Poznato je da pojedini ioni prisutni u morskoj vodi utječu na kapacitetne vrhove monoslojeva fosfatidilkolina pa je pretpostavljeno da će čista morska voda (morska voda očišćena od organske tvari, postupkom objašnjenim u poglavlju 3.1.) utjecati i na kapacitetne vrhove miješanog sloja POPC-TG, što je potvrđeno i eksperimentom. Kako bi se utvrdili uzroci ovog utjecaja, pripremljen je elektrolit s  $1300 \text{ mg dm}^{-3}$  magnezijevih i  $400 \text{ mg dm}^{-3}$  kalcijevih iona, što odgovara njihovim koncentracijama u morskoj vodi, i utvrđeno je da magnezij i kalcij imaju utjecaj istovjetan onom čistog mora (Slika 40 i 41).

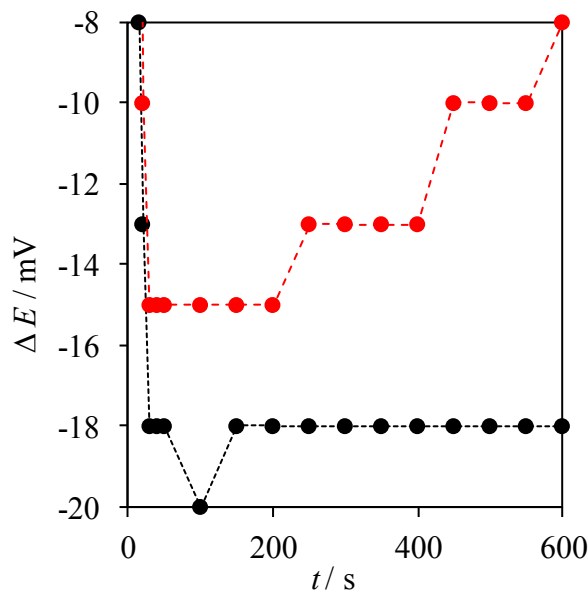


Slika 40. Usporedba utjecaja čistog mora (—) i  $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl koja sadrži ione kalcija ( $400 \text{ mg dm}^{-3}$ ) i magnezija ( $1300 \text{ mg dm}^{-3}$ ) (—) na miješani lipidni sloj (---).



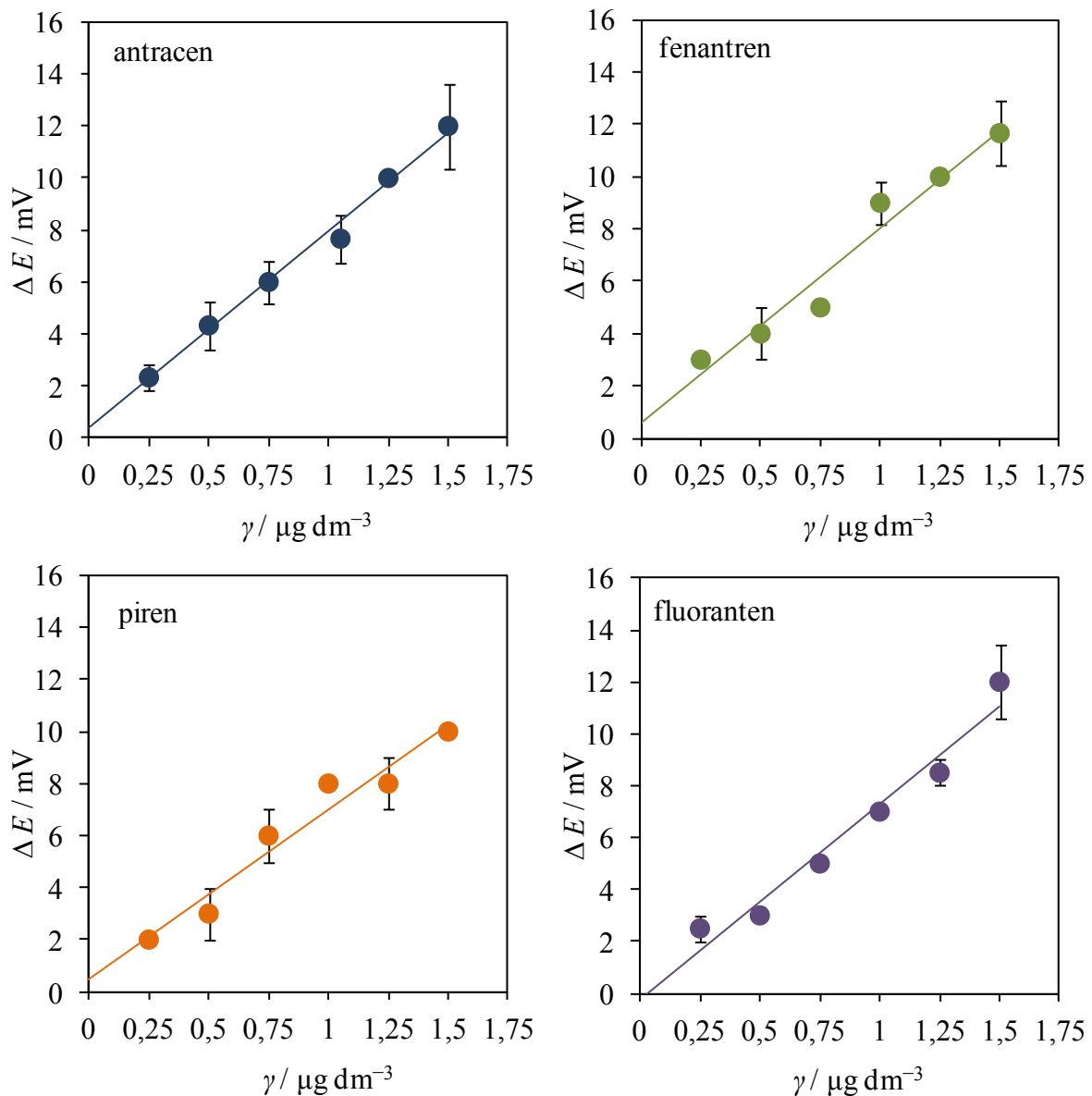
Slika 41. Pomak potencijala kapacitnog vrha 2 pod utjecajem čistog mora (●) te otopine kalcija ( $400 \text{ mg dm}^{-3}$ ) i magnezija ( $1300 \text{ mg dm}^{-3}$ ) u  $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl (●), u ovisnosti o trajanju analize.

Iako je utjecaj iona prisutnih u morskoj vodi na miješani sloj adsorbiran na elektrodi značajan, pokazano je da ipak postoji mjerljiva interakcija između analita i miješanog lipidnog sloja kada se kao elektrolit koristi čisto more. Tako je na Slici 42 prikazan utjecaj čistog mora i čistog mora koje sadrži analit na potencijal kapacitnog vrha.



Slika 42. Utjecaj čistog mora (●) i pirena ( $\gamma = 1,5 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$ ) u čistom moru (●) na pomak potencijala kapacitnog vrha 2 miješanog sloja POPC-TG, u ovisnosti o trajanju analize.

Kalibracijske krivulje za antracen, fenantren, piren i fluoranten u čistom moru dobivene su postupkom opisanim u poglavlju 3.3.1.2. i prikazane su na Slici 43, dok su regresijske jednadžbe i granice detekcije navedene u Tablici 3. Granice detekcije određene su korištenjem standardne greške linearne regresijske krivulje.



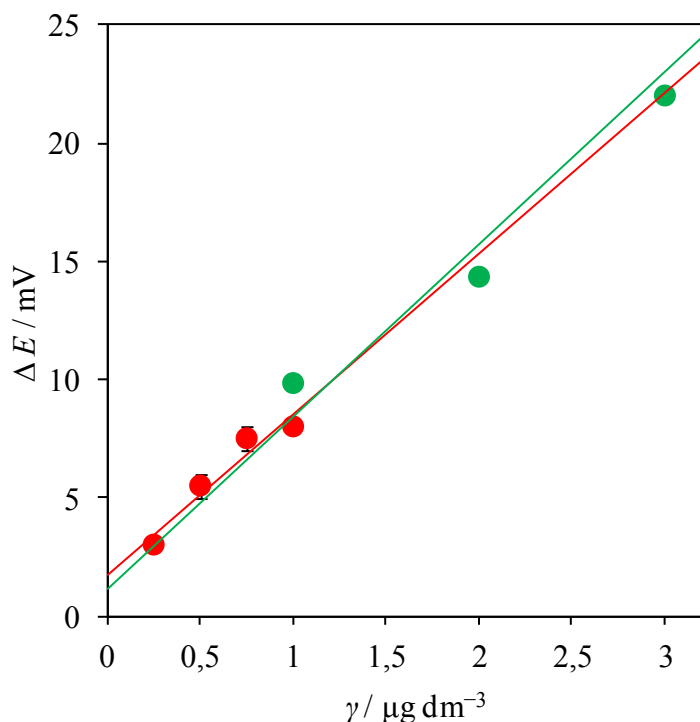
Slika 43. Kalibracijske krivulje za antracen, fenantren, piren i fluoranten u čistom moru.

**Tablica 3. Regresijske jednadžbe i granice detekcije za antracen, fenantren, piren i fluoranten u čistom moru**

PAH	Regresijska jednadžba	granica detekcije / $\mu\text{g dm}^{-3}$
antracen	$\Delta V = 7,58 \times [\text{antracen}] + 0,3$ ( $R^2 = 0,99$ )	0,15
fenantren	$\Delta V = 7,46 \times [\text{fenantren}] + 0,5$ ( $R^2 = 0,95$ )	0,33
piren	$\Delta V = 6,51 \times [\text{piren}] + 0,4$ ( $R^2 = 0,95$ )	0,35
fluoranten	$\Delta V = 7,54 \times [\text{fluoranten}] - 0,2$ ( $R^2 = 0,96$ )	0,32

#### 4.4.2. Utjecaj mješavine PAH-ova na miješani lipidni sloj POPC – TG

Policiklički aromatski ugljikovodici u vodama se najčešće nalaze kao smjesa molekula, stoga je bilo potrebno pokazati na koji način će smjesa analiziranih PAH-ova utjecati na miješani lipidni sloj POPC-TG. U čisto more dodana su četiri analizirana PAH-a, u rasponu koncentracija pojedinačnog analita od  $62,5 \text{ ng dm}^{-3}$  do  $0,25 \mu\text{g dm}^{-3}$ , odnosno ukupne koncentracije PAH-ova u čistom moru u rasponu od  $0,25$  do  $1 \mu\text{g dm}^{-3}$ . Analiza ovako pripremljenih otopina pokazala je da je utjecaj smjese PAH-ova usporediv sa zbrojem utjecaja pojedinih PAH-ova na miješani lipidni sloj, što je prikazano na Slici 44.



Slika 44. Usporedba kalibracijskih krivulja utjecaja smjese PAH-ova (●) i zbroja utjecaja pojedinačnih PAH-ova (●) na miješani lipidni sloj POPC-TG u čistom moru.

Regresijska jednadžba za smjesu PAH-ova u čistom moru je:

$$\Delta V = 6,8 \times [\text{smjesa PAH-ova}] + 1,75 \quad (R^2 = 0.932),$$

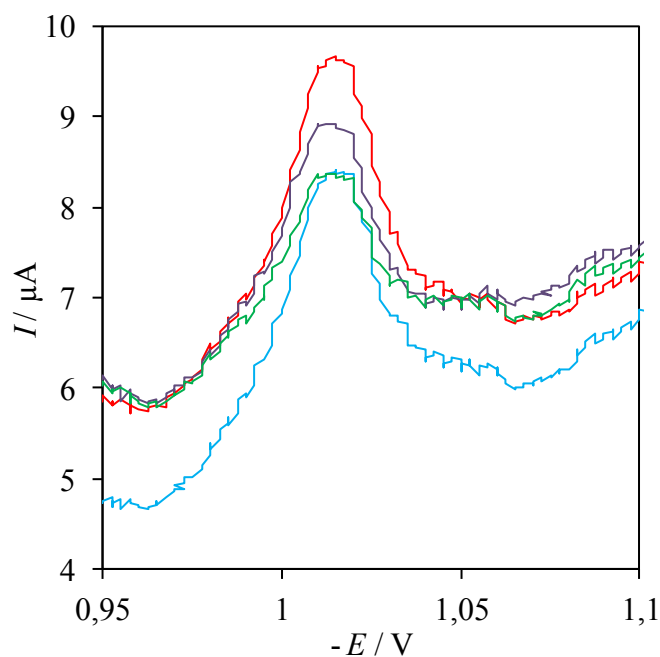
dok granica detekcije za analiziranu smjesu PAH-ova iznosi  $0,32 \mu\text{g dm}^{-3}$ .

#### 4.5. Utjecaj prirodnih organskih molekula na interakciju miješanog sloja i PAH-ova

Prirodne vode u sebi sadrže čitav niz organskih molekula koje bi mogle doći u interakciju s miješanim lipidnim slojem na površini Hg elektrode i tako utjecati na interakciju između sloja POPC-TG i PAH-ova. Zbog toga je bilo potrebno eksperimentalno provjeriti utječu li reprezentativne organske molekule na miješani sloj i na interakciju između analita i sloja. Glavne skupine organske tvari u vodenim sustavima spomenute su u poglavlju 2.1.1. te uključuju polisaharide, proteine, lipide i huminske tvari, pa su odabrani spojevi koji predstavljaju te četiri navedene skupine.

Dekstran D-500, neutralni šećer molekulske mase  $500000 \text{ g mol}^{-1}$ , odabran je kao model polisaharida, ispitivane koncentracije  $3 \text{ mg dm}^{-3}$ . Albumin izoliran iz goveđeg seruma, kao

modelna tvar za proteine, korišten je u koncentraciji od  $1 \text{ mg dm}^{-3}$ . Kao model huminskih tvari korištena je topljiva natrijeva sol huminske tvari fulvičnog tipa, niskog stupnja kondenzacije i molekulskih masa od 1000 i  $5000 \text{ g mol}^{-1}$ , koncentracije od  $1 \text{ mg dm}^{-3}$ . Korišteni lipidi smjese su lipida iz otopljene frakcije uzoraka ekstrahiranih s područja sjevernog Jadrana u siječnju 2014., ispitivane koncentracije  $100 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$ . Slika 45 pokazuje kako analizirane organske molekule nemaju utjecaj na potencijal kapacitetnog vrha 2 miješanog sloja POPC-TG u čistom moru.



Slika 45. Potencijal drugog kapacitetnog vrha miješanog sloja POPC-TG u čistom moru (—), te u čistom moru koji sadrži Na-humat,  $1 \text{ mg dm}^{-3}$  (—), albumin,  $1 \text{ mg dm}^{-3}$  (—) i Dekstran T-500,  $3 \text{ mg dm}^{-3}$  (—).

Tablica 4 daje kvantitativne rezultate utjecaja analiziranih organskih molekula na miješani sloj POPC-TG pokazujući kako albumin iz govedjeg seruma, Na-humat, te smjesa lipida uopće ne utječu na potencijal kapacitetnog vrha, dok dekstran T-500 pokazuje zanemariv utjecaj.

**Tablica 4. Pomak potencijala drugog kapacitnog vrha uslijed interakcije sa albuminom iz goveđeg seruma, dekstranom T-500, Na humatom i otopljenim lipidima**

Naziv spoja	$\gamma / \text{mg dm}^{-3}$	$\Delta E_{\text{vrh 2}} / \text{mV}$
Albumin	1	0
Dekstran T-500	3	1
Na - Humat	1	0
Otopljeni lipidi	0,1	0

Kako bi se utvrdilo utječu li dekstran T-500, albumin, Na-humat te smjesa lipida na interakciju između miješanog sloja i PAH-ova, napravljene su slijedeće analize: pojedini spojevi u već navedenim koncentracijama, dodani su u uzorak čistog mora u kojem se nalazio piren, kao model za PAH-ove, u koncentraciji od  $1,5 \mu\text{g dm}^{-3}$ , pa je tako pripremljen uzorak propuštan kroz protočnu ćeliju. U slučaju dekstrana T-500, albumina i smjese lipida, interakcija između pirena i miješanog sloja na elektrodi bila je jednaka onoj kad ti spojevi nisu bili prisutni u uzorku.

#### 4.5.1. Utjecaj huminskih tvari na analizu PAH-ova

Iako se pokazalo da Na-humat ne utječe na miješani sloj POPC-TG, primjećeno je da utječe na interakciju između pirena i sloja. Naime, kada je u otopinu pirena koncentracije  $1,5 \mu\text{g dm}^{-3}$  u čistoj morskoj vodi dodan Na-humat koncentracije  $1 \text{ mg dm}^{-3}$ , utjecaj pirena bio je manji nego kad u uzorku nije bio prisutan Na-humat. Točnije, u prisustvu Na-humata izmjereni pomak potencijala kapacitnog vrha iznosio je  $2,5 \pm 0,5 \text{ mV}$  što je ekvivalentno koncentraciji pirena od  $0,30 \pm 0,07 \mu\text{g dm}^{-3}$ .

#### 4.5.2. Utjecaj odabranih zagađivala na miješani sloj

Nekoliko odabranih spojeva analizirano je korištenjem novog elektrokemijskog sustava kako bi se utvrdila specifičnost korištenog miješanog sloja za PAH-ove. Odabrani spojevi uključivali su zagađivala 2-nitrofenol, 2,4,4'-triklorobifenil (PCB-28), klorooctenu kiselinu, morski toksin okadaičnu kiselinu, te antibiotike streptomycin, kanamicin i sulfametoksazol.

Fenoli se smatraju važnim vodenim zagađivalima dok je 2,4,4'-triklorobifenil postojano organsko zagađivalo iz skupine polikloriranih bifenila. Okadaična kiselina morski je toksin koji proizvode dinoflagelate, a klorooctena kiselina je spoj čija je proizvodnja vrlo značajna zbog upotrebe u sintezi pesticida, lijekova i bojila. Koncentracije analiziranih spojeva odabrane su tako da su bile veće od koncentracija prisutnih u vodenom okolišu. U Tablici 5 prikazani su rezultati dobiveni analizom navedenih spojeva u  $0,55 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ .

**Tablica 5. Utjecaj odabranih molekula zagađivala na potencijal drugog kapacitetnog vrha miješanog sloja POPC-TG.**

Naziv spoja	$\gamma / \mu\text{g dm}^{-3}$	$\Delta E_{\text{vrh } 2} / \text{mV}$
2,4,4'-triklorobifenil (PCB-28)	5	0
2-nitrofenol	100	0
Okadaična kiselina	1 - 10	0
Klorooctena kiselina	100	0
Streptomycin	5000-100000	0
Kanamycin	10000-100000	0
Sulfametoksazol	2 - 800	0

Analiza odabranih spojeva pokazala je da ni jedan od njih nema utjecaja na kapacitetni vrh 2 miješanog sloja POPC-TG.



## 4.6. Testiranje sustava

### 4.6.1. Uzorak rijeke Save

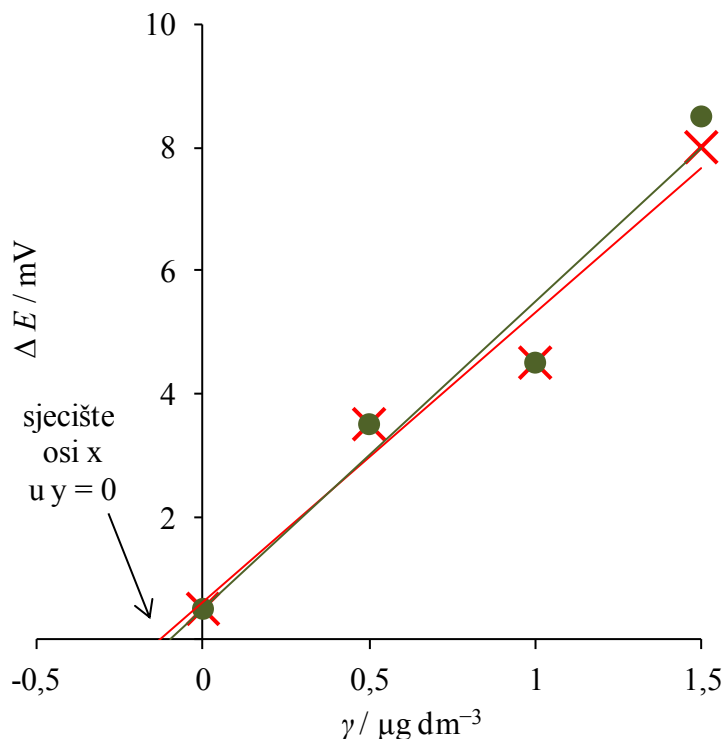
Kako bi se testirala izvedba razvijenog elektrokemijskog senzora pri analizi prirodnog uzorka, korištena je metoda standardnog dodatka za analizu uzorka rijeke Save. Prethodno je koncentracija PAH-ova izmjerena i plinskom kromatografijom spregnutom s masenom spektroskopijom (GC-MS) (Tablica 6). Metoda standardnog dodatka s fenantrenom i pirenom odabrana je jer se pokazalo da utjecaj matrice nije omogućavao direktno određivanje PAH-ova. Izmjerena vrijednost pH uzorka Save iznosila je 7,7. Ukupna koncentracija PAH-ova u uzorku određena GC-MS analizom iznosila je  $0,646 \mu\text{g dm}^{-3}$ , a fenantrena i pirena  $0,166 \mu\text{g dm}^{-3}$  i  $0,020 \mu\text{g dm}^{-3}$ .

**Tablica 6. Koncentracije pojedinih PAH-ova u uzorku rijeke Save analiziranom GC-MS metodom. (elektrokemijski analizirani PAH-ovi u ovom radu su podcrtani)**

PAH	$\log K_{ow}^A$	$\gamma / \mu\text{g dm}^{-3}$
naftalen	3,35	0,00237
naftalen 2-metil	4,0	0,03795
naftalen 1-metil	3,87	0,01965
acenaftilen	3,61	-
acenaften	3,92	-
flouren	4,18	0,02762
<u>fenantren</u>	<u>4,52</u>	<u>0,16628</u>
<u>antracen</u>	<u>4,5</u>	<u>0,02504</u>
<u>piren</u>	<u>5,0</u>	<u>0,02052</u>
<u>fluoranten</u>	<u>5,20</u>	<u>0,08458</u>
benz[a]antracen	5,91	0,00302
krizen	5,86	0,01264
benzo[k]fluoranten	6,11	-
benzo[b]fluoranten	5,78	-
benzo[a]piren	6,35	0,12136
benzo[ghi]perilen	6,9	0,05193
dibenz[a,h]antracen	6,75	0,07312
indeno[1,2,3-cd]piren	6,3	-
PAH <sub>UKUPNI</sub>		0,646

<sup>A</sup>preporučene vrijednosti oktanol – voda particijskog koeficijenta preuzete iz LOGKOW baze podataka (www.databib.org).

Metoda standardnog dodatka rađena je tako da je u uzorak dodavan fenantren odnosno piren u koncentracijskom rasponu od 0,5 do 1,5  $\mu\text{g dm}^{-3}$ , a ukupna koncentracija PAH-ova u uzorku određena je kao točka u kojoj ekstrapolirana regresijska linija siječe os koncentracije (Slika 46). Kad je kod metode standardnog dodatka korišten fenantren, ukupna koncentracija PAH-ova procjenjena je na 0,13  $\mu\text{g dm}^{-3}$ , dok je korištenjem pirena ukupna koncentracija PAH-ova u uzorku procijenjena na 0,11  $\mu\text{g dm}^{-3}$ .



Slika 46. Prikaz određivanja koncentracije PAH-ova u nepoznatom uzorku rijeke Save metodom standardnog dodatka pirena (●) i fenantrena (x).

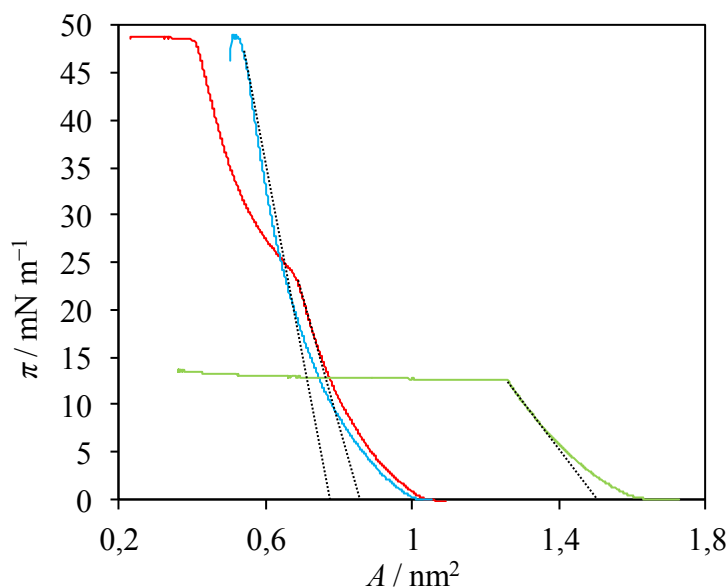
#### 4.6.2. Uzorak mora sjevernog Jadrana

Elektrokemijski je senzor korišten za analizu uzorka mora sjevernog Jadrana prikupljenog na postaji 107 (45° 02,9 N, 13° 19,0 E), oligotrofnoj postaji koja se nalazi 30 kilometara od grada Rovinja, s dubine od 0,5 m. Sam uzorak nije imao utjecaj na miješani sloj POPC-TG. Filtriranom i nefiltriranom uzorku sjevernog Jadrana dodan je piren u koncentraciji od 1,5  $\mu\text{g dm}^{-3}$ , nakon čega su uzorci pojedinačno analizirani. Kod nefiltriranog uzorka pomak potencijala kapacitnog vrha miješanog sloja iznosio je  $5,5 \pm 0,5$  mV, što odgovara koncentraciji pirena od  $0,78 \pm 0,08$   $\mu\text{g dm}^{-3}$ . Kod filtriranog uzorka pomak

potencijala kapacitnog vrha iznosio je 7 mV, što odgovara koncentraciji pirena od  $1,01 \mu\text{g dm}^{-3}$ .

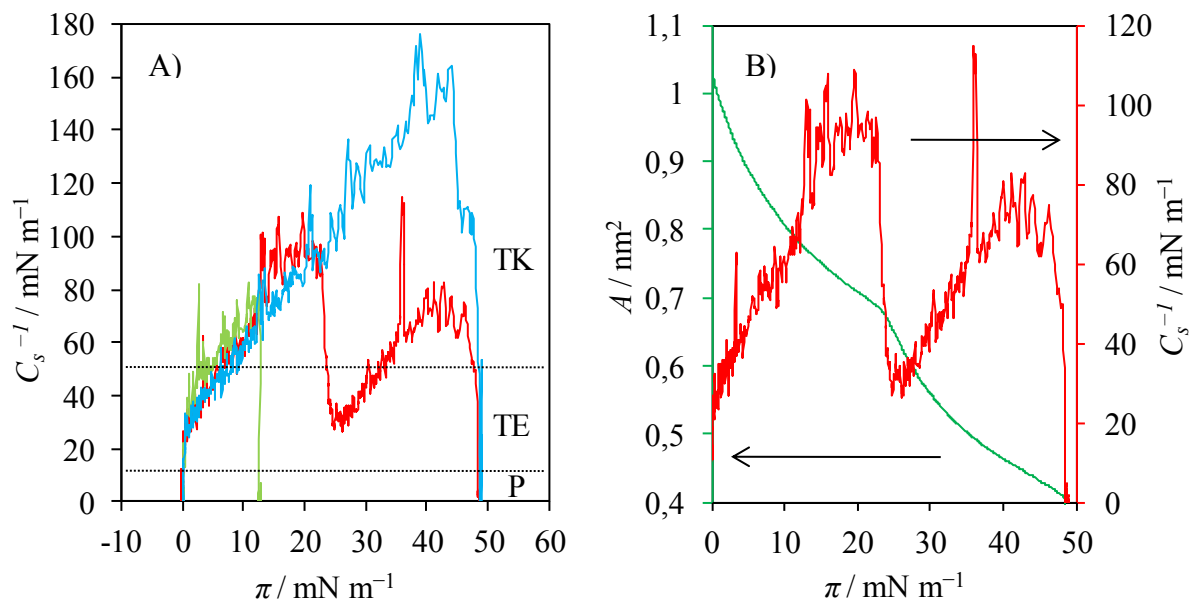
#### 4.7. Langmuir-Blodgett i sprega s refleksijskom spektroskopijom

Dodatna karakterizacija miješanog monosloja POPC-TG 3:1 izvršena je Langmuir-Blodgett tehnikom. Na Slici 46 prikazane su  $\pi$ - $A$  izoterme monoslojeva TG-a, POPC-a i miješanog monosloja molarnog omjera POPC-a i TG-a 3:1, na površini  $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl, pH = 8,1. Monosloj TG-a pri tlaku od oko  $12,7 \text{ mN m}^{-1}$  pokazuje faznu promjenu koja označava kolaps monosloja dok se kod monosloja POPC-a tlak kolapsa nalazi na tlaku od oko  $49 \text{ mN m}^{-1}$ .



Slika 47.  $\pi$ - $A$  izoterma monosloja POPC-a (—), monosloja TG-a (—) i miješanog monosloja POPC-TG (—) na površini  $0,55 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl, pH = 8,1, s ekstrapoliranim linijama (····) pomoću kojih je određena površina po molekuli pojedinog monosloja.

Tlak kolapsa miješnog monosloja POPC-TG također iznosi  $49 \text{ mN m}^{-1}$  no kod ovog se monosloja pri tlaku od  $23,7 \text{ mN m}^{-1}$  primjećuje promjena nagiba izoterme. Ovakve promjene obično su izraženije na krivuljama ovisnosti modula površinske kompresije ( $C_s^{-1}$ ) o površinskom tlaku (Slika 48 A) što pokazuje i usporedni prikaz  $\pi$ - $A$  izoterme i modula površinske kompresije miješanog monosloja na Slici 48 B.



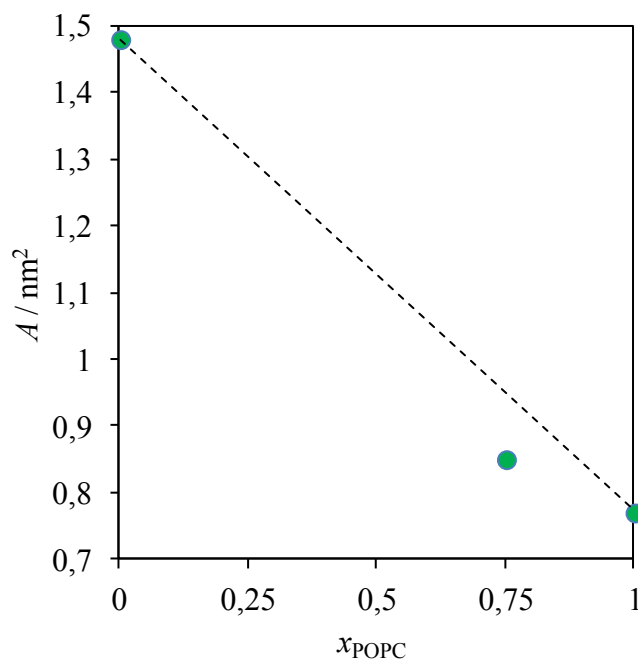
Slika 48. Modul površinske kompresije za TG (—), POPC (—) i miješani sloj POPC-TG (—), s istaknutim stanjima monosloja: P = plinovito stanje; TE = tekuće ekspanzirano stanje; TK = tekuće kondenzirano stanje (A); Usporedni prikaz  $\pi$ - $A$  izoterme (—) i ovisnosti modula površinske kompresije (—) o površinskom tlaku miješanog monosloja POPC-TG (B).

Površina po molekuli za pojedini se sloj određuje ekstrapolacijom površine iz  $\pi$ - $A$  izoterme, kako je opisano u poglavlju 2.4. U tablici 7. prikazane su vrijednosti površina po molekuli određene za pojedine slojeve.

**Tablica 7. Površine po molekuli monoslojeva POPC-a, TG-a i miješanog monosloja POPC-TG**

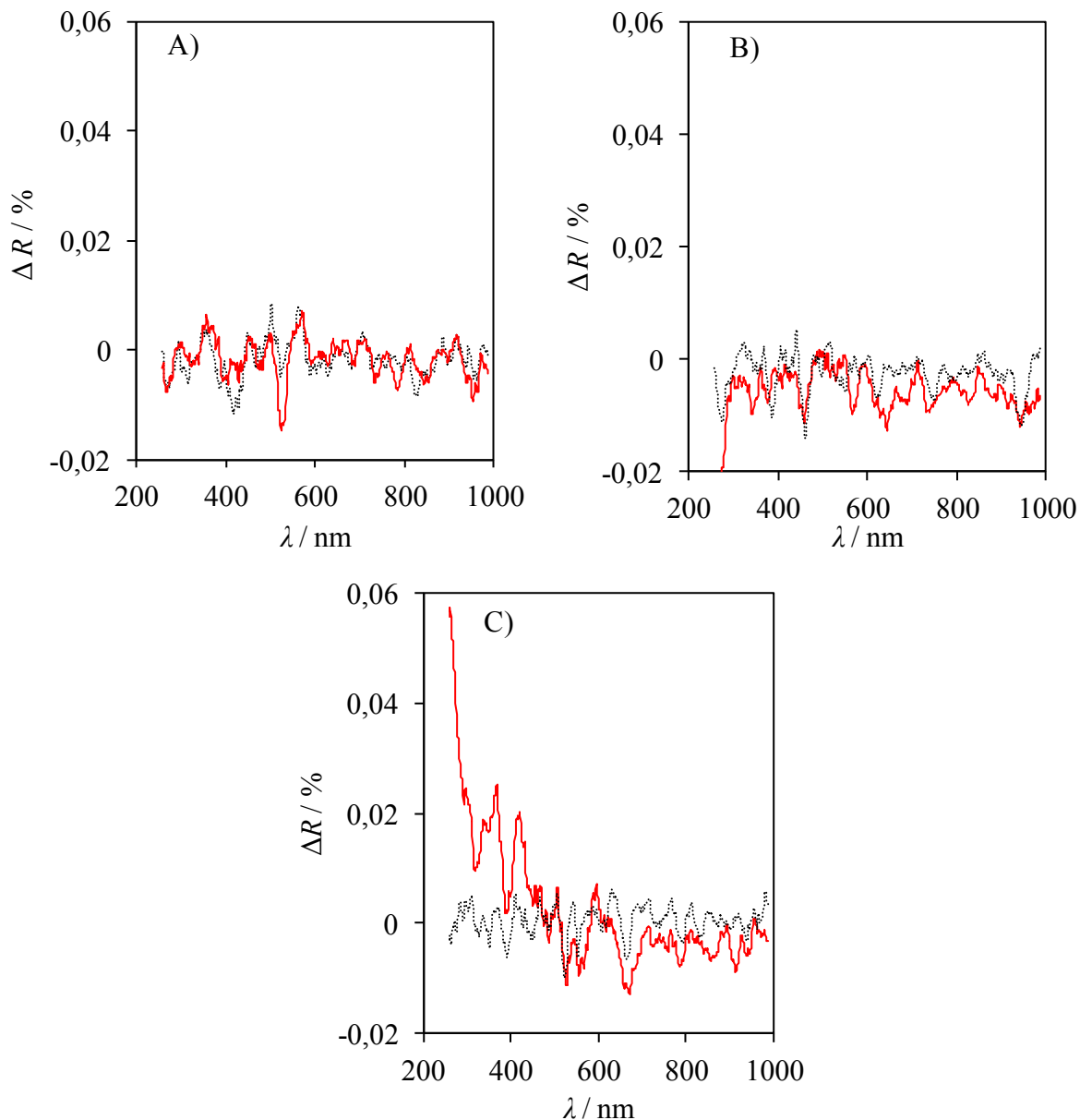
Monosloj	Površina po molekuli ( $A_o / \text{nm}^2$ )	Molarni udio POPC ( $x_{\text{POPC}}$ )
TG	1,48	0
POPC:TG	0,85	0,75
POPC	0,77	1

Ovisnost površina po molekuli o udjelu POPC-a u sloju prikazana je na Slici 49 iz koje je vidljivo da površina po molekuli za miješani sloj odstupa od linije koja pokazuje idealno miješanje komponenata u sloju.



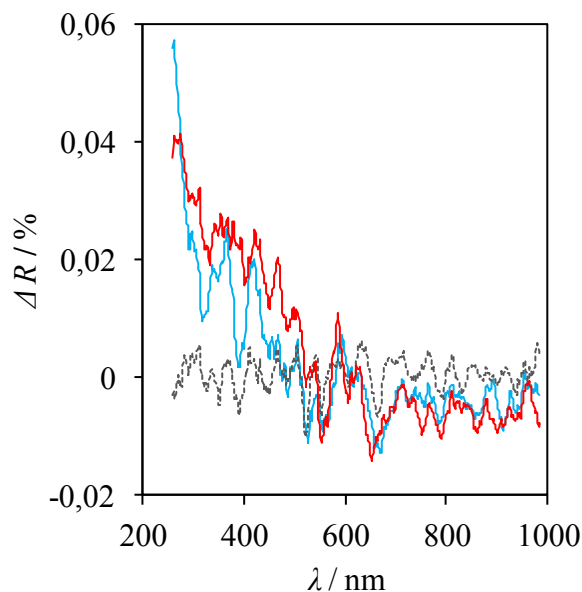
Slika 49. Površina po molekuli slojeva TG, POPC-TG 3:1 i POPC u ovisnosti o molarnom udjelu POPC-a.

Refleksijska spektroskopska mjerenja pokazala su da miješani monosloj POPC-TG nanosen na površinu elektrolita ne pokazuje refleksijski spektar. Isti je rezultat dobiven i mjerenjem refleksijskog spektra elektrolitne otopine koja je sadržavala fenantren, kada na površini nije bio prisutan miješani monosloj. Međutim, primjećeno je kako se refleksijski signal fenantrena pojavljuje čim se na elektrolit koji sadrži fenantren nanese miješani monosloj POPC-TG (Slika 50).



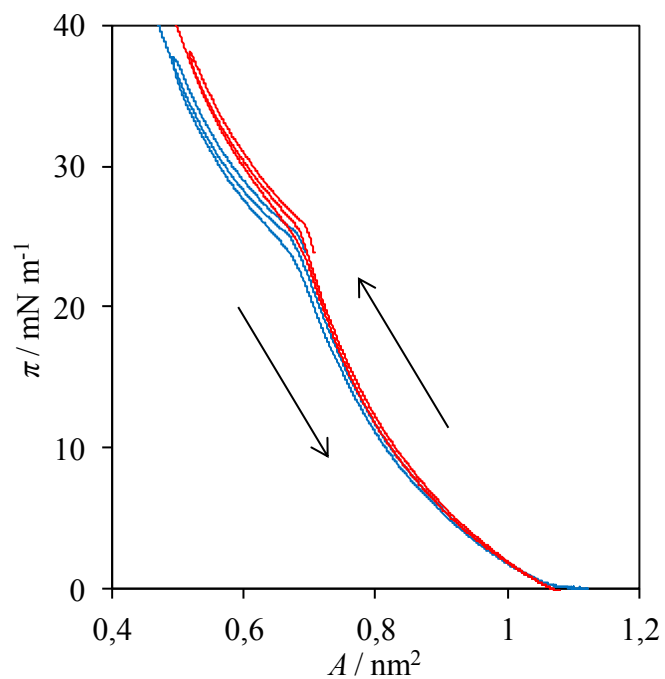
Slika 50. Refleksijski spektri elektrolita s fenantrenom,  $100 \mu\text{g dm}^{-3}$ ; nulti spektar (····) i prvi mjereni spektar (—) (A), čistog elektrolita s miješanim slojem POPC-TG; nulti spektar (····) i prvi mjereni spektar (—) (B) i elektrolita s fenantrenom  $100 \mu\text{g dm}^{-3}$ , na kojem je miješani sloj POPC-TG; nulti spektar (····) i prvi mjereni spektar (—) (C).

Refleksijski spektri snimljeni su i nakon komprimiranja miješanog monosloja do tlaka ovojnice, na površini elektrolita u kojem se nalazio fenantren. Refleksijski spektar pri tlaku ovojnice i spektar potpuno ekspaniranog sloja vrlo su slični, što znači da ne dolazi do jače interakcije između molekula analita i monosloja uslijed kompresije (Slika 51.).



Slika 51. Refleksijski spektar elektrolita s fenantrenom,  $100 \mu\text{g dm}^{-3}$  (····), nakon nanošenja miješanog sloja POPC-TG (—) i nakon kompresije monosloja do tlaka ovojnice (—).

Paralelno s refleksijskim mjerenjima rađena su i mjerenja površinskog tlaka tako da je površina kade održavana na konstantnoj vrijednosti. Površinski tlak miješanog monosloja na elektrolitu u kojem se nalazio fenantren koncentracije  $100 \mu\text{g dm}^{-3}$ , mjenen je pri potpuno raširenom monosloju, odnosno pri potpuno otvorenim barijerama kade, bez značajne promjene tlaka u vremenu od 2000 sekundi. Isto tako, površinski je tlak monosloja mjenen na elektrolitu u kojem se nalazio fenantren koncentracije  $100 \mu\text{g dm}^{-3}$ , ali tako da je monosloj prvo komprimiran do tlaka ovojnice, a potom je površina kade držana na dostignutoj vrijednosti 2000 sekundi tijekom mjerenja površinskog tlaka. Kao i kod potpuno raširenog sloja nije uočena značajna promjena tlaka. Snimljene su i kružne  $\pi$ -A izoterme miješanog monosloja bez i s fenantrenom u elektrolitu i to nakon što je monosloj držan 2000 sekundi pri tlaku ovojnice (Slika 52).



Slika 52. Histereze monosloja POPC-TG nakon 2000 s na tlaku od  $23,8 \text{ mN m}^{-1}$  na površini čistog elektrolita (—) i na površini elektrolita koji sadrži fenantren u koncentraciji  $100 \mu\text{g dm}^{-3}$  (—).



## **5. RASPRAVA**

---



## 5. Rasprava

Mogućnosti kvalitativnog i kvantitativnog određivanja PAH-ova elektrokemijskim metodama ograničene su njihovim strukturnim značajkama. Naime, PAH-ovi nemaju funkcionalne skupine koje bi uzrokovale ionske interakcije vezanja na neki senzorski sloj, niti su zabilježeni oksidacijski ili redukcijski procesi. Međutim, lipofilnost PAH-ova daje mogućnost praćenja ovih molekula s obzirom da interagiraju s lipidnim materijalima (slojem). Ti procesi mogu se vrlo jednostavno pratiti elektrokemijskim tehnikama mjerenjem promjena kapacitetne struje adsorbiranog lipidnog sloja uslijed interakcije s molekulama PAH-ova.

### 5.1. Viseća živina kap elektroda (VŽKE)

Razvoj elektrokemijskog senzora za detekciju policikličkih aromatskih ugljikovodika započeo je istraživanjima na visećoj živinoj kap elektrodi. Tijekom početnih istraživanja ispitivani su različiti slojevi lipida sastavljeni od jedne ili više komponenti, koji su morali zadovoljavati jasno postavljene kriterije uključujući dobro definirane kapacitetne vrhove senzorskog sloja, reproducibilnost, specifičnost za odabrane analite, osjetljivost na niske koncentracije analita i stvaranje stabilne vodene suspenzije liposoma. Živina elektroda s visećom kapi pokazala je veliki potencijal u detekciji membranski aktivnih zagađivala korištenjem modelne membrane (Nelson i sur., 1990), međutim ona s druge strane ima i nedostatke kao što je korištenje znatnih količina žive, krhkost elektrode i neprikladnost za terenski rad. Bez obzira na spomenute nedostatke, VŽKE je u ovom radu pokazala izuzetnu važnost u početnim istraživanjima karakteristika lipidnih monoslojeva i njihovih interakcija s PAH-ovima.

Lipidni slojevi koji su istraživani birani su prema karakteristikama koje su ukazivale na mogućnost formiranja slojeva koji bi bili prikladni za interakciju s PAH-ovima. Glavno svojstvo lipidnih slojeva koje je potrebno za uspješna istraživanja interakcije između analita i sloja lipida, jest promjena karakteristika kapacitetnih vrhova vezanih uz fazne prijelaze sloja. Jedan od prvih ispitivanih fosfolipida bio je DLPC, fosfatidilkolin sastavljen od dva lanca linoleoilne kiseline koja sadrži dvije dvostruke veze, odabran zbog sličnosti s DOPC-om. Monoslojevi DOPC-a su, naime, osim iznimne stabilnosti na VŽKE, pokazali i osjetljivost na prisutnost nekih PAH-ova (Nelson i sur., 1988). Pretpostavilo se da DLPC, s dvije dvostruke

veze više u hidrofobnim lancima od DOPC-a, ima jak afinitet prema hidrofobnim zagađivalima zbog jačih  $\pi$ - $\pi$  interakcija između analita i monosloja. Međutim, sloj DLPC-a pokazao se nestabilnim na površini VŽKE pa je zbog toga odbačen.

Smatralo se da bi povećanje broja hidrofobnih lanaca povećalo osjetljivost sloja na PAH-ove, pa su istraživani slojevi kardiolipina koji sadrže čak 4 hidrofobna lanca. Međutim, pokazalo se da na voltamogramima kardiolipina nisu zabilježeni kapacitetni vrhovi vezani uz fazne prijelaze sloja već samo desorpcijski vrhovi. Bilježenje samo desorpcijskog vrha vjerojatno je povezano s reorijentacijom adsorbiranog sloja koju odmah slijedi desorpcijski proces, sprječavajući zapravo reorijentaciju sloja. Naime, polarni segment takvih lipidnih molekula ima manji ili jednak afinitet prema polariziranoj površini živine elektrode kao i molekule vode, pri čemu tijekom pokušaja reorijentacije ovih molekula na površini živine elektrode dolazi do njihove desorpcije (Nelson i Leermakers, 1990). U obzir su, osim fosfolipida, uzeti i drugi lipidi, kao što je npr. ceramid, lipid sa sfingozinskom osnovom, kod kojeg je registiran kapacitetni vrh u AC i CV voltamogramima, i pokazalo se da je sloj stabilan i osjetljiv na PAH-ove. Međutim, daljnjim je mjerenjima ustanovljeno je da je izmjerena osjetljivost nezadovoljavajuća. Kako bi se sloju ceramida povećala osjetljivost za hidrofobne molekule PAH-ova, formirani su miješani slojevi veće hidrofobnosti. Komponenta koja povećava hidrofobnost miješanog sloja bili su trigliceridi, koji su glavni sastojak masnih naslaga morskih sisavaca, a upravo u tom tkivu dolazi do akumulacije zagađivala i toksina (Krahn i sur., 2004). Paralelno s modifikacijom sloja ceramida gliceril tristearinom, modificirani su i slojevi fosfolipida masnim kiselinama, npr. linoleinska kiselina. Sloj fosfolipida POPC-a, modificiran linoleinskom kiselinom pokazao se nestabilnim, dok je sloj ceramida modificiran trigliceridom pokazao značajniju, ali ne i zadovoljavajuću osjetljivost na molekule PAH-ova (granica detekcije za fenantren iznosila je visokih  $14,9 \mu\text{g dm}^{-3}$ ). Kako se trigliceridi, a posebno triolein, koriste kao adsorbenti u procjeni apsorpcije, biodostupnosti i raspodjele PAH-ova (Ke i sur., 2006; Tao i sur., 2008; Tao i sur., 2012), triolein je korišten za modifikaciju sloja fosfolipida, točnije POPC-a. Najveća osjetljivost dobivena je korištenjem miješanog monosloja POPC i TG u molarnom omjeru 3 prema 1, gdje je granica detekcije za fenantren iznosila  $1,99 \mu\text{g dm}^{-3}$ . Dobivena granica detekcije mogla se smatrati zadovoljavajućom s obzirom na način provedbe analize interakcije analita i monosloja na VŽKE korištenjem kombinacije AC voltametrije i cikličke voltametrije, pri jednom, točno određenom potencijalu kako je opisano u poglavlju 3.2.1. S druge strane, dobivena granica

detekcije nezadovoljavajuća je za analitičku primjenu, zbog čega se pristupilo daljnjem istraživanju ovog miješanog sloja i razvoju sustava.

## 5.2. Prelazak na živinu mikroelektrodu

S obzirom da miješani monosloj POPC-TG (3:1) ima najbolje karakteristike u smislu reproducibilnosti, stabilnosti i osjetljivosti na PAH-ove, istraživan je i na živinoj mikroelektrodi uz korištenje protočne elektrokemijske ćelije. Istovremeno su istraživane i njene osnovne karakteristike, s ciljem razvoja prenosivog senzora za *in-situ* detekciju PAH-ova u prirodnim vodama. Na čipu od silicija, elektrokemijski su napravljene živine mikroelektrode, čija je usporedba s VŽKE pokazala da te dvije elektrode imaju jednaka svojstva (Slika 27). Početna istraživanja stabilnosti protočnog sustava pokazala su da platinska pseudo-referentna elektroda nije prikladna za upotrebu jer njen potencijal nije konstantan tijekom eksperimenata, što su primjetili i Coldrick i sur. (2011), te Mohamadi i sur., (2014). Naime, tijekom rada s organskim materijalima površina platinske pseudo-referentne elektrode može se zagaditi pa dolazi do pomaka potencijala elektrode. Zbog toga su analize vršene uz upotrebu vanjske referentne elektrode RedRod Ref 201 sa dobro definiranim poznatim potencijalom. Prelazak na živinu mikroelektrodu u protočnoj ćeliji zahtijevao je i drugačiji pristup modificiranju elektrode lipidnim slojem, odnosno korištenje vodene suspenzije lipida. Suspenzija smjese lipida POPC-a i TG-a u molarnom omjeru 3:1 napravljena je jednostavnim postupkom dodavanja otopine elektrolita osušenoj smjesi lipida i miješanjem dobivene suspenzije. Tako dobivena suspenzija pokazala se stabilnom, no u literaturi je opisana kao suspenzija liposoma čija veličina i broj lamela nisu jasno definirani (Sessi i Weismann, 1967). Da se utvrdi veličina liposoma, izmjerena je raspodjela veličine čestica uporabom dinamičkog raspršenja svjetlosti (Slika 29). Izmjerena raspodjela čestica je bimodalna: velika većina liposoma (98 %) imala je promjer u rasponu između 89 i 134 nm, dok je preostalih 2 % imalo promjere između 671 i 1075 nm. Potonja skupina predstavlja agregate liposoma. Dobiveni se rezultati slažu s literaturnim podacima o postojanju dviju faza u vodenim suspenzijama liposoma POPC-a i TG-a (Delund i sur., 2013). Iako lipidna suspenzija nije homogena, to se nije odrazilo na reproducibilnost odziva. Elektrokemijsko modificiranje površine živine mikroelektrode miješanim slojem POPC-TG formira sloj koji se razlikuje od monosloja nanesenog mehaničkim modificiranjem VŽKE. Dok miješani sloj POPC-TG na VŽKE na voltamogramima bilježi jedan kapacitetni vrh, kod živine

mikroelektrode zabilježena su dva (Slika 31). S druge strane, slojevi DOPC-a imaju jednake karakteristike i na VŽKE i živinoj mikroelektrodi (Slika 30), neovisno o načinu nanošenja sloja. To svojstvo miješanog sloja POPC-TG može se objasniti specifičnošću liposoma koje ova dva lipida tvore. Naime, u liposomima sastavljenim od molekula POPC-a i TG-a, lipidi su organizirani tako da hidrofobne glave fosfolipida imaju ograničenu slobodu u usporedbi s liposomima sastavljenim samo od molekula POPC-a, te u mješanim liposomima postoji povećana mobilnost alkilnog dijela molekule (Li i sur, 1993). Prema radu Khandelie i sur. (2010), unutar fosfolipidnih dvoslojeva POPC-a molekule TG-a stvaraju pokretne neutralne lipidne agregate. Iz toga se može zaključiti da su liposomi sastavljeni od POPC-a i TG-a heterogeni, posebno u usporedbi s otopinom ovih lipida u lako hlapivom organskom otapalu pa je i za očekivati kako će se slojevi formirani elektrokemijski i mehanički međusobno razlikovati. Upravo iz tog razloga za miješani sloj POPC-a i TG-a na površini živine mikroelektrode radije biramo naziv „sloj“, umjesto „monosloj“, jer pravi izgled ovog miješanog sloja na površini živine mikroelektrode još nije točno definiran.

### 5.3. Optimiziranje eksperimentalnih uvjeta

Kako bi se pronašli uvjeti pri kojima će interakcija između analita i sloja biti najizraženija, mijenjani su različiti parametri kao npr. raspon potencijala koji će se koristiti za snimanje uzastopnih cikličkih voltamograma tijekom analize. Odabir odgovarajućeg raspona potencijala vrlo je važan jer utječe na stabilnost sloja. Naime, ukoliko raspon potencijala obuhvaća i desorpcijske vrhove, može doći do djelomične desorpcije sloja s površine mikroelektrode, a time do promjene karakteristika kapacitetnih vrhova neovisno o njihovoj interakciji s molekulama analita. Zato je radni raspon potencijala odabran tako da obuhvaća samo kapacitetne vrhove faznih prijelaza adsorbiranog sloja, osjetljive na promjene sloja modificiranog adsorpcijom ili apsorpcijom PAH-ova. Kako miješani sloj POPC-TG ima dva takva kapacitetna vrha, bilo je potrebno odrediti koji od dva vrha i dva parametra, a to su promjena visine prvog, odnosno drugog kapacitetnog vrha, te pomak potencijala prvog, odnosno drugog kapacitetnog vrha, pokazuje najveću osjetljivost na prisutnost molekula analita (Slika 35).

Interakcija je najbolje vidljiva iz pomaka potencijala drugog kapacitetnog vrha s obzirom na njegov reproducibilan pomak prema negativnijim vrijednostima uz porast koncentracije analita. Važno je napomenuti da pomak potencijala drugog kapacitetnog vrha ne ovisi o

površini elektrode, što dodatno pojednostavljuje postupak analize. Drugi kapacitetni vrh je odziv stvaranja područja dvosloja na površini živine kapi (Vakurov i sur., 2014), koji ukazuje na formiranje hidrofobnih dijelova sloja okrenutih prema otopini gdje dolazi do interakcije s molekulama PAH-ova. Kao najbolji način provođenja analize određeno je praćenje pomaka potencijala u odnosu na eventualni pomak potencijala uzrokovan propuštanjem baznog elektrolita kroz sustav.

Važni parametri protočnog sustava su trajanje analize te brzina protoka tekućine kroz sustav. 600 uzastopnih cikličkih voltamograma tijekom otprilike 11 minuta, pokazao se kao dobro uravnotežen vremenski period između rastućeg utjecaja molekula analita na miješani sloj i stabilnosti samog miješanog sloja.

Povećanjem brzine protoka analita kroz sustav utjecaj analita na miješani sloj postaje izraženiji. Posebnu pažnju smo posvetili ispitivanju najboljih uvjeta s obzirom na protok budući da kod prevelikih brzina dolazi do mehaničke desorpcije sloja lipida s površine mikroelektrode. Pokazalo se da je protok od  $5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  optimalan za provođenje analiza.

#### 5.4. Interakcije između PAH-ova i miješanog lipidnog sloja

Četiri analizirana PAH-a, antracen, fenantren, piren i fluoranten, relativno su dobro topljivi u vodi u usporedbi s PAH-ovima veće molekulske mase i većeg broja benzenskih prstenova pa imaju i nešto niže vrijednosti oktanol-voda particijskog koeficijenta ( $K_{ow}$ ) od PAH-ova veće molekulske mase. Zbog navedenih se karakteristika očekivalo da će hidrofobniji PAH-ovi veće molekulske mase prije interagirati s miješanim lipidnim slojem. Međutim, pokazalo se da postoji značajan afinitet između miješanog sloja i sva četiri analizirana PAH-a, te pokušaj detektiranja interakcija između PAH-ova većeg oktanol voda-particijskog koeficijenta i mnogo manje topljivosti u vodi, kao što je krizen ( $\log K_{ow} = 5,6$  (www.databib.org); topljivost u vodi =  $1,9 \mu\text{g dm}^{-3}$  (Mackay i Shiu, 1977) i miješanog sloja, nije bio uspješan. Interpretacija dobivenih rezultata u svjetlu analize pravih vodenih uzoraka govori kako će hidrofobniji PAH-ovi zapravo biti uklonjeni iz vodenog stupca uslijed interakcija s organskom tvari, dok će topljiviji PAH-ovi djelomično ostati otopljeni i tako biti dostupniji za analizu.

Početni eksperimenti praćenja interakcije između odabranih molekula PAH-ova i miješanog sloja rađeni su u modelnom elektrolitu za morsku vodu ( $0,55 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ , pH = 8,1). U navedenom elektrolitu napravljene su kalibracijske krivulje za četiri odabrana PAH-a,

antracen, fenantren, piren i fluoranten, s izračunatim granicama detekcije od 0,19, 0,26, 0,14, odnosno 0,26  $\mu\text{g dm}^{-3}$  (Penezić i sur., 2014). Iz regresijskih jednadžbi dobivenih pravaca vidljivo je da su odzivi za sva četiri PAH-a vrlo slični, što znači da niti jedan od četiri analizirana PAH-a ne pokazuje značajniji afinitet prema miješanom sloju i pojedine se molekule ne mogu razlikovati.

Kako je cilj rada razvoj elektrokemijskog sustava koji bi se mogao koristiti za analizu prirodnih vodenih uzoraka iz okoliša, slijedeći korak bila je analiza navedenih PAH-ova u morskoj vodi prethodno očišćenoj od organske tvari. Iako bez organske tvari, uzorci čistog mora su bili bitno kompleksniji zbog prisutnih anorganskih iona. Već je otprije poznato da različiti ioni utječu na monoslojeve fosfolipida (Seimiya i Ohki, 1973; Nelson i Auffret, 1988), a isto je potvrđeno i za miješani sloj POPC-TG. Na Slikama 40 i 41 prikazan je utjecaj čistog mora i otopine elektrolita s dodacima magnezija i kalcija u prirodno prisutnim koncentracijama u morskoj vodi. Provedena analiza pokazala je da je utjecaj morske vode skoro istovjetan onom otopini magnezijevih i kalcijevih iona, tako da je utjecaj morske vode na miješani sloj pripisan većinom upravo tim ionima. Unatoč značajnom utjecaju koji sama čista morska voda ima na miješani sloj POPC-TG, interakcija između molekula PAH-ova dodanih u uzorke čiste morske vode i miješanog sloja uspješno je detektirana. Pokazalo se da je utjecaj čiste morske vode na miješani sloj vidljiv nakon vrlo kratkog perioda. Naime, najveći pomak potencijala drugog kapacitnog vrha prema pozitivnijim vrijednostima doseže se u roku od oko 30 sekundi. Potencijal vrha pomiče se prema pozitivnijim vrijednostima uslijed interakcije kationa sa fosfatnom skupinom hidrofilnog dijela molekula fosfolipida. Tako će uzorak čistog mora u kojem se nalazi PAH na samom početku analize uzrokovati pomak potencijala kapacitnog vrha prema pozitivnijim vrijednostima, nakon čega će se postupno bilježiti pomak potencijala vrha prema negativnijim vrijednostima, zbog interakcije između molekula PAH-ova i miješanog sloja. Zbog toga je ipak omogućeno izrađivanje kalibracijskih krivulja za četiri odabrana PAH-a u čistoj morskoj vodi, te su određene granice detekcije za antracen, fenantren, piren i fluoranten u čistoj morskoj vodi iznosile redom 0,15, 0,33, 0,35, i 0,32  $\mu\text{g dm}^{-3}$  (Penezić i sur., 2014). Kod regresijskih jednadžbi za mjerenja u čistom moru, kao i kod onih u modelnom elektrolitu, vidljivo je da su odzivi za pojedine PAH-ove vrlo slični zbog sličnog afiniteta ova četiri spoja za miješani sloj POPC-TG. Uz to, iako su granice detekcije nešto više u čistom moru nego u modelnom elektrolitu, nije uočena značajna razlika između afiniteta PAH-ova prema miješanom sloju u ta dva elektrolita.



### 5.4.1. Utjecaj smjese PAH-ova na miješani lipidni sloj

Kako su PAH-ovi u prirodnim vodama obično prisutni u obliku smjese mnoštva molekula ove grupe spojeva, detektiranje četiri odabrana PAH-a pružit će informaciju i o mogućem postojanju drugih PAH-ova u uzorku. Tako je u ovom radu analizirana i smjesa četiri odabrana PAH-a u čistom moru, i dobiveni rezultati su usporedivi s utjecajima koji pojedinačne molekule imaju na miješani sloj. Utjecaj četiri PAH-a na miješani sloj se zapravo zbraja. Također je određena i granica detekcije za ovako analiziranu smjesu od  $0,32 \mu\text{g dm}^{-3}$  što je u dobrom slaganju s rezultatima dobivenim za granice detekcije pojedinih analiziranih PAH-ova u čistom moru. Ovaj rezultat ukazuje da sustav nema dobru selektivnost na pojedinačne PAH-ove, ali je vrlo važan jer pokazuje da je moguće odrediti utjecaj smjese PAH-ova na miješani sloj POPC-TG. Mogućnost detektiranja ukupne koncentracije analita razvijenim elektrokemijskim sustavom može nedvosmisleno poslužiti za rano uočavanje povišenih koncentracija ovih molekula u uzorcima prirodnih voda.

### 5.5. Interferencije

Kod svakog istraživanja koje uključuje razvoj senzora za određeni analit, jedna od najvažnijih karakteristika je njegova specifičnost za željeni analit, te veličina interferencije. U radu s prirodnim uzorcima vode velik je broj mogućih interferirajućih molekula. Zbog toga je vrlo važno odrediti specifičnosti na željeni analit, identificirati najznačajnije grupe interferirajućih molekula, te odabrati predstavnike pojedinih grupa i analizirati ih u svrhu procjene utjecaja na uspješnost i kvalitetu analize. U prirodnim vodenim uzorcima razlikujemo dvije grupe potencijalnih interferirajućih molekula. Prva grupa su organske molekule koje se prirodno nalaze u vodenim sustavima, dok se druga grupa odnosi većinom na alohtone molekule koje uzrokuju zagađenje vodenih sustava.

Najvažnije potencijalne interferirajuće molekule iz prve grupe prirodnih organskih molekula su huminske tvari, polisaharidi, proteini i lipidi. Svaka od ovih četiriju vrsta je analizirana i pokazano je da niti jedan od analiziranih spojeva ne utječe na miješani sloj POPC-TG (Tablica 4). Koncentracije pojedinih spojeva odgovaraju njihovim prirodno prisutnim vrijednostima u vodenom okolišu. Kako je poznato da se molekule PAH-ova vežu na otopljenu organsku tvar prisutnu u vodenom okolišu (Wang i Zhang, 2014.), napravljena je i analiza pirena u čistoj morskoj vodi u prisutnosti spomenutih četiriju analiziranih organskih

molekula. Analiza je pokazala da lipidi, polisaharidi i proteini ne utječu na interakciju između miješanog sloja i pirena, odnosno, da ne dolazi do interakcije između spomenutih spojeva i pirena. S druge strane, u prisustvu huminske tvari, točnije Na-humata, piren je pokazao čak  $75 \pm 5$  % manji utjecaj na miješani sloj nego kada Na-humat nije prisutan. Naime, poznato je da se molekule PAH-ova adsorbiraju na organske čestice zbog svoje hidrofobnosti, ali tvore i komplekse s otopljenim huminskim tvarima iz voda (Rav-Acha i Rebhun, 1992; Jung i sur., 2010). Huminske tvari iz različitih izvora razlikuju se veličinom, aromatičnošću, hidrofobnošću i sl. (Chin i sur., 1994). Huminske tvari u rijekama, koje su većinom porjeklom iz viših biljaka, pokazuju veću aromatičnost od huminskih tvari u morskom okolišu, u kojem su prisutne uglavnom kao alifatski spojevi (Saito i Hayano, 1980). Aromatska struktura huminskih tvari pojačava interakciju s hidrofobnim organskim zagađivalima, npr. PAH-ovima (Chin i sur., 1997), što dovodi do smanjenja koncentracije PAH-ova u vodenom stupcu, ali i utječe na njihovu biodostupnost (Landrum i sur., 1984; Akkanen i sur., 2012). Na-humat korišten u ovom radu tresetnog je porijekla pa je njegova aromatičnost veća od one huminskih tvari u morskom i slatkovodnom okolišu (Rice i MacCarthy, 1991). Zbog toga Na-humat bitno utječe na analizu pirena. Specifičnost sastava organske tvari u vodenim uzorcima različitog porijekla uzrokovati će različite utjecaje na analizu PAH-ova.

Drugu grupu potencijalnih interfereirajućih molekula čine zagađivala koja interagiraju s miješanim slojem. U ovom je radu analizirano nekoliko zagađivala: orto-nitrofenol, poliklorirani bifenil 2,4,4'-triklorobifenil, klorooctena kiselina, okadaična kiselina kao predstavni morskih toksina, te tri antibiotika. Niti jedan od analiziranih spojeva nije pokazao utjecaj na miješani sloj POPC-TG, što znači da je u prisutnosti ovih spojeva moguće detektirati PAH-ove u uzorku (Tablica 5). Kako bi se potvrdila specifičnost miješanog monosloja za PAH-ove, svakako je potrebna analiza većeg broja zagađivala.

## **5.6. Testiranje stvarnih uzoraka**

### **5.6.1. Uzorak rijeke Save**

Elektrokemijski je sustav testiran na uzorku rijeke Save, kako bi se elektrokemijski rezultati usporedili s podacima dobivenim GC-MS analizom PAH-ova u istom uzorku. Elektrokemijska je analiza provedena metodom standardnog dodatka, zbog niske koncentracije PAH-ova dostupnih za analizu elektrokemijskim senzorom. Za metodu standardnog dodatka korištena su dva različita PAH-a, piren i fenantren, čija se koncentracija,

prema rezultatima GC-MS analize, u uzorku značajno razlikovala, tj. koncentracija fenantrena bila je 8 puta veća od koncentracije pirena. Unatoč toj značajnoj razlici, elektrokemijska je analiza dala vrlo slične rezultate, odnosno  $0,11 \mu\text{g dm}^{-3}$  uz piren i  $0,13 \mu\text{g dm}^{-3}$  uz fenantren. Takav rezultat zapravo je potvrda prijašnjeg zaključka o aditivnosti utjecaja PAH-ova koje senzor detektira, dok se razlika u dobivenim koncentracijama PAH-ova u uzorku korištenjem fenantrena odnosno pirena, može se objasniti nešto većim afinitetom pirena za organsku tvar zbog veće hidrofobnosti (Plaza i sur., 2009). Razlika između rezultata dobivenih elektrokemijskom analizom i GC-MS analizom, prema kojoj je ukupna koncentracija PAH-ova  $0,646 \mu\text{g dm}^{-3}$ , može se objasniti spomenutim afinitetom molekula PAH-ova za organsku tvar u okolišu. Naime, GC-MS metoda mjeri ukupnu koncentraciju PAH-ova uključujući čestičnu i potpuno otopljenu frakciju, ali i otopljenu frakciju kompleksiranu s otopljenom organskom tvari. Elektrokemijska metoda mjeri samo potpuno otopljenu frakciju PAH-ova prisutnih u uzorku, pa su rezultati manji od rezultata GC-MS analize za 79 % odnosno 83 %, ovisno o tome je li u metodi standardnog dodatka korišten fenantren ili piren. Ako se pak koncentracije dobivene elektrokemijskim senzorom usporede sa zbrojem koncentracija antracena, fenantrena, pirena i fluorantena dobivene GC-MS analizom, ukupne vrijednosti  $0,29 \mu\text{g dm}^{-3}$ , primjećuje se da su vrijednosti dobivene elektrokemijskim senzorom 62 % (za piren) odnosno 55 % (za fenantren) manje od vrijednosti GC-MS analize. Dobiveni su rezultati vrlo važni jer pokazuju da je moguće detektirati PAH-ove koji pokazuju afinitet prema miješanom sloju, bez obzira na velike koncentracije otopljene organske tvari u rijekama. U rijeci Savi (Ogrinc i sur., 2008) nađene su visoke koncentracije otopljene organske tvari, izražene kao koncentracije DOC-a u rasponu od  $0,8 \text{ mg dm}^{-3}$  do čak  $63 \text{ mg dm}^{-3}$ . Zbog toga je pretpostavljeno da će elektrokemijska analiza uzorka dati još niže koncentracije PAH-ova. Međutim, s obzirom na dobivene rezultate zaključili smo da organska tvar prisutna u prirodnim uzorcima ne ometa elektrokemijsku analizu koliko se očekivalo, pa se elektrokemijski sustav može uspješno koristiti za analizu prirodnih uzoraka voda.

### 5.6.2. Uzorak sjevernog Jadrana

Testiranje uzorka sjevernog Jadrana provedeno je kako bi se pokazala uspješnost određivanja analita u prirodnoj morskoj vodi. Analiza nefiltriranog i filtriranog uzorka kojima je dodan piren, potvrdila je utjecaj organske tvari na analizu pirena. Utjecaj pirena na miješani sloj u nefiltriranom uzorku je  $45 \pm 5 \%$  manji u usporedbi sa utjecajem pirena na miješani sloj

u čistom moru, dok je u filtriranom uzorku samo 30 % manji. Do razlike dolazi zbog prisustva ukupne, odnosno otopljene organske tvari koja na sebe veže piren i ostale PAH-ove. U analiziranom uzorku iz sjevernog Jadrana izmjerene koncentracije čestičnog organskog ugljika (POC) iznosile su  $0,119 \text{ mg dm}^{-3}$  ( $\approx 10 \%$  ukupne organske tvari), dok je koncentracija otopljenog organskog ugljika (DOC) iznosila  $1,524 \text{ mg dm}^{-3}$  ( $\approx 90 \%$  ukupne organske tvari). Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je detekcija pirena moguća u prisustvu organske tvari u moru, čak i bez predobrade uzoraka filtriranjem. Za točniju procjenu utjecaja čestične i otopljene organske tvari na analizu odabranih PAH-ova u prirodnim uzorcima potrebno je provesti detaljniju analizu na većem broju uzoraka uz paralelnu karakterizaciju prisutne organske tvari.

### 5.7. Mjerenja na granici faza elektrolit/zrak

Za bolju karakterizaciju miješanog monosloja POPC-TG, analizirani su monoslojevi POPC-a, TG-a, te smjese POPC-a i TG-a, korištenjem monoslojne tehnike na Langmuir-Blodgett kadi. Snimljene  $\pi$ - $A$  izoterme sva tri monosloja omogućile su izrađivanje krivulja ovisnosti modula površinske kompresije ( $C_s^{-1}$ ) o površinskom tlaku (Slika 48 A i B). Analiza je pokazala značajne razlike između monoslojeva sastavljenih od pojedinačnih molekula POPC-a odnosno TG-a i miješanog monosloja. Naime, monoslojevi POPC-a i TG-a pokazuju konstantan rast  $C_s^{-1}$ , te se neposredno prije dosezanja tlaka kolapsa, kada vrijednosti  $C_s^{-1}$  padaju na nulu, oba monosloja nalaze u tekuće kondenziranom stanju. Kako modul površinske kompresije odgovara recipročnoj vrijednosti druge derivacije Gibbsove energije, diskontinuiteti u krivulji ovisnosti modula površinske kompresije o površinskom tlaku predstavljati će fazne prijelaze drugog reda (Limura i Kato, 2012), npr. kolapsa monosloja (Jurak i Conde, 2013). Kod miješanog sloja POPC-TG, uz diskontinuitet uslijed kolapsa monosloja, javlja se još jedan diskontinuitet modula površinske kompresije, i to pri tlaku ovojnice, kad vrijednosti  $C_s^{-1}$  naglo padaju. Budući da se u ovom slučaju radi o dvokomponentnom monosloju i da vrijednost  $C_s^{-1}$  ne pada na nulu nego na oko  $30 \text{ mN m}^{-1}$ , možemo zaključiti da ne dolazi do kolapsa cijelog monosloja nego do istiskivanja komponente s nižim pragom kolapsa (u ovom slučaju molekula TG-a) iz monosloja, tj. uvjetno rečeno kolapsa TG komponente (Jurak i Conde, 2013). Istiskivanjem TG-a sloj postaje rjeđi i prelazi u stanje koje odgovara TE fazi nakon čega daljnjom kompresijom  $C_s^{-1}$  vrijednosti nastavljaju rasti sve do tlaka kolapsa miješanog monosloja koji je jednak tlaku

kolapsa monosloja POPC. Vrijednosti  $C_s^{-1}$  miješanog monosloja POPC-TG manje su od vrijednosti  $C_s^{-1}$  monosloja POPC-a, što pretpostavlja miješani monosloj POPC-TG kao kompresibilniji i neuređeniji od monosloja POPC-a (Chen i sur., 2011). Pojavom faznog prijelaza drugog reda dolazi do izraženijeg utjecaja molekula TG na ponašanje miješanog monosloja. U literaturi je opisano da kod miješanog monosloja sastavljenog od fosfatidilkolina izoliranog iz jaja i TG-a, pri tlaku ovojnice dolazi do istiskivanja molekula TG-a u hidrofobni dio monosloja (Mitsche i sur., 2012) pa se ovakvo ponašanje može pretpostaviti i kod miješanog monosloja POPC-TG. Istiskivanje molekula TG-a iz monosloja pri tlaku ovojnice znači da se nakon tlaka ovojnice sastav miješanog monosloja mijenja. Uzimajući u obzir vrijednosti  $C_s^{-1}$ , neposredno prije tlaka ovojnice monosloj se nalazi u svom najkompaktnijem stanju. Zbog toga se za miješani monosloj POPC-TG površina po molekuli određuje ekstrapolacijom  $\pi$ - $A$  izoterme upravo iz područja neposredno prije tlaka ovojnice. Na temelju površina po molekuli monoslojeva POPC-a, TG-a i miješanog monosloja POPC-TG, određenih iz  $\pi$ - $A$  izoterma, procijenjeno je da je površinski suvišak,  $A^E$ , miješanog monosloja negativan, što znači da se, unatoč tome što su komponente miješanog monosloja samo djelomično mješljive, između molekula POPC-a i TG-a u miješanom monosloju javljaju privlačne interakcije.

Langmuir-Blodgett kada spregnuta s metodom UV-Vis refleksijske spektroskopije omogućila je mjerenja koja pokazuju postoji li interakcija između monosloja i kromofornih molekula PAH-ova. Činjenica da elektrolit koji sadrži fenantren ne pokazuje refleksijski spektar ukazuje na površinsku inaktivnost fenantrena, koji se ne akumulira na granici faza elektrolit/zrak. Međutim, refleksijski spektar fenantrena (Slika 50) snimljen kada je na površinu elektrolita s fenantrenom nanesen miješani sloj POPC-TG, pokazuje da u prisustvu miješanog monosloja fenantren interagira s monoslojem. Slična istraživanja proveli su Kozarac i sur. (1997.), korištenjem monoslojeva fosfolipida s jednom vrstom molekula. U navedenom radu također je ustanovljeno da analizirani PAH (piren) ne pokazuje površinsku aktivnost, no afinitet između PAH-a i čak dva ispitana fosfolipidna monosloja, 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilkolina i 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilkolina, nije primijećen.

Daljnja istraživanja interakcije fenantrena i miješanog sloja POPC-TG pokazala su da s vremenom ne dolazi do daljnje akumulacije fenantrena na monosloj kao da ni komprimiraniji sloj ne pospješuje njegovu akumulaciju na površini.

Paralelnim praćenjem površinskog tlaka pri konstantnim vrijednostima površine kade pokazalo se da interakcija između monosloja i fenantrena ne uključuje ugrađivanje molekula fenantrena u monosloj, s obzirom da promjena površinskog tlaka u vremenu nije primjećena. Kružne  $\pi$ -A izoterme miješanog monosloja pokazale su pojavu blagih histereza (Slika 52), sa i bez prisutnosti fenantrena, što je očekivano za monoslojeve fosfolipida (Notter i sur., 1982), no minimalne razlike između dviju dobivenih histereza potvrdile su da interakcija između fenantrena i miješanog monosloja ne uključuje njegovu ugradnju (Sudeesh i sur., 2012).

Istraživanja površinskog tlaka, te refleksijska istraživanja provedena na Langmuir Blodgett kadi svakako je potrebno proširiti, jer, iako su Langmuirovi monoslojevi donekle uspješni dati uvid u ponašanje miješanog monosloja POPC-TG, teško je povući korelaciju između monosloja na granici faza elektrolit/zrak s dinamičkim ponašanjem miješanog sloja POPC-TG koji se na površini živine elektrode nalazi pod utjecajem linearno mjenjajućeg napona usljed čega prolazi kroz strukturne promjene.

## **6. ZAKLJUČAK**

---





## 6. Zaključak

U ovom je radu razvijan elektrokemijski senzor za detekciju policikličkih aromatskih ugljikovodika u prirodnim vodama, koji kao radni element sadrži živinu mikroelektrodu modificiranu miješanim slojem lipida. U svrhu razvoja senzora te karakteriziranja rada senzora, korištene su elektrokemijske i spektroskopske metode na temelju kojih su doneseni slijedeći zaključci:

- Svojstva živine mikroelektrode i klasične živine elektrode s visećom kapi se ne razlikuju, pa je živina mikroelektroda odličan izbor za radnu elektrodu elektrokemijskog senzora. Stabilna živina mikroelektroda može se pripremiti elektrodepozicijom iz otopine živnog nitrata. Uporaba živine mikroelektrode je ekološki vrlo prihvatljiva jer rješava problem velikih količina žive koje se troše korištenjem živine elektrode sa visećom kapi. Živina se mikroelektroda uspješno čisti elektrokemijskim postupkom.
- Preliminarna istraživanja na visećoj živinoj kap elektrodi pokazala su da je afinitet miješanog sloja sastavljenog od molekula 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilkolina (POPC) i triglicerida trioleina (TG) u molarnom omjeru 3:1, optimalan za detekciju policikličkih aromatskih ugljikovodika, u usporedbi sa svim ispitivanim lipidnim slojevima sastavljenim od jedne ili više vrsta lipida.
- Miješanim slojem POPC-TG u molarnom omjeru 3:1 uspješno je modificirana površina živine mikroelektrode, koji na voltamogramima kao odziv daje dva karakteristična kapacitetna vrha, povezana s faznim prijelazima. Svojstva ta dva kapacitetna vrha mijenjaju se uslijed interakcije miješanog sloja i molekula PAH-ova, te upravo ove promjene omogućavaju detekciju spomenute interakcije. Pomak potencijala negativnijeg kapacitetnog vrha prema negativnijim vrijednostima potencijala je parametar koji je najosjetljiviji na prisutnost PAH-ova u analiziranim otopinama.
- Uspješno su određene granice detekcije za četiri PAH-a u jednostavnom elektrolitu ( $0,55 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ ,  $\text{pH} = 8,1$ ), te one za antracen, fenantren, piren i fluoranten iznose redom: 0,19, 0,26, 0,14 i 0,26  $\mu\text{g dm}^{-3}$ .
- Utvrđeno je da u morskoj vodi očišćenoj od organske tvari, prisustvo iona magnezija i kalcija ima značajan utjecaj na kapacitetne vrhove miješanog sloja POPC-TG. Unatoč

tome, granice detekcije za antracen, fenantren, piren i fluoranten uspješno su određene i u ovoj matrici, odnosno moru očišćenom od organske tvari, te iznose redom: 0,15, 0,33, 0,35 i 0,32  $\mu\text{g dm}^{-3}$ .

- Utvrđeno je da smjesa četiri analizirana PAH-a, u čistoj morskoj vodi, pokazuje utjecaj na miješani sloj POPC-TG, koji je istovjetan zbroju utjecaja pojedinačnih analiziranih PAH-ova, i uspješno je određena granica detekcije za analiziranu smjesu koja iznosi 0,32  $\mu\text{g dm}^{-3}$ . Na temelju ovog rezultata zaključeno je kako je senzor sposoban detektirati smjesu PAH-ova, dajući podatak o ukupnoj koncentraciji PAH-ova koji interagiraju s miješanim slojem, prisutnih u uzorku.
- Specifičnost miješanog sloja POPC-TG za odabrane molekule PAH-ova potvrđena je analizom odabranih molekula prirodno prisutnih u vodenim uzorcima, točnije dextransa T-500 kao modela za polisaharide, Na-humata huminskih tvari, albumina iz goveđeg seruma proteina, te mješavine lipida ekstrahirane iz uzoraka sjevernog Jadrana kao modela za lipide. Niti jedna od istraživanih molekula ne utječe na miješani sloj POPC-TG.
- Mjerenja su pokazala da piren u prisutnosti Na-humata pokazuje  $75 \pm 5$  % manji utjecaj na miješani sloj POPC-TG, a paralelna analiza uzorka rijeke Save elektrokemijskim sustavom i GC-MS metodom, pokazala je da su rezultati dobiveni elektrokemijskom analizom podcjenjeni za 79 do 83 % u odnosu na rezultate dobivene GC-MS analizom. Iz navedenih podataka zaključeno je da je elektrokemijski senzor pogodan za detekciju odabranih PAH-ova kada se oni nalaze u potpuno otopljenom stanju, odnosno kada nisu adsorbirani na organske čestice niti su u kompleksima s organskim molekulama prisutnim u uzorku. Elektrokemijskim se senzorom mjeri koncentracija potpuno otopljenih PAH-ova, što je izuzetno važno s obzirom da su biodostupni, a time opasni za vodene organizme u kojima se akumuliraju.
- Analiza uzorka sjevernog Jadrana u koji je dodana određena količina pirena, u svrhu daljnje procjene utjecaja kompleksnih matrica na uspješnost analize, ukazuje da je utjecaj pirena na miješani sloj uslijed interferencije organske tvari samo  $45 \pm 5$  % manji od utjecaja pirena na miješani sloj u čistom moru. Iz toga proizlazi zaključak da je uspješna analiza morskih uzoraka te procjena ukupne koncentracije četiri odabrana PAH-a moguća, uz uzimanje u obzir utjecaja organske tvari iz uzorka.

- Specifičnost miješanog monosloja za odabrane molekule PAH-ova potvrđena je i analizom odabranih molekula zagađivala koje bi mogle biti prisutne u vodenim uzorcima, uključujući orto-nitrofenol, 2,4,4'-triklorobifenil (poliklorirani bifenil), klorooctenu kiselinu, okadaičnu kiselinu te tri različita antibiotika (streptomycin, kanamicin i sulfametoksazol). Niti jedna od analiziranih molekula nije imala utjecaj na miješani sloj.
- Iz provedenih mjerenja površinskog tlaka miješanog monosloja POPC-TG u Langmuir Blodgett kadi zaključeno je da su komponente miješanog monosloja međusobno djelomično mješljive te da među njima postoje privlačne interakcije.
- Na temelju rezultata dobivenih kombinacijom Langmuir Blodgett kade i UV-Vis refleksijske spektroskopije, zaključeno je da između fenantrena, odabranog kao predstavnika analiziranih PAH-ova, i miješanog monosloja nanesenog na površinu kade postoji interakcija koja ne uključuje ugradnju molekula fenantrena u monosloj, već adsorpciju na dio monosloja koji se nalazi u elektrolitu.

Provedena istraživanja doprinjela su boljem razumijevanju interakcija između policikličkih aromatskih ugljikovodika i modelne membrane sastavljene od fosfolipida i triglicerida, te pokazala da razvijeni elektrokemijski sustav ima veliki potencijal u analizi stvarnih prirodnih uzoraka, kao sustav koji bi zaista mogao služiti za ranu detekciju povećanih koncentracija ovih zagađivala u vodenom okolišu. Podatci o povećanoj koncentraciji otopljene frakcije smjese antracena, fenantrena, pirena i fluorantena prisutnih u nekom prirodnom uzorku, potaknuli bi daljnja detaljnija mjerenja koncentracija svih prisutnih PAH-ova.



## **7. LITERATURA**

---



## 7. Literatura

- Adamson, A. W. i Gast, A. (1997): *Physical Chemistry of Surfaces*. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA, 784 str.
- Akkanen, J., Tuikka, A. i Kukkonen, J. V. K. (2012): On the borderline of dissolved and particulate organic matter: Partitioning and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 91-98.
- Bach, D., Miller, I. i Robert, F. (1970): Transport of ions across lipoprotein monolayers adsorbed at the polarized mercury/water interface. *Chemistry and Physics of Lipids*, 4(3), 269-288.
- Baumard, P, Budzinski, H., Garrigues, T., Burgeot, Michel, X. i Bellocq, J. (1999): Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Marine and Environmental Research*, 47(5), 415-439.
- Bayona, J. M. i Albaiges, J. (2006): Sources and Fate of Organic Contaminants in the Marine Environment. U: *Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA*. J. K. Volkman, (ur.), Springer, Berlin Heidelberg, 325-370.
- Bockris, J. O'M., Devanathan, A. i Muller, K. (1963): On the Structure of Charged Interfaces. *Proceedings of the Royal Society of London A*, 274, 55-79.
- Boge, G., Lespilette, M., Jamet, D. i Jamet, J.-J. (2013): The relationships between particulate and soluble alkaline phosphatase activities and the concentration of phosphorus dissolved in the seawater of Toulon Bay (NW Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin*, 74(1), 413-419.
- Bond, A. M. (1980): *Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*. Marcel Dekker Inc. New York, USA, 536 str.
- Borneff, J. (1977): Fate of carcinogens in aquatic environment. U: *Fate of pollutants in the air and aquatic environments, part 2*. Sufferr, I.H. (ur.), John Wiley and Sons, New York, USA, 393-408.
- Borsheim, K. Y., Mykkestad, S. M. i Sneli, J.-A. (1999): Monthly profiles of DOC, mono- and polysaccharides at two locations in the Trondheimsfjord (Norway) during two years. *Marine Chemistry*, 63(3-4), 255-272.

- Bott, A. W. (1995): Practical Problems in Voltammetry 3: Reference Electrodes for Voltammetry. *Current Separations*, 14, 64-68.
- Brett, C. M. A. i Brett, A. M. (1993): *Electrochemistry. Principles, Methods, and Applications*. Oxford University Press Inc., New York, USA, 427 str.
- Broniatowski, M. i Dynarowicz-Łatka, P. (2004): Langmuir monolayers from perfluorobutyl-n-eicosane. *Journal of Fluorine Chemistry*, 125, 1501-1507.
- Brukhno, V. A., Akinshina, A., Coldrick, Z., Nelson, A. i Auer, S. (2011) Phase phenomena in supported lipid films under varying electric potential. *Soft Matter*, 7, 1006-1017.
- Bruland, K. W. i Cole, K. H. (1985): Analysis of seawater for dissolved cadmium, copper and lead: An Intercomparison of Voltammetric and Atomic Adsorption Methods. *Marine Chemistry*, 17, 285-300.
- Brunaldi, K., Miranda, M. A., Abdulkader, F., Curi, R. i Procopio, J. (2004): Effects of palmitic acid and cholesterol on proton transport across black lipid membranes. *Bioelectrochemistry*, 65(1), 9-13.
- Bryne, R. H. (2008): Speciation in seawater. U: *Chemical Speciation in the Environment*. A. Ure, C. Davidson (ur.), John Wiley & Sons, New York, USA, 322-357.
- Cacosian, R. B. i Lee, C. (1981): Processes controlling the distribution of biogenic organic compounds in seawater U: *Marine Organic Chemistry*. E. K. Duursma i R. Dawson, (ur.), Elsevier Science Publishing Company, Amsterdam, Nizozemska, 91-123.
- Campas, M., Marty, J. L. (2007): Enzyme sensor for the electrochemical detection of the marine toxin okadaic acid. *Analytica Chimica Acta*. 605(1), 87-93.
- Centi S., Laschi S., Franek M., Mascini M. (2005): A disposable immunomagnetic electrochemical sensor based on functionalised magnetic beads and carbon-based screen-printed electrodes (SPCEs) for the detection of polychlorinated biphenyls (PCBs). *Analytica Chimica Acta*, 538, 205-212.
- Chauhan, A., Rahman, F., Oakeshott, J. G. i Jain, R. K. (2008): Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, 48(1), 95-113.
- Chen, S. i Huang, K. (2000): Ion-Induced Interfacial Dynamics of Phospholipid Monolayers. *Analytical Chemistry*, 72, 2949-2956.



- Chen, Y., Sun, R. i Wang, B. (2011): Monolayer behavior of binary systems of betulinic acid and cardiolipin: Thermodynamic analyses of Langmuir monolayers and AFM study of Langmuir–Blodgett monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 353, 294-300.
- Chin, Y.-P., Aiken, G. i Danielsen, K. M. (1997): Binding of Pyrene to Aquatic and Commercial Humic Substances: The Role of Molecular Weight and Aromaticity. *Environmental Science and Technology*, 31, 1630-1635.
- Chin, Y.-P., Aiken, G. i O'Loughlin, E. (1994): Molecular Weight, Polydispersity, and Spectroscopic Properties of Aquatic Humic Substances. *Environmental Science and Technology*, 28, 1853-1858.
- Coldrick, Z., Penezić, A., Gasparović, B., Steenson, P., Merrifield, J. i Nelson, A. (2011): High throughput systems for screening biomembrane interactions on fabricated mercury film electrodes. *Journal of Applied Electrochemistry*, 41(8), 939-949.
- Coldrick, Z., Steenson, P., Millner, P., Davies, M. i Nelson, A. (2009): Phospholipid monolayer coated microfabricated electrodes to model the interaction of molecules with biomembranes. *Electrochimica Acta*, 54(22), 4954-4962.
- Cotisel, M. T., Zsako, J., Chifu, E. i Quinn, E. J. (1989): Hysteresis in compression-expansion cycles of distearoylmonogalactosylglycerol monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 50, 127-133.
- Crawford, N. F. i Leblanc, R. M. (2014): Serum albumin in 2D: A Langmuir monolayer approach. *Advances in Colloid and Interface Science*, 207, 131-138.
- Cripps, G. C. (1992): The Extent of Hydrocarbon Contamination in the Marine-Environment from a Research Station in the Antarctic. *Marine Pollution Bulletin*, 25, 288-292.
- Cuculić, V., Cukrov, N. Kwokal, Ž., Mlakar, M. (2009): Natural and anthropogenic sources of Hg, Cd, Pb, Cu and Zn in seawater and sediment of Mljet National Park, Croatia. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 3, 311-320.
- Dachs, J., Bayona, J. M., Raoux, C. i Albaiges, J. (1997): Spatial, vertical distribution and budget of polycyclic aromatic hydrocarbons in the western Mediterranean seawater. *Environmental Science & Technology*, 31, 682-688.
- Davies, J. T. i Rideal, E. K. (1963): *Interfacial Phenomena*, Academic Press, New York, 1963. 479 str.

- Delund, L., Jensen, G. V., Hannibal-Bach, H. K. Ejsing, C. S., Pedersen, J. S., Pakkanen i K. I. Ipsen, J. H. (2013): Composition, structure and properties of POPC–triolein mixtures. Evidence of triglyceride domains in phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828, 1909-1917.
- Derieux, S., Fillaux, J. i Saliot, A. (1998): Lipid class and fatty acid distributions in particulate and dissolved fractions in the north Adriatic sea. *Organic Geochemistry*, 29, 1609–1621.
- Duursma, E. K. i Dawson, R. (ur.) (1981): *Marine Organic Chemistry*, Elsevier Science Publishing Company, Amsterdam, 520 str.
- Dynarowicz-Latka, P., Dhanabalanb, A. i Oliviera Jr., O. N. (2001): Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91, 221-293.
- Fernandes, M. B., Sicre, M. A., Broyelle, I., Lorre, A. I Pont, D. (1999): Contamination by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in French and European rivers. *Hydrobiologia*, 410(0), 343-348.
- Gaines, G. L. J. (1966): *Insoluble monolayers at the liquid-gas interfaces*. Interscience, New York, USA, 400 str.
- Gassa, L. M., Vallejo, A. E., Alonso-Romanowski, S. i Vilche, J. R. (1997): Identification of channel membrane processes in bilayer lipid membranes by electrochemical techniques. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 42(2), 187-192.
- Gonzales, J. A. J., Galindo-Riano, M. D. i Garcia-Vargas, M. (2003): Experimental designs in the development of a new method for the sensitive determination of cadmium in seawater by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, 487(2), 229-241.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voros, J. i Reimhult, E. (2008) *Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures*. *Sensors*, 8(3), 1400-1458.
- Grüniger., H., Möbius, D. i Meyer, H. (1983): Enhanced light reflection by dye monolayers at the air-water interface. *The Journal of Chemical Physics*, 79, 3701-3710.
- Handa, T., Saito, M. i Miyajima, K. (1993): Eutectic mixed monolayers in equilibrium with phospholipid-bilayers and triolein-liquid phase. *Biophysical Journal*, 64(6), 1760-1765.

- Hatzianestis, I. i Sklivagou, E. (2002): Dissolved and Suspended Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in the North Aegean Sea. *Mediterranean Marine Science*, 3(1), 89-98.
- Hayes, M. H. B. i Clapp, C. E. (2001): Humic substances: Considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences. *Soil Science*, 166(11), 723-737.
- Health protection: Toxic agent and radiation control, (1983). *Public Health Reports Supplement to the September-October Issue*, 56-69.
- Hellberg, D., Scholz, F., Schauer, F. i Weitschies, W. (2002): Bursting and spreading of liposomes on the surface of a static mercury drop electrode. *Electrochemistry Communications*, 4, 305-309.
- Itoh, T., Tsujii, Y., Fukuda, T. i Miyamoto, T. (1991): Fluorescence Spectroscopy for a Cellulose Trioctadecanoate Monolayer at the Air/Water Interface. *Langmuir*, 7, 2803-2807.
- Jung, A.-V., Frochot, C., Villieras, F., Lartiges, B. S., Parant, S., Viriot, M.-L. i Bersillon, J.-L. (2010): Interaction of pyrene fluoroprobe with natural and synthetic humic substances: Examining the local molecular organization from photophysical and interfacial processes. *Chemosphere*, 80 (3), 228-234.
- Jurak, M. i Conde, J. M. (2013): Characterization of the binary mixed monolayers of  $\alpha$ -tocopherol with phospholipids at the air-water interface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1828(11), 2410-2418.
- Kasem, K. K. i Jones, S. (2008): Platinum as a Reference Electrode in Electrochemical Measurements. *Platinum Metals Review*, 52, 100-106.
- Kaštelan-Macan, M. (2003): *Kemijska analiza u sustavu kvalitete*, Školska knjiga, Zagreb, Hrvatska, 337 str.
- Ke, R. H., Xu, Y. P., Wang, Z. J. i Khan, S. U. (2006): Estimation of the uptake rate constants for polycyclic aromatic hydrocarbons accumulated by semipermeable membrane devices and triolein-embedded cellulose acetate membranes. *Environmental Science and Technology*, 40(12), 3906-3911.
- Khandelia, H., Delund, L., Pakkanen, K. I. i Ipsen, H. J. (2010): Triglyceride Blisters in Lipid Bilayers: Implications for Lipid Droplet Biogenesis and the Mobile Lipid Signal in Cancer Cell Membranes. *PLoS ONE*, 5(9), e12811.

- Kirstein, D., Kirstein, L., Scheller, F., Borchering, H., Ronnenberg, J., Diekmann, S. and Steinrucke, P. (1999): Amperometric nitrate biosensors on the basis of *Pseudomonas stutzeri* nitrate reductase. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 474, 43-51.
- Klevens, H. B. (1950): Solubilization of polycyclic hydrocarbons. *Journal of Physical Chemistry*, 54(2), 283-298
- Kozarac, Z., Čosović, B., Möbius, D. i Budach, W. (1997): Adsorption of Pyrene at Model Hydrophobic Interfaces. *Croatica Chemica Acta*, 70(1), 125-139.
- Krahn, M. M., Herman, D. P., Ylitalo, G. M., Sloan, C. A., Burrows, D. G., Hobbs, R. C., Mahoney, B. A., Yanagida, G. K., Calambokidis J. i Moore, S. E. (2004): Stratification of lipids, fatty acids and organochlorine contaminants in blubber of white whales and killer whales. *Journal of Cetacean Research and Management*, 64, 175-189.
- Landrum, P.F., Nihart, S. R., Eadie, B. J. i Gardner, W. S. (1984): Reverse-phase separation method for determining pollutant binding to Aldrich humic-acid and dissolved organic-carbon of natural-waters. *Environmental Science and Technology*, 18(3), 187-192.
- Law, R. J., Dawes, V. J., Woodhead, R. J. i Matthiessen, P. (1997): Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in seawater around England and Wales. *Maine Pollution Bulletin*, 34(5), 306-322.
- Li, K. L., Cherryl, A. T., Guo, M. i Stark, R. E. (1993): Multinuclear and magic-angle-spinning NMR investigations of molecular organization in phospholipid-triglyceride aqueous dispersions. *Biochemistry*, 32(38), 9926-9935
- Li, K., Woodward, L. A., Karu, A. E. i Li, Q. X. (2000): Immunochemical detection of polycyclic aromatic hydrocarbons and 1-hydroxypyrene in water and sediment samples. *Analytica Chimica Acta*, 419(1), 1-8.
- Lin, Y. Y., Liu, G. D., Wai, C. M. i Lin, Y. H. (2007): Magnetic beads-based bioelectrochemical immunoassay of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Electrochemistry Communications*, 9(7), 1547-1552.
- Libes S. M. (2009): *Introduction to Marine Biogeochemistry*, Elsevier Academic Press, Burlington, Massachusetts, 909 str.

- Limura, K.-I. i Kato, T. (2012): Langmuir–Blodgett (LB) Film. U: Organized Organic Ultrathin Films: Fundamentals and Applications. K. Ariga (ur.) John Wiley & Sons, Inc. New York, USA, 43-106.
- Lovrić, Š. (2010) Working Electrodes U: Electroanalytical Methods. F. Scholz (ur.), Springer, Berlin, Germany, 273-290.
- Ma, J. P., Xiao, R. H., Li, J. H., Yu, J. B., Zhang, Y. Q. i Chen, L. X. (2010): Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as adsorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(34), 5462-5469.
- Mackay, D. i Shiu, W. Y. (1977): Aqueous Solubility of Polynuclear Aromatic-Hydrocarbons. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 22, 399-402.
- Maldonado, C., Bayona, J. i Bodineau, L. (1999): Sources, Distribution, and Water Column Processes of Aliphatic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Northwestern Black Sea Water. *Environmental Science and Technology*, 33(16), 2693-2702.
- May, W. E., Wasik, S. P. i Freeman, D. H. (1987): Determination of Solubility Behavior of Some Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons in Water. *Analytical Chemistry*, 59, 175-179.
- Maybeck, M. (1982): Carbon, nitrogen, and phosphorus transport by world rivers. *American Journal of Science*, 282, 401-450.
- Micelli, S., Gallucci, E., Meleleo, D., Stipani, V. i Picciarelli, V. (2002): Mitochondrial porin incorporation into black lipid membranes: ionic and gating contribution to the total current. *Bioelectrochemistry*, 57(2), 97-106.
- Miller, I. R. (1968): Ion Transport through Monolayers and Interfacial Films. *The Journal of General Physiology*, 52, 209-226.
- Miller, I. R. i Great, H. (1970): Transport of Ions across Lipid Monolayers. 3. Temperature Dependence of Surface Properties and Permeability of Decylammonium Monolayers at Mercury/Water Interface. *Electrochimica Acta*, 15(7), 1143-1154.
- Mitsche, M. A., Wang, L. i Small, D. (2010): Adsorption of Egg-PC to an Air/Water and Triolein/Water Bubble Interface: Use of the 2-Dimensional Phase Rule to Estimate the Surface Composition of a Phospholipid/Triolein/Water Surface as a Function of Surface Pressure. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(9), 3276-3284.

- Mohamadi, S., Tate, D., Vakurov, A., Nelson, A. (2014): Electrochemical screening of biomembrane-active compounds in water. *Analytica Chimica Acta*, 813, 83–89.
- Moncelli, M. R., Becucci, L. i Guidelli, R. (1994): The Intrinsic pKa Values for Phosphatidylcholine, Phosphatidylethanolamine, and Phosphatidylserine in Monolayers Deposited on Mercury Electrodes. *Biophysical Journal*, 66, 1969-1980.
- Neff, J. M. (1979): *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. Applied Science Publishers, London, 262 str.
- Nelson, A. (2001): Conducting gramicidin channel activity in phospholipid monolayers. *Biophysical Journal*, 80(6), 2694-2703.
- Nelson, A. i Auffret, N. (1988): Phospholipid Monolayers of Di-Oleoyl Lecithin (Di-O-Pc) at the Mercury Water Interface - Effects on Faradaic Reactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 248(1), 167-180.
- Nelson, A. i Benton, A. (1986): Phospholipid Monolayers at the Mercury Water Interface. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 202(1-2), 253-270.
- Nelson, A. i Leermakers, F. A. M. (1990): Substrate-induced structural-changes in electrode-adsorbed lipid-layers – experimental evidence from the behavior of phospholipid layers on the mercury water interface. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 278, 73-83.
- Nelson, A., Auffret, N. i Borlakoglu, J. (1990): Interaction of Hydrophobic Organic-Compounds with Mercury Adsorbed Dioleoylphosphatidylcholine Monolayers. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1021(2), 205-216.
- Nelson, A., Auffret, N. i Readman, J. (1988): Initial applications of phospholipid-soavted mercury electrodes to the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons and other organic micropollutants in aquatic systems. *Analytica Chimica Acta*, 207, 45-47.
- Notter, R. H., Taubold, R. i Mavis, R. D. (1982): Hysteresis in Saturated Phospholipid Films and Its Potential Relevance for Lung Surfactant Function In Vivo. *Experimental Lung Research*, 3, 109-127.
- Ogrinc, N., Markovics, R., Kanduč, T., Walter, L. M. i Hamilton, S. K. (2008): Sources and transport of carbon and nitrogen in the River Sava watershed, a major tributary of the River Danube. *Applied Geochemistry*, 23, 3685-3698.

- Ohnishi, M., Ishimoto, C. i Seto, J. (1995): Observation of the Adsorption of Cytochrome c and Glucose Oxidase onto an Amphiphilic Monolayer at an Air/Water Interface by the Reflection Spectroscopy of Visible Radiation. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 68, 230-236.
- Pagano, R. E. i Miller, I. R. (1973): Transport of Ions across Lipid Monolayers. 4. Reduction of Polarographic Currents by Spread Monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 45(1), 126-137.
- Panagiotopoulos, C. i Sempere R. (2005): Analytical methods for the determination of sugars in marine samples: A historical perspective and future directions, *Limnology and Oceanography: Methods*, 3, 419-454.
- Penezić, A., Gašparović, B., Burić, Z. i Frka, S. (2010): Distribution of marine lipid classes in salty Rogoznica Lake (Croatia). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 86, 625–636.
- Penezić, A., Gašparović, B., Stipaničev, B., Nelson, A. (2014): In situ electrochemical method for detecting freely dissolved polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Environmental Chemistry*, 11, 173-180.
- Poster, D. L., Schantz, M. M., Sander, L. C., i Wise, S. A. (2006): Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(4), 859-881.
- Plaza, C., Xing, B., Fernandez, J. M., Senesi, N. i Polo, A. (2009): Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by humic acids formed during composting. *Environmental Pollution*, 157(1), 257-263.
- Rav-Acha, C. i Rebhun, M. (1992): Binding of organic solutes to dissolved humic substances and its effects on adsorption and transport in the aquatic environment. *Water Research*, 26, 1645-1654.
- Rice, J. A. i MacCarthy, P. (1991): Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Organic Geochemistry*, 17(5), 635-648.
- Roldan-Carmona, C., Rubia – Paya, C., Perez-Morales, M., Martin-Romero, M. T., Giner-Casares, J. J., Camacho, L. (2014): UV-Vis reflection spectroscopy under variable angle incidence at the air–liquid interface. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16, 4012-4022.

- Romankevich, E.A., *Geochemistry of Organic Matter in the Ocean.*, 1984, Springer - Verlag, Berlin, 334 str.
- Saito, Y. i Hayano, S. (1980): Distribution of Oxygen-Containing Functional Groups and Elements in Humic Acids from Marine Sediments. *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, 36, 59-67.
- Seimiya, A. i Ohki, S. (1973): Ionic structure of phospholipid membranes, and binding of calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 298, 546-561.
- Sessa, G. i Weissmann, G. (1967): Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of Lipid Research*, 9, 310-318.
- Shi, Z., Tao, S., Pan, B., Liu, W. X. i Shen, W. R. (2007). Partitioning and source diagnostics of polycyclic aromatic hydrocarbons in rivers in Tianjin, China. *Environmental Pollution*, 146, 492-500
- Sikkema, J., De Bont, J. A. M. i Poolman, B. (1995): Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59(2), 201-222.
- SkopinsteV, B. A. (1981) Decomposition of organic matter of plankton, humification and hydrolysis. U: *Marine Organic Chemistry*. E. K. Duursma i R. Dawson, (ur.), Elsevier Science B.V. Amsterdam, 125-178.
- Stoodley, R.; Shepherd, J.; Wasan, K. M.; Bizzotto, D. (2002): Amphotericin B interactions with a DOPC monolayer. *Electrochemical investigations. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1564(1), 289-297.
- Sudheesh, S., Ahmad, J. i Singh, G. S. (2012): Hysteresis of Isotherms of Mixed Monolayers of N-Octadecyl-N'-phenylthiourea and Stearic Acid at Air/Water Interface. *International Scholarly Research Notices Physical Chemistry*, Article ID 835397, 6 str.
- Tao, Y. Q., Zhang, S. Z., Wang, Z. J., Ke, R. H., Shan, X. Q. i Christie, P. (2008): Biomimetic accumulation of PAHs from soils by triolein-embedded cellulose acetate membranes (TECAMs) to estimate their bioavailability. *Water Research*, 42(3), 754-762.
- Tao, Y.Q., Xue, B., Yao, S. C., Deng, J. C. i Gui, Z. F. (2012): Triolein embedded cellulose acetate membrane as a tool to evaluate sequestration of PAHs in lake sediment core at large temporal scale. *Environmental Science and Technology*, 46(7), 3851-3858.
- Ter-Minassuan-Saraga, L. (1985): Penetration into insoluble monolayers. 1. A semiopen system behavior. *Langmuir*, 1(4), 391-394.



- Thompson, M. i Krull, U. J. (1982): Bilayer lipid membrane electrochemistry in a flow injection system. *Analytica Chimica Acta*, 142, 207-216.
- Thurman, E.M. (1985): *Organic geochemistry of natural waters*. Springer Science & Business Media, 497 str.
- Toimil, P., Gerardo, P., Minones J. Jr. i Sarmiento, F. (2010): A comparative study of F-DPPC/DPPC mixed monolayers. Influence of subphase temperature on F-DPPC and DPPC monolayers. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12, 13323-13332.
- Tuskanova, V., Lavoie, H., Harata, A., Ogawa, T. i Salesse, C. (2002): Microscopic Organization of Long-Chain Rhodamine Molecules in Monolayers at the Air/Water Interface. *Journal of Physical Chemistry B*, 106, 4203-4213.
- Vakurov, A., Galluzzi, M., Podesta, A., Gamper, N., Nelson, A. L. i Connell, S. D. A. (2014): Direct Characterization of Fluid Lipid Assemblies on Mercury in Electric Fields. *ACS Nano*, 8(4), 3242-3250.
- Van Velzen, C. J., Sluyters-Rehbach, M., Remijnse, A. G. i Brug, G. J. (1982): The electrochemical reduction of oxygen to hydrogen peroxide at the dropping mercury electrode. Part I. Its Kinetics at  $6.5 < \text{pH} < 12.5$ . *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 134, 87-100.
- Vlada Republike Hrvatske (2013): Uredba o standardu kakvoće vode. *Narodne novine* 73/2013.
- Wang, H. B. i Zhang, Y. J. (2014): Mechanisms of interaction between polycyclic aromatic hydrocarbons and dissolved organic matters. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 49, 78-84.
- Wang, J.-Z., Nie, Y.-F., Luo, X.-L., Zeng, E. Y. (2008): Occurrence and phase distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in riverine runoff of the Pearl River Delta, China. *Marine Pollution Bulletin*, 57, 767-774.
- Wei, M.Y., Wen, S.D., Yang, X.Q. i Guo, L.H. (2009) Development of redox-labeled electrochemical immunoassay for polycyclic aromatic hydrocarbons with controlled surface modification and catalytic voltammetric detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(9), 2909-2914.

- Widayati, S., Stephens, S. M. i Dluhy, R. A. (1997): Internal Reflectance IR Spectroscopy of Langmuir Monolayer Films at the Air-Water Interface. Progress in Fourier Transform Spectroscopy, Mikrochimica Acta Supplement, 14, 679-681.
- Wodzinski, R. S. i Coyle, J. E. (1974): Physical State of Phenanthrene for Utilization by Bacteria. Applied Microbiology, 27(6), 1081-1084.
- Wu, Y. L., Wang, X. H., Li, Y. Y. I Hong, H. S. (2011): Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in seawater from the Western Taiwan Strait, China. Marine Pollution Bulletin 63(5-12), 459-463.
- Xia, X., Zhai, Y., i Dong, J. (2013): Contribution ratio of freely to total dissolved concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in natural river waters. Chemosphere, 90(6), 1785-1793.

## 8. ŽIVOTOPIS I POPIS ZNANSTVENIH RADOVA



## **8. Životopis i popis znanstvenih radova**

### **Osobni podaci**

- Ime i prezime: Abra Penezić
- Datum i mjesto rođenja: 20. 2. 1986., Zagreb, Hrvatska

### **Obrazovanje:**

- 2009. upisala doktorski studij Oceanologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- 2004. - 2008. diplomirani inženjer kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- 2004. Opća gimnazija Antuna Gustava Matoša, Zabok

### **Usavršavanje:**

- 7. 10. - 1. 11. 2013. Interdisciplinary Research Institute, Lille, Francuska.
- 10. - 17. 7. 2011. Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Golm, Njemačka.
- 2009. - 2011. (4 boravka od ukupno 11 tjedana) University of Leeds, Leeds, Velika Britanija.

### **Radno iskustvo:**

- od 8. 5. 2009. Znanstvena novakinja u Laboratoriju za fizičku kemiju vodenih sustava (LFKVS), Zavod za istraživanje mora i okoliša (ZIMO), Institut Ruđer Bošković (IRB).
- 12. 01. 2009. - 7. 5. 2009. Znanstvena suradnica, LFKVS, ZIMO, IRB.

### **Sudjelovanje na radionicama i konferencijama:**

- COST Action MP1202 General Meeting, Istanbul, Turska, 15. - 17. 9. 2014.
- Matrafured '14 International Conference on Electrochemical Sensors, 15. - 20. 6. 2014.
- Četvrti ISE Satelitski studentski regionalni elektrokemijski kongres, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska, 4. 4. 2014.
- COST Action M1202 Workshop, Urbino, Italija, 3.-5. 3. 2014.
- Treći ISE Satelitski studentski regionalni elektrokemijski kongres, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska, 5. 4. 2013.
- Workshop voltammetry and GEOTRACES COST Action, Šibenik, Hrvatska, 6. - 9. 10. 2012.
- Third Regional Symposium on Electrochemistry, Bukurešt, Rumunjska, 13. - 17. 5. 2012.
- Drugi ISE Satelitski studentski regionalni elektrokemijski kongres, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska, 26. 4. 2012.
- 2nd International Conference on Bio-Sensing Technology 2011, Amsterdam, Nizozemska, 10. - 12. 10. 2011.
- Simpozij mladih znanstvenika na Institutu Ruđer Bošković, Znanstveni susreti treće vrste, Zagreb, Hrvatska, 7.- 8. 7. 2011.

- Prvi ISE Satelitski studentski regionalni elektrokemijski kongres, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska, 3. 3. 2011.
- XXII. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Zagreb, Croatia, 13. – 16. 2. 2011.
- 61st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Nice, Francuska, 26. 09. - 1.10. 2010.

#### **Usmena izlaganja izvan konferencija:**

- Interdisciplinary Research Institute, Lille, Francuska, “Developing an in-situ electrochemical method for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon detection” 29.10.2013.
- Final meeting of the NATO SfP 983147 project, Dubrovnik, Hrvatska, “Sensing of polycyclic aromatic hydrocarbons in waters using model biomembranes” 17 - 18. 5. 2011.

#### **Znanstveni radovi objavljeni u časopisima koje citira baza Current Content**

- Penezić, Abra; Deokar, Geetanjali; Vignaud, Dominique; Pichonat, Emmanuelle; Subramanian, Palaniappan; Gašparović, Blaženka; Boukherroub, Rabah; Szunerits, Sabine. Carbohydrate-lectin interaction on graphene-coated surface plasmon resonance (SPR) interfaces. // *Plasmonics*. 9 (2014), 3; 677-683.
- Penezić Abra; Gašparović Blaženka; Stipaničev Draženka; Nelson Andrew. In-situ electrochemical method for detecting freely dissolved polycyclic aromatic hydrocarbons in waters. // *Environmental chemistry*. 11 (2014), 2; 173-180.
- Gašparović, Blaženka; Godrijan, Jelena; Frka, Sanja; Tomažić, Igor; Penezić, Abra; Marić, Daniela; Djakovac, Tamara; Ivančić, Ingrid; Paliaga, Paolo; Lyons, Daniel; Precali, Robert; Tepić, Nataša. Adaptation of marine plankton to environmental stress by glycolipid accumulation. // *Marine environmental research*. 92 (2013), 120-132.
- Marić, Daniela; Frka, Sanja; Godrijan, Jelena; Tomažić, Igor; Penezić, Abra; Djakovac, Tamara; Vojvodić, Vjeročka; Precali, Robert; Gašparović, Blaženka. Organic matter production during late summer-winter period in a temperate sea. // *Continental shelf research*. 55 (2013); 52-65.
- Coldrick, Zachary; Penezić, Abra; Gašparović, Blaženka; Steenson, Paul; Merrifield, Jon; Nelson, Andrew. High throughput systems for screening biomembrane interactions on fabricated mercury film electrodes. // *Journal of applied electrochemistry*. 41 (2011), 8; 939-949.
- Penezić, Abra; Gašparović, Blaženka; Burić, Zrinka; Frka, Sanja. Distribution of marine lipid classes in salty Rogoznica Lake (Croatia). // *Estuarine, coastal and shelf science*. 86 (2010); 625-636.

## Sažeci u zbornicima skupova

- Penezić, Abra; Gašparović, Blaženka; Stipaničev, Draženka; Nelson, Andrew. Developing an Electrochemical Sensor for the Detection of Dissolved Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water // *Book of Abstracts Matrafured 2014 International Conference on Electrochemical Sensors, Visegrad, Hungary*. 87-87 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- Risović, Dubravko; Penezić, Abra; Gašparović, Blaženka. Tuning of surface free energy of supported mixed lipid monolayers for sensor applications // *ECOSS30 European Conference on Surface Science, 31 August-5. September 2014, Antalya, Turkey, BOOK of ABSTRACTS / Suzer, Sefik (ur.)*. Ankara : The Scientific And Technological Research Council of Turkey, 2014. 418-418 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- Risović, Dubravko; Gašparović, Blaženka; Penezić, Abra. Surface free energy of self-assembled pure and mixed lipid layers // *19th International Vacuum Congress / ICN+T 2013, Paris, Sept. 9-13, 2013. Abstracts Book: T13 Surface Science*. 2013. 1999-1999 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- Penezić, Abra; Gašparović, Blaženka; Tate, Daniel; Coldrick, Zachary; Nelson, Andrew. Developing an in-situ electrochemical method for PAH detection // *Program and Book of Abstracts of The Third Regional Symposium on Electrochemistry South-East Europe / Ungureanu, Eleonora M. (ur.)*. Bukurešt : Romanian Chemical Society, 2012. 52-52 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- Penezić, Abra; Gašparović, Blaženka; Tate, Daniel; Coldrick, Zachary; Nelson, Andrew. Mixed lipid monolayer electrochemical biosensor for detection of lipophilic pollutants in aquatic environment // *Abstracts of the 2nd International Conference on Bio-Sensing Technology*. Amsterdam (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- Gašparović, Blaženka, Penezić, Abra, Coldrick, Zachary, Nelson, Andrew. Sensing of aquatic pollutants: mixed lipid monolayers as a sensing template // *Abstract book of the 43rd IUPAC World Chemistry Congress 2011*. Puerto Rico : IUPAC, 2011. 288-288 (predavanje, sažetak, znanstveni).
- Gašparović, Blaženka; Frka, Sanja; Penezić, Abra. Surface active organic substances characterization in the sea surface microlayers // *What is the sea surface microlayer? Towards a unified physical, chemical and biological definition of the air-ocean interface / Cunliffe, Michael (ur.)*. Plymouth, UK : The marine biological association of the United Kingdom, 2011. 6-6 (pozvano predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- Penezić, Abra; Gašparović, Blaženka; Coldrick, Zachary; Nelson, Andrew. Lipidni monoslojevi ceramida i derivata masnih kiselina za elektrokemijsko detektiranje lipofilnih vodenih zagađivala i toksina // *Knjiga sažetaka XXII. Hrvatskog skupa kemičara i kemijskih inženjera / Tomašić, V., Maduna Valkaj, K. (ur.)*. Kutina : HDKI, Kemija u industriji, 2011. 305-305 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

- Coldrick, Zachary; Nelson, Andrew N.; Steenson, Paul; Penezić, Abra; Gašparović, Blaženka. Potential Induced Desorption, Adsorption and Real Time Monitoring of Organised Phospholipid Structures on Mercury Electrodes // *Presentation program* / B. Tribollet (ur.). Nica, Francuska : ISE, 2010. 181-181 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- Gašparović, Blaženka; Frka, Sanja; Penezić, Abra; Risović, Dubravko; Coldrick, Zachary; Nelson, Andrew L. The study of ceramide adsorption at the mercury/electrolyte and air/water interfaces // *Presentation program* / B. Tribollet (ur.). Nica, Francuska : ISE, 2010. 67-67 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- Penezić, Abra; Nelson, Andrew; Coldrick, Zachary; Gašparović, Blaženka. A lipid system ceramide-fatty acid as a sensing material to detect lipophilic aquatic pollutants // *Presentation program of the 61st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry* / Tribollet, Bernard (ur.). Nica : ISE, 2010. 14-14 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

### **Diplomski rad**

- Penezić, Abra. Raspodjela lipida u vodenom stupcu Rogozničkog jezera u rano proljeće i ljeto Zagreb: PMF, 2008. Voditeljice: N. Galić i B. Gašparović